

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

(受託者) 国立大学法人広島大学

(研究代表者) 松浦伸也 広島大学原爆放射線医科学研究所

(研究期間) 平成26年度～28年度

1. 研究の背景とねらい

平成23年3月11日の未曾有の大地震により福島第一原発事故が発生した。これにより国民の放射線による健康リスクの不安が増大している。現在、放射線防護基準は公衆に一律に定められているが、放射線感受性には個人差があることが報告されており、将来的には個人の感受性に応じて放射線防護基準を設定することが望ましいと考えられる。本研究は、このような次世代の放射線防護体系の確立に向けて、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。微小核形成法はこの現象を利用して放射線感受性を高感度に測定する手法である(図1)。この検査法を用いて

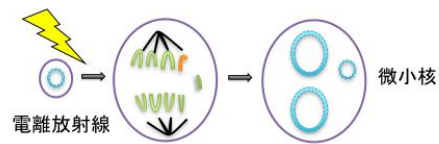


図1 細胞質分裂停止-微小核形成法 (CBMN)

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)。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 (表1)。

本研究では、候補遺伝子変異 (多型) を持つ健常者の細胞サンプルを収集して放射線感受性を解析し、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。さらに、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を作製

表1 発がんリスクと相関するDNA修復遺伝子多型

Gene	Amino acid change	Change of base	Phenotype
<i>XRCC1</i>	Q399R	c.1196A>G	Acute/Late radiation reaction
<i>XRCC1</i>	R194W	c.580C>T	Acute/Late radiation reaction
<i>XRCC1</i>	R280H	c.839G>A	Cancer risk, late radiation reaction
<i>XRCC3</i>	Y241M	c.722C>T	Late radiation reaction
<i>LIG4</i>	A3V	c.8C>T	Lung cancer risk
<i>LIG4</i>	T9I	c.26C>T	Lung cancer risk
<i>ATM</i>		c.8850+60A>G	Late radiation reaction
<i>ATM</i>		c.5674+1518T>A	Breast cancer risk
<i>XPD/ERCC2</i>	D711D	c.2133C>T	Late radiation reaction
<i>MDC1</i>	A1657A	c.4971C>G	Acute/Late radiation reaction
<i>CHEK1</i>		c.1233+35G>A	Pancreatic cancer risk
<i>XRCC6/Ku70</i>	G593G	c.1779G>T	Breast cancer risk
<i>XRCC5/Ku80</i>		c..2110-2408G>A	Breast cancer risk
<i>RAD51C</i>		c.-98G>C	Head/neck cancer risk
<i>MRE11</i>		c.*2501A>G	Bladder cancer risk
<i>NBS1</i>	I171V	c.511A>G	Breast cancer risk
<i>RAD50</i>		c.3390-1922T>G	Non-Hodgkin lymphoma risk

して、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に評価でき、放射線感受性の個人差の遺伝的素因の解明に繋がる。

2. これまでの研究成果

2.1 微小核法の実験間誤差の検定

健常者ボランティア 6 名の全血サンプルを用いて微小核法を独立に 3 回実施した。その結果、健常者 2 の微小核形成頻度は健常者 1 に比べて 0 Gy、1 Gy、2 Gy で高値を示した。0 Gy、1 Gy、2 Gy 照射の 3 回分の平均値をグラフ化したところ、2 名の 2 Gy 照射における感受性に統計的有意差があることが示された (図 2)。これにより、放射線感受性に個人差があることが確認された。

