

## 部の概要

分子生物科学部は、臨床研究や疫学研究で明らかになった放射線の影響を細胞・分子レベルで研究することで、放影研の使命を支えている。研究内容は(1) 遺伝的影響調査、(2) 放射線発がん調査、および(3) 原爆被爆者のがん以外の疾患の調査である。

遺伝的影響調査では、被爆者の家族(母、父、子)に観察された継世代的変異の頻度および性質について調べることを目的としている。放影研の遺伝的調査では被爆者の家族に親の放射線被曝による有意な遺伝的影響は認められず、我々を含む研究班が過去に行った動物研究では、比較的大規模な欠失や増幅の平均突然変異率は 1 ゲノムあたり  $2 \times 10^{-2}/\text{Gy}$  であることが判明した。ゲノム時代を迎えた今、被爆者の家族について全ての突然変異スペクトルを検出することが可能な次世代シーケンシング(NGS)技術を用いた全ゲノムシーケンシングに基づく遺伝的調査を計画しているところである。複雑なタイプの突然変異(大規模な欠失および転座)について評価するため、ロングリード NGS に必要なソフトウェアの改良や新技術の開発が進んでいる。また、ヒトのデータを裏付け、内在する分子機序を解明するために、NGS を用いて de novo 生殖細胞突然変異を測定するためのマウスモデルも開発している。

放射線発がんの調査は、放射線被曝とがん発生との機序的関係の解明を目標とする。被爆者の甲状腺がんを対象とした以前の研究は、若年で高線量に被曝した人たちの甲状腺乳頭がんにおいて、*RET* や *ALK* の遺伝子再配列が高頻度で発生していることを示した。これらの再配列遺伝子が発がんに関わる可能性について、実験動物モデルを用いて評価を進めている。肝臓の炎症および線維化と放射線に関連した肝がんとの関わりの可能性という観点から、放射線被曝に起因する慢性的な炎症が肝臓の代謝異常や線維化を介して肝がんの発生に関与しているかもしれないという仮説を立てた。肝がん発生における放射線に関連した脂肪性肝炎や線維化の役割を探る新たな研究計画を策定中である。また、被爆者の乳がんや甲状腺がんの遺伝的要因を調べている。細胞遺伝学的調査で、胎内被爆者のリンパ球染色体転座に線量に依存した増加は見られなかったのに対し、母親では増加していたことが示されている。胎仔中の損傷細胞の負の選択の根底にある機序について動物実験で調査している。

また、原爆被爆者の疾患と放射線被曝を結びつけるバイオマーカーを同定し評価する努力をしている。現在評価しているバイオマーカーは、がんを含む慢性疾患リスクの増加に関連すると思われる免疫エンドポイントと代謝指標である。造血と免疫細胞のホメオスタシスが放射線被曝により乱されると心血管疾患および肝臓の線維化やがんなどの炎症性疾患の発生につながる可能性があるという仮説を検証することを目的とした縦断調査をデザインしているところである。被爆者の心血管疾患発生に関わると思われる生物学的経路には、クローン性造血、炎症性免疫細胞、内在性危険信号および動脈硬化が関与する。AHS 対象者におけるこれらの経路の役割を調べる研究を開始し、比較のための動物モデルシステムの開発を進めている。

また、放射線に関連した疾患の生物学的機序の理解を深めるため、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクス、プロテオミクスなど、複数の分子(オミック)エンドポイントの統合解析を実施するために外部専門家との共同研究も計画中である。血中 T 細胞の染色体異常頻度および菌エナメル質の電子スピン共鳴(ESR)シグナルの強度に関する生物学的線量推定データは、DS02R1 によ

り算出した個人線量における確率的不確実性および系統的な不確実性に対する情報を提供し、結果的にがんリスク推定の役にたつと期待している。

ゲノム時代の今、ゲノム解析は我々の研究デザインにおいて最も重要な役割を果たすであろう。体細胞(がん、がん以外の疾患)や生殖細胞(遺伝的影響)内で原因が放射線であることを示す特徴(放射線シグネチャー)を持つ突然変異を検出することが、我々の研究の主要な目標になりつつある。臨床調査や疫学調査の結果を、全ゲノム解析に基づき見直す必要がある。

