

20101504/A

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術実用化総合研究事業

網膜色素変性に対する  
視細胞保護遺伝子治療臨床研究に関する研究

平成 22 年度 総括研究報告書

主任研究者 石橋 達朗

平成 23 (2011) 年 5 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療臨床研究に関する研究 -----	1
石橋達朗	

## II. 分担研究報告

1. 遺伝子治療臨床研究への準備に関する研究 -----	6
石橋達朗	
2. サル長期安全性試験の最終評価に関する研究 -----	9
池田康博	
3. hPEDF の持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明に関する研究 -----	12
米満吉和	

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 16

# I . 總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
総括研究報告書

網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療臨床研究

研究代表者 石橋 達朗  
九州大学大学院医学研究院 眼科学 教授

**研究要旨** 本研究では、網膜色素変性（retinitis pigmentosa: RP）に対する視細胞保護遺伝子治療に関連したこれまでの効能試験ならびに安全性試験の結果を臨床研究へとスムーズに移行することを目的として、1. 遺伝子治療臨床研究への準備（治療用ベクターのGMP生産と厚生科学審議会での実施計画の審議）、2. サルを用いた長期安全性試験の最終評価、3. ヒト色素上皮由来因子（human pigment epithelium -derived factor: hPEDF）の持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明、という3つのテーマで研究を行った。本年度得られた成果は、①治療用ベクターの入手、②厚生科学審議会での審査開始、③治療遺伝子の長期発現の確認、④カニクイザルにおける長期安全性の確認、⑤RPにおけるゲノム酸化損傷の病態への関与、である。

**研究分担者**

池田康博（九州大学病院 眼科 助教）  
米満吉和（九州大学大学院薬学研究院 革新的  
バイオ医薬創成学 客員教授）

**A. 研究目的**

我が国は高齢者社会に突入し、感覚器機能異常の是正や機能補完技術の開発は、国策としても重要な位置を占める。我々は、このような時代の到来を先取りし、平成13年度より医薬品医療機器総合機構メディカルフロンティア研究として、網膜変性疾患に対する遺伝子治療技術開発を進めてきた（MF-21）。この研究成果をもとに、RPに対する遺伝子治療臨床研究実施計画書を九州大学医学研究院等倫理委員会へ提出し、平成20年10月3日に正式承認を受けた。現在、厚生科学審議会への実施申請を終え、審議が進められている。

本研究では、臨床研究へのスムーズな移行を目的とし、以下の研究を行う。

1. 遺伝子治療臨床研究への準備：治療用ベクター（SIV-hPEDF）のGMP生産と厚生科学審議会での実施計画の審議
2. サルを用いた長期安全性試験の最終評価
3. hPEDFの持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明

**B. 研究方法**

1-1. Vector Gene Technology (VGTC) 社（中華人民共和国・北京市）において、まずマスターセルバンクを作製し、good manufacturing practice (GMP) 生産ラインによるテストランを実施する。本年度後半から、治療用ベクターの実生産を行う。

1-2. 平成20年10月3日に学内倫理委員会にて承認を受けた実施計画を厚生科学審議会に提

出する。

2. カニクイザルの片眼に、ガラスシリンジを用いて hPEDF を搭載したサル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus: SIV) ベクター (SIV-hPEDF) を経硝子体的に網膜下投与した。術後、定期的に採血・採尿・バイタルサインを記録した。また、眼科的検査として細隙灯検査・眼底検査・蛍光眼底造影検査・網膜電図の記録を定期的に行った。術後約5年間の経過観察を終了後、それぞれの個体を病理解剖し、主要臓器から組織等を採取した。検討項目は以下のとおりである。①遺伝子発現の確認、②全身状態の評価 (バイタルサイン、血液検査、尿検査、行動観察、など)、③剖検、④主要臓器の病理組織学的評価 (発癌性の有無)、⑤主要臓器へのベクター撒布状況調査、⑥眼圧、⑦眼底検査、⑧網膜機能評価 (網膜電図)、⑨網膜の病理組織学的評価