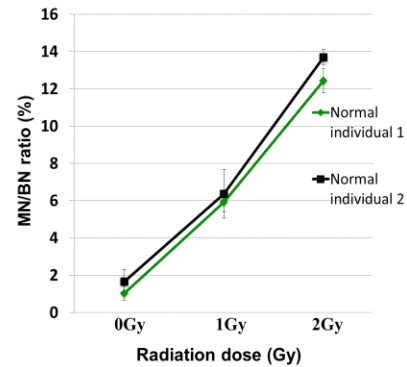


図2 健常者2名で検出された放射線感受性の個人差

2.2 放射線高感受性遺伝病 A-T 家系構成員の放射線感受性

放射線高感受性遺伝病はいずれも劣性遺伝形式を取る。これまでの研究から、放射線高感受性遺伝病のヘテロ接合体保因者は発がんリスクが高く、放射線に高感受性であることが報告されている。そこで、放射線高感受性遺伝病の代表疾患であり、DNA 二重鎖切断修復過程のマスターキナーゼである ATM キナーゼの欠損によって発症す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入手して、サイトジェネティックススキニングシステムを使用して放射線照射後の微小核形成率を検討した。その結果、両親と同胞保因者 ($ATM^{+/-}$) は臨床的に全く健常だが、いずれも正常コントロール ($ATM^{+/+}$) よりも微小核形成頻度が高い値を示した (図 3)。さらに、染色体 Dicentric 法とヒストン H2AX 抗体を用いた免疫染色法においても、微小核法の結果と同様に、両親と同胞保因者 ($ATM^{+/-}$) は正常コントロール ($ATM^{+/+}$) よりも高感受性であることが示された。A-T 保因者はヒト集団の 0.5-1% を占めるとされており、本結果は DNA 修復遺伝子の多様性が放射線感受性の個人差を規定することの根拠の一つである。

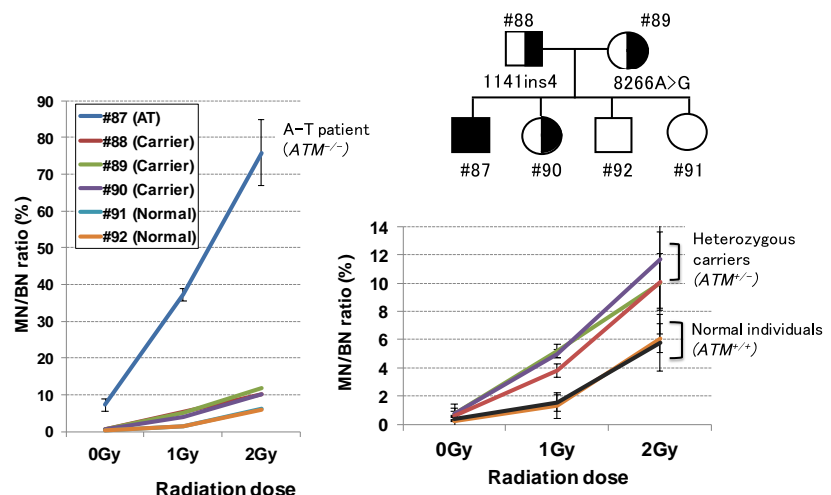


図3 AT家系サンプルで検出された放射線感受性の個人差

2.3 ゲノム編集細胞の作成と放射線感受性

研究代表者らは、人工ヌクレアーゼを用いたヒト培養細胞へのSNP導入法の開発に取り組んできた。これまでに標的ベクターを用いた薬剤選択を2回行う「2段階一塩基編集法」を独自に開発して、ゲノム不安定性疾患の原因変異を同定することに成功した¹⁾。本研究ではさらに一塩基編集法の点変異導入ドナーや編集細胞の選別法を改良して、一塩基編集法のハイスループット化を試みた。

NBS1 遺伝子は、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である。*NBS1* 遺伝子には種々の多型が知られているが、そのうちの I171V 多型 (551A>G) は日本人 89 人に 1 人と多く、乳がん高リスク群であることが報告されている。また、I171V 多型をホモ接合性に持つ日本人女兒は、ナイミーヘン症候群の臨床症状は呈さないが、再生不良性貧血を発症していた (Shimada *et al.* Hum Genet 2004)。これらの所見は、I171V 多型が放射線感受性 SNP の有力候補であることを示唆する。そこで、一塩基編集法の標的遺伝子として *NBS1* 遺伝子の I171V 多型を選定した。

NBS1 遺伝子を切断する人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 と、I171V (511A>G) を含む一本鎖 DNA (ssODN) を点変異ドナーとして準備して、ヒト細胞 HCT116 にリポフェクション法で共導入した (図 4)。点変異ドナー (ssODN) には、一塩基置換に加えて、相同組換え体を簡便に検出するための制限酵素 *ScaI* の認識部位を搭載した。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 96 クローン単離した。それぞれゲノム DNA を抽出して *ScaI* 制限酵素で処理した結果、1 クローンが *ScaI* 消化に陽性だった。こ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、I171V 多型をホモ接合体に有していた (図 5)。

NBS1 I171V 編集細胞の放射線照射後の生存率をコロニー形成法で解析した。コントロール細胞として、*NBS1* 遺伝子の野生型細胞 (*NBS1*^{+/+}) と *NBS1* 欠損患者細胞 (*NBS1*^{-/-}) を使用した。*NBS1* I171V 編集細胞は、放射線照射後の致死感受性は野生型細胞 (*NBS1*^{+/+}) と差は見られなかった (図 6 左)。次に *NBS1* I171V 編集細胞の放射線照射後の微小核形成頻度を検討した結果、微小核形成頻度は、野生型細胞 (*NBS1*^{+/+}) と *NBS1* 欠損患者細胞 (*NBS1*^{-/-}) の中間の値を示した。以上より *NBS1* I171V 編集細胞は、DNA 修復能に関して放射線高感受性であることが証明された (図 6 右)。

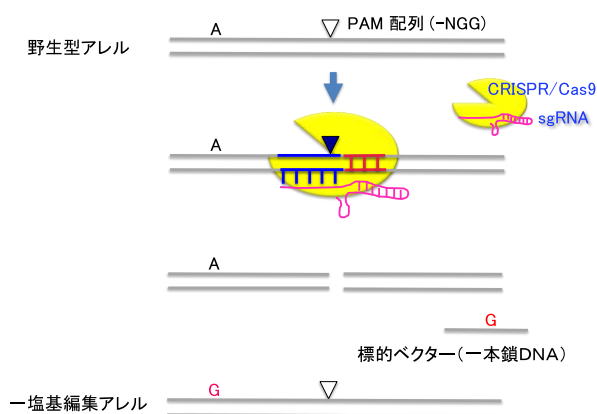


図4 CRISPR/Cas9 と一本鎖DNAを用いた一塩基編集法

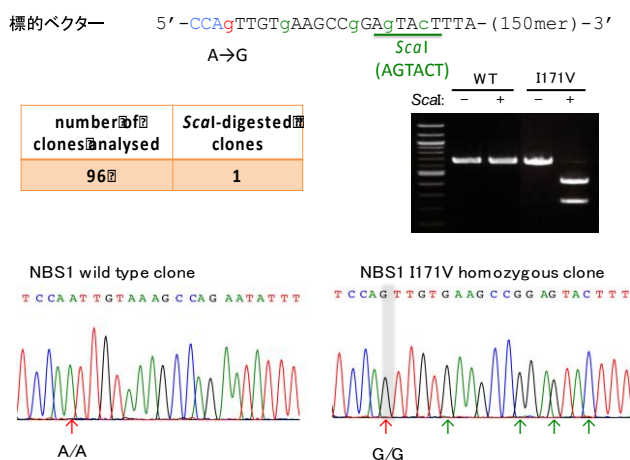


図5 *NBS1* I171V 細胞の作成

3. 今後の展望

一本鎖DNA(ssODN)を標的ドナーとした一過性薬剤選択によるワンステップ遺伝子標的法をデザインして、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)多型をホモに持つヒトモデル細胞を作成した。このモデル細胞が放射線高感受性を示したことから、この多型が放射線感受性の個人差を規定する

遺伝的素因の1つであることが明らかとなった²⁾。今後、ヒト培養細胞系におけるゲノム編集のさらなる高効率化を検討するとともに、種々の遺伝子変異または多型を持つヒトモデル細胞を作成して、放射線感受性の相互比較を行う予定である^{3、4)}。

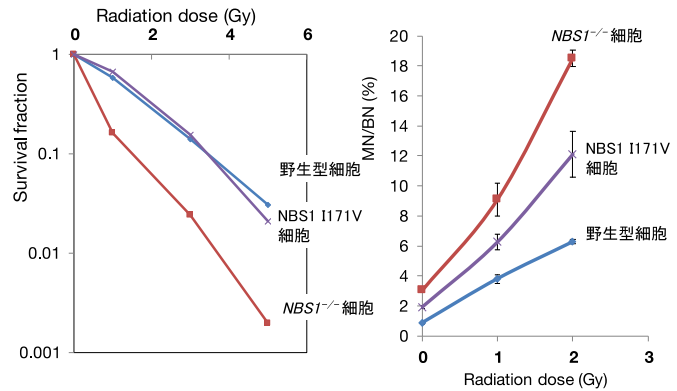


図6 NBS1 I171V細胞の放射線感受性

4. 参考文献

- (1) Ochiai H., et al., "TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, p1461-1466, (2014).
- (2) Matsuura S., et al., "Analysis of individual differences in radiosensitivity using genome editing" ICRP 2015; 3rd International Symposium on the System of Radiological Protection, Seoul, 20-22 Oct, 2015.
- (3) Miyamoto T., and Matsuura S., "Ciliopathy in PCS (MVA) syndrome" Oncotarget 6, p24582-24583 (2015).
- (4) Miyamoto T., et al., "The microtubule depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation" Cell Rep. 10, p664-673 (2015).