

氏名	蒔田 幸正		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 9055 号		
学位授与年月日	平成 31年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Tumor-selective in vivo Growth Inhibitory Activities of siRNAs Targeting Kinetochores-Associated Protein 2 (Kinetochores-Associated Protein 2を標的としたsiRNAの癌組織選択的なin vivo増殖抑制活性)		
主査	筑波大学准教授	理学博士	坂本 和一
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	徳永 幸彦
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	中野 賢太郎
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	千葉 親文

論 文 の 要 旨

本論文は、癌細胞で特異的に発現する KNTC2 に着目し、KNTC2 に対する siRNA を内封した脂質ナノ粒子を用いて、マウスおよび三次元培養細胞における抗腫瘍作用を解析し、その成果について論述している。Kinetochores-Associated Protein 2 (KNTC2) は、細胞分裂の際に染色体の分配に関わる因子の 1 つであり、細胞分裂が休止した正常組織では殆ど発現せず、増殖の盛んな癌組織で特異的に発現亢進する。KNTC2 は、別名では Highly expressed in cancer 1 とも呼ばれており、近年、癌治療薬の標的分子として注目されている。しかし、KNTC2 を標的とした低分子化合物の中から高活性かつ特異性の高いものを見出す事は困難で、承認された癌治療薬はまだ存在しない。本論文において著者は、KNTC2 を標的とした siRNA 医薬の創出を目指し、マウスや三次元培養細胞を用いて KNTC2 siRNA の抗腫瘍作用を明らかにすることを目的とした。

本論文の第一章で著者は、KNTC2 に対する siRNA を内封した脂質ナノ粒子 (LNP) を用いて、マウスおよび三次元培養細胞における抗腫瘍作用を解析し、その成果について述べている。著者は、ヒト KNTC2 遺伝子およびマウス *Kntc2* 遺伝子に対する siRNA 約 250 種の中からヒト肝癌細胞株 Hep3B およびマウス肝癌細胞株 Hepalclc7 を用いた *in vitro* スクリーニングを行い、IC₅₀ 値が数十 pM という高活性の siRNA 2 種類を見出すことに成功した。さらに著者は、選択した 2 種類の siRNA を LNP に内封し、ヒト Hep3B-luc 株の同所移植モデルマウスに単回投与することにより、肝癌組織内のヒト *KNTC2* 遺伝子もマウス *Kntc2* 遺伝子も約 70% 程度抑制されたことを明らかにした。さらに著者は、それぞれの KNTC2 siRNA 内封 LNP を反復投与し、*in vivo* imaging system で観測したところ、KNTC2 siRNA 内封 LNP 投与群で特異的な腫瘍退縮が観察され、腫瘍重量も顕著に減少したことを明らかにした。著者は、抗腫瘍活性が検出された条件において肝毒性の指標である血漿中 AST, ALT レベルは上昇しないことから、KNTC2 siRNA 内封 LNP の腫瘍増殖抑制活性が癌組織選択的であると述べている。これらの結果から、第一章で著者は、KNTC2 遺

伝子が肝癌患者の治療薬を開発する上で有望な標的であり、KNTC2 遺伝子に対する siRNA を内封した LNP を用いることにより、肝癌組織中の癌細胞における抗腫瘍活性と肝毒性を同時に評価できたと述べている。

本論文の第二章で著者は、ヒト肺癌患者から樹立された後マウスの皮下で維持された臨床分離株を用いて、KNTC2 siRNA 内封 LNP の抗腫瘍活性を解析し、その成果について述べている。著者は、三次元培養が可能な 8 種の肺癌臨床分離株の中から肺癌治療薬 erlotinib に感受性の株 LC-60 と非感受性の株 LC-45 の 2 種類を選択し、三次元培養系における erlotinib 感受性を調べ、その感受性が *in vivo* と相関していることを明らかにした。さらに著者は、LC-60 の三次元培養系において上記 KNTC2 siRNA 内封 LNP の薬効を評価し、KNTC2 遺伝子の発現および腫瘍増殖はいずれも濃度依存的かつ siRNA 配列依存的に抑制されていたと述べている。さらに著者は、LC-60 の皮下移植モデルマウスへ KNTC2 siRNA 内封 LNP を単回投与したところ、腫瘍組織中のヒト KNTC2 遺伝子は 27%、マウス *Kntc2* 遺伝子は 46% 抑制されていたと述べている。また著者は、反復投与した場合、LC-60 の増殖は 67% 抑制されたと言及している。また著者は、LC-45 の場合は、単回投与によりヒト KNTC2 遺伝子もマウス *Kntc2* 遺伝子も 60% 抑制され、反復投与により LC-45 の増殖は 63% 抑制されたと述べている。これらの結果から、第二章で著者は、KNTC2 siRNA 内封 LNP は erlotinib に感受性の株と非感受性の株の両方において抗腫瘍活性を示し、EGFR を標的とした erlotinib とは異なるメカニズムで肺癌臨床分離株の増殖を抑制することが可能であると述べている。

本論文で著者は、癌細胞で特異的に発現する Kinetochore-Associated Protein 2 (KNTC2) に着目し、KNTC2 に対する siRNA を内封した脂質ナノ粒子を用いて、マウスおよび三次元培養細胞における抗腫瘍作用を明らかにしたと述べている。まず著者は、(1) KNTC2 に選択的に作用する siRNA を作製して LNP に内封し、ヒト肝癌細胞株の同所移植モデルマウスに投与したところ、肝毒性を引き起こす事なく、顕著な KNTC2 遺伝子の発現抑制と特異的な腫瘍増殖抑制効果を示したと述べている。さらに著者は、(2) KNTC2 siRNA 内封 LNP が、肺癌患者から樹立された臨床腫瘍株の三次元培養系および皮下移植モデルにおいても、標的遺伝子の発現を抑制し、顕著に腫瘍組織の増殖を抑制したと述べている。これらの結果から、著者は、抗腫瘍治療剤としての KNTC2 siRNA 内封 LNP の有効性および安全性を明らかにすることができ、がん治療の新規治療剤の開発に大きなブレークスルーをもたらしたと述べている。

審 査 の 要 旨

本論文は、癌細胞で特異的に発現する KNTC2 に着目し、KNTC2 に対する siRNA を内封した脂質ナノ粒子を用いてマウスおよび三次元培養細胞における抗腫瘍作用を解析し、(1) KNTC2 siRNA 内封 LNP がヒト肝癌細胞株の同所移植モデルマウスにおいて、顕著な KNTC2 遺伝子の発現抑制と特異的な腫瘍増殖抑制効果を示すこと、さらに (2) 臨床腫瘍株の三次元培養系および皮下移植モデルにおいても、標的遺伝子の発現を抑制し、顕著に腫瘍組織の増殖を抑制することを明らかにしたものである。本論文は、抗腫瘍治療剤としての KNTC2 siRNA 内封 LNP の有効性と安全性を明らかにしたもので、学術的にも大きな意義があるばかりでなく、抗腫瘍の新たな薬剤治療法開発の道を開くもので、その功績は極めて大きい。

平成 31 年 1 月 29 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。