

## —特集 [遺伝子治療 update : 日本医科大学の遺伝子治療研究 (9)]—



## 眼科分野における遺伝子治療

五十嵐 勉

日本医科大学千葉北総病院眼科

日本医科大学生化学・分子生物学 (分子遺伝学)

## Gene Therapy for Ophthalmic Diseases

Tsutomu Igarashi

Department of Ophthalmology, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

## Abstract

In the field of ophthalmology, gene therapy has focused on hereditary retinal dystrophy, including retinitis pigmentosa. Hereditary retinal dystrophy is a group of intractable diseases for which there is currently no effective treatment, and expectations are focused on gene therapy and retinal regeneration therapy using iPS cells. In recent years, results of a number of clinical trials of gene therapies for hereditary retinal dystrophy have been reported from Europe and the United States. Since 2017, gene therapy drugs for Leber congenital amaurosis have been approved after being found to be safe and therapeutically efficacious. In this article, we will discuss the current state of gene therapy for retinitis pigmentosa and the use of adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy.

(日本医科大学医学会雑誌 2023; 19: 242-246)

**Key words:** gene therapy, ophthalmology, retina, retinitis pigmentosa, hereditary retinal disease

## はじめに

網膜色素変性 (RP) は遺伝子変異が原因で網膜の視細胞および色素上皮細胞が広範に変性する疾患である。多くは病初期に杆体の変性が現れる。杆体の変性が先行し、徐々に錐体の変性が生じる。そのため初期には、夜盲や視野狭窄を自覚し、その後、視力低下、羞明を自覚する。すべて両眼性であり、基本的には緩徐に進行し、中高年で高度な視力障害に至る。70種類以上の原因遺伝子が報告されており、わが国での有病

率は約 5,000 人に 1 人とされ、患者数は約 30,000 人と推定されている。RP はわが国における先天盲の第 1 位、中途失明原因で第 2 位である<sup>1</sup>。一方、RP を含む遺伝性網膜疾患の発症頻度は約 1,000~4,000 人とされ<sup>2</sup>、わが国では 50,000 人と推定されている<sup>3</sup>。RP が代表的な疾患であるが、それ以外にオカルト黄斑ジストロフィー (OMD)、錐体杆体ジストロフィー (CORD)、先天性停止性夜盲症、スターガルト病、Leber 先天盲など様々な疾患が含まれる。各疾患の原因遺伝子の

Correspondence to Tsutomu Igarashi, Department of Ophthalmology, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital, 1715 Kamagari, Inzai, Chiba 270-1694, Japan

E-mail: tutomu@nms.ac.jp

Journal Website (<https://www.nms.ac.jp/sh/jmanms/>)

表1 人網膜外植片に対する遺伝子導入効率

	AAV1	AAV2	AAV4	AAV5	AAV6	AAV8	AAV9
網膜外層	高	中	高	中	中	低	中

オーバーラッピングも認められ、300を超える原因遺伝子に対して、表現型・疾患メカニズムを理解するために今後も検討が必要である。

### 1. AAV ベクター

現在、AAV ベクターは、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。AAV ベクターについては、他稿で詳しく説明されているので、詳しくは省くが、神経細胞などの非分裂細胞にも遺伝子導入でき、神経組織である網膜に対して有用と考えられる。その 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、今後の研究を考える上で非常に重要なステップである。詳細に関しては、過去に本誌にてまとめているので、参考にして欲しい<sup>4</sup>。

#### (1) AAV vector serotypes

12種類のウイルス外殻(カプシド)が開発されて来た。ウイルスのカプシドの種類によって遺伝子導入効率は変わり、組織特異性は、遺伝子治療を考える上で重要である。欧米において Leber 先天盲に対し、世界初の眼科分野における遺伝子治療で用いられたのは、AAV2 ベクターである。2002年、AAV1-6が開発され、マウスの網膜下投与では、AAV5が最も高い遺伝子導入効率であると報告された<sup>5</sup>。その後2008年 AAV9までが開発され、AAV8や AAV9が高い遺伝子導入効率を持つと報告された<sup>6</sup>。われわれも 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<sup>7</sup>。しかしながら、マウスと人では、同じ網膜下投与でも特異性が代わると報告されてきている。人のサイトメガロウイルスのプロモーターを用いた AAV1~9までを、人の網膜外植片と共培養した結果では、AAV2よりも AAV1や AAV4の方が網膜外層への親和性が高いと報告された(表1)<sup>8</sup>。

