



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CRISPR/Cas9を活用したエピゲノム編集システムの開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	片山, 翔太
Description	配架番号 : 2369
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12990号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70265
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shota_Katayama_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 片 山 翔 太

審査担当者	主査	准教授	伊 藤 陽 一
	副査	教授	廣 瀬 哲 郎
	副査	教授	畠 山 鎮 次
	副査	准教授	矢 部 一 郎

学 位 論 文 題 名

CRISPR/Cas9 を活用したエピゲノム編集システムの開発
(Development of Epigenome Editing System using CRISPR/Cas9)

本論文は、CRISPR/Cas9 を用いた既存のシステムである SAM および VPR が、プロモータ領域が DNA メチル化によって発現がオフになっている遺伝子に対して、転写活性化能が弱く一時的であり、またオフターゲット効果があるという問題点を改善することを目的として、microhomology-mediated end-joining(MMEJ)法を利用して、DNA メチル化されているプロモータ領域を DNA メチル化されていないプロモータ領域に置き替えるエピゲノム編集システムを開発したものである。OLIG2 遺伝子をモデル標的とした実験を行った結果、MMEJ 法の特徴からオフターゲット効果はほとんど見られず、転写活性化能も 21 日目まで維持されることが確認された。

審査にあたり、まず副査の畠山教授から基礎論文の投稿先の選択理由について質問があった。申請者は選択理由として、IF が高く、審査が早く、掲載料が必要なかったためと回答した。また、畠山教授から、論文の体裁についてコメントがあり、緒言が著しく短いため CRISPR/Cas9 の開発の歴史等を記述すること、数値や単位、括弧などの体裁を整え、指導教員のチェックを受けるように指示があった。申請者は対応する旨、回答した。また、畠山教授から、先行研究においては、オフターゲット効果がないことをマイクロアレイを用いて網羅的に調べているにも拘わらず、本論文ではそのようなスクリーニングを行っていないもののオフターゲット効果がないと言い切るのは、言い過ぎではないかと質問があった。申請者は、修正する旨、回答した。

次に副査の矢部准教授から、臨床応用として、パーキンソン病への適用について質問があった。申請者は、適用できる可能性がある旨、回答した。また、癌細胞への適用について質問があった。申請者は、本システムが 1 個のメチル化しか変えられず、複数の遺伝子がメチル化されている場合には、適用は限定されると回答した。矢部准教授は、昨今、ドライバー遺伝子のメチル化が、癌化のトリガーになっていることが注目されているため、ドライバー遺伝子のメチル化を標的とすることはできないかという質問があった。申請者は、単一遺伝

子であれば、適用の可能性があると回答した。矢部准教授から、論文の体裁について、1人称や体现止めは論文として、ふさわしくないとコメントがあった。申請者は、修正する旨、回答した。

次に副査の廣瀬教授からも、同様に論文の体裁と、緒言を修正する旨、コメントがあった。また、本研究の内容について、中間発表の時から大きく変化がないが、中間発表以降は何か追加されたのかと質問があった。申請者は、中間発表以降は、異なる研究に従事していたと回答した。廣瀬教授から、モデル標的における転写活性の減少はプロモータ領域のメチル化のみによって起こっているのかどうか直接的には調べていないのではないかと質問があった。申請者は、非メチル化プロモータ領域の導入によって、転写活性が起こっているため、モデル標的の転写活性の減少は、プロモータ領域のメチル化によって起こっていたと考えたと回答した。廣瀬教授から、入れ替えるフラグメントの長さはどのようにして決定したのかと質問があった。申請者は、プロモータ領域がどの程度メチル化されているかに依存しており、本論文のモデル標的においては、700bpが適切であったと回答した。

最後に、主査の伊藤准教授から、本論文の体裁について、審査時の発表における内容を緒言に盛り込んで欲しいとコメントがあった。申請者は修正する旨、回答した。また、伊藤准教授から、非メチル化されたプロモータ領域だけでなく、ルシフェラーゼの遺伝子を導入しているのは何故かと質問があった。申請者は、非メチル化されたプロモータ領域が働いたことを確認するためであると回答した。また、伊藤准教授は、NANOG 遺伝子の転写活性化に関する群間比較は、3回の繰り返し実験に基くものかと質問した。申請者のその通りであると回答した。

この論文は、**Angewandte Chemie** 誌において高く評価され、今後のエピゲノム編集を用いた細胞工学やエピゲノム医療に応用されることが期待できる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。