## 2019 年度業績

### 放射線と遺伝的影響

- 「放射線と遺伝的影響」に関する最重要課題は、原爆被爆者とその子どもを含むヒトリオ研究を中心とした全ゲノム研究である。2019 年度は放影研でのトリオの全ゲノムシーケンシング(WGS) 調査 を含んだ研究計画書を作成し、ICP(初期構想案)の承認を得た。2019 年度末までに、ヒトリオ研究の本格調査のための研究計画書を遺伝リサーチクラスターに提出し、研究計画の評価を受ける予定である。また、ヒトゲノム解析を行うため、セキュリティ管理されたコンピューター室を所内に設置した。ヒトにおける WGS の最重要課題の一つは、社会的な合意を得て倫理的な問題に対処することである。そこで、市民に向けた一連の交流・啓蒙プログラムを開始した。
- ヒト細胞を用いたトリオ WGS の実行可能性調査  
【目的】WGS を用いて被爆者の原爆放射線被曝の遺伝的影響を評価するために、ヒト試料の変異を検出するシステムを開発する。この度、公共の細胞バンクから入手可能な標準的な日本人正常細胞(GM18943)を用いた。  
【方法】元の細胞集団から単一細胞由来のコロニーを分離し、そのゲノム DNA を用いてショートリード(Illumina 社)とロングリード(Nanopore 社)の WGS を行った。生の WGS データ(Illumina 社)は BWA-MEM を用いてヒト参照配列(GRCh38)にマッピングした。その後、Picard および SAMtools を用いた放影研仕様のプログラムを使用して、重複リードと低品質リードを除外した。候補となるバリエント(多様体・変異体)を HaplotypeCaller (GATK)を用いて検出した。検出したバリエントを各細胞クローン内で比較して、候補となる de novo バリエント(新しく生じた変異体)を同定した。de novo バリエントを検証するために、サンガー法シーケンシングと IGV 検査を用いてバリエントを確認し、各細胞クローンにおける de novo バリエントのリストを得た。各 de novo バリエントが親に由来するのかを同定するために、突然変異の周辺のパロタイプを調べた。データ処理は全て放影研のゲノム解析サーバーで行った。  
【結果】重複リードと低品質のマッピングしたリードを除外した後、1 試料当たり 100~140Gb の生リードデータ(Illumina 社)と 1 試料当たり 80~111Gb の高品質なリードのマッピングデータを手に入れた。カスタマイズしたパイプラインでは、個々のクローン間で信頼性の高い約 2,000 の塩基置換が得られたが(偽陽性率:0.0%)、従来の突然変異検出パイプラインを用いた解析では約

4,500 の塩基置換が得られた(偽陽性率:67%)。また、クローン間で小規模挿入欠失(スモールインデル)は 90 個程度、多部位突然変異(マルチサイト変異)は 6~9 個程度検出することができ、ハプロタイプ情報を用いてアレルの起源を識別することができた。ロングリード WGS を行うために、高品質かつ高分子量の DNA 試料を作成した。現在、PromethION (Oxford Nanopore 社)を用いて試料の WGS を行っている。

【結論】我々のマウス研究とチェルノブイリ研究(NCI にて実施)から得られた知見と、放影研の新たなクラウドコンピューティング資源を用いて、高品質の突然変異検出パイプラインの開発に成功し、原爆被爆者の家族を含むヒトの WGS 研究に利用できるようになった。(佐藤、RP S3-11)

- 放射線照射した精原細胞または成熟卵母細胞から生まれた F1 マウスにおける放射線誘発性小規模欠失の特徴づけ

【目的】先行研究で、F1 マウスにおいて SNV と小規模欠失を検出した。本研究では、放射線照射した精原細胞または成熟卵母細胞から生まれた F1 マウスにおいて同定された放射線誘発性小規模挿入欠失の特徴を明らかにすることを目的とした。また、突然変異誘発に対する親マウスの加齢による影響を考慮して統計計算を改良した。

【方法】de novo バリエーションの近傍配列についてさらに詳しく調べた。また SNV の de novo バリエーションの誘発に対する加齢の影響を推定するために、非照射の親のアレルの de novo バリエーション変異数を調べた。親由来の突然変異を特定するための段階的シーケンシングを改良するために、疑似ロングリード分析(Illumina 社製ショートリードを用いた 10X Genomics 社の Chromium システムおよび DNBseq による stLFR 分析)を実施した。

