

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12338

研究課題名(和文)放射線発癌と体細胞変異に対する抗酸化ストレス転写因子NRF2による防御作用の検討

研究課題名(英文) Study on Protective Effects of NRF2, an Anti-oxidative Stress Transcription Factor, against Radiation-induced Oncogenesis and Mutagenesis

研究代表者

田邊 修 (TANABE, Osamu)

公益財団法人放射線影響研究所・バイオサンプル研究センター・センター長

研究者番号：70221398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの長期造血幹細胞(LT-HSC)に自然発生した、あるいは全身X線照射により誘発された体細胞変異を、LT-HSCを培養して得た細胞クローンの全ゲノムシーケンスによって同定した。一塩基変異(SNV)及び短い挿入・欠失は最も高頻度の変異であり、X線照射により線量依存的に2倍から3倍に増加した。SNVの塩基置換パターンより、X線による変異誘発における活性酸素の役割が示唆された。タンDEMリピート外の欠失、マルチサイト変異及び構造変異が放射線特異性の特に高い変異種であった。さらに、NRF2欠損または活性化変異マウスを用いた解析から、放射線被曝による体細胞変異に対するNRF2の防御作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線の主要な晩発障害である悪性腫瘍の増加は、DNA損傷による体細胞変異が原因とされている。しかし放射線による変異のゲノムワイドの特徴や、その後の腫瘍発生の分子メカニズムは明らかでない。この研究では、全身X線照射後にマウスの造血幹細胞に生じた体細胞変異の全体像と頻度とを明らかにした。これにより、個々の変異種の放射線感受性と特異性を決定し、放射線による変異シグネチャーを同定した。また、放射線被曝による体細胞変異に対するNRF2の防御作用が示唆された。これらの知見は、放射線の晩発障害のメカニズム解明とそれに対する予防法の開発、そして放射線傷害の新しいバイオマーカー開発に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：We identified spontaneous somatic mutations and ones induced by whole-body X-irradiation in mouse long-term hematopoietic stem cells (LT-HSCs) by whole-genome sequencing of cell clones propagated in vitro from LT-HSCs. Single-nucleotide variants (SNVs) and small indels were the most common types of somatic mutations, and increased in a dose-dependent manner up to 2 to 3-fold by X-irradiation. Single-base substitution patterns in the SNVs suggested a role of reactive oxygen species in X-ray-induced mutagenesis. Small deletions out of tandem repeats, multisite mutations, and structural variants were the mutation types of the highest radiation-specificity. Analysis of mice with an NRF2 null or activation mutation suggested a protective action of NRF2 against somatic mutations induced by radiation exposure.

研究分野：分子生物学、血液学

キーワード：DNA損傷 変異シグネチャー 全ゲノムシーケンス

1. 研究開始当初の背景

電離放射線の被曝による発癌リスク上昇を抑制する遺伝的要因あるいは内的・外的要因を同定できれば、放射線による発癌の予防法の開発につながる可能性がある。放射線発癌の原因は、DNA 損傷後の修復エラーに基づく突然変異と考えられているが、X 線やガンマ線による DNA 損傷では、間接作用すなわち水の電離により生ずる活性酸素等のラジカルによる DNA 損傷が主要な原因である。一方、転写活性化因子 NRF2 は、活性酸素の消去に関わるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンなどの抗酸化ストレス因子群のマスター制御因子であることから (文献 1)、放射線障害を抑制するための分子標的となりうる。実際、NRF2 の活性化剤をマウスに投与すると、放射線被曝による骨髄や消化管の急性障害が顕著に軽減されてマウスの生存率が向上することが報告されている (2,3)。NRF2 は定常状態では細胞質内において、その抑制因子である Keap1 による分解を受けるが、細胞が酸化ストレスを受けると NRF2 と Keap1 の結合が解離し、NRF2 は分解を逃れて核内に移行し、抗酸化ストレス遺伝子群の発現を誘導する (1)。

