

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多人数の健常者末梢血リンパ球が検討された結果、

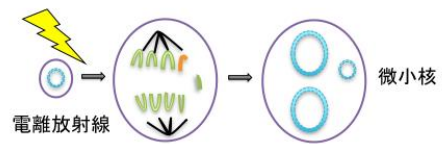


図1 細胞質分裂停止-微小核形成法(CBMN)

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 発がんリスクと関連する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 CRISPR-ObRiGaRe 法を用いた放射線高感受性遺伝病 A-T のモデル細胞の作成

一般に正常組織に由来する細胞は、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た。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムと NHEJ 経路を利用した CRISPR-ObRiGaRe

(Obligate Ligation-Gated Recombination) 法をヒト正常網膜色素上皮組織由来 hTERT-RPE1 細胞に試みた (図 2)。

hTERT-RPE1 細胞に px459 ベクターと ATM 遺伝子を標的とするベクターを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い、2 週間後に 211 個の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を

判定した。その結果、153 個の $ATM^{-/-}$ 細胞と 7 個の $ATM^{+/-}$ 細胞が得られ、CRISPR-ObRiGaRe 法が hTERT-RPE1 細胞を高効率にゲノム編集できることがわかった。

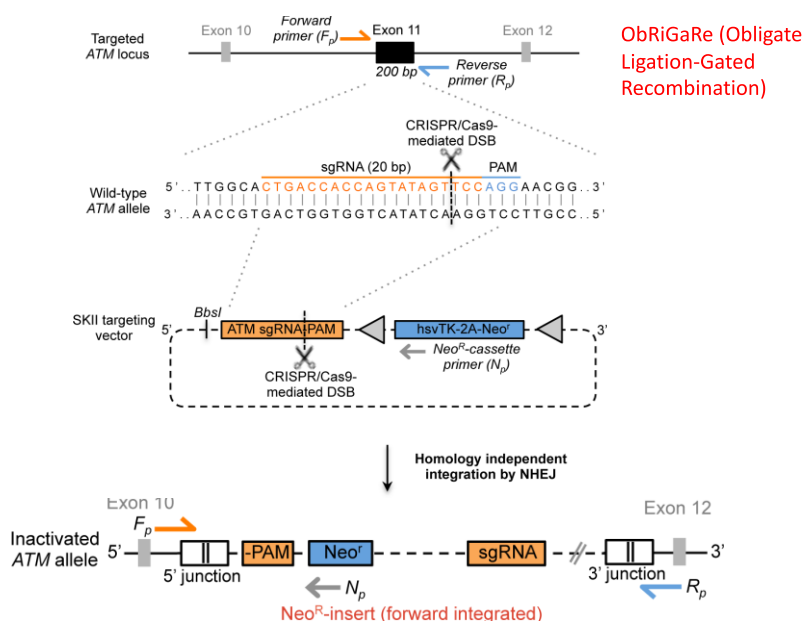


図 2 CRISPR-ObRiGaRe (Obligate Ligation-Gated Recombination) 法

2.2 放射線高感受性遺伝病 A-T 家系構成員の皮膚線維芽細胞との比較

昨年度の研究で、放射線高感受性遺伝病である毛細血管拡張性運動失調症 (A-T) の家系構成員の皮膚線維芽細胞を入手して、サイトジェネティックススキャン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 ($ATM^{+/-}$) は臨床的に全く健康だが、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ことから (図 3 右)、放射線高感受性遺伝病のヘテロ保因者が放射線高感受性であることを明らかにした。

今回、項目 2.1 で作成したゲノム編集細胞について、同様にサイトジェネティックススキャン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、家系サンプルと同様に、ATM 遺伝子の片アレル性ノックアウトモデル細胞 ($ATM^{+/-}$) は、ATM 欠損モデル細胞 ($ATM^{-/-}$) と野生型細胞 ($ATM^{+/+}$) の中間の感受性を示した (図 3 左)。興味深いことに、家系サンプルでは、A-T 保因者間で、遺伝的背景の違いによると思われる有意な微小核形成能の変動が見られ

た。一方で、ゲノム編集細胞では、同一遺伝子型間で感受性の変動がほとんど見られなかった。以上の結果から、放射線感受性の個人差を検討する上では、ゲノム編集細胞が健常者サンプルよ

