

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 北本 昂大

本研究はTGFB1角膜ジストロフィに対する CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子治療の可能性を示すため、TGFB1角膜ジストロフィ症例における表現型と遺伝子変異の関係性、TGFB1角膜ジストロフィモデルマウスの作製、モデルマウス角膜に対する CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 東京大学医学部附属病院眼科に受診している TGFB1角膜ジストロフィ 26 例に対し遺伝子解析を行い、表現型との関係性について検討した。26 症例中 14 症例が R124H 変異、4 症例が R124C 変異、1 症例が R555W 変異、6 症例が L527R 変異、1 症例が A546D 変異であった。R124H 変異では顆粒状の混濁と星状の混濁が混在した顆粒状角膜ジストロフィ 2 型 (granular corneal dystrophy type2 : GCD2) の所見を呈するが、今回解析した 14 例中 1 症例では顆粒状の混濁のみを呈する顆粒状角膜ジストロフィ 1 型 (GCD1) の所見を呈した。また A546D 変異症例においては既報とは異なった表現型が認められ、遺伝子解析を行っていないが、同じく TGFB1角膜ジストロフィである実妹とも明らかに異なる角膜混濁所見が認められた。また TGFB1角膜ジストロフィでは通常両眼に角膜混濁が生じるのに対し、L527R 変異症例においては 6 例中 2 例では片眼のみに角膜混濁が生じていた。このように表現型による遺伝子変異の推定には限界があり、遺伝子解析による診断の重要性が示唆された。
2. CRISPR/Cas9 および相同配向型修復による遺伝子編集技術を用いて、ヒトでは格子状角膜ジストロフィ (lattice corneal dystrophy : LCD) を生じる代表的な変異である R124C 変異を有するマウス (TGFB1-R124C マウス) を作製した。ホモ変異を有する TGFB1-R124C マウスでは、20 週齢までに 61.3%、40 週齢までに 73.9%の眼において角膜混濁が生じた。免疫組織学的検討の結果、角膜混濁は TGFB1p の沈着が原因であるこ

とが確認された。また角膜上皮剥離モデルでは野生型マウスと比較して角膜上皮の再生の遅延がみられ、TGFB1 角膜ジストロフィの臨床所見と類似していた。これらのことより TGFB1-R124C マウスはTGFB1 角膜ジストロフィの疾患モデル動物として妥当であることが示された。

3. 作製した TGFB1-R124C マウスを用いて、*in vivo* での CRISPR/Cas9 による TGFB1p 発現の抑制を試みた。まず GFP 遺伝子を標的とした guide RNA (gRNA) と Cas9 蛋白を発現するレンチウイルスベクター (LV/Cas9-gRNA-GFP) を作製し、GFP 発現マウスの角膜に導入した。その結果角膜実質および角膜上皮細胞において GFP の発現低下がみられ、角膜において CRISPR/Cas9 システムが機能したことを確認した。次に変異 *Tgfb1* 遺伝子を標的とした gRNA と Cas9 蛋白を発現するレンチウイルスベクター (LV/Cas9-gRNA-mTGFB1) を作製し、TGFB1-R124C マウスの角膜に導入した。その結果、角膜における TGFB1p の発現低下が確認され、*Tgfb1* 遺伝子の編集によるものであることが確認された。

以上の結果より、CRISPR/Cas9 による遺伝子編集が TGFB1 角膜ジストロフィの新たな治療となりうることが示唆された。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。