

眼科分野における遺伝子導入法の開発

五十嵐 勉^{1,2} 三宅 弘一² 小林 舞香^{1,2} 高橋 和久^{1,2}
中元 兼二¹ 岡田 尚巳² 高橋 浩¹

¹日本医科大学眼科

²日本医科大学生化学・分子生物学（分子遺伝学）

New innovations for ocular gene therapy

Tsutomu Igarashi^{1,2}, Koichi Miyake², Maika Kobayashi^{1,2}, Kazuhisa Takahashi^{1,2},
Kenji Nakamoto¹, Takashi Okada² and Hiroshi Takahashi¹

¹Department of Ophthalmology, Nippon Medical School

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

Abstract

Adeno-associated virus (AAV) vectors are widely used for retinal gene transfer, and they are undergoing various clinical trials. Their popularity is due to the non-pathogenic nature of AAVs and their versatility in basic research and clinical applications; the excellent transduction efficiency of AAV vectors has boosted basic research and has facilitated the development of various technical innovation systems, such as AAV vector serotypes, self-complementary AAV vectors, tyrosine mutated AAV vectors and the routes of vector administration. However, while the transduction efficiency of intravitreal injections has increased markedly in rodents, it is still low in non-human primates. We have recently developed a new technique of intravitreal administration in macaque monkeys. In this review, we outline and discuss strategies for developing AAV vector systems and advancing intravitreal administration.

(日本医科大学医学会雑誌 2017; 13: 88-96)

Key words: gene therapy, adeno-associated virus (AAV) vector, glaucoma, retina, intravitreal injection

1. はじめに

遺伝子治療がはじまり 20 年の年月が過ぎた。2016 年の時点で、2,409 のプロトコルの元で臨床研究が実施されている¹。実施当初遺伝子治療は単一遺伝子疾患において異常遺伝子を補充するという試みから始

まった。故障した遺伝子の代わりに正常な遺伝子を入れようという発想である。現時点では遺伝子治療が示す意味はもっと広義となり、疾患の治療を目的に、原因遺伝子ではないがその疾患に対してプラスとなる遺伝子を患者の体内に発現させることも含まれてきている。これは、多因子、多遺伝子疾患も対象に入ることの意味している。

これまで米国で行われた遺伝子治療の結果としては当初期待されたほどの効果を上げることはできず、後述する多くの技術的問題に直面した。悪性腫瘍の場合、多くの対象例が、ほかに治療法がない患者であったため、生命予後などから臨床成績が不良となったことが考えられるが、期待される治療効果が得られていないことの主因として、これまでの遺伝子導入技術では遺伝子導入効率、発現量、発現期間、標的細胞への特異的発現など様々な問題点から治療に必要な発現レベルに達しないためと考えられる。このことから現在の遺伝子治療研究は既存のベクターを用いた臨床的研究から、ベクターの開発、改良を主とした基礎的研究が主流となり、研究の中心はベクターの性能向上に集中する方向へ移行してきた。本稿では、眼科分野で最も使用されているアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) ベクターを中心に、これまでの研究の流れと現在の状況について報告する。

2. AAV ベクターとその進化

遺伝子導入には、リボソームやエレクトロポレーションなどの物理的、化学的遺伝子導入法とウイルスベクターを用いた生物学的遺伝子導入法があるが、発現効率、発現期間などの点からウイルスベクターが主流となってきている。そのウイルスベクターにはレトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、AAVなどをベースにしたウイルスベクターがあり、様々な特徴を持つが、細かな違いなどは以前報告した総説をご覧ください²。現在、眼科疾患に対する遺伝子治療研究で最も使用されているウイルスベクターは AAV ベクターである。AAV ベクターは神経細胞などの非分裂細胞にも遺伝子導入できるため、網膜のような組織に対して非常に有利といえる。またウイルスとして、AAV は細胞障害性や病原性がないため安全性の点で優れたベクターである。野生型 AAV は 19 番染色体の特定の領域に組み込まれることが知られているが³、この組み込みは非相同組換えによるものであり非構造タンパク質 Rep が関与している^{4,5}。AAV ベクターは Rep 遺伝子を含まないように工夫されているためこの性質が失われており、導入遺伝子は核内には入るが、染色体に組み込まれずに留まるといわれている⁶。AAV ベクターにはいくつかの技術的なイノベーションがあり、眼科分野における報告と併せて見ていきたい。

