

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20053

研究課題名(和文)ゲノムワイド放射線影響解析法の開発

研究課題名(英文)Development of genome-wide method for analyzing radiation effects

研究代表者

荒木 良子 (ARAKI, RYOKO)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・グループリーダー(定常)

研究者番号：40392211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線影響研究において、ゲノム変異頻度及びその質の理解は中心的課題であり、次世代シーケンシング法による高精度で網羅的な解析が期待されている。しかし、ひとつひとつの細胞に生じる独立した異なる異常を通常はクローン増殖しない状況で解析することは不可能である。今回、X線照射された細胞をクローン増殖させることを目的として、iPS細胞技術応用の可能性をヒト及びマウスの系で検討した。その結果、iPS細胞技術を組み合わせることによる放射線影響のゲノムワイド解析の可能性が初めて示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、放射線によるDNA損傷の分子メカニズムの理解、更には、被ばく事故における被ばく線量の正確な推定、さらには発癌研究に貢献する可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：In the study of radiation effects, understanding the frequency and quality of genomic mutations is a central issue, and highly accurate and comprehensive (genome-wide) analysis using the next-generation sequencing method has been long awaited. However, it is impossible to analyze an independent abnormality that occurs in each cell. In this study, we investigated the possibility of applying iPS cell technology for clonal expansion of X-irradiated cells. We tried to identify SNV and INDEL mutations in iPS cells established from human and mouse cells irradiated by various dose of X-ray and demonstrated the potential of iPS cell technology for genome-wide analysis of radiation effects.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム変異 全ゲノムシーケンシング 放射線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

放射線被ばく影響研究において、個体が被ばくした場合の正確な変異の頻度の決定やその質の理解は基本となる中心的な課題である。特定のモニター遺伝子やゲノムの一部の解析というどうしてもバイアスのかかる従来の解析法から、近年めざましい発展を遂げている次世代シーケンサーによる領域バイアスのかからないゲノム全体を対象とした解析が期待され続けてきたが、未だ実現していない。その主な理由は、放射線照射によって生じるゲノム異常は細胞毎に異なるため、単一細胞の解析が求められることによる。現在のところ、1細胞のゲノムの配列を正確に決定することは不可能である。そのため、一つ一つの細胞をゲノム配列決定に必要なゲノム量の調製が可能な数まで増殖させる必要がある。即ち、現在のところ、次世代シーケンシング解析が利用されている癌や細胞株の様にクローン増殖した細胞集団が使用できないことが技術的な壁となって、全ゲノム解析が利用できない状況が続いている。

単一細胞 WGS (whole genome sequencing) を行うためには、1分子の DNA を直接シーケンシングできる技術、または、DNA を正確・均一に増幅する技術の確立が前提となるが、ポリメラーゼのエラーのみならず、DNA 変性時の損傷等による多量の変異発生や大きな増幅バイアス (片アリルしか増幅されない、両アリルとも増幅されないなど) が生じることが知られており、その結果膨大なバックグラウンドシグナルが発生する。この精度では、より頻度が低いことが予想される放射線による変異の抽出は不可能である。この状況から、本分野において、もうひとつのアプローチ、即ち単一細胞からのクローン増殖法は重要なテーマとなっている。

## 2. 研究の目的

単一細胞ゲノムの酵素的増幅による WGS によるのではなく、各細胞のクローン増殖を iPS 細胞技術によって行い WGS にて変異を決定することが可能か否か検証した。体細胞からの iPS 細胞化そのものでもゲノムに変異が発生することを我々は報告してきたが、その量、質には特徴があるため、X線による変異と区別できる可能性があると考えた。

## 3. 研究の方法

まず、マウスおよびヒト初代培養細胞 (線維芽細胞) に初期化因子をレトロウイルスで感染させることにより iPS 細胞を樹立した。

具体的な WGS 解析については次のように行った。イルミナ社 TruSeq DNA PCR-free sample prep kit を用いてライブラリを調製し、HiSeq X を用いて、150bp の paired-end にて、各細胞あたり depth 約 135Gb の read を取得した。CLC 社 Genomics Workbench にてマッピング及び single nucleotide variant (SNV)、short INDEL (1-約 20bp)、medium INDEL (~100bp) をターゲットとする変異検出を行い、親体細胞に存在する変異を除去、その他既知の SNP の除去および信頼性の低い候補の除去等フィルタリングを行った。INDEL 検出に関しては、ソフトウェアによらず偽陽性を除去することが困難なことが知られているため、モデルデータを作成し、検出能を指標にフィルタリング法の検討を繰り返し行った。本 SNV 検出法の正当性は過去に検証済みであり、INDEL については、研究成果に示した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト iPS 細胞の樹立と変異解析

購入した成人皮膚線維芽細胞（初代培養細胞）を用いて X 線照射群 2 株、非照射コントロール 3 株の iPS 細胞を樹立した (OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, NANOG、レトロウイルスベクター)。

WGS を実施し (平均 depth 35)、SNV および INDEL の解析を行った。INDEL の候補箇所全てについて、目視確認によりアラインメント異常等の偽陽性を除去した。

その結果、照射群の SNV は control に対し 1.4 倍、INDEL (70bp 以下) は 2.7 倍に増加していた。INDEL では、特に MNV (multi nucleotide variation) と放射線影響に特徴的な現象であることは知られている deletion の増加が顕著であった。今後、n 数を増やし、統計学的解析を行いたい。

