

|              |                                                                                   |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | CRISPR-Cas13リボヌクレアーゼを使用したプログラム可能な特異的RNAノックダウン                                     |
| Author(s)    | SAIFULLAH                                                                         |
| Citation     |                                                                                   |
| Issue Date   | 2021-09                                                                           |
| Type         | Thesis or Dissertation                                                            |
| Text version | ETD                                                                               |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/10119/17532">http://hdl.handle.net/10119/17532</a> |
| Rights       |                                                                                   |
| Description  | Supervisor:塚原 俊文, 先端科学技術研究科, 博士                                                   |

|         |                                                                                      |       |                  |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------|
| 氏名      | SAIFULLAH                                                                            |       |                  |
| 学位の種類   | 博士（マテリアルサイエンス）                                                                       |       |                  |
| 学位記番号   | 博材第 519 号                                                                            |       |                  |
| 学位授与年月日 | 令和 3 年 9 月 24 日                                                                      |       |                  |
| 論文題目    | A Programmable RNA Knockdown Using CRISPR-Cas13<br>Ribonuclease Towards Gene Therapy |       |                  |
| 論文審査委員  | 主査                                                                                   | 塚原 俊文 | 北陸先端科学技術大学院大学 教授 |
|         |                                                                                      | 藤本 健造 | 同 教授             |
|         |                                                                                      | 芳坂 貴弘 | 同 教授             |
|         |                                                                                      | 筒井 秀和 | 同 准教授            |
|         |                                                                                      | 後藤 典子 | 金沢大学 教授          |

### 論文の内容の要旨

Recent approvals in gene therapy have paved the road for an extensive second upsurge of therapies and forefront the groundwork for next-generation treatment strategies. CRISPR-Cas effectors have flourished as an overwhelming tool that can potentially endeavor future genetic medicine. In this doctoral thesis, I investigated the therapeutic potential of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and developed optimal parameters for programmable RNA knockdown using CRISPR-Cas13a ribonucleoprotein. Furthermore, I applied the optimized protocol for echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)-*ALK* transcript knockdown as a proof-of-principle for RNA-based cancer therapy. More explicitly, this dissertation consists of five chapters. Where, chapter one summarizes the recent development in RNA-targeted therapeutics including RNAi and CRISPR-Cas systems, and discusses the landscape of *EML4-ALK*-positive lung cancer treatment. This summarization of recent work will assist to understand the recent advancement of RNA-targeted CRISPR-Cas technologies and underpinning the contemporary *ALK*-positive cancer therapeutics.

In the second chapter, I explored the clinical outcome and associated genes of *ALK* expression using integrative bioinformatics. *ALK* is a tyrosine kinase receptor that is genetically altered in several cancers, such as non-small cell lung cancer (NSCLC), melanoma, lymphoma, and other tumors. Although *ALK* is associated with various cancers, the relationship between *ALK* expression and patient prognosis in different cancers is poorly understood. Here, I show a correlation between *ALK* expression and its clinical outcome in patients with lung adenocarcinoma (LUAD), melanoma, ovarian carcinoma (OV), diffuse large B-cell lymphoma (DLBC), acute myeloid leukemia (AML), and breast cancer (BC) using different computational assessments. I analyzed *ALK* transcriptional expression, patient survival rate, genetic alteration, protein network, and gene and microRNA (miRNA) co-expression. I found that deregulated expression of *ALK* is associated with a high mortality rate in *ALK*-positive cancers. I identified 214 missense mutations, 24 truncating mutations, seven fusions, and two in-frame mutations, with the highest alteration of *ALK* in melanoma. I further showed that 17 genes and 19 miRNAs were exclusively co-expressed and found that *EML4* was the most positively correlated gene. The gene ontology and signaling pathways of the genes co-expressed with *ALK* involved in these six cancers were also identified. My findings offer a basis for *ALK* as a prognostic biomarker and therapeutic target in cancers, which will potentially contribute to precision oncology.

In the third chapter, I developed optimal parameters for programmable and effective RNA knockdown using marker genes including firefly luciferase and mCherry transcripts. RNAi technology has noteworthy potential as a future medicine and could ideally be used to knock down disease-related RNAs. However, owing to frequent off-target effects, limited accessibility of nuclear transcripts, and low efficiency, the medical application of the technique remains challenging. Here, I first evaluated the stability of the Cas13a transcript and guide RNA. Next, I optimized the Cas13a and guide RNA expression vectors to achieve effective knockdown of firefly luciferase (FLuc) transcript, used as a target RNA. The knockdown specificity of Cas13a on target-search was next examined. I found that the 1:3 molar ratio concentration of Cas13a and guide RNA vector is preferable for effective knockdown than the vector amount. Based on the Cas13a selectivity results, I observed restricted endonuclease activity in 3' crRNA-gRNA orientation. I also found the highest activity between 24–30 bp long gRNAs with limited mismatch tolerance. Cas13a could effectively knock down FLuc luminescence (70–76%), and mCherry fluorescence (72%). Accordingly, Cas13a has strong potential for use in RNA knockdown and regulation.

