

2. Ikeda Y: (Symposium) Phase I clinical study of a third-generation simian immunodeficiency virus (SIV)-based lentiviral vector carrying human pigment epithelium-derived factor (PEDF) gene for patients with retinitis pigmentosa. 2014 Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (Orlando, USA) 2014. 5. 4-8.

3. Ikeda Y, Ishibashi T, et al.: Phase I clinical study for patients with retinitis pigmentosa: interim report of initial 5 subjects (low-titer group). 22nd Anniversary Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (Hague, Netherlands) 2014. 10. 23-26.

4. 池田康博: (シンポジウム) 硝子体手術と遺伝子治療の融合. 第 68 回 日本臨床眼科学会. 2014 年 11 月 13-16 日、神戸

5. 池田康博: (シンポジウム) 網膜色素変性に対する遺伝子治療. 第 53 回 日本網膜硝子体学会総会. 2014 年 11 月 28-30 日、大阪

6. 池田康博: (指定演者) Phase I clinical study for patients with retinitis pigmentosa. : interim report of initial 5 subjects (low-titer group) 第 5 回 国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム. 2015 年 1 月 15 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表：ベクターの品質管理試験

	項目	概要	規格値
1	粒子力価測定 (Vp)	ベクターゲノム内の WPRE をターゲットにしたリアルタイム PCR 法による粒子力価の測定	規定値
2	機能力価測定 (TU)	抗 PEDF 抗体を用いた細胞免疫染色法による機能力価の測定	規定値
3	PCR of gene of interest	PCR 法による PEDF 遺伝子の確認	目的断片の確認
4	SDS-PAGE	SDS-PAGE により分離したタンパク質の CBB 染色による分析	目的バンドの確認
5	タンパク質濃度	Bradford 法によるタンパク質濃度の測定	規定値
6	微生物限度試験	直接培養法による微生物群の分析	陰性
7	無菌試験	細胞溶解液接種による無菌試験 (直接法)	陰性
8	マイコプラズマ否定試験	PCR 法によるマイコプラズマ否定試験	陰性
9	マイコプラズマ否定試験	培養法	陰性
10	ウイルス混入否定試験	PCR 法によるウイルス混入否定試験	陰性
11	異常毒性試験	マウス腹腔内注射による異常毒性試験	陰性
12	電子顕微鏡検査	細菌、真菌の混入否定検査	陰性
13	エンドトキシン	ゲル化法によるエンドトキシンの測定	<10 EU/ml
14	細胞由来 DNA 濃度測定	ドットブロット法による細胞由来残存 DNA 濃度の測定	10ng/dose
15	BSA 濃度測定	ELISA 法による残存 BSA 濃度の測定	50ng/dose
16	Benzonase 濃度測定	ELISA 法による残存ベンゾナーゼ濃度の測定	規定値 ≤ pg/ml
17	増殖性レンチウイルス (RCL)	PCR 法による増殖性レンチウイルス (RCL) 否定試験	陰性
18	In vitro 遺伝子発現	ELISA 法による PEDF タンパク質濃度の測定	規定値 ≥ ng/ml
19	PEDF 濃度測定	ELISA 法による製品中における PEDF タンパク質濃度の測定	規定値 ≤ ng/ml
20	PCR for E1A, E1B, SV40 large T antigen	PCR 法によるアデノウイルス E1A, E1B, SV40 ラージ T 抗原の検出	情報確認
21	充填量	充填量の確認	規定値
22	pH	pH の測定	規定値
23	外観	目視による外観の検査	無色、透明～やや白濁

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
池田 康博	網膜色素変性に対する 遺伝子治療の実際と 可能性	あたらしい眼 科	3 2 卷	203-208	2015年

IV . 研究成果の刊行物・別刷

網膜色素変性に対する遺伝子治療の 実際と可能性

Current and Future Gene Therapy for Patients with Retinitis Pigmentosa

池田 康博*

はじめに

われわれ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 (quality of life) を著しく低下させ、社会活動は大幅に制限される。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となった。一方、網膜色素変性 (retinitis pigmentosa : RP) などのように現時点で有効な治療法が確立されていない疾患も数多く存在しており、早期の治療法開発が望まれている。このような難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている方法の一つが、遺伝子治療である。

