

# 新規相同組み換え修復活性測定法による 乳がん発症リスク診断法の開発

東北大学加齢医学研究所腫瘍生物学分野 助教 吉野 優樹

## 要 約

癌は本邦における最大の死因であり、その診断法・治療法の開発は重要な社会的課題である。発癌はDNA変異の蓄積によって生じるため、DNA損傷修復機構は発癌リスクの規定因子の一つである。また、抗癌薬や分子標的治療薬には、DNA損傷修復活性が障害された細胞に特異的な毒性を発揮する薬剤があることから、DNA損傷修復活性の評価は癌の診断・治療の両面で重要である。

我々は培養細胞を対象とし、DNA損傷修復機構の一つである相同組み換え修復(以降HR)の活性を定量する手法としてAssay for Site-specific HR Activity (ASHRA)を開発し、従来法よりもより定量的かつ薬剤感受性と高い相関が得られることを報告してきた。本研究では、ASHRAを応用し、患者検体、具体的には患者由来の末梢血リンパ球を用いてHR活性を直接定量する手法の開発を行った。

ASHRAでは2種類の測定用プラスミドベクターを対象細胞に導入し、HRによって生じる産物を定量PCRによって検出する。評価対象であるリンパ球にプラスミドを導入するため、エレクトロポレーション法を用いた。健常人由来のリンパ球を不死化したリンパ芽球様細胞を用い、エレクトロポレーション条件を最適化した結果、ASHRA測定用ベクターを十分な効率で導入することができ、HR産物を検出することができた。また、遺伝性乳癌卵巣癌症候群患者由来のリンパ芽球様細胞ではHR産物量が少ないことも確認できた。

今後、プラスミド導入効率の差の補正法などを開発し、本法を実際の臨床検体の評価に応用していきたい。

## 緒 言

癌は本邦における最大の死因であり、その診断法・治療法の開発は重要な社会的課題である。近年の腫瘍生物学の進展により、癌の生物学的な特徴を基にした診断法・治療法が開発され、大きな成果をあげつつある。

癌は遺伝子変異が蓄積した結果生じる疾患であるため、ゲノム安定性の維持に寄与するDNA損傷修復系の異常は発癌を促進する一因となる。実際、癌の多くでDNA損傷修復系に何らかの異常がみられるうえ、先天的にDNA損傷修復系に異常を有する場合、高頻度に癌を発症する遺伝性癌症候群となる例がある。相同組み換え修復(Homologous recombination repair、以降HRと略す)はDNA二本鎖切断や鎖間架橋、複製フォークの停止などのDNA損傷の修復に必要であり、*BRCA1/2*、*RAD51*などの多くの因子が関与する複雑な分子機構である。*BRCA1/2*遺伝子に胚細胞性のヘテロ欠損変異を有する症例は、乳癌を70%、卵巣癌を40%程度の頻度で発症することから、遺伝性乳癌卵巣癌症候群

と呼ばれる。*BRCA1/2*以外のHR関連因子の変異もまた、遺伝性乳癌や卵巣癌症例で報告されていることから、HR関連因子の異常はこれらの癌の発症に重要であると考えられる。

HR活性は癌の治療においても重要である。プラチナ系抗がん薬や電離放射線は、HRによって修復されるDNA損傷を作成することで癌細胞を障害することから、HR活性に異常を有する癌に特に高い効果を発揮する。また、近年開発されたpoly(ADP-ribose) polymerase阻害薬(以降PARP阻害薬と略す)はHR活性障害との合成致死を利用した薬剤であり、HR活性に異常を有する癌に特異的に治療効果を発揮する。

これらから、HR活性の評価は遺伝性癌症候群の診断、および癌治療薬選択における層別化に有用と考えられるが、実臨床に応用可能なHR活性の直接評価法は確立されていない。現時点では、HR関連因子の遺伝子変異解析や、HR活性の異常によって生じるゲノム変異を計数することでHR活性を間接的に評価する方法(HRDスコアなど)が用いられて

いる。しかし、遺伝子変異解析では、同定される変異の機能的帰結が判明していない場合、診断不能となる。また、HRDスコアは過去のHR活性障害の結果を代理マーカーとするものであり、検査時点でのHR活性を評価するものではないため、治療への耐性化など、時間的なHR活性の変化を捉えることができない。

これらの問題点を解決するため、我々は患者由来の検体を用いて直接HR活性を測定する方法を開発することとした。我々は、培養細胞を用いてHR活性を定量する手法としてAssay for Site-specific HR Activity (ASHRA、図1<sup>1</sup>)を開発し、ASHRAによる測定値は従来法よりもより定量的にHR活性を反映すること、およびPARP阻害薬感受性と高い相関が得られることを報告してきた<sup>2,3</sup>。本研究では、ASHRAを応用し、患者検体、具体的には患者由来の末梢血リンパ球を用いてHR活性を直接定量する手法の開発を行う。

