

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16123

研究課題名(和文) 逆遺伝学的アプローチによる疾患SNPの評価系の確立とその応用

研究課題名(英文) The establishment and its application of the evaluation system of disease-associated SNP using a reverse genetics technique

研究代表者

柳原 啓見 (Yanagihara, Hiromi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：50719474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：疾患原因と判断された一塩基多型(SNP)を逆遺伝学的手法を用いて解析する実験系を計画し、今回CRISPR/Cas9システムを用いたSNPモデル細胞の作製方法を確立した。これにより交絡因子の影響を取り除き、細胞の遺伝的背景を揃えた状態で疾患SNPの比較実験を行うことが可能となった。その結果、片アリルもしくは両アリル性に同一SNPが導入された細胞を樹立し、それらは染色体不安定性を示した。

研究成果の概要(英文)：We planned to establish the new experimental system to analyze disease-associated single nucleotide polymorphisms (SNPs) using a reverse genetics technique. In this study, we developed a method to generate SNP model cells using CRISPR/Cas9 system. This method has enabled us to carry out comparative study of candidate SNP in human cultured cells under genetically uniform backgrounds. The SNP model cell lines we established in this study, which have either mono- or bi-allelic mutation, showed increased chromosome instability.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ゲノム編集 SNP NBS1

1. 研究開始当初の背景

(1) 一塩基編集技術の必要性

大規模一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNP) 解析により、がんなどの疾患関連 SNP や放射線感受性 SNP の探索が進められており、診断や治療への適用、個別医療の実現化が期待されている。

近年、患者で認められる SNP と病気との関わりが示されつつあるが、患者由来細胞株を用いた検証では遺伝的背景の違いにより性質に差が生じる懸念がある。この問題点を解決するためには、逆遺伝学的手法を用いた一塩基編集技術が必要である。

(2) ヒト細胞における遺伝子改変の問題点

細胞に外来ベクターを導入する場合、多くはランダムに染色体に取り込まれてしまうが、低い頻度で相同組換えが起こり染色体上の標的位置に取り込まれる。この逆遺伝学的変異導入法により、酵母など相同組換え頻度が高い一部の生物種において、目的遺伝子の改変 (遺伝子ターゲティング) が行われてきた。

一方、ヒト細胞では組換え頻度が1%未満と低いため、遺伝子ターゲティング技術を用いた一塩基編集は非常に難しい課題であった。そこに挑戦するべく、所属研究室では近年急速に発展しているゲノム編集技術を応用した新しい一塩基編集法を開発した (Ochiai *et al.* *PNAS*, 2014)。このような技術の開発は他に類がなく、新たなゲノム医学研究の必須ツールとして国際的にも高い評価を得ている (Urnov. *PNAS*, 2014)。

この技術開発は、SNP の逆遺伝学的検証実現に向けた大きな一歩であったが、一塩基置換細胞の作製には半年以上を要するため、より簡便で高効率な新しい技術開発が必要であった。

(3) SNP と放射線感受性の個人差について

放射線に対する感受性は個人差があり、SNP が大きく影響していると考えられている。将来的には、個人の感受性に応じたテーラーメイド放射線医療実現にむけ、個人差を反映させた放射線防護基準を設定することが望ましい。そのためにも各 SNP の機能評価系の確立、SNP による放射線感受性への影響とその分子基盤研究は重要である。

2. 研究の目的

本研究では、SNP の逆遺伝学的解析を推し進めるため、特定の一塩基変異をもつヒト疾患 SNP 導入細胞の簡便な作製法を確立し、細胞の遺伝的背景を揃えた状態で疾患 SNP の比較実験を行うことを目的としている。

放射線初期応答遺伝子 *NBS1* をモデルケースとし SNP 導入細胞の作製と、放射線感受性評価法の確立を目指す。

近年の SNP 解析により、*NBS1* 遺伝子には、がん関連 SNP が複数存在していることが報告され、SNP 評価系を確立する絶好の標的因子であると考えた。

3. 研究の方法

細胞株は二倍体でありゲノム編集実績のあるヒト HCT-116 細胞を使用する。内在性の *NBS1* の各 SNP 近傍部位を切断する CRISPR を作製し DSB を誘発、点変異ドナーとして一本鎖オリゴ DNA (ssODN) と共発現させ相同組換え修復により、内在性の *NBS1* に変異を導入する。

SNP の影響については、放射線致死感受性と染色体異常解析を行い定量的な評価を行う。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 疾患 SNP 導入細胞の作製

既存の遺伝子変異導入法による一塩基改変効率は1%以下と非常に低く難しいことが大きな問題であったため、平成27年度は、より高効率で簡便な一塩基編集法を確立することを目標とした。

