

# 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、放射線感受性には遺伝的な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

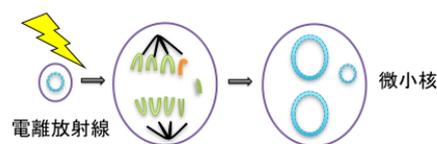


図1 細胞質分裂停止-微小核形成法(CBMN)

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 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

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) をモデル疾患として検討した。A-T は常染色体劣性の遺伝形式を取り、ヘテロ保因者は臨床的に健常だが、乳がんリスクが 2~5 倍高いことが知られている。まず、A-T 家系の皮膚線維芽細胞を入手して、放射線急照射後の微小核形成率を 3 回検討した (図 2)。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。興味深いことに、A-T 保因者は 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。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。さらに、放射線 Dicentric 法で放射線感受性を評価したところ、微小核形成法と同様に放射線感受性の個人差が確認された (データ非表示: 文献 1)。

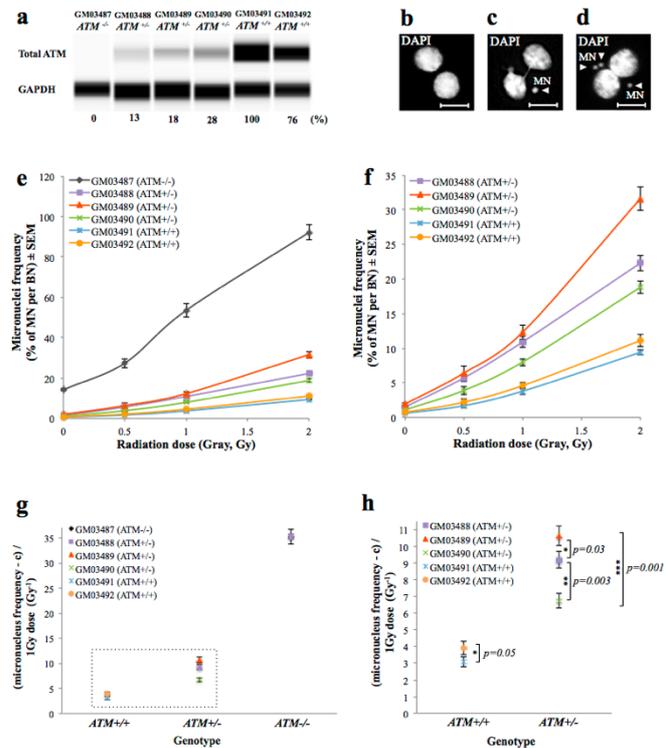


図 2 A-T 家系細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度

### 2.2 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

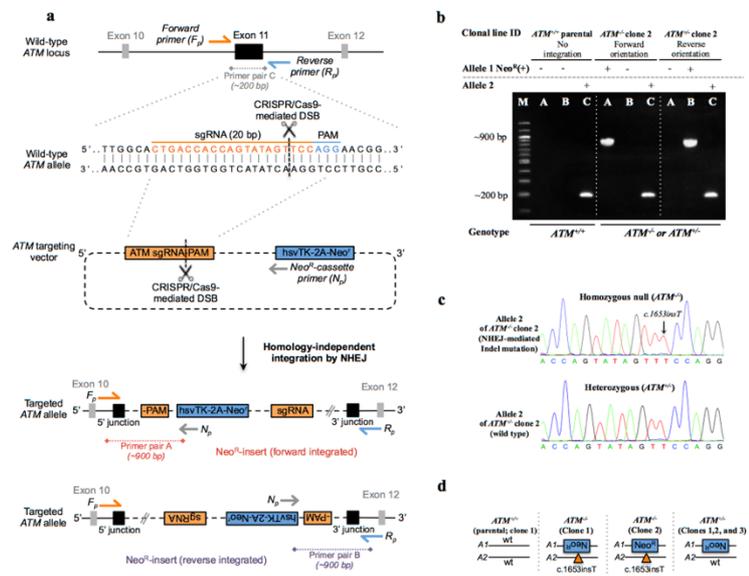


図 3 ゲノム編集法を用いた A-T モデル細胞の作製

Recombination)法により、A-T 保因者細胞のモデルとなる *ATM*<sup>+/-</sup> 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 3)。PCR 法で遺伝子型をチェックしたところ、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*<sup>+/-</sup>)、153 クローンはホモ接合体 (*ATM*<sup>-/-</sup>) だった。ヘテロ接合体 (*ATM*<sup>+/-</sup>) 2 クローンとホモ接合体 (*ATM*<sup>-/-</sup>) 3 クローンの放射線感受性を定量的微小核形成法で測定した。