3-1. RP モデル動物である rd10 マウスならびに RCS ラットを用いて検討した。生後 21 日目の rd10 マウス、ならびに生後 28 日目の RCS ラットより眼球を摘出し、4%パラホルムにて固定後、パラフィン包埋した。ゲノム酸化損傷のマーカーとなる 8-OH-dG に対する免疫組織化学的染色を行った。さらに、rd10 マウスにおいては、その下流で活性化されるシグナルである single strand DNA (ssDNA)、poly (ADP-ribose) (PAR)、apoptosis-inducing factor (AIF) に対する免疫組織化学的染色を行った。同様に摘出した眼球より網膜を採取し、ウエスタンブロット法にて PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) の活性化の有無を検討した。また、PARP 阻害剤である DPQ を生後 19 日目から 25 日目まで rd10 マウスに腹腔内投与し、生後 26 日目に摘出した網膜の視細胞数を PBS 投与群と比較した。

3-2. ゲノム酸化損傷修復遺伝子である Mut T

homolog-1 (MTH1) トランスジェニックマウスと rd10 マウスを交配し、rd10+/+:MTH1+/+マウスにおける網膜の病理組織学的検討を行った。

3-3. 対象は、九州大学病院で黄斑上膜に対して硝子体手術を施行した定型 RP 患者 7 例 7 眼 (男性 3 例、女性 4 例)、ならびに特発性黄斑前膜患者 13 例 13 眼 (男性 6 例、女性 7 例)。硝子体液は、径毛様体扁平部硝子体手術のポート作製後に無灌流で採取した。採取した硝子体液は凍結保存し、ELISA 法にて 8-OH-dG 濃度を測定した。

#### (倫理面への配慮)

本臨床研究の実施計画は、厚生労働省・文部科学省の遺伝子治療ガイドライン他、以下の指針・法律等に基づいて立案されており、「臨床研究実施計画書」ならびに「患者説明・同意書」の倫理性等については、九州大学医学研究院等倫理委員会および同遺伝子治療臨床研究審査専門委員会にて十分に議論され、平成 20 年 10 月 3 日に最終承認を受けた。

- 1) 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(文部科学省/厚生労働省 告示第二号、平成 16 年 12 月 28 日)
- 2) 「臨床研究に関する倫理指針」(厚生労働省告示第四百五十九号、平成 16 年 12 月 28 日)
- 3) 「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」(薬食発第 0219011 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成 16 年 2 月 19 日)
- 4) 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」(薬発第 1062 号、各都道府県知事あて厚生省薬務局長通知、平成 7 年 11 月 15 日)
- 5) 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について」(医薬発第

329004号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬局長通知、平成14年3月29日)

6)「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号)。

動物実験に関しては、眼科領域の動物使用に関するARVO(The Association for Research in Vision and Ophthalmology)の声明、ならびに日本霊長類学会の定めたサル類を用いる実験遂行のための基本原則を遵守し、所属研究機関による承認を得た動物実験プロトコールに従った。また、臨床サンプルの使用に関しては、ヘルシンキ宣言を遵守し、臨床研究を行った。十分な説明を行った後にインフォームドコンセントを得、個人情報の機密保持を厳守する。学内の倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

### 1. 遺伝子治療臨床研究への準備

治療用ベクターの最終産物は本年度内に生産を完了し、九州大学病院 外来棟 北3階・分子細胞調製センター(MCPC)に設置するディープフリーザーにて保管・管理されている。最終生産物がGMP基準に合致することを確認する品質検定試験は、平成23年度に実施する予定となっている。

また、臨床研究実施計画書を平成22年10月23日に厚生科学審議会へ提出し、第61回厚生科学審議会にて、作業委員会において個別に審議を行うことが決定した。平成23年3月29日に開催予定であった第1回網膜色素変性遺伝子治療臨床研究作業委員会は震災の影響により延期となったが、現在は、作業委員会からの内容照会に対応している。

### 2. サルを用いた長期安全性試験の最終評価

①経時的に採取した前房水中のhPEDF濃度をELISA法を用いて測定した。剖検時に採取した術後約5年が経過したサンプルにおいて、低濃度群( $2.5 \times 10^7$  TU/ml)では100 ng/ml前後、高濃度群( $2.5 \times 10^8$  TU/ml)では1000 ng/ml程度のhPEDFが検出された。

また、EGFP(enhanced green fluorescent protein)を搭載したSIVベクターを投与した個体では、5年以上の安定した遺伝子発現が確認された。