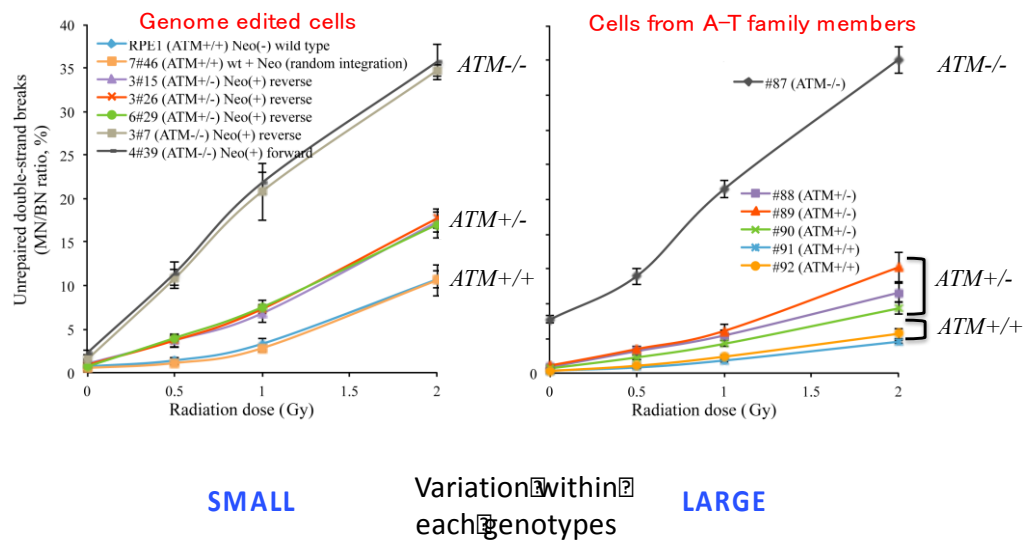


図3 ゲノム編集細胞と家系サンプルのIR

りもより優れていると考えられた。

2.3 ゲノム編集細胞の作成と表現型の解析

昨年度の研究で、一塩基編集法を用いて、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 I171V 多型 (551A>G) が放射線高感受性を規定する遺伝的素因の 1 つであることを明らかにした。本年度はさらに、放射線高感受性が疑われた遺伝性小頭症患者のモデル細胞を作成した。遺伝性小頭症は遺伝的多様性が知られ、一部の患者は放射線高感受性であることが報告されている。そこで、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 細胞株に導入した。すなわち、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 BamHI 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、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。各クローンの遺伝子型を解析して、2 クローンの WDR62 S244L ミスセンス変異の両アレル編集クローンを樹立した。S244L 編集細胞を解析したところ、放射線感受性は正常だったが、微小管重合能が低下して正常細胞で観察される細胞接地面に対して水平な紡錘体配向が不安定化することを

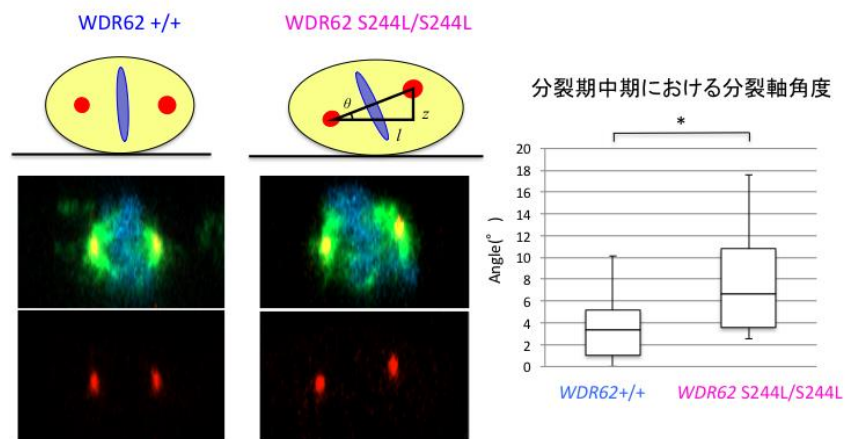


図4 WDR62 ゲノム編集細胞のLR体配Dの不安定化

見出した (図 4)。最終的に、WDR62 が分裂期キナーゼ PLK1 によってリン酸化され、紡錘体を細胞接地面に対して水平に維持する働きがあることを明らかにした。

この他にも、ナイミーヘン症候群原因遺伝子 *NBS1* 657del5 変異導入細胞や、放射線高感受性遺伝病 *LIG4* 症候群の遺伝子多型 A3V、T9I のホモ接合体細胞、小頭症遺伝子 *KIF2A* のモデル細胞などを作成した (1-3)。今後、これらのゲノム編集細胞の放射線感受性を検討していく予定である。

3. 今後の展望

毛細血管拡張性運動失調症 A-T をモデルとして、放射線感受性の個人差を規定する遺伝的素因を検討した。その結果、ゲノム編集法が、健常者サンプルよりも、より高感受性であることを明らかにした。今後は、ゲノム編集法を用いた手法が、放射線感受性の個人差研究のスタンダードとなるよう世界に発信・提案していきたい (1)。

放射線高感受性遺伝病の A-T と、ナイミーヘン症候群、*LIG4* 症候群、遺伝性小頭症などの家系サンプルや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 修復遺伝子の多く変異・多型が放射線感受性の個人差を規定することを明らかにした。一方で、他のグループの研究により、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さらに増えてきている

(*BRCA1*、*BRCA2*、*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*MUTYH*、*TP53*、*ATM*、*BRIP1*、*CHEK2*、*RAD51C*、*RAD51D*、*BARD1*、*MRE11A*、*NBS1*、*RAD50* など)。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。本研究をさらに発展させて、個人の発がんリスク推定の検査法の開発・実用化に結びつけていきたい。

4. 参考文献

- (1) 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.
- (2) Miyamoto T., and Matsuura S., "Ciliopathy in PCS (MVA) syndrome" *Oncotarget* 6, p24582-24583 (2015).
- (3) 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).