

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791262
 研究課題名（和文） 磁性微粒子を用いた眼内への遺伝子導入法の開発とインビボにおけるプロモーター解析
 研究課題名（英文） Use of Magnetite Cationic Liposome for Gene Transfection to Ocular Cells and *in vivo* Promoter Analysis.
 研究代表者
 加地 秀(KACHI SHU)
 名古屋大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：30345904

研究成果の概要：

マグネトリポフェクションにより *in vitro* で培養網膜色素上皮（RPE）シートの任意の場所への選択的遺伝子導入が可能であり、導入効率は lipofectamin2000 を使用した場合と同等であった。また、lipofectamin2000 の場合と異なり、この手法は細胞増殖に悪影響を与えなかった。さらに本法により重力方向ばかりでなく、横方向への選択的遺伝子導入も可能であり、*in vivo* においても RPE への遺伝子導入が可能であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	300,000	3,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：磁性微粒子、Non viral、遺伝子導入、Magnetolipofection、網膜色素上皮、プロモーター、遺伝子治療、リポソーム

1. 研究開始当初の背景

これまで遺伝子導入の手法としてはウイルスをベクターとして用いるもの、用いないものなど多くの方法が開発されている。しかしながら、網膜色素上皮（RPE）の狭い限局した特定の領域のみに選択的に遺伝子を導入することはできなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は磁性微粒子を用いて RPE の任意の場所に選択的に遺伝子を導入することである。

3. 研究の方法

磁性微粒子と GFP 遺伝子を持つプラスミドを内包するリポソームを作製した。ヒト RPE

由来の培養細胞である ARPE-19 をコンフルエントまで培養し、培養液に上記リポソームを混和し、培養皿の裏面に磁石を 5 分あるいは 30 分間設置して遺伝子導入をおこなった (マグネトリポフェクション)。またフラスコでコンフルエントまで RPE を培養したのちにフラスコを立て、横方向への遺伝子導入を行なった (図 1)。lipofectamin2000 により遺伝子導入したものを対照とした。遺伝子導入 48 時間後に蛍光顕微鏡にて単位面積当たりの GFP 陽性細胞数を計測した。

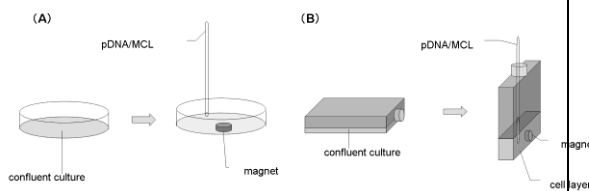


図 1 培養 RPE への遺伝子導入
(A) 垂直方向への選択的遺伝子導入
(B) 水平方向への選択的遺伝子導入

白色マウス網膜下にリポソーム混和液を注入し、結膜上に 5 分間磁石を設置した。48 時間後に眼球を摘出し、フラットマウントを蛍光顕微鏡下に観察した。

4. 研究成果

マグネトリポフェクションにより磁石を設置した部分に多くの GFP 陽性細胞がみられたが、磁石の設置していない部分にはほとんど遺伝子の発現を認めなかった。磁石を設置した部分における GFP 陽性細胞数は lipofectamin2000 を使用した場合と比べて同等であった (図 2)。RPE シートを垂直にした場合においてもマグネトリポフェクションにより横方向への遺伝子導入が可能であったが、lipofectamin2000 を使用した場合にはほとんど GFP 陽性細胞がみられなかった (図 3)。マグネトリポフェクションによって細胞

増殖が妨げられるということにはなかった (図 4)。in vivo においても RPE への遺伝子導入が可能であった (図 5)。

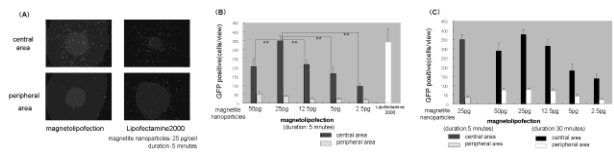


図 2 垂直方向での GFP 陽性細胞数

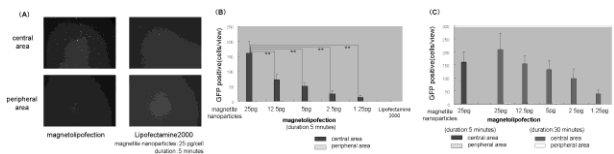


図 3 水平方向での GFP 陽性細胞数

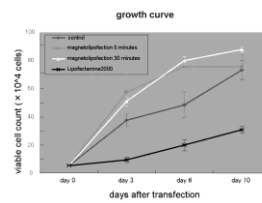


図 4 生細胞数の変化

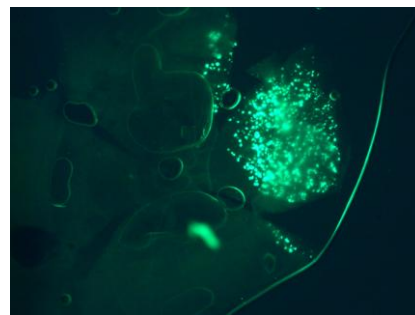


図 5 in vivo での遺伝導入

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1: Ito Nonobe N, Kachi S, Kondo M, Takai Y, Takemoto K, Nakayama A, Hayakawa M, Terasaki H. Concentration of Vascular

Endothelial Growth Factor in Aqueous Humor of Eyes with Advanced Retinopathy of Prematurity before and after Intravitreal Injection of Bevacizumab. *Retina*. 2009 in press. 査読有

2: Yamakoshi T, **Kachi S**, Sugita J, Asami T, Ishikawa K, Ito Y, Terasaki H. Triamcinolone-assisted removal of internal limiting membrane enhances the effect of vitrectomy for diabetic macular edema. *Ophthalmic Res*. 2009 in press. 査読有

3: Yokoi R, Asami T, **Kachi S**, Ito Y, Nakamura M, Terasaki H. A case of acute retinal necrosis after corticosteroid pulse therapy for unilateral Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Retinal Cases & Brief Reports*. 2009 in press. 査読有

4: **Kachi S**, Binley K, Yokoi K, Umeda N, Akiyama H, Iqbal S, Kan O, Naylor S, Campochiaro PA. EIAV vector-mediated co-delivery of Endostatin and Angiostatin driven by the RPE-specific VMD2 Promoter Inhibits Choroidal Neovascularization. *Hum Gene Ther*. 2009 in press. 査読有

5: Nishiguchi KM, Kaneko H, Nakamura M, **Kachi S**, Terasaki H. Generation of immature retinal neurons from proliferating cells in the pars plana after retinal histogenesis in mice with retinal degeneration. *Mol Vis*. 2009;15:187-99. 査読有

6: Esumi N, **Kachi S**, Hackler L Jr, Masuda T, Yang Z, Campochiaro PA, Zack DJ. BEST1 expression in the retinal pigment epithelium is modulated by OTX family

members. *Hum Mol Genet*. 2009 Jan 1;18(1):128-41. 査読有

7: Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, **Kachi S**, Terasaki H. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Sep;49(9):4162-8. 査読有

8: Doukas J, Mahesh S, Umeda N, **Kachi S**, Akiyama H, Yokoi K, Cao J, Chen Z, Dellamary L, Tam B, Racanelli-Layton A, Hood J, Martin M, Noronha G, Soll R, Campochiaro PA. Topical administration of a multi-targeted kinase inhibitor suppresses choroidal neovascularization and retinal edema. *J Cell Physiol*. 2008 Jul;216(1):29-37. 査読有

9: Palanki MS, Akiyama H, Campochiaro P, Cao J, Chow CP, Dellamary L, Doukas J, Fine R, Gritzen C, Hood JD, Hu S, **Kachi S**, Kang X, Klebansky B, Kousba A, Lohse D, Mak CC, Martin M, McPherson A, Pathak VP, Renick J, Soll R, Umeda N, Yee S, Yokoi K, Zeng B, Zhu H, Noronha G. Development of prodrug 4-chloro-3-(5-methyl-3-{{[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)phenyl]amino}-1,2,4-benzotriazin-7-yl}phenyl benzoate (TG100801): a topically administered therapeutic candidate in clinical trials for the treatment of age-related macular degeneration. *J Med Chem*. 2008 Mar 27;51(6):1546-59. 査読有

10: Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, **Kachi S**, Terasaki H. Retardation of photoreceptor degeneration in the detached retina of rd1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Feb;49(2):781-7. 査読有

11: Nishiguchi KM, Kaneko H, Nakamura M, **Kachi S**, Terasaki H. Identification of photoreceptor precursors in the pars plana during ocular development and after retinal injury. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Jan;49(1):422-8. 査読有

