

令和元年6月15日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00555

研究課題名(和文)核物質汚染地域住民(カザフスタン)の子孫におけるマイクロサテライト変異の調査研究

研究課題名(英文)Studies on microsatellite mutation rates in the children of parents exposed to radionuclides in Kazakhstan

研究代表者

梁 治子 (RYO, HARUKO)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・研究サ
ブリーダー

研究者番号：90301267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：旧ソ連邦セミパラチンスク核実験所(現カザフスタン共和国)周辺住民の放射能被曝集団について、既に報告されている集団と同一DNA試料を用いマイクロサテライト変異検出系による次世代影響(変異)を調査した。常染色体性22種、X線染色体性1種を用いたマイクロサテライトについて、常染色体性では、子供の変異率(変異数/マイクロサテライト座/子供)は、被曝者群 7.38×10^{-3} (20/2711)、非被曝者群対照群 5.58×10^{-3} (9/1612)となった。両者に有意差はない($\chi^2 = 0.448$)。調査対象は、被曝家族：36家族、子供124人、非被曝者対照家族：25家族、子供74人である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト放射線被曝集団の継世代変異について、変異検出が精微かつ客観的であり、動植物に共通して存在するマイクロサテライトを指標に調査した。調査対象は既に詳細な報告がなされ、人類にとって貴重なセミパラチンスク核実験所(カザフスタン)周辺住民の被曝集団である。DNA試料はBersimbay教授(研究協力者、カザフスタン、)より提供を受けた。両親が被曝者の子供の変異率は 7.38×10^{-3} (20/2711)、非被曝対照者の子供は 5.58×10^{-3} (9/1612)となり1.3倍程度の変異率上昇が被曝者の子供みられたが、有意差はない。マイクロサテライト変異検出系を用いることにより、明確な結果を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Reports on increased minisatellite mutation rates in radiation exposed human population are discordant. This study is to clarify the elevated minisatellite mutation rates in the children of exposed parents using microsatellite mutation assay. The families exposed to radionuclides are living in the surrounding nuclear test site (Semipalatinsk, former Soviet Union, current Kazakhstan). The identical DNA samples obtained from Prof. Bersimbay (research collaborator), to those published for the minisatellite mutation rate increment were used. Number of families studied were 36 and 25, and number of children were 124 and 74, for the exposed and unexposed control group, respectively. 22 autosomal and 1 X-linked microsatellite loci were used. At the autosomal loci, the mutation rates (no of mutations/locus/child) were 7.38×10^{-3} (20/2711) and 5.58×10^{-3} (9/1612) in the children of exposed and unexposed parents, respectively. This difference is not statistically significantly ($\chi^2 = 0.448$).

研究分野：放射線遺伝学

キーワード：ヒトの放射線(能)被曝集団 生殖細胞変異 マイクロサテライト変異 次世代影響 旧ソ連邦(現カザフスタン)核実験所周辺住民

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線は調べた限りヒトを除く、全ての高等動植物で遺伝的影響(継世代影響)を誘発することが知られている。ヒトへの放射線被曝の遺伝リスクは、マウスを用いた特定座位突然変異(100万匹マウス実験)(Russellら、1982)をもとになされていたが、現在は、雄、雌親マウスへの放射線照射により腫瘍や奇形など人類によくみられる疾病が次世代に誘発されるとの野村による報告(大阪レポート)(Nomura, 1982、他)により、国連科学委員会報告 2001年において遺伝リスクが新たに推定されている。

(2) ヒト集団における調査：原爆被爆者の子供についての調査では、放射線では検出されにくい変異検出法であったため、変異率の上昇はみられなかった(Neelら、1990)。しかし、酵素活性変異(主に欠失型変異)は1例報告されており、同様な検出系によるマウスでの変異率と似ている(Nomura, 1989)。実際、マウスにおいては放射線照射により、ヒトと同じ変異検出系による塩基置換型変異は誘発されていないものの(Ehlingら 1985)放射線でおこりやすい欠失型変異は誘発されている(Charles, Pretsch, Mutat. Res. 1986)。近年、分子生物学的手法の発展により少ない個体数でも変異検出が可能であるhyper variableミニサテライト検出系を用いた結果、放射能汚染地域の住民(チェルノブイリ原発事故後の住民：旧ソ連邦・カザフスタン共和国セミパラチンスク核実験所周辺の住民、Techa川流域住民：旧ソ連邦 Mayak プルトニウム抽出工場からの放射性物質汚染)の子供を対象にした4件の調査(Dubrovaら、1996、2002; 2報、2006)では、非曝ばく対照群の子供に比べ1.5倍上昇している。他方、同じ検出系による原爆被爆者(Kodairaら、1995)、チェルノブイリ原発事故の事故処理者の子供を対象にした調査(Lishitsら：2001、Kiuruら：2003、Slebosら：2004)では、被曝者群、非被曝者群について有意な差はない。上記のごとく、結果が決定的でないため未だに国際的な容認に至っていない。ミニサテライト検出系で1.5倍程度の上昇がみられたと同じDNA試料を用い、ミニサテライト検出系に比べ、より精微、かつ客観的な検出系であるマイクロサテライト検出系を用いることにより、信頼性の高い結果を提供する。申請者らが行ったマイクロサテライト検出系を用いた原爆被爆者の子供およびチェルノブイリ原発事故に事故処理作業員の子供についての調査では、上記に記したミニサテライト検出系による結果と同様に、いずれの調査においても被ばく群での変異の有意な上昇はみられなかった(Furitsuら、2005、Kodairaら、2010)。