2.1 AAV vector serotypes

現在 AAV ベクターは主に 12 種類のウイルス外殻 (カプシド) のベクターが開発されて来ている^{7,8}。組織特異性は、ウイルスのカプシドの種類によって決定され、AAV ベクターの血清型による指向性 (tropism) の範囲は、治療上重要となる。すなわち AAV のタイプが変わることで遺伝子導入が可能な細胞と導入効率が異なってくる。元来使用されてきた AAV ベクターは 2 型の AAV (AAV2) であり、欧米において世界初の眼科分野における遺伝子治療で用いられたベクターである。レーバー先天性黒内障に対する AAV ベクターを用いた遺伝子治療が開始され治療効果を示しており、まさに AAV ベクターが脚光を浴びつつある^{9,10}。その成功を受けて、コロイデミア¹¹、X 連鎖網膜分離症などの先天性疾患にも治療が拡大してきている。2002 年、AAV1-6 まで開発され、網膜下投与では、AAV5 が最も高い遺伝子導入効率であると報告された¹²。さらに、2008 年、AAV9 までが開発され、AAV8 や AAV9 の有用性が報告された¹³。これを受けてわれわれも有用な可能性が高い AAV5, 8 などを比較したところ、AAV8 が網膜下投与で高い遺伝子導入効率があると報告した¹⁴。また硝子体投与でも AAV8 が高い遺伝子導入効率を示すことを報告した¹⁵。

2.2 Self-complementary (sc) AAV Vector

一般的な AAV ベクターである single strand (ss) AAV ベクターは、ゲノムが一本鎖 DNA (linear single-stranded DNA (ssDNA)) であるため、遺伝子発現が起こるには細胞の核内において二本鎖になる必要がある¹⁶。そのため十分な遺伝子発現量を得るには、膨大な量のベクターが必要であることや、遺伝子発現がピークに達するのに 2~3 週間程度時間がかかることも関連していると考えられる。それに対して自己相補型 (self-complementary AAV (scAAV)) vectors というベクターが開発された^{17,18}。このベクターは挿入できる遺伝子サイズは半減するものの、分子内に相補的な配列を有するゲノム構造を持ち、プラス鎖とマイナス鎖が繋がった状態でカプシドに包まれたベクターで、標的細胞内でただちに二本鎖の状態になることから早期の遺伝子発現と高い遺伝子発現が可能となってきた。

2.3 チロシン変異 (tm)-scAAV ベクター

これまで、AAV2 は主レセプターとして Heparan sulfate proteoglycan (HSPG)¹⁹ を、副レセプターとし

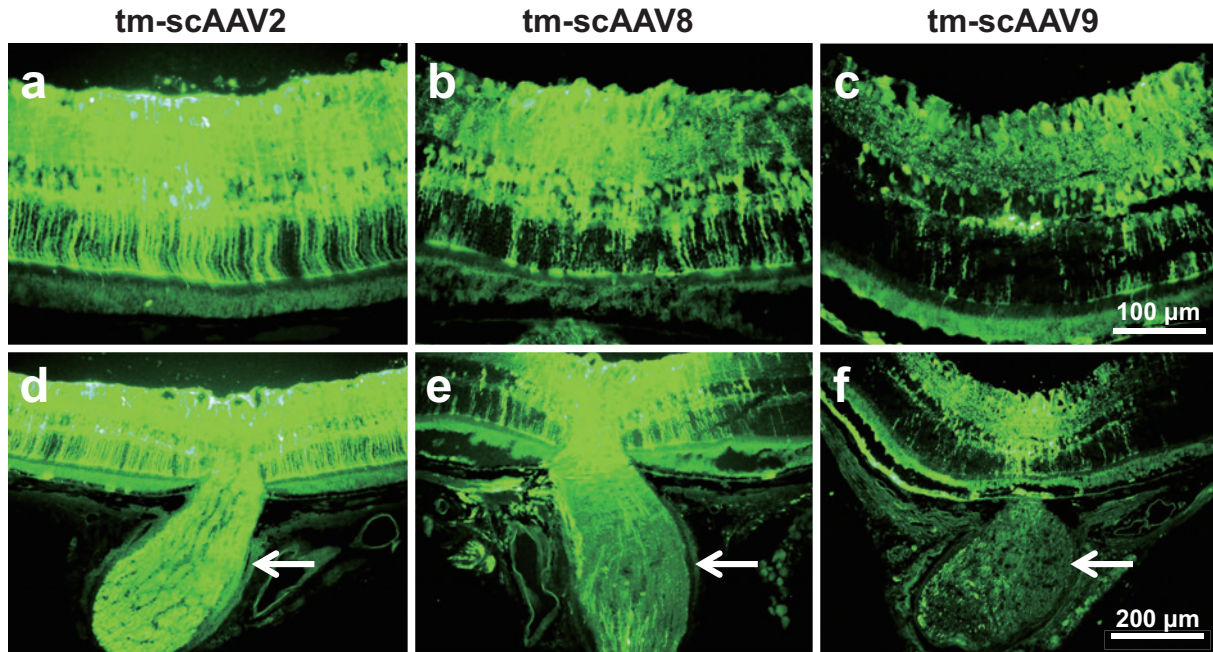


図1 マウス網膜におけるチロシン変異 (tm)-scAAV-GFP ベクターの遺伝子発現
tm-scAAV2, 8, 9で比較したところ (a~c), タイプ2で最も高い遺伝子発現を認めた. また, 視神経の遺伝子発現を免疫染色にて比較したところ (d~e), やはりタイプ2で最も高い遺伝子発現を認めた. 視神経 (矢印) は網膜神経節細胞の神経線維であることから, 網膜神経節細胞に高い遺伝子導入がなされたことを意味する. (変異はチロシンをフェニルアラニンに置換; AAV2: Y730+500+444F (triple mutant), AAV8: Y733F, AAV9: Y731F)

て fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)²⁰, $\alpha V\beta 5$ ²¹, hepatocyte growth factor receptor (MET)²² を介して感染すると報告されてきた. 2016年, Pillayらはゲノムワイドスクリーニングにより AAV2の感染における本質的なレセプターとして膜貫通型タンパク質の同定を報告した²³. このようなレセプターを介して, AAV2のウイルス粒子はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる. 細胞内では, リソソームを介する経路とユビキチン-プロテアソームシステムによる経路で分解される. AAV2はエンドソームの酸性環境下においてウイルス外殻の構造変化をきたしユビキチン化され, AAVの核輸送が阻害され遺伝子導入効率が低下すると考えられている²⁴. ユビキチン化されるには, 上皮成長因子受容体プロテインチロシンキナーゼ (epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase; EGFR-PTK) により AAV2外殻タンパクがリン酸化されることにより生じるが²⁵, EGFR-PTKのリン酸化の標的となっているのがチロシン残基であり, そのチロシン残基をフェニルアラニンに置換したチロシン変異 (tm)-scAAVベクターはユビキチン化が阻害され核輸送が促進し, 遺伝子導入効率を上昇されることに成功した²⁶. これらの tm-scAAVベクターは眼科分野においても, 非常に

高い遺伝子導入効率を示し, 特に硝子体投与による遺伝子発現が格段に上昇した^{27,28}. このような遺伝子導入効率の検討を行う研究では, 緑色の吸光度 (509 nm) の蛍光を発する Green fluorescent protein (GFP) がしばしば用いられる. 図1では緑色に光っているところが遺伝子導入部位となる. われわれは上述した AAV vector serotypesの項で説明した, 血清型の異なる, タイプ2, 8, 9の GFP発現 tm-scAAVベクター (tm-scAAV-GFP) を作製し, マウス硝子体に投与し比較検討したところ tm-scAAV2ベクターが非常に高い遺伝子導入効率を持つことが分かった. 現在, tm-scAAVベクターを用いた遺伝子治療研究が数多く展開されてきている.

3. 網膜への遺伝子導入方法

3.1 硝子体投与と網膜下投与

網膜への遺伝子治療における投与方法としては, 網膜下投与と硝子体投与の2種類が考えられるが, これまで多くの AAVベクターの投与方法は, 網膜下投与という方法を取ってきた. 網膜下投与の有利な点としては, 硝子体投与よりも遺伝子導入効率が高く, 治療可能な遺伝子発現量を得やすいという特徴を持つ. その

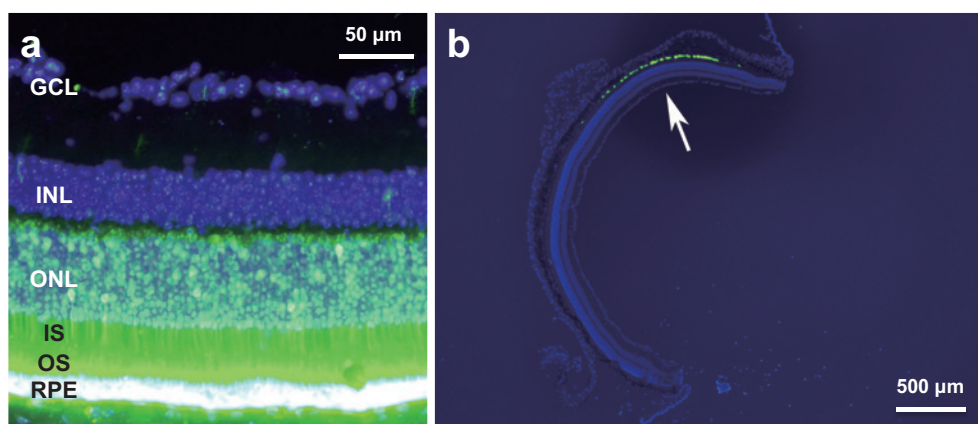


図2 マウスにおける ssAAV8-GFP ベクターの網膜下投与における遺伝子発現免疫染色にて確認したところ、網膜下投与は、網膜色素上皮細胞および視細胞（外果粒層～外節）に遺伝子導入されるが（a）、投与部位に限局しており（b；矢印）、投与されたベクターが接触した組織のみ遺伝子導入される。（GCL：神経節細胞層，INL：内果粒層，ONL：外果粒層，IS：内節，OS：外節，RPE：網膜色素上皮細胞）