12: Yokoi K, Zhang HS, **Kachi S***, Balaggan KS, Yu Q, Guschin D, Kunis M, Surosky R, Africa LM, Bainbridge JW, Spratt SK, Gregory PD, Ali RR, Campochiaro PA. Gene transfer of an engineered zinc finger protein enhances the anti-angiogenic defense system. Mol Ther. 2007 Nov;15(11):1917-23. (*:共同筆頭著者) 査読有

13: Lima e Silva R, Shen J, Hackett SF, **Kachi S**, Akiyama H, Kiuchi K, Yokoi K, Hatara MC, Lauer T, Aslam S, Gong YY, Xiao WH, Khu NH, Thut C, Campochiaro PA. The SDF-1/CXCR4 ligand/receptor pair is an important contributor to several types of ocular neovascularization. FASEB J. 2007 Oct;21(12):3219-30. 査読有

14: Nishiguchi KM, Nakamura M, Kaneko H, **Kachi S**, Terasaki H. The role of VEGF and VEGFR2/Flk1 in proliferation of retinal progenitor cells in murine retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Sep;48(9):4315-20. 査読有

15: Yokoi K, **Kachi S***, Zhang HS, Gregory PD, Spratt SK, Samulski RJ, Campochiaro PA. Ocular gene transfer with self-complementary AAV vectors. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Jul;48(7):3324-8. (*:共同筆頭著者) 査読有

16: Ikenoya K, Kondo M, Piao CH, **Kachi S**, Miyake Y, Terasaki H. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes of

patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Jul;48(7):3312-7. 査読有

[学会発表] (計 27 件)

2008 年

1: **加地秀**: 網膜色素上皮におけるウイルス由来プロモーター活性の比較 第 47 回日本網膜硝子体学会・第 25 回日本眼循環学会 合同学会 2008 年 11 月 29 日 京都

2: 近藤峰生、伊藤逸毅、**加地秀**、安間哲宏、菊池雅人、寺崎浩子、近藤永子、太田一郎、三宅謙作: 網膜静脈分枝閉塞の黄斑浮腫に対するベバシブマブ注入療法に成績に關与する因子 第 47 回日本網膜硝子体学会・第 25 回日本眼循環学会 合同学会 2008 年 11 月 28 日 京都

3: 近藤峰生、伊藤逸毅、**加地秀**、近藤永子、太田一郎、三宅謙作、寺崎浩子: 網膜静脈分枝閉塞の黄斑浮腫に対するベバシブマブ注入 12 か月後の成績 第 62 回日本臨床眼科学会 2008 年 10 月 24 日 東京

4: Terasaki H, Ito N, **Kachi S**, Takai Y, Kondo M: Surgical Treatment and Vascular Endothelial Growth Factor in Eyes with Advanced Retinopathy of Prematurity. XXVIth Meeting of the Club Jules Gonin 2008. 9. 10-13 Switzerland

5: Ito N, **Kachi S**, Kondo M, Takai Y, Terasaki H: Concentration of vascular endothelial growth factor in aqueous humour of eyes with advanced retinopathy of prematurity. World Ophthalmology Congress 2008. 6. 28-7. 2 Hong Kong

6: **Kachi S**, Yamakoshi T, Sugita J, Asami T, Ishikawa K, Ito Y, Terasaki H: Triamcinolone-assisted removal of intermal limiting membrane enhances the

effect of vitrectomy for diabetic macular edema. **World Ophthalmology Congress** 2008. 6. 28-7. 2 Hong Kong

7: Kachi S, Fujii Y, Kaneko H, Kawasumi T, Honda H, Terasaki H: Gene transfection to human retinal epithelial cells using magnetite cationic liposome. **第14回日本遺伝子治療学会** 2008. 6. 14 札幌

8: Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H: Circulating Bone Marrow Derived Microglia Engraft Into the Injured Retina. **ARVO Annual Meeting (The Association for Research in Vision and Ophthalmology)** 2008. 5. 1 USA

9: Nishiguchi KM, Kaneko H, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H: Prolonged Presence of Photoreceptor Precursors in the Ciliary Epithelium of Mice With Hereditary Retinal Degeneration. **ARVO Annual Meeting (The Association for Research in Vision and Ophthalmology)** 2008. 4. 29 USA

10: Kachi S, Umeda N, Akiyama H, Kachi M, Hackett SF, Mazar AP: ATN-224. 021 and ATN-427. 021 Suppress Choroidal Neovascularization. **ARVO Annual Meeting (The Association for Research in Vision and Ophthalmology)** 2008. 4. 29 USA

