

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792014

研究課題名(和文) siRNA技術を用いた遺伝子治療研究

研究課題名(英文) gene therapy using siRNA technology

研究代表者

五十嵐 勉 (Igarashi, Tsutomu)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10421190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおける遺伝子VEGFに対するsiRNAの配列についてデザインの決定を行った。選択された配列の遺伝子をAAV type8ベクターのベクタープラスミドに挿入した。ライゲーション、トランスフォーメーションを行って、クローンの単離を行った。クローンのシーケンスを確認し、プラスミドを精製後、発現を培養細胞にて確認後、AAV type8ベクターを作製した。次にAAV type8ベクターの発現を培養細胞にて確認後、ラージスケールにてベクターを作製し濃縮を行った。動物実験として脈絡膜新生血管モデルにおいて新生血管抑制効果を確認した。2014年度にMolecular vision誌にアクセプトされた。

研究成果の概要(英文)：To assess the feasibility of a gene therapeutic approach to treating choroidal neovascularization (CNV), we generated an adeno-associated virus type 8 vector (AAV8) encoding a small interfering RNA (siRNA) targeting vascular endothelial growth factor (VEGF), and determined its ability to inhibit angiogenesis. We made AAV8/SmVEGF-2. We injected AAV8/SmVEGF-2 or control vector (AAV8/GFP) into the subretinal space in C57BL/6 mice. The eyes were removed for flat mount analysis of CNV surface area. Subretinal delivery of AAV8/SmVEGF-2 significantly diminished CNV at the laser lesions, as compared to AAV8/GFP. Using ELISA, we found that VEGF levels were reduced by approximately half in AAV8/SmVEGF-2 treated eyes. These results suggest that siRNA-VEGF can be expressed across the retina and that long-term suppression of CNV is possible through the use of stable AAV-mediated siRNA-VEGF expression.

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：網膜 遺伝子治療 AAVベクター siRNA VEGF 脈絡膜新生血管

1. 研究開始当初の背景

近年、加齢黄斑変性に対する治療は光力学線療法(PDT)、VEGFに対する抗体医薬が臨床に用いられ有用な成績を収めている。特に抗VEGF抗体は第一選択薬となっているが、VEGFは脈絡膜毛細血管板などの正常網脈絡膜血管の恒常性維持 (Saint-Geniez et al, Proc Natl Acad Sci, 2009)に必要であり、網膜神経細胞の栄養因子 (Nishijima et al, Am J Pathol, 2007)としても働いているため、高濃度の抗 VEGF 抗体の長期間の投与は正常組織に負の影響を与える可能性がある。実際に網膜血管が狭細化した報告(Papadopoulou et al, Ophthalmology, 2009)や網膜中心静脈閉塞症の網膜虚血性変化が悪化した報告 (Pieramici et al, Ophthalmology, 2008)がされている。そのため蛋白のレベルで投与すれば現在のプロトコール通り月に1回の高い濃度の抗体が必要になり、インプラントによるゆっくりとした放出方法か遺伝子治療による安定した低濃度による遺伝子発現が必要となる。

我々はこれまで新生血管を伴う眼疾患への遺伝子治療研究を行ってきた。(Igarashi et al. Gene therapy 2003, Igarashi et al. Human gene therapy 2010)長期間の安定した遺伝子発現、安全性などを考えると現在アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが最も適しており、実際人に対する遺伝子治療では AAV ベクターが使用されている。AAV ベクターはサブタイプとして1から12まで知られているがタイプによる組織特異性があり、眼内組織への導入効率は細胞種によっても大きく異なる。我々は臨床的に使用されているタイプ2と眼内への導入効率が高いと考えられていたタイプ5と8を網膜下へ投与し比較検討した所、タイプ8が非常に導入効率が高いことが分かった。(Igarashi et al. Human gene therapy 2010) これにより高い導入効率による遺伝子治療研究が可能である事を示した。

2. 研究の目的

siRNA技術を用いた網脈絡膜新生血管抑制を目的とした遺伝子治療研究

3. 研究の方法

1, VEGFRNAの発現を抑制するsiRNAを発現する AAV type8ベクターを構築した。

ターゲットとなるsiRNAの選択

マウスにおける各遺伝子(VEGF)に対するsiRNAの配列について検討した。具体的には各遺伝子を発現する培養細胞株に対する遺伝子発現抑制について多種ある配列の中からRNAレベルにて検討を行い、デザインの決定を行った。

AAV type8ベクターを構築

選択された配列の遺伝子を AAV type8ベクターのベクタープラスミドに挿入した。ライ

ゲーション、トランスフォーメーションを行って、クローンの単離を行った。クローンのシーケンスを確認し、プラスミドを精製後、発現を培養細胞にて確認後、AAV type8ベクターを作製する。次に AAV type8ベクターの発現を培養細胞にて確認後、ラージスケールにてベクターを作製し濃縮を行い、ウイルスベクターの力価を測定し、濃縮率を決定した。

