

博士論文（要約）

TGFBI 角膜ジストロフィモデルマウスの作製と
CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子治療の検討

北本 昂大

Transforming growth factor-beta induced (TGFB1) 角膜ジストロフィは、*TGFB1* 遺伝子の変異により生じる変異 TGFB1 蛋白 (TGFB1p) の沈着により角膜混濁が生じる常染色体優性遺伝性疾患である。一般的に両眼に進行性の角膜混濁を生じ、視力低下をきたすと治療を要する。治療として現在行われているのはエキシマレーザーを用いた治療的角膜切除術または角膜移植術であるが、いずれの治療法も侵襲を伴う治療であることに加えて、再発のリスクが存在する。そこで今回我々は、根治を目的とした新たな治療法として clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) を用いた遺伝子治療の可能性につき検討した。

遺伝子治療を行う前提として、まず *TGFB1* 遺伝子の変異を確認することが重要となる。我々は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。TGFB1 角膜ジストロフィは変異によって角膜混濁の表現型が異なり、一般的に同じ遺伝子変異を有する症例は同様な混濁が生じることが知られている。例えば 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 type 2 : 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。

遺伝子治療の可能性を検討するにあたり TGFB1 角膜ジストロフィ症例と同様の一塩基変異を有し、かつ角膜混濁を生じる疾患モデル動物が必要となるが、これまでその条件を満

たすモデル動物は報告されていない。そこで我々は 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。

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法となりうることが示唆された。