【結果】子どもにおける SNV 数の増加は精原細胞と成熟卵母細胞の加齢による影響だと説明できるかもしれない。一方、加齢による影響が予測の 3 倍以上だと仮定した場合でも、放射線照射した親から生まれた F1 マウスで観察された小規模挿入欠失数は対照群に比べて有意に多かった。照射群で観察された小規模欠失に関し 2 種類の顕著な特徴が判明した。一つは非反復配列中の小規模欠失(主に 1~12 ヌクレオチド)であり、その多くは切断接合部分に微細相同性を示すものである。またもう一つはモノヌクレオチド反復配列中の単一ヌクレオチド欠失である。Kucab らが最近発表したように (Cell, 2019 年)、これらの特徴は放射線照射したヒト iPS 細胞でも見られた。

【結論】上記のような特徴を持つ欠失や多部位変異は、哺乳類において親への放射線照射によって誘発される突然変異の典型的なシグナチャー(サイン)であると考えられる。これらの結果は被爆者家族の WGS 解析を計画する上で有用な情報となる。

佐藤、研究報告書 10:37, 2020 (佐藤、RP 2-13)

- 放射線生物学、特に遺伝的影響に関する全ゲノム研究においては、全ゲノムシーケンシングデータを用いた高度な突然変異検出手法を開発することが重要である。ヒトリオヤや動物モデル研究における WGS 調査に備え、分子生物科学部では突然変異検出パイプラインの改良に取り組んできた。2019 年度は、独自のマウスモデル(変異蓄積マウス系統)を用いて、以下の 2

つの優れた突然変異検出システムを確立することができた。

(1) WGS データから各種変異を検出する新たな手法の開発

【目的】本年度内に大規模な構造バリエーションを中心とした各種の変異を検出するための新たな手法を開発する。

【方法】4 種類のシーケンシング方法(ショートリード[Illumina 社]、ロングリード[PacBio 社]、ロングリード[Nanopore 社]、疑似ロングリード[10X Genomics 社 Chromium])から得られた全ゲノムシーケンシングデータを比較し、大規模バリエーション(> 1kb)を検出できるパイプラインを開発した。

【結果】新たなパイプラインを使用し、上記の突然変異蓄積研究から得られた 2 匹のマウスのロングリード WGS データを用いて、(11 のレトロトランスポゾン挿入を含む)15 の de novo 構造バリエーションを検出することができた。これは放射線影響とは無関係だが、この結果によりマウスにおけるこのような大規模変異の自然発生率はこれまでの推定値と比べはるかに高いことが示された。現在は、検出用パイプラインの精度と効率の向上に取り組んでいる。

【結論】放射線被曝による大規模変異の誘発効果を調べる上で、この手法は大変有用である。(内村、佐藤 新規 RP)

● (2) モザイク変異の検出と細胞系列の再構築のための新しい方法論の開発

【目的】モザイク変異を検出するための新手法と、単一細胞分化レベルでの細胞系列に基づくモザイク変異の再構築のための新手法の開発

【方法】これまでの研究において、非常に高精度な de novo 変異検出パイプライン(SNV および小規模挿入欠失)を確立してきた。このパイプラインを用いることで、シーケンス深度 100 倍の WGS データからほとんどのモザイク変異を検出することができ、そのうち変異アレル頻度(VAF)は 5%以上である。2019 年度には、Amplicon-Seq を用いて各モザイク変異の VAF を高精度で測定する新手法を確立し、モザイク変異に基づいて細胞系列を再構築する新たな数学的手法を開発することができた。

【結果】1 個体あたりシーケンス深度 100 倍の WGS データから 30 個程度のモザイク変異を検出し、5 匹のマウスで初期胚細胞系列を再構築したが、いずれも 1 個体あたり 8~10 個の細胞系列が示された。初期胚での変異発生の特徴、成体の体細胞組織・生殖細胞への不均質な寄与が判明した。

