

総 説

網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療

1)九州大学病院 眼科

2)九州大学大学院医学研究院 眼科学分野

池田康博¹⁾, 石橋達朗¹⁾²⁾

はじめに

我々が取得する外界情報の約80%を得るために必要な視覚を失うこと、すなわち失明は、患者のQOLを著しく低下させ、社会活動を大幅に制限させる。世界の中途失明原因の上位を占める疾患のうち、白内障や緑内障は、手術療法の進歩や点眼薬などの充実により、治療することができる疾患である。一方、我々が遺伝子治療の対象疾患として選択した網膜色素変性 (retinitis pigmentosa : RP) は、現時点で有効な治療法が確立されておらず、この疾患が原因で失明する患者は増加しており、早期の治療法開発が望まれている。

1. 網膜色素変性 (RP)

RPは進行性の夜盲、求心性の視野狭窄、視力低下を主な症状とする遺伝性の網膜変性疾患で、“視細胞と網膜色素上皮細胞の機能を原発性、びまん性に傷害する遺伝性かつ進行性の疾患群”と定義されている。すなわち、網膜の外層にある視細胞や網膜色素上皮細胞に特異的に発現している遺伝子の異常により、一般には若年期に発症して緩徐に進行し、中年ないし老年で高度な視力障害に至る疾患の総称である(図1)。遺伝性疾患としては比較的頻度が高く、我が国での有病率は3,400~8,000人に1人とされており、患者数は約3万人と推定されている。本疾患は我が国における先天盲の第一位で、中途失明原因でも第三位である。

Dryjaらにより、1990年に視細胞に特異的に発現しているロドプシン遺伝子が常染色体優性RPの原因遺伝子であることが報告されて以来¹⁾、これまでに約40種類の原因遺伝子が報告されている。RPは、異なる遺伝子異常が共通する表現型を示す、非対立遺伝子異質性という性質を有するが、病態に共通するメカニズムは視細胞のアポトーシスである。眼底所見は特徴的で、網膜色素上皮の粗造化、網膜血管の狭細化、骨小体様色素沈着などが認められる(図2)。

この疾患に対する臨床的に明確な効果を有する治療法は確立されておらず、予後は不良である。従って、患者にとっては現状の視力を有効に利用するための情報提供、すなわち補装具の紹介・処方、特定疾患の認定とそれによるサービスの情報提供、診断書(身体障害者手帳・障害年金)の交付、リハビリテーションの紹介などといった、QOLを高めるための総合的な支援が現時点では重要である。一方、新しい治療法開発も盛んに進められており、今回紹介する遺伝子治療の他に、他家網膜移植や人工網膜移植、さらには幹細胞を利用した網膜再生療法などが将来の臨床応用を期待されている。

Yasuhiro IKEDA¹⁾ and Tatsuro ISHIBASHI¹⁾²⁾¹⁾ Department of Ophthalmology, Kyushu University Hospital²⁾ Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University
Neuroprotective Gene Therapy to Treat Patients with Retinitis Pigmentosa

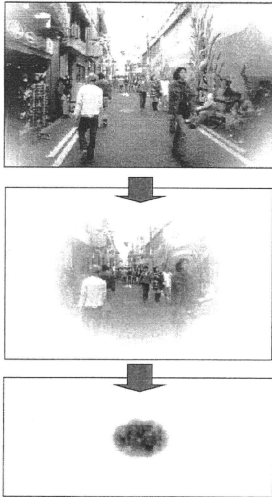


図1 網膜色素変性 (RP) 患者の見え方
見える範囲が少しずつ周辺部から狭くなり、50 円玉の穴から覗いているような見え方になっていく (中段)、さらにその見えている部分もはつきり見えなくなってくる (下段)、また、幼少時より暗いところでは見えにくいため、「鳥目」と言われた経験を持つ患者が多い。

