

**iPS 細胞由来組織細胞における  
放射線依存的突然変異計測系の確立  
(委託研究)**

—令和 2 年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業—

Establishment of the Measurement System of Radiation Dependent Mutation  
in Organ Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells  
(Contract Research)

- FY2020 Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource  
Development Project -

福島研究開発部門 福島研究開発拠点 廃炉環境国際共同研究センター  
東京工業大学

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science,  
Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development  
Tokyo Institute of Technology

December 2021

Japan Atomic Energy Agency

日本原子力研究開発機構

JAEA-Review

本レポートは国立研究開発法人日本原子力研究開発機構が不定期に発行する成果報告書です。本レポートはクリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 ライセンスの下に提供されています。本レポートの成果（データを含む）に著作権が発生しない場合でも、同ライセンスと同様の条件で利用してください。（<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>）  
なお、本レポートの全文は日本原子力研究開発機構ウェブサイト（<https://www.jaea.go.jp>）より発信されています。本レポートに関しては下記までお問合せください。

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 JAEA イノベーションハブ 研究成果利活用課  
〒319-1195 茨城県那珂郡東海村大字白方2番地4  
電話 029-282-6387, Fax 029-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

This report is issued irregularly by Japan Atomic Energy Agency.  
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).  
Even if the results of this report (including data) are not copyrighted, they must be used under the same terms and conditions as CC-BY.  
For inquiries regarding this report, please contact Institutional Repository and Utilization Section, JAEA Innovation Hub, Japan Atomic Energy Agency.  
2-4 Shirakata, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-1195 Japan  
Tel +81-29-282-6387, Fax +81-29-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立  
(委託研究)

—令和 2 年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業—

日本原子力研究開発機構 福島研究開発部門 福島研究開発拠点  
廃炉環境国際共同研究センター

東京工業大学

(2021 年 9 月 7 日受理)

日本原子力研究開発機構 (JAEA) 廃炉環境国際共同研究センター (CLADS) では、令和 2 年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業 (以下、「本事業」という) を実施している。

本事業は、東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所の廃炉等をはじめとした原子力分野の課題解決に貢献するため、国内外の英知を結集し、様々な分野の知見や経験を、従前の機関や分野の壁を越えて緊密に融合・連携させた基礎的・基盤的研究及び人材育成を推進することを目的としている。

平成 30 年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省から JAEA に移行することで、JAEA とアカデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成をより安定的かつ継続的に実施する体制を構築した。

本研究は、研究課題のうち、平成 30 年度に採択された「iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立」の平成 30 年度から令和 2 年度の研究成果について取りまとめたものである。本課題は令和 2 年度が最終年度となるため 3 年度分の成果を取りまとめた。

本研究は、放射線の生体影響を調査する一環として、放射線照射によって生じる突然変異頻度を計測する実験系を樹立することを目的とした。本研究の特色はヒト iPS 細胞とヒト iPS 細胞から分化誘導した組織細胞を用いて突然変異頻度を測定することにより、同一のゲノム DNA を持つ異なる組織細胞において突然変異の頻度を比較することができる点である。また、得られた結果を、機械学習を用いて比較解析し、これまで見逃していたサンプル間での差の検討を実施した。

---

本報告書は、日本原子力研究開発機構の英知事業における委託業務として、東京工業大学が実施した成果を取りまとめたものである。

廃炉環境国際共同研究センター：〒979-1151 福島県双葉郡富岡町大字本岡字王塚 790-1

Establishment of the Measurement System of Radiation Dependent Mutation in Organ Cells  
Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells  
(Contract Research)

— FY2020 Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project —

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science,  
Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development  
Japan Atomic Energy Agency  
Tomioka-machi, Futaba-gun, Fukushima-ken

Tokyo Institute of Technology

(Received September 7, 2021)

The Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science (CLADS), Japan Atomic Energy Agency (JAEA), had been conducting the Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project (hereafter referred to “the Project”) in FY2020.

The Project aims to contribute to solving problems in the nuclear energy field represented by the decommissioning of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station, Tokyo Electric Power Company Holdings, Inc. (TEPCO). For this purpose, intelligence was collected from all over the world, and basic research and human resource development were promoted by closely integrating/collaborating knowledge and experiences in various fields beyond the barrier of conventional organizations and research fields.

The sponsor of the Project was moved from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to JAEA since the newly adopted proposals in FY2018. On this occasion, JAEA constructed a new research system where JAEA-academia collaboration is reinforced and medium-to-long term research/development and human resource development contributing to the decommissioning are stably and consecutively implemented.

Among the adopted proposals in FY2018, this report summarizes the research results of the “Establishment of the measurement system of radiation dependent mutation in organ cells derived from human induced pluripotent stem cells” conducted from FY2018 to 2020. Since the final year of this proposal was FY2020, the results for three fiscal years were summarized.

The present study aimed to establish measurement system of radiation dependent mutation for analyze radiation effect to the human body. A distinctive feature of this study is to compare several organ cells which possess same genome DNA using human induced pluripotent stem cell. Further, using artificial intelligence technology and machine leaning method, we analyzed differences of mutation frequency during samples.

Keywords: Genetic Mutation, iPS Cells, Organ Cells

---

This work was performed by Tokyo Institute of Technology under contract with Japan Atomic Energy Agency.

目次

1. 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要 .....	1
2. 平成 30 年度 採択課題 .....	2
3. 令和元年度 採択課題 .....	5
4. 令和 2 年度 採択課題 .....	8
付録 成果報告書 .....	11

Contents

1. Outline of Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project .....	1
2. Accepted Proposal in FY2018.....	2
3. Accepted Proposal in FY2019.....	5
4. Accepted Proposal in FY2020.....	8
Appendix Result Report .....	11

This is a blank page.

## 1. 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要

文部科学省では、「東京電力(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等研究開発の加速プラン(平成26年6月文部科学省)」等を踏まえ、平成27年度から「英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業」(以下、「本事業」という。)を立ち上げ、「戦略的原子力共同研究プログラム」、「廃炉加速化研究プログラム」及び「廃止措置研究・人材育成等強化プログラム」を推進している。

具体的には、国内外の英知を結集し、国内の原子力分野のみならず様々な分野の知見や経験を、機関や分野の壁を越え、国際共同研究も含めて緊密に融合・連携させることにより、原子力の課題解決に資する基礎的・基盤的研究や産学が連携した人材育成の取組を推進している。

一方、日本原子力研究開発機構(以下、「JAEA」という。)では、平成27年に廃炉国際共同研究センター(以下、「CLADS」という。現:廃炉環境国際共同研究センター)を組織し、「東京電力ホールディングス(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等に向けた中長期ロードマップ」等を踏まえ、東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所廃炉(以下、「1F廃炉」という。)に係る研究開発を進めている。

また、平成29年4月にCLADSの中核拠点である「国際共同研究棟」の運用を開始したことを踏まえ、今後はCLADSを中核に、廃炉の現場ニーズを踏まえた国内外の大学、研究機関等との基礎的・基盤的な研究開発及び人材育成の取組を推進することにより、廃炉研究拠点の形成を目指すことが期待されている。

このため、本事業では平成30年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省からJAEAに移行することで、JAEAとアカデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成をより安定的かつ継続的に実施する体制を構築することとし、従来のプログラムを、①共通基盤型原子力研究プログラム、②課題解決型廃炉研究プログラム、③国際協力型廃炉研究プログラム、④研究人材育成型廃炉研究プログラム(令和元年度より新設)に再編した。

2. 平成 30 年度 採択課題

平成 30 年度採択課題については以下のとおりである。

課題数：19 課題

共通基盤型原子力研究プログラム	11 課題（若手研究 6 課題、一般研究 5 課題）
課題解決型廃炉研究プログラム	6 課題
国際協力型廃炉研究プログラム	2 課題（日英共同研究）

平成 30 年度 採択課題一覧

共通基盤型原子力研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
被災地探査や原子力発電所建屋内情報収集のための半自律ロボットを用いたセマンティックサーベイマップ生成システムの開発	河野 仁	東京工芸大学
汚染土壌の減容を目的とした重液分離による放射性微粒子回収法の高度化	山崎 信哉	筑波大学
ラドンを代表としたアルファ核種の吸入による内部被ばくの横断的生体影響評価	片岡 隆浩	岡山大学
炉心溶融物の粘性及び表面張力同時測定技術の開発	大石 佑治	大阪大学
iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立	島田 幹男	東京工業大学
レーザー共鳴イオン化を用いた同位体存在度の低いストロンチウム 90 の迅速分析技術開発	岩田 圭弘	東京大学



共通基盤型原子力研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
放射性核種の長期安定化を指向した使用済みゼオライト焼結固化技術の開発	新井 剛	芝浦工業大学
燃料デブリ取り出しを容易にするゲル状充填材の開発	牟田 浩明	大阪大学
レーザー蛍光法を用いた燃料デブリ変質相の同定	斉藤 拓巳	東京大学
過酷炉心放射線環境における線量測定装置の開発	岡本 保	木更津工業 高等専門学校
レーザー加工により発生する微粒子の解析と核種同定手法の開発	長谷川 秀一	東京大学

課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
合金相を含む燃料デブリの安定性評価のための基盤研究	桐島 陽	東北大学
ガンマ線画像スペクトル分光法による高放射線場環境の画像化による定量的放射能分布解析法	谷森 達	京都大学
燃料デブリ取出し時における放射性核種飛散防止技術の開発	鈴木 俊一	東京大学
アルファダストの検出を目指した超高位置分解能イメージング装置の開発	黒澤 俊介	東北大学
ナノ粒子を用いた透明遮へい材の開発研究	渡邊 隆行	九州大学
先端計測技術の融合で実現する高耐放射線燃料デブリセンサーの研究開発	萩原 雅之	高エネルギー 加速器研究機構

## 国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
放射性微粒子の基礎物性解明による廃炉作業リスク低減への貢献	五十嵐 康人	茨城大学
放射線耐性の高い薄型 SiC 中性子検出器の開発	三澤 毅	京都大学

3. 令和元年度 採択課題

令和元年度採択課題については以下のとおりである。

課題数：19 課題

- 共通基盤型原子力研究プログラム 7 課題（若手研究 2 課題、一般研究 5 課題）
- 課題解決型廃炉研究プログラム 4 課題
- 国際協力型廃炉研究プログラム 4 課題（日英共同研究 2 課題、日露共同研究 2 課題）
- 研究人材育成型廃炉研究プログラム 4 課題

令和元年度 採択課題一覧

共通基盤型原子力研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
ウラニル錯体化学に基づくテーラーメイド型新規海水ウラン吸着材開発	鷹尾 康一朗	東京工業大学
動作不能からの復帰を可能とする多連結移動ロボットの半自律遠隔操作技術の確立	田中 基康	電気通信大学

共通基盤型原子力研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
一次元光ファイバ放射線センサを用いた原子炉建屋内放射線源分布計測	瓜谷 章	名古屋大学
低線量・低線量率放射線被ばくによる臓器別酸化ストレス状態の検討	鈴木 正敏	東北大学
単一微粒子質量分析法に基づくアルファ微粒子オンラインモニタリングに向けた基礎検討	豊嶋 厚史	大阪大学
幹細胞動態により放射線発がんを特徴付ける新たな評価系の構築	飯塚 大輔	量子科学技術 研究開発機構
耐放射線性ダイヤモンド半導体撮像素子の開発	梅沢 仁 (令和元年度まで) 大曲 新矢	産業技術総合 研究所

課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
Multi-Physics モデリングによる福島2・3号機ペDESTAL燃料デブリ深さ方向の性状同定	山路 哲史	早稲田大学
燃料デブリ取出しに伴い発生する廃棄物のフッ化技術を用いた分別方法の研究開発	渡邊 大輔	日立 GE ニュークリ ア・エナジー
アパタイトセラミックスによる ALPS 沈殿系廃棄物の安定固化技術の開発	竹下 健二	東京工業大学
拡張型スーパードラゴン多関節ロボットアームによる圧力容器内燃料デブリ調査への挑戦	高橋 秀治	東京工業大学

国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
高い流動性および陰イオン核種保持性を有するアルカリ刺激材料の探索と様々な放射性廃棄物の安全で効果的な固化	佐藤 努	北海道大学
再臨界前の中性子線増に即応可能な耐放射線 FPGA システムの開発	渡邊 実	静岡大学 (令和2年度 まで) 岡山大学

国際協力型廃炉研究プログラム（日露共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリ取出し臨界安全技術の高度化	小原 徹	東京工業大学
微生物生態系による原子炉内物体の腐食・変質に関する評価研究	金井 昭夫	慶應義塾

研究人材育成型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリ取り出し時における炉内状況把握のための遠隔技術に関する研究人材育成	浅間 一	東京大学
化学計測技術とインフォマティクスを融合したデブリ性状把握手法の開発とタイアップ型人材育成	高貝 慶隆	福島大学
放射線・化学・生物的作用の複合効果による燃料デブリ劣化機構の解明	大貫 敏彦 (平成30年度まで) 竹下 健二	東京工業 大学
燃料デブリ分析のための超微量分析技術の開発	永井 康介	東北大学

## 4. 令和2年度 採択課題

令和2年度は、2つのプログラムにおいて、研究課題の採択を決定した。  
公募の概要は以下のとおりである。

公募期間：令和2年3月17日～令和2年5月14日（課題解決型）  
令和2年5月13日～令和2年7月15日（国際協力型）

課題数：10 課題

課題解決型廃炉研究プログラム 8 課題（若手研究 2 課題、一般研究 6 課題）  
国際協力型廃炉研究プログラム 2 課題（日英共同研究）

これらの提案について、外部有識者から構成される審査委員会において、書面審査及び面接審査、日英共同研究については二国間の合同審査を実施し、採択候補課題を選定した。

その後、PD（プログラムディレクター）・PO（プログラムオフィサー）会議での審議を経て、採択課題を決定した。

## 令和2年度 採択課題一覧

## 課題解決型廃炉研究プログラム

## 【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリにおける特性の経年変化と環境劣化割れの調査	楊 会龍	東京大学
健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発	岡本 章玄	物質・材料研究機構

課題解決型廃炉研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
遮蔽不要な臨界近接監視システム用ダイヤモンド中性子検出器の要素技術開発	田中 真伸	高エネルギー加速器研究機構
$\alpha / \beta / \gamma$ 線ラジオリシス影響下における格納容器系統内広域防食の実現：ナノバブルを用いた新規防食技術の開発	渡邊 豊	東北大学
$\beta$ 、 $\gamma$ 、X線同時解析による迅速・高感度放射性核種分析法の開発	篠原 宏文	日本分析センター
合理的な処分のための実機環境を考慮した汚染鉄筋コンクリート長期状態変化の定量評価	丸山 一平	東京大学
溶脱による変質を考慮した汚染コンクリート廃棄物の合理的処理・処分の検討	小崎 完	北海道大学
マイクロ波重畳 LIBS によるデブリ組成計測の高度化と同位体の直接計測への挑戦	池田 裕二	アイラボ

国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
革新的水質浄化剤の開発による環境問題低減化技術の開拓	浅尾 直樹	信州大学
無人航走体を用いた燃料デブリサンプルリターン技術の研究開発	鎌田 創	海上・港湾・航空技術研究所

本報告書は、以下の課題の平成30年度から令和2年度の研究成果を取りまとめたものである。本課題は令和2年度が最終年度となるため3年度分の成果を取りまとめている。

## 共通基盤型原子力研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
iPS細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立	島田 幹男	東京工業大学

研究成果を取りまとめた成果報告書を付録として添付する。



付録  
成果報告書

This is a blank page.

令和2年度

日本原子力研究開発機構  
英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

iPS細胞由来組織細胞における放射線依存  
的突然変異計測系の確立  
(契約番号 R02I016)

成果報告書

令和3年3月  
国立大学法人東京工業大学

本報告書は、国立研究開発法人日本原子力研究開発機構の「英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業」による委託業務として、国立大学法人東京工業大学が実施した「iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立」の平成 30 年度から令和 2 年度の研究成果を取りまとめたものです。本課題は令和 2 年度が最終年度となるため 3 年分の成果を取りまとめています。

目次

概略	vi
1. はじめに	1. 1-1
1.1 研究背景	1. 1-1
2. 業務計画	2. 1-1
2.1 全体計画	2. 1-1
2.1.1 実施体制図	2. 1-2
2.2 各年度の成果の目標および業務の実施方法	2. 2-1
2.2.1 平成 30 年度の成果の目標および業務の実施方法	2. 2-1
2.2.2 令和元年度の成果の目標および業務の実施方法	2. 2-2
2.2.3 令和 2 年度の成果の目標および業務の実施方法	2. 2-2
3. 業務の実施内容および成果	3. 1-1
3.1 iPS 細胞から神経系、皮膚系、心筋細胞および血液細胞の作製【平成 30 年度～令和 2 年度】	3. 1-1
3.1.1 各組織細胞樹立のための条件検討【平成 30 年度】	3. 1-2
3.1.2 神経細胞、皮膚細胞の継続培養【令和元年度～令和 2 年度】	3. 1-2
3.1.3 心筋細胞、血液細胞の樹立検討および継続培養【令和元年度～令和 2 年度】	3. 1-4
3.2 各種細胞における各種放射線照射後の突然変異率測定【平成 30 年度～令和 2 年度】	3. 2-1
3.2.1 実験の条件と試薬の準備【平成 30 年度】	3. 2-1
3.2.2 放射線照射のための環境整備【平成 30 年度】	3. 2-1
3.2.3 iPS 細胞および各種組織細胞を用いた突然変異測定の条件検討（再委託先：量研機構）【平成 30 年度～令和元年度】	3. 2-1
3.2.4 各種放射線照射による照射実験の条件検討【令和元年度】	3. 2-6
3.2.5 iPS 細胞および各種組織細胞を用いた突然変異測定（再委託先：量研機構）【令和 2 年度】	3. 2-9
3.2.6 各種放射線照射による照射実験【令和 2 年度】	3. 2-9
3.2.7 突然変異塩基配列の決定【令和 2 年度】	3. 2-22
3.3 突然変異した塩基配列の傾向を知る数理モデルの構築（連携先：原子力機構）	3. 3-1
3.3.1 環境整備と演習用データを用いたデータ解析法の検討【平成 30 年度～令和元年度】	3. 3-1
3.3.2 突然変異計測結果の解析【令和 2 年度】	3. 3-1
3.4 研究推進	3. 4-1
3.5 考察	3. 5-1
4. 結言	4-1
参考文献	5-1

執筆者リスト

事業代表者

国立大学法人東京工業大学 助教 島田幹男

再委託機関

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 放射線医学研究所 研究員 柳原啓見

連携機関

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 人形峠環境技術センター 研究員 神崎訓枝

表一覧

表 1	放射線による DNA への影響 .....	1. 1-1
表 2	iPS 細胞 C2 における紫外線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-10
表 3	iPS 細胞 201B7 における紫外線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-10
表 4	iPS 細胞 C2 におけるガンマ線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-12
表 5	iPS 細胞 C2 における各種放射線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-13
表 6	ヒト皮膚線維芽細胞 NB1RGB における紫外線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-14
表 7	ヒト皮膚線維芽細胞 NB1RGB における各種放射線照射時の突然変異頻度 ...	3. 2-15
表 8	神経幹細胞における紫外線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-16
表 9	神経幹細胞における各種放射線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-17
表 10	皮膚ケラチノサイトにおける各種放射線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-18
表 11	心筋細胞における各種放射線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-19
表 12	血液細胞における各種放射線照射時の突然変異頻度 .....	3. 2-20
表 13	突然変異の塩基配列決定 .....	3. 2-22

図一覧

図 1	放射線によって生じる DNA 損傷	vii
図 2	実験計画のフローチャート	viii
図 3	実験計画	2. 1-1
図 4	実施体制	2. 1-2
図 5	突然変異計測実験法	3. 2-4
図 6	紫外線照射装置	3. 2-7
図 7	コバルト 60 照射室	3. 2-7
図 8	ペレトロンによる中性子線照射	3. 2-8
図 9	iPS 細胞 C2 および 201B7 における紫外線照射後の突然変異頻度	3. 2-11
図 10	iPS 細胞 C2 におけるガンマ線照射時の突然変異頻度	3. 2-12
図 11	iPS 細胞における各種放射線照射後の突然変異頻度の比較	3. 2-13
図 12	ヒト皮膚線維芽細胞 NB1RGB における紫外線照射時の突然変異頻度	3. 2-15
図 13	神経幹細胞における紫外線照射時の突然変異頻度	3. 2-16
図 14	各種細胞における各種放射線照射後の突然変異頻度の比較	3. 2-21
図 15	自己組織化マップの概念図	3. 3-2
図 16	出力されたマップ	3. 3-2
図 17	出力されたマップからの特徴抽出	3. 3-3
図 18	神経細胞（左）と iPS 細胞（右）への紫外線照射に関する特徴抽出	3. 3-4
図 19	皮膚細胞、心筋細胞、大腸癌細胞への紫外線照射に関する特徴抽出	3. 3-4
図 20	放射線作用の時間経過	4-1



略語一覧

DNA	: Deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
iPS 細胞	: Induced pluripotent stem cells (人工多能性幹細胞)
ICRP	: International commission on radiation protection (国際放射線防護委員会)
ES 細胞	: Embryonic stem cells (胚性幹細胞)
mGS 細胞	: Multipotent germline cells (多能性生殖幹細胞)
PCS 細胞	: Pluripotent stem cells (多能性幹細胞)
mRNA	: messenger ribonucleic acid (メッセンジャーRNA)
LCS	: Longest common subsequence (最長共通部分列)
SOM	: Self organizing maps (自己組織化マップ)
原子力機構	: 国立研究開発法人日本原子力研究開発機構
量研機構	: 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

## 概略

福島第一原子力発電所事故以来、我が国における放射線の生体影響に関する社会的関心は増加傾向にある。特に放射線による突然変異の発生および発がんの関係を研究することは廃炉措置作業員に対するがん化リスクの評価と放射線防護の立場からも重要である。

放射線が生体に与える影響は細胞レベルではゲノム DNA に対する損傷が最も大きい。放射線によって生じる DNA 損傷は塩基損傷、DNA 架橋、一本鎖切断、二本鎖切断など幅広く、損傷が放置されると突然変異や細胞死の原因となる(図 1)。生物の DNA 損傷に対する防御機構として DNA 修復機構が存在するが、まれに完全に修復されずに修復エラーが生じる場合がある。そういった場合、ゲノム DNA に突然変異として残存し、染色体不安定性や発がんの原因となる。細胞 1 つ 1 つの DNA 修復頻度や活性は年齢や臓器・組織によって異なるが、その要因の 1 つとして細胞分裂活性があげられる。例えば細胞分裂が盛んな組織細胞の例として皮膚細胞や血液細胞および腸管細胞がある。これらは常に外環境に接しており、腸管細胞は消化するために様々な食物に接しているため、細胞自体の新陳代謝が活発になっており、細胞分裂活性が高い。逆に神経細胞は近年になってようやく成人の脳神経組織に神経幹細胞が確認され、それらがわずかに細胞分裂をしている可能性が報告されたが、疾患や事故によって神経組織が傷害を受けた場合、修復のために細胞分裂を行うことはないと考えられている。また、同様に心筋細胞も成人ではほとんど細胞分裂を行わない組織であると考えられている。

細胞分裂が活発な皮膚や血液と細胞分裂頻度が低い神経細胞や心筋細胞を比較した際、DNA 修復がどのように制御されているか、その修復エラーがどの程度発生しているかは突然変異の発生頻度、さらには発がんリスクを評価する上で、重要な要素となってくる。特に放射線に対する生体反応は「ベルゴニー・トリボンドーの法則」より盛んに細胞分裂する細胞ほど感受性が高いとされている。細胞分裂が盛んな細胞とは個体レベルでは幹細胞が該当する。受精卵から細胞卵割を経て個体発生が進行する際、外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉分化後、皮膚、神経などそれぞれの組織幹細胞へと分化する。

これまでマウスなどのモデル生物を用いて臓器間での突然変異頻度の比較やヒトにおいては異なる個人間の組織細胞を用いての突然変異の比較の報告はあったが、同じ個体由来の組織細胞における突然変異頻度の比較はなかった。これでは得られた突然変異の差が、個人差によるものか、組織の特徴によるものか判断することができない。そこで我々は、ヒト新生児皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、それを用いて神経、皮膚、心筋、血液細胞を分化誘導し、それらの組織幹細胞から突然変異頻度の活性を計測する実験系の確立を本研究事業の目的とした。

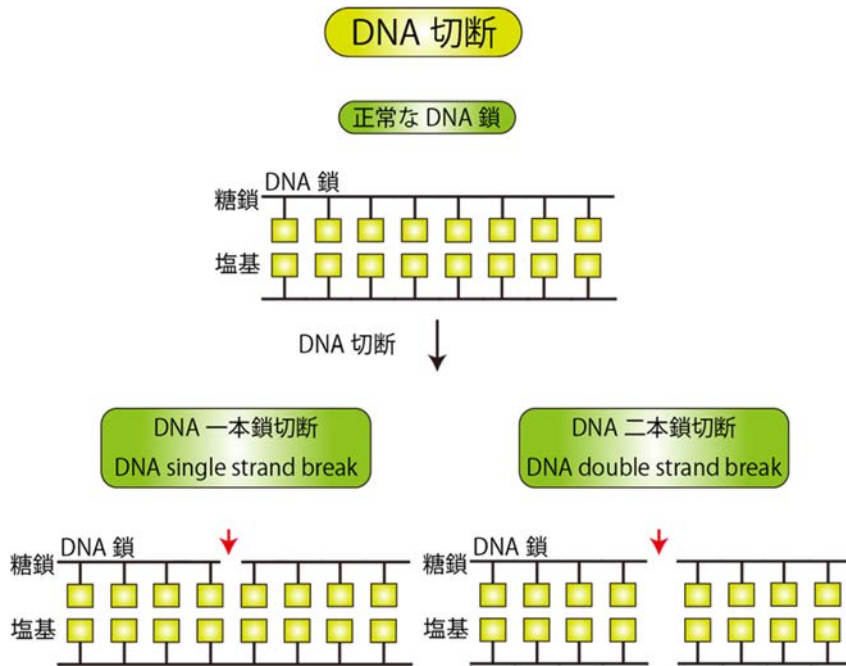


図1 放射線によって生じるDNA損傷

DNAは二本鎖構造を取っているために放射線によって一本鎖切断と二本鎖切断が生じる。

本事業の研究計画は突然変異頻度の活性測定系の確立であるが、本事業達成のために研究計画を大きく3つの段階に分けることができる(図2)。

1つ目がiPS細胞から神経、皮膚、心筋、血液細胞の分化誘導である。これら4つの組織細胞を選択した狙いは放射線に対する感受性の違いである。皮膚、血液細胞は放射線に対する感受性やがん化のリスクが高い。一方で神経、心筋細胞は放射線感受性とがん化リスクが比較的低いことが示唆されている。これらの原因として上述した細胞分裂活性の違いが考えられるが実際に組織細胞として突然変異頻度を比較検討した報告は少ないことが本事業で実施する理由である。

2つ目が突然変異測定系の確立である。突然変異は放射線等によりDNAに生じた傷が修復されずに残存することが原因と考えられる。本来は細胞内のゲノムDNAそのものを直接次世代シーケンサーで読み取るのが理想であると考えられるが、コストと所用時間との関係から現実的ではない。そこで溶液状のDNAベクターに放射線を照射し、損傷を生じさせたのち、このDNAベクターを細胞に遺伝子導入することにより損傷を修復させる手法を選択した。DNA損傷を修復する際、細胞の種類によってDNA修復活性が異なることが予想されるために不完全な修復から突然変異が生じると考えられる。DNAベクターに生じた突然変異はこのままでは計測することができないので一旦、細胞から抽出し、再度大腸菌に遺伝子導入し、X-Galの青白コロニーセレクション法により突然変異の頻度を計測する。

3つ目のステップは組織細胞による突然変異の頻度の結果を機械学習法と数理モデルにより解析することである。突然変異はA→G、C→Gなどの点突然変異に加えて欠失、付加など様々な

種類が想定される。そこで、単純な棒グラフのみで結果を表現するだけでなく、得られた結果を視覚的に読み取りやすいように表現するとともに、新たな解釈を加えて結果を再考する。

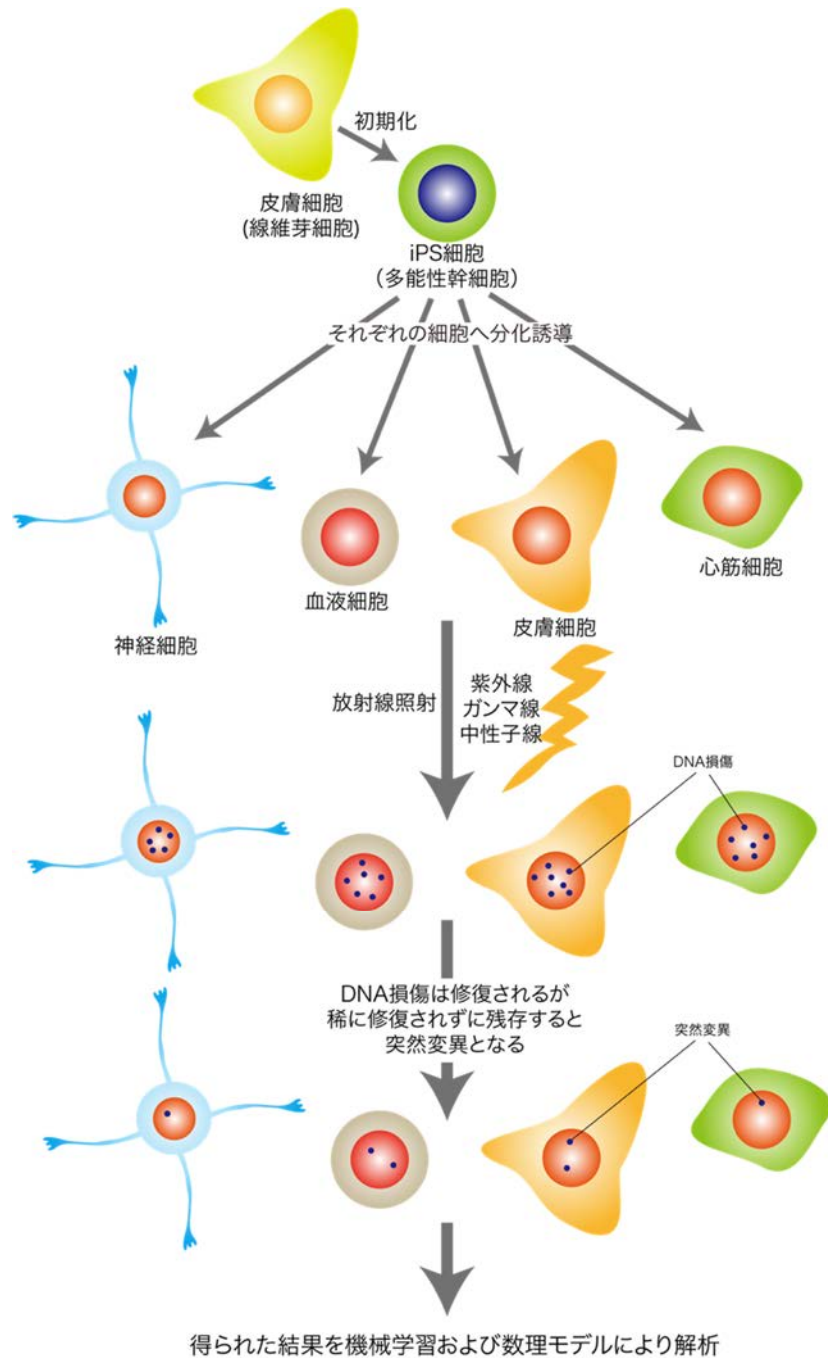


図 2 実験計画のフローチャート

ヒト新生児由来皮膚線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を用いて神経、皮膚、血液、心筋細胞へと分化誘導する。紫外線、ガンマ線、中性子線を照射した際のこれらの細胞の突然変異頻度および突然変異の種類を解析する。得られた結果を機械学習および数理モデルにより解析する。

1. はじめに

1.1 研究背景

福島第一原子力発電所事故以降、我が国における放射線の生体影響の社会的関心は増加する傾向にあり、特に放射線照射による突然変異の発生は廃炉措置作業員におけるがん化リスクの考察と放射線防護の立場からも重要である。

放射線の生体影響は細胞内 DNA に対する損傷が最も深刻であると考えられている。表 1 に記したのは放射線線量 1 Gy に対する DNA 損傷や細胞影響を定量化したものである。物理的過程として 1 Gy 照射に対して 1 細胞あたり細胞核内で 100000 個の電離、DNA 分子内で 2000 個の電離と励起を起こしていると考えられている。これら物理的な損傷の見積もりに対して DNA 分子自体が損傷を受けている量は DNA 一本鎖切断と塩基損傷が 1000 個前後、DNA 二本鎖切断が 40 個ほどと見積もられている。そしてこれらの DNA 損傷の結果として細胞に生じる影響は 1 細胞あたり 20～80 %の細胞死、1 個以下の染色体異常、10 万分の 1 前後の確率での突然変異である。

表 1 放射線による DNA への影響

X 線、ガンマ線 1 Gy 照射時の細胞への影響を「初期損傷」、「DNA 分子に対する損傷」、「細胞に対する効果」に分類してそれぞれの影響を定量化した結果

<b>●細胞に対する効果</b>		<b>1 細胞あたり</b>
細胞致死		0.2～0.8
染色体異常		～1
突然変異 (hpert mutation)		～10 <sup>-5</sup>
<b>●DNA分子に対する損傷 (生化学反応過程)</b>		<b>1 細胞あたり</b>
DNA一本鎖切断		1,000
塩基損傷		950
DNA二本鎖切断		40
<b>●初期損傷 (物理的過程)</b>		<b>1 細胞あたり</b>
細胞核内の電離		～100,000
DNA分子内の電離数		～2,000
DNA分子内の励起数		～2,000

