

平成 2 8 年度

文部科学省 国家課題対応型研究開発推進事業
英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

ゲノム編集法を用いた放射線感受性の
個人差を規定する遺伝的素因の同定

成果報告書

平成 2 9 年 3 月
国立大学法人 広島大学

本報告書は、文部科学省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 広島大学が実施した平成26－28年度「ゲノム編集法を用いた放射線感受性の個人差を規定する遺伝的素因の同定」の成果を取りまとめたものです。

目次

概略	iv
1. はじめに	1
2. 業務計画	
2.1 全体計画	3
2.2 各年度の成果の目標および業務の実施方法	3
2.2.1 一塩基編集技術の開発とモデル細胞の作製	3
2.2.2 放射線高感受性が予想されるヒト細胞の収集	3
2.2.3 放射線感受性の定量的評価	3
2.2.4 研究推進	4
3. 全研究期間（平成26年度～平成28年度）の実施内容及び成果	
3.1 一塩基編集技術の開発とモデル細胞の作製	5
3.1.1 研究の目的	5
3.1.2 研究の方法	6
3.1.3 研究の結果	9
3.1.4 結果の分析と考察	19
3.2 放射線感受性が予想されるヒト細胞の収集	20
3.2.1 研究の目的	20
3.2.2 研究の方法	20
3.2.3 研究の結果	20
3.3 放射線感受性の定量的評価	23
3.3.1 研究の目的	23
3.3.2 研究の方法	24
3.3.3 研究の結果	26
3.3.4 結果の分析と考察	38
3.4 研究推進	38
4. 結言	39

図一覧	頁
図 1 微小核法で調べられた放射線感受性の個人差	1
図 2 主要業務実施計画	3
図 3 ゲノム編集技術を用いたモデル細胞の作製	5
図 4 HCT116 細胞での一過的な薬剤選択による編集クローン作製工程	6
図 5 hTERT-RPE1 細胞における相同組換え修復活性に依存しないゲノム編集法	7
図 6 マウスにおける一塩基編集法	8
図 7 YAP P155X ナンセンス変異導入細胞の樹立	9
図 8 WDR62 S244L ミスセンス変異導入細胞の樹立	10
図 9 WDR62 S244L ミスセンス変異導入細胞の細胞分裂軸の不安定化	11
図 10 <i>NBS1</i> I171V 多型導入細胞の樹立	12
図 11 <i>NBS1</i> I171V 多型導入細胞の微小核形成頻度	13
図 12 <i>NBS1</i> 657del5 変異導入細胞の樹立	14
図 13 <i>Lig4</i> A3V 多型/T9I 多型導入細胞の樹立	15
図 14 放射線感受性の遺伝素因と予測される遺伝子のゲノム編集細胞の作製	16
図 15 hTERT-RPE1 細胞におけるゲノム編集の実績とゲノム編集入門書の出版	17
図 16 一塩基編集法を用いた <i>BubR1</i> 1833delT 変異導入マウスの樹立	18
図 17 日本人 PCS 症候群の 1 家系 (CB 家系)	20
図 18 毛細血管拡張性運動失調症 (A-T) の 1 家系	21
図 19 健常者細胞を用いた放射線感受性の測定	23
図 20 皮膚線維芽細胞の微小核プロトコール	24
図 21 皮膚線維芽細胞の Dicentric 法プロトコール	25
図 22 PCS 症候群患者由来皮膚線維芽細胞の放射線急照射後の微小核形成率	26
図 23 PCS 症候群患者由来線維芽細胞の放射線急照射後の Dicentric 染色体頻度	27
図 24 A-T 家系線維芽細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度 (3 回実施)	28
図 25 A-T 家系線維芽細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度	29
図 26 放射線照射後に観察される染色体型および染色分体型異常	30
図 27 放射線照射後に観察される染色体型および染色分体型異常 (4 回実施)	31
図 28 ゲノム編集法を用いた A-T モデル細胞の作製	32
図 29 A-T モデル細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度 (3 回実施)	33
図 30 A-T モデル細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度	34
図 31 A-T 家系の低線量率放射線照射後の微小核形成率	35
図 32 卵巣がん患者 52 名の放射線照射後の微小核形成頻度	36
図 33 卵巣がん患者における微小核形成頻度の分布	37
図 34 研究成果 1	39
図 35 研究成果 2	40
図 36 研究成果 3	41

略語一覧

A-T : ataxia-telangiectasia (毛細血管拡張性運動失調症)

NBS : Nijmegen breakage syndrome (ナイミーヘン染色体不安定症候群)

PCS : premature chromatid separation (染色分体早期解離)

SNP : single nucleotide polymorphism (一塩基多型)

ssODN : single-strand oligo DNA (一本鎖オリゴ DNA)

CRISPR/Cas9: clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9 システム)

概 略

一度に大量の電離放射線を被ばくすると急性症状が現れて、後にがんを発症するリスクが高くなる。一方、100 ミリシーベルトよりも少ない低線量の放射線被ばくで発がんリスクが上昇するか否かについては未だに明らかにされていない。そのため 2011 年に発生した福島第一原発事故では、国民は低線量放射線に対する健康不安に駆られることとなった。国際放射線防護委員会 (ICRP) は、どんなに少ない被ばくでも線量に応じて健康影響があると仮定した LNT 仮説を提唱し、より安全側に立って身を守る防護モデルとして広く受け入れられている。しかし、実際の影響が直線になるのかどうかについては異論が多い。放射線影響研究者の多くは低線量被ばくが発がんリスクを上昇させないとおそらく考えていると思われるが、健康影響がないことの証明は難しく、低線量放射線の生体影響は今後の重要課題である。

放射線被ばく線量が同一でも、被ばく時間が異なると生物影響が大きく変わってくることはよく知られた事実である。すなわち低線量被ばくは、被ばく時間（線量率）を考慮する必要がある。X 線や CT 検査などの医療被ばくは高線量率低線量被ばくの代表例である。実際にこうした医療被ばくが発がんリスクを急上昇させるとの報告が出されている。したがって、将来的には個人の医療被ばく歴の管理が重要になってくるものと思われる。

放射線感受性には個人差が存在すると考えられており、将来的には個人の感受性に応じて医療被ばくの基準を設定することが求められると予想される。本研究は、このような次々世代の放射線被ばく基準の確立に向けて、その分子基盤となる放射線感受性の個人差を規定する主要な遺伝的素因の同定を目的としている。

放射線感受性の個人差を規定する遺伝的素因として DNA 修復遺伝子の一塩基多型が推定される。本研究では、ゲノム編集法を用いて放射線感受性の遺伝的素因と考えられる DNA 修復遺伝子の変異（または多型）をヒト細胞に導入して細胞ライブラリを作製し、微小核法または染色体 Dicentric 法で放射線感受性を同一遺伝的背景内で定量的に測定する。さらに、健常者集団や DNA 修復欠損症家系の血液サンプルなどを用いて放射線感受性の分布を調べ、ゲノム編集細胞の結果と相互に比較・検討することで、放射線感受性の個人差を規定する主要な遺伝的素因を同定することを目的としている。

3 カ年の研究により、1) 一塩基編集技術の開発とモデル細胞の作製、2) 放射線高感受性が予想されるヒト細胞の収集、3) 放射線感受性の定量的評価の3項目を実施して、以下の成果を得た。

1) 人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 システムとターゲティングドナーとして一本鎖オリゴ DNA (ssODN) をヒト結腸癌細胞株 HCT116 細胞に共導入するワンステップ遺伝子標的法に一過的な薬剤選択を取り入れて、SNP 導入法の高効率化に成功した。この手法を用いて、放射線高感受性遺伝病の原因遺伝子である *NBS1* 遺伝子の I171V (511A>G) 多型、*LIG IV* 遺伝子 A39V 多型 (8C>T)、T9I 多型 (26C>T)、遺伝性小頭症遺伝子 *WDR62* の S244L ミ

スセンス変異 S244L (731C>T)、がん遺伝子 *YAP1* のナンセンス変異 P155X(463-465CCC>TGA) を保有するモデル細胞4遺伝子6種類を作製した。また、遺伝子組換えが困難であるヒト正常組織由来細胞株 hTERT-RPE1 細胞におけるゲノム編集法として相同組み換え修復に依存しない遺伝子標的法を整備した。この手法を用いて、15種類の編集細胞を樹立した。さらに、CRISPR/Cas9 システムと ssODN を用いて放射線高感受性が予想される疾患である PCS 症候群の原因遺伝子 *BubR1* の変異マウスを2種類樹立した。

2) PCS 症候群の線維芽細胞サンプルを国内の研究者から入手した。また、放射線高感受性遺伝病の代表的な疾患である毛細血管拡張性運動失調症1家系の線維芽細胞を入手した。

3) サイトジェネティックススキニングシステムを使用した微小核自動計測法の線維芽細胞および HCT116 細胞などの接着性細胞における標準プロトコルを確立した。この方法を用いて毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子 *ATM* の変異保因者は、放射線照射後の微小核形成能が健常者より有意に亢進していることが明らかになった。本研究結果は、健常者集団にも放射線高感受性の一群が存在することの根拠の一つと位置づけられる。

4) 卵巣がん患者 52 名の末梢血リンパ球を入手して、放射線感受性を測定した。その結果、卵巣がん患者は全体的に放射線高感受性であることを確認した。

1. はじめに

大規模な原爆疫学研究によっても 100 ミリシーベルト以下の低線量放射線被ばくの影響は未解明である。そのために、福島第一原発事故では多くの国民が低線量放射線に対する健康不安に駆られることになった。放射線影響研究者の多くは、低線量被ばくは発がんリスクを上昇させないとおそらく考えているが、影響がないことの証明は容易ではなく、今後解決すべき課題である。一方で、同じ低線量被ばくであっても、X線やCT検査などの高線量率低線量被ばくは発がんリスクを上昇させるとの報告がなされてきている。したがって、今後は個人の医療被ばく歴の管理が重要になると予想される。

放射線感受性には個人差があることが知られており、将来的には個人の感受性に応じて医療放射線被ばく基準を設定することが望ましいと考えられる。本研究は、このような次々世代の放射線被ばく基準の確立に向けて、その分子基盤となる放射線感受性の個人差を規定する主要な遺伝的素因の同定を目的としている。

放射線感受性を高感度に測定する手法として微小核形成法が知られている。この方法は、放射線によって生じた染色体断片が「修復」されずに細胞が分裂期に進行した場合、分裂終期に微小核を形成することを利用した手法である（図 1）。この検査法を用いて多人数の健常者末梢血リンパ球が検討された結果、一部のヒトは微小核形成頻度が再現性をもって高値を示し、放射線感受性に個人差があることが明

らかになった。さらに興味深いことに、健常者集団とがん患者集団との比較では、がん患者集団に微小核頻度の高いヒトが多く含まれていた

(Scott et al, *Br J Cancer* 1998 ; 図 1)。これらの結果から、ヒト集団には放射線高感受性を示す一群が存在し、

そのようなヒトは低線量放射

線被ばくによりがんを発症するリスクが高いことが示唆される。放射線高感受性の原因として DNA 修復タンパク質の活性の個人差が考えられており、DNA 修復遺伝子の一塩基多型 (SNP) がその遺伝的基盤であると推定されている。

本研究では、ゲノム編集法を用いて放射線感受性の遺伝的素因と考えられる DNA 修復遺伝子の変異（または多型）をヒト細胞に導入した細胞ライブラリを作製し、微小核法または染色体 Dicentric 法で放射線感受性を測定する。これによりヒト集団の多様な遺伝的背景に依存せず、候補遺伝子多型の放射線感受性に与える影響を正確かつ定量的に評価できる。さらに候補遺伝子

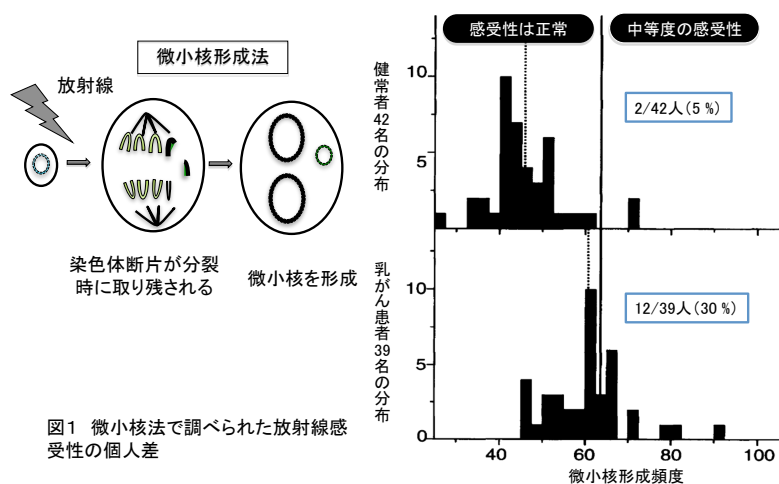


図 1 微小核法で調べられた放射線感受性の個人差

変異（多型）を持つ健常者の末梢血リンパ球または線維芽細胞、B 細胞株を収集して放射線感受性を解析してヒト集団内での候補変異（多型）の生物効果サイズを評価する。ゲノム編集細胞の結果と相互に比較・検討して、放射線感受性の個人差を規定する主要な遺伝的素因を特定する。以下に 3 ヶ年の研究期間の業務の実績・成果を述べる。

2. 業務計画

2.1 全体計画

本研究は3年間で、ゲノム編集法を用いて放射線感受性の遺伝的素因と考えられるDNA修復遺伝子の変異（または多型）をヒト細胞に導入した細胞ライブラリを作製し、微小核法または染色体Dicentric法で放射線感受性を測定する。これによりヒト集団の多様な遺伝的背景に依存せず、候補遺伝子多型の放射線感受性に与える影響を正確かつ定量的に評価できる。さらに候補遺伝子変異（多型）を持つ健常者の末梢血リンパ球または線維芽細胞、B細胞株を収集して放射線感受性を解析してヒト集団内での候補変異（多型）の生物効果サイズを評価する。ゲノム編集細胞の結果と相互に比較・検討して、放射線感受性の個人差を規定する主要な遺伝的素因を特定する。

2.2 各年度の成果の目標及び業務の実施方法

平成26年度は、図2で示した主要業務実施計画のうち1～3の計画を実施した。

平成27年度と平成28年度（最終年度）は、1～3に加えて4の研究推進も実施した。

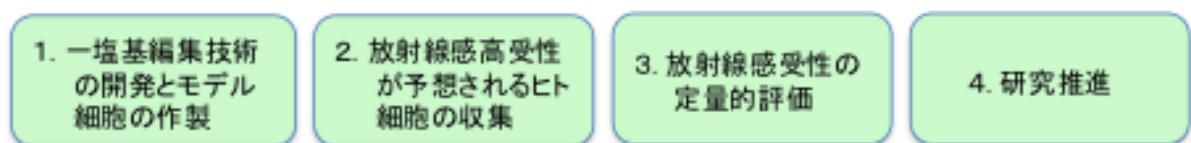


図2 主要業務実施計画

2.2.1 一塩基編集技術の開発とモデル細胞の作製

人工ヌクレアーゼと一本鎖DNAによるゲノム編集法ならびに一過性薬剤選択による編集細胞選別法を統合した一塩基編集技術を用いてゲノム編集細胞を年間10～20種類作製する。

2.2.2 放射線高感受性が予想されるヒト細胞の収集

放射線高感受性が予想されるヒトの血液サンプルまたは皮膚線維芽細胞を全国の遺伝医学研究者や細胞バンクから入手する。さらに比較検討のために健常者および婦人科がん患者40名以上から細胞を入手する。

2.2.3 放射線感受性の定量的評価

放射線感受性を多角的かつ定量的に評価するため、微小核法や染色体Dicentric法、免疫染色法の併用を検討して、2.2.1で作製したモデル細胞と2.2.2で入手したヒト細胞などを用いて放射線感受性を測定する。さらに、2.2.2で収集したサンプルの全エクソン（エクソーム）解析を行い、個人の放射線感受性と遺伝情報を連結したデータベースを構築し、主要な遺伝的素因が遺伝病の原因変異であるかどうかを検証する。

2.2.4 研究推進

研究代表者の下で各研究項目間における連携を密にして研究を進めるとともに、広く意見を聴きながら研究を進めるため委員会を開催する。

3. 全研究期間（平成26年度～平成28年度）を通しての実施内容及び成果

3.1 一塩基編集技術の開発とモデル細胞の作製

3.1.1 研究の目的

放射線感受性を規定する遺伝的素因を同定する直接的な方法は、ヒト培養細胞の遺伝子標的法である。これまでヒト細胞の遺伝子標的法は、相同組換え頻度が低いために困難とされてきたが、人工ヌクレアーゼの開発により遺伝子破壊や挿入などのゲノム編集が可能となってきた。本研究では、二倍体の遺伝情報を保持するヒト結腸癌細胞株 HCT116 細胞において第三世代の人工ヌクレアーゼである CRISPR/Cas9 システムとターゲティングドナーとして一本鎖 DNA (ssODN) を利用して一段階の高効率の遺伝子標的法を開発し、ゲノム編集細胞樹立のハイスループット化を行うことを目的としている。図3は、標的遺伝子の多型 A を G に一塩基置換する手法を示す。A を G に置換したターゲティングドナー (ssODN) を作製して gRNA/Cas9 とともに細胞に導入する。相同組換えによって A が G に置換した変異型細胞は全細胞集団の約 1 % 未満と推定される。そこで一過的な薬剤選択により変異型細胞を濃縮した後、制限酵素を用いた遺伝子型判定を行い目的のクローンを単離する。

また、正常組織由来細胞株 hTERT-RPE1 での遺伝子標的法の開発、並びにマウスにおける一塩基編集技術の確立を行い、放射線感受性の個人差研究を推進する研究基盤の整備も行う。

