

In vivo, in situ 突然変異検出系を用いた環境および放射線リスク評価

In vivo, in situ assessment of the mutagenic risk of radiation and environmental chemicals, using newly developed animal systems

課題番号：25220102

野田 朝男 (NODA ASAO)

公益財団法人放射線影響研究所・分子生物学部・副部長



研究の概要

放射線被ばくや有害化学物質による体細胞や生殖細胞突然変異リスクはこれまで、培養細胞や被ばくした組織から抽出したゲノム DNA を解析する方法で推定されてきた。我々は、突然変異が生じると細胞が生きたまま光る（蛍光を発する）システムを開発し、全身の組織・細胞を対象として突然変異リスクを「場」の情報と共に得られるモデル動物を作製して評価する。

研究分野：環境学・環境解析学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：生物影響、体細胞突然変異

1. 研究開始当初の背景

放射線や環境変異原による遺伝影響リスクは現代社会で重大な関心が持たれている。これは、がんや特定の疾患の原因が遺伝子突然変異に起因する場合があるという考え方に基づいている。従来、有害物質による遺伝影響は特定遺伝子（マーカー遺伝子）の突然変異の誘発の度合いを *in vitro* 細胞培養で見たり、組織から DNA を抽出したりすることで解析されてきた。しかしこの方法では、生体組織中の何処の、どの細胞が突然変異を起こしたのか、位置情報が得られなかった。特に、個体の発生と再生、老化を制御する細胞交代系の組織中には組織幹細胞が存在し、これが突然変異を起こすことが生体影響の大元であると考え、組織中での遺伝子変異リスク評価は細胞交代（組織幹細胞の増殖）の「場」にピンポイントで焦点を定める必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、個体を構成する全細胞を対象として、組織・器官構築の3次元「場」を壊すことなく、体のなかで生じる突然変異細胞を検出することができるモデル動物を作製する。具体的には、モデル動物について文字通り「頭のとっぺんから尻尾の先まで」すべての組織・細胞で起こり得る突然変異細胞を顕微鏡で簡単に観察できる遺伝子組換え動物を作製する。モデル動物の原型ができた後には、DNA 修復やがん抑制に関わる遺伝子欠損系統と交配し、変異の高感度検出系へとシステムを発展させる。

これを用いて放射線や環境変異原の生体

リスク評価の検証実験を行い、万国共通のリスク測定・モニタリングシステムとして提案する。

3. 研究の方法

モデル動物としてマウスとメダカを用いる。突然変異の検出システムとしては、(1) 復帰突然変異にて細胞が光る系を最初に試み、次に (2) 前進性突然変異、(3) あるいは発がん性突然変異で光る系を作製する。(4) ATM、BRCA1、Rev1、p53、Rb 等の遺伝子欠失個体をゲノム編集技術を用いて作製し、これら変異遺伝子アレルを当該モデル動物に持ち込む。(5) 発がん標的組織で生じた突然変異細胞の動態を観察し、ゲノムの損傷修復と突然変異誘発機構について考察する。

4. これまでの成果

(1) マウス X 染色体上の HPRT 遺伝子を遺伝子ノックイン法により部分重複とし、その重複部分の後ろに *in-frame* で GFP 遺伝子を結合した組換え ES 細胞を作製し、これからキメラマウスを経て、マウス個体とした (HPRTdupGFP マウス)。このマウスの全身細胞はすべて HPRT の部分重複を持ち、ここからの復帰変異が起ると HPRT-GFP タンパク質を発現して緑色に光る。今回、組織観察の容易な脾臓、肝臓、小腸、大腸、乳腺、甲状腺、脳、脾臓リンパ球、精巣などを蛍光顕微鏡で見ると、脳神経組織を除いてすべて、 10^{-6} から 10^{-5} 程の頻度で突然変異細胞が存在することが認められた。組織内には変異細胞が単独で存在する場合（突然変異成立後は分

裂していない) や、クローン増殖して比較的大きな細胞集団となっている場合が散見された (図 1)。また、小腸ではクリプト底面に位置する幹細胞からの一筋の突然変異細胞系譜(mutant cell lineage)が観察され、これが放射線被ばくにより増加することが確認された。さらに、被ばくマウスでは、クリプト基底面から立ち上がる変異細胞の筋(stripe)の数の増加傾向が見られた。これは、自然突然変異では変異細胞は上に向かってのみ分化にコミットした細胞を生み出すに対し、被ばくにより多くの細胞死が誘導された小腸クリプト内では突然変異細胞は上のみならず横にも分裂して幹細胞数を増やしている可能性を意味していた。以上、体内のそれぞれの組織内で起こる体細胞突然変異をピンポイントで観察できること、組織幹細胞の動態を直接観察できることが実証され、優れたモデル動物であることが明らかとなった。

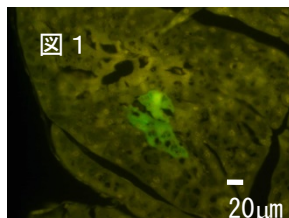


図 1
膵臓で見られた
変異細胞のク
ローン増殖

一方で、被ばく後の各個体間、各組織間での突然変異頻度には大きなバラツキがあることも明らかとなった。これは個体の発生・生長時に発生する自然突然変異に起因する体細胞モザイシズムが原因であると推察された。

メダカでも HPRTdupGFP システムは機能すると考えられ、当該ターゲットベクターの受精卵への導入では目やヒレの一部で自然突然変異と思われる蛍光が認められる個体を得た。今後安定して HPRTdupGFP が保持されるメダカシステムを作製する。

(2) p53 遺伝子にがん原性の突然変異が起こると細胞が光るシステム(p53-GFP ノックインマウス)を作製した。これは p53 に前進性の突然変異(gain-of-function 変異)が起こると p53-GFP 蛋白質が細胞核内に蓄積して光るシステムである。また、p53 遺伝子に LOH が起こるとメラノーマが発生するシステムの構築をメダカで開始した。これらはいずれも、がん原性体細胞変異を可視化する。

(3) ゲノム編集技術を用いて、メダカで網羅的に DNA 修復やがん抑制遺伝子の破壊個体を作製した。現在までに ATM、BRCA1、Rev1、p53、Rb 等のノックアウトシステムが得られ、これらを上記突然変異モニターメダカシステムと交配する計画を立てた。マウスについては、p53、ATM、53BP1 ノックアウトシステムとの交配を始めた。

(4) 組織幹細胞や体内で被ばくして増殖した細胞クローンの突然変異の特徴と変異メカニズムを解析する目的で、組織幹細胞の分離と全ゲノム解析の予備実験を開始した。第一段階として培養幹細胞クローンの全ゲノム解析の実効性の検討に入った。

5. 今後の計画

(1) マウス HPRTdupGFP : 自然突然変異によるバックグラウンドのバラツキを抑える操作を行う。メダカ HPRTdupGFP : 安定したトランスジェニック系統の作製。両者とも被ばく実験と組織観察を行い、変異リスク評価の基準を作製する。生殖幹細胞突然変異の測定方法も開発する。

(2) マウス p53-GFP : 複数系統の p53-GFP ノックインができているので、in vivo マウス発がん実験にて被ばくにより生じたがんが光るか否か検証する。メダカ p53-LOH/メラノーマ : p53LOH にてメラノーマが誘発されるか否か検証する。放射線による LOH の誘導を測定する。

(3) ゲノム編集技術の開発と突然変異・がん抑制遺伝子の網羅的破壊を行う。これら変異動物を交配することで、高感度で突然変異を検出することができるモデル動物へと発展させる。

(4) 体内で生じた突然変異細胞集団の採集と全ゲノム解析により、突然変異生成の分子メカニズムを推察する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Yasuda T, Kimori Y, Nagata K, Igarashi K, Watanabe-Asaka T, Oda S, and Mitani H. Irradiation-injured brain tissues can self-renew in the absence of the pivotal tumor suppressor p53 in the medaka (*Oryzias latipes*) embryo. *Journal of Radiation Research* 57(1): 9-15 (2016)
2. Noda A, Suemori H, Hirai Y, Hamasaki K, Kodama Y, Mitani H, Landes RD, and Nakamura N. Creation of mice bearing a partial duplication of HPRT gene marked with a GFP gene and detection of revertant cells in situ as GFP-positive somatic cells. *PLoS One* 10(8): e0136041 (2015)
doi:10.1371/journal.pone.0136041
3. Noda A, Mishima S, Hirai Y, Hamasaki K, Landes RD, Mitani H, Haga K, Kiyono T, Nakamura N, and Kodama Y. Progerin, the protein responsible for the Hutchinson-Gilford progeria syndrome, increases the unrepaired DNA damages following exposure to ionizing radiation. *Genes and Environment* 37:13 (2015)
doi:10.1186/s41021-015-0018-4

その他論文 6 報、特許 1 件