②一般健康観察及び臨床所見において、全頭著しい異常は認められなかったが、期間中に下痢・脱毛・体重減少・軽度の低体温及びBUN上昇が観察された個体が1頭認められた。しかしながら、この個体の食欲、活動性、血液性状等他の観察・検査・測定値に異常は見られず、その後上記の症状は全て完全に回復した。原因は不明であるが一時的な体調低下もしくはストレスによるものと考えられ、ベクターの投与との関連性は低いと考えられた。

③④病理学的及び病理組織学的検索の結果、主要臓器に明らかな変化を認めず、悪性新生物も認められなかった。

⑤Real-time PCR法を用いて、主要臓器から抽出したゲノムDNA中のベクターゲノムの検索を行い、すべての臓器において検出感度以下であった。

⑥著しい眼圧上昇を認めた個体はなかった。

⑦網膜への刺入部位に一致した網膜の瘢痕化は認めたものの、その他の合併症は認められなかった。

⑧全視野網膜電図(full-field ERG)では、明らかな異常を認めなかった。多局所網膜電図(multi-focal ERG)では、ベクター投与部位の大きな電位の低下は観察されな

った。

⑨網膜下投与を施行した眼球全てにおいて、投与部位付近の網膜色素上皮細胞に極めて軽度の色素ムラが認められた。高濃度群においては、視細胞層への少数のマクロファージ浸潤が限局的に認められたが、基本的な網膜構造は十分維持されていた。

3. hPEDFの持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明

①rd10 マウスならびに RCS ラットにおいて、視細胞の核にゲノム酸化損傷のマーカーである 8-OH-dG の蓄積を認めた。さらに、ゲノム酸化損傷によって生じる下流のシグナルとして、ssDNA ならびに PAR の増加が rd10 マウスにおいて確認された。また、ウエスタンブロット法にて PARP の活性化も確認された。

②PARP 阻害剤である DPQ の投与により、rd10 マウスの視細胞数減少が抑制されることも確認された。

③rd10+/+:MTH1-/-マウス (野生型)、rd10+/+:MTH1+/-マウス (ヘテロ)、rd10+/+:MTH1+/+マウス (ホモ) について、それぞれ生後 26 日目の視細胞数をカウントし、rd10+/+:MTH1+/+マウスで有意に視細胞死が抑制されていることがわかった。さらに、rd10+/+:MTH1+/+マウスでは、視細胞におけるゲノム酸化損傷の蓄積が減少しており、ssDNA ならびに PAR も減少していることが確認された。また、AIF のミトコンドリアからの放出も減少しており、TUNEL 染色陽性細胞も減少していた。

④黄斑上膜を合併した RP 患者の硝子体液中の 8-OH-dG 濃度は、 $0.75 \pm 0.06$  ng/ml で、特発性黄斑前膜患者の  $0.15 \pm 0.03$  ng/ml に比較して有意に濃度が高い ( $p < 0.0003$ ) ことがわかった。

## D. 考察

### 1. 遺伝子治療臨床研究への準備

治療用ベクターの入手ならびに厚生科学審議会での審議が順調に進められている。

### 2. サルを用いた長期安全性試験の最終評価

SIV ベクターの網膜下投与により、発癌性は認められず、全身へのベクター撒布の危険性も低いことがわかった。また、遺伝子発現は安定しており、眼局所への影響は軽微であることが確認された。

### 3. hPEDFの持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明

ゲノム酸化損傷が中枢神経系の神経変性疾患であるパーキンソン病やアルツハイマー病でも病態に関与していることが報告されており、同様に RP においてもゲノム酸化損傷が AIF のミトコンドリアからの放出を制御することで病態に関与していることが示唆された。また、ゲノム酸化損傷をコントロールすることにより、その後生じる下流のシグナルを抑制することで、視細胞死を抑制できることが示された。特に、PARP の活性を阻害するは治療のターゲットになる可能性があると考えられた。

## E. 結論

臨床研究実施に向けて、治療用ベクターの入手ならびに厚生科学審議会での審議が順調に進められている。早期の実施承認を目指し、平成 23 年度も本研究を推進する。

カニクイザルを用いた長期安全性試験により、全身ならびに眼局所への影響は大きくないことが明らかとなったことは、臨床応用への移行を支持する結果であった。平成 23 年度は、評価が完了していない項目 (ベクターに対する宿主の免疫学的反応の検討等) について、引き続き評価を進める。