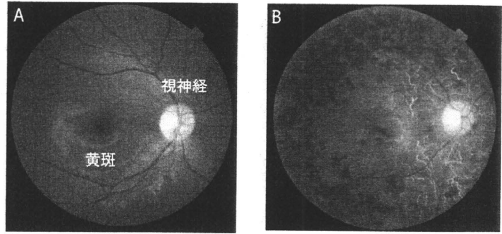


図2 網膜色素変性 (RP) の眼底所見
(A) 正常眼底写真 (右眼)、(B) RP に特徴的な色素を伴う網膜変性が認められる。

2. 眼科領域の遺伝子治療

(1) 歴史

遺伝子治療における世界初の臨床応用は、1990 年に米国においてアデノシンデアミナーゼ欠損症の女兒に対して行われたのは有名な話であるが²⁾、眼科領域の遺伝子治療研究は当時大きく遅れていた。実験動物の網膜への遺伝子導入がはじめて報告されたのが 1994 年³⁾、疾患モデル動物への治療効果のはじめての報告が 1995 年であった⁴⁾。

眼科領域での遺伝子治療の臨床応用は、網膜芽細胞腫⁵⁾、加齢黄斑変性⁶⁾、レーバー先天黒内障^{7)~9)}に対してこれまでに行われている。

(2) レーバー先天黒内障に対する遺伝子治療

レーバー先天黒内障 (Leber's congenital amaurosis: LCA) に対する遺伝子治療は、疾患モデル動物などを用いた基礎研究に裏打ちされた新しい治療法開発の素晴らしい一例であるので、ここで紹介する。

LCA は、生後早期より高度に視力が障害される RP 類縁疾患で、その原因遺伝子として *RPE65* や *CRX* などが知られている。*RPE65* は網膜色素上皮細胞 (RPE) に発現し 11-cis-retinal の産生に関わるが、*RPE65* 遺伝子に変異があると 11-cis-retinal が産生されず、視細胞 (桿体) が光に反応できなくなり、最終的に視細胞は死に至ってしまう。Acland らは、この LCA に対する遺伝子治療法として、AAV ベクターを用いた RPE への正常 *RPE65* 遺伝子導入という方法を試み、イヌの LCA モデルにおいて著明な治療効果が得られることを報告した¹⁰⁾。さらに、小型・中型動物を用いて AAV ベクター網膜下投与の安全性を確認した¹¹⁾。2007 年 2 月より英国の Ali らのグループによって、また 2007 年 9 月より米国の Bennett らのグループによって、ヒト LCA 患者に対する遺伝子治療臨床研究が開始されており、その途中経過が報告された⁷⁾⁸⁾。

英国での臨床研究では、17-23 歳の LCA 患者 3 名に対して遺伝子が投与された。その結果、1 名では、投与部位に一致した感度の改善を認め、さらに暗所下での行動の著しい改善を認めたと報告されている。

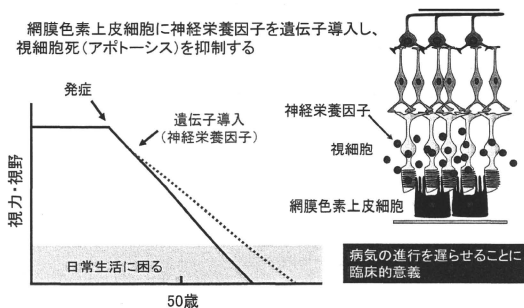


図3 視細胞保護遺伝子治療のコンセプト
網膜内の細胞（網膜色素上皮細胞）に神経栄養因子を遺伝子導入し、そこから分泌されたタンパクにより視細胞のアポトーシスを抑制する。視機能低下のスピードを抑えることで、日常生活に困らないレベルを保つことを目標としている。

また米国の臨床研究でも同様に、19-26歳の3名の患者を対象に遺伝子治療が行われ、治療を受けた3名とも視野に改善を認め、うち2名では視力の改善も認めたと報告されている。

3. 網膜色素変性 (RP) に対する視細胞保護遺伝子治療

(1) 視細胞保護遺伝子治療のコンセプト

遺伝子治療の当初の発想は「遺伝子の異常を直す」、すなわち病気を根本的に治療しようというもので、異常のある遺伝子を正常遺伝子と置換することができれば理想的である。しかしながら、現時点では技術的に難しいので、現実的には遺伝子異常を有する細胞に単に正常な遺伝子を補充する（異常遺伝子はそのまま残る）方法が取られていることが多い。この成功例が先ほどのLCAに対する遺伝子治療である。

