

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670756

研究課題名(和文) 緑内障モデル動物を用いた網膜神経節細胞保護遺伝子治療

研究課題名(英文) Neuroprotective gene therapy for glaucoma model animals

研究代表者

池田 康博 (Ikeda, Yasuhiro)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20380389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性高眼圧モデル動物であるDBA/2Jマウスを用いて実験した。まず、眼圧の推移を測定し、大部分の個体において眼圧が上昇していることを確認した。さらに、生後2, 4, 6, 8, 10ヶ月齢に、眼球を摘出し、眼球の組織切片の作製、網膜flat-mount標本の作製、ならびに網膜からのmRNA抽出を行った。

また、2ヶ月齢のDBA/2JマウスにSIV-hPEDFを網膜下投与し、経時的に眼球を摘出した。10ヶ月齢の時点で、上丘より逆行性に網膜神経節細胞を標識し、網膜flat-mount標本における網膜神経節細胞数をカウントした。治療効果について現在検討中であるが、概ね仮説通りの結果が得られている。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we used DBA/2J mice as a glaucoma model. First, we measured intraocular pressure (IOP) in DBA/2J mice at several time points and we checked IOP was high in almost all DBA/2J. Moreover, we performed histopathological analysis using retinal sections and flat-mount retinal specimens and functional gene expression analysis in retina, at several time points (two, 4, 6, 8, and 10 months after birth).

We also performed gene therapy study using 2-month-old DBA/2J mice. Now, we assess the therapeutic efficacy via retrograde labeling analysis of retinal ganglion cell.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 遺伝子治療 神経保護

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、我が国の40歳以上の5%以上が罹患する疾患で、中途失明原因の第1位である。緑内障における視神経障害の発生と進行において、眼圧は重要なRisk Factorであり、かつ眼圧下降は現時点において唯一の確実な治療法であるが、眼圧のコントロールが良好な症例でも視神経障害が進行する場合がある。さらに、多治見スタディによると、我が国における開放隅角緑内障の約90%は正常眼圧緑内障であり、視神経の微小循環障害や脆弱性などといった眼圧以外の因子の関与も示唆されており、新たな治療法開発が期待されている。

申請者がこれまでにやってきた主な研究テーマは、遺伝子導入という方法を用いて、神経栄養因子を眼内に発現させることにより網膜の神経細胞死を制御する治療法である。既に、網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療に関しては、前臨床試験におけるモデル動物での高い効能とサルでの高い安全性を証明し、平成25年3月より被験者への投与を開始した。今回は、この神経栄養因子を用いた遺伝子治療のコンセプトを緑内障へと応用する。

2. 研究の目的

本研究では研究期間内に、色素上皮由来因子(PEDF)を用いた緑内障に対する網膜神経節細胞保護遺伝子治療の臨床応用を実現するための基礎データを蓄積し、臨床応用を目指す。具体的には、以下の実験を実施する。

1. 緑内障モデル動物における網膜神経節細胞の細胞死とそのメカニズムの解明

2. 緑内障モデル動物における網膜神経節細胞保護遺伝子治療の治療効果の検証

3. 研究の方法

遺伝子治療という新しい治療法を臨床へと応用するためには、1)複数の疾患モデル

動物を用いた効能試験、2)複数の動物種を用いた安全性試験、3)臨床研究薬(ベクター)の調達、4)臨床研究実施計画の立案と学内倫理委員会での審議、5)厚生科学審議会での審議、という課題をクリアーする必要がある。申請者は、網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療に関して、平成24年8月に厚生労働大臣の実施承認を取得し、平成25年3月より我が国における初めての臨床応用を実現させた。緑内障への臨床応用も同様の治療戦略を用いるため、上記2)と3)は既にクリアーされている(Ikeda Y, et al. *Hum Gene Ther.* 2009., Miyazaki M, et al. *Hum Gene Ther.* 2011.)。本研究では、緑内障モデル動物での効能試験を実施し、臨床研究実施計画立案へと繋げる。

具体的には、神経栄養因子である色素上皮由来因子(PEDF)の遺伝子を搭載した国産ウイルスベクターである組換えサル免疫不全ウイルス(SIV)ベクター(SIV-PEDF)を用いて、網膜にPEDF遺伝子を導入することにより、緑内障で生じる網膜神経節細胞のアポトーシスを制御しようという試みである。既に、急性の網膜神経節細胞死を生じる虚血・再灌流モデルとNMDA硝子体内投与モデルにおいては、アポトーシスを抑制することにより網膜神経節細胞死を抑制することが明らかとなっているが(文献2) PEDFを用いた緑内障に対する網膜神経節細胞保護遺伝子治療の臨床応用を実現するための基礎データをさらに蓄積し、臨床応用を目指す。具体的には、以下の実験を実施する。

1. DBA/2J マウスにおける網膜神経節細胞死とそのメカニズム

慢性の高眼圧モデル動物であるDBA/2Jマウスを用いて実験を実施する。生後1ヶ月齢より10ヶ月齢まで1ヶ月毎に眼圧を測定し、眼圧の推移を確認する。さらに、生後2, 4, 6, 8, 10ヶ月齢の各時点での眼球を摘出し、眼球の組織切片の作製、網膜flat-mount 標本

の作製、ならびに網膜からの mRNA 抽出を行う。組織学的に網膜神経節細胞死とそれに付随する網膜内の変化を光学顕微鏡ならびに実体顕微鏡で経時的に観察するとともに、抽出した mRNA を用いて分子生物学的な解析 (real-time PCR など) を経時的に実施する。

2. DBA/2J マウスへの SIV-PEDF 網膜下投与による治療効果の検証

2 ヶ月齢の DBA/2J マウスに SIV-hPEDF (2.5×10^7 、 2.5×10^8 TU/mL) ならびにコントロール群である SIV-EGFP (2.5×10^7 TU/mL) を 2 μ L 網膜下投与する。10 ヶ月齢の時点で、以下の方法により治療群とコントロール群に対する検討を行い、治療効果を判定する。

1) 治療効果の病理組織学的検討

光学顕微鏡的な検討に加え、電子顕微鏡的手法による詳細な形態学的変化の検討を行う。治療遺伝子発現は免疫組織学的に確認する。

2) 網膜 flat-mount 標本における網膜神経節細胞数の評価

上丘内に蛍光色素を投与して逆行性に網膜神経節細胞を標識し、細胞数をカウントする。

3) 網膜 flat-mount 標本における網膜神経節細胞死の評価

TUNEL 染色を用いてアポトーシスを生じた網膜神経節細胞を同定し、細胞数をカウントする。

4) 網膜機能解析

パターン ERG 測定により、網膜神経節細胞の機能を定量し、治療効果を評価する

5) 治療効果の分子生物学的解析

眼内の神経栄養因子、増殖因子、サイトカインの変動を ELISA 法等により測定し、**神経保護効果のキーとなる因子を同定**する。

4. 研究成果

慢性の高眼圧モデル動物である DBA/2J マウスを用いて実験を実施した。まず、生後 1 ヶ月齢より 10 ヶ月齢まで、眼圧の推移を測定し、バラつきはあるものの既報のとおり大

部分の個体において眼圧が上昇していることを確認した。さらに、生後 2, 4, 6, 8, 10 ヶ月齢の各時点において、眼圧が上昇している個体より眼球を摘出し、眼球の組織切片の作製、網膜 flat-mount 標本の作製、ならびに網膜からの mRNA 抽出を行った。網膜神経節細胞死とミクログリア活性化の関連についての新たな知見が得られており、更なる検討を実施中である。

2 ヶ月齢の DBA/2J マウスに SIV-hPEDF (2.5×10^7 、 2.5×10^8 TU/mL) ならびにコントロール群である SIV-EGFP (2.5×10^7 TU/mL) を 2 μ L 網膜下投与し、経時的に眼球を摘出した。また、10 ヶ月齢の時点で、上丘より逆行性に網膜神経節細胞を標識し、網膜 flat-mount 標本における網膜神経節細胞数をカウントした。治療効果について現在検討中であるが、概ね仮説通りの結果が得られている。また、眼内の神経栄養因子、増殖因子、サイトカインの変動などを含めた治療効果の分子生物学的な解析を並行して実施している。

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)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

池田 康博 (Yasuhiro Ikeda)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：20380389

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし