

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791277

研究課題名（和文） 新規遺伝子導入ベクター構築を用いた加齢黄斑変性の治療法開発

研究課題名（英文）

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

研究成果の概要：

難治性眼科疾患である加齢黄斑変性の新規治療法として、サル由来レンチウイルスベクターを媒体として用いた遺伝子治療の有用性を検討した。具体的には病態の主体である脈絡膜血管新生のモデル動物に対し、センダイウイルス (SeV) の高い遺伝子導入効率とレンチウイルス (SIVagm) の長期間の安定した遺伝子発現能を併せ持ったハイブリッドベクター、SeV-F/HN-pseudotyped SIVagm vector (SIVagm-F/HN) を網膜下に導入し、血管新生抑制因子である色素上皮由来因子 (Pigment epithelium-derived factor: PEDF) を高発現させることでの治療効果を検証した。コントロールに比較して有意に血管新生を抑制し、当遺伝子治療がその新規治療の一つとなる可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1700000	0	1700000
20年度	1600000	480000	2080000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	480000	3780000

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：加齢黄斑変性、遺伝子治療、レンチウイルスベクター、色素上皮由来因子

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration :AMD) は、脈絡膜新生血管 (Choroidal Neovascular Vessels :CNV) を病態の主体とする疾患であり、欧米をはじめとする先進国において成人の失明や視力低下の主原因となっている。日本でも成人中途失明の第3位、40歳以上

の0.9%の罹患率と報告され、日本全国で50万人以上の換算となる。今後高齢化社会を迎えるにあたり、そのますますの増加が懸念されている。しかしながら、罹患人口の多さからその治療法開発が盛んに行われている現状でも、満足のいく治療は確立されていない。現在の第一選択治療である光線力学療法 (Photodynamic Therapy PDT) でも、新生

血管の再疎通や視力低下、凝固後の出血等の合併症が報告され、またその効果自体も決して満足も満足のいくものではない。また近年開発されている血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) を標的とした抗血管新生薬 (抗 VEGF アプタマー、抗 VEGF モノクローナル抗体) 治療はその有効性が示唆されているものの、硝子体内投与という侵襲を繰り返す必要がある、その組織障害や感染、患者の身体的・心理的苦痛が問題となる。

そこで標的組織で薬剤を持続的に発現する有効なドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System : DDS) として遺伝子治療が注目され、2001 年に眼科領域初の遺伝子治療臨床研究がこの AMD を対象として開始された。神経保護作用と強力な血管新生抑制作用を併せ持つ色素上皮由来因子 (Pigment epithelium-derived factor: PEDF) 遺伝子を搭載したアデノウイルス (Ad) ベクターを硝子体内に投与し、眼内で PEDF を高発現させることにより、脈絡膜新生血管を退縮させる方法論である。Phase I 臨床研究では 28 人の被験者を対象とし安全性に問題はないと報告され有効な治療として期待されているが、この画期的な方法においても Ad ベクターの発現が短期間 (数日から数週間) であることが反復投与の必要性を決して免れない。

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。変性疾患は長期経過をたどることから、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 (Nakashima T : Hum Gene Ther 2000)、その小動物眼球内における遺伝子導入特性 (Gene Ther 2003 (1)) と、遺伝性網膜変性疾患に対する PEDF の神経保護作用を利用した治療効果 (Gene Ther 2003 (2)) を検討し、新しい知見を得た。それは、

1. SIV ベクターをラット網膜下に投与することにより、少なくとも 1 年間の長期間遺伝子発現が安定して可能であり、また経過観察中明確な副作用は認められなかった。

2. 網膜色素変性モデル動物に対し、SIV-PEDF 投与により組織学的・機能的両面で変性視細胞の保護効果を証明し、眼内で発現させた PEDF 蛋白がその生理活性を十分に発揮している。

これらの研究成果を土台に、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中であり、急性毒性試験を終了した現時点で眼局所、および全身の重篤な副作用は認められていない。またこれまでの長期安全性試験経過では 2 年半の長期安定した遺伝子発現も確認され、現在は網膜色素変性を対象とした臨床応用プロトコールが九大医学部内遺伝子治療臨床研究審査専門委員会にて審議段階にある。眼科領域における国内初の遺伝子治療が発信できる可能性がある。

そこで我々は上述の AMD への遺伝子治療に着目した。SIV の長期発現特性は、現行の Ad ベクターの発現期間の弱点を克服し、低侵襲かつ半永続的な治療効果の可能性を有する。また Ad-PEDF を用いた臨床試験での安全性の報告は、眼内における PEDF 蛋白過剰発現の安全性を示唆し、当該プロトコールにとって追風となる。さらに我々は、網膜色素変性に対する臨床応用を念頭に置いた前臨床試験として SIV ベクター眼内投与の安全性試験を既に開始しており、加齢黄斑変性モデル動物における治療効果が証明されれば、臨床応用まで早急かつスムーズに移行できると考えられる。

また他の発現遺伝子として、VEGF の強力な抑制作用を示す VEGF 1 型受容体 Flt-1 の splicing variant である可溶性蛋白 soluble Flt-1 (sFlt-1) を選択し、その搭載ベクターを製作段階にある。さらにベクターとして、センダイウイルス (SeV) の高い遺伝子導入効率と、レンチウイルス (SIVagm) の長期間の安定した遺伝子発現能を併せ持ったハイブリッドベクター、SeV-F/HN-pseudotyped SIVagm vector (SIVagm-F/HN) を既に開発しており、その眼内導入特性を検討すると共に、より効果的な治療ベクターとなる得る可能性を追求する。

