

動物実験を用いた慢性的低線量内部被ばくによる突然変異と

発がんの非相関性のメカニズム解明

セシウム 137 放射線に被ばくした *Msh2* 遺伝子改変マウスを用いた

個体レベルの突然変異の解析

大野みずき（九州大学・医学研究院・基礎放射線医学分野・助教）

中津可道（九州大学・医学研究院・基礎放射線医学分野・准教授）

研究要旨

放射線被ばくによる生物影響を考える際には生体内での様々な反応機構を踏まえ実験的データに基づき科学的に議論する必要がある。特に遺伝情報を担う DNA への影響を定量的に解析することは重要で、被ばく個体の健康だけでなくその子の健康をも守ることに繋がる重要な基礎データとなる。しかし、哺乳動物を用いた内部被ばくの実験的解析例は少なく基礎データも十分ではない。

そこで我々はセシウム 137 の経口摂取による内部被ばくの生体影響を効率的に評価するために、*rpsL* レポーター遺伝子をゲノムに導入した「高感度体細胞突然変異検出用マウス」を用いた解析系の検討を行なった。低 LET 放射線の生物作用では、細胞内成分と反応して発生する活性酸素種による間接作用の寄与が大きいため、本研究では酸化 DNA 損傷の修復にも関与する DNA ミスマッチ修復の機構を欠損させた遺伝子改変マウスを解析に用いた。

rpsL レポーター遺伝子を持つ野生型並びに *Msh2* 遺伝子欠損マウスに、生後 4 週齢から 8 週齢までセシウム 137 の飲水投与を 4 週間行い、その後 2 週間の通常飼育の後、臓器を摘出し保存した。内部被ばくの影響を直接受ける小腸組織を対象に変異解析を行った。当該年度はさらにマウスの匹数を増やして変異データの収集と変異スペクトルの解析を行った。野生型マウスでは酸化剤またはセシウム 137 投与による誘発突然変異は非投与コントロール群に比較してわずかに増加したものの有意差は認められなかったが、一方で *Msh2* 遺伝子欠損マウスでは高線量被ばくグループで突然変異頻度の有意な上昇が見られた。本実験系によりセシウム 137 の経口摂取により生体内で誘発された突然変異を高効率で定量的・定性的に検出することが可能であり、さらに実験に用いるマウスの個体数を、野生型マウスを用いる場合と比較して、大幅に減らすことが可能になると考えられた。ミスマッチ修復機構が正常に働く野生型マウスではセシウム 137 の内部被ばくによる誘発突然変異は非常に低く抑えられていることが示された。

研究協力者

中島裕美子 (九州大学アイソトープ総合センター・教授), 續輝久 (九州大学・名誉教授)

I. 研究目的

本研究はセシウム 137 の経口摂取による内部被ばくの生体影響を効率的に評価することが可能な実験系の検討を行うこと、また化学物質暴露後と放射線被ばく後の突然変異や生体反応の違いを明らかにすることを目的としている。

これまでに我々は、独自に樹立した DNA 修復系に関連する種々の遺伝子改変マウスを用いて、様々な環境ストレスによって生じる酸化 DNA 損傷が、がんを引き起こす原因になることを明らかにしてきた¹⁻⁶⁾。一般に「がん」は体細胞に生じた突然変異が原因で細胞増殖の制御機構が破綻し増殖を繰り返す状態であると考えられることから、体細胞突然変異頻度の上昇は発がん頻度の指標となる。我々はこれまでに大腸菌の *rpsL* 遺伝子を含むシャトルベクターをマウスゲノムに組み込むことで、マウス体内で起こった体細胞突然変異を効率的に検出する方法 (*rpsL* アッセイ) を確立しており^{3,8)}、定量的・定性的な解析が可能なが大きな利点である。

DNA ミスマッチ修復に関わる *Msh2/MSH2* 遺伝子はヒトの遺伝性非ポリポーシス大腸がんの原因遺伝子の一つで、この遺伝子のホモ欠損マウスは DNA ミスマッチ修復機構の不全により 6 ヶ月齢程度で胸腺リンパ腫や消化管がんを自然発症する。このマウスに酸化剤である臭素酸カリウム (KBrO_3) の 0.2% 水溶液を 16 週間与えると、小腸に十数個の腫瘍が発生する⁶⁾。一方 4 週間の投与期間ではまだ腫瘍は形成されていないが、すでに突然変異頻度が上昇していることを見出している (大野未発表、論文準備中)。酸化ストレスが DNA 損傷を誘発し、体細胞突然変異頻度を上昇させ、結果として発がん頻度の上昇につながることを示唆されている。*Msh2* 遺伝子欠損マウスは通常飼育下でも野生型に比較して約 20 倍程度高い自然突然変異頻度を示すことから、野生型マウスでは検出感度以下の低線量・低線量率放射線被ばくによるゲノム変異が定量的に解析できるのではないかと期待された。実際に先行研究としてセシウム 137 水を 4 週間に渡り 2.5KBq/ml の自由飲水で投与 (初回投与時のみ 4KBq/g 体重を強制投与) した *Msh2* 遺伝子欠損マウスの小腸では、0.15% KBrO_3 (顕著に腫瘍が誘発される濃度) 投与時の変異頻度と同程度まで上昇していた。しかし予想に反して、等線量またはそれ以上の X 線を外部照射された *Msh2* 遺伝子欠損マウスの小腸では 16 週以降でも腫瘍の発生が認められなかった⁷⁾ (放医研 石原による実験より)。放射線被ばくと化学物質による酸化ストレス負荷では腫瘍発生に関して異なる経路をたどる可能性が示唆され、それらの分子メカニズムを明らかにする必要があると考えられた。