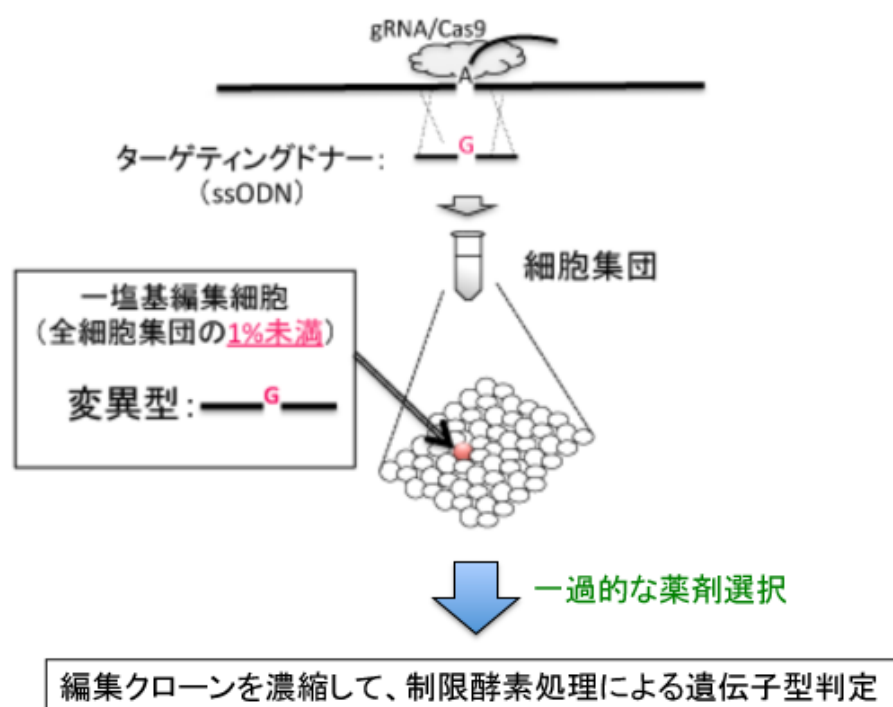


図3 ゲノム編集技術を用いたモデル細胞の作製

3.1.2 研究の方法

(1) HCT116 細胞株における一過的な薬剤選択を用いた一塩基編集法

標的塩基の近傍のゲノム DNA を切断するために、gRNA と Cas9 を共発現するプラスミドベクター（人工ヌクレアーゼ）を構築する。この際に Cas9 遺伝子がピューロマイシン耐性遺伝子と 2A ペプチド配列を介して融合している px459 ベクター（米国 Addgene より入手）を用いる。gRNA を 3 種類以上デザインして、ヘテロ二重鎖形成能を指標にしたキャピラリー電気泳動による解析により、DNA 二重鎖切断活性の高い人工ヌクレアーゼ発現ベクターを選抜する。次に、標的多型を含むターゲティングドナー（ssODN）を作製する。CRISPR/Cas9 システムによる認識配列にアミノ酸置換を伴わないサイレント変異を導入し、そのサイレント変異が新規の制限酵素部位になるようにデザインする。ssODN を人工ヌクレアーゼとともにヒト細胞 HCT116 細胞にエレクトロポレーション法またはリポフェクション法で導入する。導入 24 時間後に 48 時間のピューロマイシン処理を行い、Cas9 発現細胞集団を選択する。その後、培地からピューロマイシンを除去して約 2 週間培養を継続すると、一過的薬剤耐性コロニーが形成される。顕微鏡下でコロニーを単離する。その後、ゲノム DNA を抽出して、制限酵素処理および直接シーケンス法により遺伝子型を判定する。

図 4 には、重力拮抗遺伝子で発がんプロセスに重要な *YAP1* 遺伝子の ssODN を用いた編集細胞クローン作製工程の概略を示す。

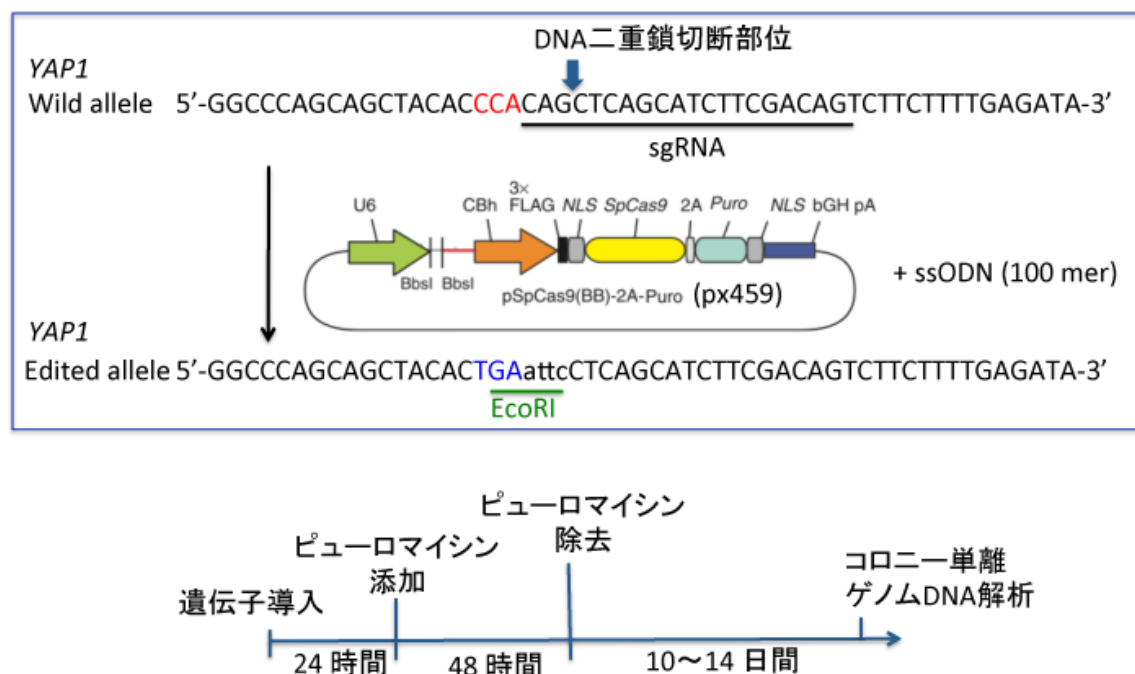


図 4 HCT116 細胞での一過的な薬剤選択による編集クローン作製工程

(2) ヒト正常組織由来 hTERT-PRE1 細胞における高効率なゲノム編集法の確立

一般に正常組織由来細胞は、内在性の相同組換え活性が低く、ゲノム編集法を用いても組換え体の単離が困難とされている。図 5a は、ヒト網膜色素上皮細胞株 hTERT-RPE1 細胞での初めての遺伝子ターゲティングである。当時の導入効率はわずかに約 1/80 の低効率だった。今後、放射線感受性の個人差を規定する遺伝的要因を正常細胞のバックグラウンドで評価する必要があると考え、ヒト網膜色素上皮細胞株におけるゲノム編集法として、相同組換え修復に依存しないゲノム編集法を整備する。

標的遺伝子を切断するために必要な CRISPR/Cas9 システムの gRNA 候補を 3 カ所抽出する。各 gRNA 配列をもつ px459 ベクターを作製した後、HEK293T 細胞に導入して 72 時間後にゲノム DNA を回収する。ヘテロ二重鎖を指標にしたキャピラリー電気泳動を行い、最も高い DNA 二重鎖切断活性をもつ gRNA を同定する。図 5b に示すように、同配列をもつネオマイシン耐性遺伝子発現ベクターをターゲティングベクターとして作製する。前述の px459 ベクターとターゲティングベクターを hTERT-RPE1 細胞にリポフェクション法で導入して、24 時間後からネオマイシンによる薬剤選択を行う。2 週間後に、薬剤耐性クローンを単離して、ゲノム DNA を回収して PCR および直接シーケンス法により遺伝子型判定を行う。

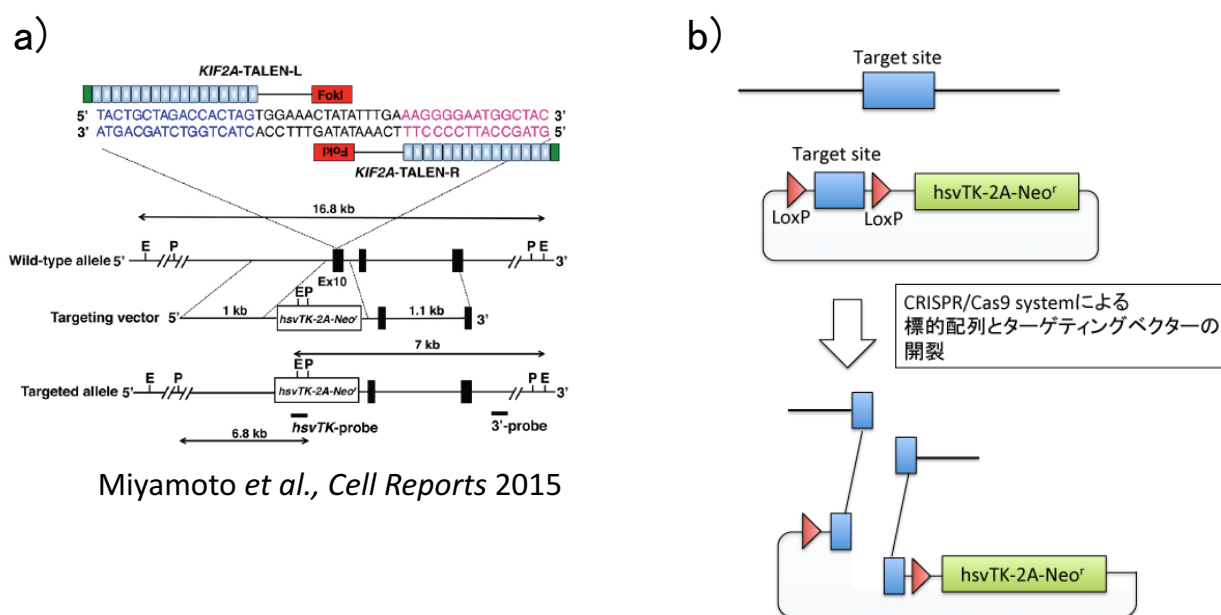


図 5 hTERT-RPE1 細胞における相同組換え修復活性に依存しないゲノム編集法

(3) マウスにおける一塩基編集法

個体レベルの放射線感受性の個人差を規定する遺伝素因の生物学的効果サイズを評価するシステムとして、本年度はマウスにおける一塩基編集法を整備する。

標的塩基の近傍に DNA 二重鎖切断を導入するために gRNA 配列をマウスゲノムデータベースより 3 カ所以上を抽出して、それぞれを Cas9 発現ベクター px459 に導入する。HEK293T 細胞を用いて、single-strand annealing (SSA) 法を用いて最大の DNA 二重鎖切断活性を示す gRNA を選択する。gRNA を *in vitro* 転写により人工合成する。図 6 に示すように、gRNA に加えて、点変異情報をもつ ssODN と Cas9 mRNA を同時に顕微注入法によりマウス受精卵に導入する。2 細胞期胚を偽妊娠マウス子宮に移植する。出生した F0 世代マウスの尾よりゲノム DNA を抽出して、標的塩基付近を直接シーケンス法により解析する。変異導入が確認された F0 マウスは、性成熟後、野生型マウスと交配して、F1 世代を得る。F1 世代も同様に遺伝子型判定を行い、点変異が生殖細胞系列に伝達されて系統化に成功したことを確認する。



図 6 マウスにおける一塩基編集法

3.1.3 研究の結果

(1) HCT116 細胞株における一過的な薬剤選択を用いた一塩基編集法

a. がん遺伝子 *YAP1* の P155X (463-465:CCC>TGA) ナンセンス変異導入細胞の樹立

がん遺伝子 *YAP1* の P155X ナンセンス変異をモデルにして、HCT116 細胞株における一過的な薬剤選択を介したワンステップの一塩基編集法の確立を行った。図 4 で示した gRNA を発現する Cas9-2A-ピューロマイシン耐性遺伝子発現ベクターと P155X 変異および *EcoRI* 切断部位をもつ 150 塩基の ssODN をエレクトロポレーション法により HCT116 細胞に導入した。48 時間のピューロマイシン処理後、14 日間培養を継続して 72 個のコロニーを得た。各クローンからゲノム DNA を抽出して、PCR 法により標的塩基付近を増幅した。PCR 断片を制限酵素 *EcoRI* で消化して、アガロース電気泳動法で分画した (図 7a)。*EcoRI* で消化後、野生型 PCR バンドが消失して組換え体型バンドのみが検出されるクローンが両アリル性に ssODN がノックインされたと推定された。この PCR 断片を直接シーケンス法で塩基配列を決定すると、予想通り ssODN の変異が両アリル性に導入されていることが確認できた (図 7b)。最終的に、4 クローンの *YAP1* P155X 変異をホモにもつ編集クローンを 5.6 %の頻度で樹立した (図 7c)。

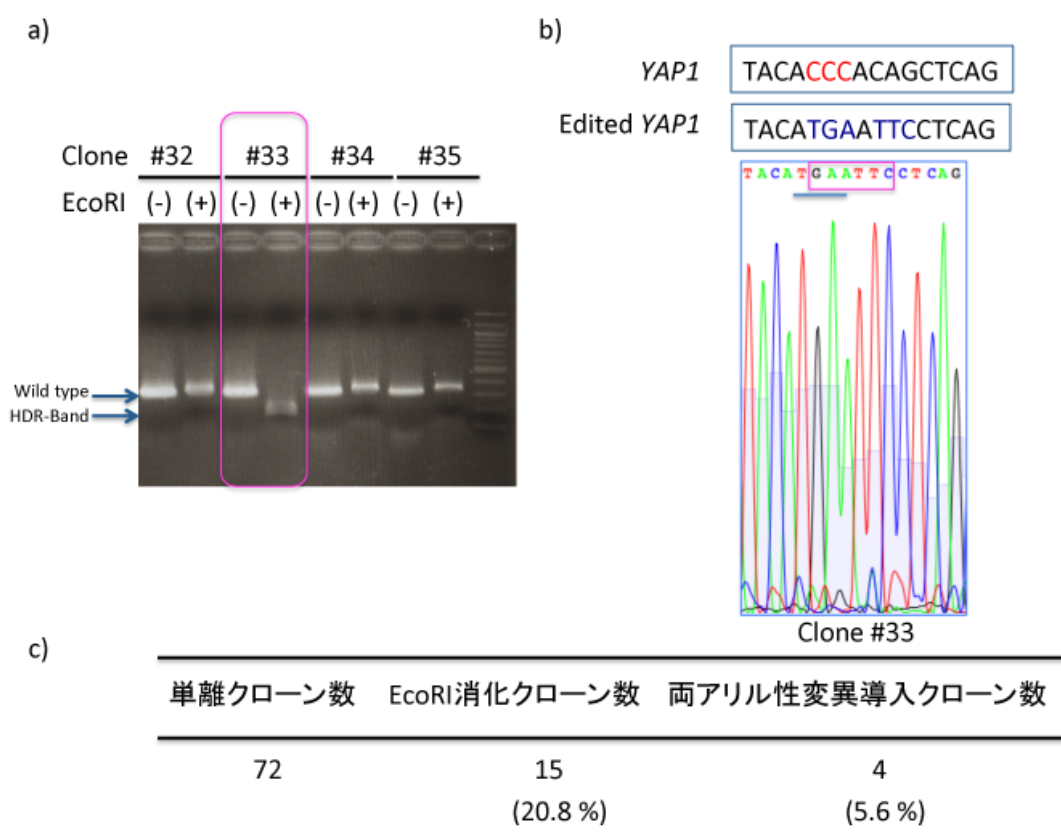
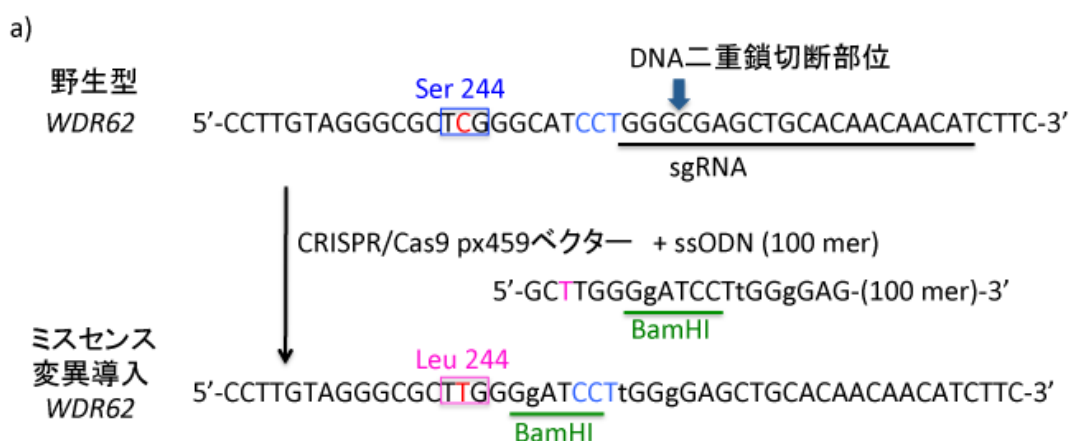


図 7 *YAP1* P155X ナンセンス変異導入細胞の樹立

b. 遺伝性小頭症遺伝子 *WDR62* の S244L (731C>T) ミスセンス変異導入細胞の樹立

一過的な薬剤選択を介したワンステップの一塩基編集法の汎用性を確認するために、日本人遺伝性小頭症家系で同定された小頭症遺伝子 *WDR62* の S244L(731C>T) 変異を HCT116 細胞株に同方法を用いて導入することを試みた。

図 8a で示した gRNA を発現する Cas9-2A-ピューロマイシン耐性遺伝子発現ベクターと S244L 変異および *Bam*HI 切断部位をもつ 100 塩基の ssODN をエレクトロポレーション法により HCT116 細胞に導入した。48 時間のピューロマイシン処理後、14 日間培養を継続して 75 個のコロニーを得た。各クローンからゲノム DNA を抽出して、PCR 法により標的塩基付近を増幅した。PCR 断片を制限酵素 *Bam*HI で消化して、アガロース電気泳動法で分画した。*Bam*HI で消化後、野生型 PCR バンドが消失して組換え体型バンドのみが検出されるクローンは、両アリル性に ssODN のノックインが推定された。この PCR 断片を直接シーケンス法で塩基配列を決定すると、予想通り *WDR62* の S244L 変異が両アリル性に導入されていた。最終的に、2 クローンの *WDR62* S244L ミスセンス変異をホモにもつ編集クローンを 2.7 % の頻度で樹立した (図 8b)。



b)

単離コロニー数	BamHI消化クローン数	両アリル性変異導入クローン数
75	7	2
	(9.3 %)	(2.7 %)