2, 加齢性黄斑変性モデルに対してベクターを投与し新生血管抑制効果を検討した。

レーザーモデルを作製

アルゴンレーザー照射を成人 C57BL マウスの網膜に行う。条件としては0.1秒、100µm、100mWにて視神経乳頭周囲に4カ所レーザー照射を行った。

AAV type8ベクターの投与

網膜下へ投与を行った。

脈絡新生血管の評価

新生血管測定用には、生理食塩水で還流後4%パラホルムアルデヒドで固定し、フルオレセイン標識のデキストランを還流し血管の可視化を行った。眼球を摘出し固定液内で固定を行う。眼球を前眼部と後眼部に分け、後眼部を神経網膜と色素上皮細胞、脈絡膜、強膜に分け、フラットマウントを作製した。蛍光顕微鏡下にて新生血管の範囲を計測し、コントロールのベクターとの比較を行った。

病理解析

生理食塩水で還流後4%パラホルムアルデヒドで固定し、眼球を摘出し固定を行った。シュクロースで置換した後、眼球を前眼部と後眼部に分け、凍結を行い、切片を作製した。

RNAレベルでの解析

病理解析で調べる VEGF の発現がタンパクのレベルと同様であるか、RNAのレベルでも検討した。

4. 研究成果

VEGFに対するsiRNAを発現するtype8AAVベクターにより脈絡膜新生血管抑制を認めた。網膜色素上皮における VEGF 発現低下を確認した。2014年度にMolecular vision誌にアクセプトされた。

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 14件)

2014

1) Igarashi T, Miyake N, Fujimoto C, Yaguchi C, Iijima O, Shimada T, Takahashi H, Miyake K. AAV2/8-mediated expression of siRNA targeting VEGF efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal

neovascularization model. *Molecular Vision*. 2014 20:488-96.

2) Suzuki H, Oki K, Igarashi T, Shiwa T, Takahashi H. Temperature in the anterior chamber during phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg*. 2014 Mar 27. pii: S0886-3350(14)00251-X. doi:

3) 一戸唱、五十嵐勉、藤本千明、飯島修、小野眞史、高橋浩. 自発的開瞼維持による涙液浸透圧の変化. *あたらしい眼科* 2014 31(2):257-259

2013

1) Igarashi T, Miyake K, Asakawa N, Miyake N, Shimada T, Takahashi H. Direct comparison of the administration routes for AAV8-mediated ocular gene therapy. *Current eye research* 2013 38(5):569-77.

2) Suzuki H, Shiwa T, Oharazawa H, Igarashi T, Takahashi H. Simultaneous treatment of pterygium and temporal conjunctivochalasis. *Journal of Nippon Medical School*. 2013 80(1): 74-77

3) Igarashi T, Igarashi T, Shimizu A, Itoh Y. Intravenous cyclophosphamide pulse therapy in Japanese children with systemic lupus erythematosus. *Journal of Nippon Medical School*. 2013 80(5):396-400

4) Igarashi T, Shimizu A, Igarashi T, Hanaoka K, Yoshizaki K, Shigemori T, Shimizu S, Komeichi H, Itoh Y. Seroconversion of hepatitis B envelope antigen by entecavir in a child with hepatitis B virus-related membranous nephropathy. *Journal of Nippon Medical School*. 2013 80(5): 387-395

5) Igarashi T, Shimizu A, Yamaguchi H, Fukushima Y, Igarashi T, Takahashi H. A definitive diagnosis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma made at a second biopsy examination. *Journal of Nippon Medical School*. 2013; 80 (6) 475-480

2012

1) Kuwabara Y, Katayama A, Igarashi T, Tomiyama R, Piao H, Kaneko R, Abe T, Mine K, Akira S, Orimo H, Takeshita T.; Rapid and Transient Upregulation of CCL11 (Eotaxin-1) in Mouse Ovary During Terminal Stages of Follicular Development. *Am J Reprod Immunol*. 2012 May;67(5):358-68.

2) Igarashi T, Itoh Y, Shimizu A, Igarashi T, Yoshizaki K, Fukunaga Y. A case of juvenile Sjögren's syndrome with interstitial nephritis. *Journal of Nippon Medical School*. 2012 August;79(4):286-90.

3) Igarashi T, Nakazato Y, Kunishige

T, Fujita M, Yamada Y, Fujimoto C, Okubo K, Takahashi H. Mometasone Furoate Nasal Spray Relieves the Ocular Symptoms of Seasonal Allergic Rhinoconjunctivitis. *Journal of Nippon Medical School*. 2012; Jun; 79 (3): 182-189.

