

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20301

研究課題名(和文) 網膜神経節細胞の障害応答性遺伝子治療の開発

研究課題名(英文) Spatially and temporally regulated gene therapy using stress response promoter in retinal injury

研究代表者

藤田 幸輔(Fujita, Kosuke)

東北大学・医学系研究科・助手

研究者番号：80708115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：網膜神経節細胞(RGC)障害が病気の本態である緑内障は視覚に重篤な影響を及ぼす。多くの場合、慢性で緩急を伴い、空間的に偏った病態の進行を示す。そこで、空間・時間特異度の高い新規遺伝子治療プラットフォームの開発を目指した。RGC障害時に転写が亢進するストレス応答プロモーターの下流に治療遺伝子を搭載したAAVベクターを作製し、恒常的に転写されるCMVプロモーターと治療効率を比較したところ、視神経挫滅モデルにおいて同等の治療効果を示した。正常マウスを用いた長期毒性試験では、CMVプロモーターにのみRGCの減少が確認された。本治療コンセプトは、眼の内外のあらゆる慢性疾患の治療に有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Retinal ganglion cell (RGC) degeneration is believed to underlie many ocular diseases including glaucoma. In these diseases, RGCs are affected unevenly, both spatially and temporally, such that healthy and unhealthy RGCs coexist in different patterns at different time points. We describe a temporally and spatially regulated AAV gene therapy aiming to reduce undesired off-target effects on healthy RGCs. The *Mcp-1* promoter shown to be transcribed in stressed RGCs following murine optic nerve injury was combined with the neuroprotective transcription factor NRF2. In this model, *Mcp-1*-driven NRF2 expression targeting only stressed RGCs showed efficacy equivalent to non-selective CMV promoter-driven therapy for preventing RGC death. However, CMV promoter-mediated NRF2 transcription induced cellular stress responses and death of uninjured RGCs. Combining a stress-responsive promoter and therapeutic gene is a versatile strategy for specifically targeting cells at risk of degeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：遺伝子治療 緑内障 アデノ随伴ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

網膜神経節細胞 (RGC) 障害が病気の本態である緑内障や視神経症は視覚に重篤な影響を及ぼしうる。なかでも緑内障は失明原因の多くを占める。しかし、それらの疾患に対する治療は、神経細胞障害の誘因 (例えば眼圧や炎症) を制御することに主眼があり、既存の治療では十分な効果が得られない場合もある。また、多くの場合、病気の進行は慢性で緩急を伴う。しかも、緑内障に関しては、空間的に偏った病態の進行を示す。つまり、同じ網膜でも、異常をきたしている RGC と正常な RGC が混在していると考えられる。近年の次世代シーケンサの普及や解析技術の進歩により、RGC 障害に関与する遺伝子発現プロファイルの理解が進んでいる。当科でもマウス軸索障害モデルを対象に網羅的遺伝子発現解析を行っている (Yasuda ら PLOS one 2014, BMC Genetics 2014)。

遺伝子治療は、外部から遺伝子を生体内に導入し働かせることで疾患を治療する手法である。遺伝子を細胞内に運ぶ様々な担体 (ベクター) があるが、なかでもアデノ随伴ウイルス (AAV) に注目した。AAV は小型のウイルスでセロタイプによって導入される細胞に選択性がある、そして、単独では増殖できず、非病原性であり安全性が高い。また、非分裂性の細胞にも遺伝子導入でき、発現が長期間維持されることから、遺伝子治療に用いられるウイルスベクターのなかでも、優れた点を多く持っている (Ali ら Hum Gene Ther 1998, Lai ら Nat Biotech 2005)。

一方で、我々は、これまでの論文報告をもとに、RGC 障害に関わると考えられるストレス応答パスウェイの AAV2 レポーターを複数作製し、RGC の障害モデルの 1 つである視神経挫滅モデルで、RGC のストレス応答を解析した。その結果、RGC 障害時に早期に転写が亢進するストレス応答プロモーター配列を 2 つ (ATF6 応答プロモーターと Mcp-1 プロモーター) 同定した (Fujita ら Sci Rep 2016)。

本研究では、これらのストレス応答プロモーター配列の下流に神経保護機能を持った NRF2 遺伝子を搭載した遺伝子治療用 AAV ベクターを作製し、視神経挫滅モデルで障害を受けた細胞だけが、しかもストレス応答を示しているときだけに強力な神経保護因子を発現する、あたらしい遺伝子治療の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

新たな遺伝子治療用ツールとして、RGC 障害に特異的に応答し治療する AAV ベクターの開発を行う (図 2)。具体的には、(1) ストレスに対するレポーター-AAV の応答性の評価、(2) 治療用 AAV ベクターの作製と治療効果の検討、(3) 既存治療用 AAV ベクターと治療効果と毒性の比較、を行う。神経保護因子をコードする遺伝子としてすでに

