

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310042

研究課題名(和文) 高密度マイクロアレイCGH法を用いた原爆放射線の遺伝的影響調査

研究課題名(英文) Study of genetic effects of atomic bomb radiation using high-density microarray

研究代表者

小平 美江子 (KODAIRA, Mieko)

公益財団法人放射線影響研究所・遺伝学部・研究員

研究者番号：60344412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：高密度マイクロアレイを用いて原爆被爆者の親子127組についてコピー数変異(CNV)を調べた。一人当たり約300個のCNVが検出された。11人の子供に見られた11個のCNVは親には認められず新規の突然変異だった。このうち7個は欠失で、1個は約140kbの欠失、6個は5kb～30kbの小さい欠失だった。照射した精原細胞由来のF1マウスを用いたモデル実験で1Gyの放射線で誘発される欠失突然変異は約100ゲノム当たり1個、大きさは100kb以上であることが分かっている。今回の結果から、ヒトの放射線感受性はマウスの感受性と大きく変わらず、放射線の遺伝的影響は従来考えられているよりはるかに小さいと思われる。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed a total of 127 mother-father-child trios using high-density microarrays. We identified about 300 copy number variants (CNV) per individual genome. Eleven CNVs observed in 11 children were not identified among the parents and were thought to be de novo germline mutations. Seven of the mutations were deletions; one was 140kb deletion but the remaining 6 were small deletions (5kb-30kb). Our model experiments on F1 mice derived from irradiated spermatogonia revealed that one deletion, which size is larger than 100kb, was induced among approximately 100 genomes per 1 Gy of radiation. The results of the current study on the offspring of the A-bomb survivors suggest that the radio-sensitivity of humans are not different from that of mice and the genetic risk of radiation maybe much smaller than currently estimated.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：原爆放射線の遺伝的影響 生殖細胞突然変異 アレイCGH法による突然変異検索 突然変異の分子レベルの特徴

1. 研究開始当初の背景

放射線被ばくにより生殖細胞に突然変異が誘発されることは多くの動植物を用いて明らかにされている。従って、原爆放射線が被ばく者の子供に遺伝的影響を及ぼした可能性は被ばく直後から懸念された問題のひとつであった。これまで放射線影響研究所(放影研)では、出生時の異常や染色体異常、ミニサテライト突然変異など種々の調査が行われてきたが、いずれの調査においても親の放射線被ばくの影響は検出されていない。

ヒトの男性の遺伝リスクはマウスの特定遺伝子座における実験結果に基づいている。合計 36 の特定遺伝子座でのオスマウスの精原細胞における突然変異誘発率は $1.08 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ /遺伝子座/Gy と推定されている(2001年 UNSCEAR レポート)。しかし、これらの遺伝子の間には突然変異誘発に関して大きな感受性の差がある。そこで我々は、一度にゲノム当たり約 1,000 遺伝子座について調査し、欠失型突然変異を検出できる DNA の 2 次元電気泳動法(DNA 2-DE)を開発した。X線照射した精原細胞に由来する F₁ マウス DNA について大規模な欠失型突然変異の検出調査を行った結果、1,000 遺伝子座の 1 Gy 当たりの突然変異誘発率は $0.17 \pm 0.09 \times 10^{-5}$ /遺伝子座/Gy となり、上記(2001年 UNSCEAR レポート)の約 1/5 となること、自然突然変異率は世代当たり約 0.1×10^{-5} であることが判明した。

男性の場合と比較して、女性被ばくの動物モデルには問題があった。その理由は、標的細胞(未熟卵母細胞)が、マウスでは細胞死に関して極端に放射線感受性が高く、放射線照射すると卵子が枯渇してしまいメスが不妊になり、F₁ が得られないからである。そこで我々はマウス以外の動物を模索し、ラットが調査可能であることを見出した。そして 2.5 Gy のガンマ線照射時に未成熟であった卵母細胞に由来する F₁ ラットと対照群として非照射の母親ラットに由来する F₁、各々 750 匹についての DNA 2-DE による突然変異の大規模なスクリーニングを行った。合計 230 万遺伝子座検査に相当する DNA 断片を検索した結果、照射群に 12 例、対照群に 13 例、合計 25 例の突然変異を検出した。しかし、そのほとんど(20 例/25 例)はマイクロサテライトに生じたものであり、欠失型突然変異は照射群で 3 例、対照群で 2 例しかなかった。更に、これらの突然変異でメス親に由来するものは、照射群では 3 例中 1 例、対照群では 2 例中 1 例でしかなかった。この結果は、メス親ラットに 2.5 Gy 照射してもほとんど突然変異は誘発されないことを示唆している。