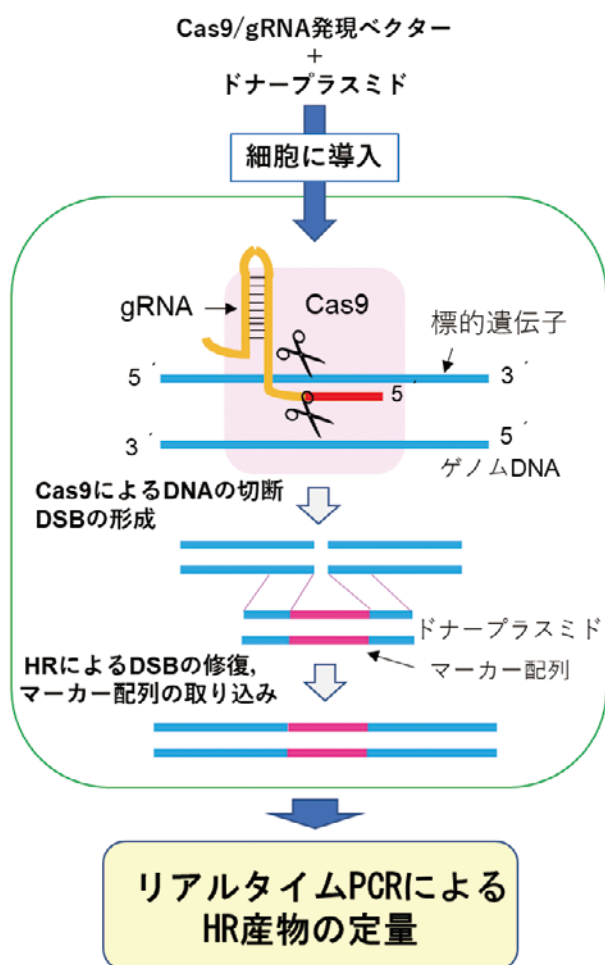


図1. ASHRAの概要

ASHRAの概要を示す。  
吉野 et al. 化学工業2019より改変

## 方法

### 細胞

実験に使用した健常人由来リンパ芽球様細胞株は理化学研究所バイオリソース研究センターから購入した。遺伝性乳癌卵巣癌症候群患者由来リンパ芽球様細胞(HCC1937-BL)はATCCから購入した。細胞は20% FBSを添加したRPMI1640培地で培養した。

### プラスミド

遺伝子改変に用いたLentiCRISPRv2(Addgene ID: #52961)はAddgeneから入手し、標的遺伝子に対するgRNA配列をクローニングして用いた。

### 遺伝子編集

標的遺伝子に対するgRNA配列をクローニングしたLentiCRISPRv2とドナープラスミドを1:1の質量比で混合し、3.5cmディッシュあたり1 μgのプラスミド混合物を導入した。トランスフェクションにはポリエチレンイミンを用いた。導入の24時間後に細胞を10cmディッシュに再播種し、ピュロマイシンを1 μg/mlの終濃度になるように培地に添加し、コロニーが形成されるまで培養を行った。

### リンパ芽球様細胞への遺伝子導入

10<sup>6</sup>個の細胞をOpti-MEMで懸濁し、プラスミド5 μgを加えてエレクトロポレーションを行った。最適化後の通電条件は以下の通りである。ポアリングパルス：電圧125V、パルス幅5msec、パルス間隔50msec、パルス回数2回、減衰率10%、極性切り替えなし。トランスファーパルス：電圧20V、パルス幅50msec、パルス間隔50msec、パルス回数5回、減衰率40%、極性切り替えあり。エレクトロポレーションはNEPA21(ネッパジーン社)で実施した。

### ASHRAによるHR活性測定

細胞のHR活性は<sup>2</sup>に記載された方法を若干の修正を加えて実施した。使用したプラスミドはpBS-ACTB-C200-GFPfr2(ドナープラスミド、Addgene ID: #170726)、LentiCRISPRv2-scr(コントロールプラスミド、Addgene ID: #169795)、LentiCRISPRv2-ACTB-C1(測定用プラスミド、Addgene ID: #169796)である。

## 結果

### リンパ芽球様細胞に対するプラスミド導入

図1にASHRAの概要を示す。これに示されるように、ASHRAではCas9/gRNA発現ベクター、およびマーカー配列を含むドナーベクターの2種類のプラスミドベクターを対象細胞に導入する必要がある。

そこで、ヒトリンパ芽球様細胞に対するプラスミド導入法の条件検討を行った。GFP発現プラスミドを用い、リンパ芽球様細胞に種々の条件で電圧ポレーションを行い、GFP導入細胞をフローサイトメトリーによって計測した。最適化したパラメータは、印加電圧、印加パルス幅、印加回数、およびパルス極性の切り替えの有無である。最適化の結果、ヒトリンパ芽球様細胞株において十分な遺伝子導入が得られる条件が決定できた。

### リンパ芽球様細胞におけるHR活性の測定

最適化した遺伝子導入条件を用い、ASHRAの測定用ベクターをリンパ芽球様細胞に導入し、HR活性の測定を試みた。健常人由来のヒトリンパ芽球様細胞株、およびBRCA1に胚細胞性のヘテロ欠損変異を有する遺伝性乳癌卵巣癌症候群患者由来のヒトリンパ芽球様細胞を用いてHR活性を測定したところ、健常人由来ヒトリンパ芽球様細胞よりも遺伝性乳癌卵巣癌症候群患者由来ヒトリンパ芽球様細胞の方でHR活性が低い傾向が認められた(図2)。しかしながら、同一細胞でも実験間で測定値のばらつきが大きく、直接比較は困難と考えられた。また、異なる

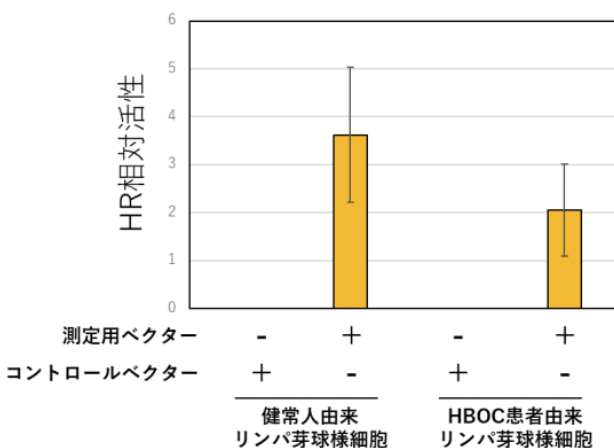


図2. リンパ芽球様細胞のHR活性測定結果

健常人由来、および遺伝性乳癌卵巣癌症候群患者由来のリンパ芽球様細胞のHR活性をASHRAで測定した結果を示す。

ヒト由来のリンパ芽球様細胞間で、プラスミド導入効率は大きく異なっていた(図3)。

### BRCA1ヘテロ接合性変異を有する疾患モデル細胞の樹立

研究時点で、BRCA1変異陽性の遺伝性乳癌卵巣癌症候群患者由来のリンパ芽球様細胞は1種類しか公的なバンクから入手できない。そこで、遺伝子編集を用い、BRCA1にヘテロ接合性変異を導入した疾患モデル細胞の樹立を試みた。疾患との関連が明らかであり、変異体の分子生物学的性状がよく解析されているC61G、およびC64G変異を選択し、CRISPR/Cas9を用いて遺伝子編集を行った。図のようにドナーベクターとgRNAを設計し、HeLa細胞に導入したところ、遺伝子編集クローンが複数得られた。しかし、いずれのクローンでもCas9による切断部位に挿入・欠損が生じていた(図4)。

## 考察

本研究では、我々が開発したHR活性測定法であるASHRAを用い、臨床的に検体を得ることが容易なリンパ球を材料にしてHR活性を測定する方法の開発を行った。EBウイルスによって不死化したリンパ球であるリンパ芽球様細胞に対して、電圧ポレーション条件を最適化することでアッセイが可能な程度のプラスミド導入効率が得られた。また、リンパ芽球様細胞を用いてHR産物を検出することができ、その量は遺伝性乳癌卵巣癌症候群患者由来のリンパ芽球様細胞において、健常人由来リンパ芽球様細胞よりも少なかったことから、疾患細胞にお

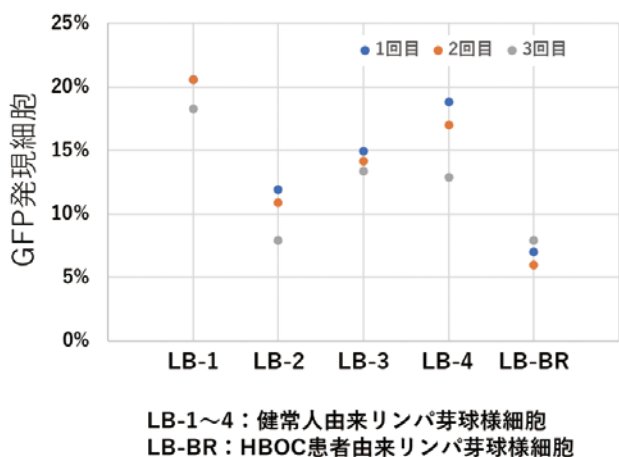


図3. リンパ芽球様細胞のプラスミド導入効率の比較

リンパ芽球様細胞にGFP発現プラスミドベクターを導入し、48時間後にフローサイトメーターで計数し、生細胞中のGFP陽性細胞の割合を算出した。各細胞株ごとに3回の測定を行った結果を示す。

