



Title	In vivo production of therapeutic peptides via genome editing and their therapeutic effect
Author(s)	廣瀬, 淳
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101694">https://hdl.handle.net/11094/101694</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 廣 瀬 淳 )	
論文題名	<i>In vivo</i> production of therapeutic peptides via genome editing and their therapeutic effect (ゲノム編集による治療用ペプチドの生体内生産とその治療効果)
論文内容の要旨	
<p>近年、肥満や糖尿病といった慢性疾患に対して、バイオロジクスやペプチド等のタンパク質医薬品が数多く上市されているが、長期にわたる注射治療は患者の投薬遵守や生活の質に課題がある。これらの課題に対して、本研究では細胞内のDNAを精密に改変することが可能なゲノム編集技術を用いて、治療用ペプチドの遺伝子配列を標的細胞のゲノムDNAに挿入（ノックイン）することで、体内で長期間にわたりペプチドを産生する方法を開発し、その有用性を評価した。</p> <p>第2章では、肝細胞を標的として遺伝子をノックインする技術の確立を目指した。肝臓癌由来細胞株を用いた検討により、Homology Independent Targeted Integration (HITI) 法がより長期にモデルタンパク（GFP）を発現し、遺伝子をノックインできることを見出した。さらに、マウスに静脈内投与可能で肝臓で高い遺伝子導入効率を示す脂質ナノ粒子（LNP）の最適化を行い、最終的にマウス肝臓におけるGFP遺伝子のノックインを確認した。</p> <p>第3章では、第2章で確立した肝細胞ノックイン技術を活用し、治療用ペプチドの生体内産生及びその治療効果を評価した。肥満及び糖尿病に対する治療効果が報告されているExendin-4（Exe-4）を治療用ペプチドとして選定し、細胞外へのペプチド分泌を促進する分泌促進型Exe4遺伝子をHITI法により肝細胞株及びマウス肝臓にノックインした。その結果、培地及び血中において長期にわたりペプチド分泌が確認され、安全性上の懸念も認められなかった。さらに、肥満及び糖尿病様症状を示すモデルマウスにおいても同様の手法で分泌促進型Exe4遺伝子ノックインしたところ、健常マウスと同程度の体重推移で肥満を抑制し、さらに糖尿病症状が健常マウスと同程度の水準まで改善した。</p> <p>以上の結果より、ゲノム編集により分泌促進型の治療用ペプチド遺伝子を肝臓にノックインすることで、長期にわたり体内でペプチドを産生し、慢性疾患に対する単回投与治療が可能となることが期待される。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 廣 瀬 淳 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	岩 井 成 憲
	副 査	教 授	馬 越 大
	副 査	教 授	境 慎 司
	副 査	教 授	鈴 木 啓一郎 (高等共創研究院)

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、将来的にゲノム編集医療が実施されることを見越して、ゲノム編集によりタンパク質やペプチド医薬品を生体内で作らせる技術の開発と、マウスモデルを用いたゲノム編集ペプチドの治療効果に関する研究をまとめたものである。タンパク質やペプチドが医薬品として使用される場合、長期にわたる定期的な注射投与が必要となるため患者の負担が大きい。その解決策として、1回の注射投与でゲノム編集によりヒトのDNAに目的のペプチドやタンパク質の遺伝子を挿入（ノックイン）することができれば、医薬品が体内で持続的に供給されることが期待できる。本論文の著者は、ゲノム編集の効率が低くても十分に医薬品を産生できる大きさで、遺伝子導入に使用する脂質ナノ粒子（LNP）との相性が良いことが報告されている肝臓において目的遺伝子を発現させることを計画し、肝臓特異的に発現するアルブミン遺伝子*Alb*の部位をゲノム編集の標的とした。

申請者はまず、緑色蛍光タンパク質（GFP）の遺伝子を使って肝臓でのノックイン技術の開発を行った。一般的にゲノム編集にはDNAの相同組換え修復が用いられるが、副査の鈴木教授が以前に開発したHomology-Independent Targeted Integration（HITI）法と比較すると、後者の方が効率的に遺伝子をノックインできることを確認した。また、一般的に使用されているアデノ随伴ウイルスベクターではなく、より安全性の高いLNPを用いた遺伝子導入を計画し、肝細胞において高い遺伝子導入効果をもつLNPの探索を行った。選択されたLNPを用いて、GFP遺伝子をゲノム編集に必要な遺伝子とともにマウスに導入した結果、肝臓特異的にGFP遺伝子の発現が確認された。

次に、HITI法とLNPを組み合わせることで開発した技術によるペプチド医薬品の生体内産生とその治療効果を示した。肥満や糖尿病の治療用ペプチドであるExendin-4（Exe4）の遺伝子をゲノム編集に必要な遺伝子とともに封入したLNPを、高脂肪飼料を与えて誘導した肥満および前糖尿病モデルマウスに尾静脈内投与し、Exe4の血中濃度、体重推移、糖尿病症状が測定された。その結果、ゲノム編集治療が行われたマウスにおいて、Exe4の持続的な産生が確認され、コントロール群と比較して顕著な体重増加の抑制および糖尿病症状の改善が示された。

以上のように、本論文はHITI法とLNPを組み合わせることによりゲノム編集によるペプチド医薬品の体内産生が安全に行われ、1回の注射で持続的な治療効果を発揮することを示したものである。得られた成果は将来のペプチド医薬品およびゲノム編集治療に貢献するものであり、博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。