近年は放射線の医療応用も盛んであり、様々な組織のがんに対して最も適当といえる放射線種が用いられ放射線治療に使用されている。特に先端医療として注目されている国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 量子医科学研究所 (千葉) の重粒子線照射装置は炭素線など high linier energy transfer (高 LET) 放射線を照射することが可能でがん治療に関して著しい成功を治めつつある。重粒子線は一定の飛程後に高いエネルギー付与を付近の物質に与えるブラッグピークという現象が知られており、ブラッグピークをちょうどがん組織に照射するよう計算することにより効率的な効果を得ることができる。しかし、重粒子線照射装置は大型の

加速器を必要とするために現段階では使用できる施設は限定されている。一方で X 線やガンマ線を用いた放射線治療はできるだけ患部に照射するためにガンマナイフのような多方向から弱い放射線を照射し、患部にエネルギーが集中するような工夫がされているが、少量の放射線が正常組織に被曝することは避けることができない。それら低線量放射線が組織に与える影響、突然変異などの効果は不明な点が多い。本事業では廃炉措置における作業員への影響に加えて、医療被曝における影響の解明にも寄与することが期待される。

本事業はこれらの背景を踏まえて、人工多能性幹 (iPS) 細胞より樹立した組織細胞を用いることによってそれぞれの組織における突然変異率を測定する実験系を確立することを目的とする。これまで組織の放射線影響を調べる際は主にモデル動物としてマウスを使用し、全身照射したマウスから各種臓器を摘出し得られた細胞内ゲノム DNA からそれらの影響を解析することが研究方法の 1 つであった。しかし、同じ哺乳類といえどもヒトとマウスでは細かな分子制御経路は異なっていることが最近の知見により明らかになっており、マウスで得られたデータをそのままヒトに外挿することはリスクが高いと考えられる。ヒトの場合正常な細胞は通常、体への負担が少ない、皮膚細胞および血液細胞に限定されているために採取が難しい正常な内臓系細胞の解析は困難であった。しかし、近年の再生医学の発展により健常者から採取した血液細胞や皮膚細胞から iPS 細胞を樹立することが可能になり、それらから様々な臓器へと分化誘導することが可能になった。このため、本事業では発生・再生医学分野の iPS 細胞技術と突然変異測定系の技術を統合し、我々の研究室で樹立した iPS 細胞を用いて神経系、皮膚、血液系、循環器系の組織細胞を作製し、放射線照射後の各組織の突然変異率を計測して、組織ごとの突然変異の違いを数理モデルの構築により評価する実験系の確立を目指す。本事業によりこれまで困難であった放射線による異なる組織間の突然変異率を比較することが可能になり、がん化リスクを評価することを目標とする。



2. 業務計画  
2.1 全体計画

本業務の全体計画図を図3に示す。

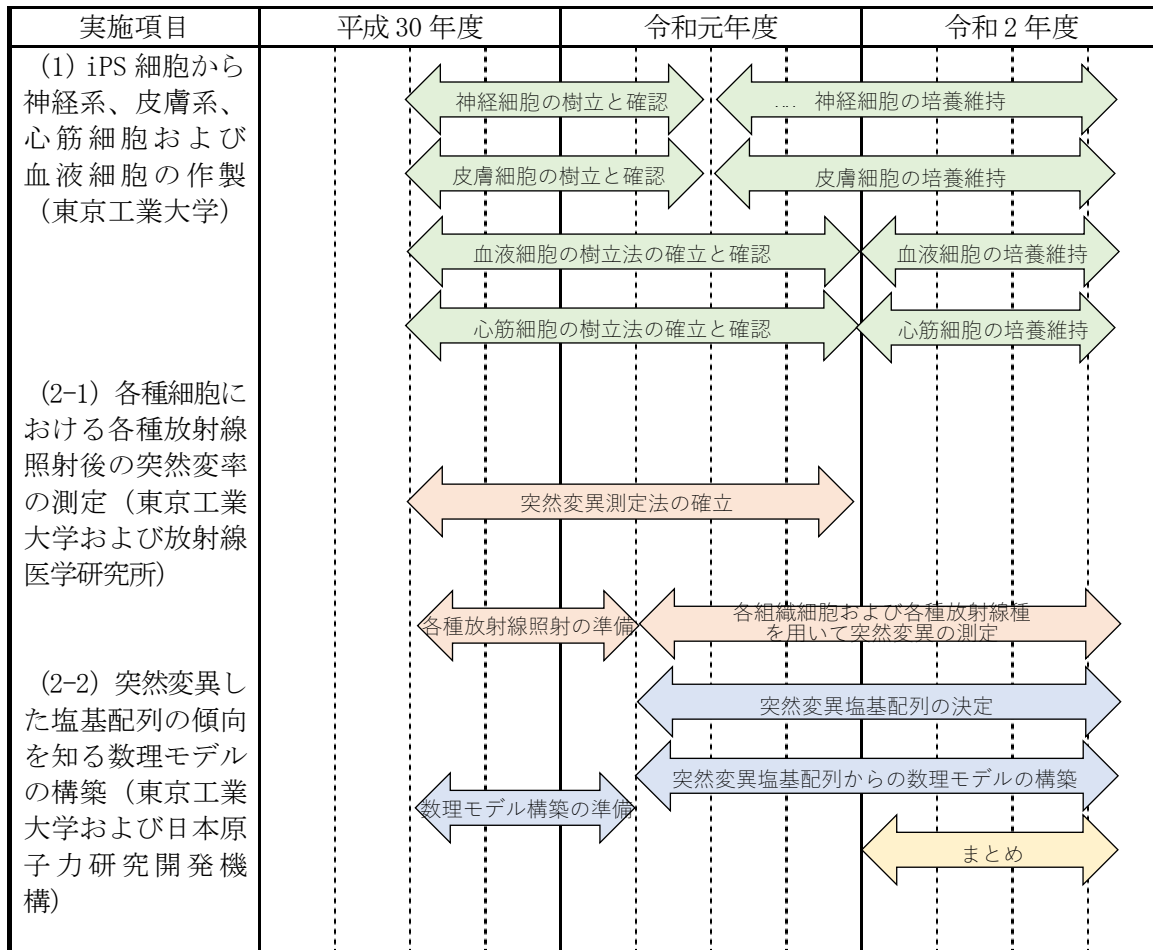


図3 実験計画

2.1.1 実施体制図

本業務の実施体制を図4に示す。

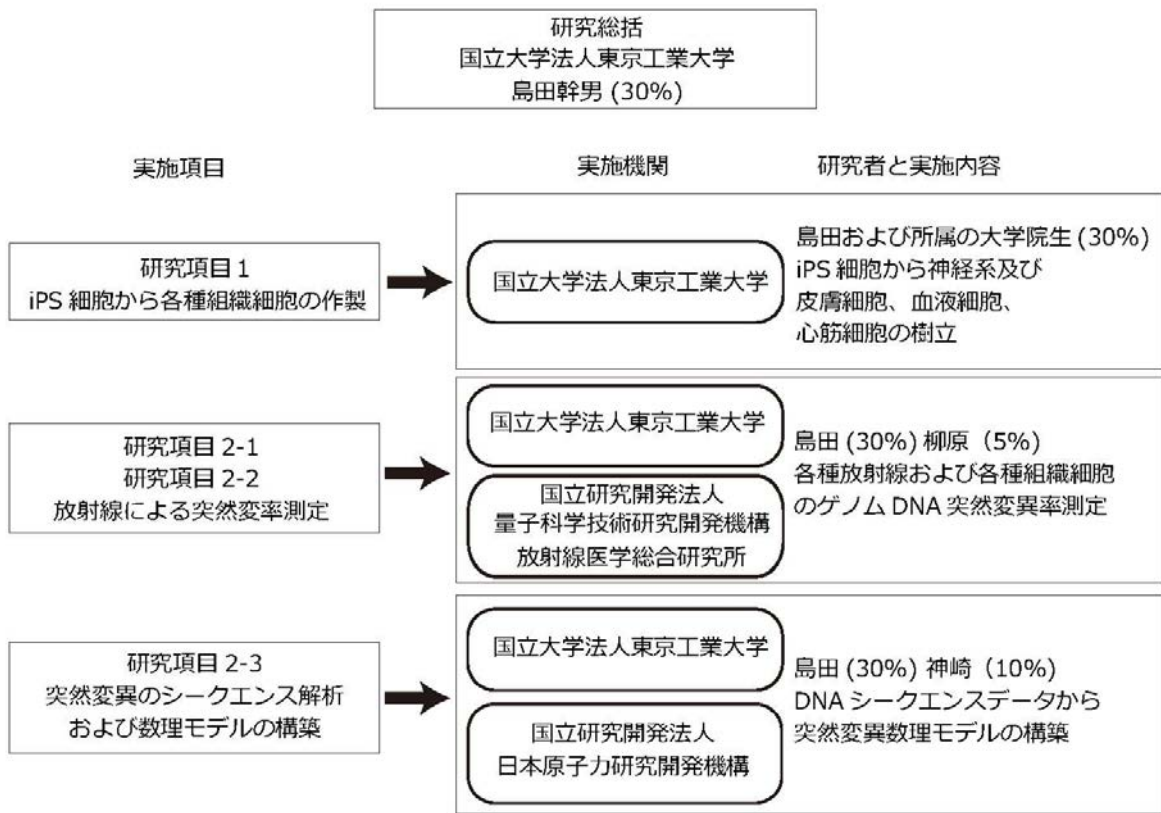


図 4 実施体制



## 2.2 各年度の成果の目標および業務の実施方法

「iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立」が業務の全体像とすると実際の業務は

1. iPS 細胞から組織幹細胞の樹立
  2. 突然変異実験系の確立
  3. 数理モデルを用いた実験結果の解析
- の3段階に分類することができる。

### 2.2.1 平成30年度の成果の目標および業務の実施方法

平成30年度はそれぞれの段階の材料の準備と調整を目標とした。以下詳細を記す。

#### 1. iPS 細胞から組織幹細胞の樹立

平成30年度の目標はiPS細胞から神経、皮膚、血液、心筋細胞樹立のための分化誘導試薬、使用条件の検討である。iPS細胞は当研究室で樹立済みであるためにそれを使用して各種組織細胞への分化条件を検討する。全ての細胞は試験管内（正確にはペトリ皿）で培養し、細胞の分化も試験管内で実施する。iPS細胞に分化誘導因子として組換えタンパク質であるBMP4、SCF等を加え、適当な時間培養することにより各種細胞へと分化させる条件を検討する。

#### 2. 突然変異実験系の確立

平成30年度の目標は突然変異計測実験のための試薬の調製、設備品の準備、行程の確認である。突然変異実験は1992年にSeidmanらによって報告された実験方法[1]を改良し実施する。実験の概要としてはまず指標となるDNAベクターに各種放射線を照射し、DNA損傷を生じさせる。その後、DNAベクターを各種組織細胞に遺伝子導入し、細胞の中でDNAベクターのDNA損傷を修復させる。この際、細胞によってDNA修復活性が異なることが予想され、いくつかの突然変異が生じる。そしてこのDNAベクターを細胞から抽出後、今度は大腸菌の中に遺伝子導入する。一晚培養することにより大腸菌はコロニー状に増殖するが突然変異を持っていないと青いコロニーになり、突然変異を持っていると白いコロニーになるように培地にX-Gal試薬を加えておく。青いコロニーと白いコロニーの比を算出することにより突然変異頻度を計測する。さらに白いコロニーを採取し、DNAシーケンサーで解析することによりどんな種類の突然変異が挿入されたかを検出する。

本実験で使用する放射線は紫外線、ガンマ線、中性子線を予定しており、このうちガンマ線、中性子線は研究代表者所属の東京工業大学科学技術創成研究院先導原子力研究所に設置されているため、それらの調整および確認を行う。紫外線照射装置は研究代表者の研究室で自作する。

平成30年度はこれらの工程を一通り実施し、それぞれの工程で必要な試薬の調整と確認を行う。

#### 3. 数理モデルを用いた実験結果の解析

前項の突然変異計測で得られた結果を解析するための手法の開発を実施する。得られた突然変異の頻度を自己組織化マップなどの機械学習法を用いて解析する予定である。

平成30年度の目標は設備品の調整から情報収集とする。

## 2.2.2 令和元年度の成果の目標および業務の実施方法

令和元年度は全体計画の2年目にあたるために平成30年度の準備段階から実際の実験に移行し、データの収集などを実施した。

以下詳細を記す。

### 1. iPS細胞から組織幹細胞の樹立と継続培養

令和元年度の目標はiPS細胞から神経、皮膚、血液、心筋細胞の樹立と実験で使用するために継続的な培養である。平成30年度までに確立した細胞分化の方法を用いて各種細胞を樹立維持する。

### 2. 突然変異実験系の確立

令和元年度の目標は平成30年度に確立した突然変異実験系を用いて実際に細胞を用いて計測することである。また、平成30年度に準備段階であった紫外線、放射線、中性子線を実際にDNAベクターに照射する。

### 3. 数理モデルを用いた実験結果の解析

前項の突然変異計測で得られた結果を解析するための手法の開発を実施する。得られた突然変異の頻度を自己組織化マップなどの機械学習法を用いて解析する。

## 2.2.3 令和2年度の成果の目標および業務の実施方法

令和2年度は全体計画の最終年にあたるために令和元年度の準備と実験状況の結果を継続し、全ての業務を遂行し研究計画をまとめる。

### 1. iPS細胞から組織幹細胞の樹立と継続培養

ヒト新生児皮膚線維芽細胞由来iPS細胞を用いて樹立した神経、皮膚細胞について、突然変異実験に使用できるように継続的に樹立培養を実施する。心筋、血液細胞については、平成30年度よりiPS細胞から分化誘導する実験系を確立させたので、令和2年度は突然変異実験に使用できるように継続的に樹立培養を実施する。

### 2. 突然変異実験系の確立

iPS細胞および樹立後の各種組織細胞を用いて突然変異測定実験を実施し、突然変異率を比較する。平成30年度より調整した設備条件の情報を用いて、実際にDNAベクターに放射線(γ線、中性子線、紫外線)を照射し、突然変異実験を実施し、突然変異率を比較する。突然変異実験で得られた大腸菌コロニーからプラスミドDNAを回収し、DNAの塩基配列を決定する。

### 3. 数理モデルを用いた実験結果の解析

平成30年度より整備した突然変異計測結果の数理モデル解析のための設備環境を用い、既知の論文のデータや演習用データを用いた条件を検討し、構築された数理モデルを用いて、実際のデータから放射線および組織特異的な突然変異率の違いを検証する。

### 3. 業務の実施内容および成果

#### 3.1 iPS 細胞から神経系、皮膚系、心筋細胞および血液細胞の作製【平成 30 年度～令和 2 年度】

##### 概要

iPS 細胞は京都大学の山中伸弥教授により開発された細胞で多能性幹細胞の一種である。多能性幹細胞とは原則全ての組織に分化することができる幹細胞のことで iPS 細胞の他、胎生幹細胞 (ES 細胞)、生殖幹細胞 (mGS 細胞) が存在する。ES 細胞はマウスおよびヒトの胚から採取することができる幹細胞で各種組織細胞への分化においてこれまでに多くの知見があり、iPS 細胞における研究にも ES 細胞の研究結果が大きく貢献している。また、mGS 細胞にも多能性が認められており、不妊治療などへの貢献が期待されている。iPS 細胞は様々な組織細胞から樹立することが報告されているが、一般的にヒトからは皮膚細胞や血液細胞が採取容易であるために用いられることが多い。また、当初は初期化のための遺伝子導入に対してウイルスベクターを用いた方法が採用されており、細胞のがん化のリスクが課題であったが、近年は mRNA を直接細胞に導入する方法が開発され、初期化のための遺伝子がゲノム DNA に挿入されることなく iPS 細胞を樹立することが可能となっている。我々の研究室においても mRNA を用いて iPS 細胞を樹立することに成功しており、本事業においても主にそれらの細胞を使用した。

個体の発生過程は受精から細胞の卵割を経て、外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉への分化過程を経る。実験室の試験管レベルで多能性幹細胞から組織細胞へ分化させる際はまずこれら三胚葉のいずれかに分化を促進させる必要がある。神経系、皮膚系の細胞は個体発生における三胚葉の分類において外胚葉由来の組織細胞である。神経系は特に神経外胚葉、皮膚系は表層外胚葉に分類される。試験管では適当な密度に播種した iPS 細胞に対して Noggin、BMP4 など分化誘導因子を加え、誘導していく必要がある。以下にそれぞれの細胞に分化するための概要と実施した研究の成果を述べる。

### 3.1.1 各組織細胞樹立のための条件検討【平成30年度】

ヒト新生児皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞を用いて樹立した神経、皮膚細胞について、突然変異実験に使用できるように継続的に樹立培養を実施した[2][3]。

### 3.1.2 神経細胞、皮膚細胞の継続培養【令和元年度～令和2年度】

本項目は平成30年度において既に iPS 細胞から神経、皮膚細胞への分化誘導の樹立条件は確立しており、突然変異計測実験に使用するために継続培養を実施した。また、神経幹細胞においては樹立後、直ちに StemSure<sup>®</sup> (富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて凍結保存することにより、実験に使用するごとに細胞融解により、使用する体制を整えた。一方で、皮膚細胞は凍結させると、融解した際に細胞が死滅するために、凍結保存させることはできず、実験毎に分化誘導させる必要がある。