さらに、hPEDF の持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明が進めば、さらに臨床研究推進を支持する結果となる可能性が高いと予想される。従って、平成 23 年度は、hPEDF がゲノム酸化損傷の制御にどのように関与しているかを検証する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Inoue M, Hasegawa M, Sueishi K, Ishibashi T. Inhibition of choroidal

neovascularization via brief subretinal exposure to a newly developed lentiviral vector pseudotyped with Sendai virus envelope proteins. Hum Gene Ther 21: 199-209, 2010

2. Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Murakami Y, Yoshida N, Tabata T, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T. PEDF gene therapy targeting retinal ganglion cell injuries: neuroprotection against loss of function in two animal models. Hum Gene Ther 22: 559-565, 2011

3. 池田康博、石橋達朗：網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療 福岡医学雑誌 101: 183-189, 2010

### 2. 学会発表

1. Ikeda Y, et al. Oxidative DNA Damage Plays

a Key Role in the Process of Photoreceptor Death in Inherited Retinal Degeneration.

2011 Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, USA) 2011

2. 石橋達朗：網膜の包括的神経保護～臨床応用への挑戦～（特別講演） 第 115 回日本眼科学会総会（東京） 2011

3. 池田康博：網膜色素変性の遺伝子治療 第 54 回専門医制度講習会（東京） 2011

4. 池田康博、他：網膜色素変性の視細胞死におけるゲノム酸化損傷の関与 第 115 回日本眼科学会総会（東京） 2011

5. 吉田倫子、他：網膜色素変性における慢性炎症の病態への関与 第 115 回日本眼科学会総会（東京） 2011

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. SIV-PEDF ベクターを用いた眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬

発明者：米満吉和、宮崎勝徳、池田康博、他（計 8 名）

2. PEDF および FGF2 を含む眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬

発明者：米満吉和、宮崎勝徳、池田康博、他（計 8 名）

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## II . 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

遺伝子治療臨床研究への準備

分担研究者 石橋 達朗  
九州大学大学院医学研究院 眼科学 教授

**研究要旨** 本臨床研究で使用するサル免疫不全ウイルス（simian immunodeficiency virus: SIV）ベクターは、米国 FDA の基準に合致した good manufacturing practice（GMP）基準に従って生産されたものを使用するため、本研究では、治療用ベクター（SIV-hPEDF）の GMP 生産ならびに品質検定を行う必要がある。さらに、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（文部科学省／厚生労働省 告示第二号、平成 16 年 12 月 28 日）に基づき、厚生科学審議会へ実施申請し、承認を受ける必要がある。本研究では、その準備と対応を行う。治療用ベクターは既に納品されており、来年度に終生産物が GMP 基準に合致することを確認する品質検定試験を実施する予定となっている。また、厚生科学審議会への実施申請は完了しており、審議が順調に進んでいる。

**A. 研究目的**

臨床研究で使用するサル免疫不全ウイルス SIV ベクターは、米国 FDA の基準に合致した GMP 基準に従って生産されたものを使用するが、本ベクターの GMP 製造技術については、精製法を含めて既に確立しており、SOP（標準業務手順書）も完成している。

本研究では、治療用ベクター（SIV-hPEDF）の GMP 生産ならびに品質検定を行う。さらに、厚生科学審議会での実施計画の審議を受けるための準備と対応を行う。

**B. 研究方法**

1. Vector Gene Technology（VGTC）社（中華人民共和国・北京市）において、まずマスターセルバンクを作製し、GMP 生産ラインによるテストランを実施する。本年度後半から、治療用ベクターの実生産を行う。

2. 平成 20 年 10 月 3 日に学内倫理委員会にて承認を受けた実施計画を厚生科学審議会に提出する。

（倫理面への配慮）

本臨床研究の実実施計画は、厚生労働省・文部科学省の遺伝子治療ガイドライン他、以下の指針・法律等に基づいて立案されており、「臨床研究実施計画書」ならびに「患者説明・同意書」の倫理性等については、九州大学医学研究院等倫理委員会および同遺伝子治療臨床研究審査専門委員会にて十分に議論され、平成 20 年 10 月 3 日に最終承認を受けた。

1) 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（文部科学省／厚生労働省 告示第二号、平成 16 年 12 月 28 日）

2) 「臨床研究に関する倫理指針」（厚生労働省告示第四百五十九号、平成 16 年 12 月 28 日）

3) 「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬

品等の製造における拡散防止措置等について」  
(薬食発第 0219011 号、各都道府県知事あて  
厚生労働省医薬食品局長通知、平成 16 年 2 月  
19 日)

4) 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の  
確保に関する指針について」(薬発第 1062 号、  
各都道府県知事あて厚生省薬務局長通知、平  
成 7 年 11 月 15 日)

5) 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の  
確保に関する指針の改正について」(医薬発第  
329004 号、各都道府県知事あて厚生労働省医  
薬局長通知、平成 14 年 3 月 29 日)

6) 「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制に  
よる生物多様性の確保に関する法律」(平成 15  
年法律第 97 号)。

## C. 研究結果

1. 最終産物は本年度内に生産を完了し、九州  
大学病院 外来棟 北 3 階・分子細胞調製セン  
ター (MCPC) に設置するディープフリーザーに  
て保管・管理されている。最終生産物が GMP 基  
準に合致することを確認する品質検定試験は、  
平成 23 年度に実施する予定となっている。

2. 臨床研究実施計画書を平成 22 年 10 月 23  
日に厚生科学審議会へ提出し、第 61 回厚生  
科学審議会にて、作業委員会において個別  
に審議を行うことが決定した。平成 23 年 3  
月 29 日に開催予定であった第 1 回網膜色素  
変性遺伝子治療臨床研究作業委員会は震災  
の影響により延期となったが、現在は、作  
業委員会からの内容照会に対応している。

## D, E. 考察、結論

臨床研究実施に向けて、治療用ベクターの入  
手ならびに厚生科学審議会での審議が順調に進  
められている。早期の実施承認を目指し、平成

23 年度も本研究を推進する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki  
M, Inoue M, Hasegawa M, Sueishi K, Ishibashi  
T. Inhibition of choroidal  
neovascularization via brief subretinal  
exposure to a newly developed lentiviral  
vector pseudotyped with Sendai virus  
envelope proteins. Hum Gene Ther 21: 199-209,  
2010

2. 池田康博、石橋達朗：網膜色素変性に対す  
る視細胞保護遺伝子治療 福岡医学雑誌 101:  
183-189, 2010

### 2. 学会発表

1. 石橋達朗：網膜の包括的神経保護ー臨床応  
用への挑戦ー (特別講演) 第 115 回日本眼科  
学会総会 (東京) 2011

2. 池田康博：網膜色素変性の遺伝子治療 第  
54 回専門医制度講習会 (東京) 2011

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. SIV-PEDF ベクターを用いた眼組織細胞に  
おけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療  
薬

発明者：米満吉和、宮崎勝徳、池田康博、他  
(計 8 名)

2. PEDF および FGF2 を含む眼組織細胞にお  
けるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬

発明者：米満吉和、宮崎勝徳、池田康博、他 (計  
8 名)

**2. 実用新案登録**

なし

**3. その他**

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

サル長期安全性試験の最終評価

分担研究者 池田 康博  
九州大学病院 眼科 助教

**研究要旨** これまでに我々は、網膜色素変性（retinitis pigmentosa: RP）に対する視細胞保護遺伝子治療の可能性と臨床応用へ向けた研究を継続してきた。ベクター投与の安全性を確認するために、臨床研究で使用するヒト色素上皮由来因子（human pigment epithelium-derived factor: hPEDF）を搭載したサル免疫不全ウイルス（simian immunodeficiency virus: SIV）ベクターをカニクイザルに網膜下投与し、その全身への影響ならびに眼局所での反応を長期間観察した。本年度は、これらの個体から採取されたサンプルを用いた解析を行い、安全性の最終的な評価を行う。現時点で得られた結果から、遺伝子は約5年間安定して発現していることが確認され、さらに重篤な副作用を示唆する所見は得られていない。

**A. 研究目的**

本研究では、RPに対する視細胞保護遺伝子治療をスムーズに臨床応用することを最終的な目的としているが、その際にベクター投与の安全性評価は必須の検討項目であると考えられる。