これまで NRF2 の酸化ストレス応答における役割は、遺伝子改変マウスを用いて明らかにされて来た (1,4)。NRF2 欠損変異のホモ接合体マウス (NRF2^{-/-}) においては、酸化ストレス障害が増強することが明らかにされている。他方、NRF2 の抑制因子である Keap1 の発現量が低下した複合変異ヘテロ接合体マウス (Keap1^{F/-}) では、NRF2 が恒常的に活性化され、酸化ストレス障害が抑制される。急性放射線障害に関しては、前述の通り NRF2 の活性化が防御作用を示すことが報告されているが (2,3)、体細胞変異や発癌などの放射線の長期的影響に対する防御作用の有無は明らかにされていない。

2. 研究の目的

抗酸化ストレス遺伝子群の転写活性化因子 NRF2 が、放射線被曝による体細胞変異の発生と発癌に対する防御作用を持つ可能性を検証するとともに、変異発生と発癌の抑制のための標的分子としての NRF2 の有効性を評価することが本研究の目的である。そのために、NRF2 欠損 (NRF2^{-/-}) 変異マウスと NRF2 活性化 (Keap1^{F/-}) 変異マウスを用いて、NRF2 活性の変化によって、X 線被曝による体細胞変異の発生が変化するか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

1) マウスへの X 線照射と長期造血幹細胞の単離・培養

X 線照射による変異発生の解析には、C57BL/6J 系統の野生型マウスと、NRF2^{-/-}及び Keap1^{F/-}変異マウスを用いた。野生型マウスでは、8 週齢時に 3.8 Gy または 7.5 Gy の 1 回照射、あるいは 8 週齢までに 7.7 Gy の 4 分割照射 (fr7.7 Gy) による全身 X 線照射を行った。変異マウスには 8 週齢時に 3.8 Gy の 1 回照射を行った。全身 X 線照射終了の 8 週後に骨髄と尾組織を採取した (図 1)。骨髄細胞から磁気ビーズ標識抗体で各分化マーカー陽性細胞を除去した後に、長期造血幹細胞

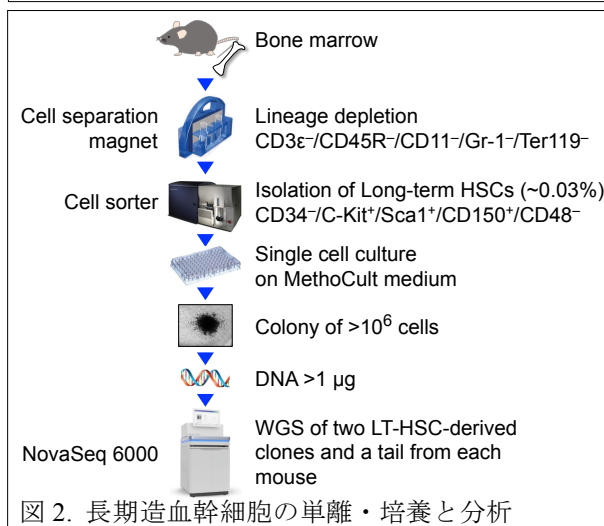
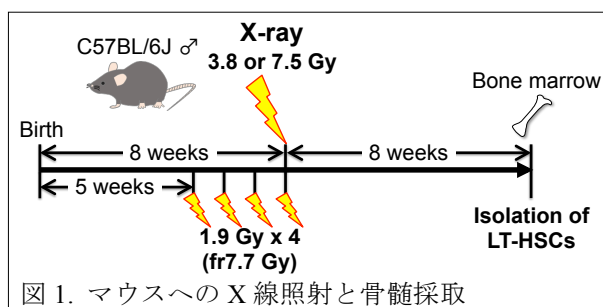
(Long-term Hematopoietic Stem Cell: LT-HSC) をセルソータで分離し、半固形培地上で 2 週間以上培養して血球 100 万個以上からなるコロニーを形成させて細胞クローンを得た (図 2)。

