

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25281027

研究課題名(和文) 遺伝毒性物質の経世代的影響の定量的評価法に関する研究

研究課題名(英文) Studies on quantitative evaluation of inherited germline mutations

研究代表者

増村 健一 (Masumura, Kenichi)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・室長

研究者番号：40291116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：環境化学物質等の遺伝的影響を調べる際、次世代個体ゲノムに生じる突然変異は重要な指標である。本研究では、マウスを用いた全エキソーム解析によって、父個体への変異原物質の曝露によって次世代個体ゲノムにおけるde novo変異が用量依存的に増加することを示した。次世代シーケンサーを用いて突然変異を直接検出する手法は、環境変異原が誘発する生殖細胞突然変異の次世代影響の評価に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：De novo germline mutations and their health effects in next generation are important in genetic toxicology. Inherited germline mutations in mice induced by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) were analyzed by whole-exome sequencing. Male gpt delta mice were treated with ENU and mated with untreated females. ENU-treated and control families were used for whole-exome sequencing. Single nucleotide variants (SNVs) and de novo mutations in the offspring were detected. Frequencies of inherited mutations increased with dosage. The result suggests that direct sequencing analysis may be a useful tool to investigate inherited germline mutations induced by environmental mutagens.

研究分野：遺伝毒性学

キーワード：遺伝毒性変異 ゲノム 次世代影響 遺伝子突然変異 環境変異原 次世代シーケンサー 生殖細胞突然変異

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境化学物質の有害影響評価において、遺伝毒性リスクと低用量曝露における閾値の有無は重要な問題である。生殖細胞に生じる突然変異はさまざまな遺伝的疾患の原因となり、生殖細胞突然変異は次世代のゲノムに受け継がれて経世代的な影響をもたらす。国連 GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) 勧告において「生殖細胞変異原性」が健康有害性項目の一つとして取り上げられ、発がん性とは別の独自性を有する毒性項目としての存在が示されるなど、次世代への遺伝的影響の評価方法の確立が求められている。だが、環境化学物質が生殖細胞に突然変異を誘発し次世代にどのようなリスクを生ずるかを評価する手法は確立されていない。ヒトの疫学的知見がない場合、動物を用いた実験的研究の知見を用いてリスク評価を行うことが必要となるが、特定座位試験などの既存の試験は大量の実験動物を使用することから現在では実施が困難であり、実効性が乏しくなっている。

(2) 申請者らのグループは、突然変異検出用のレポーター遺伝子を導入したトランスジェニック動物 (*gpt delta* マウスおよびラット) を用いた *in vivo* 遺伝子突然変異試験系を確立し (Mutat Res, 2000, 455, 191)、現在までに多くの化学物質の遺伝毒性を検討してきた (Genes Environ, 2009, 31, 105)。また、近年、次世代シーケンシング技術 (NGS) の進歩で塩基配列解読の時間とコストが低下し、広範囲のゲノム領域を対象として遺伝子変異を直接検索することが可能になりつつある。実験用の近交系マウスはヒトと比較してゲノム情報がより均一であることから、高精度な解析を行うことが可能と考えられる。このことから着想して、生殖細胞遺伝子突然変異において、親子間のゲノム配列を直接比較して子に新たに生じた遺伝子変異を同定することにより、次世代ゲノムにおける突然変異率を算出することが可能と考えられる。

2. 研究の目的

(1) 遺伝毒性発がん物質の作用には閾値がなく、どのように低用量であってもヒトに対して発がんリスクを負わせるものと考えられている。しかし実際にヒトが曝露される低用量域においては生体防御機構により遺伝毒性が抑制される実際的な閾値が形成される可能性が考えられる。環境化学物質の遺伝毒性リスクに関して、体細胞突然変異を対象にした研究は多く行われているが、生殖細胞および次世代への遺伝的影響の特徴は明らかでない。本研究では、変異検出用レポーター遺伝子導入トランスジェニックマウスと次世代シーケンシング (NGS) 技術を組み合わせ、化学物質の体細胞、生殖細胞および

次世代ゲノムへの影響を定量的に評価し、次世代変異の用量 反応関係を調べることで、遺伝毒性における経世代的影響のリスクおよび閾値形成要因を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスゲノムサンプルの調製