#### 神経幹細胞樹立の実験方法

1. 神経分化には PSC Neural induction medium (神経幹細胞誘導培地) を使用する。iPS 細胞を 6 well プレートに播種する。培地は NutriStem<sup>™</sup> XF/FF 培地 (iPS 細胞維持培地、ROCK 阻害剤入り) で細胞を 1 well あたり  $1 \times 10^4$  cells になるように播種する。
2. 翌日培地を ROCK 阻害剤なしの NutriStem<sup>™</sup> XF/FF 培地に交換する。
3. 4～7 日間培養する。
4. 細胞が 15～25 %コンフルエントになったら分化開始とし、培地を 2.5 ml PSC Neural Induction medium に交換する。
5. 2 日後、2.5 ml PSC Neural Induction medium に培地交換する。
6. 2 日後、5 ml PSC Neural Induction medium に培地交換する。
7. 翌日、細胞を播き直す。この時点で NSCs P0 とする。細胞を TrypLE<sup>™</sup> Select で剥がした後、5 ml の PBS で懸濁し、遠心分離する。その後、PBS を除き、Neural expansion medium を 5 ml 加え懸濁する。最終的に 6 well プレートで 1 well あたり  $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$  cells になるように播種。培地には ROCK 阻害剤を最終濃度 5 mM になるように加える。
8. 翌日、ROCK 阻害剤なしの Neural expansion medium を 5 ml 加える。
9. P0 から 4～6 日後に P1 NSCs として凍結保存、あるいは実験に使用する。

#### 試薬詳細

- PSC Neural Induction medium (神経幹細胞誘導培地)  
(Neurobasal medium 490 ml + Neural induction supplement 10 ml)
- Neural expansion medium (神経幹細胞維持培地)  
(Neurobasal medium 49 ml + DMEM/F12 49 ml + Neural induction supplement 2 ml)
- ROCK 阻害剤 (5 mM)  
(Y27632 1 mg + DW 0.625 ml)

#### 皮膚細胞 (ケラチノサイト) 樹立の実験方法

1. ケラチノサイトへの分化にはまず iMatrx511 でコートした iPS 細胞を 10 cm dish に  $0.8 \times 10^4$  cells を播種し、ROCK 阻害剤を含んだ iPS 細胞用培地で培養する。
2. 24 時間後、細胞培地をレチノイン酸、BMP4 を含んだケラチノサイト誘導培地へ交換する。
3. 分化開始 4 日後、細胞培地を、EGF を含んだケラチノサイト誘導培地へ交換する。

4. 分化開始 14 日後、タイプ 1 コラーゲンとフィブロネクチンでコートした 10 cm dish に EGF と ROCK 阻害剤を含んだケラチノサイト誘導培地へ継代する。この時点のケラチノサイトを P1 とする。
5. 分化開始 24 日後、同様にタイプ 1 コラーゲンとフィブロネクチンでコートした 10 cm dish に EGF と ROCK 阻害剤を含んだケラチノサイト誘導培地へ継代する。この時点のケラチノサイトを P2 とする。
6. 分化開始 34 日後、タイプ 1 コラーゲンとフィブロネクチンでコートした 10 cm dish に EGF と ROCK 阻害剤を含んだケラチノサイト誘導培地へ継代する。この時点のケラチノサイトを P3 とする。

#### 試薬詳細

- Defined keratinocyte serum free medium (皮膚ケラチノサイト誘導培地)
- レチノイン酸
- BMP4 (分化促進組換えタンパク質)
- EGF (分化促進組換えタンパク質)
- ROCK 阻害剤 (5 mM) (Y27632 1 mg + DW 0.625 ml)
- タイプ 1 コラーゲン (細胞接着用)
- フィブロネクチン (細胞接着用)

### 3.1.3 心筋細胞、血液細胞の樹立検討および継続培養【令和元年度～令和2年度】

平成30年度に実施したiPS細胞を血液、心筋細胞へ分化誘導するための条件検討に加え、細胞樹立後、突然変異実験に使用できるように継続培養を実施した。また、分化した細胞の分化レベルを免疫染色法およびウエスタンブロッティング法で評価を実施した。

下記に記した、心筋細胞分化法を用いることにより、心筋細胞を樹立後は、1～2ヶ月維持培養することが可能であった。

#### 心筋細胞樹立の実験方法

1. 心筋分化にはPSC Cardiomyocyte differentiation kitを使用する。iPS細胞をibidiスライドグラス、24 well、6 wellプレートに播種する。培地はNutriStem™ XF/FF培地（ROCK阻害剤入り）で細胞を1 wellあたり $1 \times 10^4$  cells、 $1 \times 10^3$  cellsになるように播種する。キットのプロトコルでは1つのwellあたり35～60%コンフュエントになってから分化を開始することを推奨している。
2. 翌日培地をROCK阻害剤なしのNutriStem™培地に交換する。
3. 4～7日間培養する。
4. 細胞が35～60%コンフルエントになったら培地をCardiomyocyte differentiation medium Aに交換する。
5. 2日後、培地をCardiomyocyte differentiation medium Bに交換する。
6. 2日後から毎日、培地をCardiomyocyte maintenance mediumに交換する。
7. 分化開始後10日ごろから心筋細胞があらわれてくる。
8. 免疫染色で確認する。マーカー抗体はNKX2-5抗体（初期心筋中胚葉）とTNNT2/cTNT抗体（心筋細胞）を使用する。

#### 試薬詳細

- ・PSC Cardiomyocyte differentiation kit (Thermo Fisher Scientific, GIBCO)  
（心筋細胞分化培地）
- ・Human Cardiomyocyte Immunocytochemistry Kit (#A25973)  
（神経細胞確認用マーカー抗体キット）

#### 血液細胞樹立の実験方法

1. iPS細胞をibidiスライドグラス、24 well、6 wellプレートに播種する。培地はNutriStem™ XF/FF培地（ROCK阻害剤入り）で細胞を1 wellあたり $1 \times 10^3$  cells、 $1 \times 10^2$  cells、 $0.5 \times 10^2$  cellsになるように播種する。参考文献[4]では1つのwellあたりコロニーが5個以下になるようにとある。また、コロニーのサイズが500 μmになってから分化実験を開始と記載されている。
2. 翌日培地をROCK阻害剤なしのNutriStem™培地に交換する。
3. 4～7日間培養する。
4. コロニーサイズが500 μmになったら培地をStemline II Serum free medium supplemented with Insulin transferrin Selenium-X (ITS-X)に交換する。20 ng/ml BMP4を加える。それぞれ100 μg/ml stockを1 ml培地あたり0.2 μl、10 μg/ml stockを1 ml培地あたり2 μlとする。（中胚葉分化ステップ）

5. 4日後、培地を Stemline II + ITS-X に交換し、40 ng/ml VEGF165 と 50 ng/ml SCF を加える。それぞれ 10 µg/ml stock を 1 ml 培地あたり 4 µl と 5 µl とする。(血液細胞誘導ステップ)
6. 2日後、培地を Stemline II + ITS-X に交換し、血液分化カクテル (50 ng/ml SCF、10 ng/ml TPO、50 ng/ml IL3) を用途に応じて加える。(血液分化誘導ステップ)
7. 2日後頃には血液前駆細胞があらわれてくる。

試薬詳細

• Stemline II Serum free medium (#S0192 Sigma)	(幹細胞培地)
• ITS-X (#51500-056 Invitrogen)	(幹細胞用補助剤)
• BMP4 (#314-BP-010 R & D)	(分化促進組換えタンパク質)
• VEGF165 (#293-VE-050 R & D)	(分化促進組換えタンパク質)
• SCF (#255-SC-050 R & D)	(分化促進組換えタンパク質)
• TPO (#288-TPN-025 R & D)	(分化促進組換えタンパク質)
• IL3 (#203-IL-050 R & D)	(分化促進組換えタンパク質)
• FLT-3 ligand (#308-FK-025 R & D)	(分化促進組換えタンパク質)
• EPO (#329871 EMD)	(分化促進組換えタンパク質)



### 3.2 各種細胞における各種放射線照射後の突然変異率測定【平成30年度～令和2年度】

iPS細胞、樹立後の各種組織細胞を用いて突然変異実験における条件検討を実施し、突然変異測定実験を開始した。

突然変異実験の条件検討の方法は令和元年度の内容を確認して実施した。また、突然変異実験の概要および方法も令和元年度の報告書に記載した通りであるが、簡単に手順を再記述する。

#### 3.2.1 実験の条件と試薬の準備【平成30年度】

哺乳類細胞において突然変異を計測する実験系を確立するための条件検討を実施した。実験系に必要な備品（大腸菌へ遺伝子導入するエレクトロポレーター等）、試薬の準備をした。最初は実験操作が容易なヒト大腸がん細胞 HCT116 を用いて、条件検討を実施した。

#### 3.2.2 放射線照射のための環境整備【平成30年度】

紫外線照射、ガンマ線照射、中性子線照射のための環境の整備を実施した。紫外線照射のために殺菌灯ランプ、キャビネット等から自作により照射装置を作成した。ガンマ線照射は東京工業大学付属のコバルト 60 によるガンマ線照射を実施する。また、中性子線は東京工業大学片渕研究室所有のペレトロン照射装置を使用する。

#### 3.2.3 iPS細胞および各種組織細胞を用いた突然変異測定の条件検討（再委託先：量研機構） 【平成30年度～令和元年度】

突然変異実験における概要

放射線影響として突然変異を測定する当該項目における実施項目は以下である。

pSP189 DNA ベクターの調整

MBM7070 コンピテントセルの調整

大腸菌用遺伝子導入装置（エレクトロポレーター）の準備

哺乳細胞用遺伝子導入試薬の準備

詳細を以下に記す。

#### pSP189 DNA ベクターの調整

1. pSP189 DNA ベクターはアンピシリン抵抗遺伝子を保持しているために pSP189 ベクターが導入された大腸菌はアンピシリン含有培地で培養した際、増殖することができる。そのため、コンピテントセル大腸菌 DH5 $\alpha$  に 42 °C、30 秒の条件でヒートショックによるトランスフォーメーションで pSP189 DNA ベクター 1  $\mu$ g を導入後、アンピシリン含有培地で一晩 37 °C の条件で培養した。
2. 翌日、コロニー状に増殖した大腸菌からコロニーを 1 つピックアップし、3 ml アンピシリン含有 LB 培地が入った 15 ml チューブへ移し、一晩 37 °C の条件で培養した。
3. 翌日、大腸菌が十分増殖していることを確認し、0.5 ml の大腸菌液を 200 ml LB 培地が入ったアンピシリン含有 500 ml フラスコへ移し、一晩 37 °C の条件で培養した。
4. 大腸菌液からプラスミド DNA 抽出キットを用いて pSP189DNA ベクターを調整した。



## MBM7070 コンピテントセルの調整

1. 大腸菌 MBM7070 を 3 ml LB 培地で一晚 37 °C の条件で培養する。
2. 0.5 ml の大腸菌液を 50 ml LB 培地に加え一晚 37 °C の条件で培養する。
3. 10 ml の大腸菌液を 990 ml LB 培地が入った 2 L フラスコに移す。LB 培地はあらかじめ 37 °C で前日晩から温めておいたものを使用する。
4. OD600 を測定し、0.5~0.6 になるまで約 2.5 時間培養する。
5. OD600 が目的値に達したらあらかじめ冷蔵庫で冷やしたチューブで 250 ml ずつ 4 本で遠心する (5000 rpm (7000×g)、25 min、4 °C)。
6. 上澄みを捨てて、沈殿にそれぞれ 10 ml の 10 % glycerol を加え再懸濁後、更に 10 % glycerol を 240 ml 加え氷上でよく懸濁する。
7. 遠心 (5000 rpm、30 min、4 °C) し、上澄みを捨てる。10 ml の 10 % glycerol に再懸濁後、手順 6 と同様に 250 ml までメスアップし、遠心 (5000 rpm、30 min、4 °C) を行う。
8. 上澄みを捨て、沈殿をわずかにチューブに残った液で懸濁し、全サンプルを 1 本のチューブに集める。
9. あらかじめ冷やしておいた 1.5 ml チューブに 110 µl ずつ分注し、-80 °C で保存する。

## 大腸菌用遺伝子導入装置 (エレクトロポレーター) の準備

大腸菌用の遺伝子導入エレクトロポレーターとして gene pulser Xcell エレクトロポレーションシステム (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を購入した。また、消耗品として Gene Pulser エレクトロポレーションキュベットを準備した。エレクトロポレーターは装置の中にすでに微生物、真菌、哺乳類用のエレクトロポレーションの条件がプリセットされており、本事業では主に微生物用の 1.8 kV、250 Ω の条件を使用した。また、エレクトロポレーションキュベットはサンプルの挿入幅が 1 mm のキュベットと 2 mm のキュベットがあるが、主に 1 mm のキュベットを使用した。

## 哺乳細胞用遺伝子導入試薬の準備

哺乳細胞用遺伝子導入試薬として Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific 株式会社) を準備した。実験の条件は試薬のプロトコルに従った。

## 突然変異計測実験の手順 (図 5)

1. 30 µg/ml の pSP189 ベクターを 1 mL の TE に溶解したものを氷冷した 6 cm dish に広げる。
2. pSP189 ベクター溶液に UVC (100~500 J/m<sup>2</sup>) を 200 J/m<sup>2</sup>、コバルト 60 由来ガンマ線または中性子線を照射する。
3. エッペンチューブに 330 µl (10 µg 分) ずつ回収し、33 µl の 3 M AcONa を加える。その後、950 µl の 100 % EtOH を加え、-80 °C で 30 分間反応させエタノール沈殿を行う。
4. 遠心後、上澄みを捨てて沈殿を 70 % EtOH で洗浄し再度遠心を行う。上澄みを捨てて沈殿を乾燥後 20 µl の TE に溶解し、最終濃度 0.5 µg/ µl とする。
5. トランスフェクションを行うため、3 µg (~5 µg) の pSP189 を 250 µl の Opti-MEM によく懸濁する。6 µl の Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 を 250 µl の Opti-MEM によく懸濁する。その後、両者を混ぜ合わせ 20 分静置させる。あらかじめ 6 cm dish に播種した細胞に pSP189 懸濁液を加え 37 °C で培養する。

6. 36～48 時間後、細胞を trypsin で剥がして PBS で洗浄しエッペンチューブに回収する。プラスミド回収 mini column (kit) を用いてプラスミドを回収する。
7. 2  $\mu$ l を制限酵素 DpnI で 37  $^{\circ}$ C、1 時間で処理する。
8. 切断した環状プラスミドに 70 % EtOH を加えて洗浄後、沈殿物を乾燥させ 1  $\mu$ l $\times$ 0.5 TE に溶解する。
9. エレクトロポレーションを行うため、1  $\mu$ l $\times$ 0.5 TE を 20  $\mu$ l のコンピテントセル (MBM7070) に懸濁する。懸濁液を、あらかじめ冷やした 1 mm 幅のキュベットに入れ、2.5 kV、25  $\mu$ F、200  $\Omega$  の条件で大腸菌に導入を行う。エレクトロポレーション後、1 ml の SOC を加え、よく懸濁しチューブに回収し、37  $^{\circ}$ C で 15～30 分振盪する。
10. 100  $\mu$ l の懸濁液を LB plate (Amp、X-Gal、IPTG) へ播種後、37  $^{\circ}$ C で一晩培養する。
11. 得られたコロニーを青白選択し、突然変異率を測定する。

#### 突然変異率の算出法

目的の形質変異を選択するため、青白選択法を用いる [4]。

突然変異を持つコロニーが白、持たないコロニーが青であるが、その原理を説明する。

使用した大腸菌 MBM7070 はアンバー変異した  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ遺伝子を持っているため、そのままでは寒天培地に基質として加えてある青色色素 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) を分解して青色のコロニーを作らない。しかし、pSP189 ベクターにはアンバーサプレッサー tRNA 遺伝子である *SupF* 遺伝子が組み込んであり、これが作用することにより、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ遺伝子が正常に発現し、X-gal を分解して青色のコロニーを作る。一方で、今回の突然変異実験のために放射線を照射し、*SupF* 遺伝子領域 (176 塩基) に突然変異が入ると *SupF* 遺伝子が作用せず、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ遺伝子が正常に発現しないため X-gal も分解されず、大腸菌そのものの色である白色コロニーを作るのである。青色発色の有無で容易に変異体の選択が可能となる。

突然変異率 = 白コロニーの数 / 全コロニー数 (青コロニーの数 + 白コロニー数) で求める。少なくとも 3 回以上繰り返し実験した結果の平均をとる。

仮に 3 枚の LB プレートにそれぞれ青コロニーが 750、850、790 個 (コロニーの数が多い場合は dish を 4 分割、あるいは 8 分割してそのうち一区切りをカウントしてから割った分だけかけることによって求める)、白コロニーが 10、6、2 個だった場合、青コロニーの平均は 797 (四捨五入)、白コロニーの平均は 6 となる。

$6/797=0.00752823$  であるので突然変異率は 1 万分の 75 となり、75/104 として表す。

#### 本項目で最適化した条件

1. 各組織細胞に遺伝子導入する DNA 量 : 3  $\mu$ g
2. 遺伝子導入後の培養時間 : 48 時間
3. 制限酵素 Dpn1 で処理後、行うエタノール沈殿の際に室温で乾燥させる時間 : 15 分