2) 全ゲノムシーケンス解析

各マウスから得た独立した LT-HSC 由来細胞クローン 2 個ずつから抽出した DNA と尾組織から抽出した DNA それぞれ 1 µg を用いてイルミナ NovaSeq6000 による全ゲノムシーケンス解析を行った。

3) 小さい体細胞変異の同定

NovaSeq6000 によるシーケンスリードをマウスの参照ゲノムへマッピングし、マッピングクオリティによるフィルター後に、リード深度によるフィルターによって、信頼性の高いデータが得られる領域 (ゲノム全体の 76.4%) を設定した。この領域中の一塩基変異 (Single Nucleotide Variant: SNV) や小さい挿入・欠失をソフトウェア GATK Haplotype



Caller で検出した。さらにこれらの変異のアレル比を LT-HSC 由来細胞クローンと尾組織とで比較して、両者に共通して一定以上の割合で検出される変異は生殖細胞系列変異と判断して除外し、LT-HSC 由来細胞クローンでのみ検出される変異を LT-HSC の体細胞変異として同定した。具体的には、LT-HSC 由来のクローンで 30%以上、性染色体の場合は 60%以上で、かつ全てのマウスの尾組織 DNA で 5% 未満、性染色体の場合は 10%未満の変異を体細胞変異と定義した。

4) 構造変異の同定

50 塩基以上の大きさの変異を構造変異と定義した。シーケンスリードを参照ゲノムへマッピングした際のスプリットリードをソフトウェア SvABA、Manta 及び RUFUS を用いてローカルデノボアセンブリを行うことにより検出し (5-7)、ソフトウェア Integrative Genomics Viewer によりすべて目視にて検証した。

5) X 線の変異誘発作用と NRF2 による抑制作用の分析

X 線照射群と非照射群とで各種の体細胞変異の発生頻度を正確二項検定で比較することにより、X 線照射による変異誘発作用を確認した。さらにその作用をマウスの 3 種の遺伝子型間で比較することにより、NRF2 活性を変化させたことによる変異誘発作用への影響を分析した。

4. 研究成果

1) 野生型マウスでの自然発生及び X 線照射後の体細胞変異の解析

実験に使用した野生型マウスの数は、非照射と 3.8 Gy 照射がそれぞれ 3 匹、7.5Gy 照射が 1 匹、7.7Gy の分割照射が 2 匹であった。

① 小さい体細胞変異

各種の体細胞変異の頻度をゲノム当たりの数で示す (図 3)。非照射マウスでは、SNV は平均で約 55 個、小さい挿入 (Small Insertion) が約 34 個、小さい欠失 (Small Deletion) が約 43 個で、いずれも照射量依存的に増加し、最大で 2~3 倍に達した。

② SNV の塩基置換

SNV の 6 種の塩基置換のうち、C>T 転位を、CpG 部位か否かで 2 分類した計 7 種の塩基置換の実数と割合を示す (図 4A,B)。非照射マウスでは、C>T 及び T>C 転位が大半を占めた。X 線照射により、C>A 及び T>A 転換や、非 CpG 部位の C>T 転位が特に増加していた。C>A 変異は、活性酸素により生じる 8 オキシグアニンを介する変異として知られており、X 線被曝による変異への活性酸素の関与が示唆された。

さらにこれらの変異のプロセスを明らかにするために、全部で 6 種の塩基置換とその前後の 3 塩基の配列で分類した 96 種類の変異の相対頻度、すなわち一塩基置換 (Single Base Substitution:

SBS) シグネチャーの分析を行った。その結果を、COSMIC のヒト癌ゲノム解析から得られた既知のシグネチャーと比較して、それらの寄与率を調べた (図 4C) (8)。