一方、「遺伝子を用いて治療する」という方法も遺伝子治療のひとつの治療戦略である。RPは網膜に発現する分子の遺伝子異常によって最終的には視細胞が死に至るが、その共通するメカニズムは、視細胞のアポトーシスである。九州大学眼科で計画中の視細胞保護遺伝子治療のコンセプトを図3に示す。神経栄養因子と称されるタンパクは、神経細胞に対し保護作用を有するが、筆者らはこれらの中から色素上皮由来因子（pigment epithelium-derived factor: PEDF）を選択した。網膜を構成する細胞に対する神経保護効果に加え、血管新生抑制効果を併せ持つことから、眼にとって好都合なタンパクと考えられた。このPEDF遺伝子を搭載したウイルスベクター（サル由来レンチウイルスベクター：SIVベクター）をRP患者の網膜下に投与し、患者の眼内をPEDFタンパクでいっぱいにしてしまうと考えている。PEDFの視細胞保護作用により視細胞の喪失を防ぎ、患者の視機能低下を防ぐことを目的としている。

(2) SIVベクターの網膜への遺伝子導入特性

ヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus: HIV）に代表されるレンチウイルスはレトロウイルス科に属するRNAウイルスである。宿主細胞の染色体に遺伝子が組み込まれるため、安定した長期間の遺伝子発現が得られること、神経細胞などの終末分化細胞や造血幹細胞などの休止期細胞といった非分裂細胞にも遺伝子を効率的に導入できるという特徴を持っており、慢性疾患であるRPに対する治療用ベクターとして注目されている。

筆者らは、アフリカミドリサル由来免疫不全ウイルス（SIVagm: simian immunodeficiency virus from African green monkey）を基本骨格としたSIVベクターを選択した。自然宿主であるサルにも病原性がな

いため安全性に優れており、また我が国において開発された独自性の高いベクターであったからである¹²⁾。この SIV ベクターによる網膜への遺伝子導入には以下の特性があることがわかった¹³⁾¹⁴⁾。

- ①ベクター注入部位に一致した網膜色素上皮細胞への遺伝子導入が可能であること
- ②長期間（少なくとも3年間）の安定した遺伝子発現が持続すること
- ③遺伝子導入部の網膜に機能的な影響を生じないこと

(3) SIV-hPEDF による網膜変性モデル動物への治療効果

SIV ベクターにより網膜への安定した遺伝子導入が可能であることが確認できたので、次に PEDF を遺伝子導入することによる、網膜変性モデル動物である RCS ラットに対する治療効果の検討を行った（図4）¹⁵⁾¹⁶⁾。その結果、

- ①無治療群では7週齢で多くの視細胞が消失してしまうのに対し、PEDF 遺伝子導入群では15週齢（投与後12週）まで組織学的に視細胞数が保たれること、
- ②視細胞死の抑制には PEDF によるアポトーシス抑制が関与していること、
- ③網膜電図（ERG）を用いた電気生理学的検討において、機能的な保護効果が得られること、
- ④神経栄養因子である塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）を同時に発現させることでより高い保護効果が得られること、

が明らかとなった。さらに、他の網膜変性モデル動物においても同様の検討を行い、有効な治療効果が確認できた。

(4) PEDF による視細胞保護のメカニズム

さらに、PEDF の視細胞死に対する保護効果の詳細なメカニズムを知るために、in vitro ならびに in vivo での検討を行った。その結果、アポトーシス誘導因子（apoptosis-inducing factor : AIF）というひとつの因子にたどり着いた¹⁷⁾。網膜変性モデル動物において、この AIF がミトコンドリアから放出され、核内に移行することによって視細胞にアポトーシス死を誘導すること、および PEDF はミトコンドリアの膜を安定させることにより AIF の放出を抑制することで、視細胞死を防いでいることがわかった。