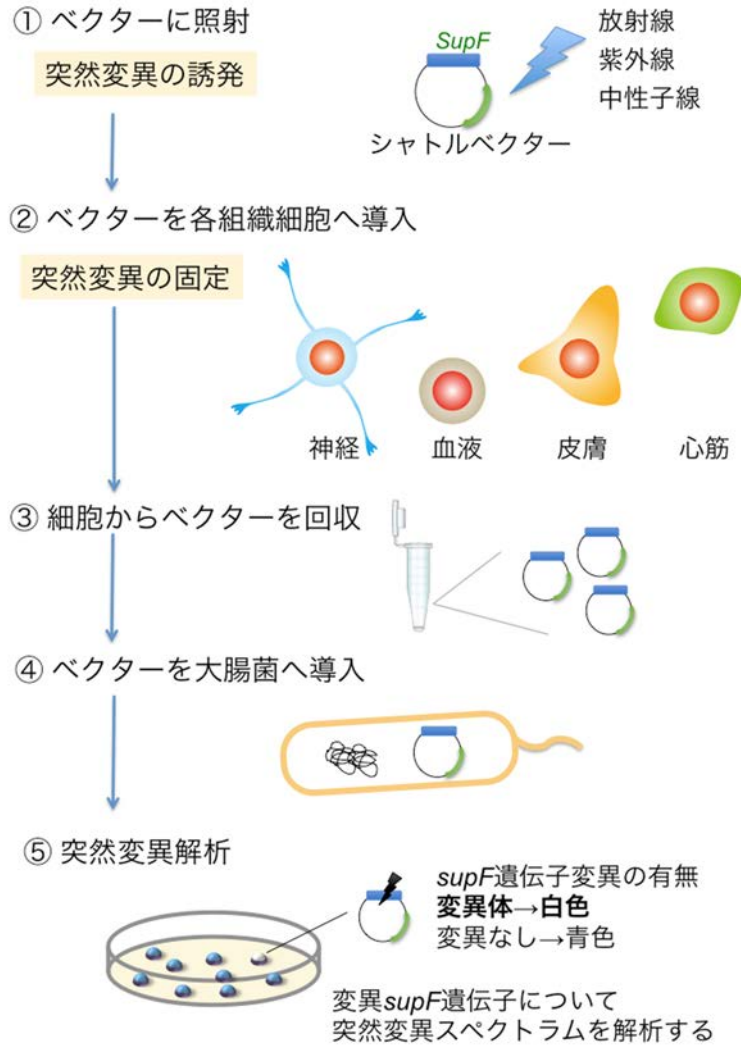


図 5 突然変異計測実験法

DNA シークエンス解析 (1)

1. 白い大腸菌コロニーを滅菌済みの爪楊枝、あるいはチップの先でとり、15 ml チューブに入れた 3 ml LB 培地に移す。
2. 37 °C で一晩振盪培養する。
3. 大腸菌培養 LB 培地 1 ml を 1.5 ml チューブに移し、ミニプレップキットでプラスミド DNA を精製し、最終的に 50 µl の DNA 溶液とする。
4. DNA 溶液 20 µl にシークエンス用プライマー 1 µl (10 µM) を加え、DNA シークエンス解析を実施する。

使用したシークエンス用プライマーの塩基配列 aaggcaaaatgccgcaaaaa

5. 送られてきた DNA 配列を DNA 配列解析ソフト SnapGene および ApE を用いて突然変異の箇所を解析する。

DNA シークエンス解析 (2)

1. 白い大腸菌コロニーを滅菌済みの爪楊枝、あるいはチップの先でとり、15 ml チューブに入れた 3 ml LB 培地に移す。
2. 37 °C で一晩振盪培養する。
3. 大腸菌培養 LB 培地 1 ml を 1.5 ml チューブに移し、ミニプレップキットでプラスミド DNA を精製し、最終的に 50 µl の DNA 溶液とする。
4. 反応カクテルの準備 (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)

	(µL)
DW	4.5
5x Sequencing Buffer	1.5
BigDye Terminator v3.1	1
3.2 µm Primer	1
Template	2
total	10

使用したシークエンス用プライマーの塩基配列 aaggcaaaatgccgcaaaaa

5. シークエンス反応：反応は Optical96well Reaction プレートを使用

96°C	2 min	} 25 cycle
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	
60°C	2 min	
4°C	∞	

Veriti 96well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて、上記に示す反応条件でサイクルシークエンス反応を行う。

6. エタノール沈殿/シーケンス反応産物の精製

PCR反応液 10  $\mu$ L

+ 125 mM EDTA 2.5  $\mu$ lを加えてスピンドウン

+ 100% Et-OH 30  $\mu$ lを加える

パラフィルムでシールする

Vortex

プレートを遮光して、室温に15 min静置

3500 rpmで30 min遠心する

Capを外してキムタオルの上に倒置し、510 rpmで1 min遠心する

+ 70% Et-OHを75  $\mu$ l加える

3500 rpmで10 min遠心する

キムタオルの上に倒置し、500 rpmで1 min遠心する

↓  
Dry up (10 min)

7. Hi-Di Formamide 15  $\mu$ l に溶かす。
8. ヒートショック (95  $^{\circ}$ C 2 min) 後、氷上で5 min 急冷する。
9. シーケンサー (3500xL DX Genetic Analyzer: Applied Biosystems) にセットし、塩基配列を解析する。
10. View Sequencing Results ソフトを用いて、シーケンス波形の確認を行い、DNA 配列解析ソフト SnapGene および ApE を用いてデータを解析する。

3.2.4 各種放射線照射による照射実験の条件検討【令和元年度】

平成30年度の報告書に記載の通り、放射線照射設備を用いてDNAベクターに放射線を照射した。

各種照射した放射線の条件は以下の通りである。

非照射 (Non treated: NT)

紫外線 (Ultraviolet: UV) 200 J/m<sup>2</sup>、500 J/m<sup>2</sup>、1000 J/m<sup>2</sup>

ガンマ線 (Ionizing radiation: IR) 10 Gy、50 Gy、100 Gy

中性子線 (Neutron) 1 Gy (推定値)

### 紫外線照射

紫外線照射は市販の殺菌灯を改良し、紫外線照射装置を自作した（図 6）。キャビネット内に殺菌灯（UV-C）を 3 本設置し、外部に配線をつないで外部からスイッチのオンオフを操作できる仕様にした。使用する際は、殺菌灯のスイッチをオンにした後、点灯が安定するまで 5 分ほど待ってから、紫外線検出器で紫外線の線量を測定後、任意の時間、サンプルを暗幕内に設置して照射する。



図 6 紫外線照射装置

### ガンマ線照射

$\gamma$  線照射実験は東京工業大学科学技術創成研究院先導原子力研究所付属のコバルト 60 照射施設において実施した（図 7）。



図 7 コバルト 60 照射室



### 中性子線照射

中性子線は東京工業大学科学技術創成研究院先導原子力研究所内の片渕竜也准教授研究室所有のペレトロン加速器由来の中性子線を使用した（図8）。



図8 ペレトロンによる中性子線照射

### 3.2.5 iPS 細胞および各種組織細胞を用いた突然変異測定（再委託先：量研機構）【令和 2 年度】

#### 突然変異計測実験の結果

3.2.3 項で示した突然変異計測の実験法（図 5）によりいくつかの細胞を用いて、突然変異頻度の計測を実施した。結果を表 2～表 11、図 9～図 13 に示す。

### 3.2.6 各種放射線照射による照射実験【令和 2 年度】

各種照射した放射線の条件は以下の通りである。

非照射 (Non treated: NT)

紫外線 (Ultraviolet: UV) 200 J/m<sup>2</sup>、500 J/m<sup>2</sup>、1000 J/m<sup>2</sup>

ガンマ線 (Ionizing radiation: IR) 10 Gy、50 Gy、100 Gy

中性子線 (Neutron) 1 Gy (推定値)

#### iPS 細胞における突然変異頻度の計測

iPS 細胞は上述した NB1RGB 由来の C2 株と一般的に細胞分化実験に使用されている 201B7 株（ヒト皮膚線維芽細胞由来：理化学研究所より分与）を使用した。C2 はフィーダーフリー条件で樹立し、201B7 は当初オンフィーダーで樹立していたがフィーダーフリーの条件で培養できる様に条件を至適化し、本研究に使用した[2]。線量をいくつか変化させた紫外線照射実験のみ 201B7 をポジティブコントロールとして使用した。iPS 細胞の特徴として細胞増殖の活性が高く、遺伝子導入効率も比較的高い。しかし、アポトーシス活性が高く、放射線などの外部刺激や細胞毒性がある試薬には高い感受性を示す。また、DNA 修復関連遺伝子の発現量が高いことから、DNA 修復活性は高いと考えられる。線量依存的に紫外線を照射した結果を表 2、表 3 および図 9 に示す。C2 および 201B7 ともに近似した傾向を示し、線量依存的に突然変異頻度が増加した。NB1RGB と比較した場合、全体的に iPS 細胞の方が同じ線量で突然変異頻度が低い傾向であった。この結果は当初の予想通り、iPS 細胞ではゲノム安定性を維持するために正確な DNA 修復活性が高いことが理由と考えられる。一方 C2 のみガンマ線を線量依存的に計測したが、線量の依存性は観察されなかった（表 4、図 10）。中性子線に関してもガンマ線同様突然変異は非照射と同程度の低い頻度であった（表 5、図 11）。また、中性子線に関しては一点のみしか突然変異を計測していないが、線量依存性はガンマ線と同様本計測法では観察されない可能性が考えられる。その理由としてガンマ線および中性子線による影響としては、紫外線と比較して DNA に二本鎖切断を生成する頻度が高いが、用いた実験系が DNA ベクターに放射線を照射するため、生じた二本鎖切断が DNA ベクターを不安定にし、細胞内に導入された際に DNA 修復系により修復されないか、異物と認識され細胞内から切断、排除される可能性が考えられる。そのため結果として突然変異として検出されない可能性が考えられる。



表 2 iPS 細胞 C2 における紫外線照射時の突然変異頻度

iPSCs C2	コロニー総数	突然変異コロニー数	突然変異頻度
未処理	17452	5	$2.87 \times 10^{-4}$
200 J/m <sup>2</sup>	15312	16	$1.04 \times 10^{-3}$
500 J/m <sup>2</sup>	7704	34	$4.41 \times 10^{-3}$
1000 J/m <sup>2</sup>	3063	26	$8.49 \times 10^{-3}$
未処理	23904	8	$3.35 \times 10^{-4}$
200 J/m <sup>2</sup>	15196	33	$2.17 \times 10^{-3}$
500 J/m <sup>2</sup>	3096	40	$1.29 \times 10^{-2}$
1000 J/m <sup>2</sup>	1665	21	$1.26 \times 10^{-2}$
未処理	12980	4	$3.08 \times 10^{-4}$
200 J/m <sup>2</sup>	4649	24	$5.16 \times 10^{-3}$
500 J/m <sup>2</sup>	1646	8	$4.86 \times 10^{-3}$
1000 J/m <sup>2</sup>	413	6	$1.45 \times 10^{-2}$

表 3 iPS 細胞 201B7 における紫外線照射時の突然変異頻度

iPSCs 201B7	コロニー総数	突然変異コロニー数	突然変異頻度
未処理	7054	19	$2.69 \times 10^{-3}$
200 J/m <sup>2</sup>	6120	21	$3.43 \times 10^{-3}$
500 J/m <sup>2</sup>	4061	36	$8.86 \times 10^{-3}$
1000 J/m <sup>2</sup>	505	8	$1.58 \times 10^{-2}$
未処理	7616	2	$2.62 \times 10^{-4}$
200 J/m <sup>2</sup>	3924	14	$3.56 \times 10^{-3}$
500 J/m <sup>2</sup>	2511	15	$5.97 \times 10^{-3}$
1000 J/m <sup>2</sup>	659	10	$1.51 \times 10^{-2}$
未処理	15972	2	$1.25 \times 10^{-4}$
200 J/m <sup>2</sup>	8604	15	$1.74 \times 10^{-3}$
500 J/m <sup>2</sup>	4835	21	$4.34 \times 10^{-3}$
1000 J/m <sup>2</sup>	652	2	$3.06 \times 10^{-3}$

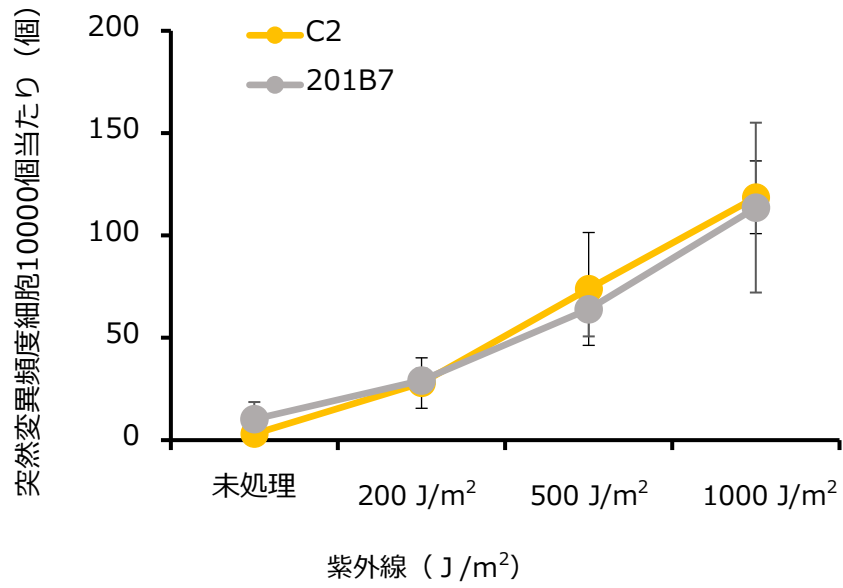


図 9 iPS 細胞 C2 および 201B7 における紫外線照射後の突然変異頻度

表 4 iPS 細胞 C2 におけるガンマ線照射時の突然変異頻度

iPSCs C2	コロニー総数	突然変異コロニー数	突然変異頻度
未処理	13704	5	$3.65 \times 10^{-4}$
IR10 Gy	23976	12	$3.64 \times 10^{-4}$
IR50 Gy	6888	11	$1.60 \times 10^{-3}$
IR100 Gy	15904	0	0
未処理	1062	2	$1.88 \times 10^{-3}$
IR10 Gy	31472	7	$2.22 \times 10^{-4}$
IR50 Gy	2384	12	$5.03 \times 10^{-3}$
IR100 Gy	23832	4	$1.68 \times 10^{-4}$
未処理	12072	8	$6.53 \times 10^{-4}$
IR10 Gy	18384	12	$2.13 \times 10^{-4}$
IR50 Gy	18736	4	$6.66 \times 10^{-4}$
IR100 Gy	-	-	-

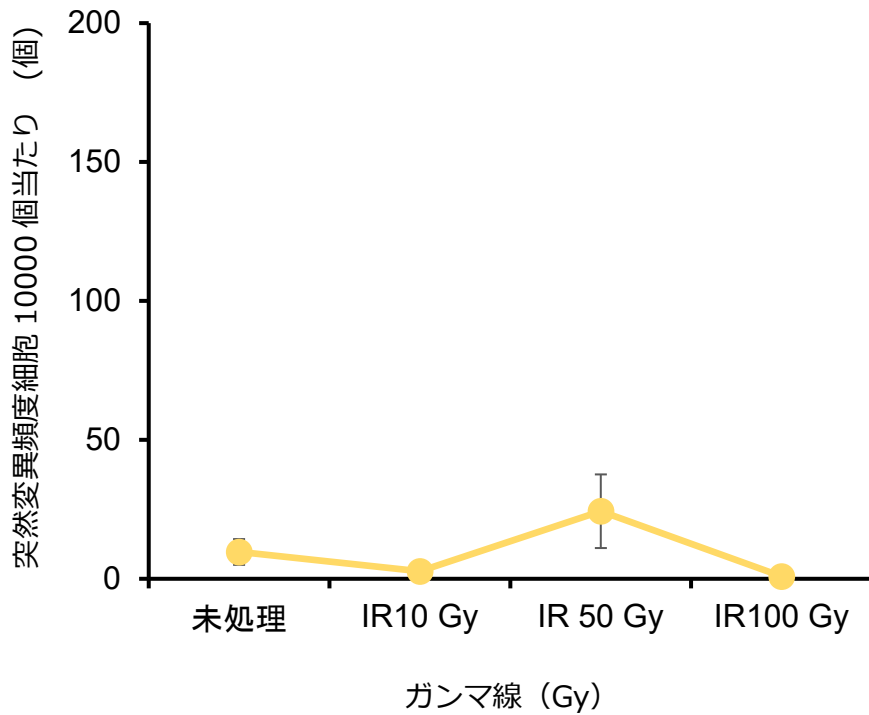


図 10 iPS 細胞 C2 におけるガンマ線照射時の突然変異頻度

表 5 iPS 細胞 C2 における各種放射線照射時の突然変異頻度

細胞種		コロニー総数	突然変異数	突然変異率
iPS 細胞 C2	未処理	17452	5	$2.87 \times 10^{-4}$
		13704	5	$3.65 \times 10^{-4}$
		23904	8	$3.35 \times 10^{-4}$
	紫外線 200 J/m <sup>2</sup>	15312	16	$1.04 \times 10^{-3}$
		15196	33	$2.17 \times 10^{-3}$
		4649	24	$5.16 \times 10^{-3}$
	放射線 10 Gy	18736	4	$2.13 \times 10^{-4}$
		31472	7	$2.22 \times 10^{-4}$
		23976	12	$3.64 \times 10^{-4}$
	中性子線	4916	2	$4.07 \times 10^{-4}$
		4208	1	$2.38 \times 10^{-4}$
		6976	3	$4.30 \times 10^{-4}$