2. 研究の目的

PEDF、および sFlt-1 各々の発現ベクター 2 種 (SIVagm-VSVG, SIVagm-F/HN) の構築と供給、そのベクターの遺伝子発現特性の検討、および AMD 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 AMD の病態に及ぼす影響を解析し、加齢黄斑変性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 sFlt-1 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. ベクターの培養系における生物活性の検討

新規ベクターの生物活性を、標的細胞である網膜色素上皮細胞 (ヒト・ARPE-19) 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. 小動物を対象とした遺伝子導入・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。

- 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

4. 脈絡膜血管新生モデル動物を対象とした遺伝子治療実験

病態の主体である CNV を生じ、広く AMD 疾患モデルとして認められているレーザー脈絡膜血管新生モデルマウス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) 眼球展開標本 (flat mount) における CNV 面積の計測
- 2) 組織切片における CNV の性状・体積、血管内皮アポトーシス

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 CNV 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できれば、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. ベクター構築

ハイブリッドベクターである SeV-F/HN-SIV ベクターを構築し、luciferase, EGFP, PEDF, sFlt1 の各種遺伝子を搭載することに成功した。

2. 培養系における生物活性

培養細胞 (ARPE-19) において、VSV-G-SIV ベクターと比較して、極短時間 (約 5 分) で導入がほぼ完了し、発現も高いことが示された。

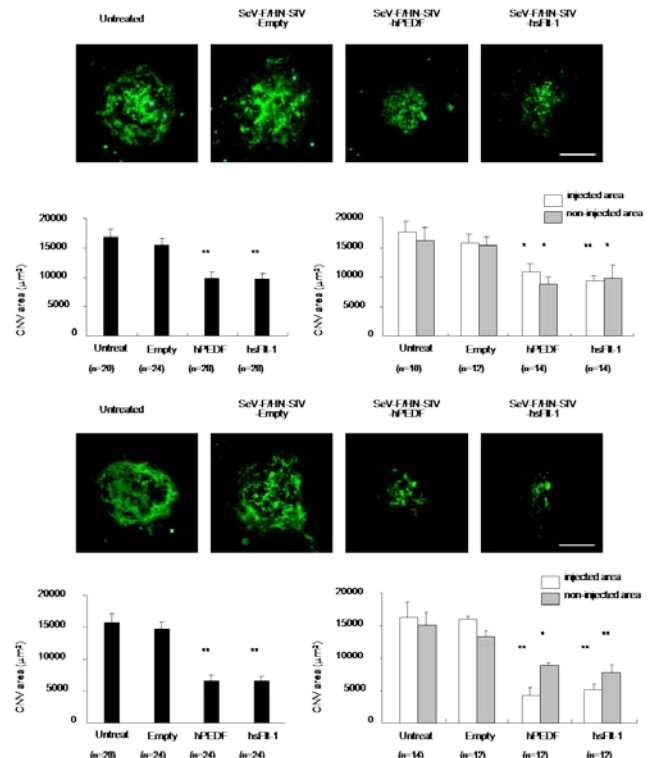
3. 小動物を対象とした遺伝子導入・発現特性

ラット網膜下投与においても、コントロールベクターと比較して、短時間 (約 5 分) で高頻度に導入されることが示された。

4. 脈絡膜血管新生モデル動物を対象とした遺伝子治療実験

レーザーによる脈絡膜血管新生モデルマウスにおいて、SeV-F/HN-SIV-hPEDF 遺伝子導入により有意に脈絡膜新生血管を抑制することが可能であった (下記参照)

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 Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Kohno R, Murakami Y, Inoue M, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T. Synergistic neuroprotective effect via simian lentiviral vector-mediated simultaneous gene transfer of human pigment epithelium-derived factor and human fibroblast growth factor-2 in rodent models of retinitis pigmentosa. *Journal of Gene Medicine* 19(12): 1273-1281, 2009年05月, 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

- ② 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
- ③ 宮崎勝徳、池田康博、吉田倫子、今木裕幸、畑 快右、石橋達朗, 網膜色素変性に合併した網膜前膜に対し硝子体手術を施行した3例, , 国内, 学会, 日本網膜硝子体学会, 一般, 講演, 京都 2008/11/29
- ④ 宮崎勝徳, 網膜中心静脈閉塞症に伴う黄斑浮腫に対する硝子体手術と抗VEGF療法との比較, , 国内, 研究会, FOC, 招待, 講演, 福岡 2008/11/10
- ⑤ M.Miyazaki, M Arima, Y Hata, T Ishibashi, An Early "Reopening" Case of Idiopathic Macular Hole; Possible Usefulness of Fundus Autofluorescence, 国際, 学会, The 1st Joint Meeting Of Korea-China-Japan Ophthalmologists, 一般, 講演, Seoul 2008/11/02
- ⑥ 宮崎勝徳、池田康博、吉田倫子、今木裕幸、畑 快右、石橋達朗, 網膜色素変性に合併した黄斑上膜に対し硝子体手術を施行した3例, , 国内, 研究会, 六大学合同眼科研究会, 一般, 講演, 福岡 2008/09/06

〔図書〕(計1件)

- ① M Miyazaki, Y Ikeda, Application of lentiviral gene therapy for retinal neuroprotection, 総説, 英語, Recent

Advances in Neurogenesis,
Neuroregeneration and Neuroprotection
/ Research Signpost

〔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: