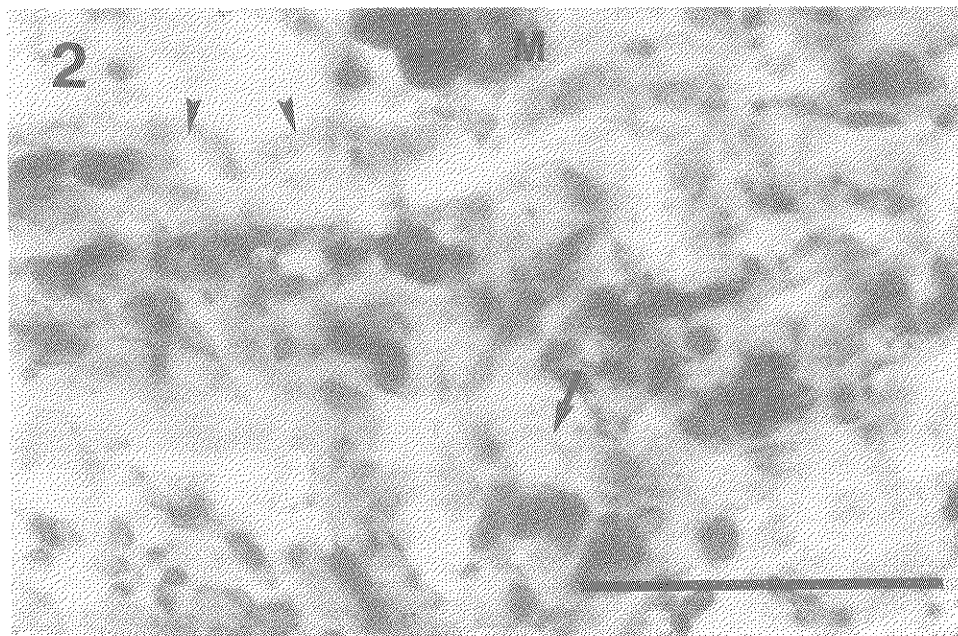
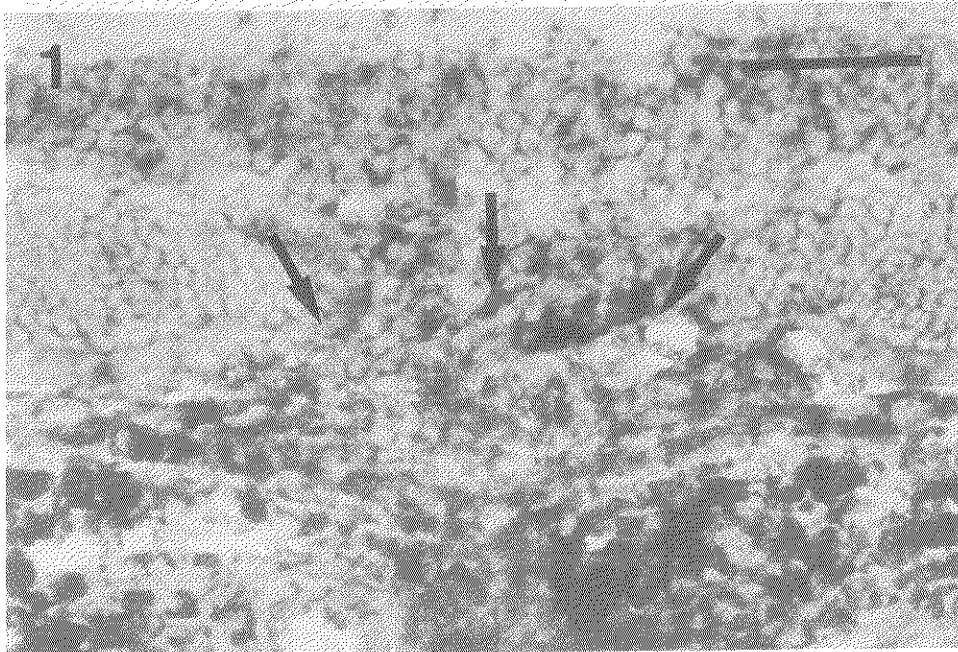


