

# 博士論文（要約）

角膜混濁に対する核酸治療の有効性の検討

～RNA 干渉 と CRISPR/Cas9 を用いて～

竹溪 友佳子

## 論文の内容の要旨

論文題目 角膜混濁に対する核酸治療の有効性の検討  
~RNA 干渉 と CRISPR/Cas9 を用いて~

氏名 竹溪友佳子

医学の発展とともに、様々な治療薬や治療法が開発されてきた。当論文では、近年注目されている核酸医薬に着目し、角膜領域の疾患の新たな治療法を検討した。

過去に我々の教室で Angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) が角膜血管新生の促進因子であることを報告しており、それを踏まえて ANGPTL2 に対する RNA 干渉 (RNAi) 点眼製剤を合成し、角膜におけるドラッグデリバリーと角膜血管新生抑制効果を検討した。まず蛍光色素含有 RNAi 製剤を脂質ナノ粒子で包埋し (ANGPTL2 Li-pshRNA)、マウスに点眼した。点眼薬の浸透範囲を組織切片で、ANGPTL2 の発現レベルを real time PCR で検討した。次に、マウスアルカリ外傷モデルに対して ANGPTL2 Li-pshRNA を点眼し、ランダム配列 RNA を脂質ナノ粒子に包埋した群 (Negative Li-pshRNA 群) や PBS を点眼した群 (Control 群) と血管新生の程度を比較した。その結果 ANGPTL2 Li-pshRNA の点眼は、角膜全層に点眼薬が到達しており、また角膜における ANGPTL2 mRNA の発現が有意に抑制された。アルカリ外傷モデルにおいて、Negative Li-pshRNA 群や Control 群と比較して、ANGPTL2 Li-pshRNA 群では、角膜血管新生が有意に抑制された。つまり脂質ナノ粒子で包埋された ANGPTL2 に対する RNAi 製剤の点眼は、角膜における ANGPTL2 の発現を抑制し、アルカリ外傷による角膜血管新生抑制効果を示した。

第 1 節と同様に、角膜炎症に伴う血管新生と線維化を抑制するための新たな治療法として、microRNA-29b (miR-29b) 補充療法を検討した。合成 miR-29b mimic をヒト角膜実質細胞の初代培養細胞に導入し、TGF- $\beta$ , VEGF, type I collagen の mRNA 発現レベルを real time PCR で、細胞培養上清中のタンパク量を ELISA でそれぞれ定量した。次にマウスアルカリ外傷モデルの角膜血管新生や線維化のレベルを、合成 miR-29b mimic の脂質ナノ粒子包埋製剤点眼 (Li-29b) 群、ランダム配列 RNA 包埋点眼群 (Negative Li-pshRNA 群) および PBS 点眼群 (Control 群) で比較した。miR-29b

の導入により、ヒト角膜実質細胞では、TGF- $\beta$ 、VEGF、type I collagen の発現レベルが有意に抑制され、また ELISA では VEGF と type I collagen の産生量が有意に減少した。アルカリ外傷モデルでは、Negative Li-pshRNA 群や Control 群に比べ Li-29b 群では角膜血管新生が有意に抑制され、type I collagen の mRNA の発現量も低下した。miR-29b の補充はヒト角膜実質細胞において血管新生や線維化に関与する分子の発現を抑制し、脂質ナノ粒子で包埋した点眼製剤は、アルカリ外傷による角膜血管新生と線維化に対する抑制効果を示した。

第2章では、遺伝病に対する遺伝子編集療法を検討した。顆粒状角膜変性症は5番常染色体長腕(5q31)にある *transforming growth factor- $\beta$ -induced (TGFB1)* 遺伝子の点変異により生じる。今回 *TGFB1* 遺伝子の変異(R124H)が確認されている顆粒状角膜変性症患者由来の培養角膜実質細胞に対し、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) /CRISPR associated proteins (Cas) 9 システムを用い、点変異の相同性配向型修復を試みた。*TGFB1* 遺伝子 R124H 変異の顆粒状角膜変性症患者の手術サンプルから角膜実質細胞を培養し、*TGFB1* 遺伝子の R124H 変異を標的とした guide RNA (gRNA) および SpCas9-2A-GFP 発現プラスミドと、切断部位に相同性配向型修復にて導入する DNA 修復テンプレートである一本鎖オリゴヌクレオチド(ssODN) を R124H 変異細胞に同時に導入した。ゲノム編集導入細胞は制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism ; RFLP)アッセイならびにダイレクトシーケンスにより変異の修復ならびに編集効率を確認した。さらにオフターゲット作用についても検討を行った。gRNA および SpCas9-2A-GFP 発現プラスミドと ssODN を同時に導入することにより、R124H 変異細胞は正常配列に是正された。その効率は、heterozygous で 20.6%、homozygous で 41.3%であった。オフターゲット作用は認めなかった。よってこれらの結果から CRISPR/Cas9 システムを用いることで、R124H の点変異遺伝子配列の修復が可能であり、本システムは顆粒状角膜変性症に対する根治療法になる可能性を示した。

次に、*in vivo* での検討を行うために、同じく *TGFB1* タンパクの 124 番目のタンパクがアルギニンからシステインに変異 (R124C) した 1 型格子状角膜変性症のモデルマウスを作成し、角膜混濁が CRISPR/Cas9 による遺伝子編集により治療可能かを検討した。CRISPR/Cas9 システムを使用して野生型マウスの受精卵の遺伝子を編集し、作成した R124C モデルマウスの 2 代目以降を実験に使用した。Homozygous マウスでは生後 14-20 週の間眼角膜の混濁が上皮直下から角膜実質浅層生じ、炎症を起こした角膜ではアミロイドの沈着が認められた。R124H 細胞編集時と同様に *TGFB1* 遺伝子の R124C 変異を標的とした gRNA および SpCas9-2A-GFP 発現プラスミドと、切断部位に相同性配向型修復にて導入する DNA 修復テンプレート ssODN の混合液を R124C モデルマウスの角膜実質に注射し、点変異の修復を試みたところ、ゲノム編集導入細胞は RFLP アッセイならびにシーケンスにより変異の修正が 5 例中全例で認められ、ならびに編集効率は  $34.2 \pm 9.8\%$  であった。また注射した 10 匹の homozygous のマウスの内 3 匹で角膜混濁が抑制された。当検討により、世界で初めて格子状角膜変性症のモデルマウスを作成出来たことを確認し、その変異により生じる角膜混濁を CRISPR/Cas9 による遺伝子編集を用いることで混濁抑制の治療が可能で

あることが示唆された。

本研究では、RNA と DNA と違った種類の核酸を利用し、難治性角膜疾患に対する新たな治療法を検討した。RNA 干渉を用いた治療法では、点眼という簡便な方法で角膜血管新生を抑制する治療法の可能性が示され、CRISPR/Cas9 による DNA 編集では、角膜遺伝子疾患の根本治療の可能性が示唆された。