

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12179

研究課題名（和文）放射線の遺伝的影響研究を目的として、マウス精原細胞の染色体に構造変異を持ち込む

研究課題名（英文）Introduction of chromosome structural changes into mouse spermatogonia cells for the analysis of their transmission to next generation

研究代表者

野田 朝男（NODA, Asao）

公益財団法人放射線影響研究所・分子生物科学部・部長

研究者番号：40294227

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：放射線被ばくで生じる特徴的な突然変異を想定した人工的な染色体構造変異体を作成し、これらの次世代継承の有無を検討する予備実験として、培養細胞レベルにて染色体構造変異の作成を試みた。これは、CRISPR/Cas9を用いた遺伝子編集システムの応用であり、マウス染色体の特定部位に二重鎖切断を2個生じさせ、非相同末端結合（NHEJ）によりその間の欠失変異を作成するというものである。今回、100 bpから1 Mbpにわたる広範な人工的欠失を作成する事が可能となった。また、人工的な染色体転座の作成も試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線被ばくの遺伝的影響は生殖系列細胞に生じる突然変異に起因する。どのようなタイプの突然変異がどれくらいの効率で次世代に伝わるか、これまで明らかになっていない。体細胞とは異なり、生殖系列細胞には減数分裂チェックポイントや受精および初期発生という関門があり、これをくぐり抜けた細胞のみが次世代へと伝わる。生体内のそれぞれの過程で、染色体構造変異を持つ細胞がどのように取り扱われるのか、本研究はその検証システム作成を目指すものであり、生殖細胞被ばくのリスク推定の礎となると期待する。

研究成果の概要（英文）：We tried to create chromosomal structural mutations in the cultured cells. This is the creation of artificial chromosomal structural mutants by assuming characteristic mutations caused by radiation exposure. We investigate the possibility of inheritance of germ cells bearing these mutations to the next generation. This is an application of the CRISPR/Cas9-based gene-editing system to generate two double-strand breaks at specific sites on the mouse chromosome and create a deletion mutation between them by non-homologous end joining (NHEJ). As a result, we have successfully created extensive artificial deletions ranging from 100 bp to 1 Mbp. We then attempted to create artificial chromosomal translocations.

研究分野：放射線生物学、放射線遺伝学

キーワード：放射線 突然変異 生殖細胞変異 遺伝子編集 染色体構造変異 CRISPR/Cas9 精原細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線被ばくの遺伝的な影響については、1920年代にショウジョウバエを用いての遺伝性の突然変異誘発実証実験があり、放射線は生殖細胞に突然変異を起こすことが知られていた。この概念は戦後、マウスを用いた特定遺伝子座の変異試験へと発展し、線量あたり、遺伝子あたりの変異頻度推定が行われた。一方で、ヒトの放射線被ばくについては、広島・長崎の原爆被爆者二世の調査があるが、これまで二世集団に遺伝的影響は観察されていない。

(2) ヒト調査では被ばく二世における染色体異常や特定遺伝子座の突然変異を調べてきた。しかし、体細胞被ばくで起こる突然変異を二世の染色体・ゲノム中で検出する事はこれまで困難であった。この理由のひとつとして、生殖細胞で起こる染色体突然変異は減数分裂やその後の受精ならびに初期発生過程で排除される可能性が指摘される。

## 2. 研究の目的

(1) 放射線被ばくで生じる突然変異がどのように次世代に継承されるのか、あるいはされないのか具体的に解明することを目的とする。突然変異の種類や構造ごとに、それらの次世代への継承効率を測定する。

(2) 上記目的を達成するために、放射線で生じる特徴的な突然変異を精原細胞内で人工的に作成し、減数分裂や受精過程にて生体内でこのような変異細胞がどのように扱われるか観察する。本研究は第一段階として、特定の染色体構造変異を持つ細胞の作成を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 特定染色体の欠失や転座を人工的に作成する方法を開発する。これには CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集技術を応用する。これまでの研究により、親マウスの放射線被ばくで仔マウスに生じた大規模染色体欠失の例がある (Asakawa et al, Radiat Res 186:568-576, 2016)。これらのうち、染色体 6 番 (6qE1) に 16 Mbp の欠失が生じた例をモデルとして (つまり生殖細胞にこれだけ大規模欠失が起こっても仔が生まれる)、CRISPR/Cas9 を用いた染色体人工欠失システムを確立する。さらに、この部位を介した転座も人工的に作成する。