Chem. 1994;269:6271-6274

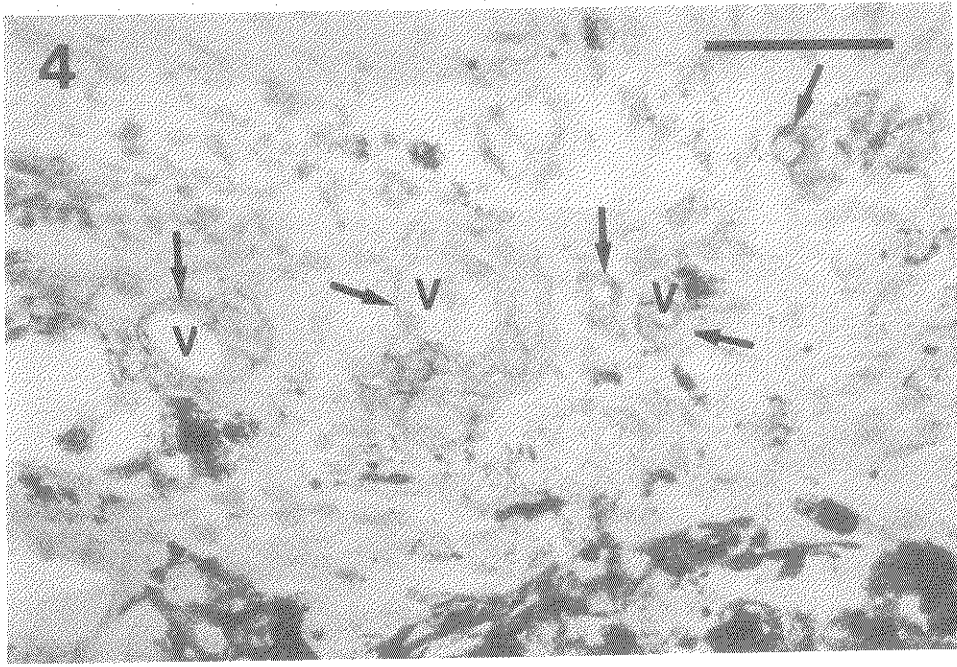
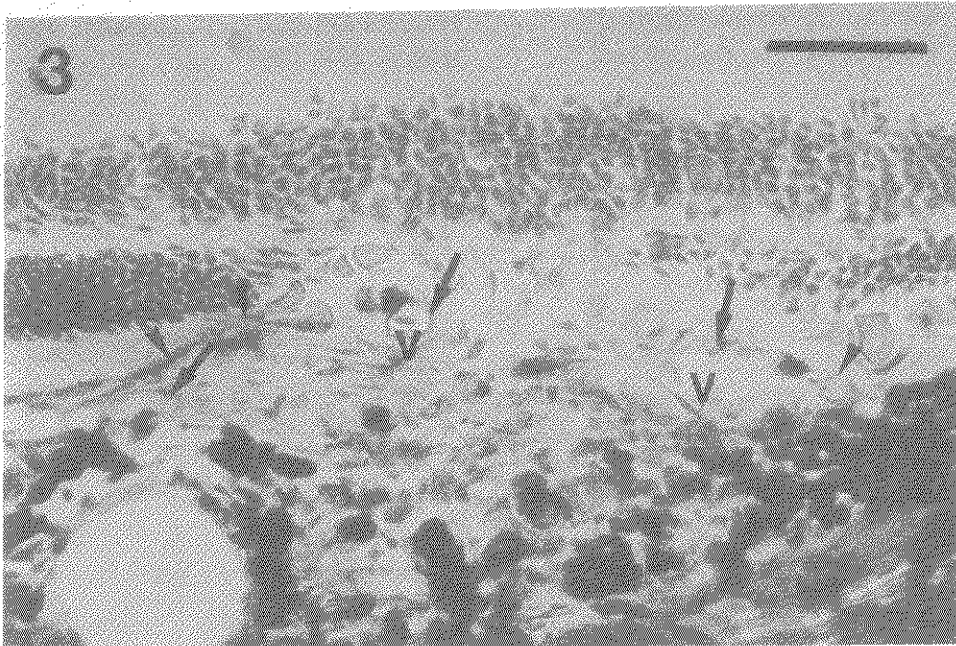
3. Ogata N, Yamanaka R, Yamamoto C,
Miyashiro M, Kimoto T, Takahashi K,
Maruyama K, Uyama M, Expression of

vascular endothelial growth factor and its
Receptor, KDR, following retinal ischemia-
reperfusion injury in the rat. *Curr Eye Res.*
1998;17:1088-1096