【結論】細胞系列解析のための革新的な方法を確立することができた。この方法は、主にヒト試料に適用できる。これは、放射線被曝によるモザイク変異の誘発を明らかにするのに有用であり、また細胞集団の変化の動態(例:クローン増殖)を調べる上でも役に立つ。(内村、新規 RP)

● 培養下のマウス精原細胞における放射線誘発突然変異の研究

【目的】どのようにして放射線被曝が精原幹細胞の変異を誘発し、その変異が次世代に伝達されるのかに関する機序を理解するため、マウスの精原細胞(以下、GS、生殖幹細胞)を調べる

ための in vitro (試験管) 培養に基づく方法に着手した。

【材料および方法】培養した GS 細胞に X 線を照射し、生き残った細胞コロニーを回収した。ゲノムの構造変化は aCGH (MacroGen 社 / Agilent 社の標準的方法) を用いて、対照 (非照射) 群、2-Gy 照射 GS 細胞、4-Gy 照射 GS 細胞の各 10 クローンについて解析した。ゲノムシーケンシング全体については、放射線誘発 SNV および小規模挿入欠失を検出するために、対照群クローンおよび X 線照射した GS 細胞クローンでショートリード WGS を実施した。

【結論】aCGH 解析の結果、放射線照射クローンでは、いくつかの欠失候補が明らかになった。その後、クローンの WGS を開始した。(野田、RP-P3-17)

### 放射線量推定

- 原爆放射線のヒトへの影響を調べるために、成人健康調査コホートの原爆被爆者のサブセットについて細胞遺伝学的・生物学的線量推定研究を行った。1、2、および 4 番染色体が関与する安定型転座頻度を検出するために、合計 1,868 人の被爆者 (広島で 1,179 人、長崎で 689 人) を 2 色 FISH 法により調べた。一部の結果は以下の通りである: (1) 転座頻度に関する全体的な線量反応は非線形であり、その傾きは高線量域 (約 1.25Gy 以上) で横ばいであった。(2) 以前のギムザ染色研究で観察されたように、両市について DS02R1 線量に対する個人の転座頻度が広範に散らばっていた。(3) 長崎の工場労働者の線量反応の程度は日本家屋で被爆した人よりも有意に小さかった。(4) 長崎の工場労働者を除外すると両市の差は有意でなくなった。(5) 観測された線量反応の程度は、遮蔽区分が屋外であるが遮蔽あり、屋外で遮蔽なし、その他家屋内である被爆者においても有意に小さかった。(6) 異なる遮蔽区分における線量反応のこのような違いによって、物理的線量推定における体系的な遮蔽関連の偏りが示唆される。(児玉、RP8-93)

### 放射線とがん

- 放射線誘発性甲状腺乳頭がん (PTC) における EML-ALK 遺伝子融合の役割を探るため、数年前のマウスの甲状腺組織に融合遺伝子を有意に発現させることが出来る EML-ALK トランスジェニックマウスを作製した。このマウスは少なくとも 1 歳になるまで、甲状腺を含むどの臓器にもがん発生の組織学的特徴を示さなかった。EML4-ALK 融合遺伝子を高度に発現する細胞は放射線被曝後に選択的に増殖しがんを発生させるという仮説を検証するために、0-または 3-Gy の全身照射を受けたトランスジェニックマウスを用いて、組織学的特徴である EML4-ALK の発現について調べた。また、in vitro X 線照射後の不死化したヒト甲状腺上皮細胞 (Nthy-ori-3 細胞) における融合遺伝子の生成を調べた。しかし、0、0.1、0.2、1.0、5.0 Gy を照射した細胞では、リアルタイム RT-PCR や液滴デジタル RT-PCR を用いて高い再現性で融合遺伝子を検出することができず、低線量から中程度の線量の放射線が EML4-ALK 融合を誘導するかもしれないというもう一つの仮説を十分に検証することができなかった。(楠木、多賀、RP1-14)
- 放影研の疫学研究では、放射線被曝が原爆被爆者における肝細胞がん (HCC) の過剰相対リ

スクをもたらすことが示されており、マウスを用いたモデル研究では、放射線が肝細胞がんを誘発することが十分に検証されている。放射線関連の肝細胞がんの機序に関する理解を深めるため、マウスを用いて放射線被曝後の脂肪肝と肝繊維化を評価する予定である(肝がんプログラムプロジェクト プロジェクト 3)。特に肝臓の星状細胞や炎症性マクロファージに注目し、放射線被曝は星状細胞や炎症性マクロファージを介して脂肪肝や線維化を促進し、肝細胞がんの発生につながるのではないかと仮説を立てている。本研究では、この仮説を以下のような具体的な目的で検証している。(1) 放射線照射マウスと非照射マウスから得られた肝臓組織を用いて、脂肪肝と肝繊維化における肝星状細胞とマクロファージの関与を形態学的に評価する。(2) 放射線照射マウスと非照射マウスから得られた肝星状細胞およびマクロファージにおける炎症性サイトカインおよびケモカインの発現の放射線関連変化を評価する。(3) *in vitro* 放射線照射実験を用いて、星状細胞やマクロファージの機能に及ぼす放射線照射の直接的な影響を評価する。(4) マウスにおける放射線関連肝細胞がん発生について考えられるバイオマーカーを同定する。これらのバイオマーカーは、原爆被爆者のバイオサンプル(生物試料)を用いた将来研究に活用できる。本プロジェクトでは、全身放射線照射、特に新生仔マウス(例: 週齢 1 週間)への照射で肝細胞がんを高頻度で発症することが知られている B6C3F1 マウス(メス C57BL/6 マウスとオス C3H マウスの F1 マウス)を用いて、DNA 損傷、細胞老化、炎症に関連する遺伝子の発現を評価する。血清や腸組織などのバイオサンプルを用いて候補マーカーを絞り込み、トランスクリプトームアプローチによる新規バイオマーカーの同定を行う。また肝臓からマクロファージを分離し、同様の方法で遺伝子発現を解析する予定である。

2019 年度に実施した予備実験では、月齢 3 ヶ月の肝臓にプロナーゼ・コラゲナーゼ灌流法と密度勾配遠心分離法を併用することで、純度 90%以上の肝星状細胞を分離することができ、具体的な目的 2)と 3)を達成するための研究が実行可能だということが示唆された。肝星状細胞の純度は、細胞固定用ゲル試薬キットおよび肝星状細胞マーカーとしてデスミンを用いた改良版の免疫蛍光染色法で容易に評価できることが分かった。このシステムを用いた予備的な結果のひとつとして、X 線照射後 3 ヶ月経過したマウス(n=7)から分離した肝細胞では脂肪肝や肝繊維化に関与することが知られているケモカインである Ccl5 の発現が、非照射の対照マウス(n=7)と比較して増加する傾向が観察された。これらの予備データをもとに、本格調査に向けた RP を完成するために、サンプルサイズを決定する目的で検出力計算を行っている。(多賀、肝がんプログラムプロジェクトの新規 RP)

- 胎仔マウス放射線照射後の造血幹細胞(HSCs)における染色体異常頻度の予備調査  
【目的】持続的な染色体転座の誘導に対する放射線の影響は、胎生期の発生の段階、すなわち幹細胞がすでにニッチ(本来の生育地)に定着しているか否かによるのではないかと仮説を検証する。その第一段階として、放射線照射後すぐに胎仔の造血幹細胞で相互転座が誘発されるかどうかを検証した。  
【材料および方法】妊娠マウス(E13-15d)に 2Gy の X 線を照射し、1 日後に胎仔の肝臓を採取した。単一細胞由来のコロニーを得るために、単離した造血幹細胞を 96 ウェルのマルチウェル

プレート(1細胞/ウェル)に分注した。増殖したコロニーを回収し、転座頻度を特定する目的で mFISH 法を用いた核型解析のために細胞を調製した。

【結果と結論】mFISH データにより、転座頻度は、胎仔由来のコロニーでは 21%(43 コロニー中 9 コロニー)、母親由来のコロニーでは 51%(41 コロニー中 21 コロニー)と判明した。この結果は、2Gy の X 線照射直後に胎仔の造血幹細胞に転座が誘発された可能性を示唆しているが、その頻度は照射 1 日後の母親由来のコロニーの頻度と比較し、約 50%であった( $p=0.026$ )。この結果を額面通りに捉えたと、放射線誘発の転座を持つ胎仔の造血幹細胞は、胎生期被曝から 1 日の間に少なくとも部分的に排除されることを示しているのかもしれない。さらに我々は、単離された LT-HSC の信頼性および 2Gy の X 線を照射した母親の LT-HSC 由来のコロニーの転座頻度が予想以上に高い(51%)という二つの困難な問題に遭遇した。(濱崎、RP-P4-17)

