

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2009

課題番号：18390473

研究課題名（和文） 角膜疾患に対する遺伝子導入・細胞移植・再生医学による総合的治療

研究課題名（英文） Treatment for corneal diseases by gene therapy, cell transplantation and reproducing medicine

研究代表者

東 範行（AZUMA NORIYUKI）

国立成育医療センター（研究所）・眼科・医長

研究者番号：10159395

研究分野：眼科学、分子細胞生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：再生医学・遺伝学・角膜

1. 研究計画の概要

角膜疾患では、さまざまな原因で混濁が起こり、重篤な視覚障害をきたす。これに対して、角膜移植が行われるが、ドナー角膜の供給が不足している上に、先天異常などでは拒絶反応などの合併症も多く、良好な結果が得られない。本研究では、遺伝子治療、細胞移植、再生医学の技術によって、従来は治療できなかった疾患において角膜の透明化を図ることを目的とする。

移植および再生医学方法に用いる細胞は、国立成育医療センター倫理委員会の承認のもと、網膜芽細胞種の治療として眼球摘出された眼球から得られたものから調整する。

本研究によって、重篤な角膜疾患によって低視力となった患者が、良好な視力を獲得することが期待される。

2. 研究の進捗状況

(1) 移植用の再生強膜の作成

培養強膜細胞から total RNA を抽出し、gene chip による遺伝子の網羅的解析によって、強膜細胞と軟骨細胞との類似性が明らかになり、強膜細胞の1部が、軟骨細胞に分化したことが示唆された。Type11 コラーゲン、アグレカン、PRELP など力学的強度を生み出す物質は、眼球の後極部に多く発現し、後極の強靭さを維持することに貢献していることが推測された。これらの遺伝子操作あるいは再生シートによって、眼球壁の維持、補修ができると思われる。

(2) 移植用の角膜内皮の作成

角膜内皮細胞は一旦障害され細胞死に至ると、通常再生されず、障害を受けた細胞周囲の細胞がその機能を補う。内皮細胞障害は

重篤な視力障害を起こす。小児の摘出眼球から角膜内皮を単離培養し、株化に成功した。初代培養細胞にレトロウイルスベクターを用いて不死化遺伝子 HPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclinD1を、単独あるいは種々の組合せで導入し、cdk4/hTERT、cdk4/cyclinD1、#6 cdk4/cyclinD1は、世代を経ても分裂速度に変化がなく不死化した。免疫染色により角膜内皮固有のZo-1、Na-k ATPaseの蛋白発現が、RT-PCR法によりNa-k ATPase、keratin12、vdcac3、clcn3、slc4a mRNAの発現が確認された。遺伝子導入細胞のポンプ機能はUssing chamberを用いて評価し、ウアバイン添加で電位差を確認した。以上の特徴から、樹立した細胞株は角膜内皮の特性を備えていることが確認できた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

遺伝子治療と細胞治療は、この研究開始前に先天ムコ多糖症の角膜混濁の治癒に、マウス動物モデルを用いて成功し、臨床応用のための倫理委員会審査、患者集積を行っている。

研究については、進捗状況に述べたように、移植用の強膜および角膜内皮の作成に成功しつつある。

4. 今後の研究の推進方策

移植用の細胞をシート状に形成する研究を進める。必要に応じて、欠損遺伝子を導入し、遺伝子治療の要素も加える。

まずは小型動物で移植実験を行い、次に家兎のような大型動物に移行して、臨床応用に備える。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 21 件) 代表的な論文

- ① Suzuki Y, Kawase E, Nishina S, Azuma N. Two patients with different features of congenital optic disc anomalies in the two eyes. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol* 244, 259-261, 2006. 査読有
- ② Azuma N, Ishikwa K, Hama Y, Hiraoka M, Suzuki Y, Nishina S. Early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 142, 636-643, 2006. 査読有
- ③ Goto K, Yamada M, Sugawara A, Ito T, Azuma N, Ito M. Small eye phenotypes observed in a human tau gene transgenic rat. *Current Eye Reseach* 31, 107-110, 2006. 査読有
- ④ Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Glial extrusion from the regressed retinoblastoma after conservative treatment. *Acta Ophthalmol Scand* 2008; 86:462-464. 査読有
- ⑤ Azuma N, Hida T, Kohsaka S. Hypovascular glial overgrowth from the optic nerve head in fetuses of 16 weeks gestation. *Acta Ophthalmol Scand* 2009; in press. 査読有
- ⑥ Hiraoka M, Nishina S, Nakagawa A, Matsuoka K, Azuma N. Case of aggressive posterior retinopathy of prematurity with atypical neovascular growth. *Jpn J Ophthalmol* 2008; 417-419. 査読有
- ⑦ Yokoi T, Nakagawa A, Matsuoka K, Koide R, Azuma N. Analysis of pathology in type I Stickler syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 2009; in press. 査読有
- ⑧ Nishina S, Suzuki Y, Azuma N. Exudative retinal detachment following cataract surgery in Hallermann-Steiff syndrome. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246:453-455. 査読有
- ⑨ Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. *PLoS ONE*. 2008;3(11):e3709. Epub 2008 Nov 12. 査読有
- ⑩ Iso M, Fukami M, Horikawa R, Azuma N, Kawashiro N, Ogata T. SOX10 mutation in Warrdenburg syndrome type II. *Am J Med Genet* 2008;146A:2162-2163. 査読有
- ⑪ Yokoi T, Hiraoka M, Miyamoto M, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Vascular abnormalities of aggressive posterior retinopathy of prematurity by fluorescein angiography findings. *Ophthalmology* 2009; in press. 査読有
- ⑫ Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. *PLoS ONE*. 2008;3(11):e3709. Epub 2008 Nov 12. 査読有
- ⑬ Shimizu N, Watanabe H, Kubota J, Wu J, Saito R, Yokoi T, Era T, Iwatsubo T, Watanabe T, Nishina S, Azuma N, Katada T, Nishina H. Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Biol Pharm Bull* 2009; in press. 査読有

[学会発表] (計 12 件) 代表的な発表

- ① 東 範行: ファイザー賞受賞講演 眼の形態形成遺伝子 第 62 回日本臨床眼科学会, 東京, 2008.10
- ② 東 範行: 網膜・神経形成における Pax6 の選択スプライスの働き 第 1 回 Retina Research Meeting 東京 2008.11
- ③ 世古裕子: 近視発症の分子機構 —ヒト強膜前後軸の網羅的遺伝子発現解析から。第 24 回日本眼内レンズ屈折手術学会総会シンポジウム 東京 2009.6.

[図書] (計 8 件) 代表的な図書

- ① 東 範行: 黄斑を形成する遺伝子システムと再生医療への応用. *医学のあゆみ* 2008;226:965-972

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

- ① 学会開催 第 65 回日本弱視斜視学会総会・第 34 回日本小児眼科学会総会 合同学会 東京 2008.7.4-5.
- ② 第 4 回 Pfizer Ophthalmic Award Japan 受賞 2009.11