

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in an inner retinal injury model induced by intravitreal injection of N-methyl-D-aspartate (NMDA)

NMDA 誘発内層障害モデルに対するチロシン変異 AAV2 ベクター由来 BDNF の神経保護効果

日本医科大学大学院医学研究科 分子遺伝医学分野
研究生 塩澤 朝香

Molecular Vision, volume 26, 409-422, 2020 掲載

緑内障は、視神経障害による視野の異常と視力低下を呈する疾患であり、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。そのような緑内障の新規治療法として、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である。実際に臨床で運用する際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。単回投与で長期の治療効果を得るためには、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療が有効である。そこで、本研究では、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。

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 μ L の tm-scAAV2-BDNF (6.6 E+13 genome copies/mL) を硝子体内投与し、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 μ L の 2 mM NMDA を硝子体内投与することにより網膜内層障害を誘導した。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、活性化ミューラー細胞マーカー: GFAP) を行い、2 群間で網膜内層厚、網膜神経節細胞数およびミューラー細胞の活性化

の比較を行った。

tm-scAAV2-BDNF 投与群ではコントロール AAV 投与群と比較し、BDNF の mRNA 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ミュラー細胞の活性化を抑制した。さらに暗順応 ERG においては、網膜内層障害によって減弱する b 波振幅が tm-scAAV2-BDNF 投与群で有意に大きかった。以上の結果から、tm-scAAV2-BDNF の投与により、NMDA 投与による組織学的および機能的な網膜内層障害が抑制されることが明らかとなった。

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、遺伝子導入効率を向上させた遺伝子治療用ベクターの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、BDNF の発現効率が増加し、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。正常眼圧緑内障を含めた網膜内層障害に対して tm-scAAV2-BDNF が有効であることを示唆する結果であった。

第二次審査では、本治療の実用化における課題、NMDA モデルにおけるヒト緑内障との類似性と問題点、治療効果の持続期間、網膜局所でみられる治療効果の差異、AAV 感染と治療効果の分子機構についてなどに関する幅広い質疑が行われ、いずれも的確な回答が得られた。本研究は、網膜内層障害に対する BDNF 発現チロシン変異 AAV2 ベクターの有効性を示した意義ある論文と考えられた。以上より学位論文として価値あるものと認定した。