2. 研究の目的

マイクロサテライト変異検出系：ミニサテライトは10-100塩基対の反復配列を持ち、500コピー数を超える反復回数で構成されている長い配列に対し、マイクロサテライトは反復配列が1~10bp、全長100~600bpと短い配列である。両者とも主な変異は繰返し配列の増減である。ミニサテライト変異検出がRELP法によるDNA断片の長さを指標にするため、アガロースゲルによる電気泳動パターンの目視であるのに対し、マイクロサテライトは短い配列が故に、PCR法による遺伝子の増幅が容易であり、PCR産物の長さの解析は1bpが検出限界となっている。旧ソ連邦(現カザフスタン共和国)セミパラチンスク核実験所周辺の住民の子供についての調査で、1.5倍程度のミニサテライト変異率上昇が報告されたものと同じDNA試料をBersimbay教授(研究協力者、カザフスタン共和国)より提供を受け、マイクロサテライト変異検出系により明確な結果を示すことが、研究の目的である。

マイクロサテライト変異検出系を用いる他の理由は、マウスでは反復配列の1種であるESTRを用いた変異検出系で放射線照射による継世代突然変異が線量依存的に誘発されている(Fanら、1995、Dubrovaら、1993)。しかし、マウスではヒトの変異検出法で用いられたようなミニサテライト繰返し配列が確認されていない。ヒトとマウスに共通に存在するマイクロサテライトを変異検出系に用い、放射線被ばくの子供において被ばくの影響を調査するのが、本研究の目的である。代表者らは、放射線(中性子)被ばくマウスの仔にマイクロサテライト変異が線量依存的に誘発されることを、世界に先駆けて明らかにした(第15回国際放射線学会、2015、Nomuraら、2017)。

3. 研究の方法

(1) 試料(DNA)：全て末梢血由来であり、既に論文に掲載されているものと(Dubrova, Bersimbayら、Science, 2002)同じ試料であり、研究協力者Bersimbay博士(カザフスタン共和国ユーラシア大学)から提供を受けた。

DNA試料は被曝者家族40：子供179人、非被曝者対照家族28家族：子供119人に由来する。

(2) 方法：本研究に用いたマイクロサテライトは、常染色体性22種およびX染色体性1種である。マイクロサテライト座の長さは、マイクロサテライト座をPCR法で増幅後、PCR産物をキャピラリーシーケンサー(Genetic Analyser 3030x1, Applied Biosystems)にかけ、フラグメント解析(Gene Mapper, Applied Biosystems)ソフトにより解析することで行う。用いたマイクロサテライトについてプライマー配列、PCRの条件等は、既に報告済みのもの(Furitsuら、2005、Kodairaら、2010)と同じである。ただし、受理したDNA量が極少量であったため、PCR反応のtemplate DNAを約1ngとし、全てsingle PCR反応で行い、Taq polymerase

も増殖しやすい種類に工夫した。変異の検出は、両親と子供のマイクロサテライト座の長さを比較することで行い、子供に両親とは異なる長さのマイクロサテライト座が検出された場合、変異とする。

4. 研究成果

(1) 調査対象 DNA 試料：マイクロサテライト変異検出の過程で、家族関係がみられなかったものは4家族あった。両親の一方のDNAがない2家族、母親のDNAの品質不良が1家族、子供に親子関係がみられないもの6人、DNAがなかった子供2人が判明した。これらを除外すると、調査対象試料は、被ばく家族は、36家族、子供124人および非被曝者対照家族は、25家族、子供74人となった。

(2) マイクロサテライト変異：常染色体性22種およびX染色体性1種のマイクロサテライトについて現在得られている解析結果を表1に示す。子供の人数が被ばく群124、対照群74より少ないものに関しては、1人の子供の解析が未確定、またはD18S1270については解析途中であるためである。