有効性が確立されている NRF2 遺伝子を用いる (Xiong ら J Clin Invest 2015)

## 3. 研究の方法

(1) ストレスに対するレポーター-AAV の応答性の評価

障害特異的に応答するプロモーターのストレスに対する反応をレポーター-AAV を用いて評価した。レポーター-AAV は Mcp-1 プロモーターの下流に蛍光タンパク質 (EGFP) を配置したものをを用いた。レポーターが導入されたマウスに対して視神経挫滅を加え、レポーターの応答性を in vivo イメージングにより経時的に合計 1 か月間観察し、遺伝子発現のオンとオフのタイミングを評価した。

(2) 治療用 AAV ベクターの作製と治療効果の検討

治療用ベクターとして、Mcp-1 プロモーターの下流に NRF2 または BDNF を配置した治療用 AAV ベクターを作製した。続いて、作製した治療用 AAV ベクターを用いて、マウス視神経軸索挫滅モデルを用いて遺伝子治療を行い、有効性を検討した。治療効果の判定は、視力・コントラスト感度測定、RGC 数、qRT-PCR、機能プローブを用いた in vivo イメージングにより行った。

(3) 既存用治療用 AAV ベクターとの治療効果と毒性の比較

神経保護因子 NRF2 を持続発現する CMV プロモーターを用いた AAV ベクターでも遺伝子治療を行い、治療効果を比較した。マウス視神経軸索挫滅モデルを用いて遺伝子治療を行い、有効性を検討した。治療効果の判定は、視力・コントラスト感度測定、RGC 数、qRT-PCR、機能プローブを用いた in vivo イメージングにより行った。毒性比較は CMV プロモーターとストレス応答性プロモーターを用いた遺伝子治療ベクターを正常マウスに投与し、8 か月に渡って網膜組織に対する毒性を評価した。

## 4. 研究成果

(1) ストレスに対するレポーター-AAV の応答性の評価

視神経挫滅モデルでの障害に対する応答性をレポーター-AAV により評価したところ、障害により細胞死より先だてて転写誘導され、障害の鎮静化に伴い転写が低下することが明らかとなった (図 1)。

(2) 治療用 AAV ベクターの作製と治療効果の検討

Mcp-1 プロモーターの下流に神経保護機能を持った NRF2 遺伝子または BDNF 遺伝子を搭載した遺伝子治療用 AAV ベクターを作製し、その治療効果を検討した。治療用 AAV ベクターを硝子体投与したマウスに、視神経挫滅を行い、RGC 死を SytoxOrange による死細胞染色と qRT-PCR により評価した。

その結果、無治療眼に対し、NRF2 は 37.9%、BDNF は 53.8%に死細胞数が低下した。また、RGC マーカーの発現においても治療効果が認められた (図 2)。

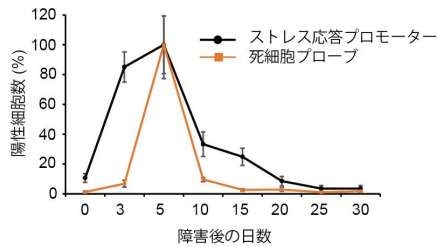


図 1 .視神経挫滅後のストレス応答プロモーターの活性の変動(Fujita ら 2018 より改変)

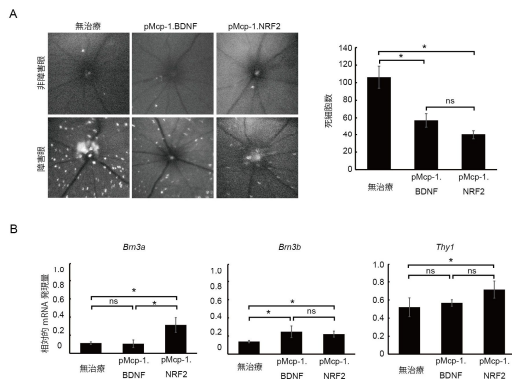


図 2 . ストレス応答プロモーターの治療効果。

A . 死細胞プローブを用いた in vivo イメージング。治療により死細胞数が減少した。B . qRT-PCR による RGC マーカーの発現量。治療により発現量の減少が抑えられている。(Fujita ら 2018 より改変)

(3) 既存治療用 AAV ベクターと治療効果および毒性の比較

既存の治療用ツールである恒常的に転写されるプロモーター (CMV プロモーター) と Mcp-1 プロモーターの治療効率の比較を行った。治療用遺伝子は良好な治療効果を示した NRF2 を用いた。両プロモーターにおいて、視神経挫滅モデルに対する NRF2 遺伝子治療の効果を比較したところ、死細胞染色、RGC マーカーの発現量、オプトトリーによる視力測定の内いずれにおいても同等の治療効果を

