

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 坂根 康太

本研究は乳癌の中でも特に難治性乳癌として知られる Basal-like 乳癌に焦点を当て、これまでに未確立であるその有効な治療法の発見に役立てることを目的とし、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法による新規癌抑制遺伝子の探索系の確立を目指したものである。

乳癌は日本においても女性の罹患率第一位の疾患であり、比較的若年の女性にも見られることから、患者の QOL(Quality of Life)の向上のために重要な研究対象である。乳癌はその遺伝子発現パターンによりいくつかのサブタイプに分類され、その中でもトリプルネガティブ乳癌に分類される Basal-like 乳癌 (BLBC)は、他のサブタイプと比べて悪性度が高く、予後が悪いことが知られている。それにも関わらず、他のサブタイプで有効なホルモン治療やハーセプチンなどが効かず、有効な治療標的が見つかっていないため、新規治療標的の発見や発癌メカニズムの解明が待たれている。そこで論文提出者は *in vivo* の BLBC の発癌モデルを用いることで生理的環境下での発癌メカニズムのより詳細な理解や新規治療標的の発見が可能なのではないかと考え、BLBC のモデルマウスとしてメスの C3(1)/SV40Tag マウス(C3 マウス)を用いて、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを利用した *in vivo* スクリーニングを考案した。

はじめに、*in vivo* での遺伝子導入方法を確立するため、蛍光タンパク質 Venus 遺伝子を導入するレンチウイルスを nipple より乳管内にインジェクションを試みた。その結果、乳管構造に沿って Venus の蛍光が確認された。また、この遺伝子導入が乳腺上皮細胞特異的であるかを確認するため、フローサイトメトリーによる解析を行った。表面抗原を利用した分画により、乳管を形成する Luminal 細胞(CD24^{high},CD49f⁺)や Basal 細胞(CD24⁺,CD49f^{high})を分画できるが、それら乳腺上皮細胞特異的に Venus の蛍光が検出された。このことから、レンチウイルスを乳管内にインジェクションすることで、乳腺上皮細胞への遺伝子の導入が可能であることが示された。

次に、上述のスクリーニング系の実施可能性について検討するために、既知の癌抑制遺伝子(Pten, Inpp5j, Rnd1, Rasa1)を対象とする gRNA を導入するレ

レンチウイルスを作製し、8週齢のメスのC3マウスに対して乳管内へのインジェクションを行った。形成されたすべての腫瘍よりゲノムDNAを抽出し、ゲノム上に挿入されたgRNA発現カセットを対象とするプライマーセットを用いてPCRを行い、腫瘍全てについてPtenを対象とするgRNAの導入が認められたことから、C3マウスの発癌過程にPtenの寄与が示唆された。そこで、Pten単独のノックアウトによって腫瘍形成が行われることを実証するために、Ptenを対象とするgRNAを導入するレンチウイルスを作製し、同様にC3マウスに対して乳管内へのインジェクションを行い、形成された腫瘍を解析したところ、gRNA発現カセットのゲノムへの挿入が確認された。実際にそれらの腫瘍についてPtenがノックアウトされているかどうかをgRNAの標的部位のゲノム配列をシーケンス解析することによっても確認を行った。一方、negative controlの実験として、マウスのゲノムを標的としないgRNA(non-targeting gRNA; ntgRNA)を設計し、同様の実験を行っており、形成された腫瘍については、gRNA発現カセットのゲノムへの挿入は見られなかった。このことは、PtenがC3マウスの発癌過程において重要な役割を担っていることを支持する結果である。

最後に、CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子のノックアウトを*in vivo*で行う系が確立したため、同様の手法で*in vivo*スクリーニングを試みている。Feng Zhangらのグループが開発したGeCKO(Genome-scale CRISPR Knock-Out)ライブラリーを用いて、マウスの乳管内にインジェクションを行った。25週齢までに得られたすべての腫瘍について、解析を行ったところ、miRNAを対象とするgRNAが検出された腫瘍が得られた。このmiRNAが実際に癌抑制遺伝子として働いているかについては今後検証を行っていく必要があるものの、論文提出者が確立を目指したスクリーニング系の実施可能性を支持する。

本研究で論文提出者が確立したCRISPR/Cas9ベースのスクリーニング系は発癌における遺伝子の機能を細胞間の相互作用を保ったまま生理的環境下で評価できると考えられる。いまだレンチウイルスの感染効率に問題があるものの、その改善により、より精度の高いノックアウトスクリーニングも可能になると考えられ、BLBCの発癌メカニズムの解明や新規治療標的の発見が可能となると考えられる。以上の研究は立案段階から論文提出者が主体となって行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。