そこで本研究では、セシウム 137 の投与量による消化管の突然変異頻度の変化を検証し、より正確に解析するためにさらにマウス個体数を増やして突然変異解析実験を進める。また *Msh2* 遺伝子欠損マウスの放射線による腫瘍形成実験はこれまで外部照射でのみ行われたので、さらにセシウム 137 経口投与による発がんの解析を行う。中島 (大阪大学) は放射線被ばく後と化学物質暴露後に生じる発がん頻度の違いを明らかにするために、遺伝子発現解析を計画しており、そのため九州大学では通常飼育されたマウスおよび 0.15% KBrO_3 を投与した野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスの臓器サンプルを採取し保存、大阪大学に提供する。セシウム 137 の投与後のサンプルは大阪大学で採取する。

また、内部被ばくの継世代影響を解析する目的で、セシウム 137 を投与したオスの *Msh2* 遺伝子欠損マウスを野生型メスと交配し、得られた仔と親の DNA を用いて次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い *de novo* 生殖細胞変異の検出を計画している。野生型マウスの世代あたりの突然変異率は非常に低いため、十分なデータ量を得るためには莫大な匹数を必要とするが、自然突然変異率が高い *Msh2* 遺伝子欠損マウスでは少ない匹数でセシウム 137 により誘発された生殖細胞変異が検出できる可能性があり、線量依存的な定量的結果が期待できる。

II. 研究方法

1. 研究の役割分担と年度の研究計画概要

本研究では、セシウム 137 の内部被ばくの生体影響についての解析を行うため、野生型マウスおよび *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて、酸化剤である KBrO_3 投与群との比較を行いながら以下の項目の解析を行う。

解析ワークフローと役割分担を以下の図 II-1 に示す。目的の遺伝子マウスと交配計画の概要を図 II-2 に示す。

- ①体細胞突然変異解析 (*rpsL* アッセイ)：各実験群のマウスの正常小腸組織中の体細胞突然変異の頻度とスペクトルの解析を行う。(2019-2021 年度)
- ②腫瘍のゲノム解析：*Msh2* 遺伝子欠損マウスの KBrO_3 長期投与群で発生した小腸腫瘍と同一個体の正常組織を用いて次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い、腫瘍特異的体細胞変異の検出を行う。(2019-2021 年度)
- ③遺伝子発現解析、生化学的解析：各実験群あたり 3 匹のマウスの正常小腸組織を用いてマイクロアレイまたは RNAseq 解析を行い遺伝子発現パターンの解析を行う。各実験群あたり複数匹のマウスの血漿を用いてサイトカインなどを含む生化学的解析を行う。(2019-2021 年度)
- ④生殖細胞変異解析：各実験群の雄マウスを野生型メスマウスと交配し生まれた仔の組織を用いて次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い、親のゲノムとの比較により *de novo germline mutation* の検出を行う。(2020-2021 年度)

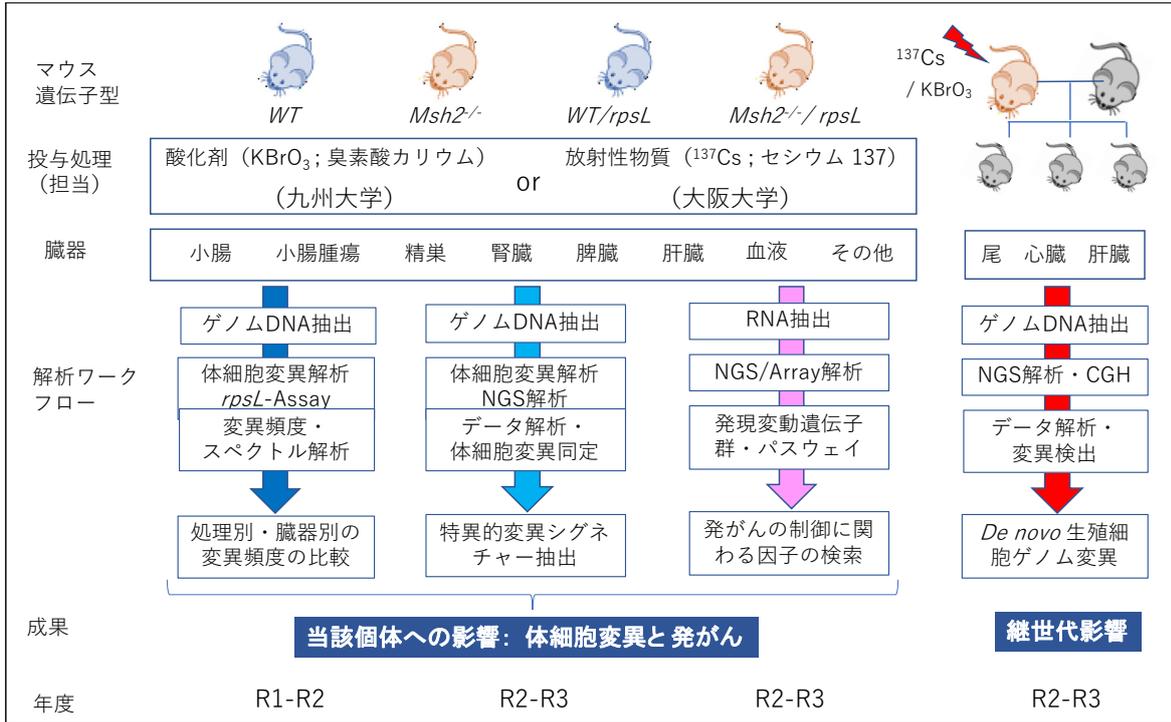


図 II-2 被ばく個体の生体影響と継世代影響の解析ワークフローと役割分担

2. 高感度変異検出用マウスの作出

九州大学の動物実験施設で既に樹立して系統維持している *Msh2* 遺伝子改変マウスと大腸菌の *rpsL* 遺伝子を含むシャトルベクターを遺伝子導入した変異解析用マウスを交配し、*rpsL* シャトルベクターを有し、*Msh2* 遺伝子欠損アレルをホモで持つ高感度変異検出用マウス (*Msh2*^{-/-}, *rpsL*-Tg⁺)、および、野生型マウス (*Msh2*^{+/+}, *rpsL*-Tg⁺) を交配により同時期に複数匹作出するための交配計画をたて目的のマウスの作出を行った。目的の遺伝子型マウスを大阪大学に輸送し、セシウム 137 投与や外部照射を行なった。