図 8 *WDR62* S244L ミスセンス変異導入細胞の樹立

WDR62 遺伝子変異による分子・細胞レベルでの小頭症発症機構はまだよくわかっていない。そこで *WDR62* S244L ミスセンス変異細胞を用いて細胞生物学的解析を行った。その結果、正常細胞の分裂期中期において、紡錘体は細胞接着面に対し水平に形成され均等分裂を保障しているのに対して、ミスセンス変異細胞では、微小管重合活性の低下により細胞分裂軸の不安定化が亢進していることを見出した（図 9）。

ヒトの神経発生において、神経幹細胞は均等分裂により十分な幹細胞数を確保した後、不均等分裂によってニューロンを産生することで正常な脳サイズが規定されている。本研究から、*WDR62* 遺伝子変異による細胞分裂軸制御の破綻が神経幹細胞集団の増大を阻害して、小頭症を引き起こしていることが示唆された。

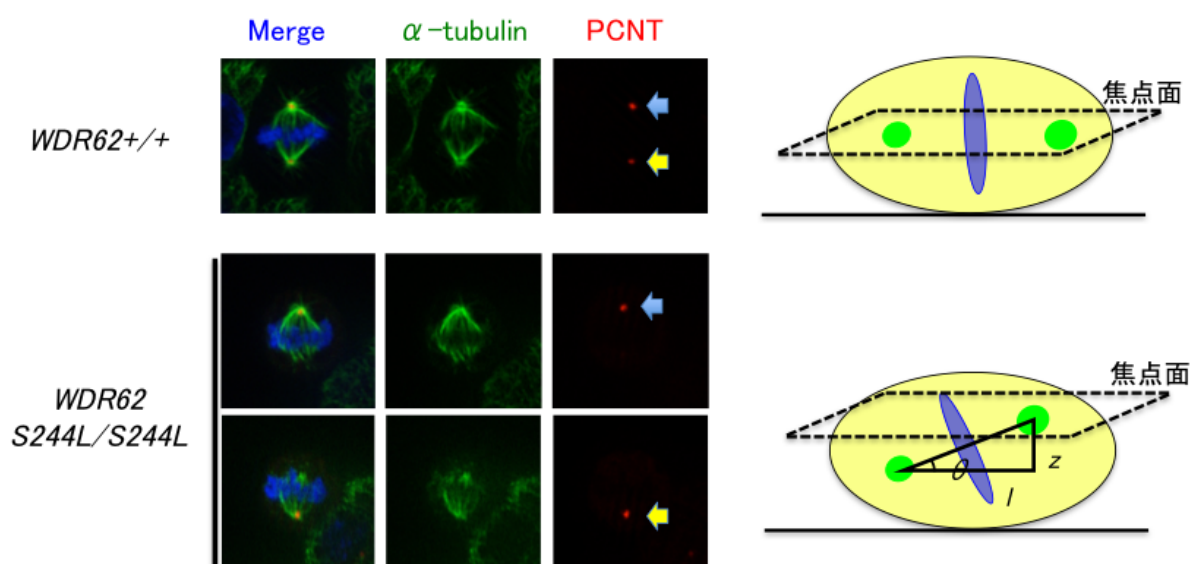


図 9 *WDR62* S244L ミスセンス変異導入細胞の細胞分裂軸の不安定化

c. ナイミーヘン症候群原因遺伝子 *NBS1* I171V(511A>G) 多型導入細胞の樹立

放射線高感受性遺伝病ナイミーヘン症候群の原因遺伝子 *NBS1* の標的多型 I171V(511A>G) 近傍の3カ所の gRNA のうち、sgRNA#2 が DNA 二重鎖切断導入の高い活性 DSB を示した (図 10a) 。I171V (511A>G) 多型と相同組換え体検出のため制限酵素 *ScaI* 切断部位を含むターゲティングドナー (ssODN) と CRSPR/Cas9-gRNA#2 を発現する px459 ベクターを HCT116 細胞株にリポフェクション法で共導入した (図 10b) 。Puromycin を培地に一過性に添加して、出現する単一細胞コロニーを単離した。それぞれのゲノム DNA を抽出して *ScaI* 制限酵素で処理した結果、複数の *ScaI* 消化陽性クローンを得た。これらの細胞クローンについて I171V 多型の有無をシーケンスで解析したところ、最終的に I171V 多型ホモ接合体を2クローンとヘテロ接合体を計2クローン得た。

さらに、上記編集細胞のコントロール細胞として、*ScaI* 部位を両アリル性にもつ細胞を同様の方法で樹立することを試みた (図 10b) 。その結果、511A (参照配列) と制限酵素 *ScaI* 部位を両アリル性にもつ2つのクローンを得た (図 10c) 。これら6クローンの *NBS1* タンパク質の発現は、HCT116 親細胞と発現量に差がないことをウェスタンブロット法で確認した (データ未提示) 。

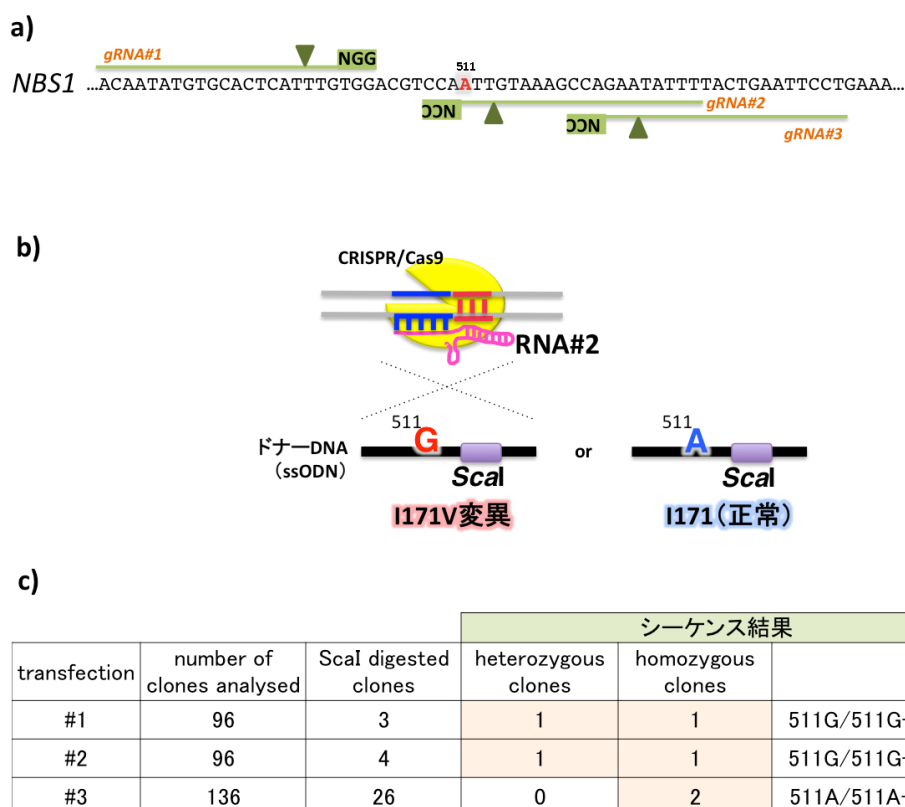


図 10 *NBS1* I171V 多型導入細胞の樹立

NBS1 多型 I171V のホモ接合体 (511G/G) 2 クローンとヘテロ接合体 (511G/G) 2 クローン、野生型 (511A/A) 2 クローンの放射線照射後の微小核形成頻度を検討した。その結果、*NBS1* 多型のホモ接合体 (511G/G) の微小核形成頻度が最も高く、ヘテロ接合体 (511G/G) はホモ接合体 (511G/G) と野生型 (511A/A) の中間の値を示した。このことから、*NBS1* 多型 I171V が放射線感受性を規定する遺伝的素因であることが明らかとなった。

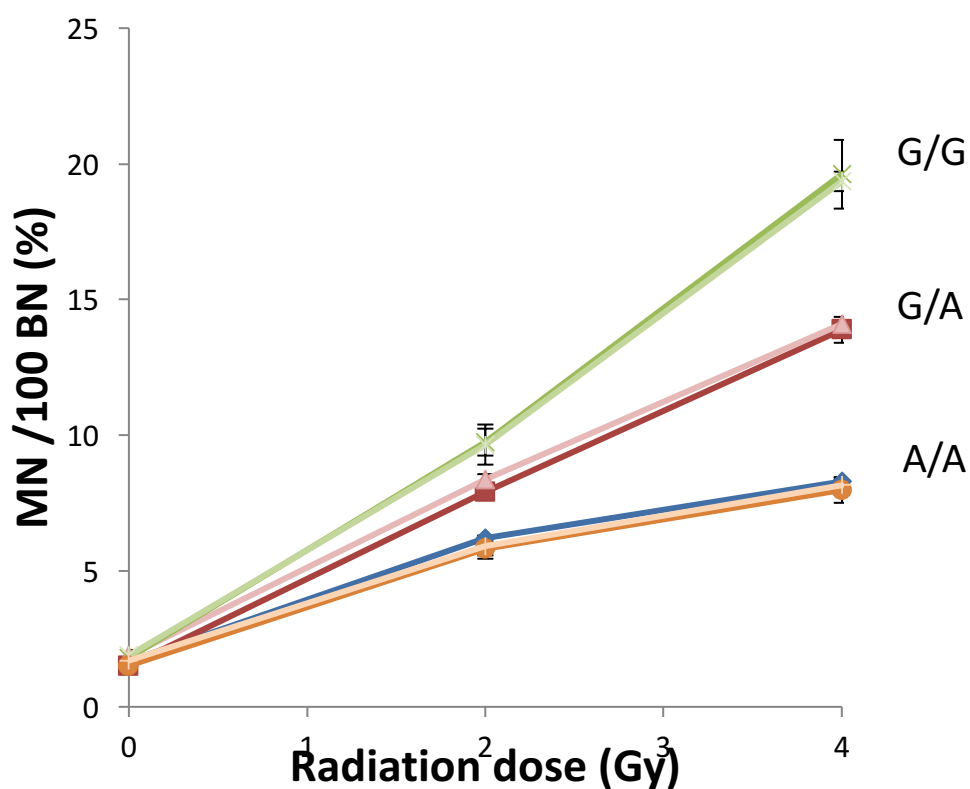


図 11 *NBS1* I171V 多型導入細胞の微小核形成頻度

d. ナイミーヘン症候群原因遺伝子 *NBS1* 657del5 変異導入細胞の樹立

ナイミーヘン症候群の *NBS1* 原因変異（657del5）を導入した細胞の樹立を行った。*NBS1* 遺伝子（657del5）の4つの gRNA のうち、gRNA#2 が最も高活性に DNA 二重鎖切断を誘導することを、ヘテロ二重鎖を指標にしたキャピラリー電気泳動で確認した（図 12a, b）。657del5 と相同組換え体検出のため制限酵素 *DraI* 認識部位を含むターゲティングドナー（ssODN）と CRISPR/Cas9-gRNA#2 を HCT116 細胞株にリポフェクション法で共導入した（図 12c）。Puromycin を培地に一過性に添加して、出現する単一細胞コロニーを単離した。各クローンのゲノム DNA を抽出して標的変異付近を PCR で増幅後、*DraI* 制限酵素処理を行った。*DraI* 消化細胞クローンの標的変異付近を直接シーケンス法により解析した。最終的に、657del5 ヘテロ接合体を計4クローン得た（図 12d）。さらに、657del5 を伴わず *DraI* 制限酵素部位のみを導入したホモ接合体4クローンとヘテロ接合体2クローンを樹立した（図 12d）。これらの細胞クローンはコントロールとして使用することができる。

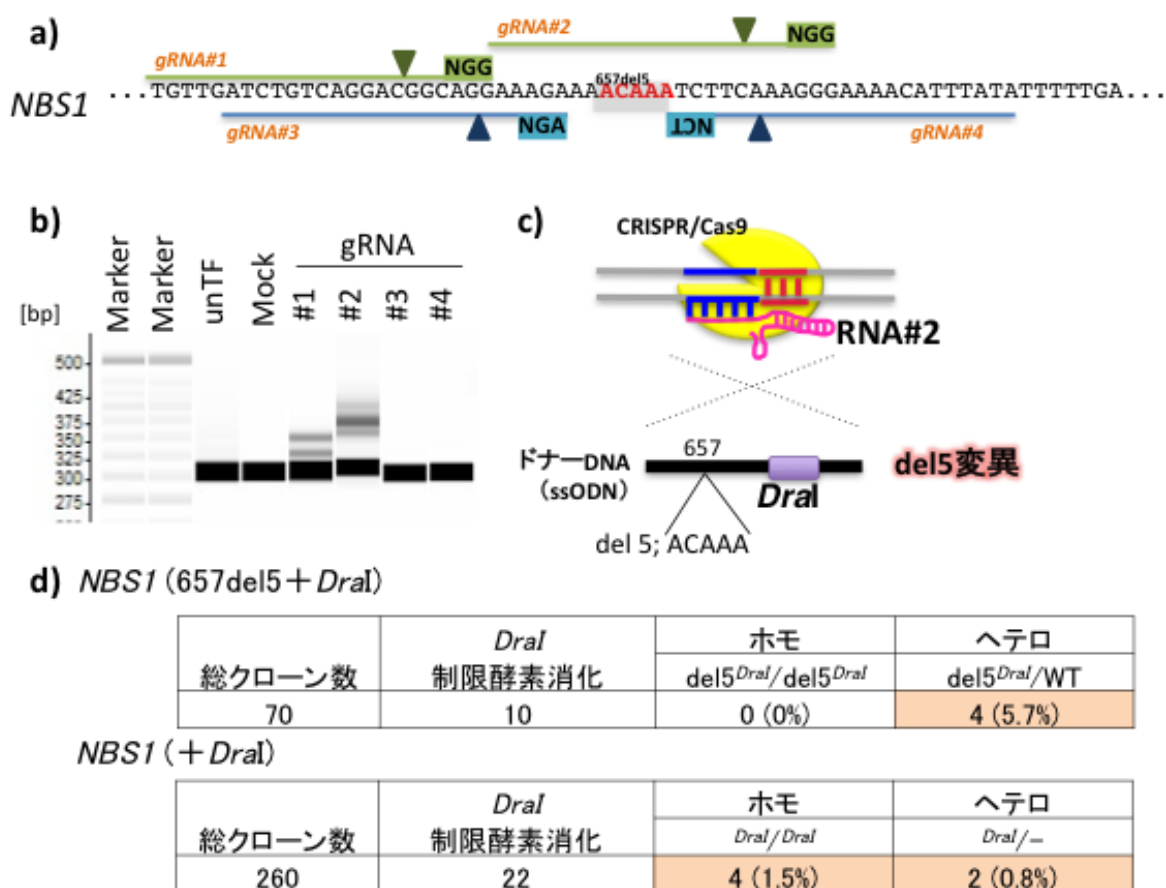


図 12 *NBS1* 657del5 変異導入細胞の樹立

d. *Lig4* 症候群原因遺伝子 *Lig4* A3V(8C>T) 多型/T9I (26C>T) 多型導入細胞の樹立

LIG4 遺伝子 (8C>T, 26C>T) 近傍の 6 つの gRNA のうち gRNA#2 が最も高い DNA 二重鎖切断導入活性をもつことを、ヘテロ二重鎖を指標にしたキャピラリー電気泳動解析により明らかにした (図 13a, b)。*Lig4* A3V(8C>T), T9I(26C>T) 多型と相同組換え体検出のため制限酵素 *Aat*II 切断部位を含むターゲティングドナー (ssODN) と CRISPR/Cas9-gRNA#2 を発現する px459 ベクターを HCT116 細胞株にリポフェクション法で共導入した (図 13c)。

Puromycin を培地に一過性に添加して、出現する単一細胞コロニーを単離した。各クローンのゲノム DNA を抽出して、標的多型付近を PCR 法により増幅して、PCR 断片を *Aat*II 制限酵素で処理した。*Aat*II 消化陽性クローンの標的多型部位を直接シーケンス法により塩基配列を決定した。その結果、8T/8T+26C/26T (A3V ホモ+T9I ヘテロ) 編集細胞を 2 クローン、8T/8T+26T/26T (A3V ホモ+T9I ホモ) 編集細胞を 1 つ得た (図 13d)。

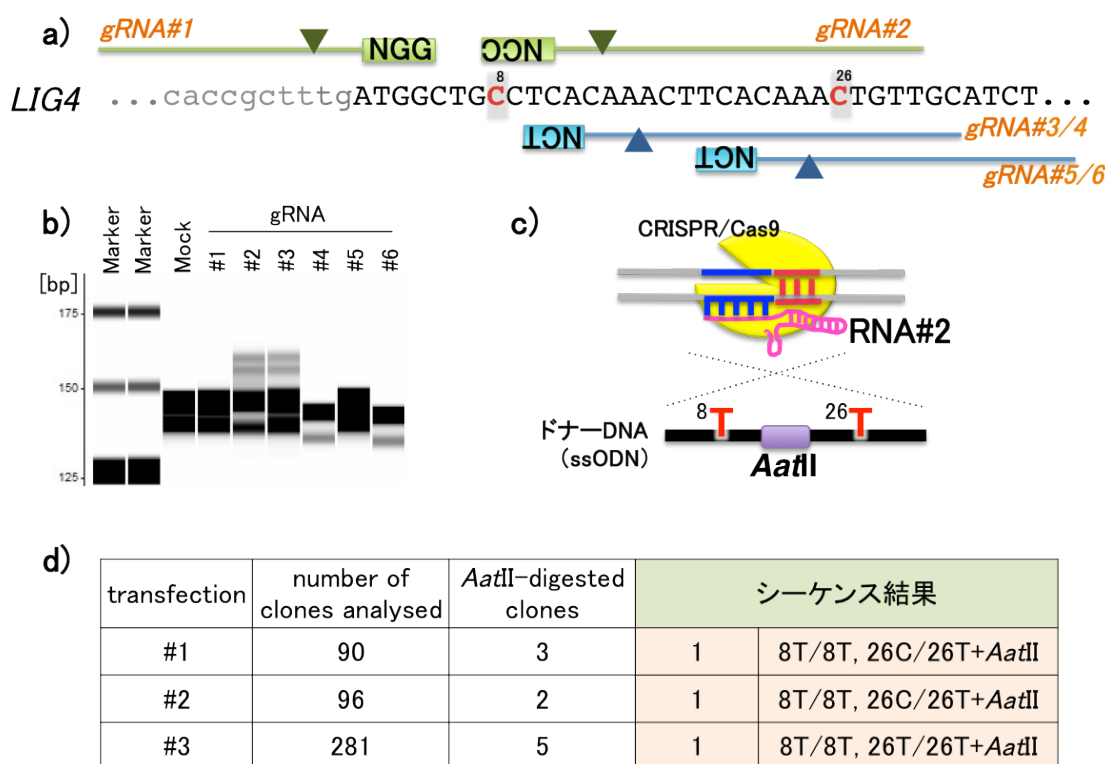


図 13 *Lig4* A3V 多型/T9I 多型導入細胞の樹立

(2) ヒト正常組織由来 hTERT-PRE1 細胞における高効率なゲノム編集法の確立

相同組換え活性の低いヒト網膜色素上皮細胞株 hTERT-RPE1 細胞株におけるゲノム編集法として、NHEJ 活性を利用したゲノム編集法を整備する。

標的遺伝子を切断するために必要な CRISPR/Cas9 システムの gRNA 候補を 3 カ所抽出して、ヘテロ二重鎖を指標にしたキャピラリー電気泳動を行い、最も高い DNA 二重鎖切断活性をもつ gRNA を同定した。同配列をネオマイシン耐性遺伝子発現ベクター内に挿入して、これをターゲティングベクターとして用いた。px459 ベクターとターゲティングベクターを hTERT-RPE1 細胞にリポフェクション法で共導入して、24 時間後からネオマイシンによる薬剤選択を行った。2 週間後に、薬剤耐性クローンを単離して、ゲノム DNA を回収して PCR 法による遺伝子型判定を行った。片アレル性にターゲティングベクターが導入され、もう一方のアレルが野生型と同じ PCR バンドが得られた場合、後者のバンドを直接シーケンス法により塩基配列決定を行った。PCR 法と直接シーケンス法を併用して、総合的に遺伝子型を判定した。