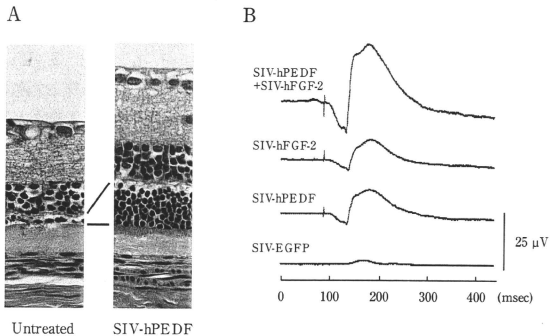


図4 SIV-hPEDF による網膜変性モデル動物への治療効果

(A) RCS ラット7週齢の網膜組織。治療群（SIV-hPEDF）では、視細胞の変性が抑制されているため、外顆粒層が厚い（文献15を改変）。(B) RCS ラット7週齢の網膜電図。PEDF、FGF-2それぞれの遺伝子導入により電位が高くなっているが、同時に発現させることによってさらに高い電位が得られている（文献16を改変）。

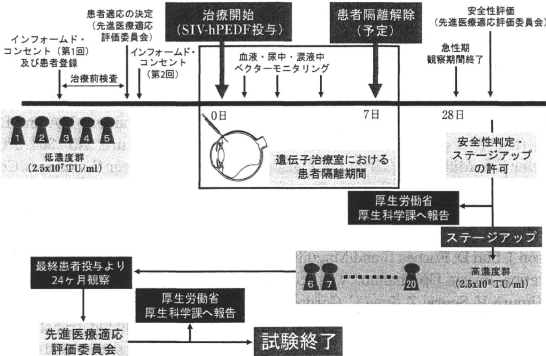


図5 視細胞保護遺伝子治療臨床研究のおおまかな流れ

(5) 大型動物を用いた安全性試験

眼科領域の遺伝子治療臨床研究としてレンチウイルスベクターが用いられた前例がないことより、SIVベクター投与による安全性（局所ならびに全身）を詳細に検証することは必須であった。筆者らは、大型動物であるカンクイザルを用いた安全性試験を計画した。長期的な安全性に関しては現在も検討中であるが、急性期においては、

- ①ベクター投与に伴う眼局所および全身における重大な有害事象がないこと、
 - ②PEDFの過剰発現による眼局所での副作用がないこと、
- が確認できている¹⁸⁾。

(6) 臨床試験実施計画書

九州大学眼科で計画中の視細胞保護遺伝子治療実施計画の大まかな流れを図5に示す。まず第1ステージとして5名の被験者に低濃度のベクター溶液を投与し各々4週間観察する。急性期の異常が認められないことを確認した後、第2ステージで15名の被験者に有効濃度と考えられる量のベクターを投与する計画となっている。安全性を見極める第I相臨床研究として位置付けており、最終被験者の投与終了後2年間経過観察するが、副作用の発生については終生追跡する予定になっている。

おわりに

現在、「神経栄養因子（ヒト色素上皮由来因子：hPEDF）遺伝子搭載第3世代組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクターの網膜下投与による網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療臨床研究（英文標記）The Clinical Study for Neuroprotective Gene Therapy to Treat Patients with Retinitis Pigmentosa via Subretinal Injection of The 3rd Generation of Recombinant Simian Immunodeficiency Virus (SIVagm) Vector Expressing Human Pigment Epithelium-Derived Factor Gene.」という臨床研究プロトコルが完成しており、学内倫理委員会での審議・承認を得ることができた。さらに、平成22年10月に厚生労働省への実施計画の申請が完了し、今年度中に厚生科学審議会において実施計画に対する審議が開始される見込みである。近い将来、この新しい治療法が臨床応用される可能性がある。

