

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	ROYBA EKATERINA
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目			
<p>Evaluation of <i>ATM</i> heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing in human cultured cells</p> <p>(ヒト培養細胞株におけるゲノム編集を用いた <i>ATM</i> ヘテロ遺伝子変異による放射線感受性個人差への定量的評価)</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	保田 浩志	印
審査委員	教授	栗井 和夫	
審査委員	教授	稲葉 俊哉	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>ヒト集団には放射線感受性の個人差が存在しており、その遺伝素因として DNA 修復遺伝子上の一塩基多型 (SNP) や変異が推定されている。これを証明するには、候補 SNP または変異を保有するヒトの末梢血リンパ球の放射線感受性を測定して、候補配列の生物効果サイズを評価することが有用である。しかし、喫煙や飲酒などの交絡因子に加えて、ヒト集団には多様な遺伝的背景があるため、個人の放射線感受性を規定する遺伝素因を同定することはこれまで困難であり、均一な遺伝的背景での定量的な評価系の確立が求められていた。本研究では、放射線高感受性遺伝病のヘテロ遺伝子変異が放射線感受性個人差を規定する遺伝素因の一部であるとの仮説を立てて、放射線高感受性遺伝病の一つである毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia-Telangiectasia : A-T) をモデルにして、A-T 保因者由来皮膚線維芽細胞ならびに CRISPR-ObLiGaRe 法で樹立した <i>ATM</i> ヘテロノックアウト (<i>ATM</i>+/-) 細胞の放射線感受性について微小核形成法を用いて計測した。</p> <p>A-T 原因遺伝子 <i>ATM</i> のヌル変異をコンパウンドヘテロに有する患者 1 名と、その保因者 3 名、健常者 2 名からなる A-T 家系の皮膚線維芽細胞を入手した。これらの細胞を、カバーガラスを入れた 6 穴プレートの各ウェルに播種して 4 時間後に、0.5 Gy、1 Gy、2Gy のガンマセル 40 エグザクタによる ¹³⁷Cs ガンマ線の急照射 (1 Gy/min) を行い、サイトジェネティックス顕微鏡を用いて独立に 3 回微小核形成頻度を計測した。その結果、患者細胞では放射線照射後の微小核形成が健常者細胞および保因者細胞に比べて大きく亢進した。また、保因者細胞は健常者細胞に比べて放射線照射後の微小核形成頻度が亢進し</p>			

ていた。さらに興味深いことに、健常者細胞間および保因者細胞間でも放射線感受性に有意な違いが検出され、*ATM* 遺伝子座以外の遺伝的背景の違いを反映していることが示唆された。

次に、*ATM* ヘテロ遺伝子変異の放射線感受性に与える正味の生物影響を評価するために、均一な遺伝的背景をもつ正常網膜色素上皮組織由来細胞株 hTERT-RPE1 細胞を用いて、A-T 患者モデル細胞および保因者モデル細胞を作製した。具体的には非相同末端結合 (NHEJ) を介した遺伝子ノックイン技術である ObLiGaRe 法を用いて、*ATM* 遺伝子のエクソン 11 に薬剤耐性遺伝子カセットを挿入した。すなわち、 2.0×10^5 cells の hTERT-RPE1 細胞をトランスフェクションの 24 時間前に 6 穴プレートの各ウェルに播種して、ドライバーベクター px330 と、ターゲティングベクターをリポフェクション法で導入した。トランスフェクション後 48 時間目に、細胞を 15 cm ディッシュに展開して 10% FBS、2 mg/ml G418 を添加した DMEM 培地内で 14 日間培養を行い、薬剤耐性クローンを単離した。得られた 211 個の細胞クローンについて、PCR 法と直接シーケンス法で *ATM* 遺伝子型を決定して、A-T モデル細胞 153 クローンと保因者モデル細胞 7 クローンを得た。そのうち、2 クローンの A-T モデル細胞と 3 クローンの保因者モデル細胞、2 クローンの健常者モデル細胞の放射線感受性について微小核形成法で独立に 3 回評価した。その結果、A-T モデル細胞は、保因者モデル細胞や健常者モデル細胞に比べて著明な微小核形成頻度を示した。さらに、保因者モデル細胞は、健常者モデル細胞に比べて放射線照射後の微小核形成頻度が亢進していた。重要な発見として、各 *ATM* 遺伝子型のゲノム編集細胞クローン間の微小核形成頻度のばらつきは、A-T 家系由来線維芽細胞に比べて小さく、低線量域においても *ATM* ヘテロ遺伝子変異の放射線感受性に与える影響が検出された。放射線高感受性遺伝病はいずれも発症頻度は極めて稀だが、そのヘテロ保因者は高頻度に認められ、人口の数%~10%を占めると推定されている。したがって、A-T をはじめとする放射線高感受性遺伝病の保因者の放射線感受性を検証することは、より適切な放射線防護の実現において重要であると考えられる。

以上の結果から、*ATM* 遺伝子のヘテロ変異が放射線感受性個人差を規定する遺伝素因の一つであることが明らかとなった。本研究では、ヒト培養細胞株にゲノム編集法を用いて、特定の遺伝子変化が放射線感受性に与える影響を高感度かつ定量的に評価する解析手法を確立しており、将来の放射線防護のテーラーメイド化への第一歩となる可能性を示した点は高く評価される。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	ROYBA EKATERINA
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Evaluation of <i>ATM</i> heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing in human cultured cells (ヒト培養細胞株におけるゲノム編集を用いた <i>ATM</i> ヘテロ遺伝子変異による放射線感受性個人差への定量的評価)			
最終試験担当者			
主査	教授	保田 浩志	印
審査委員	教授	栗井 和夫	
審査委員	教授	稲葉 俊哉	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年8月3日の第70回広島大学研究科発表会(医学)及び平成29年8月8日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 微小核形成法について 2 微小核形成法とγH2AX法の相違点 3 <i>ATM</i>タンパク質発現量と微小核形成頻度が相関しなかった理由 4 臨床応用への展望 5 研究結果の放射線災害復興における意義 <p>これらに対して極めて適切な回答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			