図 14 に示すように、毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子 *ATM* の欠損細胞をはじめ 16 種類の hTERT-RPE1 細胞株での遺伝子破壊クローンを作製した。

遺伝子名	分子機能	遺伝病	進捗状況 (CRISPR-OBLIGARE法)
ATM	染色体安定性	A-T	Null細胞 2 clones樹立済み
YAP	染色体安定性	-	Null細胞 4 clones樹立済み
Chk2	染色体安定性	Li Fraumeni症候群	Null細胞 1 clones樹立済み
BubR1	染色体安定性	PCS症候群	Null細胞 1 clone樹立済み
ATR	染色体安定性	ATR-seckel症候群	ヘテロ細胞 1 clone
BLM	染色体安定性	Bloom症候群	ヘテロ細胞 2 clone
Rad21	染色体安定性	CdLS	ヘテロ細胞 1 clone
BRCA1	染色体安定性	HBOC	Null細胞 2 clones 樹立済み ヘテロ細胞 4 clone
BRCA2	染色体安定性	HBOC/Fanconi貧血	ヘテロ細胞 2clone
Rad51C	染色体安定性	-	ヘテロ細胞 3clone
YAP	染色体安定性	-	Null細胞 4 clones 樹立済み
MST1	染色体安定性	-	Null細胞 2 clones 樹立済み
MST2	染色体安定性	-	Null細胞 4 clones樹立済み
NF2	染色体安定性	II 型神経線維腫症	Null細胞 4 clones樹立済み
P27	染色体安定性	-	Null細胞 5 clones樹立済み
TP53	染色体安定性	Li Fraumeni症候群	Null細胞 8 clones樹立済み

図 14 放射線感受性の遺伝素因と予測される遺伝子のゲノム編集細胞の作製

さらに、放射線感受性の遺伝素因が推定された種々の遺伝病について、同様の NHEJ 活性を利用したゲノム編集法を用いて種々のモデル細胞を作製した。1 ヶ月で 10 遺伝子のゲノ

ム編集が可能であり、130 種類のゲノム編集細胞を樹立した。本事業で開発したゲノム編集技術を、国内初のゲノム編集の入門教科書に記載した（図 15）。

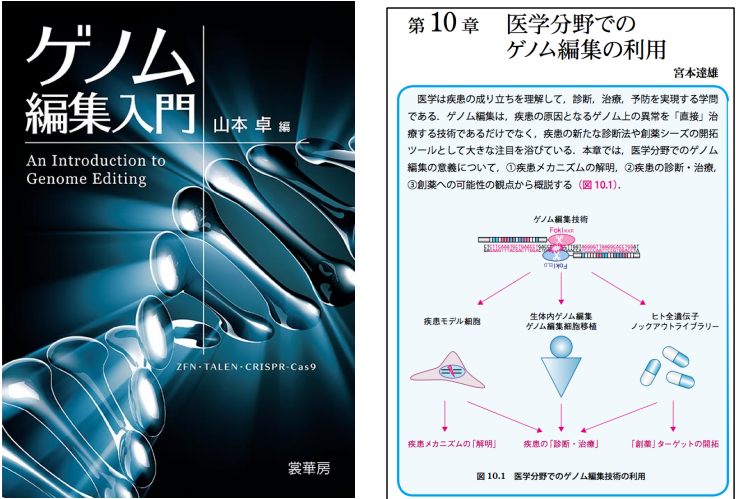


図 15 hTERT-RPE1 細胞におけるゲノム編集の実績とゲノム編集入門書の出版

(3) マウスにおける一塩基編集法

PCS 症候群は、放射線照射後に染色体不安定性が誘発されることが示唆されている。PCS 症候群日本人患者で同定された 1833delT (F611fx625) を ssODN と CRISPR/Cas9 システムを用いて、マウスに導入することを試みた。

標的塩基の近傍に DNA 二重鎖切断を導入するために gRNA 配列をマウスゲノムデータベースより 3 カ所以上を抽出して、HEK293T 細胞を用いた single-strand annealing (SSA) 法を用いて、最大の DNA 二重鎖切断活性を示す gRNA を選択した。変異情報として *BubR1* 1833delT のみもつ ssODN1 と 1833delT の直下にストップコドンを含めた ssODN2 の 2 種類を使用した。*in vitro* 転写により人工合成した gRNA、ssODN に加えて Cas9 mRNA を同時に顕微注入法によりマウス受精卵に導入した。2 細胞期胚を偽妊娠マウス子宮に移植した。出生した F0 世代マウスの尾よりゲノム DNA を抽出して、標的塩基付近を直接シーケンス法により解析した結果、ssODN1 および ssODN2 に由来する変異をもつ F0 個体をそれぞれ 1 匹ずつ得た。変異導入が確認された F0 マウスを性成熟後、野生型マウスと交配して、F1 世代を得た。図 16 に示すように ssODN1 に由来する *BubR1* 1833delT 変異が F1 世代マウスでも検出され、点変異が生殖細胞系列に伝達されて系統化に成功した。

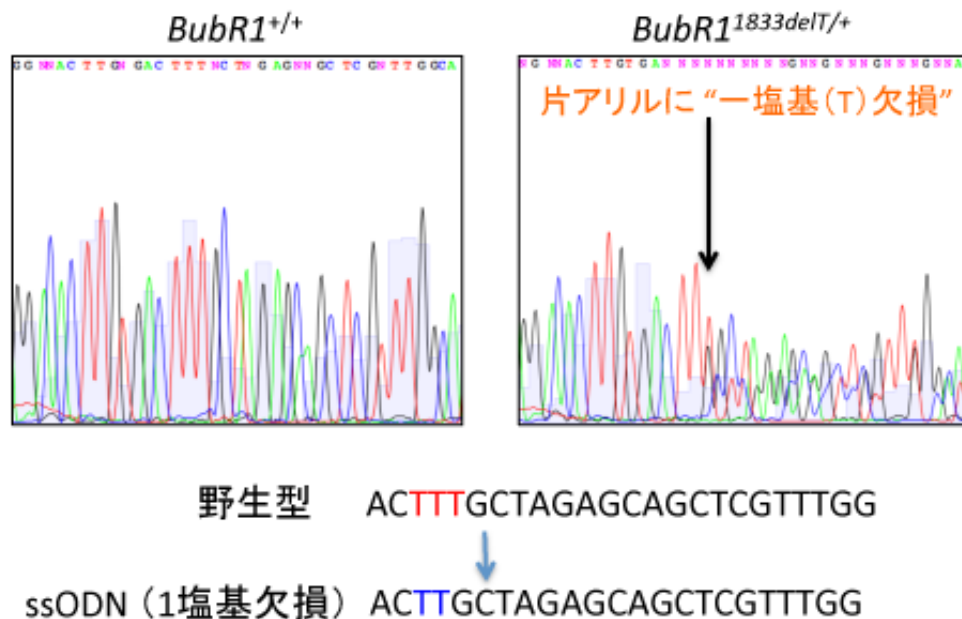


図 16 一塩基編集法を用いた *BubR1* 1833delT 変異導入マウスの樹立

3.1.4 結果の分析と考察

一過的な薬剤選択を介した ssODN と CRISPR/Cas9 システムを用いた HCT116 細胞株における一塩基編集法を構築した。その結果、4 遺伝子 6 種類のゲノム編集細胞クローンの樹立に成功した。変異部位と CRISPR/Cas9 システムによる DNA 二重鎖切断導入部位が接近しているほど、点変異導入効率が上昇する傾向があった。今後も本手法を用いて他の DNA 修復遺伝子の放射線感受性候補 SNP の導入細胞の樹立を継続して実施する予定である。

また、遺伝子ターゲティングが困難であったヒト網膜色素上皮組織由来細胞株 hTERT-RPE1 細胞における相同組換え修復に依存しないゲノム編集法を確立した。本法を用いて、本年度は 15 遺伝子 15 種類の編集細胞クローンを樹立した。今後、本法を改良して、正常細胞株における一塩基編集法の開発を行い、培養細胞における一塩基編集法の汎用化を試みる。

さらに、ssODN と CRISPR/Cas9 システムを用いた一塩基編集マウスの作製手法を整備した。これにより、放射線照射後の染色体不安定性が亢進することが示唆されている PCS 症候群の疾患モデルマウスの系統化に成功した。本手法を用いて、NBS1 I171V 多型を導入したモデルマウスの作製を試みており、個体レベルでの放射線感受性の個人差を規定する遺伝素因の評価を行う予定である。

3.2 放射線高感受性が予想されるヒト細胞の収集

3.2.1 研究の目的

ヒト健常者集団にも放射線感受性の一群が存在することを実証することを研究目的として、放射線高感受性が予想されるヒトの血液サンプルおよび皮膚線維芽細胞を全国の遺伝医学研究者ネットワークおよび細胞バンクを通じて入手する。

3.2.2 研究の方法

放射線高感受性が予想されるPCS症候群の皮膚線維芽細胞を国内の研究者から入手した。また、放射線高感受性遺伝病の代表疾患である毛細血管拡張性運動失調症（A-T）の家系構成員の線維芽細胞を細胞バンクから入手した。

3.2.3 研究の結果

(1) PCS 症候群患者の皮膚線維芽細胞

放射線高感受性が予想される疾患として PCS 症候群の皮膚線維芽細胞を国内の研究者から入手した。皮膚線維芽細胞は、日本人 PCS 症候群 1 家系の CB1 および CB4 の同胞 2 例に由来している（図 17）。本患者は分裂期チェックポイント分子 *BubR1* 遺伝子の R199P（595G>C）のミスセンス変異と転写開始点上流 44kb の点変異（ss802470619）の複合ヘテロ接合体である。PCS 症候群は、先天性の分裂期チェックポイント欠損症であり、染色体不安定性による高発がん性と、一次繊毛形成不全による繊毛病症状を特徴とする。これまで放射線感受性について検討されていなかったため、PCS 症候群患者の皮膚線維芽細胞を入手するとともに、微小核法および Dicentric 法を実施して放射線感受性を測定した。PCS 症候群細胞の放射線照射後の微小核形成率および Dicentric 法の結果は、「3.3.3 研究の結果」で述べる。

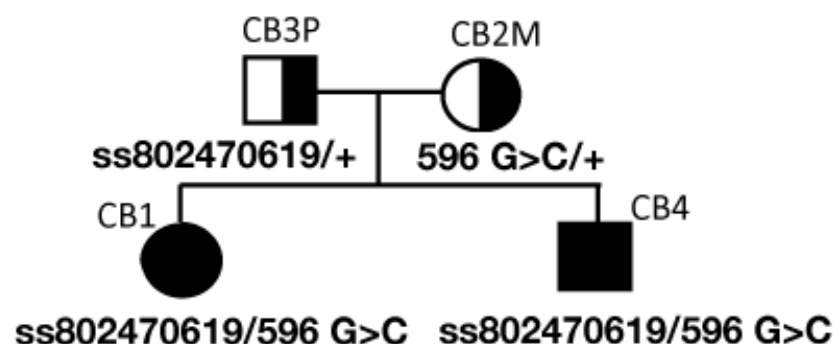


図 17 日本人 PCS 症候群の 1 家系（CB 家系）

(2) 毛細血管拡張性運動失調症 (A-T) 家系の皮膚線維芽細胞

放射線高感受性遺伝病を代表する毛細血管拡張性運動失調症 (A-T) 家系の皮膚線維芽細胞を細胞バンクから入手した。A-T は、DNA 二重鎖切断を認識する ATM キナーゼをコードする *ATM* 遺伝子の変異によって発症する高発がん性と神経変性に特徴づけられる常染色体劣性遺伝病である。入手した A-T 家系の患者は、*ATM* 遺伝子の S381X (1141ins4) 変異と K2756X (8266A>G) 変異の複合ヘテロ接合体である (図 18a)。A-T 家系の各線維芽細胞のタンパク質抽出物を調整して、抗 ATM 抗体および内部コントロールとして抗 beta tubulin 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。その結果、患者 (#87) は ATM タンパク質が完全に欠損しており、保因者 (#88, 88, 89) の ATM タンパク質量は健常者 (野生型; #91, 92) に比べて 50 % 程度減少していることが示された (図 18b)。また、本サンプルを用いて微小核法および Dicentric 法を実施して放射線感受性を測定した。A-T 家系の皮膚線維芽細胞の放射線照射後の微小核形成率の結果は、「3.3.3 研究の結果」で述べる。

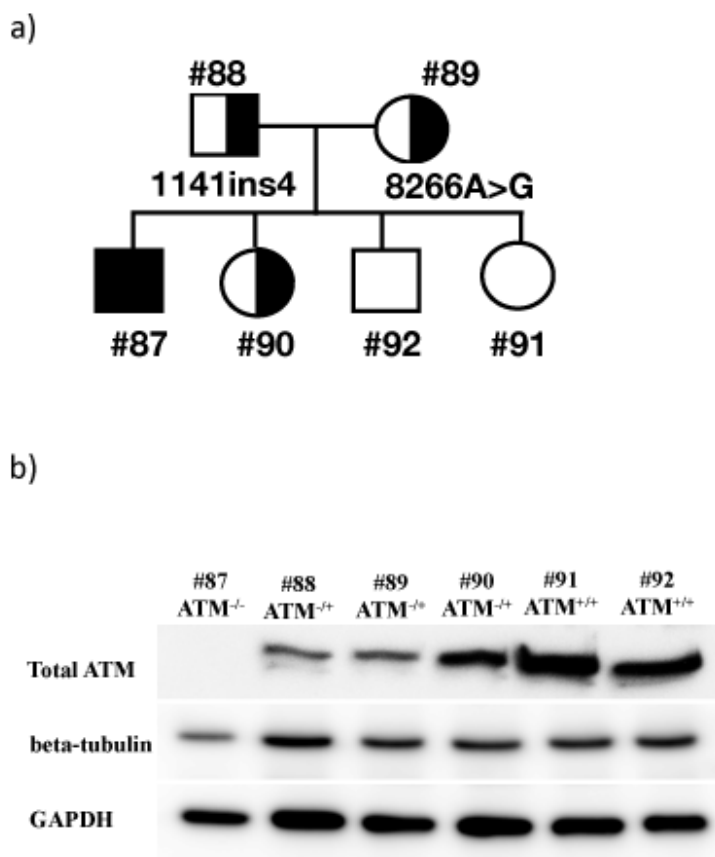


図 18 毛細血管拡張性運動失調症 (A-T) の 1 家系

(2) 卵巣がん患者の末梢血リンパ球

放射線高感受性が予想される疾患として卵巣がんが知られている。卵巣がん患者 52 名の末梢血を広島大学病院産婦人科から入手した。ただし、対象とした患者は、末梢血白血球数と血小板数、ヘモグロビン、血清クレアチニン、血清総ビリルビンが正常を示した症例に限定した。インフォームドコンセントを取得後、末梢血液を 15 ml 採取した。フィコールを用いた密度勾配遠心法により末梢リンパ球を精製して、放射線急照射（0.5 Gy、1 Gy、2 Gy）後の末梢血リンパ球を 2～3 日間培養して、微小核頻度の計測を自動染色体解析装置メタフアー（Zeiss 社、原医研共通機器）により実施して、放射線感受性の定量的な評価を行った。放射線照射後の微小核形成率の結果は、「3.3.3 研究の結果」で述べる。また、次世代シーケンサーを用いて各試料の DNA 修復などゲノム安定化関連遺伝子群のターゲットリシーケンスを行い、放射線高感受性と相関する遺伝子多型を抽出した。

3.3 放射線感受性の定量的評価

3.3.1 研究の目的

健常者細胞として、末梢血リンパ球と初代線維芽細胞、B 細胞株が入手可能である。これまでに、健常者細胞の放射線感受性の定量的評価システムとして、末梢血リンパ球と B 細胞株のような浮遊細胞のサイトジェネティックスクリーニングシステムを利用した定量的微小核法を確立した。研究項目(1)で作製したモデル細胞や研究項目(2)で入手した皮膚線維芽細胞をはじめとする接着性細胞の放射線感受性を多角的かつ定量的に評価するシステムを構築することを研究目的として、サイトジェネティックスクリーニングシステムを使用した接着細胞の微小核法および染色体法の確立を行う（図 19）。

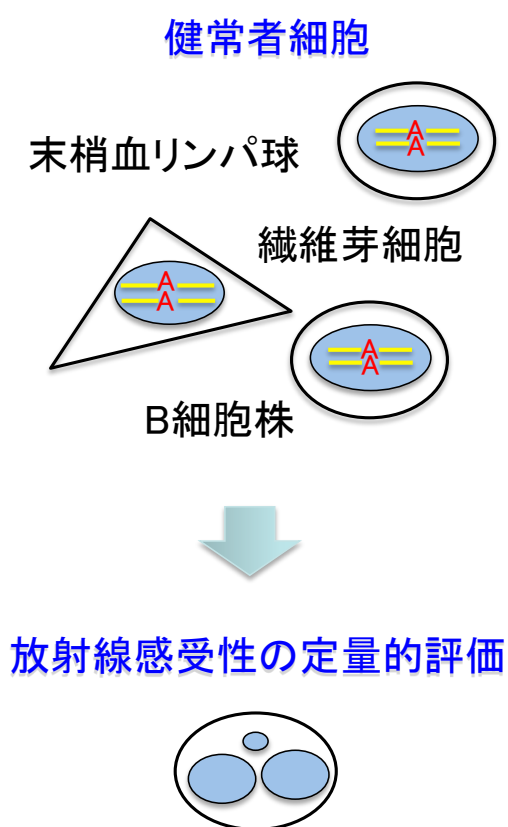


図 19 健常者細胞を用いた放射線感受性の測定

3.3.2 研究の方法

(1) 線維芽細胞の微小核法プロトコール

【1日目】

線維芽細胞を 15%FBS 添加 D-MEM 培地を加えたディッシュで培養する。培養開始 4 時間後に放射線を照射してさらに 48 時間培養する。

【3日目】

放射線を照射 48 時間後に、サイトカラシン B を培地に添加してさらに 20 時間培養する。

【4日目】

細胞を PBS で洗浄後、メタノールを加えて -20°C 、15 分間処理して細胞を固定する。1 % BSA/PBS を加えて、室温で 30 分間静置する。DAPI を用いて細胞核を染色する。Zeiss 社の Metafer システムを用いて微小核を観察・計測する。

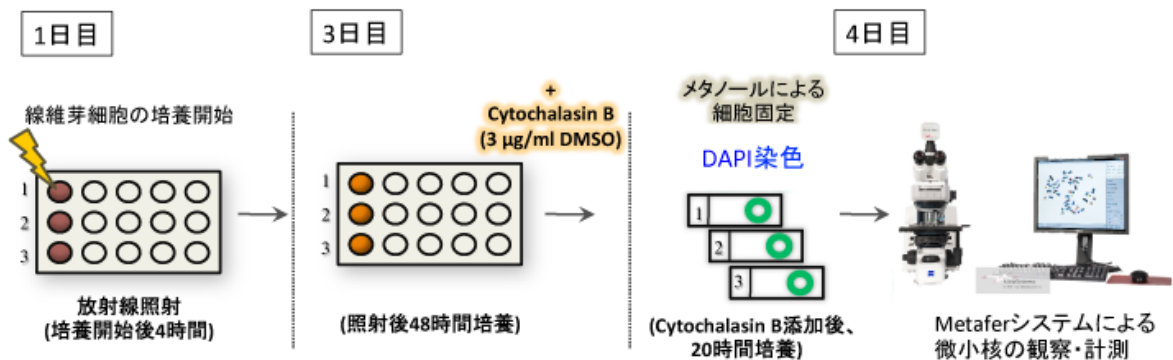


図 20 皮膚線維芽細胞の微小核プロトコール

(2) 線維芽細胞の Dicentric 法プロトコール

【1日目、2日目】

線維芽細胞を 15%FBS 添加 D-MEM 培地を加えたディッシュで培養する。培養開始 24 時間後に放射線を照射してさらに 48 時間培養する。

【3日目】

放射線を照射 18 時間後に、コルセミドを培地に添加してさらに 6 時間培養する。トリプシン処理により細胞を遠心管に回収する。20 分間の低張液処理後に、カルノア液を添加して細胞を固定する。染色体展開装置 HANABI を用いて、スライドガラス上に染色体を展開する。PNA-FISH 法を用いて、テロメア、セントロメアを染色する。カウンター染色として DAPI を用いて染色体全体を染色する。Zeiss 社の Metafer システムを用いて染色体の構造異常を観察・計測する。

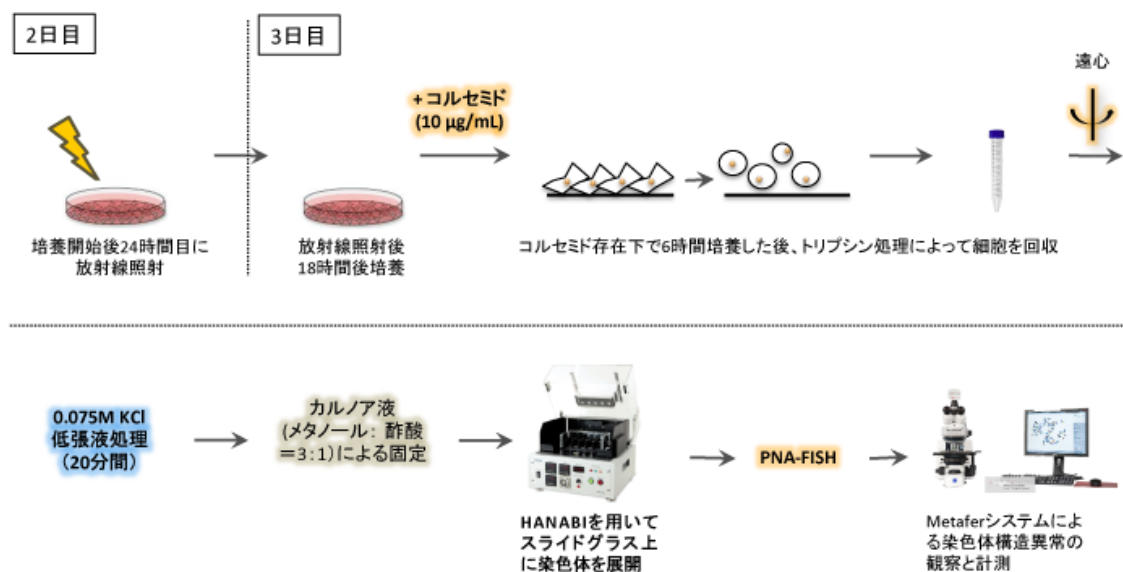


図 21 皮膚線維芽細胞の Dicentric 法プロトコール

3.3.3 研究の結果

(1) PCS 症候群患者の放射線急照射後の微小核形成頻度

PCS 症候群は、先天的に分裂期チェックポイント分子 BubR1 が欠損した染色体不安定性遺伝病であり、臨床的に高発がん性を示す。これまでに PCS 症候群患者の末梢血リンパ球を用いて放射線照射後の微小核形成率の亢進を明らかにした。さらに、別家系の PCS 症候群患者の皮膚線維芽細胞を用いて微小核形成法を検討した。PCS 症候群患者細胞 CB1、CB4 は、分裂期チェックポイントの破綻によって放射線非照射時でも、健常者コントロールに比べて高い微小核形成率を示した。さらに、1 Gy、2 Gy の放射線急照射後の微小核形成率についても、PCS 症候群患者細胞は健常者コントロールに比べて有意に高いことが示された（図 22）。以上の結果から、PCS 症候群が、新たな放射線感受性遺伝病の一つであることが示唆された。

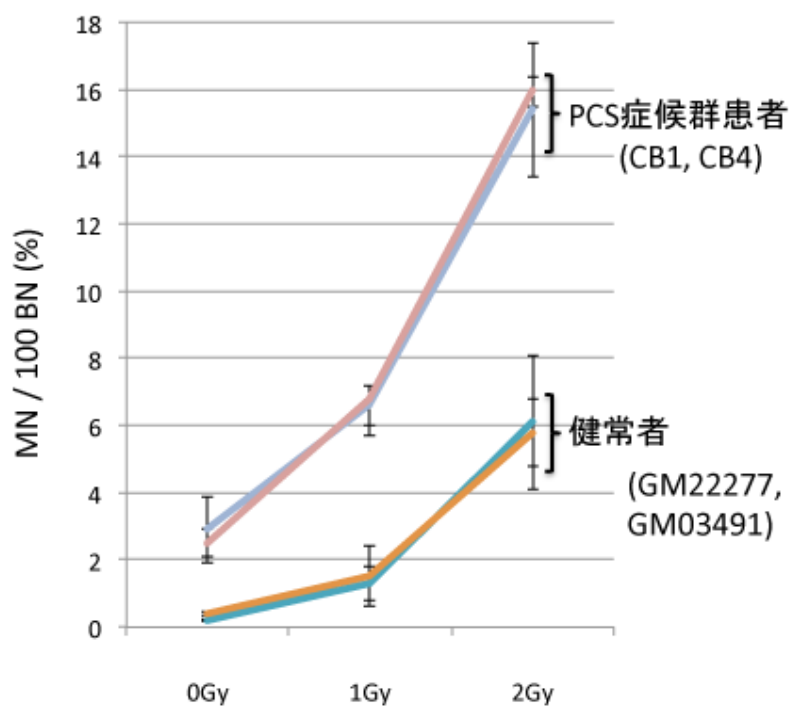


図 22 PCS 症候群患者由来皮膚線維芽細胞の放射線急照射後の微小核形成率

(2) PCS 症候群患者の放射線急照射後の Dicentric 染色体頻度

PCS 症候群の放射線感受性を多角的に評価するために、定量的 Dicentric 法を用いて患者細胞の放射線照射後の染色体構造異常の観察および測定を行った。放射線照射後、DNA 二重鎖切断の修復に失敗した細胞では、二動原体染色体 (Dicentric Chromosome :DIC) や環状染色体といった不安定型染色体が出現する (図 23a)。本研究では、不安定型染色体の成り立ちをもとにして、二動原体染色体と環状染色体は等価なゲノム損傷と評価して、分裂期中期総数における二動原体染色体 (DIC) 数の百分率として放射線感受性を評価した。その結果、PCS 症候群患者細胞 CB1、CB4 は、健常者コントロール GM22277、GM03491 に比べて 1 Gy、2 Gy の放射線照射後、高い DIC 染色体形成率を示した (図 23b)。健常者集団、PCS 症候群患者集団ごとの放射線急照射後の DIC 染色体形成率を比較したところ、PCS 症候群患者では有意に放射線感受性が亢進していた (図 23c)。さらに、PCS 症候群患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立して、DIC 染色体形成率を比較したところ、線維芽細胞と同様に iPS 細胞は高い頻度を示した (データ未提示)。以上の結果から、PCS 症候群の原因遺伝子産物の BubR1 が放射線照射後の染色体構造を安定化する新たな分子機能をもつことが示唆された。

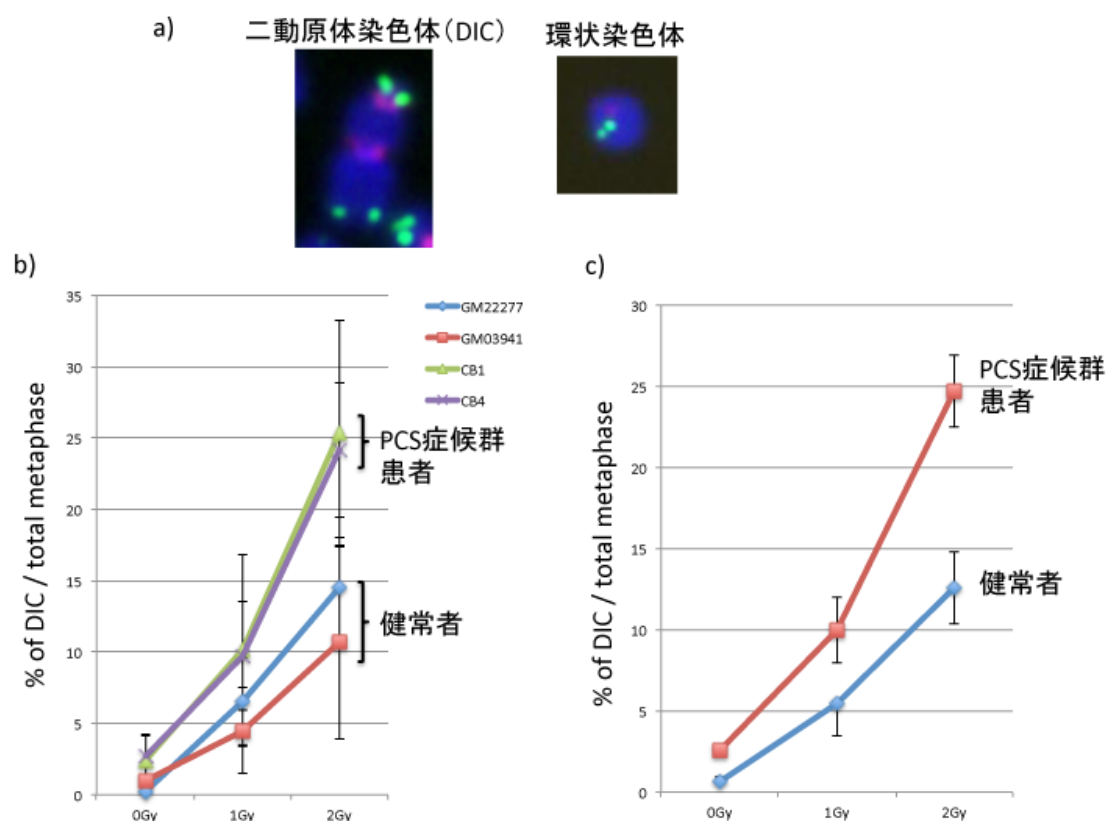


図 23 PCS 症候群患者由来線維芽細胞の放射線急照射後の Dicentric 染色体頻度

(3) 毛細血管拡張性運動失調症 (A-T) 家系の放射線急照射後の微小核形成頻度

A-T 家系の皮膚線維芽細胞を用いて、0.5 Gy、1 Gy、2 Gy の放射線急照射後の微小核形成率を 3 回検討した。放射線感受性の個人差を認め、再現性も確認された (図 24a、c、e)。図 24b、d、f はそれぞれ a、c、e の縦軸を拡大したものである。

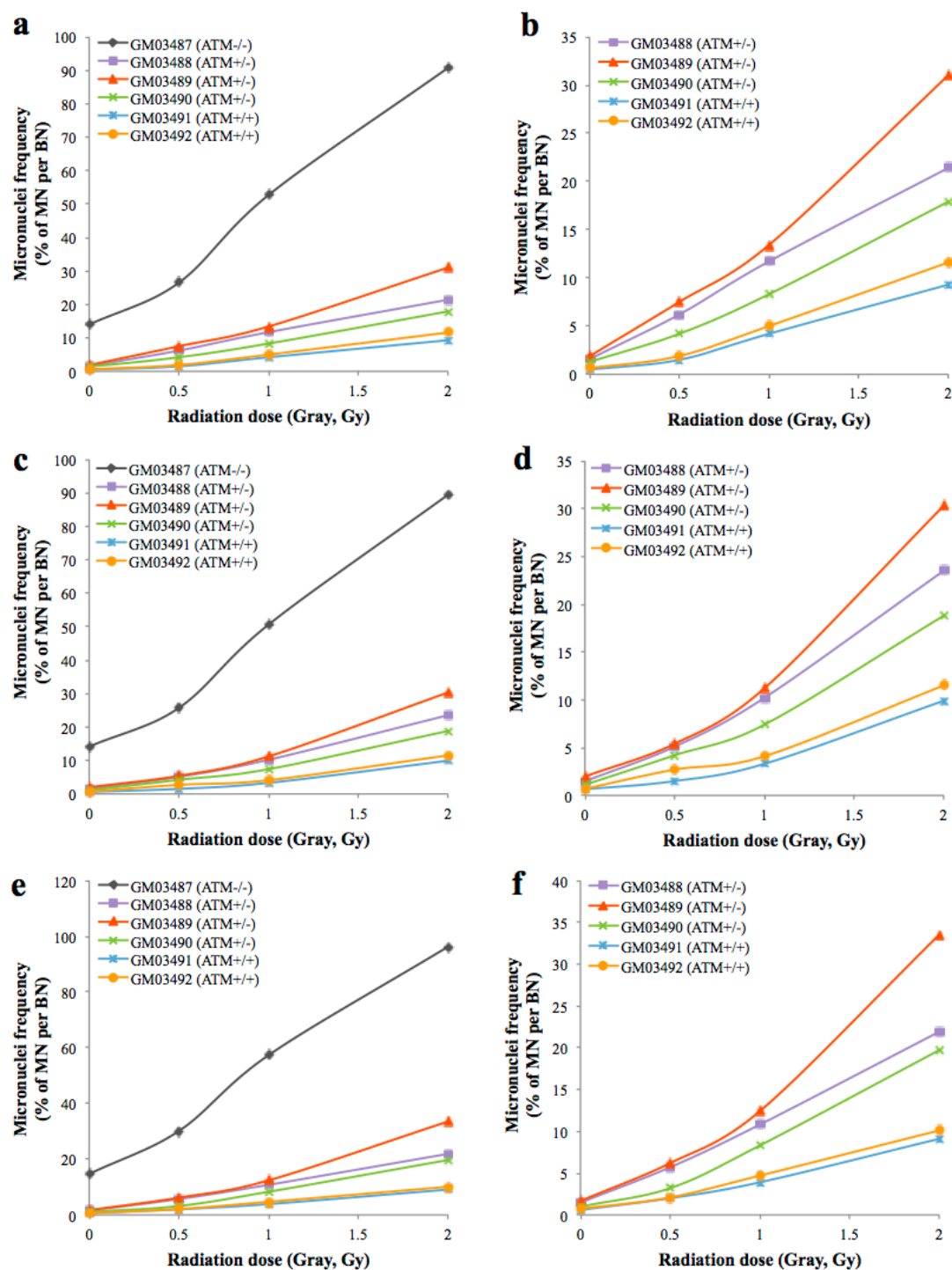


図 24 A-T 家系線維芽細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度 (3 回実施)

A-T 家系の線維芽細胞の ATM タンパク質発現は遺伝子型に一致した発現パターンを示した (図 25a)。図 25e は、図 24 で実施した 3 回の実験結果をまとめたものである。A-T 患者は、0.5 Gy、1 Gy、2 Gy のいずれも、健常者および A-T 保因者に比べて高い微小核形成率を示した (図 25)。さらに興味深いことに、A-T 保因者は臨床的には健常だが、3 名いずれも正常コントロールに比べて有意に微小核形成率が亢進していた (図 25)。この結果は、健常者集団に放射線感受性の一群が存在する根拠の一つと考えられた。

