

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09808

研究課題名（和文）遺伝性角膜疾患に対する遺伝子治療実現のための基盤技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of fundamental technologies for gene therapy for hereditary corneal diseases

研究代表者

臼井 智彦（Usui, Tomohiko）

国際医療福祉大学・医学部・教授（代表）

研究者番号：80282557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：代表的な遺伝性角膜疾患であるTGFBIジストロフィに対し、CRISPR-Cas9を用いた角膜局所遺伝子編集の開発を行った。GFPマウスやGFP細胞を用いて検討を行った後、角膜ジストロフィモデルマウスの角膜にTGFBI遺伝子を切断するウイルスベクターを作成し導入したところ、角膜においてTGFBIの発現が抑制された。

また混濁が除去できても視機能が改善しなければ意味がない。代表的なTGFBIジストロフィである顆粒状角膜ジストロフィ（GCD）と格子状角膜ジストロフィ（LCD）の角膜混濁の視機能に及ぼす影響について検討したところ、LCDでは角膜後面の乱視がGCDでは散乱が視力と関連した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜ジストロフィに対しては現時点で根治療法はなく、角膜移植やレーザーなどの外科的に混濁を切除するしか方法がない。しかし移植をしても必ず再発が生じてします。本研究は角膜ジストロフィに対して根治療法を可能にする画期的な取り組みである。また角膜ジストロフィ患者がどのような視機能異常を呈しているのかに関しても全くわかっていなかったため、今回臨床研究も行い、混濁の除去のみならず、角膜の不整も改善しないことには視機能の改善が難しい例があることもわかった。

今後これらの研究がさらに発展することにより、遺伝性疾患で苦しむ方への一助となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We developed corneal gene editing using CRISPR-Cas9 for TGFBI dystrophy, a typical hereditary corneal disease. After conducting studies using GFP mice and GFP cells, we created a viral vector that cuts the TGFBI gene and introduced it into the cornea of a corneal dystrophy model mouse, which suppressed TGFBI expression in the cornea.

Even if opacity can be removed, it is meaningless if visual function does not improve. We investigated the effect of corneal opacity on visual function in granular corneal dystrophy (GCD) and lattice corneal dystrophy (LCD), which are typical TGFBI dystrophies, and found that posterior corneal astigmatism in LCD and scattering in GCD were correlated with visual acuity.

研究分野：眼科

キーワード：角膜ジストロフィ CRISPR-Cas9

1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球の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には混濁が生じ、強い混濁では重篤な視機能低下をもたらす。角膜混濁を生じる疾患には様々なものがあり、角膜ジストロフィもその一つである。角膜ジストロフィとは遺伝性の角膜変性疾患のことを指し、両眼に進行性の角膜混濁を来す疾患である。現在22種類の角膜ジストロフィが同定されているが、本邦を含むアジア諸国ではtransforming growth factor-beta-induced (TGFBI)遺伝子（別名βig-h3, またはケラトエピテリンとも呼ばれる）の点変異によって生じるTGFBI角膜ジストロフィの頻度が高い。TGFBI角膜ジストロフィには、顆粒状角膜ジストロフィ（I型、II型）、格子状角膜ジストロフィ、Reis-Buckler角膜ジストロフィ、Thiel Behnke角膜ジストロフィの5種類が存在し、中でも顆粒状角膜ジストロフィII型と格子状角膜ジストロフィの頻度が高いことが知られている。TGFBI角膜ジストロフィはTGFBI遺伝子の点変異により合成された変性TGFBIタンパクが角膜に沈着していると考えられており、顆粒状角膜変性症II型では、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。また本疾患群では角膜びらんが頻発することもあり、患者の多くは激しい眼痛と羞明に悩まされるだけでなく、角膜びらんが繰り返すことにより、さらなる角膜混濁の進行を招く。原因遺伝子はTGFBI遺伝子と同定されているものの、現在のところ角膜混濁や角膜びらん発症のメカニズムは全く解明されていない。

現在TGFBI角膜ジストロフィに対する有効な薬物治療はなく、角膜混濁進行による視機能低下を生じた患者に対しては、エキシマレーザーを用いた治療的角膜切除（phototherapeutic keratectomy, PTK）や角膜移植による外科的治療が行われる。PTKは比較的 low-invasive 術式で、角膜厚が残っていれば複数回行えるが、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、移植に伴う重篤な合併症も多い。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、角膜移植ともに術後いずれは角膜混濁が再発してしまうことである。よってTGFBI角膜ジストロフィでは、角膜混濁や角膜びらん発症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治療法の開発が望まれている。またTGFBI角膜ジストロフィで生じる角膜混濁が、具体的にどのように視機能に影響しているか、という臨床的な疑問も未解決なままである。