- ライト染色した血液塗抹標本の GWAS への適用性を検討するための予備調査

【目的】ライト染色した血液塗抹標本から得られたごく少量の DNA を用いて全ゲノムを増幅することで、SNP 解析に東芝ジャポニカアレイの使用が可能かどうかを確認する。

【材料および方法】放影研職員の中から 6 名の対象者を無作為に抽出した。血液試料からライト染色した血液塗抹標本を作製した。ライト染色した血液塗抹標本から得られた DNA を QIAGEN REPLI-g DNA 増幅キットを用いて増幅した。血液試料から得られた DNA 試料および増幅した DNA 試料について、SNP アレイ(東芝ジャポニカアレイ)を用いて遺伝型決定を実施した。(林、RP-P1-19、2019 年 10 月開始の新規研究)

- 放射線による変異と発がんに対する酸化ストレス応答による防御作業に対する予備的研究 (RP-P)。

【目的】転写因子 NRF2 が制御する酸化ストレス応答経路が、放射線による変異と発がんに対する防御において果たし得る役割を明らかにする。

【背景】放射線発がんを防御する因子を同定することは、発がんや、発がんに対する放射線リスクの個人差に関する分子機序の解明につながり、リスク低減の方法の開発にもつながる可能性がある。ガンマ線や X 線の場合、放射線発がんの主要な機序は、イオン化された水分子に由来する活性酸素種(ROS)が原因の DNA 損傷による体細胞突然変異である。抗酸化遺伝子のマスター転写活性化因子である NRF2 を活性化すると、急性放射線障害が顕著に抑制されることが報告されている。

【方法】NRF2 が欠損または活性化した遺伝子改変マウスと、野生型の対照マウスに対する X 線照射の変異誘発作用及び発がん作用を分析し、マウスの NRF2 活性化における変化が、X 線照射の変異誘発作用及び発がん作用に影響があるか否かを明らかにする。発がん作用の分析には、マウスを放射線照射後に観察して、骨髄性白血病の発生を確認する。変異誘発作用の解析のためには、in vitro 変異原性試験のためにこれらのマウス系統をトランスジェニックレポーターマウス系統 gpt delta と交配させる。このようにして得られた複合変異マウスに放射線を照射して、後日に骨髄、脾及び肝組織を用いて変異原性試験を行う。これに加え、X 線照

射のマウスゲノムへの変異誘発作用を直接的に分析するために、骨髄から多能性造血前駆細胞を単離して *in vitro* (試験管) で増殖させ、得られるクローン化細胞集団から抽出した DNA の全ゲノムシーケンス解析を行う。これらの研究から、NRF2 が制御する酸化ストレス応答経路が、放射線による変異および発がんに対する防御反応において果たしている役割を検証する。【結果】造血幹細胞分離、コロニーを形成するための培養、およびコロニーから DNA を抽出するための条件を検証し、これらの手順に関する研究計画書を確立した。(田邊、PR-P3-19、2019年12月に開始した新規研究)

### 放射線と免疫学的影響

- 原爆被爆者における血液細胞内活性酸素種(ROS)と炎症性バイオマーカーとの関係  
【目的】年齢と放射線被曝が血液細胞における細胞内 ROS レベルに及ぼす影響を調査する。  
【方法】2007年から2012年に健康診断を受診した広島原爆被爆者 2,789人を対象に調査した。T細胞サブセットの細胞内 ROS (O<sub>2</sub>·-)レベルを蛍光標識抗体と蛍光試薬ヒドロエチジンを組み合わせて測定した。  
【結果と結論】リンパ球(特にメモリーCD8+ T細胞)の細胞内 ROS (O<sub>2</sub>·-)レベルは、年齢および放射線量の増加に伴って上昇した。また、血漿中 CRP 値に応じて3群に分けると、血漿中 CRP 値が高い群のメモリーCD8+ T細胞の細胞内 O<sub>2</sub>·-レベルは、放射線量の増加に伴って有意に増加した。これらの結果は、特に放射線被曝によるメモリーCD8+ T細胞の細胞内 O<sub>2</sub>·-レベルの上昇が、血漿 CRP レベルの上昇などの炎症状態の亢進によって誘発された可能性を示唆している。論文は2020年度に投稿予定。(RPs 3-09、4-02、2018年に終了)。