Amphispiza bilineata (Aud.)
Linn. Soc. Zool. Jpn. 1955, 1: 100, pl. 1, fig. 3

1955, 1: 100, pl. 1, fig. 3



19980849

報告書 P. 175-184は下記に掲載

Expression of transforming growth factor- β mRNA in experimental choroidal neovascularization

Nahoko Ogata, Chikako Yamamoto, Miki Miyashiro, Haruhiko Yamada, Masaki Matsushima and Masanobu Uyama

Current Eye Research. Volume 16, pp.9-18, 1996

トラニラストによる実験的脈絡膜新生血管抑制

Suppression of Laser-induced Choroidal Neovascularization by Oral Tranilast

吉村長久、竹花泰雄、黒川 徹 (信州大学眼科)

Nagahisa Yoshimura, Yasuo Takehana, Toru Kurokawa

(Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine)

抄録目的

トラニラスト経口投与により実験的脈絡膜新生血管が抑制されるかどうかを検討する。方法：BNラットを材料にダイオードレーザー光凝固を加えて脈絡膜新生血管モデルを作成した。トラニラスト投与群（200 mg/kg/dayと600 mg/kg/dayの2群）、インドメタシン投与群（1 mg/kg/dayと5 mg/kg/dayの2群）、対照群について新生血管発生を蛍光眼底造影によるスコア化、凝固部位の厚みの計測により評価した。結果：トラニラスト600 mg/kg/day投与群では、蛍光眼底造影のスコアが統計学的に有意に低かった。また、凝固部位の厚みも有意に薄くなった。インドメタシン群では有意の効果を認めなかった。結論：トラニラスト経口投与によってラット実験的脈絡膜新生血管の形成が抑制された。

Purpose. To determine whether tranilast administered to pigmented rats inhibits formation of choroidal neovascularization induced by diode laser photocoagulation. Methods. Female Brown Norway rats were used. On day 0, choroidal neovascularization was induced by diode laser photocoagulation. Tranilast (200 or 600 mg/kg/day) was administered orally twice a day for 14 days. Indomethacin (1 and 5 mg/kg/day) was administered orally once a day for 14 days. Choroidal neovascularization was evaluated on days 7 and 14 by fundus photography and fluorescein angiography. Late-phase fluorescein angiography was scored according to four grades. The animals were sacrificed on day 14, and the lesions evaluated histologically. Results. In the vehicle-treated group, 34 of 35 burns (97%) showed fluorescein staining and late leakage on day 14. Choroidal neovascularization was identified by light microscopy in all of the lesions that showed fluorescein staining and late leakage. The score of fluorescein staining was reduced in rats given 200 mg/kg/day ($P < 0.05$) or 600 mg/kg/day ($P < 0.01$) of tranilast. The thickness of the laser-induced lesions was reduced in a dose-dependent manner by tranilast, a significant difference being observed with 600 mg/kg/day ($P < 0.05$). Oral indomethacin treatment did not reduce fluorescein staining on day 14. Conclusions. Tranilast inhibits the development of choroidal neovascularization in this experimental model.

キーワード

トラニラスト、脈絡膜新生血管、ラット

tranilast, choroidal neovascularization, rat

目的

トラニラストは、臨床的に抗アレルギー剤として広く使用されている薬剤である¹⁾²⁾。この薬剤は、強い線維化抑制作用を持っている。また、サイトカイン、フリーラジカルの発生を抑制する作用もあり、脈絡膜新生血管の発生を抑える可能性が十分に考えられる³⁾。今回の検討の目的は、ラット網膜を強凝固して得られる脈絡膜新生血管の発生をこの薬剤が抑制できるかどうかを明らかにすることにある。

方法

実験には体重220 - 300 gの雌Brown Norwayラットを使用した。合計96匹のラットを6群に分けた。ラットには、IRIS Medical社製半導体光凝固装置を使用し、以下の条件で光凝固を行った。スポットサイズ75 μ m、凝固時間0.1秒 出力100 mW、凝固斑数 各眼1 - 2。6群のラットのうち、A群 (n=19)には凝固直後より100 mg/kgのトラニラストを1日2回、合計200 mg/kgを14日間投与した。B群 (n=14)は同様に一日600 mg/kgを、C群 (n=18)は溶剤のみを投与した。更に、D群 (n=15)では

トラニラストのかわりに1 mg/kgのインドメタシンを一日一回経口投与した。E群 (n=14)は一日量5 mg/kgのインドメタシンを、F群 (n=16)は、C群同様にコントロール群とした。脈絡膜新生血管の発生は、光凝固7日目と14日目に蛍光眼底造影検査を行い評価した。また、光凝固14日目にラットを屠殺し、光凝固斑部の網膜厚を組織学的に検討した。予備実験として、本実験と同一条件で光凝固を加え、凝固斑の経時経過を術後301日まで観察した。

結果

予備実験の結果、光凝固斑の蛍光強度、漏出は凝固後7日にはほぼ最高レベルに近くなり、14日目から300日まで同様の所見が認められることが分かった。このため、薬剤の評価には14日目の蛍光眼底造影像を使用することとした。光凝固14日目には、C群(コントロール群)のラットの凝固斑35個中34個で蛍光色素の漏出が認められた。一方、A群、B群では用量依存性に蛍光色素の漏出が抑制され、B群では0.01の有意差でトラニラストの有効性が確認できた(図1)。また、組織標本における検討では、凝固部位の連続切片を作成し、一番厚い切片での瘢痕の厚さを測定したが、B群では有意に瘢痕形成抑制された($P < 0.05$) (図2)。一方、インドメタシン群では、D群、E群ともに有意の蛍光漏出抑制効果が認められなかった(図1)。トラニラスト投与群のラットの体重は、コントロール群と同様の増加を認めたが、インドメタシン群では体重増加が十分得られなかった。最後に、ラット血清にトラニラストあるいはインドメタシンを溶解し、その蛍光強度を測定したが、トラニラスト、インドメタシンいずれも使用した用量では有意の変化を認めなかった(表1)。

考按

今回の検討でトラニラストの経口投与がラット実験的脈絡膜新生血管の形成を抑制することが明らかとなった。この薬剤は、抗アレルギー薬として広く使用されており、その副作用も良く分かっている。加齢黄斑変性に対する有効な薬剤が全くない現状では、この薬剤が例えわずかであっても実際の疾患に有効であれば、はかりしれない価値を持つ薬剤になる可能性が考えられる。何よりも経口投与での有効性が示されたことの意義は大きいと考えられる。

文献

1. Koda A, Nagai H, Watanabe S, Yanagihara Y, Sakamoto K. Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N-(3',4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5'). *J Allergy Clin Immunol.* 1976;57:396-407.
2. Komatsu H, Kojima M, Tsutsumi N, et al. Study of the mechanism of inhibitory action of tranilast on chemical mediator release. *Jpn J Pharmacol.* 1988;46:43-51.
3. Isaji M, Miyata H, Ajisawa Y, Takehana Y, Yoshimura N. Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *Br J Pharmacol.* 1997;122:1061-1066.

表1 トラニラストとインドメタシンが蛍光強度に与える影響

	蛍光強度 (%)	
	トラニラスト	インドメタシン
0.5% DMSO	100	100
0.1 µg/ml	101.3	
1 µg/ml	103.8	105.2
10 µg/ml	108.2	104.3
100 µg/ml	152	102.0
1000 µg/ml	171.7	163.2

