

201114029A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石橋 達朗

平成 24 (2012) 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	
（添付資料1）最終生産物に対する品質管理試験	5
（添付資料2）眼組織内に組み込まれたベクターゲノムコピー数	7

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	8
石橋達朗	
（添付資料1）最終生産物に対する品質管理試験	11
2. サル長期安全性試験の最終評価に関する研究	13
池田康博	
（添付資料2）眼組織内に組み込まれたベクターゲノムコピー数	15
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	16
米満吉和	

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 18 |

IV . 研究成果の刊行物・別刷 19 |

I . 総括研究報告

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実施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最終生産物（治療用ベクター）に対する品質管理試験の実施、②厚生科学審議会での審査、③カニクイザルにおける長期安全性の最終確認、④RP における視細胞死と炎症反応や酸化ストレスとの関連の解明、である。臨床研究開始までの準備は着実に進んでおり、平成 24 年度中の実施を目指している。

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）

本研究では、臨床研究実施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：治療用ベクターである 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）の good manufacturing practice（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

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。

B. 研究方法

1. 遺伝子治療臨床研究への準備
1-1.

Vector Gene Technology（VGTC）社（中華人民共和国・北京市）において、治療用ベクターの実生産は平成 22 年度中に完了し、九州大学病院に保

管・管理されている。本年度は、最終生産物に対する品質管理試験を実施する。

1-2.

平成 22 年度に厚生科学審議会へ申請した臨床研究実施計画の審議を受け、臨床研究実施へ向けた最終段階の準備を整える。

2. サルを用いた長期安全性試験の最終評価
カニクイザルの片眼に、ガラスシリンジを用いて 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。本年度実施した検討項目は、主要臓器の病理組織学的検討、ならびに眼組織におけるベクターゲノムの検出である。

3. hPEDF の持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明

3-1.

RP モデル動物である rd10 マウスを用いて以下の検討を行った。生後 14, 17, 21, 28 日目の rd10 マウスより眼球を摘出し、網膜より mRNA を抽出した。Real-time PCR 法を用いて、MCP-1, IL-1 β , RANTES, TNF- α の発現を対象群と比較した。同様に眼球を摘出後、4%パラホルムにて固定し、パラフィン包埋した。マイクログリアのマーカーである Iba-1 に対する免疫組織化学的染色を行った。

3-2.

酸化ストレスの関与を検証するために、rd10 マウスに N アセチルシステイン (N-acetylcysteine: NAC) を飲水投与し、同様にサイトカインやケモカインの発現を検討した。また、生後 26 日目の眼球を摘出し、視細胞数をカウントした。

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 6 例 7 眼 (男性 3 例、女性 3 例)、ならびに特発性黄斑前膜患者 36 例 36 眼 (男性 11 例、女性 25 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、multi-plex ELISA 法にて各種炎症性サイトカインならびにケモカインの濃度を測定した。

(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食品局長通知、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

1-1.

今年度は、最終生産物がGMP基準に合致することを確認する品質管理試験を実施した。複製可能レンチウイルス(replication competent lentivirus: RCL)否定試験を除く、すべての試験は完了した(添付資料1)。RCL否定試験は平成24年度上半に完了する予定となっている。

1-2.

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(平成22年12月)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ため、委員からの書面による内容照会に対応した(計4回)。その後、第1回委員会は平成24年1月13日に開催された。現在、委員会後の照会事項への対応

を進めており、平成24年度上半に審議が完了する予定となっている。

2. サルを用いた長期安全性試験の最終評価

すべての個体に対する主要臓器の病理組織学的検討において、明らかな病的な変化を認めず、悪性新生物も認められなかった。

試験終了後に摘出した眼球から採取したゲノムDNA(200 ng)内に含まれるベクターゲノムのコピー数について検討を行った。添付資料2に示すように、遺伝子導入したすべての眼球でベクターゲノムが検出された。

3. hPEDFの持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明

3-1.

rd10マウスは生後18日目頃より、視細胞のアポトーシスが生じるが、それ以前の生後14日目よりMCP-1, IL-1 β , TNF- α の発現が亢進していることが明らかとなった。同様に免疫組織化学的検討により、生後14日目から外顆粒層においてマイクログリアが活性化されていることが確認された。

3-2.

NACの飲水投与により、上記で活性化されていた因子は有意に抑制されていた。また、免疫組織化学的検討により、マイクログリアの活性化が抑制されていることが明らかとなった。

3-3.