高効率な一塩基編集法の開発については、CRISPR/Cas9 システムを用いた。CRISPR/Cas9 発現プラスミドと ssODN を共導入し、一時的な薬剤選択により編集細胞を濃縮させた。組換え体の検出には制限酵素サイトを利用し、目的クローンの同定を行うことにより、約1ヶ月半程度で一塩基編集細胞を作製することが可能になった (図1)。

これは一塩基変異の逆遺伝学的解析を迅速に進める上で非常に有効な手段となる。また、本研究で確立した方法は熟練した技術が必要としないため、その点においても研究推進に有効である。

この方法を利用し最終年度までに、*NBS1* 遺伝子の一塩基編集細胞を5種類作製することに成功し、片アリルもしくは両アリル性に同一 SNP が導入された細胞を複数クローン得ることが出来た。これにより任意の一塩基変異による細胞影響を逆遺伝学的に解析することが可能となった。

② 疾患 SNP 導入細胞の表現型解析

最終年度はさらに、樹立した SNP 導入細胞

を用いた表現型解析を通して、放射線影響解析を進めるための評価系を確立した。

具体的には、コロニー形成法を用いて放射線致死感受性を検討し、サイトスキャンニング顕微鏡 (Metafer システム) を用いた微小核形成法により、放射線誘発染色体異常を評価し、任意の SNP による細胞影響を逆遺伝学的に解析することが可能となった。

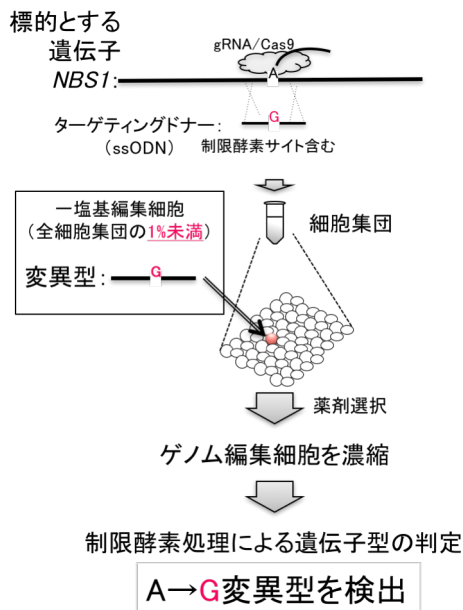


図 1. 一塩基編集細胞株樹立ワークフロー

(2) 今後の展望

ゲノム編集技術の利用により、細胞の遺伝的背景を揃えた状態で SNP の比較実験を短期間に行うことが可能となった点が、本研究の最大の特徴である。

DNA 損傷修復研究分野では、もともと修復関連遺伝子に変異をもつ細胞 (遺伝病患者由来細胞など) を野生型細胞と比較することにより詳細な細胞内メカニズムの解析が行われてきた。ゲノム編集を用いた逆遺伝学的手法をヒト培養細胞レベルで行う試みは、これまでの患者由来細胞株を用いた研究では得られない、より詳細な細胞内機能解析が可能となり、今後の主流となると予想している。

ゲノム編集による細胞評価系の確立は他の疾患 SNP にも応用が可能であり、様々な SNP について細胞ベースでの分子機能解析に用いることが出来る。

SNP 解析研究は将来的に、個人の放射線感受性を加味したテーラーメイド放射線治療/

診断の実現に向けた基礎基盤研究となりえる
と期待される。また、疾患関連 SNP 探索が世界中で進められており、今後は、変異導入細胞をスピーディーに作製し解析する需要が高まると予想される。本研究の成果は、将来的に様々な疾患に応用が可能であると考えられ、一塩基編集法のハイスループット化を目指す上での基盤研究になり得ると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 柳原啓見、宮本達雄、Ekaterina Royba、Silvia Natsuko Akutsu、山本卓、松浦伸也
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
日本放射線影響学会第 59 回大会、
2016 年 10 月 26-28 日
JMS アステールプラザ (広島)

2. Hiromi Yanagihara, Tatsuo Miyamoto, Ekaterina Royba, Silvia Natsuko Akutsu, Sinya Matsuura
Generation of SNP-knock-in cells using CRISPR/Cas9 system for elucidation of the effect on radiation sensitivity
15th International Congress of Radiation Research
2015 年 5 月 25-29 日
国立京都国際会館 (京都)

[図書] (計 1 件)

1. 加藤晃弘、柳原啓見、小松賢志
日本臨牀
Nijmegen breakage syndrome (ナイミーヘン症候群)
家族性腫瘍学 - 家族性腫瘍の最新研究動向 -
73 巻増刊号 6
2015 年、総ページ数 607 (216-219)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/rbm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳原 啓見 (YANAGIHARA HIROMI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所
助教

研究者番号：50719474

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし