

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791689

研究課題名 (和文) 新規遺伝子治療導入ベクターを用いた難治緑内障の遺伝子治療開発

研究課題名 (英文) The development of gene therapy for intractable glaucoma using new SIV vector

研究代表者

宮崎勝徳 (MIYAZAKI MASANORI)

九州大学・大学病院・眼科・助教

研究者番号：40380638

研究成果の概要 (和文)：

難治性眼科疾患である緑内障の新規治療法として、サル由来レンチウイルス(SIV)ベクターを媒体として用いた遺伝子治療の有用性を検証した。具体的には緑内障モデル動物に対し、神経保護因子である色素上皮由来因子 (Pigment epithelium-derived factor : PEDF) を搭載した SIV ベクターを眼内に導入・発現させることで、その治療効果を検討した。コントロールに比較し、組織学的にも機能的にも有意に神経節細胞死を抑制し、当該遺伝子治療がその新規治療の一つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We assessed the newly developed SIV-mediated gene therapy using PEDF for two different RGC-damaged glaucoma models. Retinal whole mount and pattern ERG showed morphological and functional rescue of retinal ganglion cells in therapeutic group. These findings show that neuroprotective gene therapy using PEDF can protect ganglion cell death, and support the potential feasibility of neuroprotective therapy of intractable glaucoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1700000	510000	2210000
2010年度	1600000	480000	2080000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

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：緑内障、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

緑内障は罹患率が高く、我が国でも中途失明原因の1,2位を占める重篤な疾患である。緑内障は眼圧のみでは説明できない多因子疾患と位置づけられており、エビデンスのある治療が眼圧下降のみである現状では、理論

上治療に難渋することが予測され、経験的にもそれを実感する。近年緑内障により傷害される網膜神経節細胞が、最終的にアポトーシスに陥ることで変性死に至ることが明らかとなってきた。関わる多くの因子を治療のターゲットとするよりも、最終的に共通に陥る

アポトーシスをそのターゲットとすることが、今後より効果的な治療となり得ると考えられる。

我々は眼科領域の難治性変性疾患に対する遺伝子治療研究に以前から精力的に取り組んできた。長期発現を目的としたサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを我々独自に開発し、その安全な遺伝子導入と、遺伝性網膜変性疾患に対する治療効果を報告してきた。その研究結果を土台に、臨床応用に向けて大型動物 (カニクイサル) を用いた安全性試験を実施し、その安全性を確認した。現在網膜色素変性を対象とした臨床応用プロトコルが九州大学医学部内遺伝子治療研究審査専門委員会にて認可され、現在は厚生労働省における申請を行っている。早ければ数年後には眼科領域における国内初の遺伝子治療研究が発信できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、2種類の神経保護因子 PEDF、および FGF-2 各々の発現ベクター2種 (SIVagm-VSVG, SIVagm-F/HN) の構築と供給、そのベクターの神経節細胞をターゲットとした遺伝子発現特性の検討、および緑内障モデル動物に対する治療効果を検証することにより、生体内での特定分子の過剰発現が緑内障の病態に及ぼす影響を解析し、緑内障に対するより安全かつ有効な遺伝子治療法の確立に向けた基礎的かつ先進的研究を目的とする。

3. 研究の方法

1. 治療用ベクターの構築

治療用ベクターとして、PEDF および FGF-2 を搭載遺伝子とし、各々を搭載した発現ベクター2種 (SIVagm-VSVG, SIVagm-F/HN) を構築する (計4種)。さらに眼内投与後の遺伝子導入・発現効率の検証、および治療用ベクターの効果判定基準用のコントロールベクターとして、LacZ、GFP 遺伝子を搭載した SIVagm-VSVG, SIVagm-F/HN を構築する。

2. ベクターの培養系での生物活性の検討

新規ベクターの生物活性を、標的細胞である網膜神経節細胞 (ラット眼球より ELISA にて採取)、網膜色素上皮細胞 (ヒト・ARPE-19 細胞株) を用いて培養系での検討を行う。具体的には、以下の実験を実施する。

- 1) 標的細胞への導入効率の検討
- 2) 感染細胞における目的遺伝子の発現、および発現蛋白 (PEDF, sFlt-1) 外分泌の確認
- 3) 感染細胞への導入による細胞障害の有無の検討

3. 小動物対象の遺伝子導入発現特性の検討

マウス、ラットを対象とし、作成した各種ベクターを用いて遺伝子導入・発現特性を検討する。投与法は硝子体内、および網膜下投与の2種類を実施し、その導入動態を検討する。さらに投与ベクター濃度を各段階設定し、詳細な検討を行う。具体的には以下の実験を実施する。

1) LacZ 遺伝子搭載ベクターによる眼内導入細胞の検討

2) GFP 遺伝子搭載ベクターによる遺伝子発現の経時的変化の検討

3) 治療用ベクター投与後の各遺伝子発現量の検討 (Western blotting, ELISA)