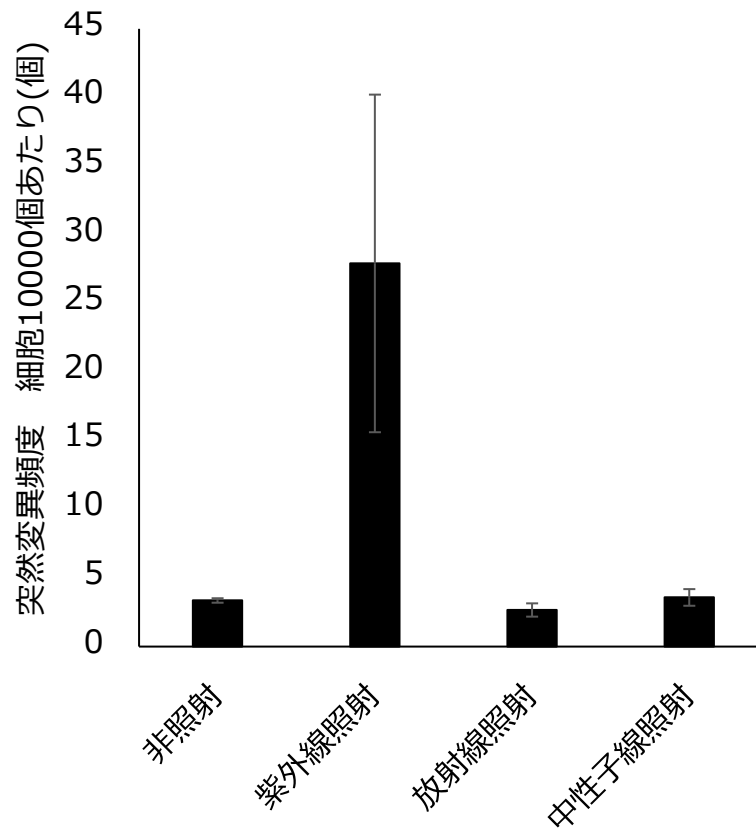


図 11 iPS 細胞における各種放射線照射後の突然変異頻度の比較

初代継代線維芽細胞 NB1RGB における突然変異頻度の計測

NB1RGB は生後 3 日のヒト新生児皮膚から樹立した線維芽細胞であり、継代 17 回で凍結保存ストックを作製し、実験の都度融解し使用した。比較的細胞増殖がよく、3 分の 1 から 5 分の 1 の希釈濃度で播種した場合、3 日から 5 日に 1 度の頻度で継代を実施することが可能である。NB1RGB は事項で述べる iPS 細胞 C2 の元になった細胞であり、iPS 細胞と結果を比較するコントロール細胞として使用した。NB1RGB は初代継代線維芽細胞であるため遺伝子導入効率が良いとはいえず、本研究で用いたリポフェクション法の場合、10~30%の遺伝子導入効率であったと思われる。細胞に pSP189 ベクターを遺伝子導入後、修復および突然変異の定着を経て回収できる DNA ベクターの収率は低く、さらにそれを大腸菌に遺伝子導入し、コロニーを形成させた場合、最終的に得られるコロニーの総数は癌細胞である HCT116 や多能性幹細胞である iPS 細胞と比較して少なかった。しかし、あくまでも突然変異頻度はコロニー全体の総数に対する突然変異コロニーの除数であるため、計測は可能であった。紫外線照射に対する結果は表 6、図 12 の通りで、照射線量依存的に突然変異頻度が増加していた。これらの結果から放射線照射により生じた突然変異の生成頻度を計測する実験系の確率は達成できた。次に種々の放射線による突然変異の測定であるが、コバルト 60 由来のガンマ線を 10 Gy 照射時とペレトロン加速器を用いて中性子線を照射した時の結果を表 7 に示す。ガンマ線、中性子線ともに突然変異の頻度は紫外線より低かった。ガンマ線中性子線に関しては考察の項で後述する。

表 6 ヒト皮膚線維芽細胞 NB1RGB における紫外線照射時の突然変異頻度

NB1RGB	コロニー総数	突然変異コロニー数	突然変異頻度
未処理	844	0	-
200 J/m <sup>2</sup>	1228	3	2.44 × 10 <sup>-3</sup>
500 J/m <sup>2</sup>	496	0	-
1000 J/m <sup>2</sup>	48	1	2.08 × 10 <sup>-2</sup>
未処理	468	2	4.12 × 10 <sup>-3</sup>
200 J/m <sup>2</sup>	1020	4	3.92 × 10 <sup>-3</sup>
500 J/m <sup>2</sup>	480	4	8.33 × 10 <sup>-3</sup>
1000 J/m <sup>2</sup>	42	1	2.38 × 10 <sup>-2</sup>
未処理	394	2	1.27 × 10 <sup>-3</sup>
200 J/m <sup>2</sup>	-	-	-
500 J/m <sup>2</sup>	291	5	1.72 × 10 <sup>-2</sup>
1000 J/m <sup>2</sup>	61	1	1.64 × 10 <sup>-2</sup>

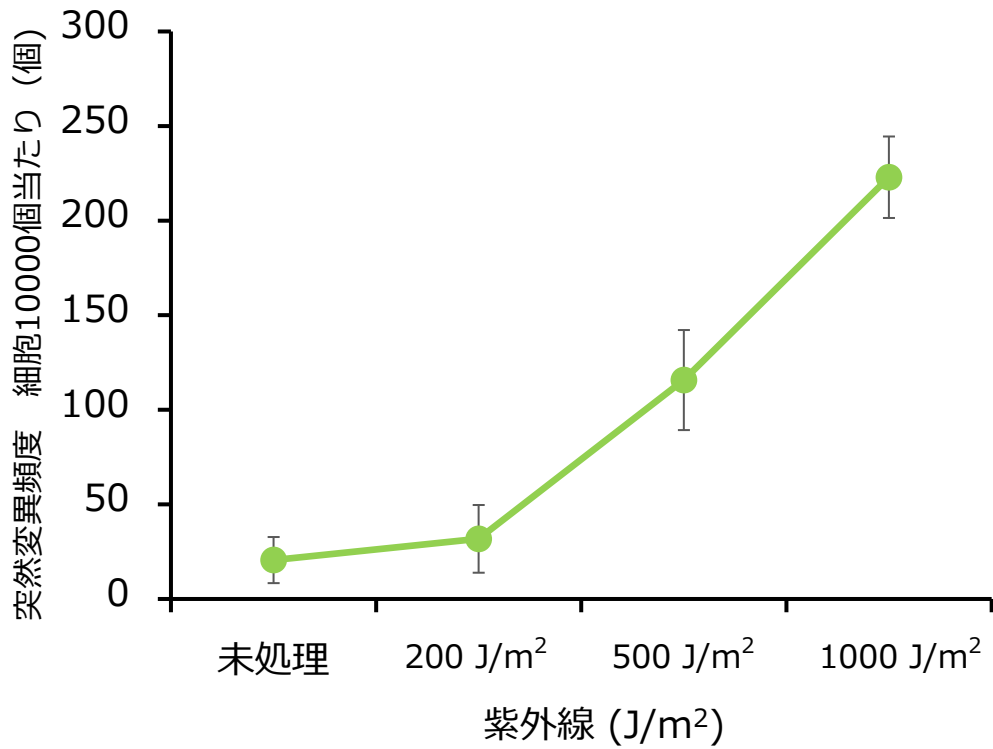


図 12 ヒト皮膚線維芽細胞 NB1RGB における紫外線照射時の突然変異頻度

表 7 ヒト皮膚線維芽細胞 NB1RGB における各種放射線照射時の突然変異頻度

細胞種		コロニー総数	突然変異数	突然変異率
NB1RGB	未処理	394	2	$1.26 \times 10^{-3}$
		705	1	$1.41 \times 10^{-3}$
		64	1	$1.56 \times 10^{-3}$
	紫外線 200 J/m <sup>2</sup>	1228	3	$2.44 \times 10^{-3}$
		1020	4	$3.92 \times 10^{-3}$
		4	0	-
	放射線 10 Gy	618	1	$1.61 \times 10^{-3}$
		298	0	-
		12	0	-
	中性子線	497	1	$2.01 \times 10^{-3}$
		626	3	$4.79 \times 10^{-3}$
		510	4	$7.84 \times 10^{-3}$

神経幹細胞における突然変異頻度の計測

神経幹細胞は iPS 細胞 C2 株より分化誘導した細胞から凍結ストックを作製し、実験の都度融解し使用した。神経幹細胞の細胞増殖活性は高く遺伝子導入効率も比較的高かった。異なる線量での紫外線照射に対する突然変異頻度を測定した結果、線量依存的に突然変異頻度が増加した(表 8、表 9、図 13)。また、突然変異頻度は iPS 細胞と似た挙動を示し、NB1RGB と比較して低い頻度であった。以前に実施した次世代シーケンサーを使用した網羅的な遺伝子発現解析の結果、神経幹細胞では DNA 修復とアポトーシス、細胞周期などの遺伝子群が高い発現量を示すことを見出している。これらから詳細なメカニズムに差はあるかもしれないが iPS 細胞と神経幹細胞では突然変異を抑制する傾向が高いことが示唆される。また、ガンマ線と中性子線照射後の突然変異頻度はやはり他の細胞種と同様、非照射と変わらないほど低い頻度であった。

表 8 神経幹細胞における紫外線照射時の突然変異頻度

NSC	コロニー総数	突然変異コロニー数	突然変異頻度
未処理	33808	10	$2.96 \times 10^{-4}$
200 J/m <sup>2</sup>	1014	4	$3.94 \times 10^{-3}$
500 J/m <sup>2</sup>	3386	31	$9.16 \times 10^{-3}$
1000 J/m <sup>2</sup>	1011	16	$1.58 \times 10^{-2}$
未処理	49936	2	$4.01 \times 10^{-5}$
200 J/m <sup>2</sup>	28114	7	$2.49 \times 10^{-4}$
500 J/m <sup>2</sup>	5630	56	$9.95 \times 10^{-3}$
1000 J/m <sup>2</sup>	9824	84	$8.55 \times 10^{-3}$
未処理	40056	2	$4.99 \times 10^{-5}$
200 J/m <sup>2</sup>	31088	21	$6.76 \times 10^{-4}$
500 J/m <sup>2</sup>	18512	51	$2.75 \times 10^{-3}$
1000 J/m <sup>2</sup>	9864	107	$1.08 \times 10^{-2}$

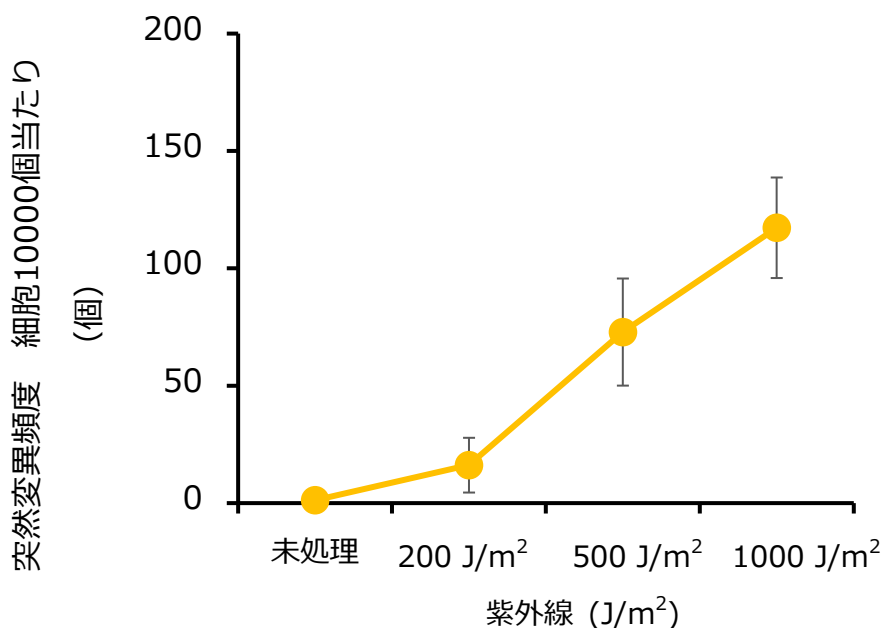


図 13 神経幹細胞における紫外線照射時の突然変異頻度

表 9 神経幹細胞における各種放射線照射時の突然変異頻度

細胞種		コロニー総数	突然変異数	突然変異率
NSC	未処理	13184	1	$7.58 \times 10^{-5}$
		1799	2	$1.11 \times 10^{-3}$
		832	1	$1.20 \times 10^{-3}$
	紫外線 200 J/m <sup>2</sup>	1014	4	$3.94 \times 10^{-3}$
		28114	7	$2.49 \times 10^{-4}$
		31088	21	$6.76 \times 10^{-4}$
	放射線 10 Gy	12272	1	$8.15 \times 10^{-5}$
		4600	6	$1.30 \times 10^{-3}$
		2649	3	$1.13 \times 10^{-3}$
	中性子線	7592	4	$5.27 \times 10^{-4}$
		2742	4	$1.46 \times 10^{-3}$
		3668	2	$5.45 \times 10^{-4}$



皮膚ケラチノサイトにおける突然変異頻度の計測

皮膚ケラチノサイトは iPS 細胞 C2 株より分化誘導して樹立した。皮膚ケラチノサイトは継代回数によって成熟度が異なり、以前の我々の報告では継代 1 回目、2 回目、3 回目 (Passage1:P1、P2、P3 と定義) で異なる挙動を示し、皮膚分化マーカーでも成熟を確認している。P1 は比較的未分化度が高く、幹細胞、前駆細胞に似た特徴も保持しているために突然変異実験では P1 を使用した。皮膚ケラチノサイト全般に細胞増殖活性と遺伝子導入効率が低く、事前に予備実験として使用した HaCaT 細胞 (皮膚ケラチノサイトのモデル細胞として一般に使用されている) においても低い細胞増殖活性と遺伝子導入効率を示していた (未発表データ)。また凍結ストックを作成することが現在の技術では不可能であり、実験に使用する細胞は都度 iPS 細胞から分化誘導して使用した。まず紫外線照射による突然変異頻度の測定であるが、全体のコロニー自体が少なく、十分な突然変異を持つコロニーを得ることができなかったが、傾向としては NB1RGB と同程度の頻度であった (表 10)。また、ガンマ線、中性子線照射においても特に同様に十分なコロニーを得ることができなかった。これは後述する様にガンマ線、中性子線により生じる DNA 二本鎖切断構造が不安定であり、細胞内に導入された場合に修復されずに異物として分解されてしまう可能性が示唆される。

表 10 皮膚ケラチノサイトにおける各種放射線照射時の突然変異頻度

細胞種		コロニー総数	突然変異数	突然変異率
ケラチノサイト	未処理	62	0	-
		50	0	-
		1	0	-
		11	0	-
		113	0	-
	紫外線 200 J/m <sup>2</sup>	1960	7	$3.57 \times 10^{-3}$
		12	0	-
		7	0	-
		176	0	-
	放射線 10 Gy	1	0	-
		18	-	-

心筋細胞における突然変異頻度の計測

心筋細胞は iPS 細胞 C2 株より分化誘導して樹立した。心筋細胞は凍結ストックを作成することが困難であったために突然変異実験に使用する都度、樹立した。また、心筋細胞の遺伝子導入効率は皮膚ケラチノサイト同様に著しく低く、最終的なコロニーの総数が少ない傾向にあった。紫外線照射の結果では iPS 細胞よりも NB1RGB に近い突然変異頻度を示しており、細胞の特性として突然変異を抑制する機構は線維芽細胞に近いことが考えられる（表 11）。ガンマ線で参考になる結果は得られていないが、中性子線の結果からは NB1RGB に近い突然変異頻度が得られた。

表 11 心筋細胞における各種放射線照射時の突然変異頻度

細胞種		コロニー総数	突然変異数	突然変異率
心筋細胞	未処理	62	0	-
		149	0	-
		72	0	-
		85	0	-
		326	0	-
		33	0	-
		23	0	-
	紫外線 200 J/m <sup>2</sup>	96	0	-
		203	1	4.93×10 <sup>-3</sup>
		2	0	-
		11	0	-
		356	1	2.81×10 <sup>-3</sup>
		2	0	-
		1	0	-
	放射線 10 Gy	127	0	-
		148	0	-
		-	0	-
		159	0	-
		286	0	-
		-	0	-
		223	0	-
中性子線	971	2	2.0597×10 <sup>-3</sup>	

血液細胞における突然変異頻度の計測

血液細胞は iPS 細胞 C2 株より分化誘導して樹立した。細胞増殖はよいが、遺伝子導入効率にばらつきが見られるが、これはおそらく細胞の分化状態の違いに起因すると思われる。紫外線照射による突然変異頻度は iPS 細胞よりも NB1RGB に近かった（表 12）。また、ガンマ線および中性子線照射による突然変異頻度は他の細胞と同様に低い傾向を示した。