黄斑上膜を合併したRP患者の硝子体液中では、種々の炎症性サイトカインならびにケモカインの濃度が、特発性黄斑前膜患者に比較して有意に高いことがわかった。

D, E. 考察、結論

1. 遺伝子治療臨床研究への準備

臨床研究実施に向けて、治療用ベクターの品質管理試験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。臨床研究開始までの準備は着実に進んでおり、平成 24 年度中の開始を目指している。

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、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。

3. hPEDF の持つ視細胞保護効果の分子メカニズムの解明

RP における視細胞死に酸化ストレスを介した炎症反応の関与が示唆された。酸化ストレスをコントロールすることで炎症反応の抑制と視細胞死の抑制が認められたことより、RP の新しい治療法として、抗酸化ストレス療法、ならびに抗炎症療法が有用である可能性が考えられた。PEDF の視細胞死抑制効果に、これらのメカニズムが関与するか否かを今後検討する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 坂本泰二、池田康博：【ここまで進んだ先端医療】眼科における先端的治療について 臨牀と研究 88: 448-454, 2011

2. 池田康博、石橋達朗：【最先端医療の進歩-臓器移植・再生医療・遺伝子治療】遺伝子治療の進歩 先天性網膜変性疾患に対する遺伝子治療 小児科診療 75: 131-135, 2012

2. 学会発表

1. 池田康博：シンポジウム 7「網膜変性治療の最前線」網膜色素変性に対する遺伝子治療～From Bench to Clinical Trial～ 第 65 回日本臨床眼科学会（東京）2011

2. 吉田倫子、他：網膜色素変性における前部硝子体炎症の病態への関与 第 65 回日本臨床眼科学会（東京）2011

3. 吉田倫子、他：網膜色素変性患者の臨床所見の特徴 第 50 回日本網膜硝子体学会（東京）2011

4. 池田康博：網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療 第 2 回 国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム（東京）2012

5. Ikeda Y：Lentivirus vector-mediated gene therapy for retinitis pigmentosa The World Ophthalmology Congress 2012 (Abu Dhabi, United Arab Emirates) 2012

6. Ikeda Y, et al. Sustained Chronic Inflammatory Reaction in Retinitis Pigmentosa. 2012 Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, USA) 2012

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

添付資料 1 : 最終生産物に対する品質管理試験

	試験項目	試験方法	規格値	結果
1	RNA titer (particles/ml)	Real-time PCR	$1.6 \times 10^9 \sim 2.4 \times 10^{10}$ copies/mL	6.42×10^9 copies/mL
2	Transduction Unit (TU/ml)	cell immune staining	$3.34 \times 10^8 \sim 3.00 \times 10^9$ TU/mL	1.04×10^9 TU/mL
3	PCR of hPEDF	PCR	Product specific	Qualified
4	SDS-PAGE	SDS-PAGE	Comparable to reference	Comparable to reference
5	Protein concentration	Bradford	> 20 ug/mL	53.93 ug/mL
6	Sterility	direct inoculation method (21CFR)	negative	Negative
7	Mycoplasma	PCR	negative	Negative
8	Mycoplasma	direct inoculation	negative	Negative
9	Special virus(HIV, HBV, HCV,)	PCR	negative	HBV: Negative HCV: Negative HIV: Negative
10	Abnormal toxicity		negative	Negative
11	TEM		No bacteria and fungi	No bacteria and fungi
12	Endotoxin	LAL	<10 EU/mL	<10 EU/mL
13	Host Cell DNA	Dot blot or Pico-green	<200 ng/mL	36 ng/mL (= 1.8 ng/dose for high dose)
14	Residual BSA	ELISA	< 1ug/mL	1.375 ng/mL (= 0.06875 ng/dose for high dose)
15	Residual Benzonase	ELISA	< 2 ng/mL	≤ 0.2 pg/ml
16	Replication Competent Lentivirus (RCL)	PCR	negative	not completed (2012/5/22 Plan Reporting Date)
17	in vitro potency assay (expression of PEDF)	ELISA	> 300 ng/mL	570.73 ng/mL

18	PEDF (pg/vial)	ELISA	< 10 ng/mL	Negative
19	PCR for E1A, E1B, SV40 large T antigen	PCR	negative	E1A: Negative E1B: Negative SV40 large T antigen: Negative
20	Fill volume		> 0.5ml/vial	0.56ml/vial
21	pH	pH meter	pH 6.5~7.5	7.22
22	Appearance	Examination under light	Milky & Light Milky, Colorless	Passed

添付資料 2 : 眼組織内に組み込まれたベクターゲノムコピー数

SIV-hPEDF copy number in genome DNA from the eyes

No. of animals	R/L (treatment)	copy number/ 200 ng DNA
22	R (SIV-hPEDF low)	6.1
	L (untreated)	not done
24	R (SIV-hPEDF low)	32.6
	L (untreated)	undetected
29	R (untreated)	not done
	L (SIV-hPEDF high)	341.0
30	R (untreated)	undetected
	L (SIV-hPEDF high)	124.3
31	R (SIV-hPEDF high)	93.8
	L (untreated→high)	60.4
32	R (untreated→BSS)	undetected
	L (SIV-hPEDF low)	57.6
33	R (SIV-hPEDF low)	26.3
	L (untreated→low)	75.0

