

201114029B

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~23 年度 総合研究報告書

研究代表者 石橋 達朗

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I . 総合研究報告	1
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 石橋達朗 （添付資料1）最終生産物に対する品質管理試験 （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	
II . 研究成果の刊行に関する一覧表	11
III . 研究成果の刊行物・別刷	12

I . 総合研究報告

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）
総合研究報告書

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。本研究で得られた成果は、①治療用ベクターの入手と品質管理試験の実施、②厚生科学審議会での審査、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最終確認、⑤RPにおけるゲノム酸化損傷の病態への関与の解明、⑥RP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）

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

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GMP基準を満たす治療用ベクターの実生産を行い、その品質管理試験を実施する。

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臨床研究実施計画を厚生科学審議会に提出し、審議を受ける。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-hPDF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眼内における導入遺伝子と遺伝子発現の確認、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

3. hPDF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。

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.

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。

3-4.

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。

3-5.

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。

3-6.

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

1-1.

治療用ベクターの最終生産物は平成 22 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。平成 23 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 年度月上旬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

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 (2.5×10^7 TU/ml) では 100 ng/ml 前後、高濃度群 (2.5×10^8 TU/ml) では 1000 ng/ml 程度の hPEDF が検出された。

また、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。

さらに、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癍痕化は認められたものの、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。

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。さらに、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。

3-2.

rd10+/+: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。

3-3.

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。

3-4.

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。

3-5.

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 ± 0.06 ng/ml で、特発性黄斑前膜患者の 0.15 ± 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。

3-6.

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

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。従って、ゲノム酸化損傷をコントロールすることにより、その後に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。

また、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。

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

4. 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

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

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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ーFrom Bench to Clinical Trialー 第65回日本臨床眼科学会(東京) 2011

9. 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

10. 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

11. 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

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 Benzoylase	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 . 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
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	臨床と研究	88	448-454	2011
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

III . 研究成果の刊行物・別刷

Inhibition of Choroidal Neovascularization via Brief Subretinal Exposure to a Newly Developed Lentiviral Vector Pseudotyped with Sendai Viral Envelope Proteins

Yusuke Murakami,^{1,2} Yasuhiro Ikeda,¹ Yoshikazu Yonemitsu,³ Masanori Miyazaki,¹
Makoto Inoue,⁴ Mamoru Hasegawa,⁴ Katsuo Sueishi,² and Tatsuro Ishibashi¹

Abstract

Lentiviral vectors are promising tools for the treatment of chronic retinal diseases, including age-related macular degeneration (AMD), as they enable stable transgene expression. On the other hand, Sendai virus (SeV) vectors provide the unique advantage of rapid gene transfer. Here we show that novel simian immunodeficiency viral vectors pseudotyped with SeV envelope proteins (SeV-F/HN-SIV) achieved rapid, efficient, and long-lasting gene transfer in the mouse retina. Subretinal exposure to SeV-F/HN-SIV vectors for only a few minutes resulted in high-level gene transfer to the retinal pigment epithelium, whereas several hours were required for gene transfer by standard vesicular stomatitis virus G-pseudotyped SIV vectors. Transgene expression continued over a 1-year period. SeV-F/HN-SIV vector-mediated retinal overexpression of soluble Fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) or pigment epithelium-derived factor (PEDF) significantly suppressed laser-induced choroidal neovascularization (CNV). Histologically, 6-month-long sustained overexpression of PEDF did not adversely affect the retina; however, that with sFlt-1 resulted in photoreceptor degeneration associated with choroidal circulation defects. These data demonstrate that brief subretinal administration of SeV-F/HN-SIV vectors may facilitate safe and efficient retinal gene transfer, and suggest the therapeutic potential of PEDF with a higher safety profile for treating CNV in AMD patients.