#### (2) Self-complementary (sc) AAV Vector

一般的な AAV ベクターは、ゲノムが一本鎖 DNA (linear singlestranded DNA (ssDNA)) である。遺伝子発現のため、核内において二本鎖となる必要がある。有用な遺伝子発現量を確保するには、大量のベクターが必要となる。自己相補型 (scAAV) ベクターは挿入

できる遺伝子サイズは半減するが、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<sup>9</sup>。網膜下投与と比較検討されたところ、scAAV ベクターは ssAAV ベクターより高い遺伝子発現を示すことが報告された<sup>10</sup>。

#### (3) チロシン変異 (tm)-scAAV ベクター

AAV 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。細胞内に入ると、ユビキチン-プロテアソームシステムによる経路とリソソームを介す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<sup>11</sup>。ユビキチン化には、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て生じる<sup>12</sup>。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<sup>13</sup>。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<sup>14,15</sup>。われわれは血清型の異なる、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(図1)。また網膜下投与した場合、主に視細胞と網膜色素上皮に遺伝子導入され、tm-scAAV8 ベクターと tm-scAAV9 ベクターが高い遺伝子導入することが分かった(図2)。この遺伝子導入効率が高いということは、実験的に治療効果に繋がることを示唆される。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、一過性高眼圧モデルと薬剤誘発網膜障害モデルにおいて非常に高い治療効果を得た<sup>16,17</sup>。治療に必要なタンパク量をベクターに供給できるかは、ベクターの遺伝子発現能力に依存しているため、非常に重要な問題である。

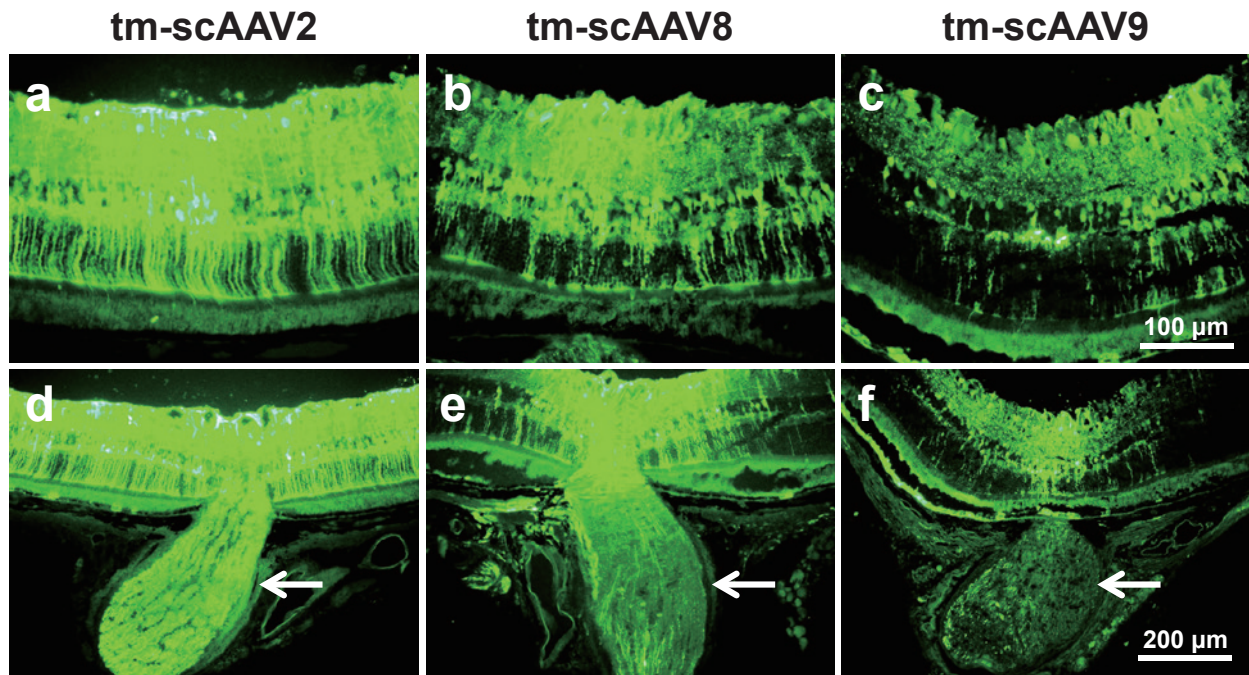


図1 硝子体投与におけるチロシン変異 (tm)-scAAV-GFP ベクターの遺伝子発現  
tm-scAAV2, 8, 9 で比較したところ (a ~ c), タイプ2 で最も高い遺伝子発現を認めた. 視神経の遺伝子発現を比較したところ (d ~ e), タイプ2 で最も高い遺伝子発現を認めた. 視神経 (矢印) は網膜神経節細胞の神経線維であることから, 網膜神経節細胞に高い遺伝子導入がなされたことを意味する. (変異はチロシンをフェニルアラニンに置換; AAV2; Y730+500+444F (triple mutant), AAV8; Y733F, AAV9; Y731F) 文献4より転載

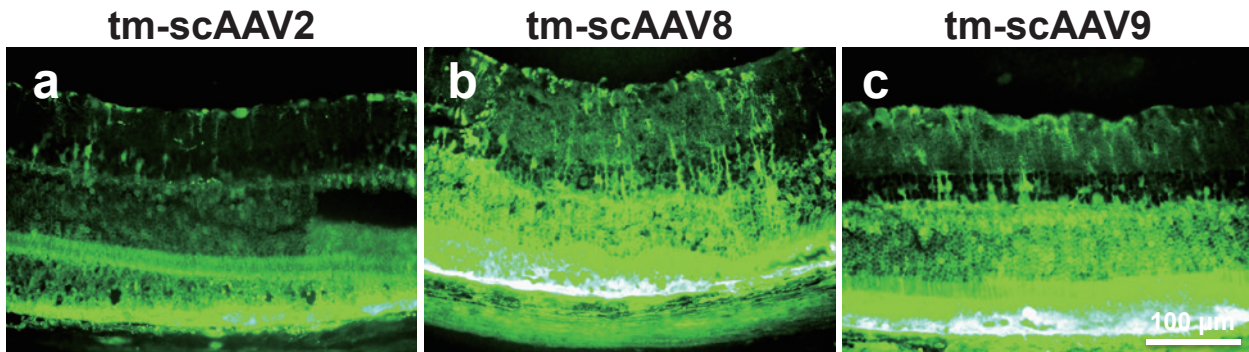


図2 網膜下投与におけるチロシン変異 (tm)-scAAV-GFP ベクターの遺伝子発現  
tm-scAAV2, 8, 9 で比較したところ (a ~ c), タイプ8 と9 で高い遺伝子発現を認めた.

## 2. 欧米における眼科領域の遺伝子治療

欧米では, Leber 先天盲だけでなく, コロイデレミア, RP, レーバー遺伝性視神経症, 加齢黄斑変性, 全色盲, 網膜分離症などに対する臨床応用が進められている.

### (1) Leber 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 の類縁疾患で高度に視力が障害される. 15 種類以上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. そのなかの RPE65 (LCA2) 遺伝子異常を対象にした遺伝子治療研究が行われてきた. RPE65 は網膜色素上皮細胞に発現する, 視サイクルに重要なタンパクであり, 変異があると光に反応できず, 視細胞自体が死に至る. RPE65 の遺伝子を AAV ベクターに組み込み, イヌの LCA2 モデルの網膜下へ投与したところ, 著しい治療効果が得られ, かなりの回復がみられた<sup>18</sup>. 2007 年より英国と米国ペンシルバニアのグループによってヒト LCA2 患者に対する遺伝子治療の臨床研究が開始された<sup>19,21</sup>. 投与 6 カ月後, 網膜電図



など客観的な機能評価法で視機能の改善を示唆する所見は得られなかったが、網膜感度の上昇と暗所下での行動の著しい改善を認めた。その後、31名のLCA2患者を対象にしたPhase IIIが米国で行われ、投与から1年後に重篤な有害事象や視力改善の有意差はなかったが、暗所での行動、網膜感度、視野においてコントロールと有意差を認めたと報告された<sup>22</sup>。その後、2017年に米国で、2018年にヨーロッパでAAV遺伝子治療薬(Luxturna<sup>®</sup>)が認可された。一方、3年以上の長期成績でも重篤な合併症がなく安全性が確認されたが、網膜感度は6カ月から12カ月をピークにほとんどの症例で減少してしまうことも報告された<sup>23</sup>。筆者らは、遺伝子治療臨床研究への成功の鍵として、強力で持続力のある治療法の必要性について述べられており、より良いAAVベクターの開発が重要視されている。そのため、RPE65遺伝子の発現量増大を目指し、AAV2/5をベースとしたベクターで現在I/II相臨床試験を行っている。今後、新たなAAVベクターを用いたより良い治療薬の登場が期待されている。

## (2) コロイデレミアに対する遺伝子治療

コロイデレミアはREP-1遺伝子異常により生じる、伴性劣性遺伝の疾患である<sup>24</sup>。基本的には男性に発症するが、女性の保因者にも眼底異常や夜盲が出現する。幼少期から夜盲を自覚することが多いが、視力は比較的后期まで保たれることが多い。2012年、オックスフォード大学のグループによってコロイデレミアのI/II相臨床試験がスタートした<sup>25</sup>。その後、他グループで実施されたII相臨床試験では一部の患者で視力の改善がみられた。すなわち、治療効果を認められた<sup>26,27</sup>。さらにBiogen社によりIII相臨床試験が行われたが、視力向上の割合が主要評価項目を達成することができず<sup>28</sup>、今後の研究が期待される。

## (3) 網膜色素変性に対する遺伝子治療

RPは70種類以上の原因遺伝子が報告されているが、病因遺伝子の種類が多く、遺伝形式により病気の進行が異なることが知られている。単一施設で患者データを集積するには限界がある。近年、日本網膜色素変性レジストリプロジェクト(Japan Retinitis Pigmentosa Registry Project: JRPRP)が構築され疾患データ蓄積が進んでいる。JRPRPに登録されている定型RP患者2,653名のうち遺伝子解析を実施されたのは1,338名であった。病因遺伝子が同定されたのは544名で、解決率は40.7%であった。病因遺伝子ごとの患者数はEYS遺伝子(189名)、USH2A遺伝子(49名)、

RHO遺伝子(35名)、RP1遺伝子(34名)、RPGR遺伝子(31名)であった<sup>29</sup>。LCAやコロイデミアのように正常遺伝子を遺伝子導入する遺伝子補充療法の場合、AAVベクターに搭載できる遺伝子は4.7 kb程度であり、それよりも小さなサイズである必要がある。RPの場合、多くの遺伝子においてそれよりも長い遺伝子が多く、遺伝子補充療法が難しい。そのため、遺伝子編集や神経保護因子の活用が期待されている。

## おわりに

眼科分野の遺伝子治療では、AAVによるRPE65遺伝子治療の成功の報告から10数年の間に、次々と新しい遺伝子治療臨床試験が開始されている。遺伝子治療は、共通基盤を確立すれば、搭載遺伝子を変えて他の疾患へ応用ができる。今後、網膜疾患に加えて、緑内障やぶどう膜炎などの領域でも応用され、治療開発が進むものと期待される。また、今回触れなかったがAAVベクターによる炎症の惹起も問題となっている<sup>30</sup>。いまだ効果的な治療効果には至らぬ網膜への遺伝子治療であるが、遺伝子導入効率を上昇させつつ、炎症などの副作用を上手くコントロールするためのAAVベクターの開発や基礎研究が必要と考えられる。

Conflict of Interest: 開示すべき利益相反はなし。

## 文献

1. Koyanagi Y, Akiyama M, Nishiguchi KM, et al: Genetic characteristics of retinitis pigmentosa in 1204 Japanese patients. *J Med Genet* 2019; 56: 662-670.
2. Sohocki MM, Daiger SP, Bowne SJ, et al: Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies. *Hum Mutat* 2001; 17: 42-51.
3. 角田和繁: 網脈絡膜ジストロフィの遺伝学的病態解明および治療に向けた症例データバンクの構築. *日眼会誌* 2020; 124: 247-284.
4. 五十嵐勉, 三宅弘一, 小林舞香ほか: 眼科分野における遺伝子導入法の開発. *日本医大医会誌* 2017; 13: 88-96.
5. 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. *J Virol* 2002; 76: 7651-7660.
6. Leberher C, Maguire A, Tang W, Bennett J, Wilson JM: Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J Gene Med* 2008; 10: 375-382.
7. Igarashi T, Miyake K, Masuda I, Takahashi H, Shimada T: Adeno-associated vector (type 8)-mediated expression of soluble Flt-1 efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. *Hum Gene Ther* 2010; 21: 631-637.
8. Wiley LA, Burnight ER, Kaalberg EE, et al: Assessment of Adeno-Associated Virus Serotype

- Tropism in Human Retinal Explants. *Hum Gene Ther* 2018; 29: 424–436.
9. McCarty DM: Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 2008; 16: 1648–1656.
  10. Natkunarajah M, Trittibach P, McIntosh J, et al.: Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8. *Gene Ther* 2008; 15: 463–467.
  11. Ding W, Zhang L, Yan Z, Engelhardt JF: Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 2005; 12: 873–880.
  12. 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. *Mol Ther* 2007; 15: 1323–1330.
  13. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7827–7832.
  14. Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, et al.: Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol Ther* 2011; 19: 293–301.
  15. Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, et al.: High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Mol Ther* 2009; 17: 463–471.
  16. Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, et al.: Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in a rat model of transient IOP elevation. *Mol Vis* 2016; 22: 816–826.
  17. Shiozawa AL, Igarashi T, Kobayashi M, et al.: Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in an inner retinal injury model induced by intravitreal injection of N-methyl-D-aspartate (NMDA). *Mol Vis* 2020; 26: 409–422.
  18. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al.: Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001; 28: 92–95.
  19. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al.: Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2231–2239.
  20. 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* 2008; 19: 979–990.
  21. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al.: Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2240–2248.
  22. Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al.: Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390: 849–860.
  23. Bainbridge JW, Mehat MS, Sundaram V, et al.: Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2015; 372: 1887–1897.
  24. Seabra MC, Brown MS, Goldstein JL. Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase. *Science* 1993; 259: 377–381.
  25. Edwards TL, Jolly JK, Groppa M, et al.: Visual Acuity after Retinal Gene Therapy for Choroideremia. *N Engl J Med* 2016; 374: 1996–1998.
  26. Fischer MD, Ochakovski GA, Beier B, et al.: Efficacy and Safety of Retinal Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vector for Patients With Choroideremia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol* 2019; 137: 1247–1254.
  27. Lam BL, Davis JL, Gregori NZ, et al.: Choroideremia Gene Therapy Phase 2 Clinical Trial: 24-Month Results. *Am J Ophthalmol* 2019; 197: 65–73.
  28. Lam BL, Davis JL, Gregori NZ: Choroideremia Gene Therapy. *Int Ophthalmol Clin* 2021; 61: 185–193.
  29. 池田康博：網膜色素変性の疾患レジストリ。 *臨眼* 2023; 77: 37–40.
  30. Bucher K, Rodríguez-Bocanegra E, Daultbekov D, Fischer MD: Immune responses to retinal gene therapy using adeno-associated viral vectors—Implications for treatment success and safety. *Prog Retin Eye Res* 2021; 83: 100915.

(受付：2023年3月27日)

(受理：2023年7月3日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。