

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592061

研究課題名 (和文) 遺伝子治療用ソフトコンタクトレンズの開発

研究課題名 (英文) A Device for Gene Transfer to the Anterior Segment of the Eye Using Anionic Hydrogel Contact Lens

研究代表者

藤巻拓郎 (Fujimaki Takuro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50333042

研究成果の概要 (和文)：

pDNA を持続的に放出する、リン酸カルシウム複合体を形成した高分子ハイドロゲルにプラスミド DNA (pDNA) を包括させたソフトコンタクトレンズ (SCL) を家兎眼に装用させることにより、角膜上皮細胞に pDNA を導入する検討を行った。リン酸基を側鎖に有する高分子ハイドロゲルを遺伝子導入用デバイスとして用いることで、pDNA を導入することが可能であったことから、非侵襲的な簡便な方法で、より臨床に近い形態での遺伝子導入が可能であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

To investigate non-viral device for gene transfer to the anterior segment of the eye using a newly developed anionic hydrogel soft contact lens (SCL). The newly developed SCL which contained imidazolium group and phosphate group in its side chains lens might be one of the efficient devices for non-viral gene transfection to corneal epithelial cells. It is suggested that this SCL could be applied for gene therapy for corneal diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,050,000	450,000	1,500,000
2010 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,250,000	1,110,000	4,360,000

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：ソフトコンタクトレンズ、プラスミド DNA、
培養ヒト角膜上皮細胞、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

眼表面疾患には外傷、感染症、自己免疫疾患、腫瘍、遺伝性疾患など様々な病態が存在し、現在その治療には点眼薬療法、手術療法が主となっている。当教室では以前より遺伝性眼疾患、眼表面疾患の研究を行なっており、近年では膠様滴状角膜ジストロフィ患者に見出された変異MIS1蛋白の角膜上皮細胞内での局在 (Murakami A et al. Jpn J Ophthalmol. 2004)、変異MIS1蛋白の細胞接着能低下 (Fujimaki T et al. ARVO ポスター 2004) を見出している。また遺伝子のプロモーター機能解析 (Fujimaki T et al. Gene 2004)、ドライアイモデル動物の作製による副交感神経と眼表面恒常性維持との関連性 (Toshida H et al. Adv Exp Med Biol 2002)、ドラッグデリバリーシステムとしてのソフトコンタクトレンズの開発 (Sato T J App Polym Sci 2005)、などの業績と知見を重ねる中、今回の申請の主眼である「遺伝子治療用ソフトコンタクトレンズ」の着想に至った。近年、コンタクトレンズは眼鏡と並ぶ屈折矯正法として広く一般化している上、眼表面保護効果を応用した治療用具として広く使用されている。我々はコンタクトレンズを薬物徐放ドラッグデリバリーシステムのデバイスとして応用する研究をスタートさせた。この研究の過程で、イオン性低含水性コンタクトレンズは薬剤と同様にDNAを高濃度に保持できる性質があることが確認でき、DNAを持続的に徐放するコンタクトレンズを、株式会社シードと共同で開発し特許を取得した (特願 2006-006129)。これまでの予備実験では、発現ベクタープラスミドDNAを取り込んだ水ゲル製コンタクトレンズに接着させた培養細胞や、レンズを装着させた動物の角膜上皮細胞内は、特別の処理なしに外来遺伝子を発現しうることを確認している (特開 2007-187897)。今回、コンタクトレンズを用いてさらに効率よく遺伝子を角膜細胞に導入する方法を研究開発し、難治性角膜疾患の遺伝子治療へと応用することを目的としている。特許を取得した遺伝子治療用ソフトコンタクトレンズは、世界的にも類のない独創的なものである。例えば膠様滴状角膜ジストロフィは、角膜上皮に重度のアミロイドが沈着し、視力低下を引き起こす常染色体劣性遺伝病であるが、これまでに原因遺伝子が *MIS1* (membrane component chromosome1 surface marker 1) 遺伝子であることが知られている。この *MIS1* 遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、遺伝子治療用ソフトコンタクトレンズに吸着させる事で、*MIS1* 遺伝子変異患者の異常角膜上皮内において、正常な *MIS1* 遺伝子を発現させ