Introduction

THE DEVELOPMENT OF CHOROIDAL NEOVASCULARIZATION (CNV) is a principal pathological feature of age-related macular degeneration (AMD), the leading cause of adult blindness in industrialized countries (Lopez *et al.*, 1991; Friedman *et al.*, 2004; Miyazaki *et al.*, 2005). One of the major factors that induce CNV is vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), a diffusible cytokine that promotes angiogenesis and vascular permeability (Ishibashi *et al.*, 1997; Krzystolik *et al.*, 2002). Clinical data analyses have revealed that the intravitreal administration of VEGF-A antagonists such as ranibizumab, bevacizumab, and pegaptanib arrests CNV progression and leakage from CNV, and improves visual acuity (Gragoudas *et al.*, 2004; Avery *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2006; Rosenfeld *et al.*, 2006). However, these drugs need to be

used repeatedly at 4- to 6-week intervals, which raises concerns about injection-related adverse events including ocular inflammation, retinal injury, and endophthalmitis.

Advances in gene therapy technologies have been introduced as components of novel therapeutic approaches to the treatment of retinal diseases. Among several vector systems, recombinant adeno-associated viral (rAAV) and lentiviral vectors are likely to be useful for patients with chronic progressive retinal diseases, as these vectors can achieve gene transfer in nondividing cells and yield long-term transgene expression (Miyoshi *et al.*, 1997; Acland *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003). Clinical studies demonstrated the safety and efficacy of the subretinal delivery of rAAV carrying the *RPE65* gene for patients with Leber's congenital amaurosis, thereby providing the proof of concept for retinal gene therapy strategies (Bainbridge *et al.*, 2008; Hauswirth *et al.*,

¹Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan.

²Division of Pathophysiological and Experimental Pathology, Department of Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan.

³Department of Gene Therapy, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba 260-8670, Japan.

⁴DNAVEC, Tsukuba City, Ibaraki 305-0856, Japan.

2008; Maguire *et al.*, 2008; Cideciyan *et al.*, 2009). The clinical study has shown that the viral vector solution left in the subretinal space is almost fully absorbed by 24 hr after injection (Bainbridge *et al.*, 2008); however, it is more preferable to remove the vector solution and resolve the retinal detachment (RD) during gene transfer surgery, because the outer retinal cells are deprived of trophic and metabolic support from the retinal pigment epithelium (RPE) and choroid vessels during RD. Hauswirth and colleagues reported that retinal thinning was observed in one of three patients after subretinal injection of rAAV-RPE65 (Hauswirth *et al.*, 2008). We developed novel simian lentiviral vectors pseudotyped with Sendai virus (SeV) hemagglutinin–neuraminidase (HN) and fusion (F) envelope proteins (SeV-F/HN-SIV) (Kobayashi *et al.*, 2003). The F and HN proteins of SeV mediate viral attachment and penetration (Lamb and Kolakofsky, 1996), and SeV-derived vectors have shown efficient gene transfer with only a few minutes of vector–cell interaction (Yonemitsu *et al.*, 2000; Masaki *et al.*, 2001). Therefore, SeV-F/HN-SIV vectors are expected to facilitate rapid transfection, and they may enable the removal of the vector solution shortly after injection.

Neovascularization is thought to be regulated by the balance between angiogenesis inducers and inhibitors (Folkman, 1995). Soluble Fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)/VEGF receptor (VEGFR)-1, a splice variant of the VEGF receptor Flt-1, is an endogenous inhibitor of VEGF-A (Kendall *et al.*, 1996), and has been used successfully to attenuate CNV in experimental models (Honda *et al.*, 2000; Bainbridge *et al.*, 2002; Gehlbach *et al.*, 2003). However, studies have indicated that VEGF-A acts as a survival factor in normal vascular endothelial cells and neural cells (Darland *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007; Maharaj *et al.*, 2008), and some investigators have warned that a long-term blockade of VEGF signaling may lead to vascular and tissue dysfunction in the retina, as observed in the case of other systemic organs (Maynard *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 2004; Hurwitz and Saini, 2006). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a secreted glycoprotein isolated from the conditioned medium of human RPE (Tombran-Tink and Johnson, 1989; Steele *et al.*, 1993), and it has been shown to exhibit both antiangiogenic and neuroprotective properties (Taniwaki *et al.*, 1995; Dawson *et al.*, 1999). Retinal gene transfer of PEDF by adenoviral vectors substantially inhibited experimental CNV by inducing apoptosis in activated endothelial cells (Mori *et al.*, 2002); and this approach is currently under evaluation in a clinical trial investigating its efficacy in AMD patients (Campochiaro *et al.*, 2006). However, the effects of long-term PEDF overexpression on the normal retinal vasculature and neurons remain unknown.