表 12 血液細胞における各種放射線照射時の突然変異頻度

細胞種		コロニー総数	突然変異数	突然変異率
血液細胞	未処理	350	0	-
		24480	0	-
	紫外線 200 J/m <sup>2</sup>	43	0	-
		222	1	4.50 × 10 <sup>-3</sup>
	放射線 10 Gy	2109	0	-
		16192	5	3.09 × 10 <sup>-4</sup>
	中性子線	457	2	4.38 × 10 <sup>-3</sup>

各細胞における各種放射線照射による突然変異頻度のまとめ

上述した各種細胞における各種放射線照射後の突然変異頻度の結果を以下の図 14 にまとめる。遺伝子導入効率の問題からいくつかの細胞種では正確な突然変異頻度結果が得られなかったが、得られた結果を考察すると、幹細胞的特徴を持つ iPS 細胞 C2 および神経幹細胞では全体的に突然変異の頻度が低い。一方で、分化レベルが高い線維芽細胞 NB1RGB や心筋細胞、血液細胞では突然変異の頻度が高い傾向がある。これは研究計画時の予想通り、未分化な幹細胞ではゲノムの安定性を高く保つために DNA に生じる突然変異を抑える傾向があることを示していると考えられる。

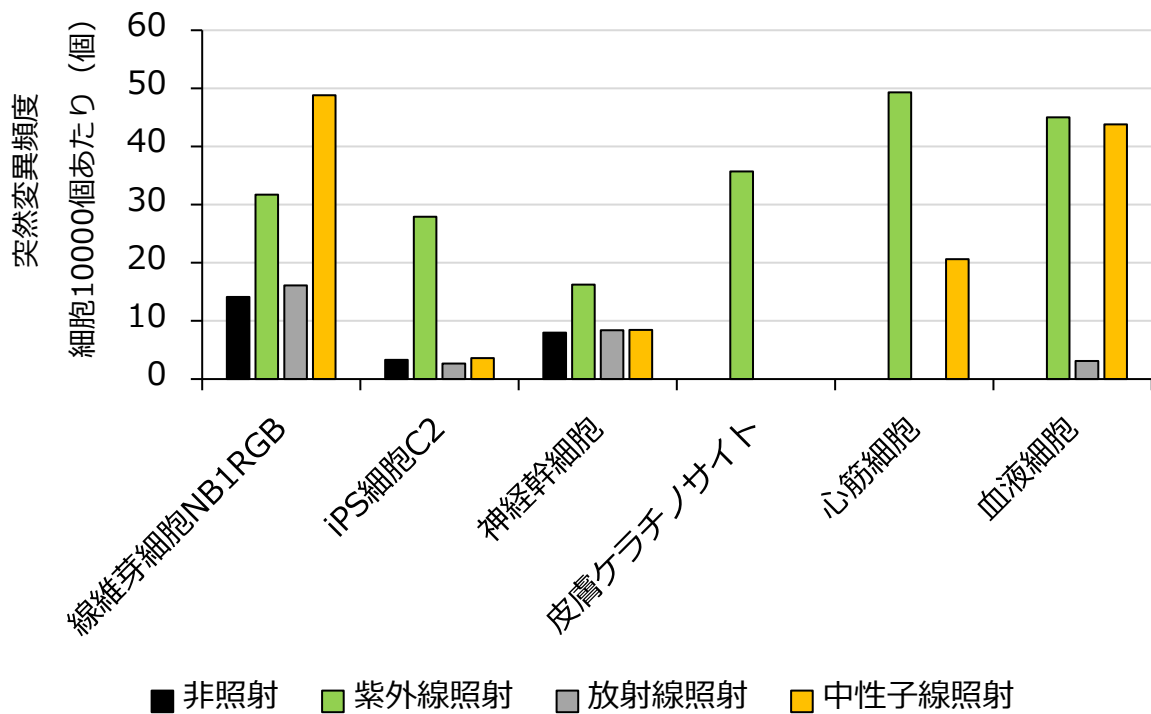


図 14 各種細胞における各種放射線照射後の突然変異頻度の比較

3.2.7 突然変異塩基配列の決定【令和2年度】

iPS細胞C2、皮膚線維芽細胞NB1RGB、iPS細胞より樹立した神経幹細胞における突然変異の塩基配列の決定を実施した。

結果を表13に示す。

Transitions型変異はpurine塩基(G or A)が(A or G)に変異するタイプでTransversions型変異はpurine塩基(G or A)がpyrimidine塩基(C or T)に変異するタイプのことを指す。全体的な傾向としてG:C→A:Tの変異が多いことがわかる。

表13 突然変異の塩基配列決定

表中の数字は得られたそれぞれの突然変異の数を表す。

		transitions		transversions			挿入	欠失
		G:C→A:T	A:T→G:C	G:C→T:A	G:C→C:G	A:T→T:A		
iPS細胞C2	未処理	6		6	4		1	
	紫外線 200 J/m <sup>2</sup>	44	2	2		1		12
	紫外線 500 J/m <sup>2</sup>	19	1	4		1		
	紫外線 1000 J/m <sup>2</sup>	33	1	1				
皮膚線維芽細胞 NB1RGB	未処理	1						
	紫外線 200 J/m <sup>2</sup>	2						
	紫外線 500 J/m <sup>2</sup>							
	紫外線 1000 J/m <sup>2</sup>		1					
神経幹細胞	未処理	1						
	紫外線 200 J/m <sup>2</sup>	4	2					
	紫外線 500 J/m <sup>2</sup>	43	5	4	3	1	2	2
	紫外線 1000 J/m <sup>2</sup>	67	3	11		5	4	3

### 3.3 突然変異した塩基配列の傾向を知る数理モデルの構築（連携先：原子力機構）

平成 30 年度より、突然変異計測結果のデータ解析のための設備環境を整備し、既知の論文のデータや演習用データを用いて条件の検討等をしてきた。令和 2 年度は、これまでの結果を評価して、実際のデータから放射線および組織特異的な突然変異率の違いを検証した。ここでは、平成 30 年度および令和元年度の成果の概略を述べた後、令和 2 年度の成果を報告する。

#### 3.3.1 環境整備と演習用データを用いたデータ解析法の検討【平成 30 年度～令和元年度】

突然変異は、放射線被ばくだけでなく様々な要因で発生し、点突然変異、欠失、付加などの様々な種類がある。放射線の線種や細胞の種類による突然変異の差異は、発がんリスクの評価をする上で重要な要素となってくる。突然変異計測結果から、突然変異の種類を見いだすデータ解析手法は様々あり、例えば、動的計画法は、再帰的に同じ副問題を繰り返し計算する際にトップダウンで計算を行うと同じ計算が複数回実行され非効率な場合、計算結果をメモリー上に保存しながら計算を続ける有効なアルゴリズムである。突然変異計測結果を解析する場合、DNA 配列を文字列として扱い、異なる 2 つの DNA 配列の共通部分（最長共通部分列：Longest Common Subsequence）を探索できるので、どのような突然変異が発生したかを明らかにできる。本事業では、放射線の線種や細胞の種類による突然変異の差異を明らかにするため、平成 30 年度より、演習用に既知の論文データを用いた各種データ解析を行った。まず、検出された突然変異の種類ごとに頻度を算出して多次元データとして扱い、多変量解析により総合的な評価を行った。予備試験として、ヒストグラム（Microsoft® Excel®）、主成分分析（R のパッケージ multcomp）、自己組織化マップ（R のパッケージ som）、ニューラルネットワーク（R のパッケージ nnet）、サポートベクターマシン（R のパッケージ kernlab）を比較検討し、その結果、感覚的に複数の項目間の関係性等を把握することに優れている主成分分析や自己組織化マップの有用性、ニューラルネットワークやサポートベクターマシンの高い分類精度を確認した。

#### 3.3.2 突然変異計測結果の解析【令和 2 年度】

上記の結果を基に、放射線の線種や細胞の種類による突然変異の差異を明らかにするデータ解析手法についての検討を重ね、本事業の結果に適用するデータ解析手法として、機械学習の一種である教師なしニューラルネットワークの自己組織化マップを採用した（図 15）。自己組織化マップは、視覚表現に優れたデータ解析法として知られており、学習させた多次元データは、それらの関係性（トポロジー）を保った 2 次元マップとして写像される。以下に自己組織化マップのアルゴリズムを簡単に記す。

自己組織化マップのアルゴリズム

- ① 競合層にユニットを配置し、それぞれの持つ参照ベクトルを初期化する。
- ② 入力データとの差が最小となる競合層のユニットを勝者とする。
- ③ 勝者ユニットの近傍を次式で更新する。

$$m_i(t+1) = m_i(t) + \alpha(t) \cdot h(d, t)[x(t) - m_i(t)]$$

競合層のユニット  $i$  が時刻  $t$  で参照ベクトル  $m_i(t)$  を処理し、入力データ  $x(t)$  を学習して、 $m_i(t+1)$  となる。 $m_i$  と  $x$  は同じ  $n$  次元の要素を持つ。 $d$  は勝者ユニットと更新される参照ベクトルの距離で、学習率係数  $\alpha(t)$  と近傍関数  $h(d, t)$  は、一般に学習が進むにつれて減少関数で設定する。

- ④ 上の②に戻って、設定した学習回数だけ学習を繰り返す。

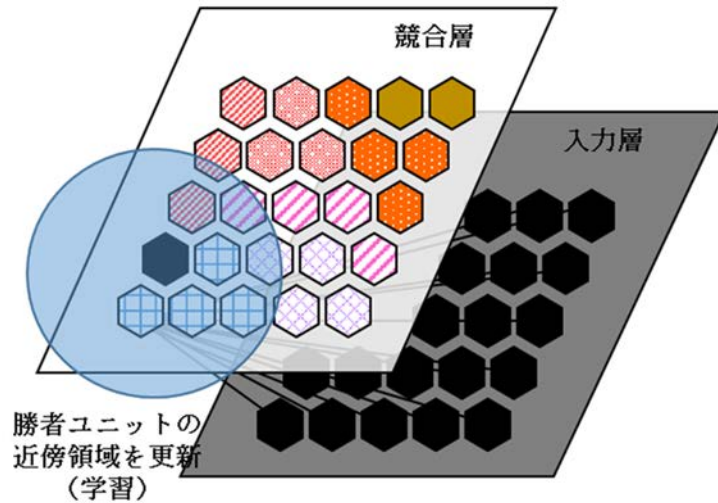


図 15 自己組織化マップの概念図

自己組織化マップは、入力層と競合層の2層からなり、各層に対して最も整合する勝者ユニットを決定し、その近傍にあるユニットを入力データに似せることで学習を行う。競合層は、徐々に入力データの特徴が反映されて更新され、類似した特徴を持ったユニットの領域が作られていく。

入力データは、突然変異計測結果より得られた各サンプルのトランジション (G:C→A:T、A:T→G:C) トランスバージョン (G:C→T:A、G:C→C:G、A:T→T:A、A:T→C:G)、挿入 (A、T、C、G)、欠失 (A、T、C、G) の個数で14次元の数値データである。例えば、突然変異がないサンプルのデータは (0、0、0、0、0、0、0、0、0、0、0、0、0、0) となる。3.2節で説明した突然変異解析で得られた497個のサンプル(データ)を用い、上で説明した自己組織化マップで解析すると、以下のようなマップが得られた(図16)。

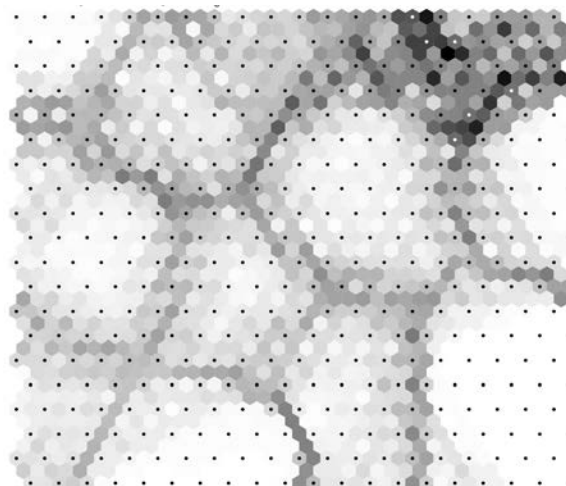


図 16 出力されたマップ



SOM の出力マップ上には、入力データに対する結合ベクトルを持つユニットが並んでおり、出力マップには入力データの特徴が反映しているだけで軸はない。表現方法としては、U-matrix がよく用いられる。一般的に SOM の表現方法として用いられる U-matrix は、競合層の各ユニットが近傍のユニットと異なる度合いを色づけし、局所的なデータの差を表したマップを出力することができ、色合いでデータ全体の特徴の類似度を表す。データの乖離度を濃淡で表し、黒いユニットはデータの隔たりを表現している。SOM で出力されたマップは局所的なデータの関係性が反映され、似通ったデータが近くに配置される。つまり、学習させて出力マップに写像した入力データは、主に、データの隔たりに囲まれた 10 個の特徴を持っていることを表している（図 17）。

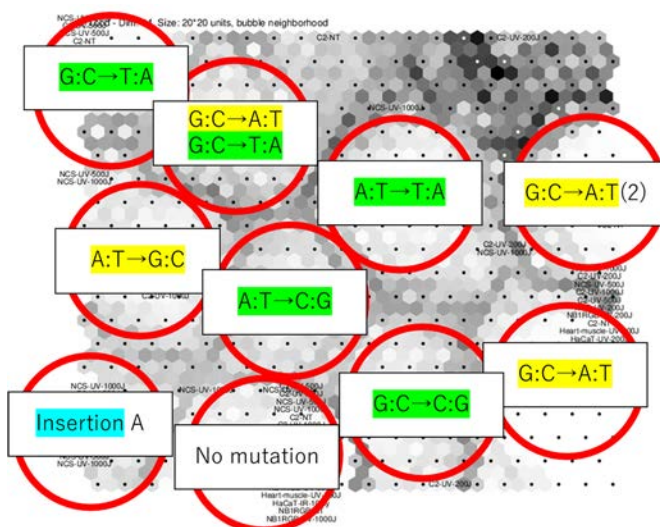


図 17 出力されたマップからの特徴抽出

示された 10 個の特徴を丸で囲んだ。カッコ内の数字は個数を示しており、G:C→A:T(2)は G:C→A:T が 2 個起こっていることを示している。黄色、緑色、青色は、トランジション、トランスバージョン、挿入を表している。

データ数が十分に得られた紫外線照射において、細胞の種類による差を検討した。神経細胞、iPS 細胞を比較すると、低線量でトランジション (G:C→A:T) が 1 カ所起こるのが多いのは明らかで、高線量では 2 カ所の変異やトランスバージョン (G:C→T:A) が起こりやすいことがわかった。また、iPS 細胞では見られなかったが、神経細胞ではトランジション (A:T→G:C) も起こっていた（図 18）。また、iPS 細胞と神経細胞以外の細胞では、紫外線照射でトランジション (G:C→A:T、A:T→G:C) しか見られなかった（図 19）。



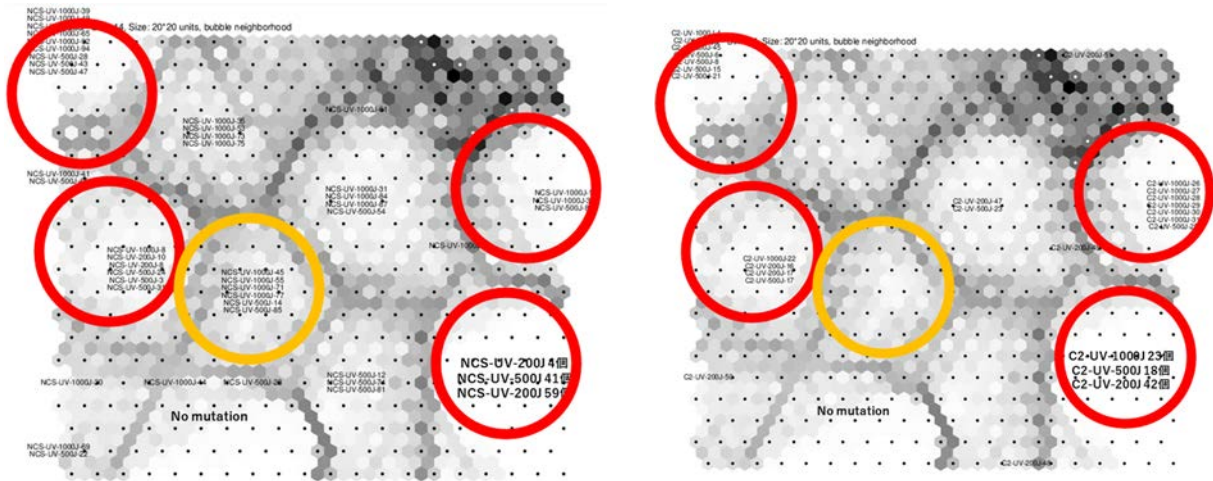


図 18 神経細胞（左）と iPS 細胞（右）への紫外線照射に関する特徴抽出  
 神経細胞および iPS 細胞で起こった突然変異の特徴を丸で囲んだ。赤色の丸が共通の特徴  
 であり、黄色い丸が異なる特徴である。

