

DNA 損傷の定量による DNA 損傷修復活性の評価法の開発

所属：東北大学 加齢医学研究所 腫瘍生物学分野

助成対象者：吉野 優樹

概要

相同組み換え修復 (HR) は DNA 損傷修復機構の一つであり、その障害が PARP 阻害薬などの抗がん薬への感受性を規定する。我々は HR 活性の新たな測定法、ASHRA を開発し、HR 活性を定量的に評価することを可能にしていた。ASHRA では測定用プラスミドベクターを細胞に導入する必要があり、性質が大きく異なる細胞間ではベクター導入効率などの違いが測定値に影響を与えてしまう。したがって、ASHRA を臨床応用するためには、サンプルの状態の違いに起因する測定値の差を補正し、サンプル間で比較可能な測定値を得る必要がある。本研究では、ASHRA 測定値に影響を及ぼす因子を解析し、その影響を補正する方法の開発を行った。

abstract

Homologous recombination repair (HR) contributes repair of DNA damages. The activity of HR determines sensitivity to several anti-cancer agents including PARP inhibitors. We previously developed a new method named ASHRA to measure the HR activity. ASHRA can evaluate cellular HR activity quantitatively. In ASHRA, plasmid vectors for measurements are introduced into sample cells. Thus, difference of vector introduction efficiency can affect the measured values. To apply ASHRA to clinical sample, we should remove

the effect of differences between samples from the measurement of ASHRA. In this study, we analyzed several cellular phenotypes affecting ASHRA measurement to develop a new protocol to evaluate the HR activity.

研究内容

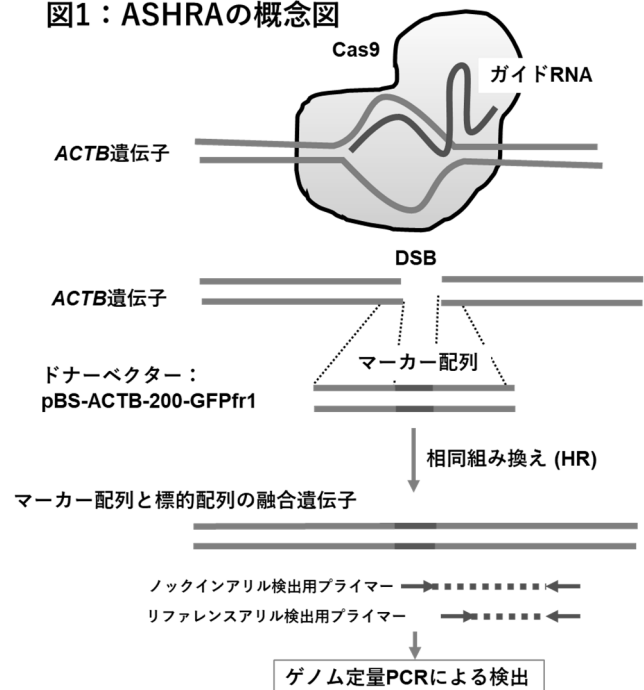
【背景】

相同組み換え修復 (Homologous recombination repair: HR) は DNA 損傷修復機構の一つであり、DNA 二本鎖切断や鎖間架橋などの DNA 損傷の修復に寄与する。HR 関連因子の変異などによる HR 障害は、がんではしばしば認められる異常であり、PARP 阻害薬などの抗がん薬への感受性を規定する。したがって、HR 活性の評価はがん治療の方針決定において重要な意味を持つ。

我々は HR 活性の新たな測定法、Assay for Site-specific HR Activity (ASHRA) を開発し、HR 活性を定量的に評価することを可能

にした(1, 2)。図 1 に ASHRA の概要を示す。ASHRA では 2 種類の測定用プラスミドベクターを細胞に導入する。1 つ目のベクターからは Cas9 タンパク質と guide RNA が発現し、guide RNA 配列で指定される標的遺伝子上でゲノム DNA が切断される。2 つ目のベクターは標的遺伝子と相同な配列とマーカー配列を有し、組み換えのドナーとなる。ドナーベクターを鋳型として HR によって DNA 二本鎖切断が修復される際、マーカー配列がゲノムに取り込まれるため、取り込まれたマーカー配列の量を定量することで HR 活性を評価する。この方法によって HR 因子のノックダウンや変異による HR 活性の変化を定量的に測定することができる。一方、異なる細胞株など、特性が大きく異なるサンプル間では、ベクターの導入効率や Cas9 の発現効率が異なり、ASHRA による測定値(見かけの HR 活性値)に影響を与えうる。したがって、ASHRA を臨床検体に応用するためには、HR 活性以外の因子の影響を補正した