In the present study, we aimed to evaluate the availability of SeV-F/HN-SIV vectors for retinal gene transfer. We demonstrated the rapid and efficient transduction ability of these vectors, both *in vitro* and *in vivo*. Using this new vector system, we assessed the efficacy and safety of long-term overexpression of the antiangiogenic agents sFlt-1 and PEDF in a mouse model of laser-induced CNV.

Material and Methods

SIV vectors

To produce third-generation recombinant SIV-based lentiviral vectors, HEK 293T cells were transfected with the

packaging vector; gene transfer vectors encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP), hPEDF, or hsFlt-1 driven by the cytomegalovirus promoter; the ReV expression vector; and the envelope vector (vesicular stomatitis virus G glycoprotein [pVSV-G] [Clontech Laboratories, Mountain View, CA] or pSeV-F/HN with a truncation of the cytoplasmic tail of F and the addition of the cytoplasmic tail of the SIV transmembrane envelope protein to the N terminus of HN) (Kobayashi *et al.*, 2003). The SIV vector lacking a transgene cassette (SeV-F/HN-SIV-Empty) was used as the control vector. The U3 region in the 3' and 5' long terminal repeat of SIV was deleted to induce self-inactivation. The viral titer was determined by the transduction of HEK 293T cells and expressed as transducing units (TU) per milliliter, and the viruses were kept at -80°C until just before use.

Cell culture and *in vitro* gene transfer

ARPE-19 cells, a human RPE-derived cell line, were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). ARPE-19 cells were seeded in 24-well plates at 1×10^5 cells per well in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)–F12. Twelve hours later, either SeV-F/HN-SIV-luciferase or VSV-G-SIV-luciferase was added to each well at a multiplicity of infection (MOI) of 10. After various times of incubation with each vector solution, the culture medium was removed, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and fresh medium was added. At 48 hr after gene transfer, the cells were harvested and subjected to luciferase assay.

Animals and *in vivo* gene transfer

Adult C57BL/6 mice were maintained humanely, with proper institutional approval, and in accordance with the statement of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. All animal experiments were carried out according to approved protocols and in accordance with the recommendations for the proper care and use of laboratory animals by the Committee for Animals, Recombinant DNA, and Infectious Pathogen Experiments at Kyushu University and according to the Law (No. 105) and Notification (No. 6) of the Japanese Government. The subretinal injection of each solution was performed as previously described (Murakami *et al.*, 2008b). Briefly, mice were anesthetized by inhalation of ether. A 30-gauge needle was inserted into the subretinal space of the peripheral retina in the nasal hemisphere via an external transscleral transchoroidal approach. Subretinal injection of vector solution (SeV-F/HN-SIV or VSV-G-SIV vector; 2.5×10^7 TU/ml $\times 2 \mu\text{l}$) resulted in a dome-shaped detachment of about half the retina. To assess the effects of vector–cell interaction time on retinal gene transfer, we used two different subretinal administration techniques: either simple injection (*leave*) or removal 5 min after gene transfer by draining the subretinal vector solution and injecting balanced salt solution (BSS) after drainage (*remove*). The following assessments for duration of transgene expression, the efficacy of antiangiogenic factors for laser-induced CNV, and their retinal toxicity were performed by the *remove* procedure. Eyes that sustained marked surgical trauma (e.g., retinal or subretinal hemorrhage, bacterial infection) were excluded from further analyses.

Luciferase assay

Procedures used for the luciferase assay have been described previously (Ikeda *et al.*, 2002). ARPE-19 cells and enucleated mouse eyes were treated with 1× lysis buffer (Promega, Madison, WI) with a protease inhibitor cocktail and centrifuged, and then 20- μ l samples of the supernatants were mixed with 100 μ l of luciferase assay buffer. Light intensity was measured with a luminometer (model LB 9507; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) with 10-sec integration.

Detection of GFP expression in vivo and indocyanine green angiography

GFP expression in the mouse retina was examined with a scanning laser ophthalmoscope (Heidelberg retinal angiograph; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany), using a 488-nm excitation laser light and a 500-nm barrier filter. Indocyanine green (ICG) angiography was performed 7 min after intraperitoneal injection of 0.2 ml of 10% ICG, using a 795-nm excitation diode laser light and an 810-nm barrier filter, as previously described (Janssen *et al.*, 2008).

Histological examination

Mouse eyes were enucleated, and both paraffin and cryosections were prepared. To prepare the paraffin sections, the eyes were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 24 hr, and were then mounted in paraffin. For the cryosections, the eyes were frozen in liquid nitrogen, and 5- μ m-thick sections were prepared along the horizontal meridian. The sections were subsequently stained with hematoxylin and eosin. The number of cells in the outer nuclear layer was counted per 250 μ m at six points around the retinal section (A1–A3, from the ora serrata to the optic nerve of the temporal hemisphere; A4–A6, from the optic nerve to the ora serrata of the nasal hemisphere).

Immunohistochemistry

Five-micrometer-thick cryosections were cut, air dried, and fixed in cold acetone for 10 min. The sections were blocked with 3% nonfat dried milk and labeled with rabbit anti-GFP polyclonal antibody (diluted 1:300; Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR) at 4°C for 24 hr. After biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (diluted 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA) was applied as a secondary antibody, the cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated streptavidin (diluted 1:100; BD Biosciences, San Jose, CA). After labeling, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to counterstain the nuclei. Immunofluorescence images were acquired with an Olympus BX51 microscope with a fluorescence attachment (Olympus, Tokyo, Japan). For negative controls, the primary antibody was omitted.

Enzyme-linked immunosorbent assay

The protein content of mouse eyes was determined with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for human PEDF (not available for mouse PEDF; Chemicon International, Temecula, CA) and human sFlt-1 (not available for mouse sFlt-1; R&D Systems, Minneapolis, MN). For the preparation of ocular tissue, conjunctival and muscular tissues were removed from enucleated eyes. The eyes were

washed with PBS, minced with scissors in 500 μ l of 1× lysis buffer with a protease inhibitor cocktail, and centrifuged at 15,000 rpm for 5 min at 4°C. The supernatants were subjected to ELISA according to the manufacturer's instructions.

Laser-induced CNV

Laser photocoagulation (630 nm, 150 mW, 0.1 sec, 75 μ m) was performed on one eye (four spots per eye) of each animal, using a slit-lamp delivery system (NIDEK, Aichi, Japan), as previously described (Tsutsumi *et al.*, 2003). Burns were performed at the 2, 5, 7, and 10 o'clock positions around the optic disk such that two laser-treated sites were within the vector-injected area, and the other two laser-treated sites were located outside of that area. Laser injury disrupted the RPE, Bruch's membrane, and choroid, and induced the subsequent proliferation and migration of choroidal endothelial cells, resulting in CNV. On day 14 after the laser induction of injury, the eyes were enucleated and fixed with 4% paraformaldehyde. The eyecups, obtained by removing the anterior segments and the entire neural retina, were incubated with FITC-conjugated isolectin B4 (Vector Laboratories) at 4°C for 24 hr. Then, CNV was visualized by Olympus BX51 fluorescence microscopy, and the area was measured with National Institutes of Health (Bethesda, MD) ImageJ software.

Transmission electron microscopy

The eyes were enucleated, and the posterior segments were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer with 0.08 M CaCl₂ at 4°C. Sections of retina, RPE, and choroid complex in the vector-injected area were postfixed for 1.5 hr in 2% aqueous OsO₄, dehydrated in ethanol and water, and embedded in Epon. Ultrathin sections were cut from blocks and stained with saturated, aqueous uranyl acetate and Sato's lead stain. The specimens were observed with a Hitachi H-7650 electron microscope (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan).

Statistical analyses

All values are expressed as means \pm SD. Statistical differences were assessed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer adjustments for multiple comparisons. Numbers per group are as indicated. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

SeV-F/HN-SIV vectors require only a brief vector–cell interaction to achieve efficient gene transfer

We previously demonstrated that recombinant Sendai viral (rSeV) vectors exhibited efficient gene transfer into the RPE of the rat retina with a brief exposure time (Ikeda *et al.*, 2002). To determine whether SeV F- and HN-pseudotyped SIV vectors would be capable of rapid and efficient transfection, we first investigated the vector–cell interaction time-dependent transgene expression level. In a human RPE-derived cell line, ARPE-19, conventional VSV-G-pseudotyped SIV (VSV-G-SIV) vectors encoding luciferase showed an interaction time-dependent increase in luciferase expression, and more than 24 hr of exposure was required to achieve maximal gene transfer (Fig. 1A). In contrast, with SeV-F/HN-SIV-luciferase, only 1 min of exposure yielded efficient luciferase expression at

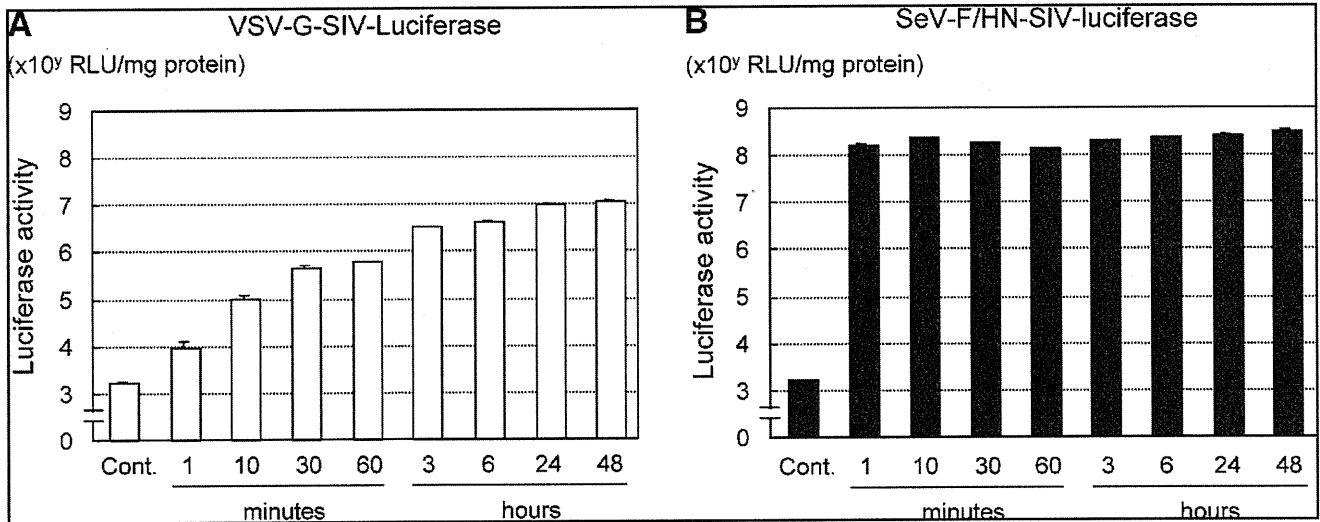


FIG. 1. Effect of vector-cell interaction time on gene transfer to ARPE-19 cells. (A and B) ARPE-19 cells were exposed to (A) VSV-G-SIV-luciferase or (B) SeV-F/HN-SIV-luciferase at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for each time period, and the cells were washed three times with PBS ($n = 4$ each). Forty-eight hours later, the cells were subjected to luciferase assay. VSV-G-SIV vectors required more than 24 hr of exposure time to achieve maximal gene transfer, whereas only 1 min of exposure was sufficient for SeV-F/HN-SIV vectors to reach the maximal expression level. (Note the log scale.) Cont., control; RLU, relative light units.

levels similar to those observed with 48 hr of exposure (Fig. 1B). Moreover, the luciferase expression levels achieved with SeV-F/HN-SIV vectors were more than 10-fold higher than the peak value obtained with VSV-G-SIV vectors (Fig. 1A and B).

Next, we assessed the *in vivo* transduction efficiency of SeV-F/HN-SIV vectors in the mouse retina. To assess the

effects of vector-cell interaction time on retinal gene transfer, we subretinally injected the SIV vectors by one of two different techniques, that is, either the vector solution was left in the subretinal space (*leave*), or the solution was removed 5 min after vector injection (*remove*). In eyes treated with VSV-G-SIV-luciferase, transgene expression in the *remove*

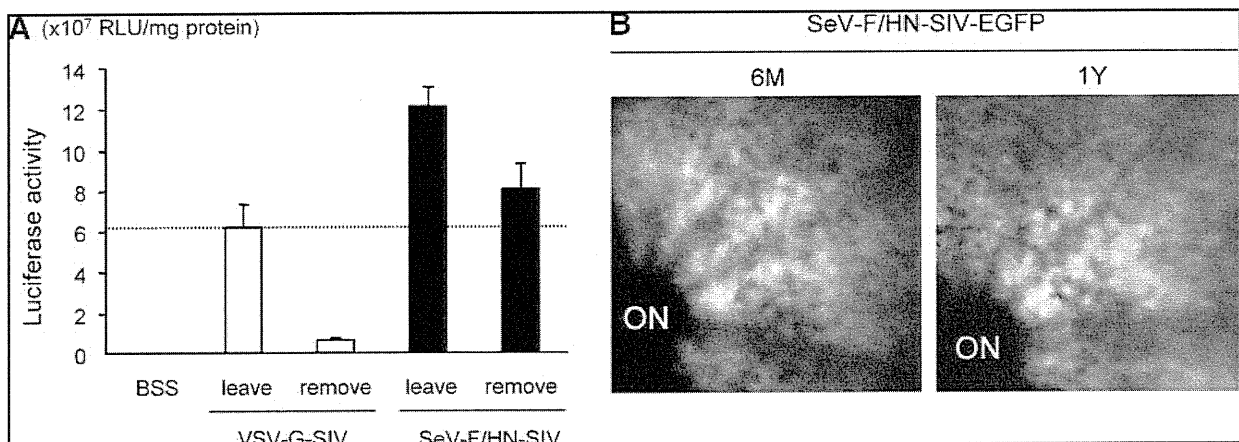


FIG. 2. SeV-F/HN-SIV vector-mediated retinal gene transfer with brief exposure time. (A) Effect of vector exposure time *in vivo*. VSV-G-SIV-luciferase or SeV-F/HN-SIV-luciferase was injected into the subretinal space of mice by two different techniques: simple injection (*leave*), or removal 5 min after injection (*remove*). The eyes were subjected to luciferase assay 2 weeks after gene transfer ($n = 5$ or 6). (B) Retinal GFP expression in eyes treated with SeV-F/HN-SIV-EGFP. GFP fluorescence was assessed by scanning laser ophthalmoscopy 6 months (6M) and 1 year (1Y) after vector injection. ON, optic nerve. (C) Immunohistochemical staining for GFP in retina treated with SeV-F/HN-SIV-EGFP. Arrows indicate staining in the retinal pigment epithelium (RPE). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar, 100 μ m.