TGFBI角膜ジストロフィは遺伝性疾患であるため、安全かつ効果的な遺伝子治療が可能であれば、それが根治療法となる。近年急速に遺伝子編集技術が発達し、特にclustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-CRISPR-associated 9 (CRISPR-Cas9) システムは、簡便かつ効率的に遺伝子編集を可能にした。元来このシステムは細菌がウイルスやプラスミドなどの遺伝的要素の侵入物を標的にし、それを排除するように備わった獲得免疫機構であり、近年本システムを応用したゲノム編集が大変盛んである。具体的には、ターゲット部位を含む相補的な配列をもつガイドRNA (gRNA) とCas9の複合体が細胞に導入されると、ターゲットの二本鎖DNAを切断する（double strand break, DSB）。切断後は、非相同性末端結合（non-homologous end joining, NHEJ）により修復されるか、DSBと同時に正常配列のssDNAを遺伝子導入することにより、相同組み換え修復（homology direct repair, HDR）が生じることが知られている。

申請者は過去に代表的なTGFBI角膜ジストロフィである顆粒状角膜変性症II型（GCD2, *TGFBI*遺伝子R124H変異）の手術検体から得られた培養角膜実質細胞に対し、CRISPR-Cas9とssDNAによるHDRを検討したところ、R124H変異を正常配列に戻すことに成功した（Taketani Y et al. Sci Rep 2017）。さらに、混濁のメカニズムの解明や新たな治療法の検証のため、格子状角膜変性症I型（LCD1, *TGFBI*遺伝子R124C変異）のモデルマウスの作製を行い、それに成功した（Kitamoto K et al. Sci Rep 2020）。

2. 研究の目的

以上の背景から本研究では、CRISPR-Cas9を用いた角膜局所遺伝子編集の開発に取り組むことを目的とする。また混濁が除去できても視機能が改善しなければ意味がない。そこでTGFBIジストロフィ患者における角膜混濁の視機能に及ぼす影響について、前眼部光干渉断層系（前眼部OCT）を用いて実際の患者で検討する。

3. 研究の方法

3-1. マウス角膜への遺伝子導入法の探索

生体角膜における CRISPR-Cas9 遺伝子導入法の確立には GFP マウスを用い、GFP 発現を NHEJ でノックアウトするレンチウイルスベクターを作製した（GFP-CRISPR）。HEK293-GFP 細胞で検討後に、マウス角膜への検討を行った。

3-2. LCD1 モデルマウスにおける TGFBI 発現の制御

LCD1 モデルマウスの角膜を用いて、TGFBI 遺伝子発現をノックアウトするウイルスベクターを作製し、角膜における TGFBI 発現を検討した。
また T7 endonuclease assay I を用いて編集効率の検討を行った。

3-3. TGFBI ジストロフィの角膜混濁が視機能に与える影響

顆粒状角膜ジストロフィ(GCD)あるいは格子状角膜ジストロフィ(LCD)患者の前眼部 OCT を用いて、各種パラメーターと矯正視力との関連について検討した。

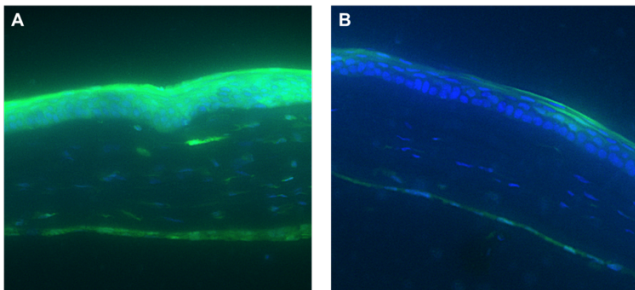
4. 研究成果

3-1. マウス角膜への遺伝子導入法の探索

まず GFP-CRISPR の効果を HEK293-GFP 細胞を用いて *in vitro* で検証した。すると遺伝子導入された細胞では蛍光の減弱を認め、FACS での解析で約 40%の細胞で蛍光検出を認めなかった。

次に GFP マウスの角膜に GFP-CRISPR 発現レンチウイルスベクターまたは PBS を注射し、1週間後にマウス眼球を摘出し、組織学的に蛍光の発現を検討した。GFP-CRISPR 発現レンチウイルスベクターを注射したマウスにおいて、PBS を注射したマウスと比較し角膜上皮、実質内の GFP による蛍光の減弱が認められた（図1）。一方で角膜内皮での GFP の発現は両群で同等だった（図1）。

図1.