2001年には米国のジョーンズ・ホプキンス大学において、加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration : AMD) に対する遺伝子治療の臨床プロトコルが提出され¹⁾、眼科領域における遺伝子治療の臨床応用の幕が開けた。これまでに、網膜芽細胞腫²⁾、AMD³⁾、レーバー先天盲 (Leber's congenital amaurosis : LCA)^{4~6)} という疾患に対する遺伝子治療臨床研究が報告されている。本稿では、平成25年3月よりスタートしたアジア初となるRPに対する遺伝子治療臨床研究を中心に遺伝子治療について紹介する。

I 遺伝子治療という治療法

RPは網膜に発現する分子の遺伝子異常によって、最終的には視細胞死 (アポトーシス) が生じる疾患である。

分子遺伝学の発展により、これまでに多くの原因遺伝子が同定されているが、遺伝子診断にとどまらず、病態の理解や治療にまで応用しようとするのは自然な発想であろう。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、この場合、欠陥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、そのためには遺伝子相同組換えという技術を用いる必要があるが、相同組換えの効率が非常に低いことから、現時点で実現はむずかしい。そこで、現実的には、遺伝子異常を有する細胞に単に正常遺伝子を補充する (異常な遺伝子はそのまま残る) 方法が取られているが、この方法では異常な遺伝子が機能を失うタイプのもの (ロスオブファンクション異常) にしか対応できないという欠点がある。また、RPは原因遺伝子が多岐にわたるため、特定の遺伝子を対象とした場合、対象患者が限られてしまうことが考えられる。

一方、遺伝子治療技術が具体化するにつれ、「遺伝子を用いて治療する」方法が考えられるようになった。RPに対しても、神経栄養因子 (毛様体由来神経栄養因子 : CNTF, 色素上皮由来因子 : PEDF など) やアポトーシス阻害因子 (Bcl-2 など) を網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelium : RPE) や視細胞に遺伝子導入することで、基礎研究の段階ではあるが視細胞死を抑制できることが明らかとなっている^{7~9)}。また、最近では網膜神経節細胞に光を感受する遺伝子 (channelrhodop-

* Yasuhiro Ikeda : 九州大学大学院医学研究院眼科学分野
〔別刷請求先〕 池田康博 : 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学大学院医学研究院眼科学分野

sin-2) を遺伝子導入することで、網膜神経節細胞に光を感受する機能を賦与するという方法も開発されている^{10,11)}。このような方法の場合、遺伝子の欠陥は修正されないことから根本的な治療法にはなりえないものの、遺伝子異常の種類にかかわらずより多くの患者を対象とできる点で有利である。

II レーバー先天盲 (LCA) に対する遺伝子治療

LCA は、1869 年 Leber によって報告された RP の類縁疾患で、生後早期 (多くは生後 6 カ月以内) より高度に視力が障害される¹²⁾。これまでに 16 種類の原因遺伝子が同定されており、ほとんどが常染色体劣性遺伝の形式をとる。80,000 出生に 1~2 人の頻度で認められ、先天盲の約 20% を占めるとされている。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。

RPE65 (*LCA2*) は RPE に発現し 11-cis-retinal の産生にかかわるが、*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 *LCA2* に対する遺伝子治療法として、アデノ随伴ウイルス (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 *LCA2* 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¹³⁾。2007 年 2 月より英国のグループによって、また 2007 年 9 月より米国ペンシルバニア大学のグループによって、ヒト *LCA2* 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^{4~6)}。

英国での臨床研究では、17~23 歳の *LCA2* 患者 3 名に対して、AAV ベクターが網膜下投与された。その結果、1 名 (症例 3) 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⁴⁾。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 名とも対光反応および視野に改善を認め、うち 2 名では視力の改善も認めたと報告されている⁵⁾。同様に、米国フロリダ大学とペンシルバニア大学の共同研究グループからの報告でも、1 年間の経過観察

期間に重篤な副作用がないこと、光に対する感度が上昇した症例があることが示されている⁶⁾。

このように、*LCA2* に対する遺伝子治療は安全性と治療効果が複数の施設で確認され、症例も着実に積み重ねられている。より若年の症例を適応とすることにより、さらに高い治療効果が期待される。

