

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11446

研究課題名(和文) CRISPR-Cas9システムを用いた遺伝性角膜疾患に対する画期的根治療法の開発

研究課題名(英文) Gene editing for corneal dystrophy using CRISPR/Cas9

研究代表者

臼井 智彦 (Usui, Tomohiko)

東京大学・医学部附属病院・届出診療員

研究者番号：80282557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TGFB1 R124H変異を持つTGFB1角膜ジストロフィ患者の角膜実質細胞に対しCRISPRによる遺伝子編集効果を検討したところ、RFLP、シーケンス共に遺伝子変異の編集による正常配列化を認めた。またオフターゲットも認めなかった。TGFB1 R124C変異を持つマウス(R124Cマウス)は高率に角膜混濁を生じたが、アミロイドの沈着は見られなかった。電子顕微鏡所見では、混濁部位に一致して無構造な沈着物を認めた。混濁部位ではTGFB1蛋白の蓄積が亢進していた。ホモR124Cマウスではワイルドタイプのマウスと比較して角膜上皮擦過による創傷治癒が遅延することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題における検討で、CRISPR-Cas9システムは、TGFB1遺伝子の点変異をin vitroにおいて正常に編集可能なことを示した。現在外科的治療では再発が必発であり、薬物治療法が全く存在しないTGFB1角膜ジストロフィの根治療法開発の基盤となる。

また高率に角膜混濁が生じる本疾患のモデル動物は存在しなかったが、我々が作製したマウスは高率に角膜混濁を生じ、今後、遺伝子治療を含め、本疾患に対する治療効果の検討をin vivoで行う意味で大変有用なモデル動物である。また現在までよく分かっていないTGFB1角膜ジストロフィにおける角膜混濁のメカニズム解明にも有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Granular corneal dystrophy (GCD) is caused by a point mutation in the transforming growth factor- β -induced (TGFB1) gene. To correct genetic defects in GCD patient cells, we designed a disease-specific guide RNA (gRNA) targeting the R124H mutation of TGFB1. An R124H mutation in human corneal keratocytes derived from a GCD patient was corrected by delivering a CRISPR plasmid expressing Cas9/gRNA and a single-stranded oligodeoxynucleotide HDR donor template in vitro. No off-target effects were detected.

R124C mutation in TGFB1 causes lattice corneal dystrophy type 1. We used CRISPR-Cas9 to establish the Tgfb1 mutant mouse model. TGFB1-R124C mice were generated using ssODN-mediated base-pair substitution introduced via CRISPR-Cas9. Mice carrying base substitution in Tgfb1 showed high frequency of corneal opacity. Corneal epithelial wound healing was affected by TGFB1-R124C mutation. This mouse model will help delineate the pathogenic mechanisms of human corneal dystrophy.

研究分野：眼科

キーワード：角膜ジストロフィ 遺伝子編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球の最も表面に位置する無血管透明組織であり、健全な視機能を得るためには、角膜には混濁がなく透明であることが必須条件である。しかし様々な疾患で角膜混濁が生じ、それにより時に重篤な視機能低下をもたらすことがある。角膜混濁を生じる疾患には様々なものがあり、TGFBI角膜ジストロフィーもその一つである。角膜ジストロフィーとは遺伝性の角膜変性疾患のことを指し、本邦ではtransforming growth factor-beta-induced (TGFBI)遺伝子(別名big-h3, ケラトエピテリン)の点変異によって生じる顆粒状角膜ジストロフィーや格子状角膜ジストロフィーの頻度が高い。顆粒状角膜変性症では、角膜実質にヒアリンやアミロイドが、格子状角膜変性症では同様に角膜実質にアミロイドがそれぞれ角膜実質に徐々に沈着することで、角膜混濁が進行する。また本疾患では角膜混濁が生じる前にも、角膜びらんが頻発することもあり、患者には多くの苦痛を伴う。原因遺伝子は同定されているものの、角膜混濁のメカニズムはいまだ解明されていない。

現在 TGFBI 関連角膜ジストロフィーにおける進行した角膜混濁に対して、エキシマレーザーを用いた phototherapeutic keratectomy (PTK) や角膜移植による混濁除去が行われる。PTK は比較的低侵襲な術式で、角膜厚が残っていれば複数回行うことも可能だが、遠視化や反応性の混濁(haze)を生じることが問題となる。角膜移植は長期にわたり混濁を除去可能であるが、侵襲が大きく、移植に伴う合併症も多い。さらに本邦では、ドナー角膜の供給が不十分であるという問題点もある。しかし、最も重要な問題は、これらの治療を行っても患者の遺伝情報が代わるわけではないので、PTK、角膜移植ともにいずれは角膜混濁が再発してしまうことである。このような背景から、TGFBI 角膜ジストロフィーにおける角膜混濁のメカニズムの解明とともに、PTK や角膜移植にかわる新たな根治療法の開発が望まれている。

前述のごとく、TGFBI 角膜ジストロフィーは TGFBI 遺伝子の点変異によって生じるため、この点変異を角膜局所で是正することが可能であれば、病勢が進行しないことが予想される。本疾患では角膜のみに異常が生じることが知られており、角膜局所で遺伝子編集が可能であれば、それが本疾患に対する根治療法になる。