半面、網膜下投与では医原性の網膜剥離を作製するため、視機能の低下をもたらすこと、特に黄斑部の場合、視力低下をもたらすことや、網膜剥離が起きた場所にしか遺伝子導入が生じないというデメリットがある。図2はssAAV8ベクターを網膜下投与したものであるが、投与部位に限局して網膜外層である網膜色素上皮細胞および視細胞に遺伝子導入されていることを示している。すなわち、投与されたベクターが接触した組織のみに遺伝子導入される。われわれは、以前ssAAV8ベクターを用い、網膜下投与と硝子体投与における遺伝子発現の比較を1年間かけて行った¹⁵。遺伝子発現量は投与された部分では圧倒的に網膜下投与のほうが高い遺伝子導入効率であったが、眼球全体で比較するとほぼ同等の遺伝子発現量で、硝子体投与では広範囲に弱い遺伝子発現が見られた。しかしながら網膜電図（ERG）で網膜の機能を見ると、硝子体投与では網膜機能の低下は見られなかったが、網膜下投与において機能の低下が見られ、病理組織で観察したところ、一部に視細胞の全欠損が見られた。レーバー黒内障の臨床試験においても網膜下投与では、黄斑部における網膜厚の低下と何例かの症例で視力低下を認めたと報告された²⁹。網膜下投与では、ベクターの力価や投与量など慎重に検討する必要があると考えられた。

3.2 硝子体投与と tm-scAAV ベクター

上述したような網膜下投与の副作用事象を受けて、現在、網膜外層に対しても網膜の内側である硝子体投与によって網膜外層に遺伝子発現ができないか、検討

が行われている。現在最も期待されている二つのAAVベクターとしては、上述したtm-scAAV2ベクターの一種で4カ所に変異を入れたquadruple（Y272, 444, 500, 730F）tm-scAAV2ベクター²⁷とtm-scAAV2ベクターをベースにerror prone PCRを用いて作製したtm-scAAV2ライブラリーより選択された、視細胞に最も入りやすい変異であった7m8と呼ばれるAAVベクターがある³⁰。特に7m8は硝子体投与で、レーバー黒内障のモデルであるRd12マウス³¹に対して、網膜最外層である網膜色素上皮において責任遺伝子であるRPE65遺伝子発現し治療効果を、網膜分離症のモデルであるRs1h^{-/-}マウス³²に対してRs1遺伝子発現し治療効果を報告している³⁰。また網膜内層へのAAVベクターとしては、triple（Y730, 500, 444F）tm-scAAV2ベクターが神経節細胞や網膜の指示細胞であるミュラー細胞において高い遺伝子発現を示す²⁷。図3aはわれわれのデータであるが、以前使用していたAAV8に比べtriple tm-scAAV2ベクターでは、マウス硝子体投与で網膜全体に高い遺伝子発現を認めている。

3.3 tm-scAAV ベクターによる治療効果の改善

われわれはこれまでAAVベクターを用いて治療効果を得られなかった実験系において、tm-scAAV2ベクターを用いることで、高い治療効果を得ることができた。具体的には、Renらはsingle strandのssAAV2を用いて脳由来神経栄養因子（brain derived neurotrophic factor；BDNF）をラット過性高眼圧モデルにおいて発現させ治療効果を検討したが、大幅