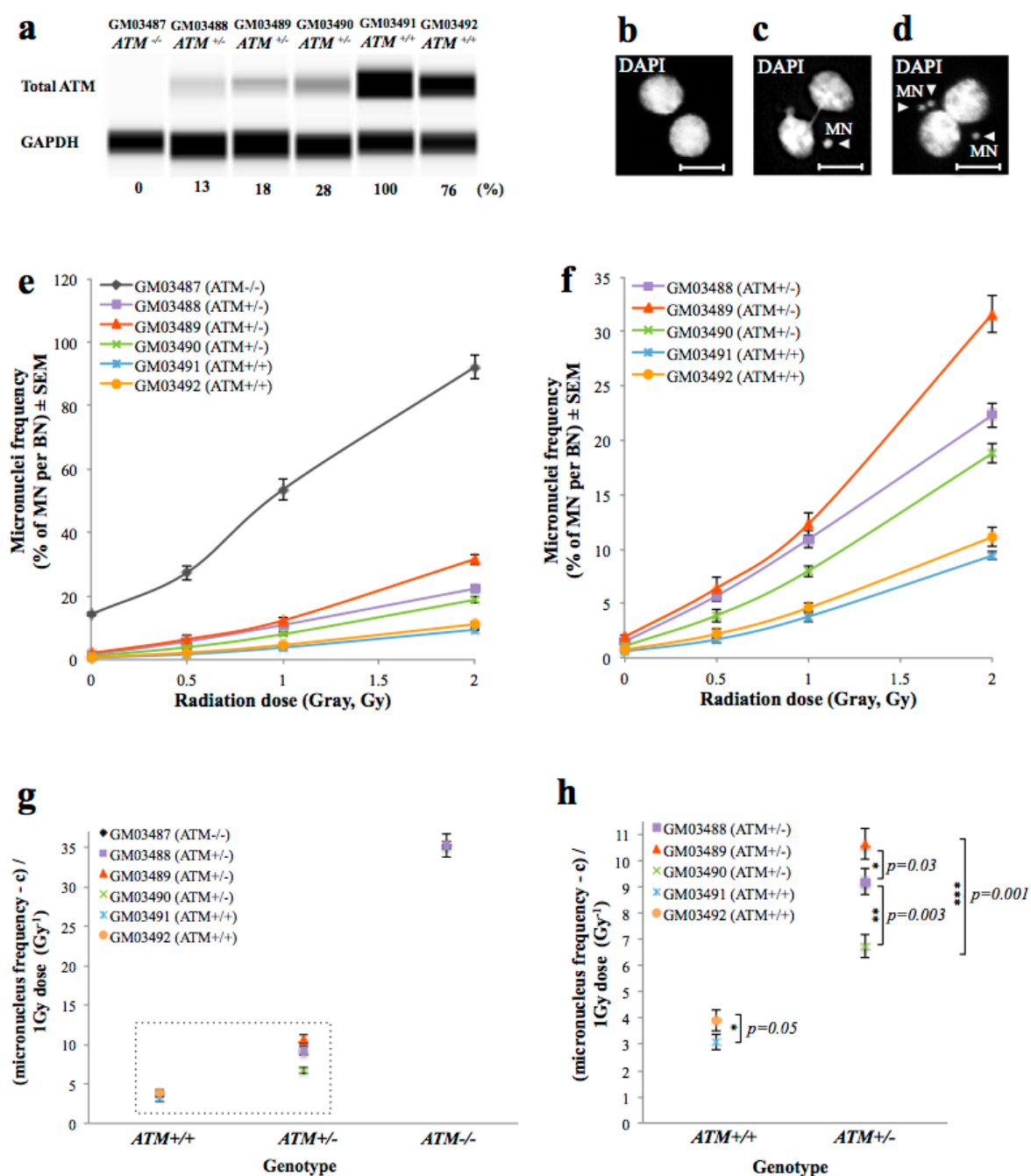
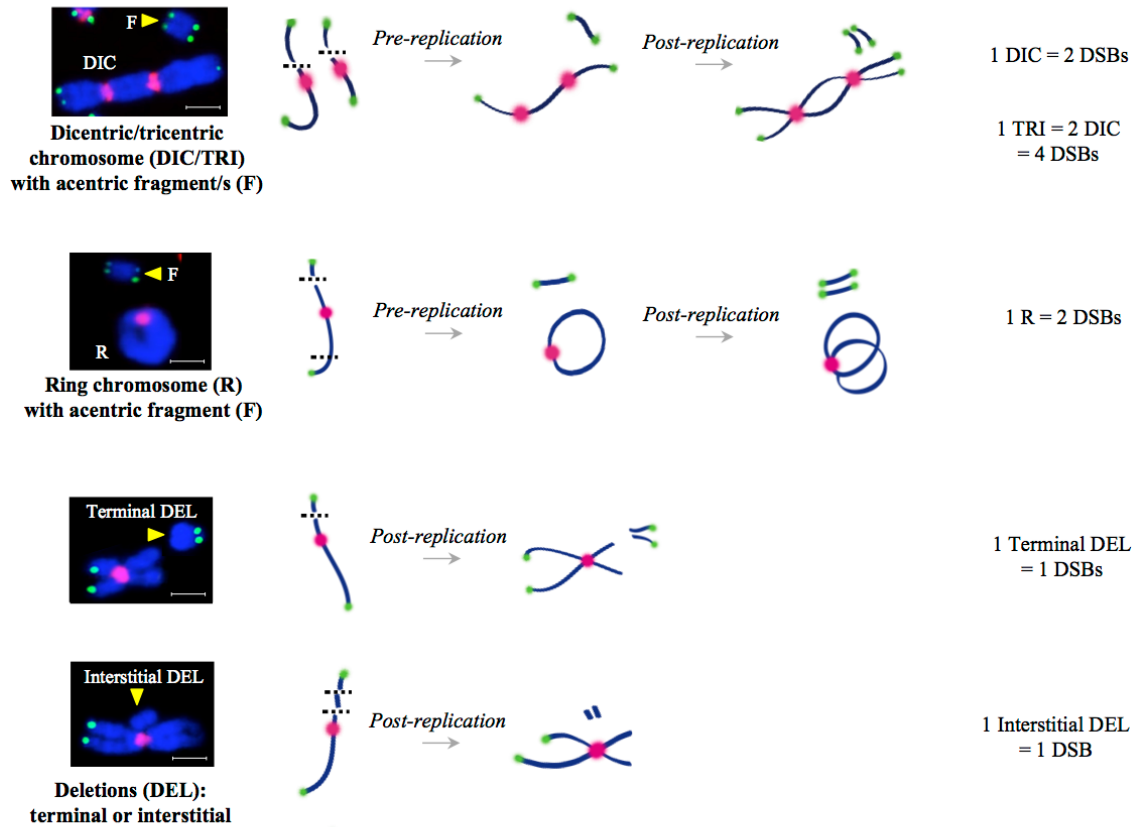


図 25 A-T 家系線維芽細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度

放射線照射後に観察される染色体構造異常は、放射線が照射された細胞周期によって異なる。G1～S 期早期に照射された細胞は染色体型の構造異常を示し、S 期後期～G2 期では染色分体型異常を示す。本研究では、図 26 にしたがって、観察される染色体構造異常によって DNA 二重鎖切断数をカウントした。

Chromosomal aberrations produced after irradiation in G1/ early S phase



Chromatid aberrations produced after irradiation in Mid to Late S and G2 phase

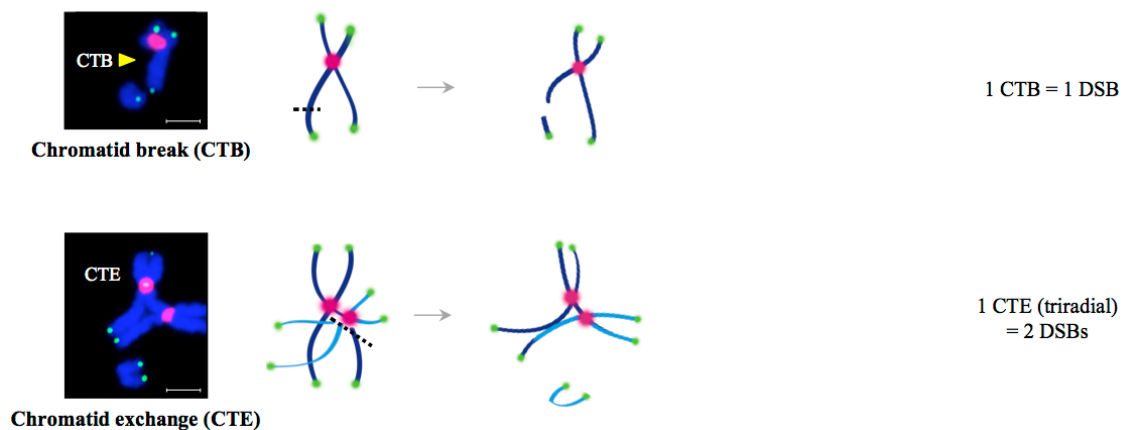


図 26 放射線照射後に観察される染色体型および染色分体型異常

放射線 Dicentric 法で、放射線感受性を評価した（実験を 4 回繰り返した）。微小核形成法と同様に放射線感受性の個人差を確認し、高い再現性が認められた（図 27）。

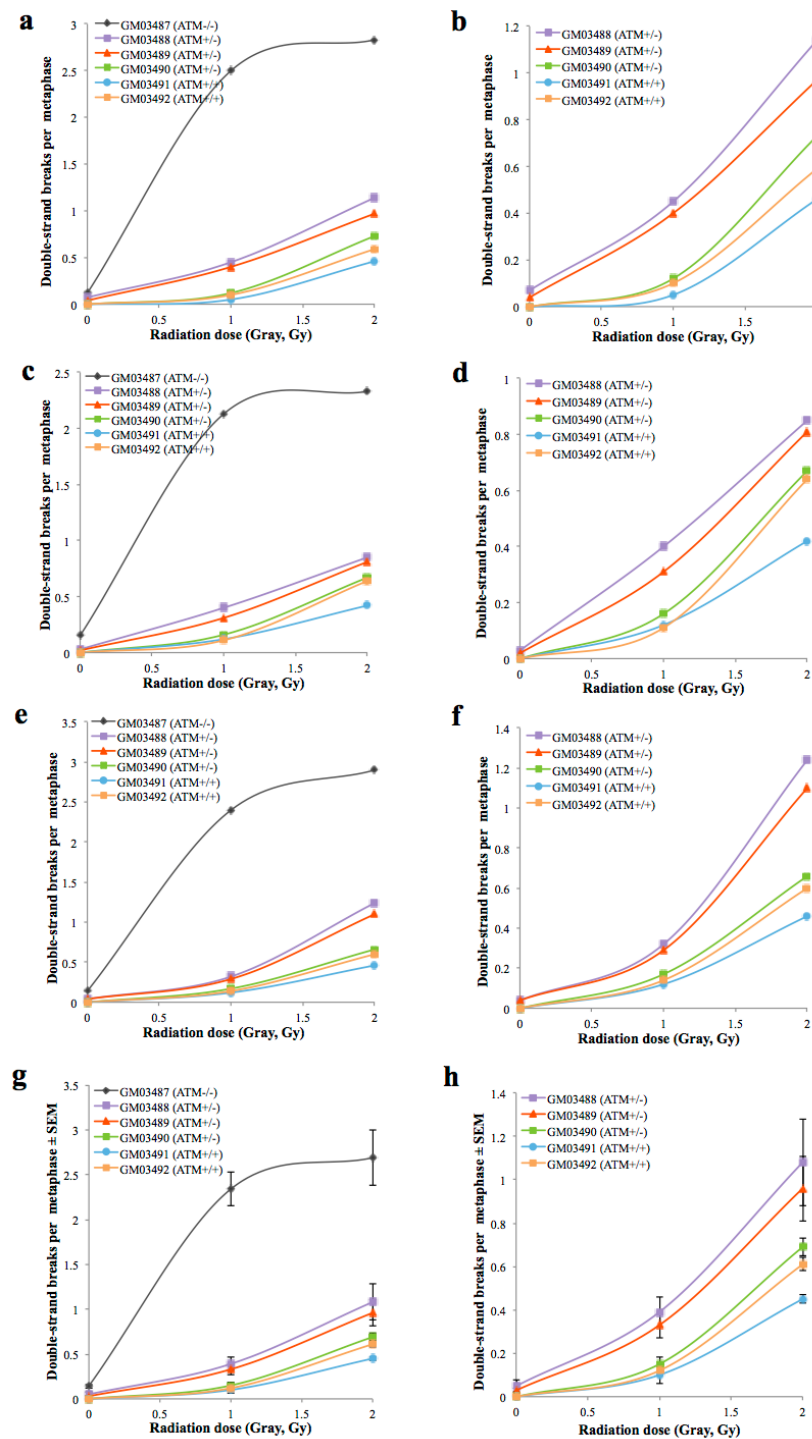


図 27 放射線照射後に観察される染色体型および染色分体型異常（4 回実施）

(4) ゲノム編集による AT モデル細胞の作製と微小核形成頻度

放射線感受性個人差を規定する遺伝的素因を定量的に評価するために、ヒト正常網膜色素上皮組織由来の hTERT-RPE1 細胞において、CRISPR/Cas9 システムと NHEJ 経路を利用したノックイン技術を組み合わせた CRISPR-ObLiGaRe (Obligate Ligation-Gated Recombination) 法により、 $ATM^{-/-}$ 細胞クローンの樹立を試みた。CRISPR-ObLiGaRe ベクターを hTERT-RPE1 にリポフェクション法で導入して、ネオマイシン薬剤耐性の 211 細胞クローンをピックアップした (図 28a)。PCR 法で遺伝子型をチェックした (図 28b)。得られた細胞クローンのうち、7 クローンはヘテロ接合体 ($ATM^{+/-}$)、153 クローンはホモ接合体 ($ATM^{-/-}$) だった。ヘテロ接合体 ($ATM^{+/-}$) 2 クローンとホモ接合体 ($ATM^{-/-}$) 3 クローンの放射線感受性を定量的微小核形成法でアッセイした。

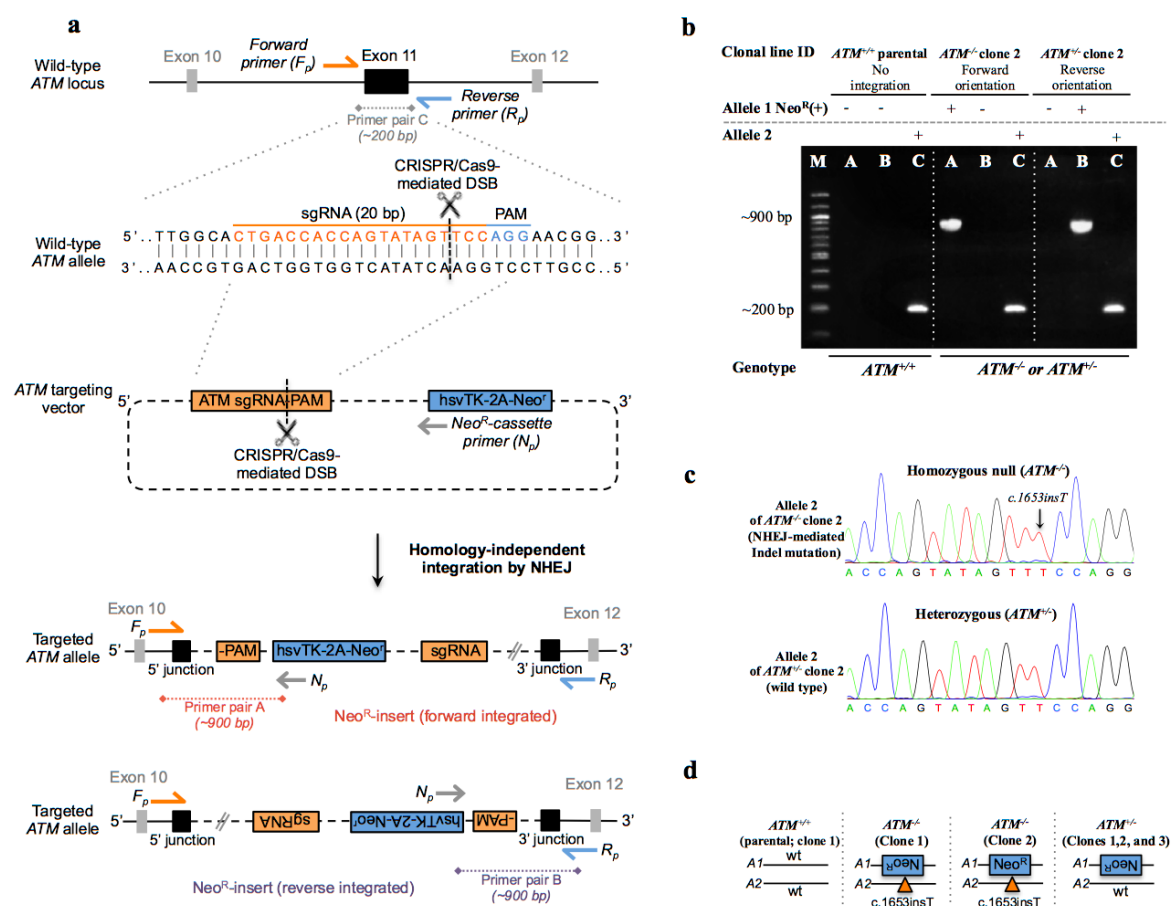


図 28 ゲノム編集法を用いた A-T モデル細胞の作製

ヘテロ接合体 ($ATM^{+/-}$) 2 クローンとホモ接合体 ($ATM^{-/-}$) 3 クローンについて、0.5 Gy、1 Gy、2 Gy の放射線急照射後の微小核形成率を3回検討した (図 29a、c、e)。図 29b、d、f はそれぞれ a、c、e の縦軸を拡大したものである。同一遺伝子型を持つ細胞クローンは、互いに似た放射線感受性を示し、いずれも再現性が確認された。