### 2.3 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

野生型 2 クローンとヘテロ接合体 (*ATM*<sup>+/-</sup>) 2 クローン、ホモ接合体 (*ATM*<sup>-/-</sup>) 3 クローンについて放射線急照射後の微小核形成率を 3 回検討した (図 4)。ホモ接合体細胞は、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。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。この結果は、*ATM* 遺伝子変異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。さらに、1 Gy 当たりの放射線感受性を数値化したところ、*ATM* ヘテロ接合体のモデル細胞は変異の無い細胞に比べて放射線感受性が 2.6 倍高かった。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を高感度かつ定量的に検出する評価系であると考えられた。

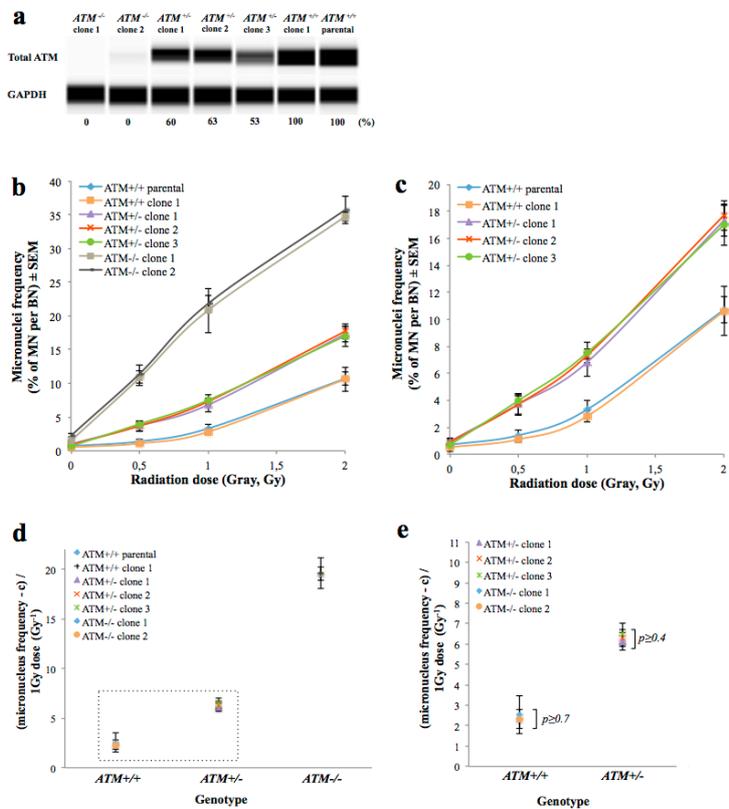


図 4 A-T モデル細胞の放射線急照射後の微小核形成頻度

### 3. 今後の展望

放射線高感受性遺伝病の A-T 家系サンプルと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、DNA 修復遺伝子の変異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から採取した末梢血リンパ球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。個人の遺伝的な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平行して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）。放射線感受性には遺伝的な個人差があり、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、さらに研究を進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遺伝的な個人差研究を継続・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・実用化に結びつける所存である。

#### 4. 参考文献

1. Evaluation of *ATM* heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing in human cultured cells. Royba E, Miyamoto T, Akutsu SN, et al. *Sci Rep* 20;7(1):5996 (2017)
2. PLK1-mediated phosphorylation of WDR62/MCPH2 ensures proper mitotic spindle orientation. Miyamoto T, Akutsu SN, et al. *Hum Mol Genet* 26(22):4429-4440 (2017)
3. Updated summary of genome editing technology in human cultured cells linked to human genetics studies Miyamoto T, Akutsu SN, Matsuura S. *J Hum Genet* (2017 in press)
4. Analysis of individual differences in radiosensitivity using genome editing. Matsuura S, et al. *Ann ICRP* 45: 290-296 (2016)
5. The microtubule-depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation. Miyamoto T, et al. *Cell Reports* 10:664-673 (2015)