

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2014

課題番号：21221003

研究課題名(和文) 個体内における電離放射線誘発突然変異成立過程の解明

研究課題名(英文) Visualization of radiation induced mutagenesis in vivo

研究代表者

三谷 啓志 (Mitani, Hiroshi)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：70181922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 77,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線の生物影響を真に理解するには、分子から細胞レベルの知見から生体内のネットワークとしての組織応答を知ることが必要である。本研究では、新規改変遺伝子導入技術を利用して、放射線影響の可視化定量評価の系をマウス及びメダカで開発した。さらにメダカで細胞増殖能の高い組織の放射線照射後の応答を評価し、マウスとは異なる新規の応答を見いだした。マウスでも胎児期の腸では、成体と異なり、放射線照射後もアポトーシスが誘発されないで、増殖制御が進行するという報告があり、メダカ成体との共通性が示唆される。これによりゲノム損傷ストレスに対する脊椎動物に普遍的な応答解明の基盤が構築された。

研究成果の概要(英文)：A complex network of signaling proteins sense radiation-induced DNA damage and activates the cellular response, which activates cell-cycle checkpoint, DNA repair and apoptosis. The defects in this process lead to mutation, cancer, and cellular death. However, the comparison of mutation frequency among cells in various kind of tissue is very hard to study. In this project, we used mouse and medaka as model animal to analyze the radiation responses in tissue. We reported that the cell lines from radiation-sensitive mutant medaka strain has a defect in the Histone H2AX phosphorylation after irradiation and its low level of DNA-PK activity causes aberrant DNA-PKcs autophosphorylation. We also found novel roles of radiation induced apoptosis in tissue response including testis-ova in p53 deficient mutant medaka. The visualization of mutagenesis and apoptosis in mouse and medaka tissue was developed to detect radiation response in tissue.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 突然変異 メダカ マウス

1. 研究開始当初の背景

近年医学分野をはじめとする放射線利用の急速な拡大に加えて月面利用や火星探索等の宇宙環境進出が現実的なものとなり、放射線の人体影響の解明と制御が重要な課題となっている。従来、分子から細胞レベルの解析を中心として研究が進められてきた。放射線に対する生体防護のためには、DNA二本鎖切断や塩基損傷に対する**DNA修復機構**と修復を安全に行うための**細胞周期チェックポイント制御機構**、損傷をもつ細胞を安全に排除するための**アポトーシス機構**がネットワークとして最適化されている必要がある。しかし個体内での個々の細胞がこれらの分子ネットワークを介して生と死の狭間を選択しているメカニズムの解明は長く未着手の領域であった。最近放射線防護剤の研究がすすみ、NF- κ B活性化剤によるマウスの放射線致死効果の軽減やDNA修復の活性化剤が報告されているが、その作用機構を従来の放射線応答研究の分子生物学的知見のみにもとづき個体の中の生細胞の挙動として捉えることには限界がある。なぜなら、細胞集団内の個々の細胞における放射線応答には生体内での細胞内外の微小環境の差異が大きく影響しており、個体の生存を担う組織/器官の機能維持は、その組織を構成する個々の細胞の応答の統合の結果であるからである。

動物の消化器や造血組織などの活発な細胞再生系では、幹細胞 分化途中の分裂細胞 非分裂機能細胞 老化した細胞と、それぞれ全く異なる細胞周期制御と代謝能を有していて、そのニッチの微小環境も大きく異なっている。さらには、配偶子から初期胚 後期胚 幼体 成体 老体のライフサイクルでは個体レベルのホメオスタシスが激変する。その全容を理解するためには、分子レベルの生体内現象を捉えることのできる方法論を備えた個体レベルでの研究が必要となっている。研究当初の時点では、メダカをモデルとして、胚発生時の形態形成や生殖腺、腸などに及ぼす組織レベルの放射線影響研究と東京大学の嶋らによる特定座位法による放射線誘発生殖細胞突然変異率の測定などのデータの蓄積があった。またゲノムワイドな突然変異体スクリーニングによる放射線高変異体感受性系統の作製(2004年)、ゲノム配列の公開(2007年)、TILLING (Ta

rgeting Induced Local Lesions IN Genomes)法による各種DNA修復関連遺伝子突然変異体系統の作製(2006年)、GFPトランスジェニックメダカを用いた胚体生殖細胞における放射線影響の可視化(2007年)など、研究代表者らが関わってきた実験技術の基盤整備がなされていた。