DNA 2-DE は現在では時代遅れとなり、それに代わる技法のひとつがマイクロアレイを用いた CGH 法(comparative genome hybridization)である。この方法はコピー数変異(CNV; copy number variations)を効率よく検出できる。放射線により誘発される突

然変異は主に DNA の 2 本鎖切断に起因する遺伝子欠失と考えられているので、アレイ CGH 法は放射線の遺伝的影響の研究に適した技術である。1 枚のガラススライドに 100 万個以上のプローブ(プローブの長さは 50~70 塩基)を貼り付けた高密度(HD)マイクロアレイが市販されるようになった。こうしたマイクロアレイを用いた CGH 法は、小さい CNV まで効率よく検出できると考えられたので、我々は NimbleGen 社のマイクロアレイシステムを導入し、マウスモデルを用いて技法の再現性・精度の向上を行い、CGH 法を精度の高い遺伝子欠失スクリーニング法を確立した。この改良 CGH 法では、大きな変異は勿論のこと、小さな遺伝子欠失(3~5kb)でも高い確率(偽陰性率 10%以下、偽陽性率 20%以下)で検出できる。

2. 研究の目的

原爆放射線の継世代影響は、ヒト生殖細胞における自然発生および放射線誘発突然変異の頻度が低いので、いまだ解明されていない。放射線により誘発される突然変異は主に DNA の 2 本鎖切断に起因する遺伝子欠失と考えられている。本研究では、高密度マイクロアレイ CGH 法によって、親の原爆放射線被ばくが原因で、子供のゲノムに欠失型の突然変異が生じたか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象と試料 DNA: 放影研の遺伝学調査では「血液提供と細胞株樹立」について書面による同意書を得て両親と子供からリンパ芽球永続細胞株(B-細胞株)を樹立している。この内、片親が高線量被ばく者である 184 家族の両親 368 人と子供 315 人; 父親が被ばく者である 92 家族(平均被ばく線量 1.5 Gy) 158 人の子供、母親が被ばく者である 84 家族(平均被ばく線量 1.3 Gy) 157 人の子供、を対象として選んだ。

ゲノム DNA は対象者から樹立した B-細胞株より抽出した DNA を試料とした。DNA 試料は個人情報管理者の監督下で連結可能匿名化され、個々の試料にはバーコードタグが付けられた。バーコード番号が以下の解析にも使用され、両親の被ばく情報は実験担当者には分らないように調査を行った。

CGH スクリーニングに用いた DNA は培養細胞から抽出したものである。突然変異候補については培養していない白血球より抽出した DNA を用いて、突然変異が培養中に生じたものではないことを確認した。

(2) マイクロアレイ CGH: アレイスライドには 140 万個の同じプローブセットが 3 か所に貼り付けられていて 1 枚で 3 組の CGH 実験ができる、NimbleGen 社の $3 \times 1.4M$ tiling アレイスライドを用いた。

CGH 実験は Roche NimbleGen 社の標準マニュアルに従って行った。対象 DNA の一方を緑色の蛍光色素 Cy3 で、もう一方の DNA を赤色の蛍光色素 Cy5 で標識した。45 °C で 72 時間のハイブリダイゼーション後、未反応の DNA を除去した。アレイスライドを乾燥し MS200 マイクロアレイスキャナーを用いて、2 μm の解像度で励起波長 532 nm と 635 nm の 2 波長同時読み取りを行った。1 枚のスライドについて連続して 5 回蛍光強度を測定した。なお、CGH 実験は標識に用いる蛍光色素を相互に交換して、1 組について 2 回の実験を行う「Dye-swap 法」を採用した。

NimbleGen 社アレイ CGH 解析ソフト(DNA Segment : NimbleScan V2.5)を用い、Cy3 と Cy5 の蛍光強度の \log_2 値を算出した。個々のプローブの \log_2 値より対象 DNA のコピー数を推定した。

(3) 突然変異の確認と由来親の推定 : 子供に突然変異の候補が検出された場合は、候補領域に PCR プライマーを作製し、定量 PCR (qPCR) によって、その子供と両親のコピー数を検討し、確認を行った。欠失あるいは重複の切断点における塩基配列の決定を行い、突然変異のメカニズムについても検討した。

突然変異が検出された親子については次世代シーケンサーを用いた全エクソン配列解析を行い、突然変異の周辺に位置する一塩基多型(SNP)情報を得た。この SNP 情報に基づき、突然変異の由来親についても調べた。

4 . 研究成果

(1) CGH 方法の検討と日本人集団における CNV の推定 : アレイ CGH 解析では特定の個人の DNA をリファレンスとして検査対象 DNA のコピー数変異領域(CNV)を検出する。最初にこの標準的な CGH 解析法で調査対象日本人集団に高頻度で存在する CNV のデータベース化のために 30 組の親子について解析を行った (5 組は 1 人のヨーロッパ白人 DNA、25 組は 1 人の日本人 DNA をリファレンスとした)。白人 DNA をリファレンスとした場合には 1 人当たり 500~600 個の CNV が検出されたが、そのうちの約 200 個は 5 家族の両親 10 人すべてに認められたので人種間差による CNV と考えられた。1 人の日本人の DNA をリファレンスとして実施した 25 組のトリオの CGH データを解析したところ、1 人につき約 350~450 個の CNV が検出された(図 1)。免疫関連遺伝子領域や性染色体に位置する CNV を除いても、50 人の親に、2,745 種類に分類できる合計約 26,000 個の常染色体 CNV が検出された。

次に、より効率よく突然変異を検索するために、特定個人の DNA をリファレンスとするのではなく、2 家族を 1 組として、父/父、母/母、子/子(同性)を組み合わせた CGH 解析を試みた。この方法でも、従来の特定個人の DNA をリファレンスとする方法と同様の精度、

再現性で CNV を検出できた。この家族間アレイ CGH 解析方法は、1 枚のアレイを用いた CGH 実験で 2 家族の DNA サンプルの解析ができるので効率が 2 倍になる。この方法は特定リファレンスに対して全ての CNV を検出する目的には適さないが、親子間での CNV を比較して突然変異を検出する我々の目的には効率的で優れている。この方法を用いて残りの父・母・子(トリオ)の解析を行った。この方法では、高い解析精度を維持するため、CGH 実験は Dye-swap 法によって行った。

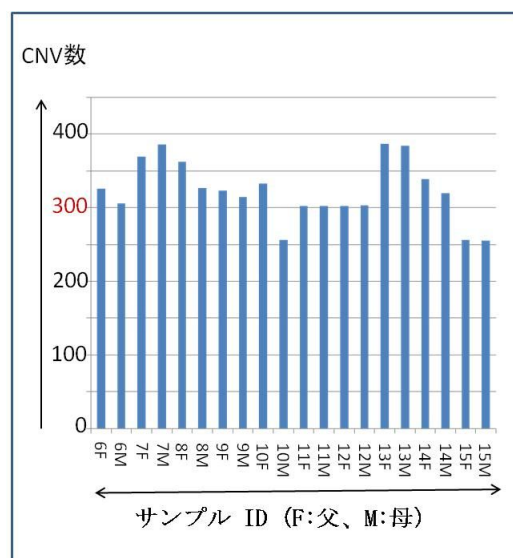


図 1 . 日本人 1 人当たりのゲノムに認められた CNV 数 : この図は 10 組の家族(#6-#15)の両親のゲノムに認められた CNV の数

(2) 新規突然変異の検出と確認 : 高頻度の多型 CNV は突然変異の候補とはしなかった。子供に検出された CNV を両親の CNV と比較検討し、子供にだけ存在する CNV を突然変異候補とした。検出された突然変異候補の 1 例についての CGH パターンを図 2 に示した。

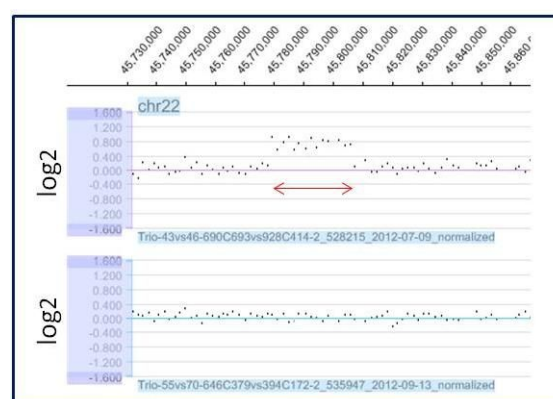


図 2 . 検出された突然変異候補の一例。上段が変異、下段が正常の CGH パターン。

図 2 に示した新規突然変異候補について両親と子供の DNA について qPCR を行い対象領域の遺伝子コピー数を測定した(図 3)。

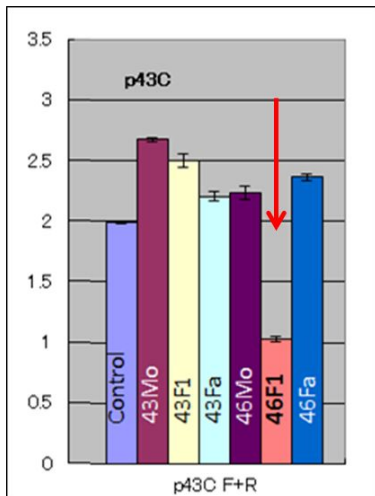


図3. qPCRを用いた遺伝子コピー数の家族調査：右3列が子供に突然変異が検出された家族：子供は中央赤矢印、左が父、右が母。図縦軸は推定遺伝子コピー数を示している。

qPCRの結果、両親は2コピーで子供は1コピーであり、この例は欠失突然変異と判定された。解析した127家族に検出された30例の突然変異候補についてqPCRを用いた家族調査の結果、11例が新規突然変異であった。11例の突然変異のタイプと生じた染色体番号、変異の大きさを図4にまとめた。

突然変異のタイプ	ID	染色体	大きさ (kb)
欠失	D1	6	25
	D2	9	4
	D3	1	140
	D4	22	26
	D5	19	6
	D6	X	6
	D7	8	13
重複	A1	17	426
	A2	20	260
	A3	1	1,383
	A4	5	130

図4. 検出された新規突然変異の特性

現在までにマウスを用いた放射線の遺伝的影響調査で検出した30数例の欠失突然変異の分子レベルでの詳細な解析から放射線誘発遺伝子欠失は大きさが100kb以上、切断点の塩基配列には類似性が無いことが分かっている。被ばく者の子供に検出された欠失突然変異は7個の内6個が30kb以下の小さなもので、自然突然変異と考えられる。

我々ヒトゲノムには、先祖の代に起きた欠失あるいは重複突然変異を蓄積したCNVが個

人ごとに異なるものの、約300個も存在する。動物モデル実験の結果と併せて考えると、10Gyの放射線で誘発される遺伝子欠失はゲノム当たり1個に満たず、放射線の遺伝的影響のインパクトは、従来考えられているものよりはるかに小さいことが示唆される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 5件)

三浦昭子、辻隆弘、今中正明、北村淳、金子順子、中本芳子、錦織栄子、佐藤康成、古川恭治、小平美江子、中村典、浅川順一、高密度マイクロアレイ CGH法を用いた原爆放射線の遺伝的影響調査、第57回日本放射線影響学会、2014年10月1日、かごしま県民交流センター、鹿児島

浅川順一、藤本明洋、佐藤康成、三浦昭子、中本芳子、錦織栄子、今中正明、小平美江子、X線照射ヒト培養細胞クローン DNAの全ゲノム塩基配列解読で検出された突然変異、第57回日本放射線影響学会、2014年10月1日、かごしま県民交流センター、鹿児島

浅川順一、Whole exome sequencingを用いた放射線の遺伝的影響調査、第3回NGS現場の会研究会、2013年9月4日、神戸国際会議場、神戸
浅川順一、放射線の継世代影響、日本放射線影響学会ワークショップ「低線量(率)被ばくの生体影響を考える」、2012年10月30日、福島

浅川順一、原爆被爆者の子供における放射線の遺伝的影響(放射線の遺伝的影響に関するDNA調査)、第35回日本がん疫学・分子疫学研究会総会、2012年7月5日、JMSアステールプラザ、広島

[その他]

ホームページ等

1. <http://www.rerf.or.jp/programs/rparchiv/rp04-11.htm>
2. http://www.rerf.or.jp/shared/briefdescript/briefdescript_j.pdf
3. http://www.rerf.or.jp/library/AnnualReport/2013/pdf/2_FY2013%20Highlights%20in%20Research%20Progress.pdf

6. 研究組織

(1)研究代表者

小平 美江子 (KODAIRA, Mieko)

(公財) 放射線影響研究所・遺伝学部・研究員

研究者番号：60344412

(2)研究分担者

浅川 順一 (ASAKAWA, Jun-ichi)
(公財) 放射線影響研究所・遺伝学部・
主任研究員
研究者番号：10359458

古川 恭二 (FURUKAWA, Kyoji)
(公財) 放射線影響研究所・統計部・副
主任研究員
研究者番号：00416421

中村 典 (NAKAMURA, Nori)
(公財) 放射線影響研究所・遺伝学部・
顧問
研究者番号：00010116
(平成24年度より連携研究者)