III 網膜色素変性 (RP) に対する視細胞保護遺伝子治療のコンセプト

RP は網膜に発現するさまざまな分子の遺伝子異常によって最終的には視細胞死が生じるが、その共通するメカニズムは視細胞のアポトーシスと考えられている。われわれの視細胞保護遺伝子治療のコンセプトは、眼内に神経栄養因子を過剰発現させることにより、視細胞のアポトーシスを抑制しようというものである (図 1)。今回の臨床研究で使用する治療遺伝子は、PEDF という神経栄養因子である。複数の RP モデル動物において、この PEDF の遺伝子導入による視細胞のアポトーシス抑制効果が認められた^{9,14~16)}。PEDF 遺伝子を搭載したサル免疫不全ウイルス (SIV) ベクター (SIV-hPEDF) を RP 患者の網膜下に投与し、そこから分泌される PEDF 蛋白の視細胞保護作用により視細胞の喪失を防ぎ、RP 患者の視機能低下を防ぐことをめざす。

臨床応用にあたり、安全性を確認するための大型動物 (カニクイザル) を用いた急性毒性試験、長期安全性試験を実施し、眼局所ならびに全身に重篤な副作用を認めないことを明らかとし¹⁷⁾、次項で紹介する臨床研究実施計画を立案した。

IV 臨床研究実施計画

臨床研究実施計画の学内倫理委員会での審査は平成 18 年 7 月より開始され、承認までに約 2 年を要した。さらに、平成 22 年 10 月に厚生労働省へ実施計画を申請し、平成 24 年 8 月に厚生労働大臣より了承された。本臨床研究の主な目的は、SIV ベクターの眼内投与の安全性を確認することである (第 I 相臨床研究)。臨床研究実施計画の大まかな流れを図 2 に示す。まず第 1 ステージとして 5 名の被験者に低用量の臨床研究薬 (SIV-hPEDF) を投与し各々 4 週間観察し、急性期の異常が

神経栄養因子を使った視細胞保護療法

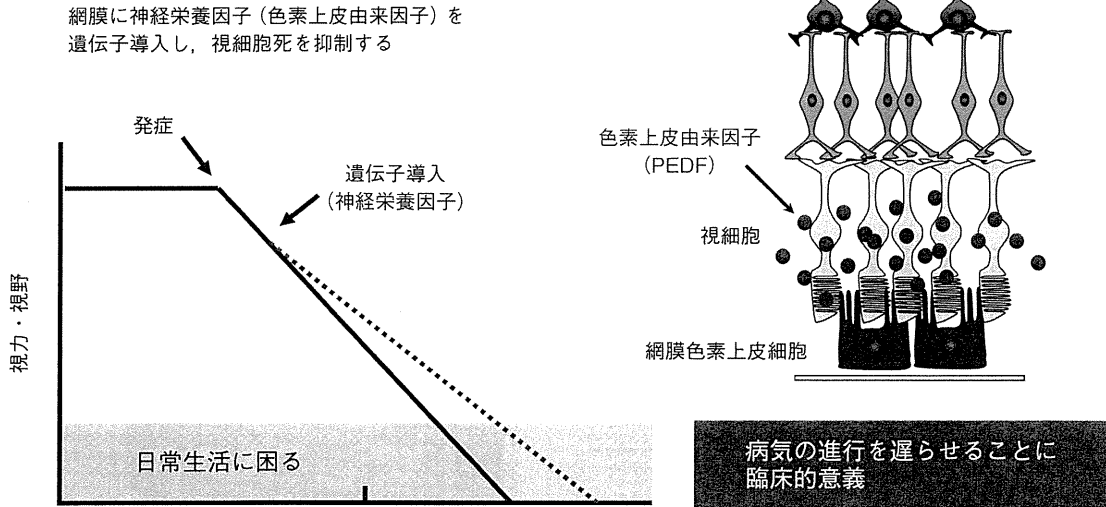


図1 視細胞保護遺伝子治療のコンセプト
網膜に PEDF を遺伝子導入し、分泌される PEDF 蛋白で視細胞死を防ぐ。

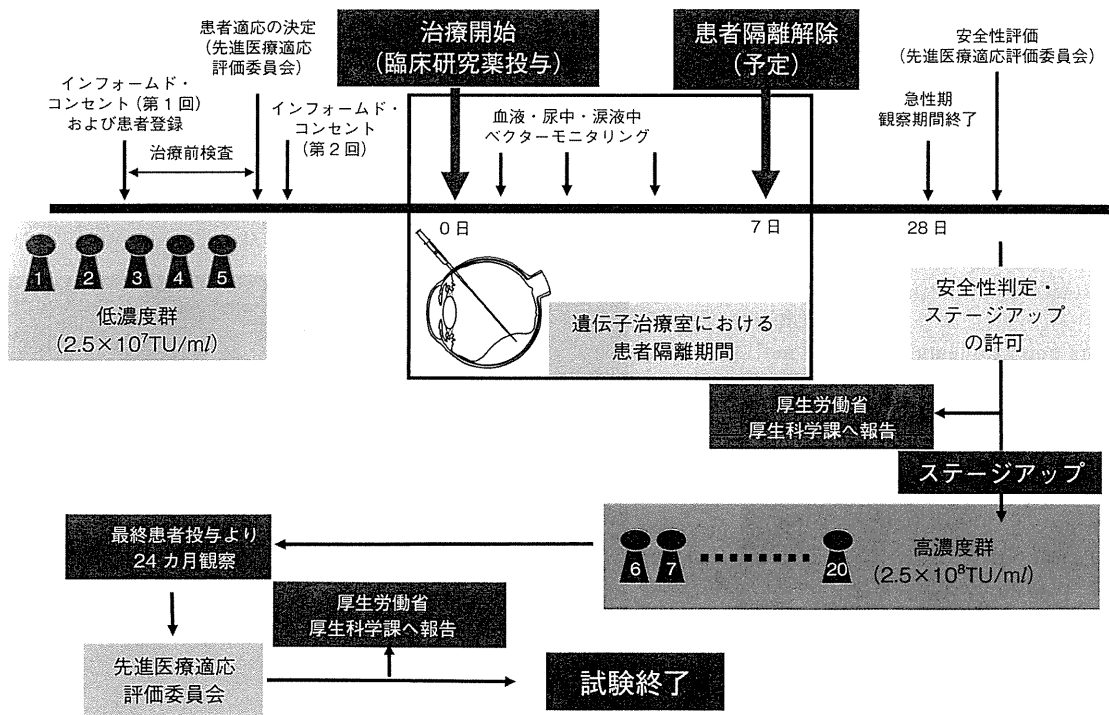


図2 視細胞保護遺伝子治療臨床研究のおおまかな流れ
臨床研究薬投与後1週間は遺伝子治療室で隔離状態となる。

認められないことを確認した後、第2ステージで15名の被験者に高用量の臨床研究薬を投与する計画となっている。それぞれの被験者は投与後2年間の経過観察を行うが、副作用の発生については終生追跡される予定である。

本臨床研究は、安全性の確認が主な目的となっているので、適応基準と除外基準が厳密に決められている(表1)。

V 臨床研究の経過と今後の可能性

平成25年3月26日より臨床研究はスタートし、こ

れまでに低用量群5名の被験者に臨床研究薬を投与した。平成26年6月に高用量群へのステージアップの承認を受け、高用量群への投与をスタートする予定である。

図3は第1症例での手術室の様子である。手術は、23ゲージでの硝子体切除術とし、後部硝子体剝離を作製したのちに41G網膜下注射針(ドルク社製)を用いて臨床研究薬を網膜下投与した(図4)。この際、黄斑部への投与を避けるように、原則4カ所に分けて計200 μ Lを行った(図5)。投与された臨床研究薬は、概ね1週間以内に吸収されるが、第3症例では臨床研究薬が吸収さ

表1 臨床研究の適応基準と除外基準

適応基準	
1.	40歳以上の網膜色素変性患者
2.	1年以上九州大学病院で定期的に経過観察中で、病状が安定していると判断された患者
除外基準(一部抜粋)	
1.	失明している患者
2.	黄斑部合併症(黄斑上膜、黄斑浮腫など)のある患者
3.	緑内障を合併している患者
4.	網膜や網膜下に色変以外の病変(網膜出血など)を合併している患者
5.	心機能障害や肝機能障害など全身状態の悪い患者
6.	悪性新生物の既往のある患者
7.	妊娠または授乳中の患者 など



図3 第1症例の手術室の風景
筆者が術者となり臨床研究薬を投与した。

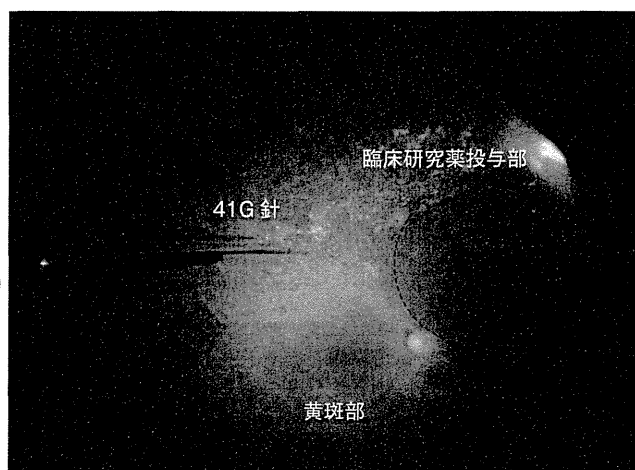
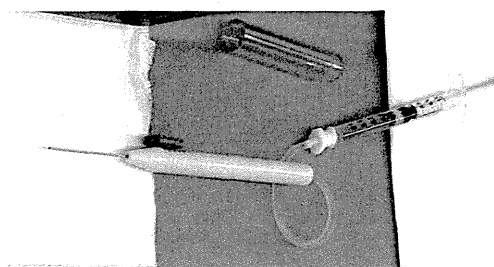


図4 左:ドルク社製41ゲージ網膜下注射針と臨床研究薬, 右:第3症例の術中写真
右眼に対して臨床研究薬を投与した。

れずに網膜剝離が遷延する状況になったため、投与2週間後に再手術を実施し、臨床研究薬の除去を実施した。本症例では、RPEが存在しない部分へ臨床研究薬を投与したために下液が吸収されなかったという結論となり、以後の症例では、投与前の光干渉断層計(OCT)による検査でRPEの層が確認された部分に網膜下投与を実施することに変更した。

また、この臨床研究に引き続き、平成29年度からの開始をめざして医師主導治験(Phase II)の準備を開始しており、視細胞保護遺伝子治療薬の薬事承認を目標に、治験で治療効果を確認したいと考えている。さらに、将来的には神経細胞保護遺伝子治療という観点から、網膜神経節細胞保護による緑内障に対する遺伝子治療も実現したいと考えている。使用する臨床研究薬や投与方法は網膜色素変性の場合とまったく同様のため、スムーズに移行できるのではないかと考えている。

文 献

- 1) Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro P et al : Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose-escalation study of ADGVPEDF.11D (ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Hum Gene Ther* **12** : 2029-2032, 2001
- 2) Chévez-Barríos P, Chintagumpala M, Mieler W et al : Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *J Clin Oncol* **23** : 7927-7935, 2005
- 3) Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM et al : 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
- 4) Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS et al : Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358** : 2231-2239, 2008
- 5) Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA et al : Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358** : 2240-2248, 2008
- 6) Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S et al : 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
- 7) Cayouette M, Gravel C : Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd)

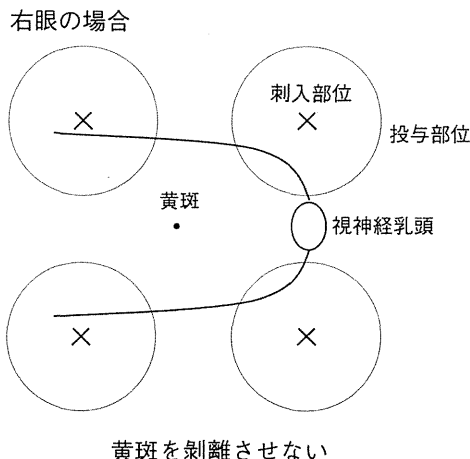


図5 臨床研究薬投与のイメージ(右眼の場合)
黄斑部を剝離させないように、原則4カ所に分けて臨床研究薬と投与する。

- mouse. *Hum Gene Ther* **8** : 423-430, 1997
- 8) Bennett J, Zeng Y, Bajwa R et al : Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. *Gene Ther* **5** : 1156-1164, 1998
- 9) Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y et al : 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
- 10) Bi A, Cui J, Ma YP et al : Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* **50** : 23-33, 2006
- 11) Tomita H, Sugano E, Yawo H et al : Restoration of visual response in aged dystrophic RCS rats using AAV-mediated channelopsin-2 gene transfer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48** : 3821-3826, 2007
- 12) Leber T : Uber retinitis pigmentosa und angeborene amaurose. *Graefes Arch Klin Ophthalmol* **15** : 1-25, 1869
- 13) Acland GM, Aguirre GD, Ray J et al : Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* **28** : 92-95, 2001
- 14) Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y et al : 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
- 15) Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y et al : 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
- 16) Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y et al : 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) Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M et al : 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