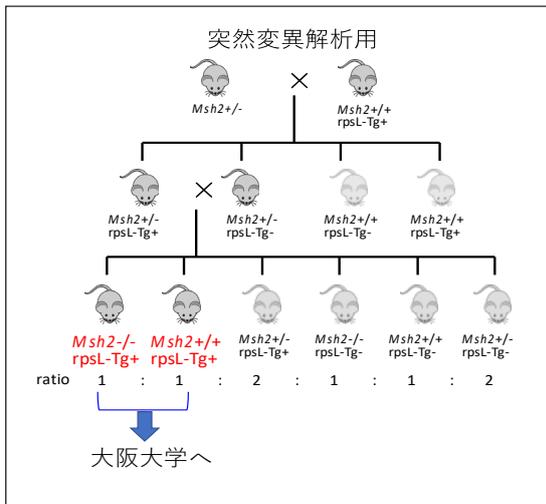


図 II-2 高感度変異検出用マウスの作出方法

3. セシウム 137 または KBrO_3 の投与および γ 線外部照射の短期照射プロトコールと臓器サンプリング

マウスは生後3週齢の時点で遺伝子型を決定し、生後4週齢で大阪大学に移送した。大阪大学では、RI 実験施設においてセシウム 137 の投与を行った。投与実験が終了した時点で全てのマウスを解剖し、臓器を摘出し凍結後、九州大学に返送した。九州大学では、同様の遺伝子型マウスを使用して、セシウム投与と同じタイムコースで対照実験としての KBrO_3 投与および非投与コントロール群として通常の水での飼育を行い、同様に臓器を摘出して保存した。投与プロトコールと実験群を以下の図 II-3 に示す。2020 年度は大阪大学にてセシウム 137 の飲水投与による内部被ばくとほぼ同じ線量になるように野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスに γ 線の外部照射群を作成した（図 II-4, E 群）。また、図の投与プロトコールに加えて週齢の影響を確認するため、A, B, D 群と同様の方法で投与開始週齢を生後8週齢、投与終了12週齢、解剖14週齢にした実験群を準備した。

- A 群： コントロール（自由飲水、通常飼育）
- B 群： 0.15%臭素酸カリウム（酸化剤）投与群（自由飲水）
- C 群： 2.5KBq/ml セシウム 137 投与群（自由飲水）
- D 群： 初日に 4KBq/g 体重を強制飲水、2.5KBq/ml セシウム 137 投与群（自由飲水）、
（推定積算線量は C 群の約 2 倍）
- E 群： γ 線外部照射（（線量率 2.74mGy/日、総線量 76.72mGy, D 群とほぼ同程度）

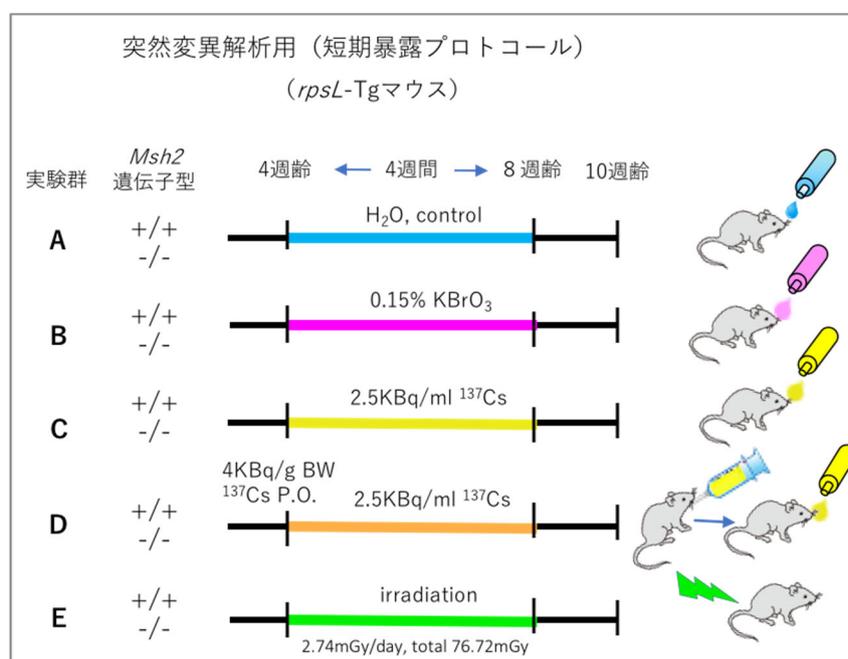


図 II-3 各実験群と突然変異解析用の投与プロトコール

4. 高感度体細胞変異検出用マウスを用いた突然変異解析

今回使用した野生型及び *Msh2* 遺伝子欠損マウスには、変異検出用シャトルベクター（大腸菌由来 *rpsL* 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を含む）がゲノム中に組み込まれている。単一ベクターは約 3 kb でタンデムに約 100 コピー連結した状態で導入されている。この DNA 領域をマウスゲノム DNA から切り出して回収し、マウス体内で *rpsL* 遺伝子上に生じた変異を、大腸菌プレート上でストレプトマイシン耐性の表現型を指標にして検出する。カナマイシンとストレプトマイシンは抗生物質であり、それらに対する耐性遺伝子を獲得した大腸菌カナマイシン、ストレプトマイシン含有培地で増殖することが可能となる。本方法は変異頻度の算出だけでなく、塩基配列を解析することで変異部位での変化（スペクトラム）を同定できる優れた実験系である。