### 放射線とがん以外の疾患

放射線被曝および炎症性疾患のリスク増加との関連でクローン造血(CH)について評価した動物モデル研究はまだない。放射線関連のがん以外の疾患、特に動脈硬化症と関連する可能性がある CH について評価するための戦略を策定するため、我々は放射線照射マウスにおける CH が炎症誘発性表現型に関与し、アテローム性動脈硬化症発生を促進するかもしれないという仮説を検証できるマウスモデルを1つ以上確立するための研究計画を提案した。本研究で開発するマウスモデルは、体細胞突然変異誘発および CH 発生に対する種々の環境因子の影響を評価する上で有用であると考えられる。2019年度に実施した予備実験では、1)放射線照射マウス42匹中に変異 GFP 陽性血球を多量に保有するマウスが認められなかったことから、HPRT-dup-GFP モデル(野田、PLoS One 2015年)において生存変異細胞で CH を同定することは困難であること、2)ヒトの CH と関連することが知られている赤血球分布幅(RDW)および単球数が3Gyを照射したマウスの一部で増加したことから、血液学的指標の縦断的解析が実行可能であること、3)デジタル液滴 RT-PCR およびフローサイトメトリーを用いて、骨髄由来のマクロファージにおける炎症性遺伝子の発現量で CH 関連の炎症誘発性表現型を評価できることが示された。これらの結果に基づき、CH 同定のために HPRT-dup-GFP システムではなく、全エクソーム配列決定(WES)を使用することを決定した。現在、8匹



の放射線照射マウスおよび 4 匹の対照マウス由来の骨髄 DNA 試料について、再発性体細胞突然変異を伴う CH を同定するための WES の評価を実施中で、これにより CH 評価のためのマウス骨髄の WES の実行可能性を検討する予定である。また、高脂肪食を摂食させ放射線照射した LDLR-KO マウスで形成されるアテローム性プラーク中に集積する単球のクローン性評価を計画しており、これにより放射線被曝後の CH がアテローム性動脈硬化病変への炎症誘発性単球のクローン集積を介してアテローム性動脈硬化発生を促進するという仮説を検証することができるだろう。この研究提案は、非がんリサーチクラスターで十分に検討され承認されている(楠、吉田、多賀、濱崎、佐藤、内村、三角、野田:クローン造血プログラムプロジェクトの新規 RP)。

- 放射線被曝が循環器疾患(CD)関与している可能性を調べるために、高血圧自然発症ラット(SHR)、易脳卒中発症性本態性高血圧症自然発症ラット(SHRSP)、ウイスター京都ラット(WKY)に中・低線量・低線量率のガンマ線を照射し、実験を行った。その結果、SHR の収縮期血圧および肝臓に嚢胞性変性を有する SHR の数は線量の増加に伴い増加したが、WKY では増加しなかった。一方、両系統とも線量の増加に伴う体重増加に遅延が認められた。これらの表現型と放射線との関連は、系統の違いから明らかなように、遺伝的背景に影響される可能性がある。SHRSP における脳卒中発生までの時間をエンドポイントとして、低線量被曝および低線量率被曝の放射線影響を評価した。急性被曝では、0.1Gy 程度の線量に閾値が存在することが示された。低線量率被曝の場合、持続的に照射した SHRSP では有意な放射線影響は認められなかった。このことから、線量率効果係数は無限大であると考えられる。また、メタボローム解析及びサイトカイン測定から、慢性的な線量依存性の変化が様々なマーカーで観察された。これらのデータにより、CD と放射線被曝との関連性の分子機序を解明するための有用なツールが得られる可能性がある。なお、本研究は要約報告発表後に終了する予定である。(高橋、RPs 1-11, 2-12, S1-15)