平成17年より継続していたカニクイザルを用いた長期安全性試験については、約5年間の観察期間を平成21年度内に終了し、それぞれの個体の病理解剖を行った。本年度は、これらの個体から採取されたサンプルを用いた解析を行い、安全性の最終的な評価を行う。具体的には、眼球ならびに主要臓器の病理組織学的評価、ベクターの全身散布の有無（各臓器におけるベクターシーケンスの有無）の確認、ベクターに対する宿主の免疫学的反応の検討、経時的血液サンプルの解析、などである。

**B. 研究方法**

カニクイザルの片眼に、ガラスシリンジを用いてhPEDFを搭載したSIVベクター（SIV-hPEDF）を経硝子体的に網膜下投与した。術後、定期的に採血・採尿・バイタルサインを記録した。また、眼科的検査として細隙灯検査・眼底検査・蛍光眼底造影検査・網膜電図の記録を定期的に行った。術後約5年間の経過観察を終了後、それぞれの個体を病理解剖し、主要臓器から組織等を採取した。検討項目は以下のとおりである。

1. 遺伝子発現の確認、
2. 全身状態の評価（バイタルサイン、血液検査、尿検査、行動観察、など）、
3. 剖検、
4. 主要臓器の病理組織学的評価（発癌性の有無）、
5. 主要臓器へのベクター散布状況調査、
6. 眼圧、
7. 眼底検査、
8. 網膜機能評価（網膜電図）、
9. 網膜の病理組織学的評価

## (倫理面への配慮)

動物実験に関しては、眼科領域の動物使用に関する ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) の声明、ならびに日本霊長類学会の定めたサル類を用いる実験遂行のための基本原則を遵守し、所属研究機関による承認を得た動物実験プロトコールに従った。

## C. 研究結果

1. 経時的に採取した前房水中の hPEDF 濃度を ELISA 法を用いて測定した。剖検時に採取した術後約 5 年が経過したサンプルにおいて、低濃度群 ( $2.5 \times 10^7$  TU/ml) では 100 ng/ml 前後、高濃度群 ( $2.5 \times 10^8$  TU/ml) では 1000 ng/ml 程度の hPEDF が検出された。

また、EGFP (enhanced green fluorescent protein) を搭載した SIV ベクターを投与した個体では、5 年以上の安定した遺伝子発現が確認された。

2. 一般健康観察及び臨床所見において、全頭著しい異常は認められなかったが、期間中に下痢・脱毛・体重減少・軽度の低体温及び BUN 上昇が観察された個体が 1 頭認められた。しかしながら、この個体の食欲、活動性、血液性状等他の観察・検査・測定値に異常は見られず、その後上記の症状は全て完全に回復した。原因は不明であるが一時的な体調低下もしくはストレスによるものと考えられ、ベクターの投与との関連性は低いと考えられた。

3, 4. 病理学的及び病理組織学的検索の結果、主要臓器に明らかな変化を認めず、悪性新生物も認められなかった。

5. Real-time PCR 法を用いて、主要臓器から抽出したゲノム DNA 中のベクターゲノムの検索を行い、すべての臓器において検出

感度以下であった。

6. 著しい眼圧上昇を認めた個体はなかった。

7. 網膜への刺入部位に一致した網膜の瘢痕化は認めたものの、その他の合併症は認められなかった。

8. 全視野網膜電図 (full-field ERG) では、明らかな異常を認めなかった。多局所網膜電図 (multi-focal ERG) では、ベクター投与部位の大きな電位の低下は観察されなかった。

9. 網膜下投与を施行した眼球全てにおいて、投与部位付近の網膜色素上皮細胞に極めて軽度の色素ムラが認められた。高濃度群においては、視細胞層への少数のマクロファージ浸潤が限局的に認められたが、基本的な網膜構造は十分維持されていた。

## D. 考察

SIV ベクターの網膜下投与により、発癌性は認められず、全身へのベクター撒布の危険性も低いことがわかった。また、遺伝子発現は安定しており、眼局所への影響は軽微であることが確認された。

## E. 結論

SIV ベクターの網膜下投与により、少なくとも 5 年間の安定した遺伝子発現が得られるとともに、全身ならびに眼局所への影響は大きくないことが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 池田康博、石橋達朗：網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療 福岡医学雑誌 101: 183-189, 2010

## 2. 学会発表

1. 石橋達朗：網膜の包括的神経保護ー臨床応用への挑戦ー（特別講演） 第115回日本眼科学会総会（東京） 2011

2. 池田康博：網膜色素変性の遺伝子治療 第54回専門医制度講習会（東京） 2011

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. SIV-PEDF ベクターを用いた眼組織細胞に

おけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬

発明者：米満吉和、宮崎勝徳、池田康博、他（計8名）

2. PEDF および FGF2 を含む眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬  
発明者：米満吉和、宮崎勝徳、池田康博、他（計8名）

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

hPEDF の持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明

分担研究者 米満 吉和

九州大学大学院薬学研究院 革新的バイオ医薬創成学 客員教授

**研究要旨** 網膜色素変性 (retinitis pigmentosa: RP) の視細胞死 (アポトーシス) において、アポトーシス誘導因子 (apoptosis-inducing factor: AIF) のミトコンドリアからの放出、核内への移行が重要な過程であるが、色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor: PEDF) はミトコンドリア膜の安定化により、AIF放出を抑制することがわかっている。本年度は、AIFのミトコンドリアからの放出を制御する上流の因子として、ゲノム酸化損傷に注目した研究を行った。複数のRPモデル動物において、視細胞の核にゲノム酸化損傷のマーカである8-OH-dGが蓄積していることを明らかとした。さらに、ゲノム酸化損傷が抑制された遺伝子改変マウスを用いることで、8-OH-dGの蓄積が減少し、視細胞死が抑制されることを明らかとした。

#### A. 研究目的

網膜色素変性 (RP) における視細胞死の制御にアポトーシス誘導因子 (AIF) のミトコンドリアからの放出が重要であり、色素上皮由来因子 (PEDF) はミトコンドリア膜の安定化により、AIF 放出を抑制することがわかっている

(Murakami Y, Ishibashi T, et al. *Am J Pathol.* 2008)。本年度は、AIF のミトコンドリアからの放出を制御する上流の因子として、ゲノム酸化損傷とその修復遺伝子に注目し、RP における視細胞死への関与について検討した。

#### B. 研究方法

1. RP モデル動物である rd10 マウスならびに RCS ラットを用いて検討した。生後 21 日目の rd10 マウス、ならびに生後 28 日目の RCS ラットより眼球を摘出し、4%パラホルムにて固定後、パラフィン包埋した。ゲノム酸化損傷のマーカ

ーとなる 8-OH-dG に対する免疫組織化学的染色を行った。さらに、rd10 マウスにおいては、その下流で活性化されるシグナルである single strand DNA (ssDNA)、poly(ADP-ribose) (PAR)、AIF に対する免疫組織化学的染色を行った。同様に摘出した眼球より網膜を採取し、ウエスタンブロット法にて PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) の活性化の有無を検討した。また、PARP 阻害剤である DPQ を生後 19 日目から 25 日目まで rd10 マウスに腹腔内投与し、生後 26 日目に摘出した網膜の視細胞数を PBS 投与群と比較した。

2. ゲノム酸化損傷修復遺伝子である Mut T homolog-1 (MTH1) トランスジェニックマウスと rd10 マウスを交配し、rd10<sup>+/+</sup>:MTH1<sup>+/+</sup>マウスにおける網膜の病理組織学的検討を行った。

3. 対象は、九州大学病院で黄斑上膜に対して硝子体手術を施行した定型 RP 患者 7 例 7 眼 (男



性 3 例、女性 4 例)、ならびに特発性黄斑前膜患者 13 例 13 眼 (男性 6 例、女性 7 例)。硝子体液は、径毛様体扁平部硝子体手術のポート作製後に無灌流で採取した。採取した硝子体液は凍結保存し、ELISA 法にて 8-OH-dG 濃度を測定した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験に関しては、眼科領域の動物使用に関する ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) の声明を遵守し、所属研究機関による承認を得た動物実験プロトコルに従った。また、臨床サンプルの使用に関しては、ヘルシンキ宣言を遵守し、臨床研究を行った。十分な説明を行った後にインフォームドコンセントを得、個人情報の機密保持を厳守する。学内の倫理委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