凍結保存した臓器約 10mg からゲノム DNA を抽出し、制限酵素 Ban II で処理した後、3Kb 付近の DNA をさらに選択的に抽出し精製し、酵素処理により *rpsL* 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を含むベクター領域の DNA を環状化する。精製し、濃度を調製した *rpsL* プラスミドベクターを用いて、大腸菌 DH10B6 (NEB) にエレクトロポレーションにより導入した。形質転換された大腸菌をカナマイシン含有 LB プレート、及びカナマイシンとストレプトマイシン含有 LB プレートに撒き 28°C で 40 時間培養した。大腸菌 DH10B6 はカナマイシン感受性、ストレプトマイシン耐性の性質を持つ。野生型 *rpsL* 遺伝子を含むプラスミドが導入されるとカナマイシン耐性、ストレプトマイシン感受性を示す。一方 *rpsL* 遺伝子の機能欠失型変異を持つプラスミドが導入されるとカナマイシン耐性、ストレプトマイシン耐性を示す。したがって、変異頻度についてカナマイシン/ストレプトマイシン耐性コロニー数をカナマイシン耐性コロニーで除した値として算出される。全てのカナマイシン/ストレプトマイシン耐性コロニーを新たにプレーティングし、単一コロニーを分離、特定領域を PCR で増幅し、ゲル電気泳動パターンの確認及びシーケンスまで確認した上で、変異頻度の算出用データとして使用する。

5. 次世代シーケンスによる腫瘍のゲノム解析

腫瘍の解析には図 II-3 と同様の投与条件で、投与期間を 16 週間に延長し、その後小腸組織での解析を行う。腫瘍解析用長期暴露プロトコルを図 II-4 に示す。これまでに *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて X 線の外部照射による解析を行っている（放医研、石原）、2020~2021 年度は長期内部被ばくによる腫瘍形成の有無の解析用サンプルを作成する（阪大、中島）。

セシウム 137 または KBrO_3 の 16 週間の飲水投与により *Msh2* 遺伝子欠損マウスに発生した腫瘍の体細胞突然変異をゲノムワイドに検出するために、腫瘍組織および周辺の非腫瘍部に加え心臓、尾などを採取し、ゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い腫瘍特異的に発生した体細胞変異の同定を行う。次世代シーケンス解析は受託で行う。解析ワークフローを図 II-5 に示す。

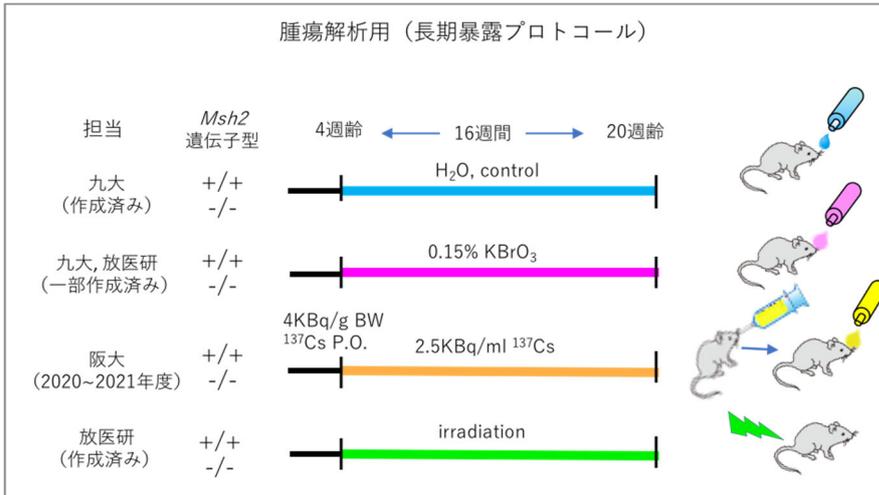


図 II-4. 腫瘍解析用 長期暴露プロトコール

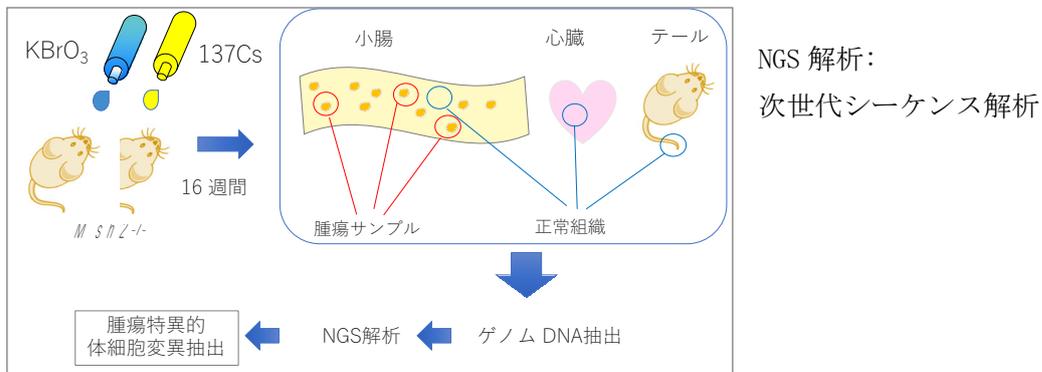


図 II-4 腫瘍特異的体細胞変異の解析ワークフロー

6. 次世代シーケンスによる *de novo* 生殖細胞変異の解析

図 II-3 に示したように、野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスにセシウム 137 を 4 週間投与し、野生型のメスと交配して得られた仔の尾をサンプルとして次世代シーケンス解析を行う。検出された変異データよりスペクトルや変異率を算出し、大阪大学の中島らがすでに行なっている野生型 A/J, C57BL/6 マウスにセシウム 137 を投与した際のデータとの比較解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究で行う遺伝子組換え実験 (カルタヘナ法) および動物実験計画に関して所定の審査を受け機関の承認を得ている。九州大学における遺伝子組換え実験については「ゲノム安定性維持に関する分子制御機構の生態における機能解析」(承認番号 1-57、有効期限令和 6 年 8 月 31 日まで)、動物実験については「DNA 修復機構の破綻による突然変異と発がんの分子遺伝学的研究」(承認番号 A20-089、有効期限令和 4 年 3 月 31 日まで) で承認を得ている。研究の遂行にあたっては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」、「動物の愛護および管理に関する法律」などの法令及び関連する学内規則を遵守して行なっている。

III. 研究結果

1. 高感度体細胞変異検出用マウスを用いた突然変異解析

Msh2^{-/-}, *rpsL*^{-Tg+} マウス及び *Msh2*^{+/+}, *rpsL*^{-Tg+} はそれぞれ A-E の 5 群に分け各処理を 4 週間行い (図 II-3 参照)、その後同じ週齢の時点で解剖し、主要な臓器を凍結保存した。セシウム 137 を可溶性水溶液の状態では飲水させた場合、消化管 (主に小腸) からそのほとんどが吸収され、その後迅速に血中に移行し全身に分布すると考えられる (ICRP publication 30)。そこで、セシウム 137 経口摂取による内部被ばくの影響を直接受ける小腸組織を用いてゲノム DNA を抽出し変異解析に用いた。 γ 線外部照射の E 群については本年度はサンプル保存まで行ったので解析を次年度に行う。これまでに行なった *rpsL* 解析のサンプル別の結果を表 III-1 に、各実験群別の平均値をグラフに表示した (図 III-1)。

表 III-1. *rpsL* 解析 サンプル別データ

Exp. Grop	Sample ID	Msh2 genotype	Km ^r clones (x 10 ⁵)	Km ^r Sm ^r clones	Mutation frequency (x 10 ⁻⁵)	MF(x 10 ⁻⁵) Average (SD)
A	RY1305	+/+	3.35	3	0.90	1.41 (0.71)
A	RY1411	+/+	1.28	1	0.78	
A	A1366	+/+	4.83	11	2.28	
A	A1364	+/+	1.79	3	1.68	
B	RY1134	+/+	1.96	7	3.58	2.65 (0.74)
B	RY1135	+/+	2.43	7	2.88	
B	RY1291	+/+	4.82	11	2.28	
B	RY1297	+/+	4.26	8	1.88	
C	2212	+/+	1.11	2	1.81	3.61 (1.89)
C	2206	+/+	1.60	10	6.27	
C	2163	+/+	0.63	2	3.17	
C	2204	+/+	0.63	2	3.17	
D	2191	+/+	1.06	7	6.62	6.62 (1.35)
D	1387	+/+	4.25	20	4.71	
A	A2198	-/-	1.44	46	31.90	31.83 (7.00)
A	A2198	-/-	0.57	22	38.80	
A	A2224	-/-	8.47	210	24.79	
B	A2214	-/-	0.96	51	53.18	58.27 (19.39)
B	A2214	-/-	0.89	59	66.37	
B	A2238	-/-	2.16	90	41.61	
B	A2238	-/-	1.87	79	42.27	
B	A2181	-/-	0.36	32	87.91	32.82 (5.11)
C	2201	-/-	1.04	28	26.85	
C	2184	-/-	1.07	33	30.81	
C	2187	-/-	0.66	23	34.95	
C	2222	-/-	0.60	23	38.66	47.72 (4.07)
D	2183	-/-	1.46	67	45.80	
D	2183_2	-/-	3.12	168	53.81	
D	1390	-/-	2.46	113	45.86	
D	1388	-/-	3.46	157	45.40	

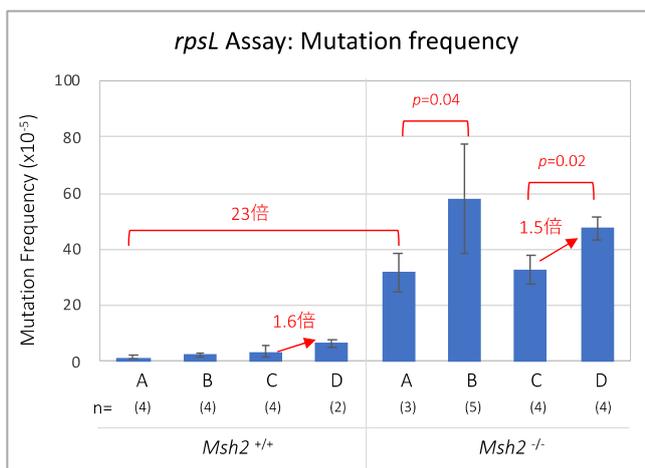


図 III-1. *rpsL* 解析 Mutation Frequency

- A群: コントロール (自由飲水、通常飼育)
- B群: KBrO₃ 投与群 0.15% (自由飲水)
- C群: Cs-137投与群1: 2.5KBq/ml (自由飲水)
- D群: Cs-137投与群2: 初日に4KBq/g体重を強制飲水、
2.5KBq/mlセシウム137投与群 (自由飲水)
(推定積算線量はC群の約2倍)

通常飼育コントロール群 (A 群) の結果から小腸組織における自然突然変異頻度が得られる。野生型マウスの自然突然変異頻度は 1.4×10^{-5} と非常に低い値であったのに対して *Msh2* 遺伝子欠損マウスでは 31.8×10^{-5} と野生型マウスの約 23 倍高い値を示した。

0.15%KBrO₃の飲水投与(B 群)は、A 群に比較して野生型マウスでは 1.9 倍、*Msh2* 欠損マウスでは 1.8 倍高い値を示した ($p=0.04$, Wilcoxon 検定)。一方 2.5kBq/ml セシウム 137 を 4 週間自由飲水により投与した C 群では、野生型マウスでは約 2.6 倍の上昇が見られたものの、*Msh2* 欠損マウスでは A 群とほぼ同等の変異頻度を示した。また初日に 4KBq/g 体重のセシウム 137 を強制飲水させた後に 2.5kBq/ml を自由飲水により投与した D 群 (推定積算線量は C 群の約 2 倍) の変異頻度は、A 群に比較して野生型マウスでは約 4.7 倍に、*Msh2* 欠損マウスでは約 1.5 倍に上昇していた。またこの値は C 群に比較して、野生型マウスでは約 1.6 倍に、*Msh2* 欠損マウス D 群では約 1.5 倍に上昇していた ($p=0.030$, Wilcoxon 検定) ことから、セシウム 137 の内部被ばく量による変異頻度の変化が検出されていると考えられた。*Msh2* 欠損マウス D 群の変異頻度は 0.15% KBrO₃ 投与群 (B 群) とほぼ同程度の値まで上昇していることがわかった。