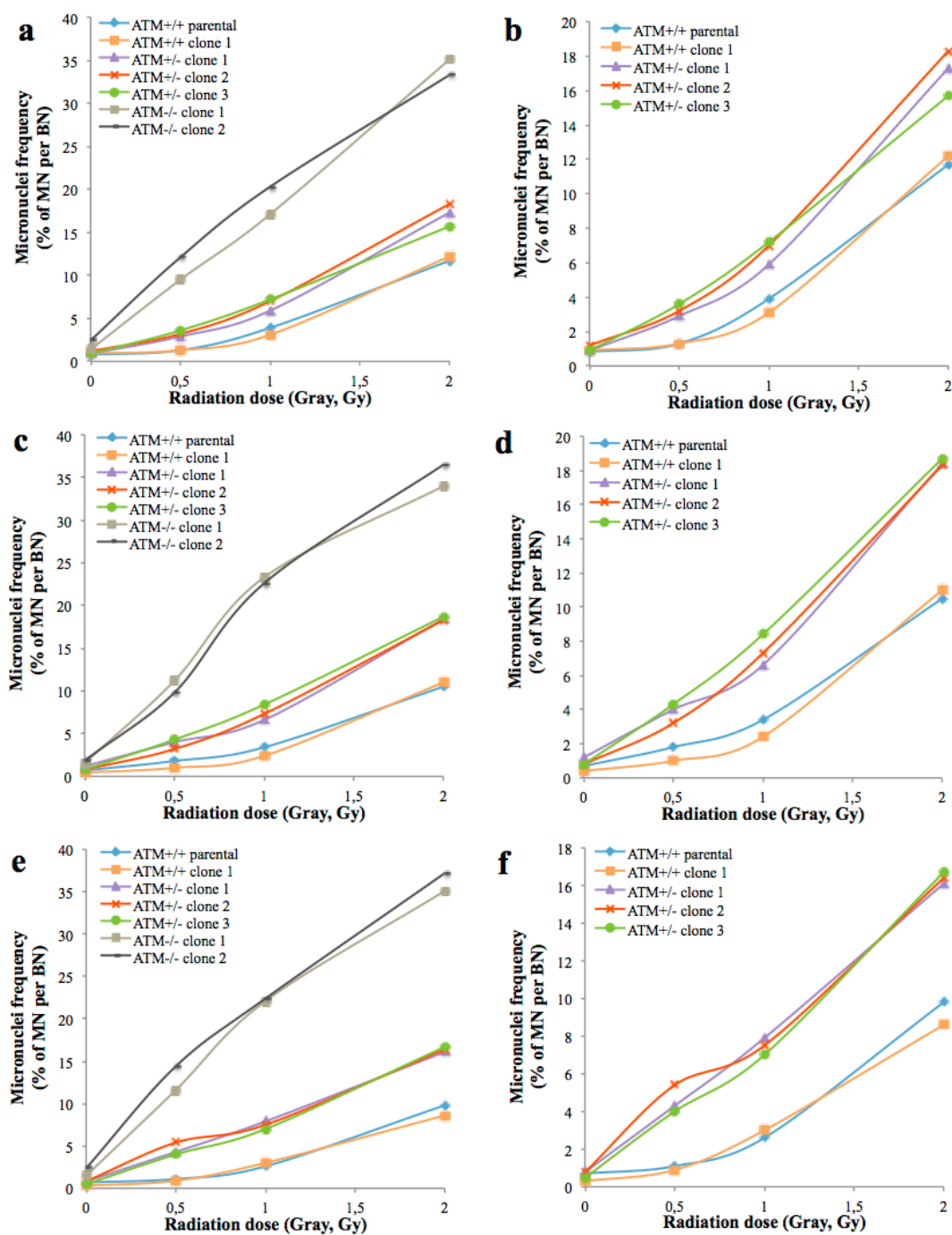


図 29 ゲノム編集法による A-T モデル細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度 (3 回実施)

ゲノム編集法による A-T モデル細胞は遺伝子型に一致した (図 30a) 。図 30b-e は、図 29 の 3 回の実験結果をまとめたものである。A-T 患者のモデル細胞は、0.5 Gy、1 Gy、2 Gy のいずれも、野生型および A-T 保因者モデル細胞に比べて高い微小核形成率を示した (図 30) 。さらに、A-T 保因者モデル細胞はいずれも野生型細胞に比べて有意に微小核形成率が亢進していた (図 30) 。この結果は、ATM 遺伝子が放射線感受性の遺伝的素因であることを示している。重要なことに、各 ATM 遺伝子型のゲノム編集細胞クローン間の放射線感受性のばらつきは、A-T 家系由来皮膚線維芽細胞のばらつきに比べて極めて小さかった。これらのことから、ヒト培養細胞株におけるゲノム編集は、放射線感受性個人差を規定する遺伝素因の高感度かつ定量的な評価系であると考えられた。

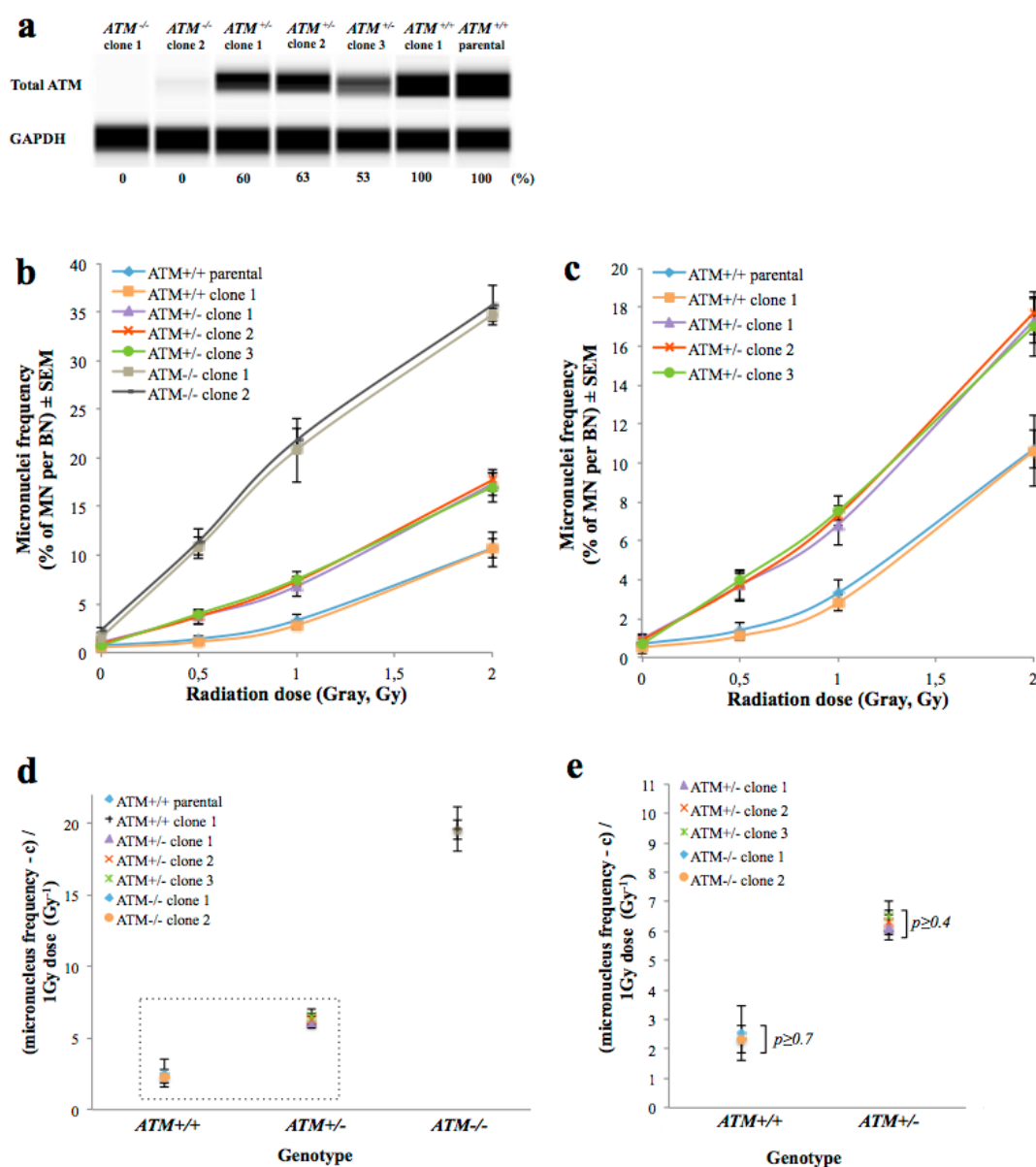


図 30 ゲノム編集法による A-T モデル細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度

(5) 毛細血管拡張性運動失調症 (A-T) 家系の低線量率放射線照射後の微小核形成頻度

A-T の患者家系の皮膚線維芽細胞を用いて低線量率放射線照射後の微小核形成率を検討した。照射条件は、 ^{137}Cs を線源にして 0.069 mGy/min、0.174 mGy/min、0.347 mGy/min、0.694 mGy/min の線量率で 48 時間細胞に放射線照射した。各線量率の積算線量は図 31a のようになる。その結果、A-T 患者#87 は、どの積算線量においても健常者および A-T 保因者に比べて高い微小核形成率を示した (図 31b)。また、A-T 保因者 #88、#89、#90 は、正常コントロール#91、#92 に比べて、どの積算線量においても微小核形成が亢進する傾向にあるが、積算線量が大きいくほど A-T 保因者と健常者間の微小核形成率の差も明確であった (図 31c)。以上の結果から、A-T 患者および A-T 保因者は健常者に比べて低線量率放射線に対しても感受性が高いことが示された。

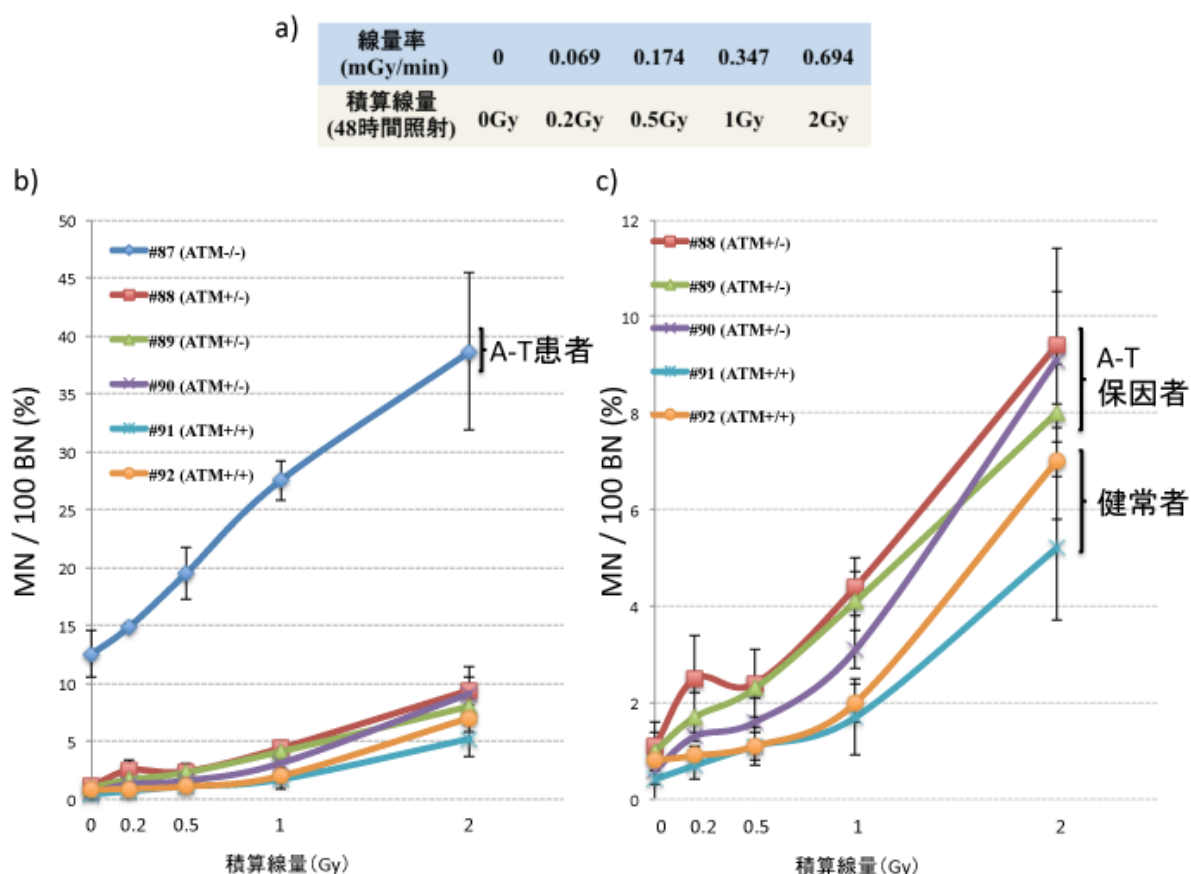


図 31 A-T 家系の低線量率放射線照射後の微小核形成率

(6) 卵巣がん患者の放射線照射後の微小核形成頻度

卵巣がん患者 52 名の末梢血リンパ球を用いて放射線照射後の微小核形成率を検討した (図 32)。微小核形成率は症例によって大きく異なっていた。健常者ボランティア 6 名の 2 Gy 照射後の微小核形成率を同時に調べたところ、それぞれ 13.7、13.8、13.9、14.0、17.8、21.0% だった。すなわち、卵巣がん患者は、健常者ボランティアと比較して全体的に放射線高感受性であることが確認された。また興味深いことに、卵巣がん患者であっても放射線に抵抗性を示す一群が認められた。

これまでに卵巣がん患者の末梢血リンパ球から抽出したゲノム DNA を用いて、全エクソーム解析により網羅的な生殖細胞系列の遺伝子解析データの取得を終了した。家族性乳がん・卵巣がん (HBOC) の原因遺伝子の一部であり、DNA 修復遺伝子としても知られている *BRCA1*, *BRCA2* の変異解析を行ったところ、5 例の卵巣がん患者で変異を検出した (図 32)。各患者の微小核形成頻度は、7.0、11.2、11.5、14.5、18.8% であり、これらのヘテロ遺伝子変異が放射線感受性に与える影響は大きくなかった。

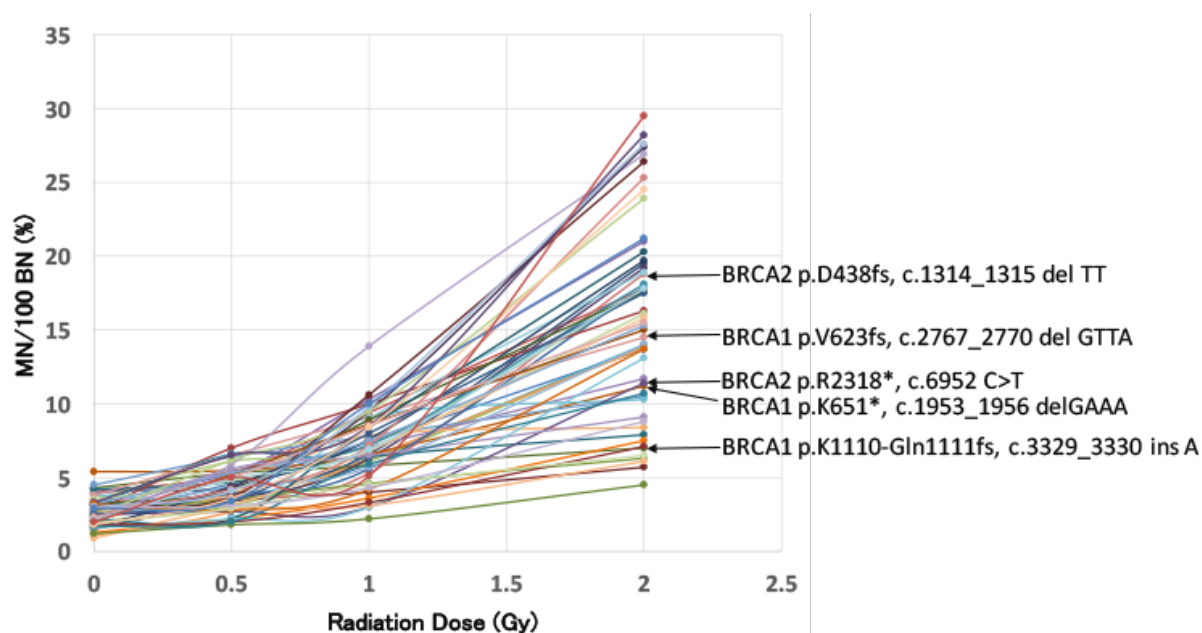


図 32 卵巣がん患者 52 名の放射線照射後の微小核形成頻度

また、卵巣がん患者 52 名分のうち、放射線感受性を示す一群の分布を解析した（図 33）。健常者の 2Gy 照射時の微小核形成頻度の平均値が 15%であるのに対して、卵巣がん患者では放射線感受性が全体的に高いことが示された。図 25、30 の解析より、*ATM*ヘテロ変異は健常者（正常）細胞に対して少なくとも 1.6 倍の 2Gy 照射時の微小核形成頻度を亢進することが示唆された。本解析集団で、A-T 保因者レベルの感受性（ $15.0 \times 1.6 = 24.0\%$ の微小核形成）を示したのは 11 名で 21.1%であった。興味深いことに、この 11.6%の感受性群の存在頻度は、放射線感受性遺伝子のヘテロ変異の健常者集団内の存在頻度である 5%～15%（概算値）に比べて高く、がん患者集団では放射線感受性を亢進する遺伝素因が濃縮することが示唆された。なお、全エクソーム解析の結果、今回の解析集団には A-T ヘテロ保因者は存在していないことを確認した。

今後は、図 33 に示された A-T 保因者レベルの感受性を示す一群に特徴的な遺伝素因の抽出、とくに放射線感受性の遺伝的素因と考えられる DNA 修復遺伝子を中心とした解析を今回取得した全エクソーム解析データを用いて行い、遺伝子変異（または多型）との相関を調べていく予定である。

