

氏名	葭葉貴弘
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 578 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	CRISPR/Cas9 を応用した子宮頸癌に対する新規分子標的治療法の開発のための基礎研究
論文審査委員	(委員長) 教授 久米 晃 啓 (委員) 教授 崔 龍 洙 准教授 富 永 薫

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

Cas9 を恒常発現させた子宮頸がん細胞と、高リスク型ヒトパピローマウイルス (HPV) の発がん性蛋白質 E6 を標的とした単ガイド (sg)RNA (sgE6) 搭載アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター (AAV-sgE6) を用いて、子宮頸がん新規治療法の可能性を探索すること。

### 2 研究方法

3 種の高リスク型 HPV 陽性子宮頸がん細胞株 (HeLa, HCS-2, SKG-1) に Cas9 遺伝子を導入し、Cas9 の恒常発現株を樹立した。これらの細胞株に AAV-sgE6 を感染させ、遺伝子変異とその頻度、E6 およびアポトーシス関連蛋白質 (p53, BAX) 発現、アポトーシス細胞数、および細胞増殖抑制効果を *in vitro* で検討した。子宮頸がん細胞由来のマウス皮下移植腫瘍内に AAV-sgE6 を 1 回のみ直接投与し、腫瘍増殖抑制効果を検討した。CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集で問題となるオフターゲット効果の候補とされる配列における遺伝子変異の有無を調べた。

### 3 研究成果

AAV-sgE6 感染後の子宮頸がん細胞では E6 遺伝子の標的配列に、様々な変異が高頻度に観察された。また E6 の発現が低下し、一方、p53 と BAX の発現が増加した。さらに、アポトーシスおよびベクター粒子数に依存して細胞増殖が抑制された。マウス皮下移植モデルを用いた *in vivo* 実験においては、AAV-sgE6 を投与した腫瘍の増殖が顕著に抑制された。なお、AAV-sgE6 投与に伴う体重減少、局所の炎症反応は観察されなかった。AAV-sgE6 によるオフターゲット効果を解析した 10 サイト中、1 サイトにおいて 1/8 の頻度で遺伝子変異が認められた。

### 4 考察

高リスク型 HPV の E6 を標的とした sgRNA 搭載 AAV ベクター (AAV-sgE6) は、E6 の発現を抑制し、がん抑制遺伝子 p53 を正常に機能させることで Cas9 発現子宮頸がん細胞をアポトーシスに誘導し、*in vitro* および *in vivo* 実験で著明な増殖抑制効果を認めた。同時に AAV-sgE6 の投与による *in vivo* 実験の観察範囲では有害事象は認めず、AAV ベクターを介した CRISPR/Cas9 システムの局所

投与は忍容できると考えられる。

## 5 結論

高リスク型 HPV の E6 を標的とする CRISPR/Cas9 は、特異性の高い効果的な新規子宮頸がん治療材となる可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

子宮頸がんは女性のがん死亡原因の第 2 位を占める重要な治療標的であるが、手術療法・化学療法・放射線療法及びこれらの組み合わせによる治療成績は過去 30 年間改善しておらず、進行例の予後は依然として不良である。申請者らは、子宮頸がんが高リスク型ヒトパピローマウイルス (HPV) の感染により引き起こされることに着目し、HPV の主要ながん遺伝子である E6 をノックダウンすれば子宮頸がんを治癒に導けるのではないかという仮説を立てた。本論文では、遺伝子治療とゲノム編集技術を組み合わせてその実現可能性を探索し、子宮頸がんの新規治療法として有望であることを示した。

ゲノム編集の方法として汎用性の高い CRISPR/Cas9 システムを用いて E6 遺伝子が破壊できるかを検討するため、まず 3 種類の HPV 陽性子宮頸がん細胞株 (HeLa、HCS-2、SKG-I) に溶連菌由来 Cas9 遺伝子を導入してそれぞれ安定発現株を樹立した。次に、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに E6 遺伝子破壊のためのガイド RNA 遺伝子を組み込み、組換え AAV ベクター (AAV-sgE6) を作製した。この AAV-sgE6 を上記の Cas9 発現子宮頸がん細胞株に感染させたところ、細胞の *in vitro* 増殖が阻止された。これらの腫瘍細胞を詳しく解析したところ、標的となった E6 遺伝子に高率に変異が導入され E6 蛋白が発現しなくなったこと、腫瘍の親株では E6 にブロックされていたアポトーシス関連蛋白 (P53、BAX) の発現が回復してアポトーシスが誘導されたことが示された。E6 遺伝子の変異検出法としては塩基配列確認と定法である T7 endonuclease 1 アッセイのほか、申請者らが独自に開発した PCR による定量も実施した。ゲノム編集の際に問題となるオフターゲット効果についても検討し、低率ではあるが実際にオフターゲット編集が起こり得ることがわかった。最後に、ヌードマウスへの皮下移植モデルを用いて、本法による子宮頸がんの *in vivo* 治療が可能であるか検討した。移植した Cas9 発現 SKG-I 細胞塊に AAV-sgE6 を注射したところ、腫瘍の増殖は著明に抑制され、一方、移植された宿主マウスの一般状態に悪影響は観察されなかった。以上から、ゲノム編集技術を遺伝子治療と組み合わせることにより、子宮頸がんの新たな治療法開発につながる可能性が示唆された。

本学位論文には、着想から仮説を検証するための方法及び実験結果が順序立てて記載されており、得られた結果は信頼できるものである。考察についても飛躍がなく、実験系の限界も踏まえて今後の課題も提起されている。例えば、本論文では AAV ベクターに搭載できる遺伝子サイズの限界から、2 ステップによるゲノム編集を行ったが、この方法を臨床に適用することは難しい。申請者らは、サイズの小さなブドウ球菌由来の Cas9 遺伝子を用いて、単一の AAV ベクターでゲノム編集ができないか検討中である。

本研究の成果は子宮頸がんの新規治療法の開発に繋がるものとして臨床的意義も大きい。以上の理由により、全審査委員が一致して、本学位論文として相応しいものと判断した。

## 最終試験の結果の要旨

最終試験では、本研究の着想に至った背景と仮説、その仮説に答えるために研究に用いた材料・方法の妥当性と限界、得られた結果と解釈、及び考察について口頭試問が行われた。

申請者は、それらに関する質問に対して適切に答え、研究全般及び関連情報について十分に理解していることが確認された。また、研究内容の発表から質疑応答を通して一貫して自信をもった態度で臨んでいたことは、申請者自身が主体的に研究を遂行したことを示すものである。

以上から、申請者は本学大学院博士課程最終試験に合格と判断した。