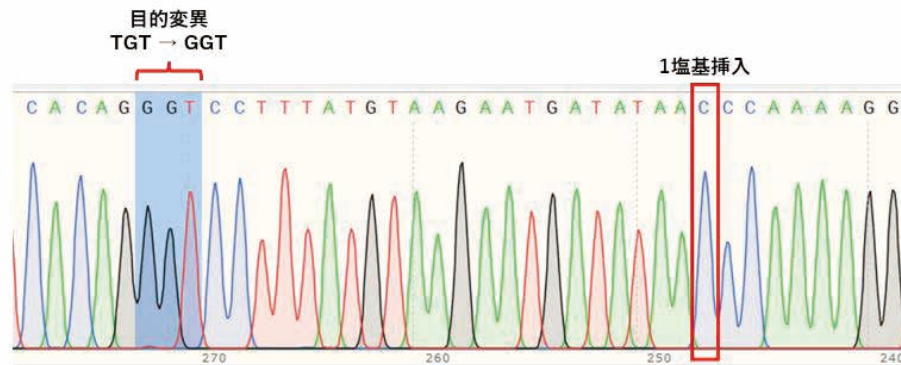


図4. 遺伝子改変細胞のシーケンス結果  
BRCA1にC61G変異が導入されたクローンの例を示す。

けるHR障害を検出できた可能性が考えられる。しかし、異なるヒトに由来するリンパ芽球様細胞間のプラスミド導入効率は思いの外ばらつきが大きく、ASHRA測定値に影響を与えていると考えられる。実際にASHRAで臨床検体のHR活性を評価するためには、今後サンプル間のプラスミド導入効率の差によるASHRA測定値の影響を補正する手法を開発する必要があると考えられた。

実際の疾患患者由来のリンパ芽球様細胞は、現時点では1種類しか入手できなかった。そこで遺伝子変異を用いて疾患モデルリンパ球の樹立を試みた。CRISPR/Cas9を用いてBRCA1遺伝子に部位特異的に点変異の導入を行ったところ、目的変異の導入は可能であったが、得られた全クローンでCas9による切断部位に挿入・欠損が生じていた。これは目的変異が導入されたアレルもCas9で切断可能なことから生じたと考えられた。そこで、gRNA標的配列に同義変異を導入し、目的変異が導入された後は切断が生じないようなドナーベクターを設計した。今後、このベクターを用いて疾患モデルリンパ芽球様細胞の作成を行い、HR活性の評価に用いる予定である。

#### 謝 辞

本研究を行うに当たりまして公益財団法人神澤医学研究振興財団からのご支援を頂きましたことに厚く感謝を申し上げます。

#### 参考文献

1. 吉野優樹, 遠藤菜乃, 千葉奈津子. 抗がん剤感受性を予測する DNA 修復能の測定法の開発. 化学工業. 2019;70(10):709-15.
2. Yoshino Y, Endo S, Chen Z, Qi H, Watanabe G, Chiba N. Evaluation of site-specific homologous recombination activity of BRCA1 by direct quantitation of gene editing efficiency. Sci Rep. 2019 Feb 7;9(1):1644.
3. Endo S, Yoshino Y, Shiota M, Watanabe G, Chiba N. BRCA1/ATF1-Mediated Transactivation is Involved in Resistance to PARP Inhibitors and Cisplatin Transactivation by BRCA1/ATF1 Causes Resistance to PARPi. Cancer Research Communications. 2021 Nov 2;1(2):90-105.

**Abstract**

Cancer is the leading cause of death in Japan. DNA damage repair mechanism is essential for suppressing carcinogenesis. In addition, the activity of DNA damage repair is one of the determinants of effect for chemotherapy. Thus, it is an important clinical demand to evaluate DNA damage repair activity. We previously developed a new method, Assay for Site-specific HR Activity (ASHRA), to measure homologous recombination activity, a pathway of DNA damage repair. In this study, we applied ASHRA to a clinically available specimen to evaluate homologous recombination activity in a clinical situation.

We choose lymphocyte as samples because it is easily obtained without invasive techniques. Using electroporation with the optimized condition, the plasmid vectors for ASHRA were efficiently delivered into lymphoblastoid cells, immortalized lymphocyte cells, and the activity of homologous recombination was detected. In addition, the measured value of the cells from a hereditary breast and ovarian cancer syndrome patient was lower than that of cells from a healthy individual.

To further develop this method to apply clinical specimens, normalization of the variation of the efficiency of the assay plasmid delivery between samples should be developed. We will optimize our strategy to apply to clinical specimens.