図1：ASHRAの概念図



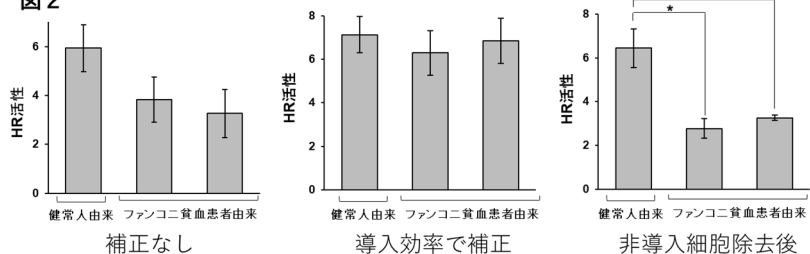
真の HR 活性値を求める必要がある。本研究では、見かけの HR 活性値に影響を与える因子を解析し、サンプル間での HR 活性の比較を可能にする補正法の開発を試みた。

【結果】

まず、測定用ベクターの導入効率の差が測定結果に与える影響を解析するため、人為的にベクター導入効率を変えて測定用ベクターを導入したサンプルを作成し、HR 活性を測定した。その結果、ベクター導入効率の対数と HR 活性が線形相関することが明らかになった。このことから、同一細胞種を用いた解析においては、HR 活性と同時にベクター導入効率を測定することで、操作によって生じるベクター導入効率の差による測定値への影響を補正することが可能と考えられた。

次に、異なる細胞種間で同様のベクター導入効率による測定値の補正を試みた。HR 活性が障害されることが報告されている Fanconi 貧血患者由来の線維芽細胞を用い、健常人由来線維芽細胞と HR 活性を比較したところ、ベクター導入

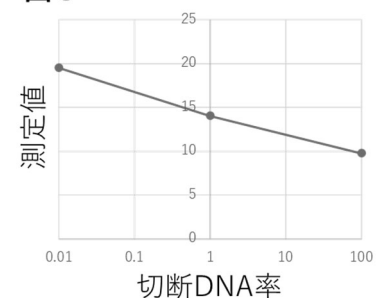
図 2



率によって補正しても HR 活性に有意な差は検出できなかった。そこで、ベクター非導入細胞を薬剤処理によって除き、ベクター導入率をほぼ 100%にしたサンプルを作成したところ、Fanconi 貧血患者由来線維芽細胞において有意な HR 活性の低下を検出できた(図 2、未発表データ)。

さらに根本的な補正法としては、HR の基質である DNA 二本鎖切断の数を定量し、生じた DNA 二本鎖切断のうち HR で修復されたものの割合を算出すればよいと考えられた。そこで、DSB 末端に検出用のアダプターオリゴ DNA を付加し、標的遺伝子上のプライマーを用いてアダプター付加 DNA のみを特異的に検出する方法(アダプターPCR 法)を試みたところ、切断

図 3



された DNA を特異的に検出することができ、その定量も可能であった(図 3、未発表データ)。

【考察】

CRISPR/Cas9 を応用した遺伝子編集は、近年急速に適応範囲を広げ、広く行われるもの

となっているが、その効率に影響を与える因子、特に編集効率との量的な関係の詳細は明らかになっていない。本研究によって、遺伝子編集用のベクター導入効率の対数が遺伝子編集効率と比例することが明らかになった。導入効率が高い場合、一細胞あたりに導入されるベクター量も多くなることから、細胞あたりより多くの DNA 二本鎖切断が形成されるために、ベクター導入効率の対数が編集効率と比例すると考えられた。一方、異なる細胞間でベクター導入効率によって測定値を補正することはできなかった。これは、導入後、Cas9 の発現効率などにも細胞間で差があるためと考えられた。一方、非導入細胞を除くことで異なる細胞間でも HR 活性を比較できる可能性が示された。

より根本的な補正法の開発のため、DNA 二本鎖切断数の定量を試み、DNA 二本鎖切断を部位特異的に定量することに成功した。今後、実際に測定用ベクターを導入した細胞で DNA 二本鎖切断を定量し、これによる補正が可能であるかを検討する予定である。

引用文献

1. 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.
2. Endo S, Yoshino Y, Shirota 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.

本助成に関わる成果物

[口頭発表]

1. 本成登貴和, 吉野優樹, 春田萌, 遠藤志乃, 角掛聡子, 柳垣美歌, 進藤晴彦, 小坂真吉, 江幡明子, 濱中洋平, 原田成美, 宮下穰, 多田寛, 千葉奈津子, 石田孝宣. 臨床検体での HR 活性評価を目指した DSB 定量法の開発. 2022 第 30 回日本乳癌学会総会