非照射マウスの LT-HSC の SNV は、SBS5 が 75%、SBS1 が 25% を占めた。これらはいずれもクロックシグネチャーであり (9)、SBS1 はメチルシトシンの脱アミノ化によるチミンへの変換により生じ、細胞分裂回数を反映すると考えられている。一方、SBS5 の原因は不明である。X 線照射マウスでは線量依存的に SBS5 が、SBS 40 に置き換えられた。SBS 40 は様々な癌に見られ、特徴に乏しく原因も不明であったが (8)、この結果から放射線との強い関連が示された。

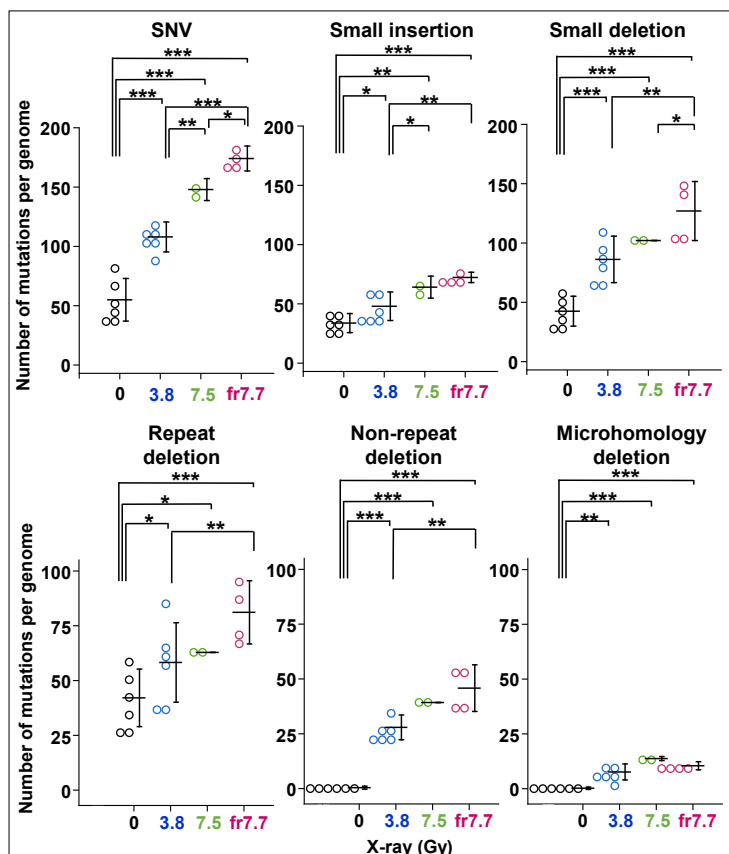


図 3. X 線照射及び非照射マウスの長期造血幹細胞の小さい体細胞変異の頻度

③ 小さい欠失変異

小さい欠失変異を、タンデムリピートの短縮であるリピート欠失 (Repeat Deletion) と、タンデムリピート以外に生じた非リピート欠失 (Non-repeat Deletion) とに分類して分析した (図 3)。非照射マウスではリピート欠失は平均で約 42 個認められ、線量依存的に増加し、最大で約 2 倍に増加した。これに対して非リピート欠失は、非照射マウスにはほとんど認められず、放射線特異的かつ線量依存的に発生し、最大で平均約 46 個認められた。

さらに非リピート欠失におけるマイクロホモロジー配列の有無を分析した。非リピート欠失のうち、欠失のサイズが 3 塩基以上で、欠失した配列の端と、反対側の逆ストランドの周辺配列との間が 2 塩基以上一致している場合に、マイクロホモロジー欠失 (Microhomology Deletion) と定義した。これらは、非リピート欠失のうちの 30% 前後を占めており、X 線照射による DNA 二重鎖切断の修復に、非相同末端結合 (NHEJ) だけでなくマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) も働いていることが示唆された (図 3) (10,11)。

④ マルチサイト変異

100 塩基以内に複数の塩基置換や小さい挿入・欠失が発生した変異をマルチサイト変異と定義した。このような変異はこれまでにマウスの放射線特異的な生殖細胞系列変異として知られている (12,13)。非照射マウスでは平均 1.1 個ほどだが、X 線照射マウスでは、最大で約 8 倍に増加した (図 5A)。

