

氏名（本籍）	よしだ まさかず 吉田 将和	（岡山県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第 671 号	
学位授与日付	平成 31 年 3 月 14 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学位論文題目	Development of an integrated CRISPRi targeting $\Delta$ Np63 for treatment of squamous cell carcinoma	
審査委員	教授 守田 吉孝	教授 大槻 剛巳
		教授 佐々木 環

### 論文の内容の要旨・論文審査の結果の報告

近年、CRISPR/Cas9 と呼ばれるゲノム編集技術が注目されている。本研究ではこの技術を応用し、肺および食道扁平上皮癌において癌遺伝子（ドライバー遺伝子）として働く  $\Delta$ Np63 の転写を特異的かつ効率的に阻害することを試みている。具体的には、転写抑制因子（KRAB）に連結した不活性化 Cas9（dCas9）と  $\Delta$ Np63 の転写開始部位の下流の特定配列を含むガイド RNA（gRNA）を同時に癌細胞に発現させることで、ドライバー遺伝子である  $\Delta$ Np63 の転写活性を抑制し、その抗腫瘍効果を検討している。

申請論文では、まず肺および食道扁平上皮癌株における  $\Delta$ Np63 の発現をイムノブロット法にて確認し、研究に使用する 3 種の細胞株（EBC2、TE8、KYSE70）を決定した。次に、gRNA を 1 種類あるいは 2 種類連結させた dCas9/KRAB+gRNA コンストラクト（CRISPRi $\Delta$ Np63）を作成し、ルシフェラーゼレポーターアッセイにて、gRNA を 2 種類連結させたコンストラクトが、癌細胞株の  $\Delta$ Np63 の転写活性をより効率的に抑制することを明らかにした。そして、その CRISPRi $\Delta$ Np63 を含むオールインワン型のアデノウイルスベクター（Ad-CRISPRi $\Delta$ Np63）を作成し、*in vitro* と *in vivo* で抗腫瘍効果を検討した。*In vitro* において、Ad-CRISPRi $\Delta$ Np63 は EBC2、TE8、KYSE70 の  $\Delta$ Np63 発現を抑制し、そのコロニー形成を効果的に抑制した。また、TUNEL 染色の結果から、EBC2 にアポトーシスを誘導していることも確認した。さらに、Ad-CRISPRi $\Delta$ Np63 を遺伝子導入した EBC2 をヌードマウスに皮下移植したところ、その腫瘍形成が有意に抑制されていることを確認した。考察においても、上記の各々の結果を論理的かつ適切に解説していた。

以上、本申請論文は *in vitro* と *in vivo* 双方において CRISPRi $\Delta$ Np63 による肺および食道扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果を示したものであり、この技術は、現在標的薬未開発の他の癌に対する治療法開発の基盤になり得る独創的な新技術である。科学・医学において重要な意義のある知見であり、学位論文に足るものと確信する。

## 学位審査会（最終試験）の結果の要旨

学位審査会では、申請者は所定の時間を厳守し、スライドを用いて論理的かつ分かりやすく発表した。冒頭に癌の発生や進行に役割を果たすドライバー遺伝子の概念、またゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 について詳細な説明がなされ、申請者が関連領域における十分な学識を有することが示された。引き続き、CRISPRiΔNp63 による肺および食道扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果に関して、目的、方法、詳細な結果ならびにその解釈と考察について論理的に必要な十分な説明がなされた。審査員からは、CRISPRiΔNp63 コンストラクトのデザインに関する質問、*in vivo xenograft* モデルでの検討（即ち、癌細胞株を前もってヌードマウスに皮下移植した後に Ad-CRISPRiΔNp63 を投与した場合の効果）、正常組織に発現した ΔNp63 を抑制した場合の検討などに関する質問があった。*In vivo xenograft* モデルでの検討においては、アデノウイルスベクターの精製上の問題にて実現が困難であった旨の回答があったが、このこと自体はベクター開発に関連する研究事項にて、本研究の目的を超えたものであり、本研究の価値を損なうものではないと判断された。その他の答弁においても、その領域の研究内容を十分に把握し適切に行われ、この研究をまとめるにあたり、十分な知識をもった上で論文を作成したことが伺われ、今後、更なる研究を遂行する能力も十分有していると考えられた。さらに、申請者からは、一つの遺伝子に対して複数の gRNA を使う CRISPRi コンストラクトの手法は、CRISPRi の遺伝子発現抑制効果が強いこと、また複数の標的遺伝子を同時に抑制させることができるメリットがあることも示された。この手法は、gRNA の配列を変えることで、本研究で標的とされた ΔNp63 遺伝子だけでなく、他の遺伝子の発現を抑制することで、多種の癌に対して応用が期待されると考えられた。

以上、本学位論文提出者である吉田将和氏は、学位授与に値する研究結果と資質を十分備えていると判断した。