

【背景・目的】緑内障は、視神経と視野に特徴的変化を有する疾患であり、エビデンスに基づいた唯一確実な治療法は眼圧の下降である。しかし、眼圧下降治療に関わらず病態の進行を認める患者がいることから、眼圧下降に依らない新たな治療法の確立が急務である。緑内障の新規治療法としては神経保護治療が検討されている。神経保護治療は多くの場合、神経細胞死を抑制する物質の投与によって行われるが、その内数々の実験的緑内障モデルにおいて網膜神経節細胞保護効果が報告されているのが脳由来栄養因子 (BDNF) である。BDNF を治療薬として用いる際、治療標的である網膜神経へ到達させるには硝子体内投与が必要となる。しかし BDNF の半減期が短いがために単回投与では効果が不十分あり、実際に臨床で運用するには頻回投与が必要となるが、頻回の硝子体内投与は患者への負担が大きく現実的ではない。そこで、一度の投与で長期の治療効果を得るために、ベクターによる遺伝子治療が有効である。

本研究は緑内障の遺伝子治療を目標として、BDNF 発現アデノ随伴ウイルスの治療効果を網膜内層障害モデル (N-methyl-D-aspartate; NMDA 投与モデル) にて検討した。

【方法】実験には BDNF 発現自己相補性チロシントリプルミュータントアデノ随伴ウイルス (tm-scAAV2-BDNF) を使用した。8 週齢の C57BL/6J マウスに 1  $\mu$ L の tm-scAAV2-BDNF (6.6 E+13 genome copy/mL) を硝子体内投与した。コントロールとして GFP 発現自己相補性チロシントリプルミュータント AAV (tm-scAAV2-GFP) を同様に投与した。その 3 週間後に 1  $\mu$ L の 2 mM NMDA を硝子体内投与した。NMDA 投与 6 日後に暗順応網膜電図 (ERG) を施行し、投与 7 日後に眼球を採取した。採取した眼球を用いて導入遺伝子の RNA およびタンパク質発現量解析を行った。また摘出した眼球について後眼部の凍結包埋処理を行い、薄切切片を作製した。作製した切片はヘマトキシリン・エオジン染色および免疫染色 (網膜神経節細胞マーカー: Brn3a、炎症シグナルマーカー: Glial fibrillary acidic protein) を行い、それぞれ網膜内層厚、網膜神経節細胞数および炎症シグナル増減の比較を行った。

【結果】 tm-scAAV2-BDNF 投与群ではコントロール AAV 投与群と比較し、BDNF の RNA 発現およびタンパク質発現の顕著な増加が認められた。また tm-scAAV2-BDNF 投与群で、NMDA による網膜内層菲薄化が抑制され、その保護効果は特に網膜中心部で顕著であった。また

tm-scAAV2-BDNF 投与は網膜神経節細胞数減少および炎症シグナル上昇を抑制した。さらに暗順応 ERG においては、網膜内層障害の指標となる b 波振幅が tm-scAAV2-BDNF 投与群で有意に大きかった。

【考察】 これまでも網膜内層障害モデルへの BDNF 発現ウイルスの治療研究は報告されていたが、その治療効果は限定的だった。そのため AAV の導入効率を改善するために様々なベクター開発が行われてきた。チロシントリプルミュータント AAV は、外殻タンパク質である VP3 に存在するチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体であり、これによりユビキチン・プロテアソーム系による分解を回避できる。また自己相補性 AAV は、従来 1 本鎖 DNA である AAV ゲノムを 2 本鎖に改変することで動物細胞内での遺伝子発現効率を改善した変異 AAV である。今回、チロシントリプルミュータント AAV と自己相補性 AAV を組み合わせた tm-scAAV2-BDNF を使用することで、NMDA 誘発網膜障害に対する顕著な抑制効果を実現することが出来たと推察される。

【結論】 tm-scAAV2-BDNF の投与は、NMDA 投与による組織学的および機能的な網膜内層障害を抑制した。正常眼圧緑内障を含めた網膜内層障害に対して tm-scAAV2-BDNF が有効であると示唆された。