る事も可能である。この様に難治性の眼疾患における遺伝子治療のデバイスとして実用化への期待が非常に大きい。

2. 研究の目的

pDNA を持続的に放出する、リン酸カルシウム複合体を形成した高分子水ゲルにプラスミドDNA (pDNA) を包括させたソフトコンタクトレンズ (SCL) を家兎眼に装着させることにより、角膜上皮細胞に pDNA を導入する検討を行った。

3. 研究の方法

リン酸基を側鎖に有する SCL の合成を行い、得られた SCL にカルシウムを介した pDNA を SCL へ包括 (pDNA-SCL) させた。

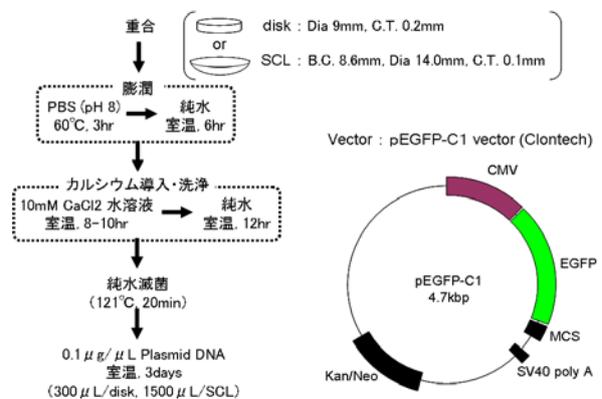
リン酸カルシウム複合SCL

被験物質名	SCL中の成分	含水率	FDA分類
SCL-P5	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{P}-\text{O}^- \\ \\ \text{O}^- \end{array}$ MOEP	50	IV
SCL-P10	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{P}-\text{O}^- \\ \\ \text{O}^- \end{array}$ MOEP	60	IV
Control-A	-NH ₂ AAm	45	I
Control-B	-OH HEMA	38	I

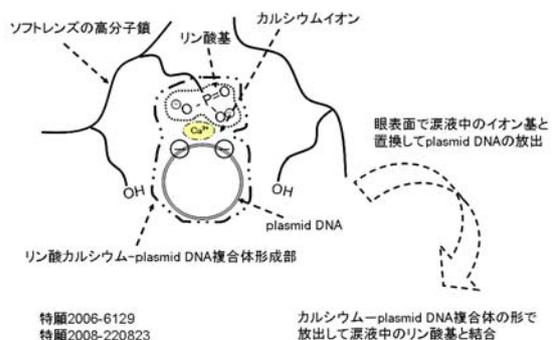
SCLの基本骨格	ポリメタクリレート
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{-(CH}_2\text{-C)-} \\ \\ \text{O=C-O-X} \end{array}$	

(HEMA: Hydroxyethyl methacrylate; MOEP: Methylacryloyloxyethyl phosphate; AAm: Acrylamide)

リン酸カルシウム複合SCL作製

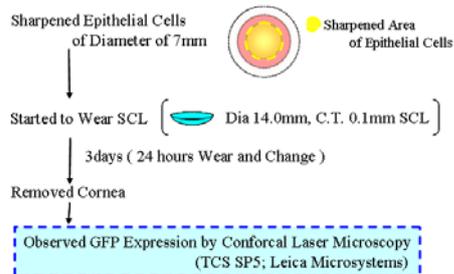


リン酸カルシウム複合SCLと plasmid DNA 結合構造モデル



プライマリーな角膜上皮細胞における pDNA の発現を確認するため、in vitro においてウサギ輪部角膜上皮細胞 (RLEC) を pDNA-SCL 上にて培養し、Green Fluorescent Protein (GFP) の発現を蛍光顕微鏡にて観察した。また、pDNA-SCL を日本白色家兔眼に装用後、眼球を摘出して作製した組織学標本の角膜上皮細胞における GFP の発現を、レーザー共焦点顕微鏡にて観察した。

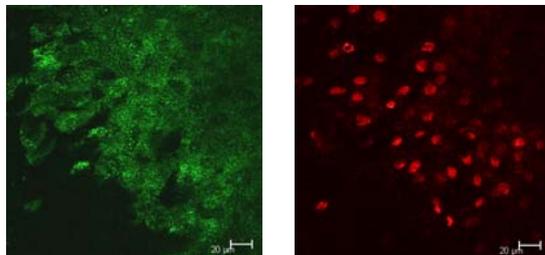
plasmid DNA Transfection and Expression of GFP in Rabbit Corneal Epithelial



4. 研究成果

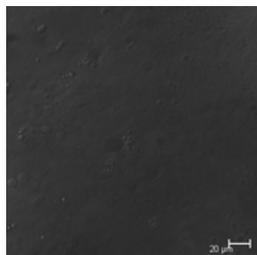
pDNA-SCL 上に培養したプライマリーな細胞においては、培養ヒト角膜上皮細胞と同様、GFP の発現が確認された。また、pDNA-SCL を装用した角膜上皮においても GFP の発現が認められ、多くは最表層ではあったが、深層部における発現も認められた。

GFP Expression Image in Corneal Epithelial

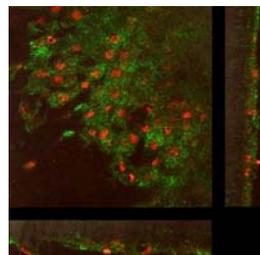


GFP

PI



Bright-Field



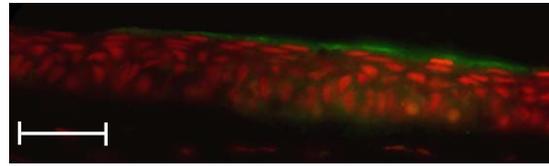
Merge

GFP Expression Image in Corneal Epithelial by Immunofluorescence

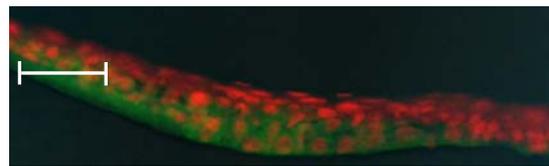
Section Thickness: 7μm (by a Cryostat)

Primary Antibodies: GFP monoclonal antibody
(GFP090R; rat IgG2a; 1:500)

Secondary Antibodies: Alexa488-conjugated goat anti-ratIgG
(1:300; Molecular Probes)



50μm



50μm



リン酸基を側鎖に有する高分子ハイドロゲルを遺伝子導入用デバイスとして用いることで、pDNA を導入することが可能であったことから、非侵襲的な簡便な方法で、より臨床に近い形態での遺伝子導入が可能であることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 3 件)

藤巻拓郎、松永 透、佐藤隆郎、村上 晶
リン酸カルシウム複合体コンタクトレンズによる培養角膜上皮細胞への遺伝子導入
日本眼科学会 平成 21 年 4 月 15 日 東京

T. Sato, Y Watanabe, T. Fujimaki, A. Murakami.
Gene Introduction to the Corneal Epithelial Cells with a Calcium Phosphate Complex Contact Lens.
Asia Pacific Academy of Ophthalmology, 2009.5.19 Bali, Indonesia

T. Matsunaga, T. Sato, Y Watanabe, T. Fujimaki, A. Murakami.
A Device for Gene Transfer to the Anterior Segment of the Eye Using Anionic Hydrogel Contact Lens. ARVO 2010, May 04, 2010, Florida, U. S. A.

〔産業財産権〕

○取得状況（計2件）

名称：「眼の遺伝子治療に用いられる
 ハイドロゲル製眼用レンズ」

発明者：佐藤隆郎、宇野憲 治、藤巻拓郎、
 村上 晶

権利者：佐藤隆郎、宇野憲 治、藤巻拓郎、
 村上 晶

種類：2H006 4C076 4C081 4C084 4C097

番号：特開 2007-187897

取得年月日：公開日 2007-07-26

国内外の別：国内、国外

名称：「遺伝子治療に用いられる
 ハイドロゲル製眼用レンズ」

発明者：佐藤隆郎、松永 透、藤巻拓郎、
 村上 晶

権利者：佐藤隆郎、松永 透、藤巻拓郎、
 村上 晶

種類：4B024 4C076 4C084 4C097

番号：特開 2008-220823

取得年月日：2008-09-25

国内外の別：国内、国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤巻 拓郎 (Fujimaki Takuro)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：50333042

(2) 研究分担者

村上 晶 (Murakami Akira)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：90157743

(2) 研究分担者

土至田 宏 (准教授)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00306901