表1 放射能汚染地域住民の両親からの子供および非汚染地域住民の両親からの子供におけるマイクロサテライト変異

Micro-satellite	Exposed group			Un-exposed control group		
	No. of children	No. of mutations	Origin ^a and size change (bp) ^b of mutations	No. of children	No. of mutations	Origin ^a and size change (bp) ^b of mutations
ACTBP2	124	2	m(+4), p(-4)	74	2	null p(-4)
D1S389	124	0		74	1	p(-4)
D3S1358	124	0		74	0	
D4S2431	124	1	null	74	0	
D7S820	124	0		74	0	
D7S1482	124	3	null p(-4)x2 ^c	74	1	p(-4)
D7S1517	124	1	p(+4)	74	1	p(-4)
D9S58	124	0		74	0	
D9S63	124	1	p(-2)	74	0	
D9S748	123	1	null	74	0	
D10S1214	123	11	p(-4)x9 ^c m(-3) p(-36)	74	5	p(+4)x5 ^c
D10S1237	124	1	p or m(-4)	74	0	
D12S67	124	0		74	0	
D13S130	124	0		74	0	
D16S539	124	0		74	0	
D18S1270	111	1	p(-4)	60	0	
D19S47	124	0		74	0	
D19S245	124	0		73	0	
D19S247	123	0		74	0	
D21S211	124	0		73	0	
D21S1245	124	1	p(+4)	74	0	
CSF1R(TAGA)	123	0		74	0	
DXS981	123	0		74	0	

^a p, paternal; m, maternal

^b +, increased; -, decreased

^c x, same origin and size change of mutations

null が被曝者群で3個、非被曝者対照群で1個検出された。両親-子供のトリオ解析において、両親の一方が単一のサイズであり、子供のサイズがもう一方の両親と同じであり単一サイズである場合、null と称される (Furitsu, Ryo ら、2005)。使用したプライマーによるPCR反応でヘテロ接合体の片方のアレルが増幅されなかった可能性がある。null が変異である確証

がないため、ここでは変異から省く。

変異数は、常染色体性について被曝者群で 20、非被曝者対照群は 9 であった。変異の由来は、null を除く計 29 個の変異の内、父親由来が 26、母親由来 2、由来不明 1 であり、父親由来がほとんどであった。ほとんどの変異は、繰返し配列の増減であったが、D10S1214 については、母親由来 m(-3)、父親由来 p(-36)が検出された。D10S1214 は、DNA 配列が複雑であるためと思われる。X 染色体性変異は検出されなかった。

(3) マイクロサテライト変異率

汚染地域住民被曝群の両親および非汚染地域被曝者対照群の両親からの子供におけるマイクロサテライト変異率を表 2 に示す。変異率は変異数/マイクロサテライト座/子供とする。

表 2 放射能汚染地域住民の両親からの子供および非汚染地域住民の両親からの子供におけるマイクロサテライト変異率

	No. of microsatellite loci	Exposed group		Control group	
		Total no. of microsatellite loci	No. of mutations (mutation rate, $\times 10^{-3}$)	Total no. of microsatellite loci	No. of mutations (mutation rate, $\times 10^{-3}$)
Autosomal	22	2711	20 (7.38)	1612	9 (5.58)
X-linked	1	123 (dau 52, son 71)	0	74 (dau27, son 47)	0

X 染色体性変異は検出されなかったため、変異率の計算からは除外し、常染色体性について変異率を算出した。被曝者群の子供では、変異率は、 7.38×10^{-3} (20/2711)、非被曝者群対照群の子供では、 5.58×10^{-3} (9/1612) であり、被曝者群が 1.3 倍程度高いが、両者に有意差はみられない ($\chi^2 = 0.488$)。

(4) 考察

本研究課題で調査対象とした被曝者の子供については、用いたマイクロサテライトでは変異率の有意な上昇はみられなかった。マウスにおいては、放射線(中性子)被ばくマウスの仔に、4 種のマイクロサテライトのうち 1 種のみが高感度に線量依存的な変異が誘発された(第 15 回国際放射線学会、2015、Nomura,ら、2017)。ヒトで、放射線に高感度なマイクロサテライトを同定することが求められる。

予定していた常染色体性マイクロサテライト 40 種のうち解析がほぼ終了したものが 22 種であるため、残り 18 種について調査を継続し終了した時点で再検討する。