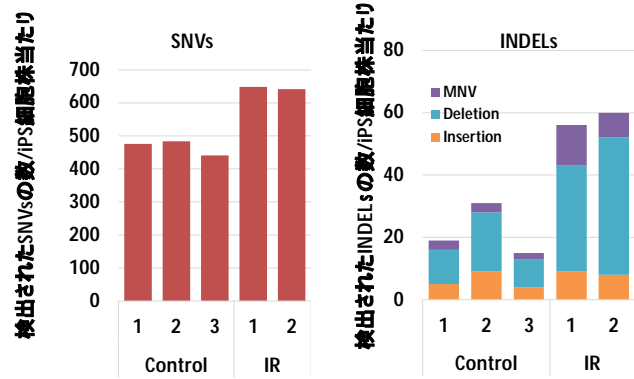


Fig. 1 iPS細胞の全ゲノム変異解析  
control: 非照射, IR: day3に3GyX線照射し樹立したiPS細胞  
SNV: single nucleotide variation, MNV: multi nucleotide variant

### (2) マウス iPS 細胞の樹立変異解析

マウス胎児線維芽細胞を用いて X 線 3Gy、5Gy、コントロール群について各 3 株ずつ iPS 細胞を樹立した (OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc、レトロウイルスベクター)。

WGS を実施し (平均 depth 35)、SNV の解析を行った。照射群の SNV 数は control に対し約 1.2 倍 (3Gy) であった。一方、5Gy 照射ではクローン間のばらつきが大きかった。3Gy 照射条件では iPS 細胞株の樹立効率に大きな影響が無かったのに対して、5Gy 照射条件では著しくその頻度の低下がみられた。5Gy では多くの細胞に致死的な損傷が生じ、より変異の少ない iPS 細胞が選択され細胞株として生き残る傾向にもあったかもしれない、5Gy での影響の観察の難しさが示された。

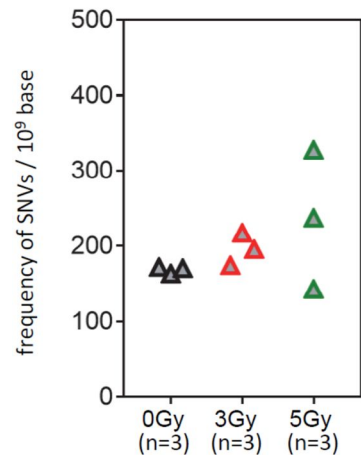


Fig. 2 X線照射MEFの全ゲノムSNVs解析

今回の我々の実験結果は、放射線影響をゲノムワイドに SNV の線量依存性を捉えられる可能性を示している (線量は更なる検討が必要)。今後、INDEL の解析、および、n 数を増やし、その有用性を明らかにする。

### (3) INDEL (挿入・欠失) 検出法の高精度化

INDEL 検出においては特に WGS データのゲノム上へのアラインメントの不正確さによる偽陽性が問題となる。我々は、その問題を克服するため、過去に取得した C57BL/6 マウス MEF (1 個体由来) WGS read data を用いて、仮想の insertion, deletion read data (model INDELs) を作成し (1-70bp, insertion 91 種類、deletion 88 種類、計 179 種類) それらの検出効率を指標に、フィルタリング法を最適化した。この条件を用いて今後の解析を進める。

上記の通り、iPS 細胞樹立技術を導入することにより、単一細胞における放射線影響とバックグラウンドに差がある傾向が認められた。解析クローン数が少ない為、統計学的有意差を出すことができなかったが、iPS 細胞樹立技術の有用性は示唆することができたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Allen Christopher P., Hirakawa Hirokazu, Nakajima Nakako Izumi, Moore Sophia, Nie Jingyi, Sharma Neelam, Sugiura Mayumi, Hoki Yuko, Araki Ryoko, Abe Masumi, Okayasu Ryuichi, Fujimori Akira, Nickoloff Jac A.	4. 巻 188
2. 論文標題 Low- and High-LET Ionizing Radiation Induces Delayed Homologous Recombination that Persists for Two Weeks before Resolving	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 82 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RR14748.1	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 Araki Ryoko, Hoki Yuko, Suga Tomo, Obara Chizuka, Sunayama Misato, Imadome Kaori, Fujita Mayumi, Kamimura Satoshi, Nakamura Miki, Wakayama Sayaka, Nagy Andras, Wakayama Teruhiko, Abe Masumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic aberrations in iPSCs are introduced by a transient G1/S cell cycle checkpoint deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13830-x	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅 智, 砂山 美里, 藤森 (法喜) ゆう子, 小原 千寿香, 今留 香織, 藤田 真由美, 中村 美樹, 安倍 真澄, 荒木 良子
2. 発表標題 iPS細胞におけるゲノム変異 -INDEL解析-
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会, 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤森 ゆう子, 砂山 美里, 小原 千寿香, 今留 香織, 菅 智, 藤田 真由美, 安倍 真澄, 荒木 良子
2. 発表標題 iPS細胞ゲノム内点突然変異の頻度は変えられるか？
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村 悟氏, 菅 智, 砂山 美里, 藤森(法喜)ゆう子, 小原 千寿香, 今留 香織, 藤田 真由美, 中村 美樹, 安倍 真澄, 荒木 良子
2. 発表標題 Reprogrammed cellゲノムにおけるINDEL変異解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
連携研究者	法喜 ゆう子  (HOKI YUKO)  (50415402)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・研究員   (82502)	
連携研究者	砂山 美里  (SUNAYAMA MIASATO)  (20625115)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・技術員   (82502)	
連携研究者	安倍 真澄  (ABE MASUMI)  (00291104)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・部長   (82502)	