4) Kabuto T, Takahashi H, Goto-Fukuura Y, Igarashi T, Akahori M, Kameya S, Iwata T, Mizota A, Yamaki K, Miyake Y, Takahashi H. A new mutation in RP1L1 gene in occult macular dystrophy patient associated with a depolarizing-pattern of focal macular ERG. *Molecular Vision*. 2012 April; 18: 1031-9.

5) Igarashi T, Itoh Y, Maeda M, Igarashi T, Fukunaga Y. Mean hemoglobin levels in venous blood samples and prevalence of anemia in Japanese elementary and junior high school students. *Journal of Nippon Medical School*. 2012; Jun; 79 (3): 232-235.

6) 佐藤景子、堀純子、五十嵐勉、今高之；強皮症に随伴した両眼性汎ぶどう膜炎の1例。 *臨床眼科* 2012 2月 66(2) 179-83

〔学会発表〕(計 15 件)

2014

1) 小林舞香、五十嵐勉、藤本千明、高橋浩. 短時間の超高浸透圧暴露で角膜上皮細胞からの IL-6 産生は上昇する. 日本角膜学会 沖縄

2) 仲野裕一郎、五十嵐勉、藤田美穂、山田佑美、藤本千明、國重智之、高橋永幸、高橋浩. レバミピド点眼によるドライアイの自覚症状・他覚所見の改善. 日本角膜学会 沖縄

3) 有馬武志、五十嵐勉、藤田美穂、山田佑美、藤本千明、高橋永幸、國重智之、高橋浩. 白内障手術前後における涙液浸透圧の変化. 日本角膜学会 沖縄

4) 久保田大紀、五十嵐勉、藤田美穂、山田佑美、藤本千明、國重智之、高橋永幸、高橋浩. 血漿浸透圧と涙液浸透圧の相関因子について. 日本角膜学会 沖縄

5) Igarashi T, Miyake K, Miyake N, Iijima O, Yaguchi C, Yaguchi C, Shimada T, Takahashi H. Adeno-associated vector (type 8)-mediated expression of siRNA targeting vascular endothelial growth factor efficiently inhibits neovascularization in a murine

- choroidal neovascularization model.
World ophthalmology congress Tokyo
- 6) Takahashi K, Igarashi T, Shimizu A, Yamaguchi A, Fukushima Y, Igarashi T, Akeo K, Takahashi H. A definitive diagnosis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma made at a second biopsy examination. World ophthalmology congress Tokyo
 - 7) Ichinohe S, Igarashi T, Fujimoto C, Ono M, Takahashi H. Alteration of tear osmolality by sustained eye opening World ophthalmology congress Tokyo

2013

- 1) Igarashi T, Miyake K, Miyake N, Iijima O, Yaguchi C, Shimada T, Takahashi H. Adeno-associated vector (type 8)-mediated expression of siRNA targeting vascular endothelial growth factor efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. American society of gene therapy. Solt lake city
- 2) Igarashi T, Miyake N, Iijima O, Yaguchi C, Shimada T, Takahashi H, Miyake K. siRNA targeting vascular endothelial growth factor by adeno-associated vector (type 8) efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. Japan society of gene therapy (18th) Okayama
- 3) Igarashi T, Miyake N, Iijima O, Yaguchi C, Shimada T, Takahashi H, Miyake K. siRNA targeting vascular endothelial growth factor by adeno-associated vector (type 8) efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. 日本網膜硝子体学会 名古屋
- 4) Iijima O, Miyake K, Nakamura A, Igarashi T, Kanokoda C, Watanabe A,

Shimada T. Bone Marrow Cell Based Enzyme Replacement Prolongs Survival and Improves Disease Phenotypes In a Mouse Model Of Lethal Hypophosphatasia. American society of hematology. New Orleans

- 5) 一戸唱、五十嵐勉、飯島修、小野眞史、高橋浩. 自発的開瞼維持による涙液浸透圧の変化. 日本角膜学会 和歌山
- 6) 飯島修、三宅弘一、中村有希、鹿子田千津、五十嵐勉、渡邊淳、島田隆. 低フォスファターゼ症マウスに対する ex vivo 遺伝子治療法の検討. 第 58 回日本人類遺伝学会学術集会 仙台

2012

- 1) Iijima O, Miyake K, Sugano-Tajima H, Igarashi T, Kanokoda C, Watanabe A, Shimada T. Rescue of Lethal Hypophosphatasia Mice by Neonatal Ex Vivo Gene Therapy Using Lentivirally Transduced Bone Marrow Cells. American society of hematology. Atlanta
- 2) 五十嵐勉、三宅弘一、浅川なぎさ、三宅紀子、島田隆、高橋浩. 異なる投与方法による AAVtype8 ベクターの遺伝子導入効率と安全性の比較検討. 日本網膜硝子体学会

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 五十嵐 勉
(Tutomu Igarashi)
日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10421190