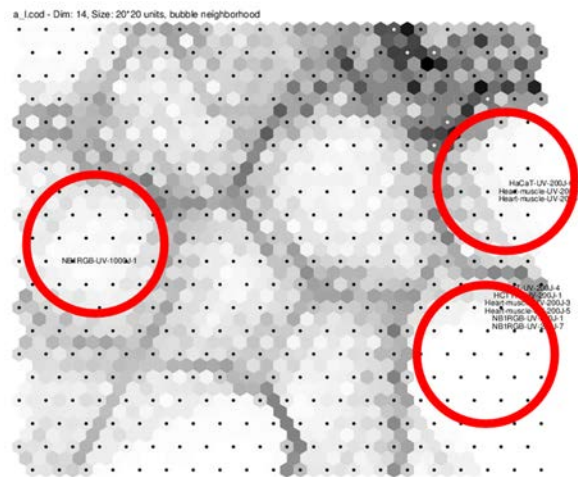


図 19 皮膚細胞、心筋細胞、大腸癌細胞への紫外線照射に関する特徴抽出  
 皮膚細胞、心筋細胞、大腸がん細胞で起こった突然変異の特徴を丸で囲んだ。

SOM の解析ではどのような突然変異のパターンが起こるかを表しているため起こりやすさを  
 評価するものではない。しかし、SOM の出力マップを見ると、特に自然に起こりやすい突然変  
 異と言われているトランジション (G:C→A:T) のデータが右端に集中的に集まっていた。つま  
 り、SOM の出力マップの右端は自然突然変異を表していると言える。したがって、本研究では、  
 皮膚細胞、心筋細胞、大腸癌細胞への紫外線照射は自然突然変異と差がない可能性が高いとい  
 う結果が得られた。また、トランスバージョン (A:T→C:G) が、紫外線照射をした神経細胞で  
 は起こり、iPS 細胞では起こらないパターンであるという知見が得られたが、その理由につい  
 ては不明で、解析データの精査や追加、さらなる検討が必要と考える。

### 3.4 研究推進

平成 30 年度は 2 回の研究打ち合わせを実施した。

第 1 回目は平成 30 年 12 月 3 日に東京工業大学を会場として東京工業大学の島田（研究代表者）、原子力機構の神崎（研究分担者）、量研機構の柳原（研究分担者）が参加した他、東京工業大学のエネルギー科学専攻大学院生の三宅、東京工業大学受託研究グループの浅井氏が事務代表として参加した。本事業は平成 30 年 10 月 31 日開始であったために 12 月の研究打ち合わせでは全体研究計画の再確認と今後の展望を島田が説明したほか、神崎が数理モデルについての説明、柳原が突然変異測定実験についての説明を実施した。

第 2 回目は平成 31 年 3 月 7 日～8 日にかけて原子力機構人形峠環境技術センターを会場として実施した。参加者は東京工業大学の島田（研究代表者）、原子力機構の神崎（研究分担者）、量研機構の柳原（研究分担者）で、原子力機構の神崎の手配の元、研究施設の見学を実施した。本打ち合わせでは研究設備、試薬の準備状況の説明と、具体的な今後の方針の確認を行った。

その他、30 件ほどのメール会議を実施し、進捗状況の確認と研究打ち合わせを行った。

令和元年度は 2 回の研究打ち合わせを実施した。

第 1 回目は令和元年 7 月 3 日に東京大学農学部キャンパスを会場として東京工業大学の島田（研究代表者）、原子力機構の神崎（研究分担者）、量研機構の柳原（研究分担者）が現在の進捗状況の説明と今後の計画の確認を行った。

第 2 回目は令和元年 10 月 10 日～12 日にかけて原子力機構人形峠環境技術センターを会場として実施した。参加者は東京工業大学の島田（研究代表者）、原子力機構の神崎（研究分担者）、量研機構の柳原（研究分担者）で、原子力機構の神崎の手配の元、研究施設の見学を実施した。本打ち合わせでは研究設備、試薬の準備状況の説明と、具体的な今後の方針の確認を行った。

その他、30 件ほどのメール会議を実施し、進捗状況の確認と研究打ち合わせを行った。

令和 2 年度は COVID-19 による対面会議の制限により、メールおよび ZOOM による Web 会議を中心に研究打ち合わせを実施した。

研究代表者を中心に分担研究者らと互いにメールおよび ZOOM による Web 会議を実施し、打ち合わせと進捗状況の確認を行い、研究連携をとりあった。メールは 40 件程度、Web 会議は 2 回実施（令和 2 年 10 月 20 日、令和 3 年 2 月 25 日）した。また、廃炉環境国際共同研究センター（CLADS）と連携を密にして、研究を進めた。令和 2 年度が研究計画の最終年度であるために、研究打ち合わせでは突然変異計測の研究結果の検討とデータ解析を中心に議論を行い、本研究成果を共同でまとめた。

### 3.5 考察

本研究では哺乳類細胞において放射線により生じる突然変異の臓器・組織特異性を計測するための実験系の確立を目指した。突然変異は自然突然変異と誘発突然変異に大別することができる。自然突然変異は細胞のエネルギー代謝時に生じる活性酸素などの酸化ストレスによりゲノム DNA が傷害を受け、突然変異が生じるものである。一方で誘発突然変異は紫外線や放射線などの外部刺激によりゲノム DNA が障害を受け、突然変異を生じる。自然突然変異では塩基置換の頻度が最も高く、特に G:C→A:T の頻度が多いとされており、C のメチル化とその脱アミノ化によるチミンへの変換が原因であると考えられている。一方で放射線による突然変異は欠失型が多いとされており、放射線により DNA 二本鎖切断が生成し、その修復のために非相同末端結合修復が用いられるために一部のヌクレオチドの欠失をまねくと考えられている。

細胞の種類による突然変異の頻度は様々な因子が関与しており、それらを包括的に考慮する必要がある。まず放射線照射により生じた DNA 損傷を修復する活性であるが、放射線照射により生じやすい DNA 二本鎖切断を修復する機構は哺乳類には相同組換え修復と非相同末端結合修復の 2 種類が存在する。相同組換え修復は DNA 合成期以降に細胞内に姉妹染色体が存在する状態でその姉妹染色体を鋳型として傷害を受けた DNA を修復する機構であり、突然変異を生じない正確な修復が特徴であるが、姉妹染色体が存在する DNA 合成期から細胞分裂までの期間でないと働くことが出来ない。一方で全ての期間において働くことができるのが非相同末端結合修復であるが、DNA の欠失などを考慮せずに DNA の末端同士を直接結合する仕組みであるために欠失を特徴とする突然変異を生じやすい。一般的に幹細胞などの細胞増殖が活発な細胞種では DNA 合成の活性も高いため、相同組換え修復が高いと考えられている。次に考慮すべき細胞内の機能としてプログラムされた細胞死であるアポトーシスが挙げられる。アポトーシスは異常になった細胞をその細胞集団から除去するための仕組みであり、突然変異を抑制するために重要である。p53 というタンパク質が DNA 損傷応答における分子伝達の中心的な制御因子であり、DNA 損傷が生じた際に p53 が下流の細胞周期進行因子を停止させ DNA 修復が可能かどうかをチェックし、可能であれば DNA 修復因子を活性化し、不可能であればアポトーシス関連因子を活性化し細胞死に向かわせる。幹細胞、生殖細胞などでは放射線照射後の突然変異の頻度が低いそれを達成するために DNA 修復活性とアポトーシス活性の両方を高めていると考えられる。実際、我々は以前の研究で多能性幹細胞である iPS 細胞では DNA 修復に関する遺伝子の発現量が初期化する前の線維芽細胞と比較して極めて増加しており、アポトーシスの活性も同時に高いことを見出している。

これらの関係性から体全体の臓器の関係性を考察すると腸管などの消化器系や皮膚系細胞では頻繁に細胞増殖と細胞死が起こっている一方で末梢神経などでは細胞増殖がほとんど見られない。しかし、発がんにつながる突然変異が残存しているかの視点から考えると末梢神経では DNA 損傷が蓄積しているという報告がある一方で細胞増殖の活性もほぼないのでリスクも限りなく低いと考えられる。

これまでのマウスを用いた研究の報告において組織における突然変異の頻度は発生・分化の過程や老化によっても変化することが知られている。また、その他の報告としてマウスの脾臓は脳と比較して 2 倍の突然変異頻度を示す。上述した通り、細胞増殖活性が高い幹細胞や生殖細胞では DNA 修復活性とアポトーシス活性を高めることにより突然変異の頻度を抑制していると考えられるが、細胞増殖能が高い脾臓ではなぜ突然変異頻度が高いのだろうか？おそらく幹細胞系列と異なり、幹細胞ではない脾臓細胞は DNA 修復の活性がそこまで高くない可能性が考えられる。同様の事柄は他の臓器にも言えるかもしれない。例えば腸管の絨毛部の細胞は消化



物に晒されているために常時細胞死により脱落しているが、クリプトに存在する腸幹細胞および前駆細胞は組織の深部に位置しており、突然変異を抑制していると考えられる。

今回の研究においては上記の状況を踏まえて、ヒト皮膚線維芽細胞 (NB1RGB)、ヒト iPS 細胞 (NB1RG 由来)、さらにヒト iPS 細胞から分化誘導した神経幹細胞、皮膚ケラチノサイト、心筋細胞、血液細胞を用いて突然変異頻度を測定した。特に分化誘導した組織細胞は単一のヒト iPS 細胞由来であるために個体間の差を考慮する必要なしに、純粋に組織における差を計測することが目的である。さらに簡便な実験系を目指すために方法として突然変異の指標として *SupF* 遺伝子を含む DNA ベクターに直接各種放射線を照射し、その DNA ベクターを細胞の遺伝子導入し、細胞の中で突然変異を定着後、抽出し、大腸菌に遺伝子導入する手法を採用した。この方法の利点として細胞を放射線照射装置がある場所まで移動させる必要がないために、細胞へのストレスを減少させることができる他、放射線照射の条件を統一できることにある。この方法を用いて紫外線、ガンマ線、中性子線を DNA ベクターに照射し、突然変異測定に用いた。元来この手法は紫外線照射による突然変異の測定研究に汎用されている方法であるが、放射線にも適用できるか、本研究で試みた。

まず紫外線照射したヒト iPS 細胞および線維芽細胞を比較すると予想通り幹細胞である iPS 細胞では突然変異頻度が低い傾向が見られた。一方で同じく紫外線照射した神経幹細胞では iPS 細胞と同等の突然変異頻度であった。同じ神経系の細胞でも未分化な状態の幹細胞および前駆細胞と、成熟した末梢神経細胞では突然変異の頻度が異なると予想されるが、成熟した抹消神経細胞は細胞増殖の低下に起因する遺伝子導入効率の低さから今回の実験手法を用いることは困難であるため実施しなかった。老化に伴い、神経細胞において DNA 損傷が蓄積しているとの報告があることから、成熟した末梢神経細胞では DNA 修復能が低下していると考えられる。本研究の趣旨とは逸れるが、医学・生物学的には非常に重要な課題であるために今後老化に伴う成熟神経細胞の DNA 損傷および突然変異頻度の測定法の開発が望まれる。一方で皮膚ケラチノサイト、心筋細胞、血液細胞は遺伝子導入効率が低いために最終的な大腸菌コロニーの数が少なく、突然変異頻度もバラツキが大きい結果となった。今後の改善点として効率が良く、細胞への損傷が少ない遺伝子導入法の選定および開発が重要と考えられる。電気穿孔法 (エレクトロポレーション法) は遺伝子導入効率が高いが細胞への損傷も大きい。一方でリポフェクション法は電気穿孔法と比較して遺伝子導入効率が低い。今回はリポフェクション法を用いたが、細胞への損傷を考えると適切であったと考えられる。そのため使用する DNA 量や試薬の量の最適化が最善の改良法であると考えられる。

一方でガンマ線、中性子線を照射した細胞では突然変異の増加が少なかった。その理由としてガンマ線、中性子線ともに DNA 二本鎖切断を生成する割合が高く、欠失の割合が高く、細胞に遺伝子導入された際に正常に修復されなかった可能性が考えられる。特に今回用いた DNA ベクターはゲノム DNA とは異なり、ヒストンに DNA が巻きついたクロモソーム構造をとっていない。そのためゲノム DNA より構造的に脆弱となり、放射線照射により生じた障害が致命的となったと考えられる。さらに iPS 細胞では異なる線量のガンマ線を照射し、突然変異頻度を測定したが、10 Gy、50 Gy、100 Gy いずれの線量においても突然変異頻度は紫外線と比較して低かった。

また本研究の特色として得られた突然変異頻度と塩基配列の結果を数理モデルで解析しようと試みたことが挙げられる。多種多様な突然変異パターンをグループ化できるか検討し、視覚効果に優れた自己組織化マップを採用して特徴抽出を行った結果、感覚的に細胞の種類による突然変異の傾向をつかむことができた。

4. 結言

この研究では、放射線による生体影響として DNA 損傷とそれに起因するゲノム DNA の突然変異に着目し、放射線が与える影響の臓器・組織の特異性を測定することを主眼とした。ヒトの臓器・組織は部位によって細胞分裂の速度や回数の特徴が異なることから組織ごとに放射線の影響も異なると考えられる。図 20 にあるように放射線の DNA への影響は物理的過程、化学的過程、生物医学過程によってその影響時間が異なり、物理過程である水・生体分子への影響は  $10^{-14}$  秒で生じるのに対し、生物医学過程である細胞死・突然変異が生じるには数日から数十日かかる。これは生物が分子シグナルの制御などの短時間で生じる過程と細胞分裂などの比較的長い時間を要する過程と複雑な過程を経ることに起因している。放射線によって細胞の核内 DNA に傷が生じた際、それを修復する分子メカニズムの活性に差があると考えられるがその実態は不明である。そのため同じ線量を被曝し、同量の DNA 損傷が生じても修復活性が異なり、突然変異の発生頻度が異なる可能性があるため本事業ではそれらを解析するための実験系の確立を目指した。本事業は原子炉の廃炉作業者の生体影響と放射線防護の観点から放射線によって臓器によって突然変異頻度の差を知ることにより遮蔽部位などの工夫の一助になることが期待される。

放射線作用の時間経過

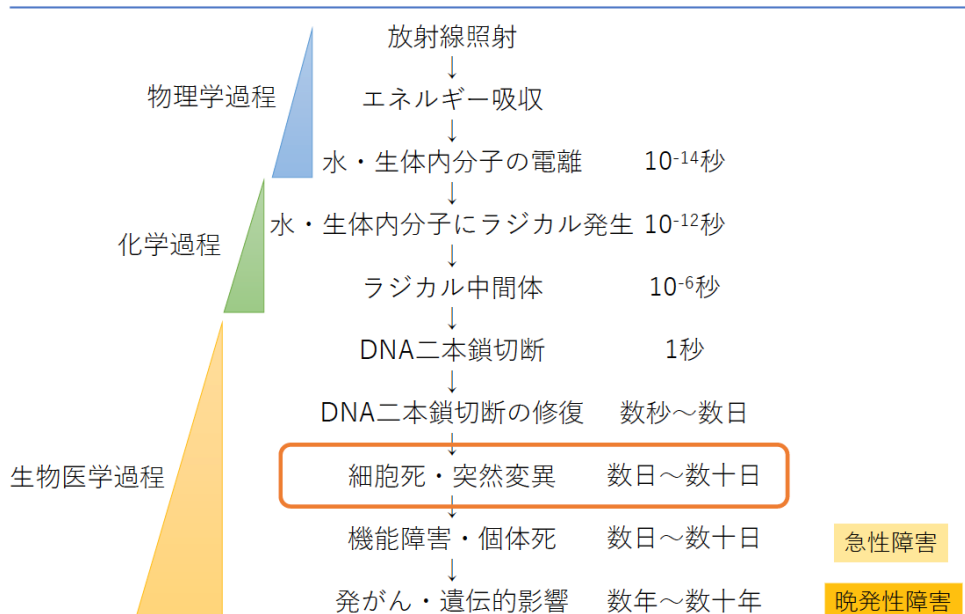


図 20 放射線作用の時間経過

放射線の DNA への影響は物理過程、化学過程、生物医学過程に分類することができ、物理過程の水・生体内分子の電離が  $10^{-14}$  秒であるのに対し突然変異過程である生物医学過程は数日から数十日と時間がかかる。

参考文献

- [1] Parris, C. N., Seidman, M. M., A Signature Element Distinguishes Sibling and Independent Mutations in a Shuttle Vector Plasmid, *Gene*, 117, 1992, pp.1-5.
- [2] Shimada, M., Tsukada, K., Kagawa, N., and Matsumoto, Y., Reprogramming and Differentiation-dependent Transcriptional Alteration of DNA Damage Response and Apoptosis Genes in Human Induced Pluripotent Stem Cells, *J. Radiat. Res.*, 60, 2019, pp.719-728.
- [3] Miyake, T., Shimada, M., Matsumoto, Y., and Okino, A., DNA Damage Response After Ionizing Radiation Exposure in Skin Keratinocytes Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 105, 2019, pp.193-205.
- [4] 中辻憲夫監修, 末盛博文編集, *ES・iPS細胞実験スタンダード*, 羊土社, 2014, 358p.