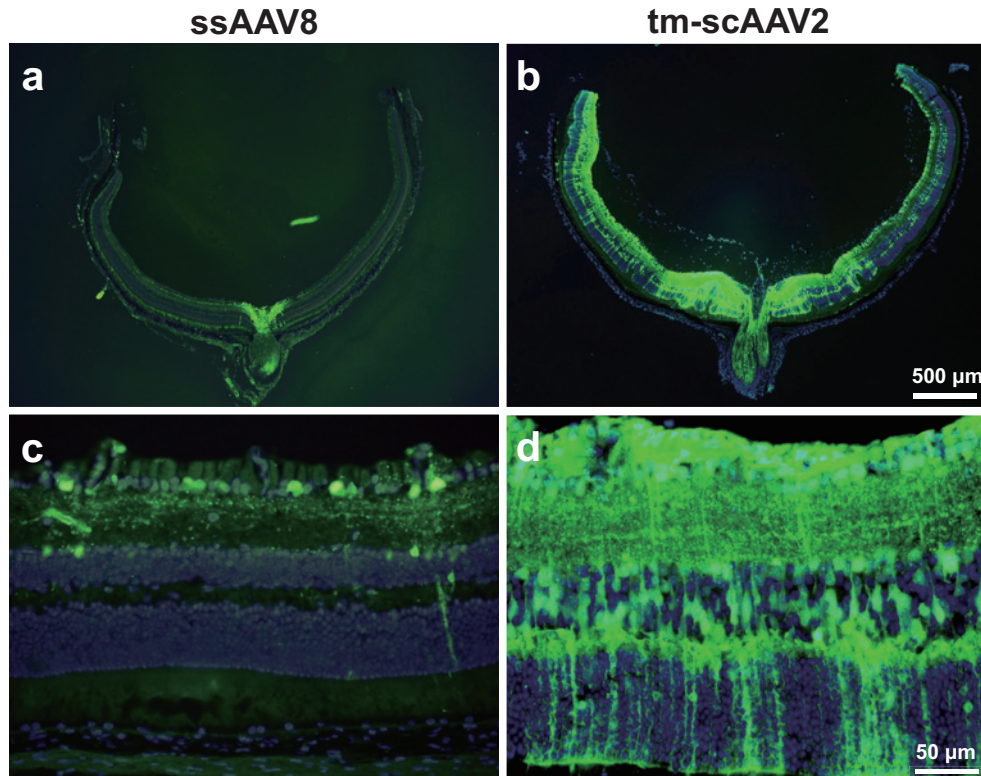


図3 マウスにおける ssAAV8-GFP ベクターと tm-scAAV2-GFP ベクターの硝子体投与における遺伝子発現
免疫染色にて比較したところ、ssAAV8-GFP ベクター (a, c) に比べ、tm-scAAV2-GFP ベクター (b, d) は硝子体投与において高い遺伝子発現を可能とした。

に神経が障害を受ける急性期に神経保護効果を示すことができなかった³³。一方われわれは tm-scAAV2 ベクターで BDNF を発現 (tm-scAAV2-BDNF) させることにより、網膜の RNA レベル (図 4a)、タンパク質レベル (図 4b) において高い BDNF 発現を確認した。ラット一過性高眼圧モデルにおいて検討したところ、図 4c のように BDNF を発現させた群では網膜内層の維持が計られ、80% 以上の神経節細胞が生存し続けた³⁴。図 4d では網膜内層厚を比較検討したが、有意に網膜内層厚の減少を防ぐことができた。このことは治療に必要なタンパク量がベクターにより供給できたからと考えられる。このような研究の流れがほかの疾患でも行われている。上述した網膜分離症の場合、モデルマウスに対して、オリジナルである ssAAV2 ベクターによって初めて治療効果が示された^{35,36}。その後、ssAAV8 ベクターの有用性が報告され^{37,38}、現在は 7m8 と呼ばれる tm-scAAV2 ベクターに最も期待が集まって来ている³⁰。

3.4 組織特異的プロモーターの活用

組織特異的プロモーターとは、ある組織のみで機能

し遺伝子を発現、すなわち転写の開始に関与する領域のことである。通常遺伝子治療で用いられるプロモーターとしては、どの細胞、組織でも強力に発現しやすい CMV (サイトメガロウイルス)、CBA (チキンβアクチン) などのプロモーターが選ばれる。一方、網膜ではロドプシン (rhodopsin) というプロモーターは特異的に視細胞でのみ発現する³⁹。網膜色素細胞であれば、RPE65 が特異的なプロモーターとして有名である⁴⁰。それ以外にも網膜の各細胞種における特異的なプロモーターが知られているが、一般的に発現が非常に弱いことが知られている。遺伝子導入効率を上昇させることは、このような組織特異性プロモーターの使用を可能とし、より安全な遺伝子治療の確立に寄与すると考えられる。すなわちロドプシン⁴¹や RPE65 などのプロモーターは視覚サイクルに関わるため、プロモーター活性が高く遺伝子治療研究で以前より用いられてきているが、ベクター側の遺伝子発現効率を上げることにより、今まで発現量が弱くて使用できなかった組織特異的プロモーターの使用も可能となると考えられ、より標的を絞った細胞にのみ遺伝子発現させ治療へつなげることが期待される。

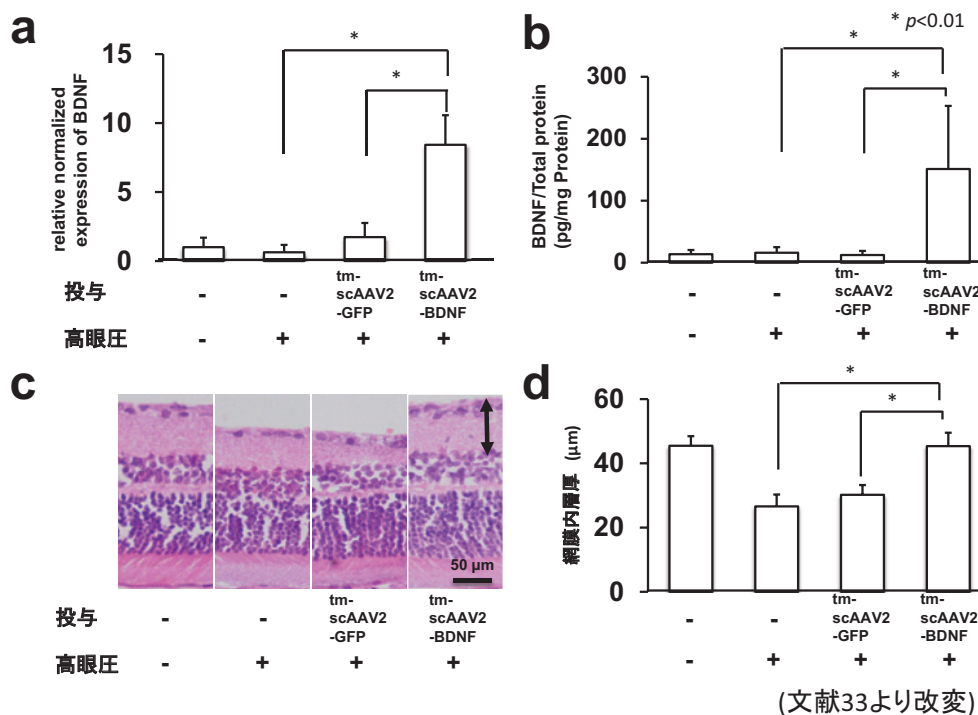


図4 tm-scAAV2ベクターによるBDNFの網膜神経保護効果

(a) 神経網膜内RNAレベルにおけるBDNFの発現, (b) 神経網膜内タンパク質レベルにおけるBDNFの発現. (c) 無処置群, 無処置高眼圧群, コントロールベクターであるtm-scAAV2-GFP群, tm-scAAV2-BDNF群の網膜組織像を示す. 網膜内層厚(矢印)がtm-scAAV2-BDNF群において保たれているのが観察される. (d) 各群における網膜内層厚を計測した. 無処置高眼圧群, tm-scAAV2-GFP群に比べ, tm-scAAV2-BDNF群では有意に内層厚の減少が抑制された.

4. 霊長類における硝子体投与

これまで述べてきたようにマウスなどの齧歯類に対しては硝子体投与による遺伝子導入により数多くの優れた報告がなされてきている. それに対して, 霊長類では黄斑近傍の限られた領域にしか遺伝子導入ができないと報告されてきており, 臨床的に考えると非常に大きな問題となっている⁴²⁻⁴⁵. 理由としては, 硝子体と網膜の間に介在する内境界膜 (Inner limiting membrane; ILM) の存在が考えられている⁴⁶. 物質が内境界膜を通過する際, 齧歯類に比べて霊長類のほうが生理的な障壁となっていると推測されていた^{47,48}. そこでわれわれは, 手術的に内境界膜剝離を行うことで, AAVの遺伝子導入効率を上げることができるか検討を行った. 網膜内層に入りやすいtm-scAAV2ベクターを硝子体注射するに当たり, ①硝子体投与のみ, ②硝子体手術+硝子体投与, ③硝子体手術+内境界膜剝離+硝子体投与の3群で比較検討したところ, 内境界膜剝離をした群のみで遺伝子導入効率が上昇した(図5)⁴⁹. 遺伝子導入パターンとしては,

内境界膜剝離を行ったところのみ遺伝子が導入されることやtm-scAAV2ベクターを使用したため齧歯類と同様にミュラー細胞および神経節細胞など網膜内層を主体に遺伝子導入が見られた. この技術の確立により, 硝子体からの臨床応用に弾みがつくと考えられる. また内境界膜剝離は眼科臨床において, 黄斑円孔などの疾患に対して日常的に行われている手術であり⁵⁰, 今回の研究ではERGで生理学的に検討したところ術後一過性の障害が認められたものの, 経過とともにほぼ正常化し, 安全性が確認された. その他, 世界的な最近の報告では, 高濃度の7m8 tm-scAAV2ベクターを用いて硝子体投与したところ, 遺伝子導入できたという報告⁵¹やAAV2を内境界膜下に注入し遺伝子導入できたという報告⁵²がなされている. 病理学的解析では内境界膜下に注入すると注入部位の網膜内層が破壊されていた. どちらの報告においても病理学的解析のみなので, 網膜電図のような生理学的な解析結果が待たれるところである.

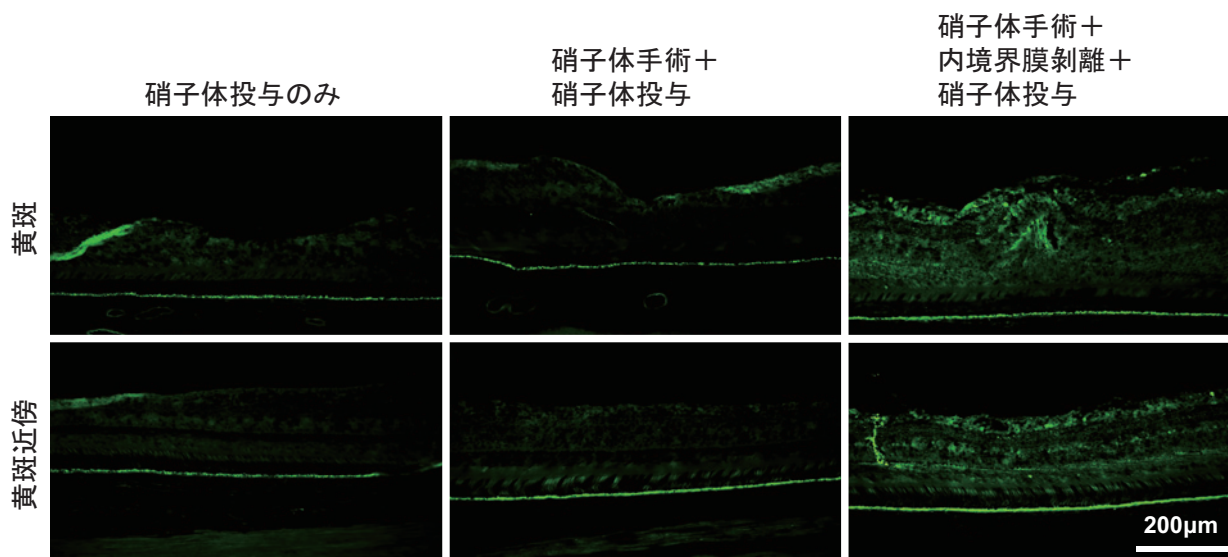


図5 サルにおける内境界膜剝離による遺伝子導入効率の上昇

霊長類における硝子体投与では、内境界膜が障壁になっていると考えられている。そのため、硝子体投与群、硝子体手術と硝子体投与群、硝子体手術、内境界膜剝離と硝子体投与群と比較検討した。使用したウイルスベクターは網膜内層に効率よく遺伝子導入できる tm-scAAV2-GFP を用いた。結果としては、硝子体投与群および硝子体手術と硝子体投与群では、ほとんど遺伝子導入されなかったが、内境界膜剝離を併用した群では、高い遺伝子導入を認めた。また予想されたとおり、内境界膜剝離を行わなかった部位では遺伝子導入をほとんど認めなかった。

5. おわりに

20年前遺伝子治療における眼科分野の研究者は非常に数少なかったが、網膜の標的組織が小さく少量のベクターで治療可能なこと、免疫の影響を受けにくい可能性があることや BBB (Blood-brain barrier) と呼ばれる血液-脳関門のような血液-網膜関門が存在するため、眼球内の投与による全身へのベクターの散布が非常に低いことから注目を集め、遺伝子治療分野で最も期待される分野へと成長した。日本では、眼科分野における研究者は今のところまだ少なく、今後この分野への研究者の増加が期待される。基礎研究の重要性はさることながら、臨床への道のりを考えたときトランスレーショナルリサーチの重要性も増してきている。今後新しいテクニックとベクターの最適化の研究が、臨床応用への鍵となるであろう。

文献

1. The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *American journal of ophthalmology* 1998; 126: 498-505.
2. 五十嵐勉, 島田 隆, 大原國俊: 遺伝子治療の基礎と眼疾患への応用. *あたらしい眼科* 2002; 19: 1185-1196.
3. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, et al.: Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *The EMBO journal* 1991; 10: 3941-3950.
4. Surosky RT, Urabe M, Godwin SG, et al.: Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *Journal of virology* 1997; 71: 7951-7959.
5. Urabe M, Hasumi Y, Kume A, et al.: Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein. *Journal of virology* 1999; 73: 2682-2693.
6. Malik AK, Monahan PE, Allen DL, et al.: Kinetics of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Journal of virology* 2000; 74: 3555-3565.
7. Schmidt M, Govindasamy L, Afione S, et al.: Molecular characterization of the heparin-dependent transduction domain on the capsid of a novel adeno-associated virus isolate, AAV (VR-942). *Journal of virology* 2008; 82: 8911-8916.
8. Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, et al.: Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *Journal of virology* 2008; 82: 1399-1406.
9. Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, et al.: Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Human gene therapy* 2009; 20: 999-1004.
10. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al.: Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine* 2008; 358: 2240-2248.
11. MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, et al.: Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial

- findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* (London, England) 2014; 383: 1129–1137.
12. Yang GS, Schmidt M, Yan Z, et al: Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *Journal of virology* 2002; 76: 7651–7660.
 13. Leberherz C, Maguire A, Tang W, et al: Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *The journal of gene medicine* 2008; 10: 375–382.
 14. Igarashi T, Miyake K, Masuda I, et al: Adeno-associated vector (type 8)-mediated expression of soluble Flt-1 efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. *Human gene therapy* 2010; 21: 631–637.
 15. Igarashi T, Miyake K, Asakawa N, et al: Direct comparison of administration routes for AAV8-mediated ocular gene therapy. *Current eye research* 2013; 38: 569–577.
 16. Russell DW, Kay MA: Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood* 1999; 94: 864–874.
 17. McCarty DM: Self-complementary AAV vectors: advances and applications. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2008; 16: 1648–1656.
 18. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ: Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene therapy* 2001; 8: 1248–1254.
 19. Summerford C, Samulski RJ: Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of virology* 1998; 72: 1438–1445.
 20. Qing K, Mah C, Hansen J, et al: Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature medicine* 1999; 5: 71–77.
 21. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ: AlphaVbeta 5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature medicine* 1999; 5: 78–82.
 22. Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, et al: Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Journal of virology* 2005; 79: 609–614.
 23. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, et al: An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 2016; 530: 108–112.
 24. Ding W, Zhang L, Yan Z, Engelhardt JF: Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene therapy* 2005; 12: 873–880.
 25. Zhong L, Zhao W, Wu J, et al: A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2007; 15: 1323–1330.
 26. Zhong L, Li B, Mah CS, et al: Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 7827–7832.
 27. Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, et al: Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2011; 19: 293–301.
 28. Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, et al: High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2009; 17: 463–471.
 29. Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, et al: Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill: 1960) 2012; 130: 9–24.
 30. Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, et al: In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Science translational medicine* 2013; 5: 189 ra76.
 31. Pang JJ, Chang B, Hawes NL, et al: Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Molecular vision* 2005; 11: 152–162.
 32. Molday LL, Wu WW, Molday RS: Retinoschisin (RS1), the protein encoded by the X-linked retinoschisis gene, is anchored to the surface of retinal photoreceptor and bipolar cells through its interactions with a Na/K ATPase-SARM1 complex. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282: 32792–32801.
 33. Ren R, Li Y, Liu Z, et al: Long-term rescue of rat retinal ganglion cells and visual function by AAV-mediated BDNF expression after acute elevation of intraocular pressure. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012; 53: 1003–1011.
 34. Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, et al: Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in a rat model of transient IOP elevation. *Molecular vision* 2016; 22: 816–826.
 35. Kjellstrom S, Bush RA, Zeng Y, et al: Retinoschisin gene therapy and natural history in the Rs1h-KO mouse: long-term rescue from retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007; 48: 3837–3845.
 36. Zeng Y, Takada Y, Kjellstrom S, et al: RS-1 Gene Delivery to an Adult Rs1h Knockout Mouse Model Restores ERG b-Wave with Reversal of the Electronegative Waveform of X-Linked Retinoschisis. *Investigative ophthalmology & visual science* 2004; 45: 3279–3285.
 37. Ou J, Vijayasarathy C, Ziccardi L, et al: Synaptic pathology and therapeutic repair in adult retinoschisis mouse by AAV-RS1 transfer. *The Journal of clinical investigation* 2015; 125: 2891–2903.
 38. Park TK, Wu Z, Kjellstrom S, et al: Intravitreal delivery of AAV8 retinoschisin results in cell type-specific gene expression and retinal rescue in the Rs1-KO mouse. *Gene therapy* 2009; 16: 916–926.
 39. Nathans J: Rhodopsin: structure, function, and genetics. *Biochemistry* 1992; 31: 4923–4931.
 40. Nicoletti A, Kawase K, Thompson DA: Promoter analysis of RPE65, the gene encoding a 61-kDa retinal pigment epithelium-specific protein. *Investigative ophthalmology & visual science* 1998; 39: 637–644.
 41. Palfi A, Chadderton N, O'Reilly M, et al: Efficient gene delivery to photoreceptors using AAV2/rh10

- and rescue of the Rho (-/-) mouse. *Molecular therapy Methods & clinical development* 2015; 2: 15016.
42. Ivanova E, Hwang GS, Pan ZH, Troilo D: Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010; 51: 5288-5296.
 43. Leberherz C, Maguire AM, Auricchio A, et al: Nonhuman primate models for diabetic ocular neovascularization using AAV2-mediated overexpression of vascular endothelial growth factor. *Diabetes* 2005; 54: 1141-1149.
 44. MacLachlan TK, Lukason M, Collins M, et al: Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01—a gene therapy for age-related macular degeneration. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2011; 19: 326-334.
 45. Yin L, Greenberg K, Hunter JJ, et al: Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011; 52: 2775-2783.
 46. Dalkara D, Kolstad KD, Caporale N, et al: Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2009; 17: 2096-2102.
 47. Fischer MD, Huber G, Beck SC, et al: Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography. *PloS one* 2009; 4: e7507.
 48. Snodderly DM, Weinhaus RS, Choi JC: Neural-vascular relationships in central retina of macaque monkeys (*Macaca fascicularis*). *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 1992; 12: 1169-1193.
 49. Takahashi K, Igarashi T, Miyake K, et al: Improved Intravitreal AAV-Mediated Inner Retinal Gene Transduction after Surgical Internal Limiting Membrane Peeling in *Cynomolgus* Monkeys. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2017; 25: 296-302.
 50. Kadonosono K, Itoh N, Uchio E, et al: Staining of internal limiting membrane in macular hole surgery. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill: 1960)* 2000; 118: 1116-1118.
 51. Ramachandran PS, Lee V, Wei Z, et al: Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina. *Human gene therapy* 2016.
 52. Boye SE, Alexander JJ, Witherspoon CD, et al: Highly Efficient Delivery of Adeno-Associated Viral Vectors to the Primate Retina. *Human gene therapy* 2016; 27: 580-597.

(受付：2017年2月9日)

(受理：2017年3月7日)