⑤ 構造変異

50 塩基以上の大きさの構造変異を、大きな欠失 (Large Deletion) と挿入 (Large Insertion)、逆位 (Inversion)、転座 (Translocation)、複合変異 (Complex Variant) の 5 種に分類した。複合変異の定義は、3 箇所以上の切断点を持つ構造変異である。非照射マウスでは大きな欠失と挿入のみが認められ、合計で平均 0.8 個ほどだが、X 線照射マウスでは最大で約 8 倍に増加した (図 5A,B)。

⑥ 体細胞変異の線量応答モデル

線形回帰によって個々の変異種の線量応答モデルを求めた (図 6)。いずれも線量と変異頻度に統計的に有意な相関が認められた。放射線感受性すなわち 1 Gy あたりの変異頻度自体は、SNV、小さい挿入・欠失で高いが、これらは非照射マウスでも高頻度であり、放射線特異性は低いことがわかった。これに対して、非リピート欠失、マルチサイト変異、構造変異は、非照射マウスでの頻度が低いことから、放射線特異性が高いことが明らかになった。

これらの知見は、長期的な放射線障害のメカニズムの理解と放射線傷害のバイオマーカー開発に貢献すると期待される。

2) 変異マウスでの体細胞変異の解析

NRF2 欠損 (NRF2^{-/-}) 変異マウス及び NRF2 活性化 (Keap1^{F/-}) 変異マウスを用いた。マウスの数は、両変異マウス及びそれらの対照マウスとも非照射と 3.8 Gy 照射がそれぞれ 3 匹ずつであった。上記と同様の分析を行ったところ、全身 X 線照射による小さい挿入・欠失などの体細胞

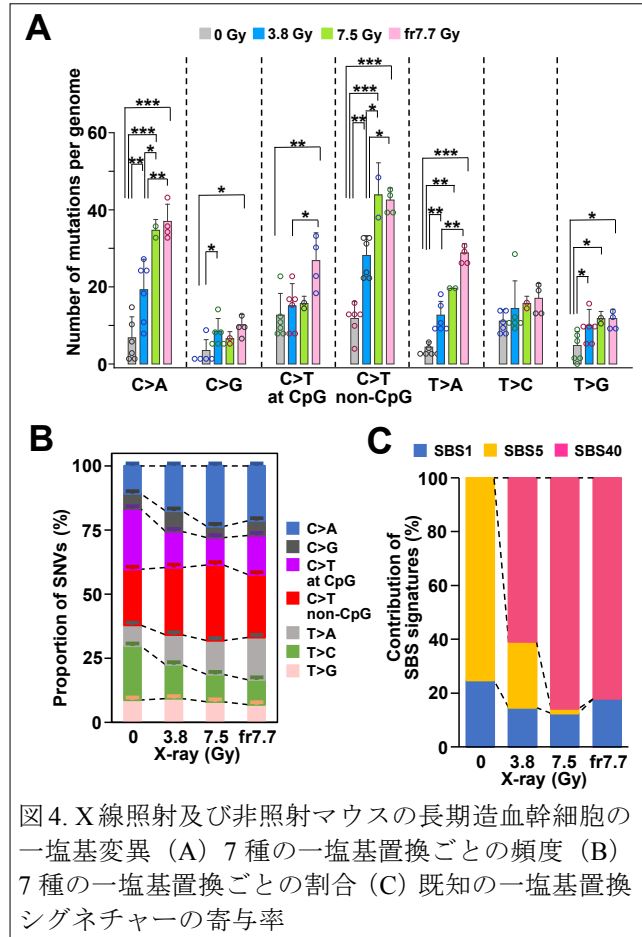


図 4. X 線照射及び非照射マウスの長期造血幹細胞の一塩基変異 (A) 7 種の一塩基置換ごとの頻度 (B) 7 種の一塩基置換ごとの割合 (C) 既知の一塩基置換シグネチャーの寄与率