(2) 染色体構造変異は染色体 DNA 二重鎖切断 (DSB) の誤った非相同末端結合 (NHEJ) により生じる。これは修復が困難な DSB によると考えられる。放射線は修復不能な DSB をある一定数生じさせることから、修復因子の機能修飾により人工欠失や転座作成の効率化を行う。

## 4. 研究成果

(1) 実験システム：研究開始時には人工的な染色体構造変異を作成した例はほとんど無く、複数の DSB を細胞内に作成した後に、誤って修復された細胞クローンを拾うという考え方がなかった。この方法を体系的に行うには、特定の位置に DSB を導入する必要がある。上述のマウス染色体 6qE1 部位に大規模の欠失を生じさせても細胞が生存できることから、この領域内に CRISPR/Cas9 による人工的な染色体切断方法を用いて DSB を 2 つ導入することを試みた。CRISPR/Cas9 による染色体 DNA の切断はクロマチン構造に大きく依存し、標的塩基配列でもヘテロクロマチン領域では極端に効率が低下する。そこで、6qE1 領域約 13Mbp の中心部に存在し、恒常的に転写が行われている Cntn4 遺伝子を標的とした。Cntn4 遺伝子内を起点 DSB 部位として、100 bp, 1 Kbp, 10 Kbp, 100 Kbp, 1 Mbp 毎に DSB 導入部位を設定した。CRISPR vector は、pGuide-it ZsGreen を用い、マウス培養細胞 m5s を対象として、Cntn4 内に guide RNA 配列を設定して DSB を導入した。Vector 導入細胞を GFP 陽性細胞として検出し、cell sorter を用いて分取して培養し、その一部から DNA を抽出する方法で、標的塩基配列部位に小さな変異 (small indel) の出現効率を求めた。その結果、DSB 導入効率は guide RNA 塩基配列毎に相当に異なり、10-20% の導入効率から全く DSB が導入されない場合までが認められた。起点となる Cntn4 内 DSB 導入部位を決定した後は、多数の guide RNA 配列を設定し、DSB 導入効率の高い配列を絞り込む必要があった。2 つの CRISPR/Cas9 vector の同時導入により DSB

を2つ作成する操作は、まずはDSB間の距離が短いものから取り組み、得られた細胞クローンからDSB間の欠失が認められるクローンを同定した。この方法により、現在では1 Mbpに至る大きな染色体欠失が作成できる様になった(図-1)。

