

## 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	富岡 啓太
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 <i>NBS1</i> I171V variant underlies individual differences in chromosomal radiosensitivity within human populations (放射線感受性の遺伝的個人差を規定する候補因子 <i>NBS1</i> I171V 多型の同定)			
論文審査担当者			
主査	教授	田代 聡	印
審査委員	教授	保田 浩志	
審査委員	准教授	笹谷めぐみ	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>遺伝情報は、DNA 二本鎖切断修復機構によって、電離放射線などの様々な遺伝毒性から保護されている。DNA 修復遺伝子の変異または多型が、ヒト集団内における放射線感受性(発がんリスク)の個人差を規定することがゲノムワイド関連解析やがん患者の臨床シーケンスにより示唆されてきた。これまで、放射線感受性の個人差は、疫学調査と患者検体を直接調べる方法があったが、いずれもリスク評価を行うには限界があった。申請者の所属研究室では、遺伝的背景が均一なゲノム編集モデル細胞を作製して、染色体の大量画像データを取得することで、交絡因子や多様な遺伝的背景などの影響を受けない高感度な定量的評価法が開発されていた。この手法を用いて、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の原因遺伝子 <i>ATM</i> 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つであることが示された。</p> <p>本研究では、放射線感受性個人差を規定する新たな遺伝素因の同定を目的として、放射線高感受性集団として知られている日本人卵巣がん患者 29 名の全エクソーム解析を施行した。その結果、DNA 二重鎖切断修復遺伝子 <i>NBS1</i> の I171V 多型を 1 名に同定した。<i>NBS1</i> はナイミーヘン染色体不安定症候群の原因遺伝子であり、<i>NBS1</i> I171V はタンパク質相互作用に重要な BRCT ドメインに位置していた。そのホモ接合体は、ナイミーヘン染色体不安定症候群の特徴的症状を示さないが、再生不良性貧血を発症したとの報告があった。<i>NBS1</i> I171V は小児髄芽腫や喉頭がん、肺がんのリスクを増加させるという報告がある一方で、発がんには寄与しないとの報告もあり、疫学的な発がんリスク因子としての評価は定まっていなかった。そこで、<i>NBS1</i> I171V が放射線感受性個人差に関与するか否かについて解析することとした。</p> <p>CRISPR / Cas9 システムを HCT116 細胞に使用して、<i>NBS1</i> I171V 多型ノックイン細胞の作製を試みた。その結果、2 つの両アレル性ノックイン細胞(<i>NBS1</i> I171V/I171V 細胞)と、1 つの両アレル性野生型ノックイン細胞(<i>NBS1</i> +/+細胞)を樹立した。これらの細胞について、放射線照射後のコロニー形成法により、放射線に対する致死感受性を評価した結果、両アレル性ノックイン細胞(<i>NBS1</i> I171V/I171V 細胞)は、両アレル性野生型ノックイン細胞と HCT116 親株細胞に比較して、有意にコロニー形成率が低下していた。次に放射線に対する染色体不安定性としての放射線感受性を評価するため、Metafer system を用いて半自動的に 1 クローンあたり 1000 以上の二核細胞を計測したところ、両アレル性ノックイン細胞(<i>NBS1</i> I171V/I171V 細胞)は、両アレル性野生型ノックイン細胞と HCT116 親株細胞に比較して、有意に高い放射線照射後の微小核形成率を示した。</p>			

放射線照射後の染色体損傷形成率においても同様の結果を示した。

CRISPR / Cas9 システムを HCT116 細胞に使用して、ヘテロ接合の *NBS1* I171V/+ 細胞の作製も試みたが、1 クローンも得られなかった。そこで、ゲノム編集技術をマウス受精卵に用いて *Nbs1* I171V ノックインマウスを作製し、*Nbs1* I171V/+マウスを交配して、各 *Nbs1* 遺伝子型の MEF 細胞を作製した。放射線に対する染色体不安定性としての放射線感受性を評価するため、Metafer system を用いて半自動的に 1 クローンあたり 1000 以上の二核細胞を計測したところ、*Nbs1* I171V/I171V MEF 細胞は *Nbs1* +/+ MEF 細胞と比較して、有意に高い放射線照射後の微小核形成率を示した。さらに *Nbs1* I171V/+ MEF 細胞は *Nbs1* +/+ MEF 細胞と比較して、有意に中程度の微小核形成率を示した。放射線照射後の染色体損傷形成率においても同様の結果を示した。

以上の結果から、本論文によって *NBS1* I171V 多型は、ヒト集団における染色体の放射線感受性の個人差をもたらす遺伝素因である可能性が示唆された。医療放射線被ばくには線量限度は定められていないが、頻回の X 線や CT 検査が発がんリスクを増加させることは確実なため、医療現場においても放射線防護の最適化が必要である。本論文のようなモデル細胞を作製する「逆遺伝学的アプローチ」は、遺伝的背景が均一な条件で遺伝子多型を評価できるため、放射線感受性個人差を規定する遺伝素因を解明する上で有用な手段と考えられた。

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があるものと認めた。