

論文内容の要旨

Improved intravitreal AAV-mediated inner retinal gene transduction after surgical internal limiting membrane (ILM) peeling in cynomolgus monkeys

(訳) 内境界膜剝離はアデノ随伴ウイルスベクターの硝子体投与によるカニクイザルの網膜内層における遺伝子導入効率を改善する

日本医科大学大学院医学研究科 外科系感覚器視覚機能医学（眼科学）分野

大学院生 高橋 和久

Molecular Therapy Vol. 25 No 1 (2017) 掲載予定

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは安全性が高く、非分裂細胞にも遺伝子導入可能であることから網膜疾患で最も使用されている遺伝子導入ベクターであり、レーバー先天黒内障、コロイデレミア、加齢黄斑変性等の疾患に対して、現在臨床試験が進行中である。網膜に対するAAVベクターの投与経路として網膜下投与と硝子体投与が考えられる。網膜下投与は網膜外層における遺伝子導入効率が高く、臨床試験においてしばしば用いられる投与方法である。しかし網膜下投与はAAVベクターを視細胞と網膜色素上皮の間に投与する必要があり網膜剥離を医原性に作成しなければならず、合併症による視機能低下のリスクがある。一方、硝子体投与は網膜内層に遺伝子導入されやすく、また、網膜剥離を作成する必要がないため安全性が高い。しかしながら霊長類網膜に対する遺伝子導入効率が極端に低いことが問題点とされている。硝子体投与による遺伝子導入効率が低い原因として、網膜の内境界膜 (ILM) がAAVベクターによる遺伝子導入に対して物理的な障壁となっている可能性が考えられてきた。そこで今回、ILMをAAVベクター投与前に外科的に剥離することで遺伝子導入効率を改善させ得るか否かを検討した。

カニクイザル3匹の計6眼を2眼ずつ、無処置 (control) 群、硝子体切除 (VIT) 群、ILM剥離併用硝子体切除 (VIT+ILM) 群に分けて手術を行った。手術の4週後に、全ての眼球に対してGFPを発現する血清2型のカプシドチロシン変異型であるself-complementary AAVベクターを硝子体に50 μ l (1.9×10^{13} v. g. /mL) 投与した。AAVベクター投与19週後に眼球摘出を行い、抗GFP抗体を用いて網膜に対する遺伝子導入効率を組織学的に比較検討した。手術およびAAV投与の影響を、形態学的に評価するために眼底カメラ撮影および三次元断層撮影 (OCT) を行い、機能的に評価する目的で網膜電図 (ERG) を経時的に行った。また、GFPが発現している細胞種を特定するために、ミュラー細胞を特異的に染色する抗glutamine synthetase抗体 (抗GS抗体) を用いて2重染色を行った。

その結果、control群ではGFPの発現をほとんど認めなかった。同様にVIT群においてもGFPの発現をほとんど認めなかったが、ILM剥離を行ったILM+VIT群においてはGFPが強く発現していることが確認できた。GFP陽性細胞はILM剥離を行った領域に一致し、抗GS抗体陽性のミュラー細胞へ遺伝子導入されていた。眼底カメラ、OCT、ERGは手術の前後では変化を認めなかった。しかしながらAAVベクター投与2週後から6週後に、眼底カメラ撮影にて6眼中4眼に眼内炎を認め、同時期に網膜電図の電位が一過性に減少した。この眼内炎は一過性であり無治療でAAVベクター投与8週後までに寛解した。炎症寛解後は網膜の形態的および機能的な異常は認めなかった。

以上の結果から、AAVベクターの硝子体投与に際し、ILM剥離を併用することで、網膜内層への遺伝子導入効率を大幅に改善できることが判明した。この遺伝子導入法を用いることで、緑内障などの網膜内層疾患に対する遺伝子治療の実用化が期待される。