引用文献

- Russell, WL, Kelly EM. Mutation frequencies in male mice and the estimation of genetic hazards of radiation in men. Proc Natl Acad Sci U S A 79, 1982, 542-544
- Nomura T. Parental exposure to X rays and chemicals induces heritable tumours and anomalies in mice. Nature, 296, 1982, 575-577
- Neel JV, Schull WJ, Awa AA, Satoh C, Kato H, Otake M, Yoshimoto Y. The children of parents exposed to atomic bombs: estimates of the genetic doubling dose of radiation for humans. Am J Hum Genet. 46, 1990, 1053-1072
- Nomura, T. Role of radiation-induced mutations in multigeneration carcinogenesis. Ed. Napalkov NP, Rice, JM, Tomatis L. Yamasaki H. IARC 1989, 375-387
- Ehling UH, Charles DJ, Favor J, Graw J, Kratochvilova J, Neuhäuser-Klaus A, Pretsch W. Induction of gene mutations in mice: the multiple endpoint approach. Mutat Res. 150, 1985, 393-401
- Charles DJ, Pretsch W. Enzyme-activity mutations detected in mice after paternal fractionated irradiation. Mutat Res, 160, 1986, 243-248
- Dubrova YE, Nesterov VN, Krouchinsky NG, Ostapenko VA, Neumann R, Neil DL, et al. Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident. Nature 380 1996, 683-686.
- Dubrova YE, Grant G, Chumak AA, Stezhka VA, Karakasian AN. Elevated minisatellite mutation rate in the post-chernobyl families from Ukraine. Am J Hum Genet 71, 2002, 801-809
- Dubrova YE, Bersimbaev RI, Djansugurova LB, Tankimanova MK, Mamyrbayeva ZZ, Mustonen R, et al. Nuclear weapons tests and human germline mutation rate. Science 295 2002, 1037

Dubrova YE, Ploshchanskaya OG, Kozionova OS, Akleyev AV. Minisatellite germline mutation rate in the Techa River population. *Mutat Res*, 602, 2006, 74-82

Kodaira M, Satoh C, Hiyama K, Toyama K. Lack of effects of atomic bomb radiation on genetic instability of tandem-repetitive elements in human germ cells. *Am J Hum Genet* 57, 1995, 1275-1283

Livshits LA, Malyarchuk SG, Kravchenko SA, Matsuka GH, Lukyanova EM, Antipkin YG, et al. Children of chernobyl cleanup workers do not show elevated rates of mutations in minisatellite alleles. *Radiat Res* 155 (1 Pt 1), 2001, 74-80

Kiuru A, Auvinen A, Luokkamäki M, Makkonen K, Veidebaum T, Tekkel M, et al. Hereditary minisatellite mutations among the offspring of Estonian Chernobyl cleanup workers. *Radiat Res* 159, 2006, 51-55.

Slebos RJ, Little RE, Umbach DM, Antipkin Y, Zadaorozhnaja TD, Mendel NA, et al. Mini-and microsatellite mutations in children from Chernobyl accident cleanup workers. *Mutat Res* 559, 2004, 143-51

Furitsu K, Ryo H, Yeliseeva KG, Thuy le TT, Kawabata H, Nomura T et.al. Microsatellite mutations show no increases in the children of the Chernobyl liquidators. *Mutat Res*. 581, 2005, 69-82.

Kodaira M, Ryo H, Kamada N, Furukawa K, Takahashi N, Nomura T et. al., et al. No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. *Radiat Res* 173, 2010, 205-213

Fan YJ, Wang Z, Sadamoto S, Ninomiya Y, Kotomura N, Kamiya K, Dohi K, Kominami R, Niwa O. Dose-response of a radiation induction of a germline mutation at a hypervariable mouse minisatellite locus. *Int J Radiat Biol*. 68, 1995, 177-83

Dubrova YE, Jeffreys AJ, Malashenko AM. Mouse minisatellite mutations induced by ionizing radiation. *Nat Genet*. 5, 1993, 92-94.

Ryo H, Adachi S, Nomura T. Hereditary Effects of Neutrons; Increase of Microsatellite Mutations in the Offspring of N5 Mice Exposed to Fission Neutron. *Proceedings of ICRR 2015:2-PS1F-14*; 2015.

Nomura T, Baleva LS, Ryo H, Adachi S, Sipyagina A, Karakhan NM. Transgenerational effects of radiation on cancer and other disorders in mice and humans, *J Radiat Cancer Res* 8, 2017, 123-134

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nomura T, Baleva LS, Ryo H, Adachi S, Sipyagina A, Karakhan NM. Transgenerational effects of radiation on cancer and other disorders in mice and humans, *J Radiat Cancer Res* 査読あり 8, 2017, 123-134, DOI:10.4103/jrcr.jrcr_30_17

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：野村 大成

ローマ字氏名：NOMURA, taisei

所属研究機関名：医薬基盤・健康・栄養研究所

部局名：医薬基盤研究所

職名：研究リーダー

研究者番号（8桁）：90089871

研究分担者氏名：足立 成基

ローマ字氏名：ADACHI, shigeki

所属研究機関名：医薬基盤・健康・栄養研究所

部局名：医薬基盤研究所

職名：プロジェクト研究員

研究者番号（8桁）：60379261

(2)研究協力者

研究協力者氏名：BERSIMBAY, rakhmetkazhi I.

ローマ字氏名：ベルシンベイ ラハメカジ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。