次に、カナマイシン/ストレプトマイシン耐性コロニー (表 III-1, Km^rSm^r カラム) の突然変異の種類とそのサイトを同定する目的で、ほぼ全てのコロニー (合計約 1200) について、単一コロニー分離を行なった後、*rpsL* 遺伝子領域を PCR で増幅し、ゲル電気泳動パターンを確認し、サンガーシーケンスを行なった。スペクトル別 Mutation Frequency を表 III-2 に示す。

表 III-2. *rpsL* スペクトル解析 変異別 Mutation Frequency

		<i>Msh2</i> +/+				<i>Msh2</i> -/-			
		A	B	C	D	A	B	C	D
		($\times 10^{-5}$)							
		cont.	0.15% KBrO ₃	¹³⁷ Cs-1	¹³⁷ Cs-2	cont.	0.15% KBrO ₃	¹³⁷ Cs-1	¹³⁷ Cs-2
Base Substitutions	G:C→A:T	0.23	0.56	0.23		3.03	2.41	1.19	3.87
	A:T→G:C		0.16		2.43	0.45	1.48	1.19	0.83
	G:C→T:A	0.08	0.24	0.23		0.22	0.19	0.30	0.18
	G:C→C:G					0.22		0.30	0.28
	A:T→T:A	0.08		0.23	0.63	0.11		0.30	0.18
	A:T→C:G				0.21	0.67			0.46
Frameshift	1bp deletion	0.39	0.88	0.90	6.47	0.56	1.30	1.79	1.66
	1bp deletion (A-run)			0.45		21.07	46.76	23.27	34.18
	1bp insertion		0.08			0.11		0.30	0.64
	1bp insertion (A-run)					3.59	4.45	2.39	1.66
	>2bps indel	0.63	0.72	1.58	2.52	1.79	1.48	1.79	3.78
				$\times 1.6$				$\times 1.5$	$\times 2.1$
Total		1.41	2.65	3.61	5.66	31.83	58.27	32.82	47.72

Msh2 欠損マウスでは、塩基置換の中では G:C>A:T が多いこと、そして全変異の 60%以上がアデニン塩基の連続配列(A-run 配列)での 1~2 塩基の挿入/欠失変異であった。KBrO₃ 投与群 (B)、高線量セシウム 137 投与群 (D) では、コントロール群に比較して A-run 配列での 1 塩基

欠失の増加が見られた。2 塩基以上の挿入／欠失変異は高線量セシウム 137 投与群 (D) でのみ増加が見られた。野生型マウスではセシウム 137 投与により 2 塩基以上の挿入／欠失変異の頻度が上昇していたが、これは A-run 配列ではなかった。

2. セシウム 137 長期飲水投与による腫瘍形成への影響の解析

九州大学で交配し目的の遺伝子型マウスを大阪大学へ輸送し、セシウム 137 の飲水投与を 16 週間行なった (図 III-4 参照)。表 III-3 に途中死亡などを除き解析可能となったマウスのリストを示す。投与終了後 1-2 週間程度通常飼育を行い、解剖して消化管とその他の臓器を保存し今後腫瘍解析に用いる。

表 III-3 セシウム 137 長期飲水投与による腫瘍解析用マウスリスト

mouse ID	Msh2 genotype	sex
1858	-/-	f
1845	-/-	f
1854	-/-	f
1858	-/-	f
2143	-/-	f
2144	-/-	f
2145	-/-	f
2146	-/-	f
1852	-/-	m
1855	-/-	m
1850	-/-	m
1863	-/-	m
2155	-/-	m
2159	-/-	m
1847	+/+	f
1848	+/+	f
2157	+/+	f
2158	+/+	f
2178	+/+	f
1844	+/+	m
1861	+/+	m

3. 次世代シーケンスによる腫瘍のゲノム解析

本年度は *Msh2* 遺伝子欠損マウスに KBrO_3 の 16 週間投与を行った後に解剖し、小腸に発生した腫瘍、小腸正常組織、心臓、尾を保存し、ゲノム解析用サンプルを調製し、一部次世代シーケンス解析を行った。今後データ解析を行い腫瘍組織特異的な体細胞変異を検出する予定である。セシウム 137 を 16 週間投与した場合に世代シーケンス解析が可能な大きさの腫瘍が発生した場合には、摘出して保存しゲノム解析に用いる。

4. 遺伝子発現解析 次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析

本年度はこれまでに突然変異解析または生化学解析用に作成し、凍結保存した小腸のサンプルの中から、次年度に大阪大学の中島が行う次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析用に各実験群

（図 III-3 参照）から 3 個体分、合計 18 サンプルを選択し受託解析用に調製した（表 III-4）。

表 III-4 RNA-seq 用 小腸の凍結サンプルのリスト

Exp. Group	treatment	Mouse ID	sex	Msh2 genotype
A	control	1768	female	-/-
A	control	1741	male	-/-
A	control	1799	male	-/-
B	KBrO3	1489	female	-/-
B	KBrO3	2214	male	-/-
B	KBrO3	1492	male	-/-
D	Cs-137 P.O.	1390	female	-/-
D	Cs-137 P.O.	1388	female	-/-
D	Cs-137 P.O.	2183	male	-/-
A	control	1810	female	+/+
A	control	1706	male	+/+
A	control	1801	male	+/+
B	KBrO3	645F	female	+/+
B	KBrO3	1478	male	+/+
B	KBrO3	1486	male	+/+
D	Cs-137 P.O.	2191	male	+/+
D	Cs-137 P.O.	1387	male	+/+
D	Cs-137 P.O.	1397	male	+/+