Next, chapter fourth showed the feasibility of Cas13a ribonuclease in downregulation of oncogenic driver *EML4-ALK* expression in human disease model lung cancer cells. ALK tyrosine kinase inhibitors provoke a significant anti-tumor response; however, they inevitably succumb to the acquired resistance. Therefore, an alternative therapeutic strategy that limits *ALK* over-activation is necessary for the treatment of this lung cancer. Here, I show that the CRISPR-Cas13a effector possesses effective knockdown potency for oncogenic driver *EML4-ALK* transcript in lung cancer cells. I found the *EML4* transcript was not substantially expressed but *ALK* expressed 80–100 fold higher in *ALK*-positive lung cells compared to a non-fusion transcript in HEK293T cells. I also found that the *EML4-ALK* oncoproteins were robustly down-regulated (>80%) by employing Cas13a in those lung cancer cells based on western blot results. Consequently, the tyrosine kinase phosphorylation (50–70%) and cell growth (up to 40%) were inhibited. Overall the obtained data demonstrated that the CRISPR-Cas13a protein downregulated the *ALK* expression in the lung cancer cells. Thus, CRISPR-Cas13a mediated *EML4-ALK* RNA knockdown devises a potential therapeutic strategy for treating *ALK*-positive lung cancer.

Finally, chapter V recapitulates the total work and discusses the benefits, challenges, and future directions. In conclusion, Cas13a has strong potential for use in RNA regulation and could contribute to the development of next-generation genetic medicine.

**Keywords:** Prognosis of *ALK* expression; RNA knockdown; CRISPR-Cas13a; FLuc transcript; *EML4-ALK*-positive lung cancer.

## 論文審査の結果の要旨

近年、CRISPR-Cas システムが、未来の遺伝子治療を促進する可能性のある圧倒的なツールとして発展してきた。本博士論文では、Anaplastic Lymphoma Kinase(ALK)発現異常を原因とするがんの治療法として、CRISPR-Cas13a を用いたプログラム可能な RNA ノックダウンのツールを開発した。さらに、RNA ベースのがん治療の原理実証として、Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4(EML4)-ALK 転写産物のノックダウンを試みた。まず、統合的バイオインフォマティクスを用いて、ALK の転写発現、患

者生存率、遺伝子変化、タンパク質ネットワーク、遺伝子と miRNA の共発現を分析し、ALK の発現が低下すると、ALK 陽性のがん患者の死亡率が高くなることを示した。また、214 個のミスセンス変異、24 個の切断変異、7 個の融合変異、2 個のインフレーム変異を同定し、メラノーマにおける ALK の変化が最も高いことを明らかにした。さらに、17 の遺伝子と 19 の miRNA が排他的に共発現していることを示し、EML4 が最も正の相関を持つ遺伝子であることを発見した。

次にホタル・ルシフェラーゼと mCherry をマーカーに用いて、効果的な RNA ノックダウン法を検討した。RNA 切断活性を有する Cas13a 転写産物とガイド RNA の発現ベクターを構築・最適化して、標的 RNA として用いたホタル・ルシフェラーゼ (FLuc) の転写産物を効果的にノックダウンすることに成功した。次に、ターゲットサーチにおける Cas13a のノックダウン特異性を調べた。その結果、Cas13 とガイド RNA ベクターのモル比を 1:3 とすることで効果的なノックダウンが得られた。Cas13a の選択性の結果から、3'crRNA-gRNA の配向では RNA 分解活性が制限され、24-30bp の長い gRNA で最も高い活性を示し、またミスマッチ耐性が制限されることを示した。Cas13a は、FLuc の発光 (70-76%) と mCherry の蛍光 (72%) を効果的にノックダウンすることができた。

Saifullah 氏はさらに、上記の CRISPR-Cas13a システムによって肺がん細胞の発がんドライバーである EML4-ALK 転写産物を効果的にノックダウンする効力を持つことを示した。EML4 転写物は実質的には発現していないが、ALK は HEK293T 細胞の非融合転写物と比較して、ALK 陽性の肺癌細胞では 80-100 倍も発現していることを発見し、また Western Blot の結果から、これらの肺がん細胞では、Cas13a システムを採用することで、EML4-ALK のがんタンパク質が顕著に (80%以上) 抑制されることが判明した。その結果、ALK のリン酸化 (50~70%) と細胞増殖 (最大 40%) が抑制され、CRISPR-Cas13a システムが肺がん細胞における ALK の発現を抑制することが明らかとなった。ALK 阻害剤は、大きな抗腫瘍効果をもたらすが、その後は抵抗性が生じるため、肺がんの治療には、ALK の過剰活性化を制限する代替治療戦略が必要とされているが、CRISPR-Cas13a を介した EML4-ALK の RNA ノックダウンは、ALK 陽性の肺がんを治療するための潜在的な治療戦略となることが示された。

以上、本論文は、Cas13a を用いた特異的な RNA の制御法に利用したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士 (マテリアルサイエンス) の学位論文として十分価値あるものと認めた。