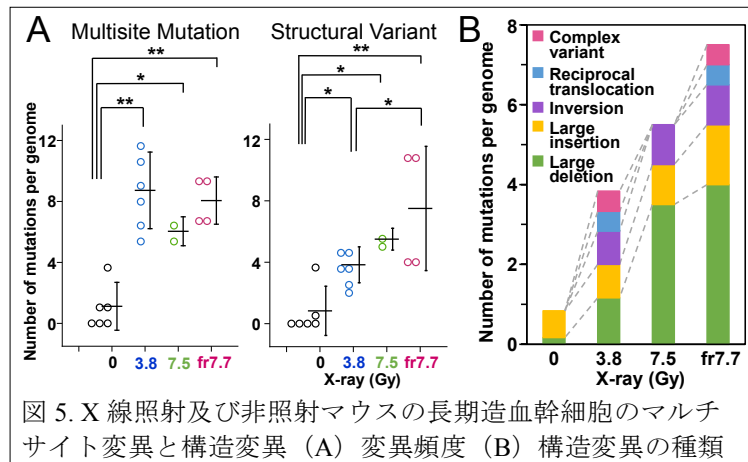
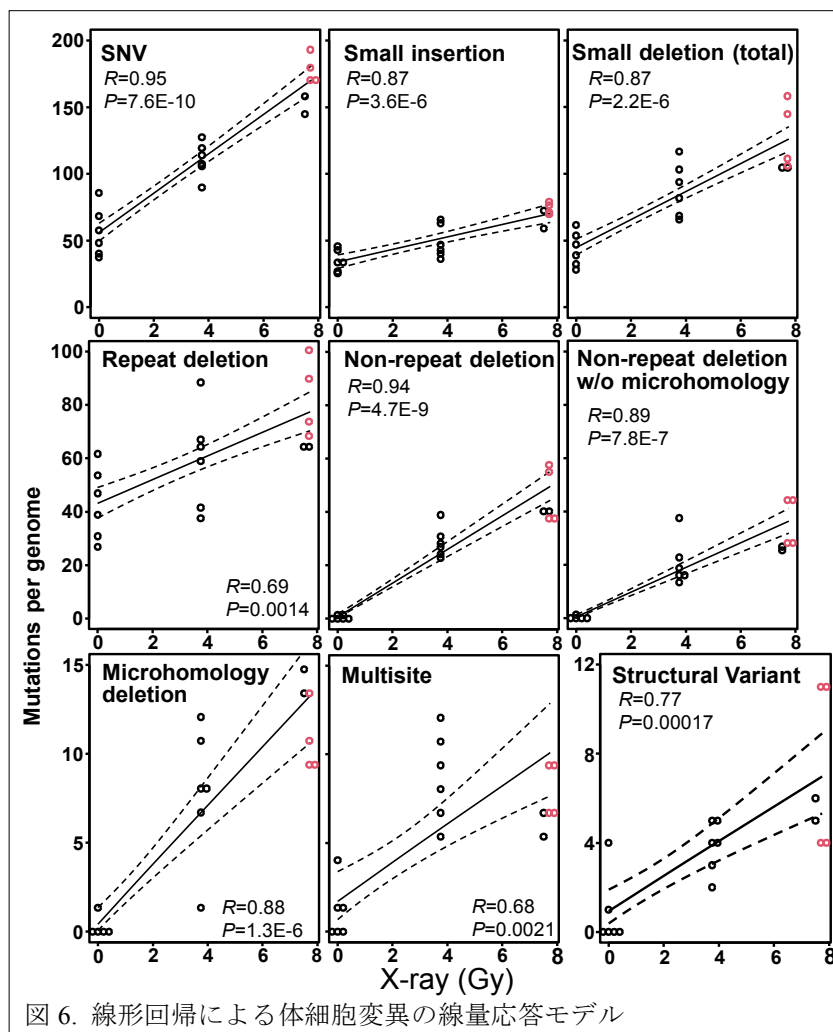