5. 次世代シーケンスによる *de novo* 生殖細胞変異の解析

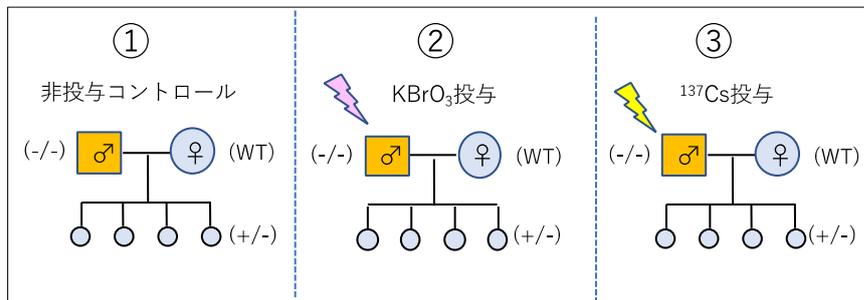


図 III-2 生殖細胞変異解析のための親仔サンプルの概略図

Msh2 遺伝子欠損マウスのオスを野生型のメスと交配しその仔を得て（図 III-2）、次世代シーケンサーによる親子解析を行い *de novo germline mutation* を検出する準備をした。未処理の *Msh2* 遺伝子欠損マウスの若いオスは生殖機能を持ち野生型メスとの交配での産仔数は 6-8 匹で C57BL6/J と変わらなかった。ただし生後 18 週齢程度から生殖能が低下する傾向が見られた。*Msh2* 遺伝子欠損オスと野生型メスとの交配での仔の遺伝子型は全てヘテロとなり、出生後も正常に育ち、生殖機能も正常であった。

非投与コントロール群についてはすでに親仔サンプル 1 家系分を用いて、尾組織からゲノム DNA を抽出し、その後受託業者によりエクソンキャプチャリング、ライブラリ合成、次世代シーケンサー（HiSeq2000）による全エクソン領域（約 50Mb）のシーケンスを行った。*Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスに 4 週間の KBrO₃ の投与を行いその後に野生型メスと交配し複数の仔を得たので、2 家系分のエクソームシーケンスを行った。

大阪大学にて、野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスに 4 週間のセシウム 137 の投与を行い、その直後に野生型メスと交配し複数の仔を得たので、全ての個体の尾などの組織を凍結保存した。今後エクソーム解析を行う予定である。今後これらのデータを用いて 1 世代で新たに生じた *de novo* 変異を同定するために、親では検出されず、仔でのみ約 50% のアレル頻度で検出される変異 (一塩基置換および小さな挿入/欠失) の抽出を行う。

KBrO_3 またはセシウム 137 の 4 週間投与により野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスの生殖能力が失われることはなく、また産仔に目視で判別できる形態異常などは見られなかった。

IV. 考察

これまでに生体内での誘発変異を検出する目的で種々のトランスジェニックマウスが作成され遺伝毒性試験に利用されている。生後約 12 週齢の C57BL/6 マウスの小腸の自然突然変異頻度は、*gpt delta* マウス⁹⁾で $(0.8 \pm 0.27) \times 10^{-5}$ 、*LacZ* plasmid マウス¹⁰⁾で $(11.0 \pm 2.7) \times 10^{-5}$ 、BigBlue^R マウス¹¹⁾で $(4.8 \pm 1.5) \times 10^{-5}$ 、MutaTM マウス¹²⁾で $(2.71 \pm 2.3) \times 10^{-5}$ と報告されている。今回の我々の *rpsL* 解析による野生型マウスのコントロール群の変異頻度は $(1.4 \pm 0.71) \times 10^{-5}$ で、他のトランスジェニックマウスの値とほぼ同程度であったことから実験系の有効性が確認できた。化学物質や放射線による誘発変異は自然突然変異頻度 (バックグラウンド変異頻度) に対する相対比率の変化として考察するので自然突然変異を安定に検出できることが重要である。*Msh2* 欠損マウスでは野生型マウスに比較して 23 倍高い自然突然変異頻度を示し、セシウム 137 投与群のうち D 群 (初日に 4KBq/g 体重を強制飲水 2.5KBq/ml セシウム 137 投与) ではコントロール群と比較して突然変異頻度の有意な上昇が確認された。野生型マウスでも線量依存的に突然変異頻度が上昇する傾向が認められたが、自然突然変異頻度が非常に低く、被ばくの影響は変異頻度のわずかな変化としてしか捉えられず、誘発変異の定量的・定性的解析と統計学的検定を行うにはさらに多くのマウス個体が必要であると考えられた。一方で *Msh2* 欠損マウスでは酸化剤や放射線被ばくにより誘発される突然変異を効率的に検出することが可能であった。これは変異原暴露により生体内では種々の DNA 損傷が誘発されるが、それらに起因して発生する突然変異はミスマッチ修復機構が効率的に抑制していること、ミスマッチ修復機構の不全により野生型マウスでは観察できない程度の変異原の影響が可視化されたことを示している。突然変異の抑制に関してミスマッチ修復機構以外にも重要な働きを担う種々の機構があるので、今後より効率的かつ定量的に内部被ばくの生体影響を解析できる遺伝子改変マウスを見つけることができるかもしれない。今回の結果はそのための重要な基礎データとなる。

rpsL レポーター遺伝子上に発生した変異のスペクトル解析から *Msh2* 欠損マウスの小腸における自然突然変異は塩基置換の中では G:C>A:T がもっとも高頻度であり、全体の変異の 60% 以上を A-run 配列での挿入/欠失変異が占めていた。 KBrO_3 投与、セシウム 137 投与 (D 群のみ) により A-run 配列での挿入/欠失変異が増加したことから、両負荷に共通の原因 (通常はミスマッチ修復機構が対処している DNA 損傷など) が生体内で発生していることが示唆された。また、コントロール群に比較して D 群でのみ 2 塩基以上の挿入/欠失変異が増加していた。野生型マウスでも D 群でのみ 2 塩基以上の挿入/欠失変異の頻度が上昇していた。このことから、2

塩基以上の挿入／欠失変異が、ある線量以上のセシウム 137 投与により誘発される変異の特徴である可能性が示唆された。今後さらに解析数を増やして今回の結果の検証を行う。