A. コントロール注射

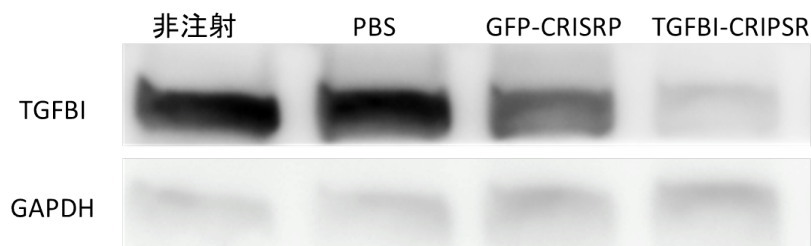
B. GFP-CRISPR 注射

角膜上皮と実質において、GFP-CRISPR 注射（B）では傾向がコントロール（A）と比較して蛍光が減弱しているのがわかる。

3-2. LCD1 モデルマウスにおける TGFBI 発現の制御

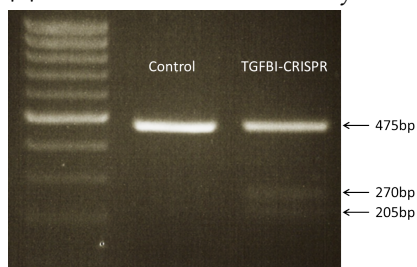
TGFBI-R124C マウス角膜に mTGFBI-CRISPR を結膜下注射で導入した。1週間後に角膜を摘出し、ウエスタンブロットにて TGFBIp の発現をコントロールと比較した。コントロールとして非注射、PBS、GFP-CRISPR をコントロールとして用意したが、いずれのコントロールとも TGFBIp の発現量に有意差が認められた（図2）。

図2. ウエスタンブロットティング



TGFBI-R124C マウス角膜に mTGFBI-CRISPR を注射し、1 週間後に T7 endonuclease I assay にて角膜における TGFBI 遺伝子の切断効率を確認した。角膜注射を行っていない眼では切断されていない 475bp のバンドのみ見られたのに対し、注射眼では切断されていない 475bp のバンドに加え、切断に生じた 270bp、205bp のバンドが生じた (図 3)。編集効率は 5.33% だった。

図 3. T7 endonuclease I assay



3-3. TGFBI ジストロフィの角膜混濁が視機能に与える影響

LCD 群は GCD 群に比し矯正視力は有意に悪く、また角膜後面の正乱視および不正乱視も有意に大きかった。よって LCD では GCD に比べて角膜後面の乱視が強く視力に影響を与えている可能性が示唆された。また GCD デンシトメトリー値と視力に負の相関があったことから、GCD では散乱 (=角膜混濁) がより強く視力と相関していた。よって GCD では混濁の除去が視機能回復に重要であり、LCD では混濁の除去に加えて乱視の軽減にも注意を払う必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe Yuito, Omoto Takashi, Kitamoto Kohdai, Toyono Tetsuya, Yoshida Junko, Asaoka Ryo, Yamagami Satoru, Miyai Takashi, Usui Tomohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Corneal irregularity and visual function using anterior segment optical coherence tomography in TGFBI corneal dystrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-17738-3	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 陳リイ、大内靖夫、神川あずさ、橋本友美、北本昂大、豊野哲也、相原一、臼井智彦、宮井尊史
2. 発表標題 CRISPR-Cas9によりTCF4遺伝子のCTGリピート伸長FECD細胞モデル
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田瑞希、臼井智彦
2. 発表標題 TGFBI遺伝子のL527R変異に伴う片眼性格子状角膜ジストロフィの1例
3. 学会等名 角膜間ファランス2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Omoto T, Kitamoto K, Toyono T, Miyai T, Yamagami S, Usui T
2. 発表標題 Genome editing in vivo for TGFBI corneal dystrophy mice using CRISPR/Cas9 system
3. 学会等名 The 7th Asia Cornea Society Biennial Scientific meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 臼井智彦
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 角膜カンファランス2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 臼井智彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 320
3. 書名 最新主要文献で見る眼科学レビュー 2021-2022 6. 角膜疾患	

〔産業財産権〕

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関