2. 研究の目的

本研究では、モデル動物であるメダカとマウスにおいて組織細胞に対する放射線影響を統合的に理解することを目指し、それぞれの利点を活用しながら幹細胞死や突然変異にいたる生体内での放射線応答を解明するために、特に定量的イメージング手法によってDNA修復、突然変異解析、細胞死と細胞増殖を解析した。

3. 研究の方法

(1) 放射線誘発突然変異細胞を可視化測定するモデルマウス/メダカの作製(分担 野田朝男、三谷啓志、藤原(石川)智子)

前進性の突然変異(forward mutation)が生じると細胞が蛍光を発する系と、復帰型の突然変異(reversion)が生じると細胞が蛍光を発する系の2つの方法で突然変異を検出した。この方法を可能とするために2種類のベクターを開発した。作製したベクターをマウスES細胞とメダカ胚およびメダカ培養細胞に遺伝子導入し、培養細胞と個体での突然変異を検出する系を開発した。マウスの作出は野田が、メダカでの系は三谷が担当し、石川はメダカの系統維持のバックアップ支援を行った。連携研究者の尾田正二、浅香智美は蛍光イメージング解析に協力した。

(2) 放射線応答を可視化測定するメダカモデルの作製(分担 三谷啓志)

放射線による転写制御やDNA修復タンパク質の挙動を蛍光タンパク質により個体内でモニターするベクターを開発してメダカ培養細胞に導入し、放射線照射後の応答をほ乳類における結果と比較した。京都大学放射線生物研究センター、日本原子力研究開発機構との共同利用によりマイクロビーム照射実験を実施した。

(3) メダカ p53 突然変異体における組織細胞の放射線応答(分担 三谷啓志、藤原(石川)智子)

放射線が誘発するDNA損傷の修復や回避に関連する遺伝子であるp53等の突然変異体メダカを用いて放射線の組織応答を増殖と細胞死に注目して解析した。またDNA二本鎖切断修復に重要な機能を持つDNAPKのうち、触媒サブユニットであるDNAPKcsの突然変異体系統を作製した。連携研究者の保田隆子は蛍光組織構築と遺伝子発現の解析に

協力した。

4) 放射線応答のモデル組織としてのメダカ咽頭歯(分担 高野吉郎、三谷啓志)

細胞の増殖とターンオーバーが極めて盛んな組織であるメダカ咽頭歯、腸、鰓を対象に、これまで報告のない放射線の細胞増殖・分化への影響を組織レベルで観察した。

4. 研究成果

(1) 放射線誘発突然変異細胞を可視化測定するモデルマウス/メダカの作製

マウスモデルの作製

突然変異を検出するための特定遺伝子座として、X染色体上のHPRT遺伝子を選定した。HPRT遺伝子座において、(a) 前進性の突然変異(forward mutation)が生じると細胞が蛍光を発する系と、(b) 復帰型の突然変異(reversion)が生じると細胞が蛍光を発する系を作製した。(a)システムを用いた培養細胞においては、フローサイトメーターを用いることにより、突然変異体を生きたまま迅速に計測できることとなり、低線量被曝の遺伝的影響をこれまでになく詳細に測定できることが期待される(Noda *et. al.*, 2011)。このシステムにより、培養細胞レベルでの放射線被曝影響のリスク評価と、遺伝影響(遺伝子突然変異)を修飾する薬剤のスクリーニングが可能になった。論文発表と共に共同研究の申し込みが相次ぎ、現在当該細胞株はMD Anderson がん研究所、国立衛生研究所などに提供されている。この(a)システムを応用し、トランスジェニックマウス(TetO-GFP/TetR mouse)の作製を試みたが、TetR存在下でGFPの蛍光シグナルが低く、安定して高い蛍光量のTetR変異細胞が見られる系統は作製できなかった。

次に、マウスX染色体上のHPRT遺伝子を標的に選定して、突然変異(reversion)が生じると細胞が恒久的に蛍光を発する系を作製した。このHPRT-partial-duplicate-GFP(以下、HPRTdupGFP)ノックインマウスにおいては、HPRT遺伝子座における復帰突然変異により体細胞および生殖細胞が生きたまま緑色の蛍光を発する。全身の組織細胞について、組

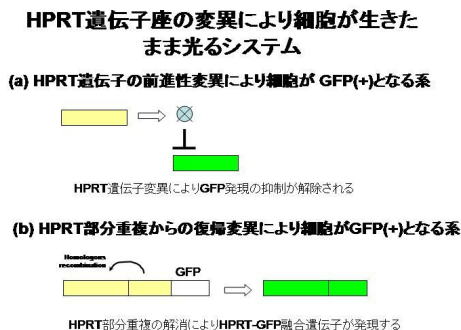


図1 HPRTdupGFPで突然変異を検出する原理

織構築を壊すことなく、in situにて突然変異を検出し、測定することが可能となった。

このマウスにX線(3 Gy)を照射して3ヶ月

後に、まず代表的な組織として、肝臓、膵臓、小腸、血液リンパ球、精原細胞の突然変異頻度を測定したところ、被曝の影響としてそれぞれの組織細胞の突然変異頻度が上昇していることが観察された。放射線の急性症状の場合は組織幹細胞の死(アポトーシス)、晩発効果(発がん、老化促進)では組織幹細胞の突然変異が原因と考えられる。HPRTdupGFPマウスは放射線や環境変異原、あるいは各種ストレスが個体内の細胞にどのような影響を与えるか、具体的に測定できる世界初の画期的なモデル動物になると期待される。このマウスの遺伝的背景を変えることを目的として、p53やATMノックアウトマウスとの交配も開始した。

メダカモデルの作製

前進性の突然変異可視化に必要な2つのコンストラクト(TetO-GFP、TetR)の安定導入メダカ培養細胞株の樹立に成功した。実際に線照射後にGFP蛍光が増加した細胞数を定量したところ、線照射量に比例して、GFP蛍光細胞割合が増加した。個体レベルでの解析のためTetO-GFP、TetRのコンストラクトを自家蛍光の低いT5系統の受精卵にマイクロインジェクションした。TetRが生殖細胞ゲノム上に挿入された個体を選別することができたがホモ個体を得ることができていないことから、リプレッサーの過剰発現がなんらかの生体毒性を持つ可能性が考えられる。また、TetO-GFPコンストラクトの導入個体は確認することができなかった。そこで、マウスでノックイン系統の作製に成功したHPRTdupGFPを応用して、トランスジェニックメダカ作製を実施した。

メダカでは内在するHPRT遺伝子が性染色体上に存在しないことから、マウスHPRT遺伝子の上位にメダカアクチンプロモーターを相同組換えによってコンストラクトに導入した(actin-HPRTdupGFP)。メダカ胚のゲノムにコンストラクトが挿入しやすいようにPiggyBacトランスポゾンサイトを、またメダカ胚のレンズにおけるBFP蛍光を導入の指標として使用するためにcrystallinプロモーターBFP(mgBFP)をベクターに挿入した。実際には、一度の組換えで効率よくactin-HPRTdupGFPに導入できるように、PiggyBacサイトとmgBFPの両方を挿入したプラスミドベクターを作製し、これをactin-HPRTdupGFPの5'側あるいは3'側に新たに挿入し、2種類の目的コンストラクトを作製した。5'側にmgBFPを挿入したコンストラクトについては、メダカの受精卵100個程度にマイクロインジェクションして導入を試みたが、導入の指標となるレンズでのBFP蛍光を観察することができなかった。一方、3'側にmgBFPを挿入したコンストラクトについては、高率でレンズにBFP蛍光をもつキャリアー胚が得られた。現在、GFP蛍光を指標として復帰型突然変異細胞のスクリーニングを進めている(図2)。透明なメダカ

胚、稚魚の特性を利用して、全身の細胞をハイスループットスクリーニングし、マウスとの比較を行う予定である。

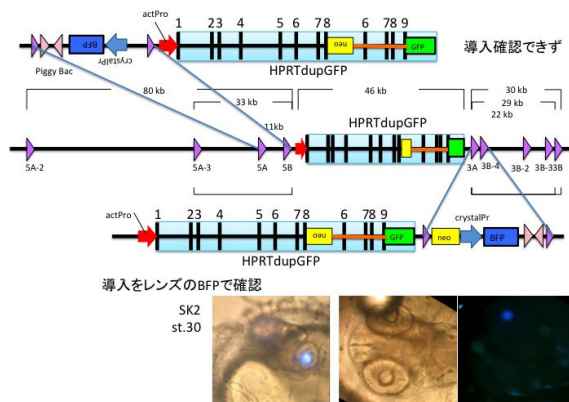


図2 メダカ用 HPRTdupGFP の構造

(2) 放射線応答を可視化測定するメダカモデルの作製

DSB 修復経路には非相同末端結合修復 Non-homologous end joining (NHEJ) と相同組換え修復 Homologous recombination (HR) の2つの経路が知られている。修復方法の特性のために、NHEJ は修復時に塩基変異を起こしやすく、HR は起こしにくい修復として知られている。レポーターコンストラクトを導入したメダカ細胞内でエンドヌクレアーゼ I-SceI による人為的な DSB を起こし、その修復経路を蛍光タンパク質の発現によって検出する実験系である HR アッセイ、EJ アッセイを用いて、メダカ細胞でも哺乳類と同様の修復能を検出できることを確認した。DNA-PK 阻害剤で処理するとヒストン H2AX のリン酸化誘導量が低下して HR 修復が低下すること、また、ATM 阻害剤処理によっても HR 修復率が低下し、誤修復が生じやすい NHEJ 修復率が上昇することを見出した。

Nijmegen breakage syndrome 1 (NBS1)、53BP1 はそれぞれ HR、NHEJ に関わる因子として知られ、各修復経路による修復時に DSB 部位へと集積し、修復の終了とともに DNA から解離することが知られている。NBS1 と 53BP1 と GFP との融合タンパク質を発現させるコンストラクトを作製し、DSB 後の蛍光の挙動を調べるため安定発現培養細胞株を作製した。放射線により NBS1 foci 数、53BP1 foci 数の定量が可能であることを確認し、さらに損傷直後の NBS1、53BP1 の損傷部位への集積量を京都大学放射線生物研究センターのレーザーマイクロビーム照射装置を用いて定量的に解析する手法を確立した。また、1-2細胞期にこれらのコンストラクトをマイクロインジェクションしてその集積挙動を解析できることも見出した。これらのコンストラクトに PiggyBac トランスポゾンサイトや眼で発現するキャリアー検出を可能とする標識遺伝子を導入し、メダカ胚への効率的な導入を行っている。