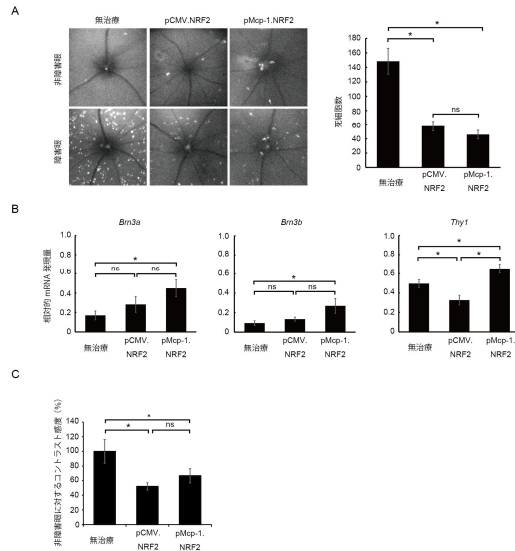


図 3 . 既存の遺伝子治療ツールとストレス応答性遺伝子治療の治療効果の比較。

A . 死細胞プローブを用いた in vivo イメージング。B . qRT-PCR による RGC マーカーの発現量。C . オプトトリーによる視力測定 (コントラスト感度) 既存の治療ツールと同等の治療効果が認められた。(Fujita ら 2018 より改変)

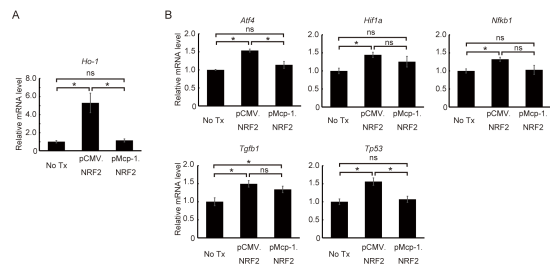


図 4 . 正常マウスを用いた毒性試験。

AAV ベクターを導入後 2 か月の正常マウスの遺伝子発現を qRT-PCR により解析した。Mcp-1 プロモーターに比べ、CMV プロモーターでは NRF2 下流遺伝子と各細胞ストレス遺伝子の発現上昇が見られた。(Fujita ら 2018 より改変)。

示した (図 3) 。しかしながら、AAV ベクター導入後 2 か月の正常マウスでは、CMV プロモーターにおいてのみ、NRF2 下流の Ho-1 遺伝子の発現が増加しているとともに、Chop や p53 等の細胞ストレスに関わる遺伝子の発現上昇も見られた (図 4) 。さらに、正常マウスも用いた長期 (8 カ月) の毒性試験では、

CMV プロモーターにおいてのみ NRF2 過剰発現 RGC の有意な減少 (36.3%) が確認された (図 5)。このことは、既存のツールでは常時、治療用遺伝子が発現誘導されるため、障害が生じる可能性を示唆している。

適切なストレス応答性プロモーターと治療遺伝子を組み合わせることにより、ストレス下にある細胞でスイッチオンして治療遺伝子を発現し、ストレスが解消されると速やかにオフになり遺伝子発現が低下するという、「ストレス応答性遺伝子治療」の有効性が示された。本治療コンセプトは、疾患に対する空間的・時間的な治療の効率の向上と副作用の低下に資するもので、眼の内外のあらゆる慢性疾患の治療に有用である可能性がある。

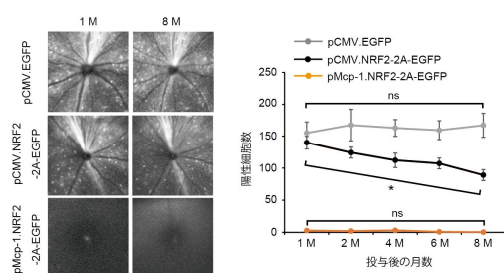


図 5 . 正常マウスを用いた長期毒性試験。  
治療用遺伝子 (NRF2 の発現を蛍光タンパク質 (EGFP) で標識し、in vivo イメージングにより経時的に観察した。対照群 (pCMV.EGFP) に比べ、CMV プロモーター (pCMV.NRF2-2A.EGFP) では細胞数の減少が見られた。Mcp-1 プロモーター (pMcp-1.NRF2-2A.EGFP) では過剰 NRF2 発現細胞は低レベルを維持(Fujita ら 2018 より改変)。

## 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 1 件)

1 . Fujita K, Nishiguchi KM, Shiga Y, Nakazawa T. "Spatially and Temporally Regulated NRF2 Gene Therapy Using Mcp-1 Promoter in Retinal Ganglion Cell Injury." Molecular Therapy Methods & Clinical Development. 2017 Jun. 16; Vol. 5: pp.130-141. doi: 10.1016/j.omtm.2017.04.003. 査読有

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 幸輔 (FUJITA, Kosuke)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 80708115