11: Ito Y, Kondo M, Kachi S, Nakamura M, Asano T, Terasaki H: Increased Macular Volume at Onset Followed by Gradual Decrease in Eyes With Acute Zonal Occult Outer Retinopathy. **ARVO Annual Meeting (The Association for Research in Vision and Ophthalmology)** 2008. 4. 28 USA

12: Ito N, Kachi S, Kondo M, Terasaki H: Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor in Aqueous Humor of Eyes With Advanced Retinopathy of Prematurity. **ARVO**

Annual Meeting (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2008. 4. 28 USA

13: Fujii Y, Kachi S, Kaneko H, Kawasumi T, Honda H, Terasaki H: Gene Transfection to Human Retinal Pigment Epithelial Cells Using Magnetite Cationic Liposome. **ARVO Annual Meeting (The Association for Research in Vision and Ophthalmology)** 2008. 4. 27 USA

14: 梅田尚靖、加地秀、秋山英夫: 血管障害剤 Combretastatin A4 phosphate の眼内血管新生退縮効果 **第112回日本眼科学会** 2008年4月18日 横浜

15: 伊藤典枝、加地秀、近藤峰生、高井佳子、寺崎浩子: 重症未熟児網膜症の血管内皮増殖因子濃度 **第112回日本眼科学会** 2008年4月18日 横浜

16: 加地秀: 重症未熟児網膜症の眼内 VEGF と bevacizumab **第112回日本眼科学会 シンポジウム** 2008年4月18日 横浜

17: 牛田宏昭、浅見哲、加地秀、石川浩平、近藤峰生、寺崎浩子: 増殖糖尿病網膜症に対する bevacizumab 硝子体手術前投与の影響 **第13回日本糖尿病眼科学会** 2008年3月16日 東京

18: 伊藤典枝、高井佳子、近藤峰生、加地秀、寺崎浩子: 未熟児網膜症 stage4 に対するバックリング手術 **第31回日本眼科手術学会** 2008年2月1日 横浜

2007年

19: Kachi S, Binley K, Umeda N, Akiyama H, Yokoi K, Xiao W, Kachi M, Esapa M, Iqbal S, Kan O, Picard M, Naylor S, Campochiaro PA: Inhibition of Choroidal Neovascularization by Angioinhibitory Genes Derived by the RPE Specific Promoter.

第13回日本遺伝子治療学会 2007.6.30 名古屋

20: 栗本幸英、近藤峰生、加地秀、朴昌華、杉田紉、中村美晴、伊藤逸毅、寺崎浩子: 抗 VEGF 抗体 網膜中心静脈分岐閉塞に伴う黄斑浮腫に対するベバシズマブ注入後の黄斑部局所網膜電図 第61回日本臨床眼科学会 2007年10月12日 京都

21: 近藤峰生、伊藤逸毅、加地秀、石川浩平、寺崎浩子、近藤永子、太田一郎、三宅謙作: 網膜中心静脈分枝閉塞に対するベバシズマブ注入6カ月後の成績 第46回日本網膜硝子体学会 2007年11月23日 青森

22: 伊藤典枝、近藤峰生、加地秀、高井佳子、寺崎浩子: 未熟児網膜症に対する bevacizumab 硝子体注射 第46回日本網膜硝子体学会 2007年11月23日 青森

23: 兼子裕規、西口康二、中村誠、加地秀、寺崎浩子: 骨髄由来細胞のマウス網膜内への生着 第46回日本網膜硝子体学会 2007年11月24日 青森

24: 藤井康生、加地秀、兼子裕規、寺崎浩子: 磁性微粒子を用いた網膜色素上皮細胞への遺伝子導入 第46回日本網膜硝子体学会 2007年11月24日 青森

25: 加地秀、梅田尚靖、秋山英雄: テトラチオモリブテン酸とテトラチオタンゲステン酸の脈絡膜新生血管に対する効果 第46回日本網膜硝子体学会 2007年11月24日 青森

26: 秋山英雄、加地秀、梅田尚靖: PDGF-B アプタマーの硝子体注射は増殖網膜症を抑圧する 第46回日本網膜硝子体学会 2007年11月24日 青森

27: 伊藤逸毅、近藤峰生、加地秀、中村誠、寺崎浩子: 片眼性 AZOOR の発症初期黄斑部網膜厚変化 第46回日本網膜硝子体学会 2007年11月25日 青森

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加地 秀 (KACHI SHU)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30345904