V. 結論

rpsL レポーター遺伝子を用いた解析法はマウスの個体レベルでのセシウム 137 内部被ばくにより誘発される体細胞突然変異の検出に有効であることが示された。本実験系を利用することで生体内で発生した突然変異を効率的に、定量性・定性性を持って検出することが可能であると考えられる。さらに *Msh2* 欠損マウスを用いることで、誘発変異を高感度に検出可能であり、野生型マウスを用いる場合に比較して解析に要するマウス匹数を大幅に減らすことができる。突然変異スペクトルの解析から、2 塩基以上の挿入／欠失変異は KBrO_3 投与群では増加せず、セシウム 137 投与群（D 群、高濃度投与群）でのみ増加することがわかり、放射線被ばくの際の変異の特徴である可能性が示唆された。しかし、化学物質による発がんや放射線による発がんの発生機序の違いや、セシウム 137 内部被ばくの生殖細胞への影響などの理解に向けて、今後も継続した基礎研究が重要であると考えられた。

VI. 次年度以降の計画

次年度では、解析サンプル数をさらに増やして突然変異データの定量的解析およびスペクトル解析を行う。セシウム 137 長期投与群の消化管腫瘍の解析、腫瘍が発生した場合にはゲノム解析を行う。また、継世代影響の実験のために必要なサンプルが揃った時点で次世代シーケンスによるゲノム解析を行う。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 学会発表等

- 1) Mizuki Ohno, Kunihoko Sakumi, Noriko Takano, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Toward understanding de novo germline mutations in mammals, 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2019.11. 招待講演
- 2) Mizuki OHNO, Kunihiko SAKUMI, Noriko TAKANO, Kosuke TESHIMA, Kyoko HIDAKA, Yoshimichi NAKATSU, Teruhisa TSUZUKI, Detection of de novo germline mutations in DNA repair-deficient mice lines, The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens(ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society(JEMS), 2019.11.

VIII. 引用文献

- 1) Tsuzuki, T. *et al.* Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11456-11461, doi:10.1073/pnas.191086798 (2001).
- 2) Tsuzuki, T., Egashira, A. & Kura, S. Analysis of MTH1 gene function in mice with targeted mutagenesis. *Mutat Res* **477**, 71-78 (2001).
- 3) Egashira, A. *et al.* Mutational specificity of mice defective in the MTH1 and/or the MSH2 genes. *DNA Repair (Amst)* **1**, 881-893 (2002).
- 4) Sakamoto, K. *et al.* MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress induced intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* **67**, 6599-6604, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4802 (2007).
- 5) Isoda, T. *et al.* Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice. *Int J Biol Sci* **10**, 940-947, doi:10.7150/ijbs.9241 (2014).
- 6) Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K. & Tsuzuki, T. Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis. *Int J Biol Sci* **10**, 73-79, doi:10.7150/ijbs.5750 (2013).
- 7) 環境省 原子力災害影響調査等事業 (放射線の健康影響に係る研究調査事業) 放射線による健康影響の解明及び放射線以外の要因による健康リスクの低減を含めた総合的な健康リスクに関する研究, 「マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる成体と子孫への影響の定量的実験検証」 代表中島裕夫 (大阪大学) H30 年度報告書)
- 8) Gondo, Y., Shioyama, Y., Nakao, K. & Katsuki, M. A novel positive detection system of in vivo mutations in rpsL (strA) transgenic mice. *Mutat Res* **360**, 1-14 (1996).
- 9) Aoki Y., Matsumoto M., Matsumoto M., Masumura K., Takehiko Nohmi T., Mutant frequency is not increased in mice orally exposed to sodium dichromate. *Food Safety* **7**, 2-10 (2019)
- 10) Dollé ME., Snyder WK., Gossen JA., Lohman PH., and Vijg J., Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *PNAS* **97**, 8403-8408 (2000)
- 11) Arrault X., Michel V., Quillardet P., Hofnung M., Touati E., Comparison of kinetics of induction of DNA adducts and gene mutations by a nitrofurantoin compound, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-b]furan (R7000), in the caecum and small intestine of Big Blue™ mice. *Mutagenesis* **17**, 353-359 (2002)
- 12) Lynch M., Gooderham NJ and Boobis AR., Organ distinctive mutagenicity in Muta™ Mouse after short-term exposure to PhIP. *Mutagenesis* **11**, 505-509 (1996)

Analysis of mutations using *Msh2*-deficient mice internally exposed to Cesium-137 radiation

Mizuki Ohno and Yoshimichi Nakatsu

Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Science, Kyushu University

Key word: cesium-137, internal exposure, mutation, mismatch repair, oxidative stress, genetic effect,

Abstract

To evaluate the biological effects of internal exposure due to oral administration of cesium-137, we performed the experimental system using the *rpsL* reporter gene transgenic mice. Of the biological effects of chronic exposure to cesium-137 radiation, the contribution of the indirect effects caused by reactive oxygen species generated by low LET radiation reacting with intracellular components is expected to be large. Therefore, we used DNA mismatch repair-deficient mice addition with wild-type mice in this study. DNA mismatch repair system is known to be also involved in the repair of oxidative DNA damages.

Wild-type and *Msh2*-deficient mice possessing *rpsL* reporter genes were administered with cesium-137-containing water for 4 weeks. They were treated with regular water for additional 2 weeks. Subsequently, all the mice were sacrificed, and their organs were isolated and stored for further analysis. The small intestinal tissue, which was directly affected by the administration of cesium-137, was obtained for the mutation analysis. Mutation frequency in the wild-type mice, which received the same treatment, showed a slightly-increased mutation frequency, which was not statistically significant. We observed a 1.5-times increased mutation frequency in cesium-137 (77 mGy)-treated *Msh2*-deficient mice compared to the nontreated, matched control group, with statistical significance.

With this experimental result, we have successfully detected induced mutations *in vivo* with high efficiency by orally administering cesium-137, quantitatively and qualitatively. By using this system, it would be possible to reduce the number of mice used for the study compared to the study that uses wild-type mice. It has been suggested that DNA mismatch repair system play an important role in protecting intestinal tissues against the internal exposure of cesium-137.