遺伝毒性物質として、体細胞および生殖細胞に高頻度に塩基置換変異を誘発することが知られているエチルニトロソ尿素 (ENU) を用いた。8週齢の雄 *gpt delta* マウスに 85, 30, 10 mg/kg b.w. の 3 用量群で ENU を腹腔内投与 (週 1 回 × 2 週) した。ENU 投与終了後 10 週目から無処理雌個体と交配を開始し、子マウスを得た。父、母および子マウス 4 匹 (雌雄各 2 匹) の合計 6 匹を 1 家族単位として NGS 解析に用いることとした。対照群として溶媒を投与した雄マウスについて同条件で交配を行い、子マウスを得た。父マウスについては、体細胞および生殖細胞変異を検索するため、肝臓、精巣および精巣上体を採取した。母および子マウスについては肝臓を採取した。子が 4 週齢の時点で父母子マウスの組織採取および凍結保存を行った。1 家族単位 (6 個体) の肝臓サンプルからゲノム DNA を抽出し、NGS 解析に用いた。

(2) NGS を用いた次世代ゲノム変異の検出 ENU 投与 3 用量群および対照群について各 1 家族 (父母および子 4 匹の計 6 匹) を用い、計 24 匹のゲノム DNA について、NGS を用いて全エキソーム解析を行った。マウス全エキソーム領域 (約 50 Mb) の濃縮にはアジレント・テクノロジー社の SureSelectXT Mouse All Exon Kit を用いた。イルミナ社の HiSeq を用いて 150 bp ペアエンドでシーケンシングを行い、シーケンス冗長度で約 100 倍相当の配列データを取得した。得られた塩基配列データを参照ゲノム配列に対してマッピングした。参照配列は C57BL/6 マウスゲノム DNA 配列 (mm9) を用いた。本実験に使用した *gpt delta* マウスの遺伝的バックグラウンドは C57BL/6 である。各サンプルについて参照配列と異なる一塩基変異 (SNVs) のリストを作成し、親子間比較を行った (トリオ解析)。複数の条件を組み合わせ、絞り込みを行い、子マウスゲノムに新規に誘発された変異のみを抽出した。検出した変異の一部はサンガー法 (キャピラリー型シーケンサー) で真偽を確認し、NGS による変異検出の妥当性を検証した。次世代マウスのゲノムに生じた変異の数を、エキソーム領域を同様の条件で絞り込んだ解析対象塩基数で除して、次世代突然変異頻度を算出した。

(3) 体細胞及び生殖細胞における点突然変異頻度の測定

ENU 投与雄マウスおよび対照群の肝臓、精巣および精子からゲノム DNA を抽出し、点突然

変異頻度を測定した。ゲノム DNA から点突然変異検出用のレポーター遺伝子 (*gpt* 遺伝子) を ファージとして回収し、大腸菌に感染させて形質転換体を得た。突然変異によって不活化した変異 *gpt* 遺伝子を持った大腸菌は 6-チオグアニン (6-TG) 耐性となるため、寒天培地上で 6-TG 耐性コロニーとして検出した。6-TG 耐性コロニー数を形質転換コロニーの数で除して点突然変異頻度を算出した。

4. 研究成果

(1) 次世代ゲノム突然変異の検出

各用量群 1 家族 6 匹として 4 家族計 24 匹の肝臓からゲノム DNA を抽出し、全エキソームシーケンス解析を行った。

解析 1 として、得られた配列データを参照配列にマッピングし SNVs を検出した (ELAND, SAMtools 使用)。SNVs の親子間比較を行い一定のカバレッジ条件でユニークな変異のみを絞り込み、16 匹の子から計 87 個の変異候補が得られた。うち 90% (78/87) がサンガー法により真と確認された。次世代個体ゲノムで見られた変異は全てヘテロ型であり、変異箇所の野生型/変異型リード比は 0.5 をピークとした分布を示した。野生型/変異型リード比 0.3 未満の変異候補はサンガー法で確認できない偽陽性が多かった。そこで、リード比 0.3 未満を足切りするフィルタリングを行うことで、生殖系列突然変異を効率よく選択し、サンガー法による確認作業を置き換えることが可能と考えられた。

これを検証するため、同じ 24 匹のエキソーム配列データを用いて、異なるソフトを使った解析 2 を行った。マッピングに BWA、変異検出に GATK を使用した。解析 1 と同様の方法で変異を絞り込み、16 匹の子から計 219 個の変異候補が得られた。BWA は ELAND と比較してマッピング効率が高いため多数の変異候補が検出されたと考えられた。変異候補は野生型/変異型リード比 0.3~0.7 の条件で絞り込み、サンガー法による確認は行わなかった。