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 本臨床研究では、米国 FDA の good manufacturing practice (GMP) 基準に従って生産されたサル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus: SIV) ベクターを使用する。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、本臨床研究は、「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。そのため、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、本年度は終生産物が GMP 基準に合致することを品質管理試験にて確認する。また、厚生科学審議会への実施申請は昨年度中に完了しており、審議は順調に進んでいる。

A. 研究目的

本臨床研究で使用する SIV ベクターは、米国 FDA の GMP 基準に従って生産されたものであるが、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、最終生産物に対する品質管理試験を実施する。
2. 平成 22 年度に厚生科学審議会へ申請した臨床研究実施計画の審議を受け、臨床研究実施へ向けた最終段階の準備を整える。

(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)。

C. 研究結果

1. 今年度は、最終生産物がGMP基準に合致することを確認する品質管理試験を実施した。複製可能レンチウイルス(replication competent lentivirus: RCL)否定試験を除く、すべての試験は完了した(添付資料1)。RCL否定試験は平成24年度上半に完了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(平成22年12月)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ため、委員からの書面による内容照会に対応した(計4回)。その後、第1回委員会は平成24年1月13日に開催された。現在、委員会後の照会事項への対応を進めており、平成24年度上半に審議が完了する予定となっている。

D, E. 考察、結論

臨床研究実施に向けて、治療用ベクターの品質管理試験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。臨床研究開始までの準備は着実に進んでおり、平成24年度中の開始を目指している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 坂本泰二、池田康博：【ここまで進んだ先端医療】眼科における先端的治療について 臨牀と研究 88: 448-454, 2011

2. 池田康博、石橋達朗：【最先端医療の進歩-臓器移植・再生医療・遺伝子治療】遺伝子治療の進歩 先天性網膜変性疾患に対する遺伝子治療 小児科診療 75: 131-135, 2012

2. 学会発表

1. 池田康博：シンポジウム7「網膜変性治療の最前線」網膜色素変性に対する遺伝子治療～From Bench to Clinical Trial～ 第65回日本臨床眼科学会(東京)2011

2. 池田康博：網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療 第2回 国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム(東京)2012

3. Ikeda Y：Lentivirus vector-mediated gene therapy for retinitis pigmentosa The World Ophthalmology Congress 2012 (Abu Dhabi, United Arab Emirates) 2012

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

添付資料 1 : 最終生産物に対する品質管理試験

	試験項目	試験方法	規格値	結果
1	RNA titer (particles/ml)	Real-time PCR	$1.6 \times 10^9 \sim 2.4 \times 10^{10}$ copies/mL	6.42×10^9 copies/mL
2	Transduction Unit (TU/ml)	cell immune staining	$3.34 \times 10^8 \sim 3.00 \times 10^9$ TU/mL	1.04×10^9 TU/mL
3	PCR of hPEDF	PCR	Product specific	Qualified
4	SDS-PAGE	SDS-PAGE	Comparable to reference	Comparable to reference
5	Protein concentration	Bradford	> 20 ug/mL	53.93 ug/mL
6	Sterility	direct inoculation method (21CFR)	negative	Negative
7	Mycoplasma	PCR	negative	Negative
8	Mycoplasma	direct inoculation	negative	Negative
9	Special virus(HIV, HBV, HCV,)	PCR	negative	HBV: Negative HCV: Negative HIV: Negative
10	Abnormal toxicity		negative	Negative
11	TEM		No bacteria and fungi	No bacteria and fungi
12	Endotoxin	LAL	<10 EU/mL	<10 EU/mL
13	Host Cell DNA	Dot blot or Pico-green	<200 ng/mL	36 ng/mL (= 1.8 ng/dose for high dose)
14	Residual BSA	ELISA	< 1ug/mL	1.375 ng/mL (= 0.06875 ng/dose for high dose)
15	Residual Benzonase	ELISA	< 2 ng/mL	≤ 0.2 pg/ml
16	Replication Competent Lentivirus (RCL)	PCR	negative	not completed (2012/5/22 Plan Reporting Date)
17	in vitro potency assay (expression of PEDF)	ELISA	> 300 ng/mL	570.73 ng/mL

18	PEDF (pg/vial)	ELISA	< 10 ng/mL	Negative
19	PCR for E1A, E1B, SV40 large T antigen	PCR	negative	E1A: Negative E1B: Negative SV40 large T antigen: Negative
20	Fill volume		> 0.5ml/vial	0.56ml/vial
21	pH	pH meter	pH 6.5~7.5	7.22
22	Appearance	Examination under light	Milky & Light Milky, Colorless	Passed