近年、遺伝子を編集する技術が急速に発達してきている。様々な遺伝子編集技術が有る中で、我々は clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)- CRISPR-associated 9 (CRISPR-Cas9)システムというものに着目した。CRISPR CAS システムとは細菌などにおいて、ウイルスやプラスミドと言った遺伝的要素の侵入物を標的にし、排除するよう進化した獲得免疫の一つであり、1987 年現在九州大学農学部の石野良純教授らによって発見された。具体的には、侵入したウイルスの DNA を切断し、その中で特定の塩基配列をもつ断片を細菌自身のゲノムに取り込む。こうすることで、それぞれの種類のウイルス特有 DNA 塩基配列を記憶し、侵入したことのあるウイルスが細菌内に再度侵入すると、RNA にガイドされた酵素 Cas タンパク質が、そのウイルス DNA を切断する仕組みとなっている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、*in vitro* や *in vivo* の実験系を用いて、CRISPR-Cas9 システムを用いた TGFBI 角膜ジストロフィーの局所遺伝子編集の開発に取り組むことを目的に検討を行った。まず TGFBI 角膜ジストロフィー患者の手術検体から得られた TGFBI 変異角膜実質細胞を用いて、CRISPR-Cas9 と相同組み換えによる *in vitro* での遺伝子編集効果を検討した。次に TGFBI 遺伝子変異マウスを作製し、角膜における表現系の調査や角膜上皮創傷治癒に対する反応を検討した。

3. 研究の方法

In vitro における遺伝子編集の検討

R124H 変異を持つ TGFBI 角膜ジストロフィー患者(顆粒状角膜変性 2 型, GCD2)の手術検体から、角膜実質細胞を培養し、*in vitro* での遺伝子編集効果を検討した。TGFBI 遺伝子の変異部位を標的とした guide RNA (gRNA) および SpCas9-2A-GFP 発現プラスミドと、切断部位に組み込む相同組み替えの為に DNA 修復テンプレート ssDNA を設計し、それらを変異培養細胞にリポフェクション法で共遺伝子導入した。遺伝子導入後培養続けたのちに DNA を抽出し、PCR でゲノムを増幅した。この PCR 産物を制限酵素処理し、電気泳動することにより、遺伝子の編集を確認した(restriction fragment length polymorphism (RFLP) アッセイ)。また PCR 産物はシーケンシングを行い、変異の修正ならびに編集効率を確認した。コントロールには、TGFBI 遺伝子に変異のない、アメリカアイバンクの実験用正常角膜から得られた培養角膜実質細胞を用いた。さらに T7 endonuclease I アッセイでオフターゲットについても検討を行った。

TGFBI R124C 変異マウスの表現系の確認

CRISPR-Cas9 による遺伝子編集が *in vivo* でも機能するかを検討するため、まず TGFBI の変異モデルマウス(TGFBI R124C 変異を持つマウス)の角膜の表現系の検討を行った。マウスの交

配を進め、ジェノタイピングにより、ワイルド、ヘテロ、ホモの3系統を確認し、角膜混濁の発症率、組織学的検討を光顕レベル、電子顕微鏡レベルで観察した。
さらに角膜上皮擦過による創傷治癒についても観察を行った。

4. 研究成果

In vitroにおける遺伝子編集の検討

R124H変異を持つTGFB1角膜ジストロフィー患者（顆粒状角膜変性2型, GCD2）の手術検体から、角膜実質細胞を培養し、*in vitro*での遺伝子編集効果を検討したところ、RFLP, シークエンス共に遺伝子変異の編集による正常配列化を認め、その編集効率は約30%であった。

またT7 endonuclease Iアッセイにより、オフターゲットも認めなかった。

TGFB1 R124C変異マウスの表現系の確認

ヒトでは格子状角膜変性症（LCD1）を生じるR124C変異を持つマウス（TGFB1 R124Cマウス）の角膜の表現系の検討を行った。混濁部位はアミロイドの沈着は見られず、マッソントリクローム染色で一部陽性所見を認めた。電子顕微鏡所見では、混濁部位に一致して無構造な沈着物を認め、これらの所見からはR124Cマウスの角膜混濁は、格子状変性よりも顆粒状変性の混濁に近いことが確認された。混濁部位ではTGFB1蛋白（TGFB1p）の蓄積が亢進しており、TGFB1pの分解阻害によるものと考えられた。これらの混濁は生後40週において、ホモで約80%と高率に認め、ヘテロでも約9.1%に角膜混濁が見られた。

角膜上皮剥離モデルを作製すると、ホモTGFB1R124Cマウスではワイルドタイプのマウスと比較して角膜上皮擦過による創傷治癒が遅延することが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 白井 智彦	4. 巻 89
2. 論文標題 CRISPR・Cas9を用いた角膜変性症治療の可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本の眼科	6. 最初と最後の頁 1254-1255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taketani Y, Kitamoto K, Sakisaka T, Kimakura M, Toyono T, Yamagami S, Amano S, Kuroda M, Moore T, Usui T, Ouchi Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Repair of the TGFBI gene in human corneal keratocytes derived from a granular corneal dystrophy patient via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 167113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-16308-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kohdai Kitamoto, Yukako Taketani, Wataru Fujii, Aya Inamochi, Tetsuya Toyono, Takashi Miyai, Satoru Yamagami, Masahiko Kuroda, Tomohiko Usui, Yasuo Ouchi	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of mouse model of TGFBI-R124C corneal dystrophy using CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 2000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58876-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北本昂大、竹溪友佳子、藤井渉、山上聡、白井智彦、大内靖夫
2. 発表標題 TGFBI-R124C変異マウスにおける角膜混濁の検討
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井智彦
2. 発表標題 TGFBI角膜ジストロフィの基礎と臨床
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北本昂大、関沙織、橋本友美、豊野哲也、吉田絢子、山上聡、宮井尊史、白井智彦
2. 発表標題 片眼性角膜混濁を生じたTGFBI角膜変性症の2症例
3. 学会等名 角膜カンファランス2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Gene Therapy Drug for Granular Corneal Degeneration	発明者 白井智彦 竹溪友佳 子 大内靖夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/021797	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----