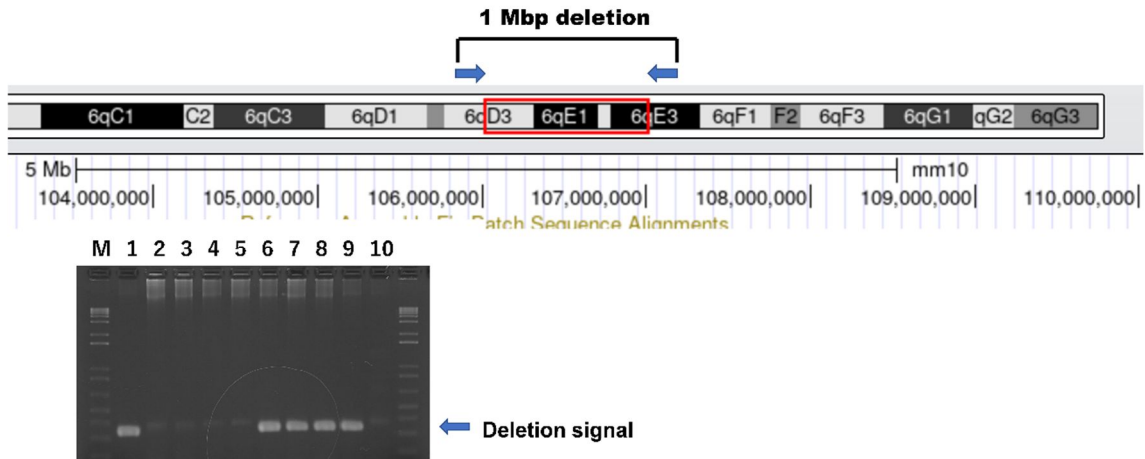


図 - 1 : CRISPR/Cas9 を用いたマウス 6 番染色体 6qE1 部位での 1 Mbp に渡る欠失作成。6qE1 部位を含む 1 Mbp の両端に DSB を導入して欠失細胞クローンを単離した。GFP 陽性細胞クローン 10 個中で 1, 6, 7, 8, 9 が欠失を検出する PCR 陽性となった。

(2) 培養マウス精原細胞への導入：マウス精原細胞 (GS 細胞 : Germline Stem cell) (理研細胞バンク・GS-DG1) の培養は篠原ら (Biology of Rep 69:612-616, 2003) に従い、Balb/c マウス feeder 細胞上で行った。この細胞は増殖が遅く、しかも未分化幹細胞であるので遺伝子導入は通常の vector では極めて困難であることが分かった。そこで、ES 細胞用の target vector を応用した CAG promoter により Cas9 の発現が制御される pGuide-ZsGreen vector (pCAG-SpCas9-GFP-U6-gRNA, addgene #79144) を用いることとして、遺伝子導入効率の改善を行った。これは成功し、遺伝子導入効率は通常のマウス培養細胞と同等になった。以上の結果から、GS 細胞で大規模欠失細胞を作成する見通しが立った。

(3) DSB 構造の修飾因子：放射線で染色体中に生じる DSB の 99% は効率よく修復されるが、残りの約 1% は修復が困難な DSB として細胞核内に残り続ける (J Cell Sci 125:5280-5287, 2012)。修復不能な DSB の生成を制御する因子として核膜 lamin A, B1 や 53BP1 がこれまで指摘されてきた。今回、X 線 10Gy 照射により修復されない DSB を多数持つ細胞集団で発現する特異的な遺伝子を expression array を用いて screening した結果、転写因子 CHD7 が新規 DSB 結合タンパク質として同定された。CHD7 は発生をコントロールする転写因子でありながら、放射線被ばく後には ATM によりリン酸化され、DSB に集積する性質を持つことが明らかとなった。従って、これら DSB 集積タンパク質と修復阻害剤を用いることにより、誤った NHEJ を誘導して染色体構造変異を誘発させるシステムが今後は考えられる。

#### < 引用文献 >

Asakawa J, Kodaira M, Miura A, Tsuji T, Nakamoto Y, Imanaka M, et al. Genome-wide deletion screening with the array-CGH method in mouse offspring derived from irradiated spermatogonia indicates that mutagenic responses are highly variable among genes. *Radiat Res* 2016, 186; 568-576. Doi 10.1667/RR14402.1

Kanatasu-Shinohara M, Ogunuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, and Shinohara T. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction* 69:612-616, 2003. Doi 10.1095/bioreprod.103.017012.

Noda A, Hirai Y, Hamasaki K, Mitani H, Nakamura N, Kodama Y. (2012). Unrepairable DNA double-strand breaks that are generated by ionising radiation determine the fate of normal human cells. *J Cell Sci* 125, 5280-5287. [10.1242/jcs.101006](https://doi.org/10.1242/jcs.101006). <https://doi.org/10.1242/jcs.101006>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 野田朝男	4. 巻 75
2. 論文標題 これからの放影研での被爆者ゲノム研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 広島医学	6. 最初と最後の頁 173-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noda Asao, Kato Kazuto, Tamura Chieko, Biesecker Leslie G, Imaizumi Misa, Inoue Yusuke, Henderson Gail E, Wilfond Benjamin, Muto Kaori, Naito Mariko, Kayukawa Junji	4. 巻 62
2. 論文標題 Ethical, legal and social implications of human genome studies in radiation research: a workshop report for studies on atomic bomb survivors at the Radiation Effects Research Foundation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 656 ~ 661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrab043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Noda A, Muramoto K, Mishima S.	4. 巻 34
2. 論文標題 ATM-dependent phosphorylation of CHD7 regulates morphogenesis-coupled DSB stress response in fetal radiation exposure.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Biol Cell	6. 最初と最後の頁 ar39-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E22-10-0450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Y, Uchimura A, Satoh Y, Kato N, Toshishige M, Kajimura J, Hamasaki K, Yoshida K, Hayashi T, Noda A, Tanabe O	4. 巻 120
2. 論文標題 Spectra and characteristics of somatic mutations induced by ionizing radiation in hematopoietic stem cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc. Acad. Sci., USA	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2216550120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hamasaki K, Matsumoto T, Cologne JB, Mukai M, Kodama Y, Noda A, Nakamura N.	4. 巻 64
2. 論文標題 Translocations are induced in hematopoietic stem cells after irradiation of fetal mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Radiat Res	6. 最初と最後の頁 99-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrac078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida K, Satoh Y, Uchimura A, Misumi M, Kyoizumi S, Taga M, Matsuda Y, Noda A, Kusunoki Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Massive expansion of multiple clones in the mouse hematopoietic system long after whole-body X-irradiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 17276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21621-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sposto R, Cordova K, Hamasaki K, Nakamura N, Noda A, Kodama Y	4. 巻 199
2. 論文標題 The Association of Radiation Exposure with Stable Chromosome Aberrations in Atomic Bomb Survivors based on DSQ2R1 Dosimetry and FISH Methods.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radiat Res	6. 最初と最後の頁 170-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-22-00154.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 野田朝男
2. 発表標題 Future genome studies on atomic bomb survivors and their offspring at RERF
3. 学会等名 The 61st Late A-bomb Effects Research Meeting (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田朝男
2. 発表標題 原爆被爆二世における遺伝的影響とがん
3. 学会等名 日本癌学会第79回学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田健吾、多賀正尊、三角宗近、佐藤康成、内村有邦、野田朝男、楠洋一郎
2. 発表標題 放射線照射マウスでのクローン造血と血液細胞プロファイルの予備研究
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asao Noda, Kaori Muramoto, Shuji Mishima
2. 発表標題 Role of CHD7 in radiation-induced fetal malformations
3. 学会等名 American Society for Cell Biology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hamasaki K, Matsumoto T, Cologne JB, Mukai M, Kodama Y, Noda A, Nakamura N.
2. 発表標題 mFISH analysis of hematopoietic stem cells isolated from pregnant mice exposed to X-rays.
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuda Y, Uchimura A, Satoh Y, Kato N, Toshishige M, Kajimura J, Kubo Y, Yamaoka M, Hamasaki K, Yoshida K, Noda A, Tanabe O.
2. 発表標題 Frequencies and characteristics of somatic mutations induced by X-irradiation in mouse hematopoietic stem cells.
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Uchimura A, Satoh Y, Noda A
2. 発表標題 Genome-wide analysis of the hereditary effects of radiation.
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshida K, Satoh Y, Uchimura A, Kyoizumi S, Misumi M, Koyama K, Nagamura H, Yamaoka M, Kubo Y, Toshishige M, Taga M, Matsuda Y, Noda A, Kusunoki Y
2. 発表標題 Somatic deletion mutations characterize clonal hematopoiesis in X-irradiated mice.
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kusunoki Y, Kyoizumi S, Satoh Y, Uchimura A, Misumi M, Taga M, Matsuda Y, Noda A, Yoshida K
2. 発表標題 Clonal hematopoiesis and blood cell count in mice long after sublethal whole-body X-irradiation.
3. 学会等名 The 84th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Sposto R, Cordova KA, Hamasaki K, Nakamura N, Noda A, Kodama Y, Liu Z.
2. 発表標題 The association of radiation exposure with stable chromosome aberrations in atomic bomb survivors based on DS02R1 dosimetry and FISH methods.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of the Radiation Research Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Uchimura A, Satoh Y, Noda A
2. 発表標題 Analysis of the transgenerational effects of radiation using next-generation sequencers.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of the Radiation Research Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱崎 幹也  (HAMASAKI Kanya)  (80443597)	公益財団法人放射線影響研究所・分子生物科学部・研究員   (85401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------