図 5. X 線照射及び非照射マウスの長期造血幹細胞のマルチサイト変異と構造変異 (A) 変異頻度 (B) 構造変異の種類

変異の増加が、変異マウスにおいて促進されていた。これらの結果から、放射線被曝による体細胞変異に対する NRF2 の防御作用が示唆された。



<引用文献>

1. T. Suzuki, M. Yamamoto: Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. *J Biol Chem* 292, 16817-16824 (2017).
2. S. B. Kim *et al.*: Targeting of Nrf2 induces DNA damage signaling and protects colonic epithelial cells from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 09, E2949-2955 (2012).
3. J. H. Kim *et al.*: NRF2-mediated Notch pathway activation enhances hematopoietic reconstitution following myelosuppressive radiation. *J Clin Invest* 124, 730-741 (2014).
4. N. Keleku-Lukwete *et al.*: Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nrf2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 12169-12174 (2015).
5. J. A. Wala *et al.*: SvABA: genome-wide detection of structural variants and indels by local assembly. *Genome Res* 28, 581-591 (2018).
6. X. Chen *et al.*: Manta: rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications. *Bioinformatics* 32, 1220-1222 (2016).
7. J. Feusier *et al.*: Pedigree-based estimation of human mobile element retrotransposition rates. *Genome Res* 29, 1567-1577 (2019).
8. L. B. Alexandrov *et al.*: The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature* 578, 94-101 (2020).
9. L. B. Alexandrov *et al.*: Clock-like mutational processes in human somatic cells. *Nat Genet* 47, 1402-1407 (2015).
10. H. H. Y. Chang *et al.*: Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 495-506 (2017).
11. B. Zhao *et al.*: The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 765-781 (2020).
12. A. B. Adewoye *et al.*: The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline. *Nat Commun* 6, 6684 (2015).
13. Y. Satoh *et al.*: Characteristics of induced mutations in offspring derived from irradiated mouse spermatogonia and mature oocytes. *Sci Rep* 10, 37 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuda Yukiko, Uchimura Arikuni, Satoh Yasunari, Kato Naohiro, Toshishige Masaaki, Kajimura Junko, Hamasaki Kanya, Yoshida Kengo, Hayashi Tomonori, Noda Asao, Tanabe Osamu	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 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2216550120
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田邊修、松田由喜子
2. 発表標題 X線照射マウスの造血幹細胞における体細胞変異の頻度と特徴
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田由喜子、内村有邦、佐藤康成、加藤直広、利重匡亮、梶村順子、久保美子、山岡美佳、濱崎幹也、吉田健吾、野田朝男、田邊修
2. 発表標題 X線照射によりマウス造血幹細胞に誘導される体細胞変異の頻度と特徴
3. 学会等名 日本放射線影響学会第 65 回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuda Yukiko, Uchimura Arikuni, Satoh Yasunari, Kato Naohiro, Toshishige Masaaki, Kajimura Junko, Hamasaki Kanya, Yoshida Kengo, Hayashi Tomonori, Noda Asao, Tanabe Osamu
2. 発表標題 Genome-wide frequencies and signatures of somatic mutations introduced by whole-body X-irradiation in mouse long-term hematopoietic stem cells
3. 学会等名 17th International Congress for Radiation Research（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松田由喜子、内村有邦、佐藤康成、加藤直広、利重匡亮、梶村順子、濱崎幹也、吉田健吾、林奉権、野田朝男、田邊修
2. 発表標題 マウス長期造血幹細胞における放射線誘発変異シグネチャーの全ゲノムシーケンスによる解析
3. 学会等名 第47回中国地区放射線影響研究会
4. 発表年 2023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	松田 由喜子 (Matsuda Yukiko) (10735301)	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)	
研究分担者	吉田 稚明 (Yoshida Noriaki) (20832926)	公益財団法人放射線影響研究所・広島臨床研究部・副主任研究員 (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
---------	---------