4. 緑内障モデルを対象とした治療実験

広く網膜神経節細胞傷害疾患モデルとして認められているラット高眼圧モデル、NMDA 硝子体内投与モデルラットの安定した作成を目指す。その上で、上記3.の検討結果から効果的と考えられる投与法を選択し、各種ベクターにおいて以下の検討項目を検証する。

1) 逆行性神経節細胞染色における残存神経節細胞数の計測

2) 組織切片における残存神経節細胞の計測

3) 網膜電図による網膜全体、および神経節細胞の機能を反映する pattern ERG の計測

以上を経時的に長期間観察することにより、治療ベクターにおいて緑内障を制御できるか否かについて厳密かつ詳細な検討を行う。治療ベクターの有効性が確認されれば、その制御メカニズムの解明を目指しさらに検証を加える。

4. 研究成果

1. 治療用ベクターの構築

治療用ベクターとして、PEDF および FGF-2 を搭載遺伝子とし、各々を搭載した発現ベクター2種 (SIVagm-VSVG, SIVagm-F/HN) を構築した。

2. ベクターの培養系での生物活性の検討

培養系では網膜神経節細胞の純度の高い採取が困難で、その導入効率や遺伝子発現を確認することが不可能であった。

3. 小動物対象の遺伝子導入発現特性の検討
ラットを対象とし、網膜下、及び硝子体内投与により網膜神経性津細胞への遺伝子導入が高効率で可能であることが確認できた。

4. 緑内障モデルを対象とした治療実験

ラット高眼圧モデル、NMDA 硝子体内投与モデルラットの安定した作成が可能であった。その上で、網膜下投与により組織学的、および機能的に有意な神経節細胞保護効果が確認できた。

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7件)

Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Murakami T, Tabata T, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T.

PEDF gene therapy targeting retinal ganglion cell injuries: neuroprotection against loss of function in two animal models.

Human Gene Therapy. 2011; 22(5): 559-565

Ikeda Y, Hisatomi T, Murakami Y, Miyazaki M, Kohno R, Takahashi H, Hata Y, Ishibashi T. Retinitis pigmentosa associated with asteroid hyalosis.

Retina. 2010 Sep;30(8):1278-81.

Kohno R, Hata Y, Mochizuki Y, Arita R, Kawahara S, Kita T, Miyazaki M, Hisatomi T, Ikeda Y, Aiello LP, Ishibashi T.

Histopathology of neovascular tissue from eyes with proliferative diabetic retinopathy after intravitreal bevacizumab injection.

Am J Ophthalmol. 2010 Aug;150(2):223-229.

Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Inoue M, Hasegawa M, Sueishi K, Ishibashi T.

Inhibition of choroidal neovascularization via brief subretinal exposure to a newly developed lentiviral vector pseudotyped with Sendai viral envelope proteins.

Hum Gene Ther. 2010 Feb;21(2):199-209.

Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Kohno R, Murakami Y, Murata T, Goto Y, Tabata T, Ueda Y, Ono F, Suzuki T, Ageyama N, Terao K, Hasegawa M, Sueishi K, Ishibashi T.

Acute toxicity study of a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector for retinal gene transfer in nonhuman primates.

Hum Gene Ther. 2009 Sep;20(9):943-54.

Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Kohno R, Murakami Y, Murata T, Tabata T, Ueda Y, Ono F, Suzuki T, Ageyama N, Terao K, Hasegawa M, Sueishi K, Ishibashi T.

Stable retinal gene expression in nonhuman primates via subretinal injection of SIVagm-based lentiviral vectors.

Hum Gene Ther. 2009 Jun;20(6):573-9.

Arima M, Miyazaki M, Kohno R, Hata Y, Ishibashi T.

An early "reopening" case of idiopathic macular hole; supportive usefulness of fundus autofluorescence.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2009 May;247(5):711-4.

[学会発表] (計4件)

宮崎勝徳、有馬充、安里良、望月泰敬、園田康平、石橋達朗

トリアムシノロン硝子体内注入後の前房水における濃度変化とVEGFとの相関
2010/11/12 臨床眼科学会、神戸

Masanori Miyazaki, Takahito Nakama, Mitsuru Arima, Yasutaka Mochizuki, Kohei Sonoda, Tatsuro Ishibashi

Secondary macular hole formation after vitrectomy with internal limiting membrane peeling.

2010/09/14 KCJ-meeting, Beijing

M.Miyazaki, Y Ikeda, N Yoshida, H Imaki, Y Hata, T Ishibashi, "Vitrectomy for Epiretinal membrane secondary to Retinitis Pigmentosa" Asia-Pacific Academy of Ophthalmology, Bali, Indonesia, 2009/05/16

宮崎勝徳、今木裕幸、向野利一郎、望月泰敬、畑 快右、石橋達朗、硝子体手術後に発症したMRSAによる眼内炎の1例、国内、学会、日本眼科手術学会、一般、講演、神戸
2009/01/23

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎勝徳 (MIYAZAKI MASANORI)
九州大学病院・眼科・助教
研究者番号：40380638

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：