

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791990

研究課題名(和文)硝子体手術併用による新規高効率遺伝子治療開発

研究課題名(英文)The development of new gene therapy of eye using vitrectomy

研究代表者

宮崎 勝徳(MIYAZAKI, MASANORI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40380638

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)：我々は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これまで検証してきた。今回ベクターの硝子体内投与では効率的な遺伝子導入や治療効果が得られないため、硝子体手術により眼内のゲル状組織を除去し、より効率的な遺伝子導入を目指して研究を行った。具体的にはラットやラビットを対象動物とし、硝子体切除後にベクターを眼内に投与したが、標的とする神経節細胞への導入効率は、硝子体切除の有無で有意差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We have assessed the newly developed SIV-mediated gene therapy for several animal models of eye diseases. As intra-vitreous injection of vector shows low gene transfer, we examined whether intra-vitreous injection after vitrectomy would show higher gene transfer. As a result, we could not get higher gene transfer by intra-vitreous injection after vitrectomy.

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：遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患である緑内障や網膜色素変性、および眼内血管新生をその病態とする加齢黄斑変性は失明原因の上位を占め、未だ難治である。それら難治性疾患に対し、遺伝子治療が有効な治療法として開発され、様々な疾患に対し応用が期待されている。我々は長期発現を目的としたサル由来レンチウイルス(SIV)ベクターを独自に開発し、網膜色素変性を対象として基礎研究を積み重ね、現在はヒトを対象とした治験を行っている段階である。この方法では、網膜下にベクターを投与する方法で、実験レベルではいずれも『網膜下投与』という人工的に網膜剥離を作成する非現実的な投与方法であり、人眼での治療は現実的に困難と考えられる。簡便には硝子体腔内に投与する『硝子体内投与』が最善であるが、硝子体というゲル状組織はそのベクターの伝播、遺伝子導入を著しく妨げる結果となっている。近年、このゲル状組織を除去する硝子体切除技術が飛躍的に向上し、非常に安全かつ効率的な手術と変貌を遂げている。

この硝子体手術と遺伝子治療を組み合わせることで、より効率的な遺伝子治療が可能となる可能性があると考え、この研究計画を立案した。すなわち、着実に進歩しつつある当該遺伝子治療と最先端外科手術との融合により、より効果的な、より現実的な治療としての遺伝子治療の確立を目指すものである。

## 2. 研究の目的

硝子体切除技術が飛躍的に向上し、非常に安全かつ効率的な手術と変貌を遂げている。この硝子体手術と遺伝子治療を組み合わせることで、より効率的な遺伝子治療が可能となる可能性があると考え、この研究計画を立案した。すなわち、着実に進歩しつつある当該遺伝子治療と最先端外科手術との融合により、より効果的な、より現実的な治療としての遺伝子治療の確立を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### 1. 各種導入効率評価用、および治療用遺伝子導

### 入ベクターの構築

エンベロープを改変した導入特性の異なる2種のベクター(SIVagm-VSVG, SIVagm-F/HN)の構築

### 2. ベクターの培養型における生物活性特性の検討

培養細胞における各ベクターの導入効率の検討と、導入による細胞毒性の評価

### 3. 動物を対象とした硝子体手術併用による生体内遺伝子導入・発現特性の検討

動物眼において硝子体手術を施行し、より効率的な遺伝子導入方法の開発とその生体内特性の検討

### 4. 疾患動物モデルを対象とした硝子体手術併用遺伝子治療実験

各種疾患モデル作成と、実際の治療実験とその効果の検証

具体的には下記とする。

### 1. 各種導入効率評価用、および治療用遺伝子導入ベクターの構築

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。治療用ベクターとしては、神経保護因子2種PEDFおよびFGF2、および血管新生抑制因子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6種)。

### 2. ベクターの培養型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, FGF2, 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. 動物を対象とした硝子体手術併用による生体内遺伝子導入・発現特性の検討

ウサギ、サルを対象とし、作成した各種ベクターを用いて硝子体切除併用による遺伝子導入・発現特性を検討する。

硝子体切除術後に硝子体内投与、さらに一定時間経過後に硝子体内をwash outすることで、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. 疾患動物モデルを対象とした遺伝子治療実験

【緑内障モデル】

網膜神経節細胞傷害疾患モデルとして高眼圧モデル、およびNMDA硝子体内投与モデル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方法を選択し、各種ベクターにおいて以下の検討項目を検証する。

- 1) 組織切片における残存神経節細胞の計測
- 2) 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

【加齢黄斑変性モデル】

網膜光凝固誘発加齢黄斑変性モデルを対象として、上記と同様に安定したモデル作成と治療効果を検討する。

- 1) 網膜・脈絡膜血管造影による新生血管の評価
- 2) 組織切片における新生血管、病巣の範囲を評価

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各病態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

我々は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これまで検証してきた。今回ベクターの硝子体内投与では効率的な遺伝子導入や治療効果が得られないため、硝子体手術により眼内のゲル状組織を除去し、より効率的な遺伝子導入を目指して研究を行った。具体的にはラットやラビットを対象動物とし、硝子体切除後にベクターを眼内に投与したが、標的とする神経節細胞への導入効率は、硝子体切除の有無で有意差を認めなかった。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

### 5. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 勝徳 (MIYAZAKI MASANORI)  
九州大学眼科学教室・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：