(2) 次世代変異頻度の解析

解析 1 及び解析 2 で得られた変異数を、変異検出と同条件 (トリオでの最小カバレッジ条件) で絞り込んだエキソーム配列塩基数で除して、それぞれの子における次世代突然変異頻度を算出した。その結果、解析 1 及び解析 2 はほぼ同等の値を示した。サンガー法による確認手順を変異リード比によるフィルタリングで置き換えることが可能であることが示された。

解析 2 において、ENU 85 mg/kg 投与群における次世代突然変異頻度は $133.8 \pm 16.8 \times 10^{-8}$ base であった。一方で、対照群においては変異が得られず、変異頻度は算出できなかった ($<1.7 \times 10^{-8}$ base)。本研究では各用量群 1 家族の解析であり、1 匹の投与雄に由来する子 4 匹の次世代変異頻度の平均値が得られて

いる。極めて低頻度の陰性対照値を調べるためには、解析個体数を増やすか、より多くのゲノム領域をカバーできる全ゲノム解析が必要と考えられた。対照群の変異頻度をゼロと仮定したときの次世代変異の用量反応性については、各用量 1 家族のデータではあるが、ENU の用量依存的に変異頻度が増加し、直線近似に比較的良好に合致することが示された ($R^2=0.94$)。 (図 1)

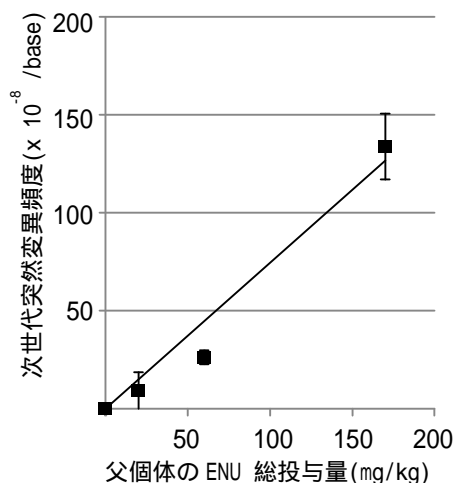


図 1 次世代個体ゲノムにおける突然変異頻度

(3) ENU 投与マウスの体細胞及び生殖細胞における点突然変異頻度

肝臓、精巣及び精子における *gpt* 遺伝子突然変異頻度は ENU 用量依存的に有意に増加した。85 mg/kg 投与群における突然変異頻度は $88.4 \pm 25.4 \times 10^{-6}$ であり対照群 ($2.0 \pm 1.2 \times 10^{-6}$) の 37 倍高かった。精巣の突然変異頻度は $96.2 \pm 27.8 \times 10^{-6}$ であり対照群 ($1.7 \pm 1.9 \times 10^{-6}$) の 55 倍高かった。精子の突然変異頻度は $44.4 \pm 25.9 \times 10^{-6}$ であり対照群 ($2.4 \pm 1.4 \times 10^{-6}$) の 18 倍高かった。組織間における有意な差は認められなかった。変異頻度は最も低い用量群から増加しており、今回の実験では閾値となる用量域は観察されなかった。用量反応データをさらに分析するため、ベンチマークドーズ法を用いて各組織における $BMDL_{10}$ 値を算出した (BMDS ver. 2.5 使用)。その結果、肝臓、精巣、精子における $BMDL_{10}$ 値はそれぞれ 0.499, 0.606, 1.344 mg/kg であった。これらは数倍程度の範囲内に収まる値であり、組織間での感受性の差を示すものではないと考えられた。ただし、本実験が腹腔内投与で行われていることに注意する必要がある。用量反応曲線の詳細な解析にはより低用量のデータが必要と考える。

(4) 次世代変異スペクトルの解析

ENU 誘発次世代変異の特徴は A:T 塩基対の変異であり、高用量群においては A:T to G:C (43.8%) および A:T to T:A (25.3%) が多く見

られた。一方、レポーター遺伝子を用いた ENU 誘発遺伝子変異は A:T to T:A および G:C to T:A が多い特徴を示し、これは複数のレポーター遺伝子系 (*gpt*, *lacZ*, *lacI*) に共通してみられる特徴であった。両者の特徴が異なる原因は明らかでないが、トランスジェニック動物に導入されたレポーター遺伝子とエキソソームの違い、表現型による変異体検出とシーケンシングによる直接検出の違い、生殖系列変異と体細胞変異の違いなど、多くの要素が変異スペクトルの差に影響していると考えられた。

(5) まとめ

本研究では、マウス 24 匹のエキソーム解析によって、父個体への変異原物質の曝露によって次世代個体のゲノムにおける *de novo* 変異が用量依存的に増加することを示した。次世代シーケンサーを用いた変異検出法の検証を行い、サンガー法による確認作業は適切なフィルタリングで置き換えられることを示した。次世代シーケンサーは環境変異原が誘発する生殖系列突然変異の検出と解析に有用であり、さらなるコスト低下によって遺伝毒性評価のツールとしての活用が期待される。また、本手法は原理的にヒトを含む他の生物種に応用可能である。環境化学物質等の集団に対する遺伝的影響を調べる際、次世代個体ゲノムの変異は重要なエンドポイントと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件) 全て査読有

Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Gondo Y, Honma M, Nohmi T. Dose-dependent *de novo* germline mutations detected by whole-exome sequencing in progeny of ENU-treated male *gpt* delta mice. *Mutation Research* 2016;810:30-39. doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.09.009

Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Gondo Y, Honma M, Nohmi T. Estimation of the frequency of inherited germline mutations by whole exome sequencing in ethyl nitrosourea-treated and untreated *gpt* delta mice. *Genes and Environment* 2016;38:10. doi:10.1186/s41021-016-0035-y
Masumura K, Sakamoto Y, Kumita W, Honma M, Nishikawa A, Nohmi T. Genomic integration of lambda EG10 transgene in *gpt* delta transgenic rodents. *Genes and Environment* 2015;37:24. doi:10.1186/s41021-015-0024-6

[学会発表](計 3 6 件)

増村健一, 鶴飼明子, 豊田尚美, 権藤洋一, 能美健彦, 本間正充: 全エキソーム解析を用いた ENU 投与雄マウスの次世代個体における生殖細胞系列突然変異頻度の測定. 日本環境変異原学会第 45 回大会 (2016.11.17) つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Gondo Y, Honma M, Nohmi T: Estimation of the frequency of inherited germline mutations by whole-exome sequencing in ethylnitrosourea-treated *gpt* delta mice. 47th Annual Meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society (2016.9.24-28) Kansas City, USA

増村健一: ゲノム解析による経世代突然変異の検出. 平成 28 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム (2016.5.28) がん研究振興財団 国際交流会館(東京都中央区)

増村健一, 鶴飼明子, 豊田尚美, 権藤洋一, 能美健彦, 本間正充: マウス全エキソーム解析による ENU 誘発生殖細胞変異スペクトルの解析. 日本環境変異原学会第 44 回大会(2015.11.27-28) 九州大学馬出キャンパス コラボ・ステーション (福岡県福岡市)

Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Gondo Y, Honma M, Nohmi T: Analysis of inherited germline mutations of ENU-treated mice by whole exome sequencing. Society of Toxicology 55th Annual meeting (2016.3.13-17) New Orleans, USA

増村健一, 豊田尚美, 権藤洋一, 能美健彦, 本間正充: マウス全エクソンシーケンシングによる経世代突然変異の測定. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014.12.4-5) 一橋講堂(東京都千代田区)

増村健一, 豊田尚美, 権藤洋一, 能美健彦, 本間正充: *gpt* delta マウスを用いた ENU 誘発突然変異と全エクソンシーケンシングによる経世代変異の検出. 日本環境変異原学会第 42 回大会 (2013.11.29-30) 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

[図書](計 1 件)

増村健一 他、(公社)日本薬学会編、金原出版(株) 衛生試験法・注解 2015, 1.3 遺伝毒性試験法, 1.3.3 げっ歯類を用いる試験, (2)トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験, 2015, pp.159-161

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増村 健一 (MASUMURA, Kenichi)
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・
室長
研究者番号：40291116

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

能美 健彦 (NOHMI, Takehiko)
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試
験研究センター・客員研究員
研究者番号：30150890

本間 正充 (HONMA, Masamitsu)
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・
部長
研究者番号：30250179

豊田 尚美 (TOYODA-HOKAIWADO, Naomi)
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・
非常勤職員
研究者番号：70381853

(4) 研究協力者

なし