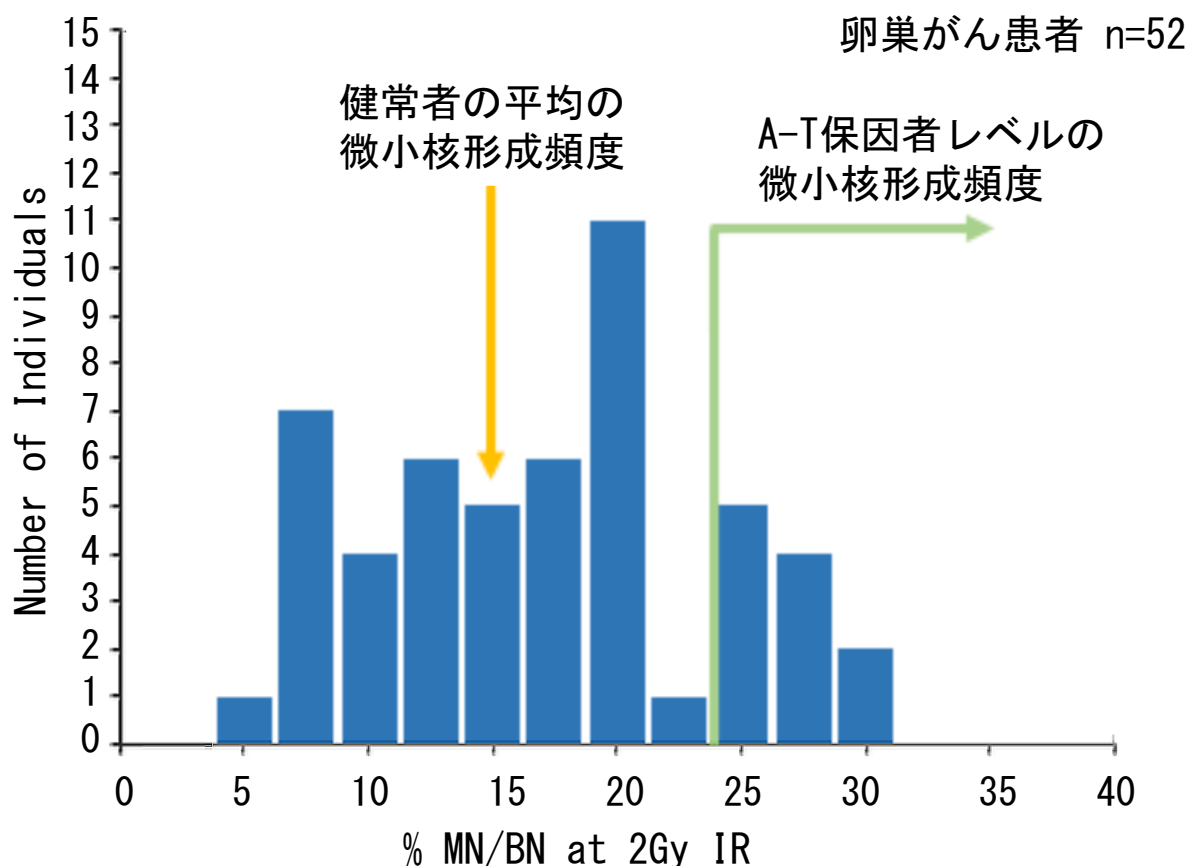


図 33 卵巣がん患者における微小核形成頻度の分布

3.3.4 結果の分析と考察

PCS 症候群患者および毛細血管拡張性運動失調症（A-T）家系に由来する皮膚線維芽細胞を用いて微小核形成頻度および Dicentric 法を検討した。接着性細胞における Metafer システムを利用した定量的な微小核法および Dicentric 法の放射線感受性評価系を確立した。これらの評価系を用いて、1) PCS 症候群が放射線照射後の染色体不安定性が亢進する新たな放射線高感受性遺伝病であること、2) 臨床的に健常な A-T 保因者が健常者に比べて有意に放射線照射後の染色体不安定性が亢進していることを明らかにした。3) ヒト培養細胞株におけるゲノム編集は、放射線感受性個人差を規定する遺伝素因の高感度かつ定量的な評価系であると考えられた。4) 卵巣がん患者サンプルおよび健常者サンプルを用いた微小核形成頻度の計測を行った結果、卵巣がん患者集団では A-T 保因者レベルの放射線感受性を示す一群が 21.1%の頻度で存在することが示された。これまでに、放射線感受性遺伝子のヘテロ変異のヒト集団内の存在頻度は5%-15%と推定されており、本研究結果はがん患者集団では放射線感受性を亢進する遺伝素因が健常者集団に比べて濃縮することが示唆された。本解析集団 52 名中 30 名分の全エクソーム解析を終了しており、今後、放射線感受性群に特徴的な遺伝変化の抽出、ゲノム編集法による放射線感受性との因果関係の検証を経て、放射線感受性を規定する遺伝マーカーの同定が可能になる。

3.4 研究推進

研究代表者の下で各研究項目間における連携を密にして研究を進めるとともに、広く意見を聞きながら研究を進めるために研究推進委員会（研究会）を平成 27 年 8 月 21 日と平成 28 年 10 月 25 日に開催した。研究会では活発な議論が行われ、委員から研究の進め方について貴重な意見が出された。なお、本研究を進めるに当たっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などの諸規定を遵守した。

4. 結言

本研究は、放射線感受性候補SNP導入モデル細胞と放射線感受性が予想されるヒト細胞を準備してその放射線感受性を定量的に測定することにより、放射線感受性の個人差を規定する主要な遺伝的素因を同定することを目的としており、本年度の研究で以下の成果を得た。

1. 一塩基編集技術の開発とモデル細胞の作製

一過的な薬剤選択を介した一本鎖 DNA と CRISPR/Cas9 システムを利用したワンステップ遺伝子標的法を確立した。この手法を用いて、放射線高感受性遺伝病の原因遺伝子である *NBS1* 遺伝子の I171V(511A>G)多型のほか、4 遺伝子 6 種類の放射線感受性のモデル細胞を作製した。また、相同組換え活性の低い正常組織由来細胞株での新たなゲノム編集法を整備して、120 遺伝子 130 種類のゲノム編集細胞クローンを樹立した。

さらに、一本鎖 DNA と CRISPR/Cas9 システムを用いたマウスにおける一塩基編集技術を整備して 1 遺伝子 2 種類のヒト疾患モデルマウスの作製に成功した。

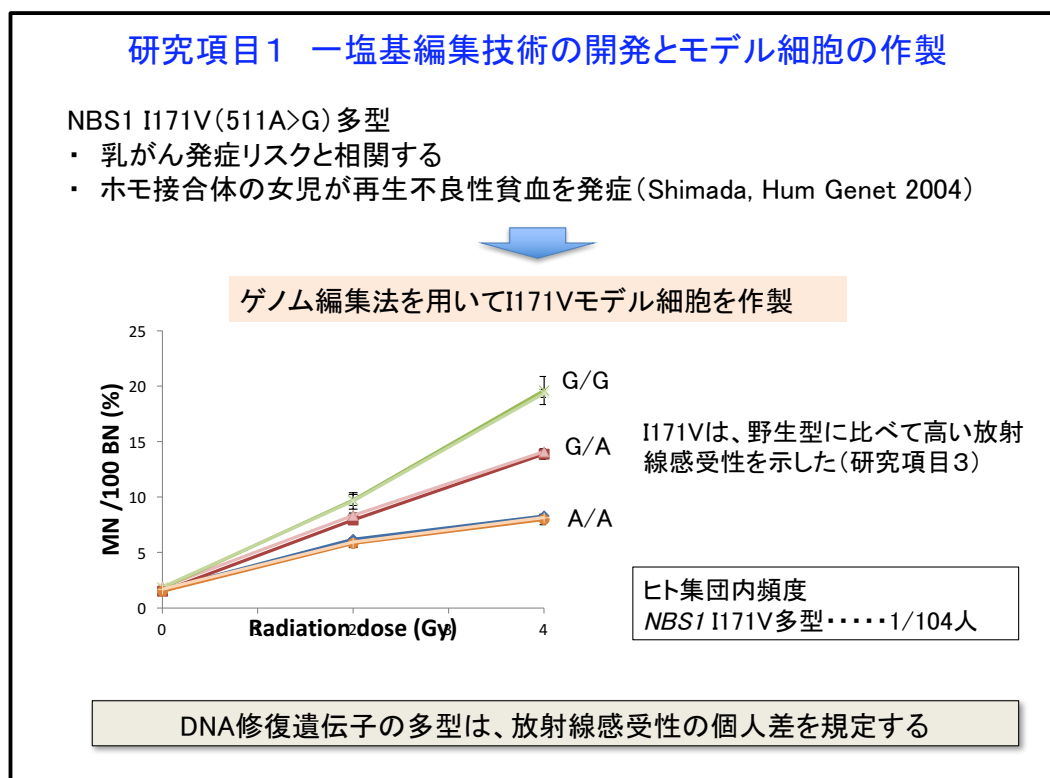


図 34 研究成果 1

2. ヒト細胞の収集

放射線高感受性が予想される疾患として、PCS症候群の皮膚線維芽細胞を国内の研究者から入手した。また、放射線高感受性遺伝病の代表疾患である毛細血管拡張性運動失調症（AT）の家系構成員の線維芽細胞を細胞バンクから入手した。また、放射線高感受性が予想される卵巣がん患者52名の末梢血リンパ球を入手した。

3. 放射線感受性の定量的評価

放射線感受性を多角的かつ定量的に評価するため、接着細胞のサイトジェネティックスキャニングシステムを使用した微小核法および染色体法の評価系を構築した。研究項目2で入手したPCS症候群患者細胞およびA-T家系の線維芽細胞の放射線照射後の染色体不安定性の定量的解析を行った。その結果、1) PCS症候群が放射線照射後の染色体不安定性に特徴づけられる新たな放射線高感受性遺伝病であること、2) 臨床的に健常であり、ヒト集団中に100~200人に1人の頻度で存在するA-T保因者が、健常者に比べて有意に放射線照射後の染色体不安定性が亢進していることを明らかにした。これらの知見は、放射線影響分野における新たな学術的知見であると同時に、放射線災害時のリスクコミュニケーションの科学的根拠として位置づけられる。

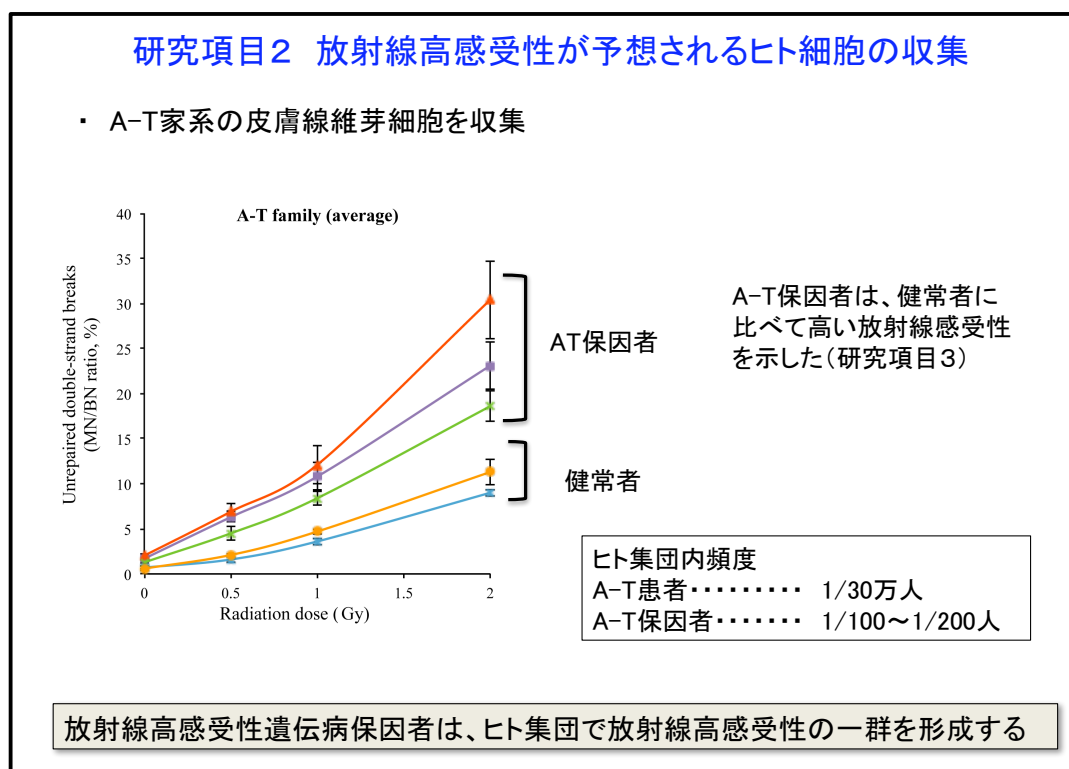


図 35 研究成果 2

研究項目2 放射線高感受性が予想されるヒト細胞の収集

- ・ 卵巣がん患者50名の末梢血リンパ球を収集して、微小核形成率を測定した

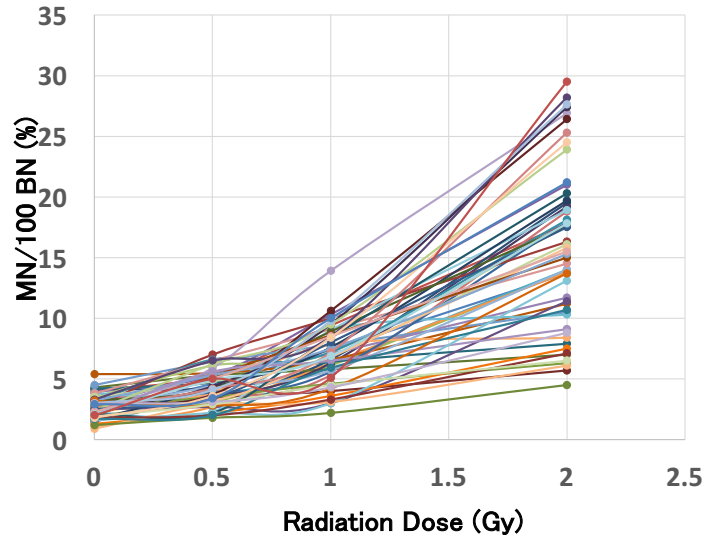


図 36 研究成果 3

今後の展望

サイトスキヤニング顕微鏡を用いた定量的微小核形成法と Dicentric 法を活用して、放射線感受性の個人差の分子基盤の一端を明らかにした。とくに、ゲノム編集技術を用いた手法が、遺伝的背景に依存せず高感度に放射線感受性を検出でき、個人差研究の有力なツールとなることを確認した。今後はこの手法を個人差研究のスタンダードになるように世界に発信していきたいと考えている。また、本研究で作製した細胞クローンは今後も数を増やす予定であり、放射線影響研究者へプロトコルを含めて広く公開・共有することを目指したい。

放射線高感受性遺伝病の A-T やナイミーヘン症候群などの家系サンプルやゲノム編集モデル細胞を用いて放射線感受性を検討した。その結果、これらの DNA 修復遺伝子の変異（または多型）が放射線感受性の個人差を規定することが明らかとなった。一方で、他の研究グループにより、家族性乳がんや卵巣がんなどのがん患者サンプルで検出される DNA 修復遺伝子変異の数と種類が増えてきている。個人の発がんリスクを推定するためには、こうした DNA 修復遺伝子の変異または多型を網羅的に解析するアプローチと、個々人の放射線感受性を定量化するアプローチを同時に進めていく必要があると考えられる。

福島第一原発事故の発生から 6 年以上が経過した。住民の被ばく線量は、チェルノブイリ

原発事故後の線量よりも大幅に低いと推定されており、放射線被ばくを原因とする甲状腺がんや白血病が多発することは予測されていない。一方、福島原発事故後、2万5,000人の放射線作業従事者が2012年10月まで復旧と建設作業に従事しており、そのうち173人の作業者が100 mSvを超える被ばくを受けた。LNT仮説に基づいた放射線リスク5%/Svから、計算上は、173人のうち2～3人が将来がんを過剰に発生する可能性が考えられる（「現代人のための放射線生物学」小松賢志著 京都大学学術出版会）。放射線感受性には個人差があり、同じ放射線量を被ばくしても発がんリスクが高い人と低い人が存在する。本研究でその遺伝素因の一部を実証することに成功したが、さらに研究を発展させることにより、将来的には遺伝子検査で放射線高感受性の作業者を予め特定し、個別に発がんリスクを低減させる配慮が可能になると期待される。ICRPのPublication105に、医療放射線防護の基本文書が出されており、そのなかに「遺伝的感受性に関する問題は入手可能な情報が不十分なため、量的判断が困難である」との記載がある。福島第一原発では今も約6,000人の作業者が数十年単位の計画で進められる廃炉作業に従事しており、高線量被ばく事故の発生も懸念される。研究代表者は、放射線作業従事者の健康管理に資するため、今後も放射線感受性の個人差研究を継続・発展させて、因果関係に基づく確度の高い個人の発がんリスク推定法の開発・実用化に結びつけていく所存である。

参考文献

- (1) Scott D, Barber JB, Levine EL, Burrill W, Roberts SA. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? Br J Cancer. 77, 614-20, 1998
- (2) Matsuura S, Royba E, Akutsu SN, Yanagihara H, Ochiai H, Kudo Y, Tashiro H, Miyamoto T. Analysis of individual differences in radiosensitivity using genome editing. Ann ICRP 45, 290-296, 2016
- (3) Shinya Matsuura; Current research of low dose radiation effects in Hiroshima. GAP related meeting between Hiroshima University and the University of Texas MD Anderson Cancer Center (Hiroshima) July, 2016
- (4) Ekaterina Royba, et al. Genome editing technique as a useful tool for analysing individual differences of radiosensitivity. The 6th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster (Hiroshima) February, 2017
- (5) Tatsuo Miyamoto, et al. A combined approach of exome sequencing and genome editing identified *WDR62/MCPH2* mutations in patients with primary microcephaly. ASHG2016 (Vancouver) October, 2016
- (6) Shinya Matsuura, et al. Molecular basis of human BUBR1 deficiency, a central protein of the spindle assembly checkpoint 第 75 回日本癌学会学術総会（横浜）2016 年 10 月
- (7) 柳原啓見 他 ゲノム編集法を用いた NBS1 SNP 導入細胞の作製と放射線感受性の評価 第 59 回日本放射線影響学会（広島）2016 年 10 月
- (8) Royba E, Miyamoto T, Akutsu SN, Hosoba K, Tauchi H, Kudo Y, Tashiro S, Yamamoto T, Matsuura S. Evaluation of ATM heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing in human cultured cells. Scientific Reports, in press
- (9) 小松賢志 「現代人のための放射線生物学」 京都大学学術出版会 2017 年 3 月

- (10) J. Valentin 編 Annals of the ICRP (ICRP 年報) ICRP Publication 105 医療における放射線防護 国際放射線防護委員会 (ICRP) 2010 年 5 月
日本語版 http://www.icrp.org/docs/P105_Japanese.pdf