1. rd10 マウスならびに RCS ラットにおいて、視細胞の核にゲノム酸化損傷のマーカである 8-OH-dG の蓄積を認めた。さらに、ゲノム酸化損傷によって生じる下流のシグナルとして、ssDNA ならびに PAR の増加が rd10 マウスにおいて確認された。また、ウェスタンブロット法にて PARP の活性化も確認された。

PARP 阻害剤である DPQ の投与により、rd10 マウスの視細胞数減少が抑制されることも確認された。

2. rd10<sup>+/+</sup>:MTH1<sup>-/-</sup>マウス (野生型)、rd10<sup>+/+</sup>:MTH1<sup>+/-</sup>マウス (ヘテロ)、rd10<sup>+/+</sup>:MTH1<sup>+/+</sup>マウス (ホモ) について、それぞれ生後 26 日目の視細胞数をカウントし、rd10<sup>+/+</sup>:MTH1<sup>+/+</sup>マウスで有意に視細胞死が抑制されていることがわかった。さらに、rd10<sup>+/+</sup>:MTH1<sup>+/+</sup>マウスでは、視細胞におけるゲノム酸化損傷の蓄積が減少しており、ssDNA ならびに PAR も減少していることが確認された。

また、AIF のミトコンドリアからの放出も減少しており、TUNEL 染色陽性細胞も減少していた。

3. 黄斑上膜を合併した RP 患者の硝子体液中の 8-OH-dG 濃度は、 $0.75 \pm 0.06$  ng/ml で、特発性黄斑前膜患者の  $0.15 \pm 0.03$  ng/ml に比較して有意に濃度が高い ( $p < 0.0003$ ) ことがわかった。

### D. 考察

ゲノム酸化損傷が中枢神経系の神経変性疾患であるパーキンソン病やアルツハイマー病でも病態に関与していることが報告されており、同様に RP においてもゲノム酸化損傷が AIF のミトコンドリアからの放出を制御することで病態に関与していることが示唆された。また、ゲノム酸化損傷をコントロールすることにより、その後生じる下流のシグナルを抑制することで、視細胞死を抑制できることが示された。特に、PARP の活性を阻害するは治療のターゲットになる可能性があると考えられた。

### E. 結論

RP における視細胞死にゲノム酸化損傷が関与している可能性が示唆された。ゲノム酸化損傷をコントロールすることが RP の新しい治療のターゲットとなる可能性があることが示唆された。平成 23 年度は、hPEDF がゲノム酸化損傷の制御にどのように関与しているかを検証する予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y,

Murakami Y, Yoshida N, Tabata T, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T. PEDF gene therapy targeting retinal ganglion cell injuries: neuroprotection against loss of function in two animal models. Hum Gene Ther. 22: 559-565, 2011

## 2. 学会発表

1. Ikeda Y, et al. Oxidative DNA Damage Plays a Key Role in the Process of Photoreceptor Death in Inherited Retinal Degeneration. 2011 Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, USA) 2011

2. 池田康博、他：網膜色素変性の視細胞死におけるゲノム酸化損傷の関与 第115回日本眼科学会総会（東京） 2011

3. 吉田倫子、他：網膜色素変性における慢性炎症の病態への関与 第115回日本眼科学会総会（東京） 2011

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. SIV-PEDF ベクターを用いた眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬

発明者：米満吉和、宮崎勝徳、池田康博、他（計8名）

2. PEDF および FGF2 を含む眼組織細胞におけるアポトーシス変性を伴う疾患の治療薬

発明者：米満吉和、宮崎勝徳、池田康博、他（計8名）

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### III . 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Inoue M, Hasegawa M, Sueishi K, Ishibashi T.	Inhibition of choroidal neovascularization via brief subretinal exposure to a newly developed lentiviral vector pseudotyped with Sendai virus envelope proteins.	Human Gene Therapy	21	199-209	2010
Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Murakami Y, Yoshida N, Tabata T, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T.	PEDF gene therapy targeting retinal ganglion cell injuries: neuroprotection against loss of function in two animal models.	Human Gene Therapy	22	559-565	2011
池田康博、石橋達朗	網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療	福岡医学雑誌	101	183-189	2010