謝 辞

遺伝子治療研究の遂行に際しご指導いただいております九州大学大学院薬学研究院の米満吉和客員教授、

ならびにウイルスベクターを供給いただいておりますディナベック株式会社の長谷川護社長に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1] Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, Sandberg MA and Berson EL : A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature*. 343 : 364-366, 1990.
- 2] Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA and Anderson WF : T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID : initial trial results after 4 years. *Science*. 270 : 475-480, 1995.
- 3] Bennett J, Wilson J, Sun D, Forbes B and Maguire A : Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer into adult murine retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 35 : 2535-2422, 1994.
- 4] Sakamoto T, Kimura H, Scurig Z, Spee C, Gordon EM, Hinton DR, Anderson WF and Ryan SJ : Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy by retroviral vector-mediated transfer of suicide gene. Can proliferative vitreoretinopathy be a target of gene therapy? *Ophthalmology*. 102 : 1417-1424, 1995.
- 5] Chévez-Barrios P, Chintagumpala M, Mieler W, Paysse E, Boniuk M, Kozinetz C, Hurwitz MY and Hurwitz RL : Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *J Clin Oncol*. 23 : 7927-7935, 2005.
- 6] Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, Klein ML, Holz E, Frank RN, Saperstein DA, Gupta A, Stout JT, Macko J, DiBartolomeo R and Wei LL : Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration : results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther*. 17 : 167-176, 2006.
- 7] Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT and Ali RR : Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis. *N Engl J Med*. 358 : 2231-2239, 2008.
- 8] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA and Bennett J : (2008). Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis. *N Engl J Med*. 358 : 2240-2248, 2008.
- 9] Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ and Jacobson SG : Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther*. 19 : 979-990, 2008.
- 10] Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW and Bennett J : Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28 : 92-95, 2001.
- 11] Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bennicelli J, Dejneka NS, Pearce-Kelling SE, Maguire AM, Palczewski K, Hauswirth WW and Jacobson SG : Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 12 : 1072-1082, 2005.
- 12] Nakajima T, Nakamaru K, Ido E, Terao K, Hayami M and Hasegawa M : Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. *Hum Gene Ther*. 11 : 1863-1874, 2000.
- 13] Ikeda Y, Goto Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Sakamoto T, Ishibashi T, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S and Sueishi K : Simian Immunodeficiency Virus-Based Lentiviral Vector For Retinal Gene Transfer: a preclinical safety study in adult rats. *Gene Ther*. 10 : 1161-1169, 2003.
- 14] Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Kohno RI, Murakami Y, Murata T, Goto Y, Tabata T, Ueda Y, Ono F, Suzuki T, Ageyama N, Terao K, Hasegawa M, Sueishi K and Ishibashi T : Acute Toxicity Study of a Simian Immunodeficiency Virus-based Lentiviral Vector for Retinal Gene Transfer in Nonhuman Primates. *Hum Gene Ther*. 20 : 943-954, 2009.

- 15] Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Sakamoto T, Tabata T, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Ishibashi T and Sueishi K : Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. *Gene Ther.* 10 : 1503-1511, 2003.
- 16] Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Kohno RI, Murakami Y, Inoue M, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K and 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. *J Gene Med.* 10 : 1273-1281, 2008.
- 17] Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M, Nakagawa K, Kohno R, Miyazaki M, Hisatomi T, Nakamura M, Yabe T, Hasegawa M, Ishibashi T and Sueishi K : Inhibition of nuclear translocation of apoptosis-inducing factor is an essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am J Pathol.* 173 : 1326-1338, 2008.
- 18] Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, Kohno RI, Murakami Y, Murata T, Tabata T, Ueda Y, Ono F, Suzuki T, Ageyama N, Terao K, Hasegawa M, Sueishi K and Ishibashi T : Stable Retinal Gene Expression in Nonhuman Primates via Subretinal Injection of SIVagm-based Lentiviral Vectors. *Hum Gene Ther.* 20 : 573-576, 2009.

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です。)

プロフィール

池田 康博 (いけだ やすひろ)

九州大学助教 (大学病院眼科)。医博。

◆**略歴** : 1970年熊本県に生る。1995年九州大学医学部卒業。同年同大学医学部眼科入局。2003年同大学大学院医学系研究科博士課程修了。2004年より同職。

◆**研究テーマ** : 網膜色素変性の病態解明とあたらしい治療法開発が研究テーマです。治療法開発のひとつが今回ご紹介した遺伝子治療で、臨床応用へ向けて研究を続けています。昼間は診療と研究に集中して夜は美味しいお酒を飲む、が理想ですが…。

◆**趣味** : お酒 (ワイン)、サッカー (最近はフットサル) など。