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。平成22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ったが、評価が完了していない項目（主要臓器の病理組織学的検討、眼組織におけるベクターゲノムの検出）について本年度は評価を行った。現時点で得られた結果から、導入された遺伝子は約5年間安定して網膜に組み込まれており、遺伝子発現も安定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っている。平成23年度は、主要臓器の病理組織学的検討と眼組織におけるベクターゲノムの検出を行う。

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。本年度実施した検討項目は、主要臓器の病理組織学的検討、ならびに眼組織におけるベクターゲノムの検出である。

（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. すべての個体に対する主要臓器の病理組織学

的検討において、明らかな病的な変化を認めず、悪性新生物も認められなかった。

2. 試験終了後に摘出した眼球から採取したゲノム DNA (200 ng) 内に含まれるベクターゲノムのコピー数について検討を行った。添付資料 2 に示すように、遺伝子導入したすべての眼球でベクターゲノムが検出された。

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. 坂本泰二、池田康博：【ここまで進んだ先端医療】眼科における先端的治療について 臨牀と研究 88: 448-454, 2011

2. 池田康博、石橋達朗：【最先端医療の進歩-臓器移植・再生医療・遺伝子治療】遺伝子治療の進歩 先天性網膜変性疾患に対する遺伝子治療 小児科診療 75: 131-135, 2012

2. 学会発表

1. 池田康博：シンポジウム 7「網膜変性治療の最前線」網膜色素変性に対する遺伝子治療～From

Bench to Clinical Trial～ 第 65 回日本臨床眼科学会 (東京) 2011

2. 池田康博：網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療 第 2 回 国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム (東京) 2012

3. Ikeda Y：Lentivirus vector-mediated gene therapy for retinitis pigmentosa The World Ophthalmology Congress 2012 (Abu Dhabi, United Arab Emirates) 2012

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

添付資料 2 : 眼組織内に組み込まれたベクターゲノムコピー数

SIV-hPEDF copy number in genome DNA from the eyes

No. of animals	R/L (treatment)	copy number/ 200 ng DNA
22	R (SIV-hPEDF low)	6.1
	L (untreated)	not done
24	R (SIV-hPEDF low)	32.6
	L (untreated)	undetected
29	R (untreated)	not done
	L (SIV-hPEDF high)	341.0
30	R (untreated)	undetected
	L (SIV-hPEDF high)	124.3
31	R (SIV-hPEDF high)	93.8
	L (untreated→high)	60.4
32	R (untreated→BSS)	undetected
	L (SIV-hPEDF low)	57.6
33	R (SIV-hPEDF low)	26.3
	L (untreated→low)	75.0

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。一方、PEDFには抗炎症作用や酸化ストレスを抑制する作用が知られており、本年度はPEDFの持つ視細胞保護効果とそれらの関連について検証するために、RPモデル動物における視細胞死と炎症ならびに酸化ストレスの関連について検討した。発症早期から網膜において各種炎症性サイトカインやケモカインの発現が増加していた。抗酸化剤の投与によりそれらの炎症反応が抑制され、視細胞死が抑制されることが明らかとなった。また、RP患者より採取した硝子体液中に、種々の炎症性サイトカインやケモカインが豊富に含まれていることが明らかとなった。

A. 研究目的

網膜色素変性 (RP) において、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、アポトーシス誘導因子 (AIF) 放出を抑制することにより、視細胞死 (アポトーシス) を抑制することがわかっている (Murakami Y, Ishibashi T, et al. *Am J Pathol.* 2008)。一方で、PEDFには抗炎症作用や酸化ストレス抑制作用が知られており、本年度はRPにおける視細胞死と酸化ストレス、ならびに炎症反応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 マウスを用いて以下の検討を行った。生後 14, 17, 21, 28 日目の rd10 マウスより眼球を摘出し、網膜より mRNA を抽出した。Real-time PCR 法を用いて、MCP-1, IL-1 β , RANTES, TNF- α の発現を対象群と比較し

た。同様に眼球を摘出後、4%パラホルムにて固定し、パラフィン包埋した。マイクログリアのマーカーである Iba-1 に対する免疫組織化学的染色を行った。

2. 酸化ストレスの関与を検証するために、rd10 マウスに N アセチルシステイン (N-acetylcysteine: NAC) を飲水投与し、同様にサイトカインやケモカインの発現を検討した。また、生後 26 日目の眼球を摘出し、視細胞数をカウントした。

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 6 例 7 眼 (男性 3 例、女性 3 例)、ならびに特発性黄斑前膜患者 36 例 36 眼 (男性 11 例、女性 25 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、multi-plex ELISA 法にて各種炎症性サイト