(3) メダカ p53 突然変異体における組織細胞の放射線応答

p53 遺伝子は、細胞の恒常性の維持やアポトーシス、DNA 修復、細胞周期制御といった重要な機能を有する遺伝子であり、成体における放射線感受性を規定する重要な因子となっている。メダカ生殖細胞に ENU ミュタジェネシスを施し、ナンセンス変異 p53 遺伝子 (p53^{-/-}) を持つメダカ系統が作製された (Taniguchi *et al.* 2007)。この変異をメダカ近交系統 Hd-rR に5代以上交配導入した安定なメダカ系統を樹立した。p53^{-/-}胚由来細胞株は野生型細胞より線照射後のアポトーシスを起こしにくい。野生型細胞と p53^{-/-}細胞に線照射を 15 Gy 照射し、照射直後、照射1時間および2時間後の DSB 修復能をコメットアッセイ法で評価すると p53 欠損細胞で DSB 修復の遅延が見られたが、コロニー形成法では逆に放射線抵抗性が示された。哺乳類で多用される p53 阻害剤である Pifithrin- α (PFT- α) を作用させたところ p53^{-/-}細胞と同じ変化が観察されたことから、この阻害剤のメダカでの有効性が確認できた。

p53 遺伝子は哺乳類において、精子形成過程においても細胞死に関わっていることが報告されている。研究代表者らは、放射線照射した精原細胞から分化した精子にはマイクロサテライト変異が誘発されるが、非照射精子では、野生型、p53 変異体ともに誘発されないことを報告した (Otozai *et al.*, 2014)。p53^{-/-}メダカの精巣組織構造を精査したところ、精原細胞 Ga が位置する場所に、細胞核の染色性が明らかに低く、かつ核小体が鮮明である野生型にはみられない細胞が少数存在していた。線照射を行うとこれらの細胞数が照射3日後から増加し始め、1~2週間後には細胞が大きくなってその数も急激に増加した。しかし、照射1カ月後には非照射の精巣と同様に少数の小さな細胞がある状態に戻った (図3)。

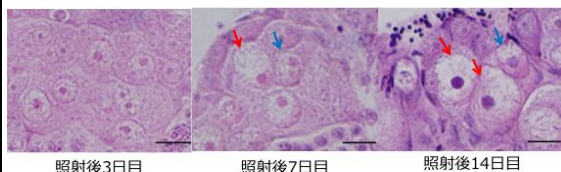


図3 放射線照射後に p53 変異体精巣内に誘発される精巣卵。青矢印：巨大化が進んだ異常な細胞核。赤矢印：さらに巨大化が進んだ異常な細胞核。

これらの細胞は、卵母細胞に特異的に発現する遺伝子 42Sp50 を発現しており、精巣卵と断定された (図4)。放射線照射後の精巣における遺伝子発現をトランスクリプトーム解析し、卵形成に関わる遺伝子の上昇と、精子形成に関わる関連遺伝子の発現変化の違いを確認した。また、電子顕微鏡による観察では、大きく成長した精巣卵では減数分裂特有の対合が観察され、細胞死を起こした細

胞は、周囲のセルトリ細胞に貪食されていた。p53 の機能欠損による生殖細胞分化異常の顕在化は哺乳類でも報告があるが、魚類では放射線が雄性生殖細胞の性転換を増加させ、p53 依存性、非依存性の 2 種類のアポトーシス経路で排除されるという報告はこれまで見当たらず、p53 遺伝子の働きの新しい知見となった。

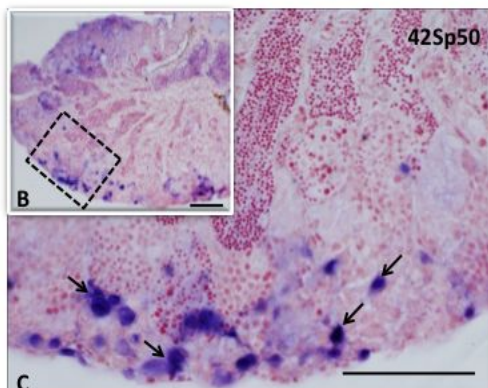


図 4 放射線誘発精巣卵に発現する卵特異的遺伝子 42Sp50

(4) 放射線応答のモデル組織としてのメダカ咽頭歯

メダカ成魚は咽頭域に凡そ 1,000 本にも及ぶ歯（咽頭歯）を有し、それらが生涯にわたり脱落と新生を繰り返している（図 5）

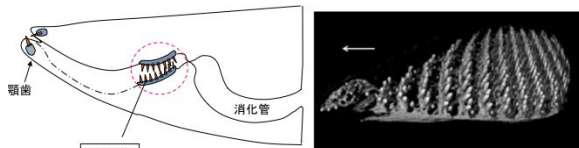


図 5 メダカの咽頭歯の構造（左図は、頭部での位置の概略を示す）

すなわち、メダカ咽頭歯形成域では生涯にわたって夥しい数の歯の再生が起きており、それを可能にする細胞増殖活性が維持されていることを意味することから、メダカ咽頭歯の歯原性細胞の高い放射線感受性が伺われた。今回 BrdU の取り込み細胞の詳細な解析により、メダカ咽頭歯が約 3 週間のサイクルで脱落と新生を繰り返していることが初めて明らかになった。また個々の咽頭歯の tooth family の後端部に slow cycling cells の存在する咽頭歯幹細胞ニッチが存在する可能性が示された。咽頭歯の歯胚では、細胞交代に伴うと思われるアポトーシスが恒常的に観察されたが、ガンマ線照射（5 Gy）によってはアポトーシスの誘導は観察されなかった（図 6）。精巣や胚の中脳と異なり、成魚では p53 の有無に関わらず増殖の活発な咽頭歯でアポトーシスが見られなかったことをヒントとして、他の増殖の盛んな組織である腸や鰓においてもアポトーシスの指標である活性化カスパーゼ 3 抗体を用いる免疫染色を実施して検討したところ、やはりこれらの組織においても放射線誘導アポトーシスが認め

られなかった。組織像の観察から、5 Gy 照射群においては歯原性上皮に広範な細胞死と上皮の脱落による潰瘍形成が認められたことから、線照射により咽頭域に急激な炎症性の組織破壊が生じた可能性が考えられる。これら広範な細胞死はアポトーシスによるものではなくネクローシスによると考えられ、鰓、腸との放射線応答の興味深い共通性が示唆された。

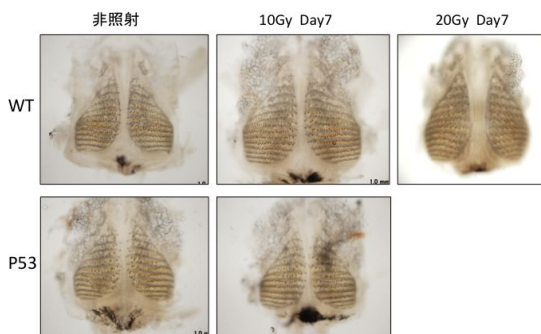


図 6 メダカ咽頭歯の放射線耐性

以上の研究結果から、本研究では、新規改変遺伝子導入技術を利用して、放射線影響の可視化定量評価の系をマウス及びメダカで開発した。さらにメダカで細胞増殖能の高い組織の放射線照射後の応答を評価し、マウスとは異なる新規の応答を見いだした。マウスでも胎児期の腸では、成体と異なり、放射線照射後もアポトーシスが誘発されないで、増殖制御が進行するという報告があり (Miyoshi-Imamura et al. 2010)、メダカ成体との共通性が示唆される。今後、可視化の系を利用して、放射線ストレスによって生じる DNA 修復やアポトーシスを組織ごとに定量的に評価することで、ゲノム損傷ストレスに対する脊椎動物に普遍的な修復、増殖停滞、細胞死、細胞増殖による組織再構築の流れと突然変異の生成の関係を明らかにすることを目指す。

<引用論文>

- Taniguchi Y. et al., 2006. *Genome Biology* 7:R116
 Noda A. et al., 2011. *Mutat Res.* 721:101-107
 Otozai S. et al., 2014. *Mutat Res.* 760:24-32
 Miyoshi-Imamura T. et al. 2010. *Radiation Res.* 173:310-318

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 26 件)

- Abduweli, D., Baba, O., Tabata, M. J., Higuchi, K., Mitani, H., Takano, Y. (2014) Tooth replacement and putative odontogenic stem cell niches in pharyngeal dentition of medaka (*Oryzias Latipes*), *Microscopy (Oxf)*. 63(2): 141-153, 2014. doi: 10.1093/jmicro/dft085.
 Kodama, Y., Noda, A., Booth, C., et al. (他 9

人中 10 番目) International workshop: radiation effects on mutation in somatic and germline stem cells. Int J Radiat Biol 2012, 88: 501-506. doi: 10.3109/09553002.2012.683512

Urushihara, Y., Kobayashi, J., Matsumoto, Y., Komatsu, K., Oda, S., Mitani, H. (2012). DNA-PK inhibition causes a low level of H2AX phosphorylation and homologous recombination repair in Medaka (*Oryzias latipes*) cells. Biochem Biophys Res Commun 2012,429: 131-136. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.128.

Yasuda, T., Oda, S., Li, Z., Kimori, Y, Kamei, Y., Ishikawa, T., Todo, T., Mitani, H. (2012). Gamma-ray irradiation promotes premature meiosis of spontaneously differentiating testis-ova in the testis of p53-deficient medaka (*Oryzias latipes*). Cell Death Dis 2012, 3: e395 doi: 10.1038/cddis.2012.133.

Noda, A., Hirai, Y., Kodama, Y., Kretzschmar, W. W., Hamasaki, K., Kusunoki, Y., Mitani, H., Cullings, H. M. and Nakamura, N. (2011). Easy detection of GFP-positive mutants following forward mutations at specific gene locus in cultured human cells. Mutat Res. 721(1):101-107 doi: 10.1016/j.mrgentox. 2010. 12.010.

〔学会発表〕(計 108 件)

Noda, A., Suemori, H., Hirai, Y., Kodama, Y., Nakamura, N., HPRT-dup-GFP mice: a new knock-in mouse system for in vivo visualization of somatic and germ cell mutants. The 43rd Annual Meeting of Environmental Mutagen Society, 8-12 September, 2012, Bellevue, Washington, USA.

Mitani, H., The radiation induced transdifferentiation in the testis of medaka (*Oryzias latipes*) p53 deficient mutant. Radiation Effects Research Foundation. International Workshop "Radiation Effects on Mutation in Somatic and Germline Stem Cells". Jan. 18-19 (2012).

Noda, A. Development of recombinant mouse model for the study of genetic effects of radiation. Radiation Effects Research Foundation. International Workshop "Radiation Effects on Mutation in Somatic and Germline Stem Cells". January 18-19th (2012).

〔図書〕(計 2 件)

村田泰彦、三谷啓志 アレル間の発現不均衡解析モデルとしてのメダカトランスクリプトーム解析 次世代シーケンサー 目的別アドバンスメソッド(監修 菅野 純夫 鈴木 穰)2012 年 学研メディカル秀潤社

Oota, H. and Mitani, H. "Human population genetics meets medaka." In A Model for Organogenesis, Human Disease and Evolution eds Naruse, Kiyoshi Tanaka, Minoru, Takeda, Hiroyuki (2011) Publisher, Springer-Verlag

〔産業財産権〕

出願状況 0 件

取得状況 0 件

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 啓志 (MITANI Hiroshi)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号 70181922

(2) 研究分担者

野田 朝男 (NODA Asao)

(財)放射線影響研究所・遺伝学部・副部長
研究者番号 40294227

藤原(石川) 智子 (FUJIWARA Tomoko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 70402922

高野 吉郎 (TAKANO Yoshiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号 90126425

(3) 連携研究者

尾田 正二 (ODA Shoji)

研究者番号 50266714

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

浅香 智美 (ASAKA Tomomi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号 90555707

保田 隆子 (YASUDA Takako)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号 40450431

(4) 研究協力者

漆原 祐介

村田 泰彦

五十嵐 健人

張 添翼

大西 壽子

塩谷 典子

伊藤 加津沙

西谷 彩香

平川 慶

永田 健斗

橋本 知佳