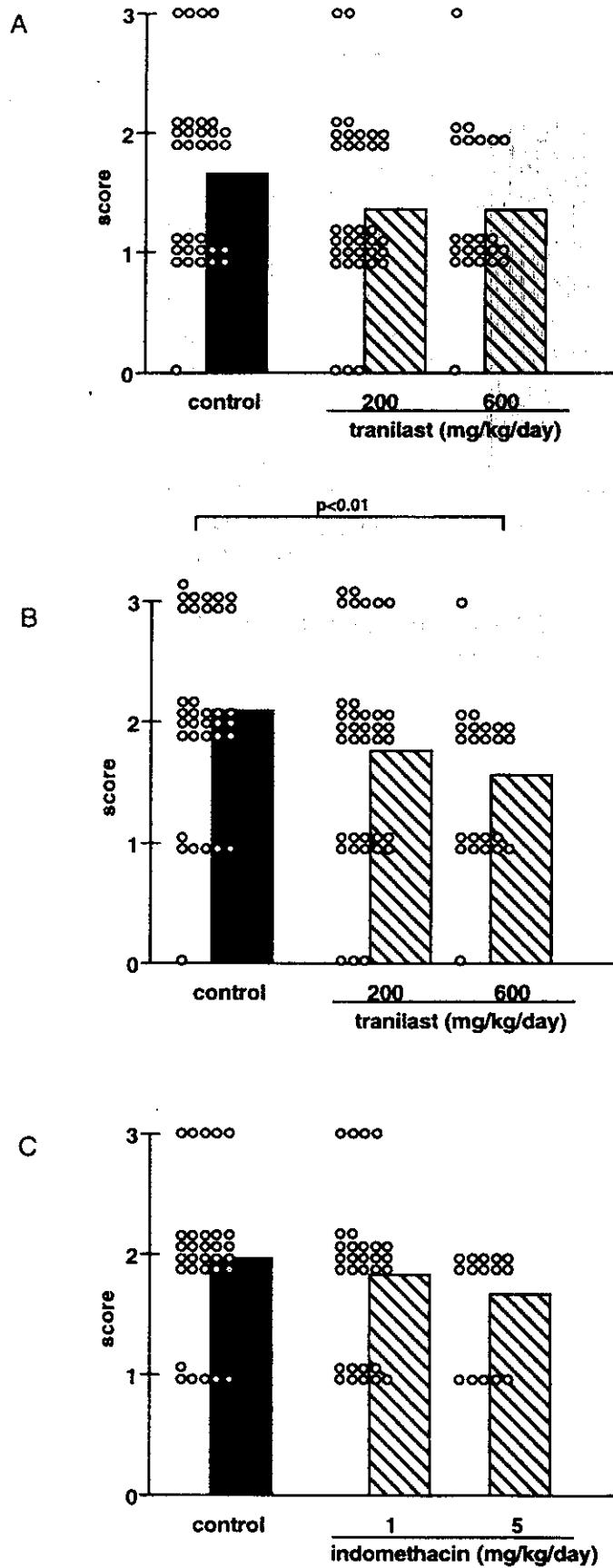


図1. トラニラスト、インドメタシン経口投与が脈絡膜新生血管に与える影響蛍光眼底造影像をスコア化して評価した。A, トラニラスト投与7日目 B, トラニラスト投与14日目 C, インドメタシン投与14日目。トラニラストは用量依存性に蛍光漏出を抑制した。

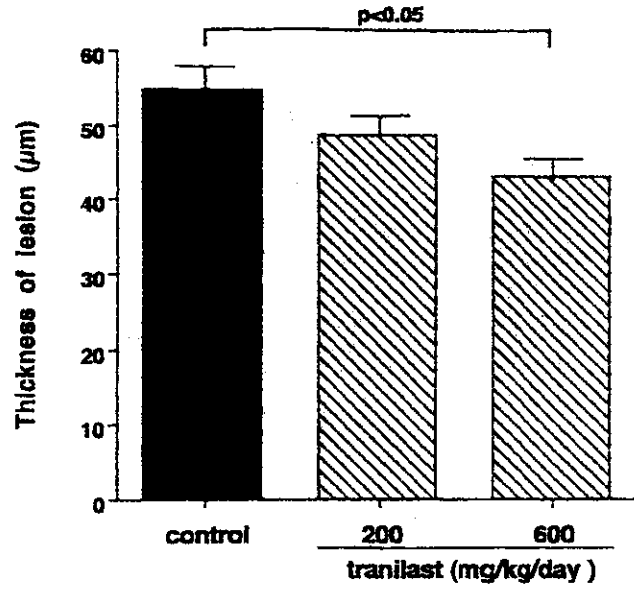


図2. トラニラスト経口投与が網膜凝固斑の厚みに与える影響
トラニラストは有意に凝固斑の厚みを小さくした。

19980849

報告書 P. 189－196は下記に掲載

**Suppression of Laser-Induced Choroidal Neovascularization by Oral
Tranilast in the Rat**

Yasuo Takebana, Toru Kurokawa, Tsuyoshi Kitamura, Yoshimi Tsukahara,
Satoshi Akabane, Makio Kitazawa, and Nagahisa Yoshimura

Investigative Ophthalmology Vision Science. Volume 40 Number 2,
pp.459-466, 1999

実験的ラット脈絡膜新生血管への レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入効果

The effect of gene transfer to experimental choroidal
neovascularization mediated by retrovirus vector

本田 祐恵¹、村田 敏規²、石橋 達朗¹

¹九州大学眼科 ²南カリフォルニア大学ドヘニー眼研究所

Masae Honda¹, Toshinori Murata², Tatsuro Ishibashi¹

¹Department of Ophthalmology, Faculty of medicine, Kyushu university, Fukuoka, Japan.

²Department of Ophthalmology, Doheny Eye Institute,
University of Southern California School of Medicine, Los Angeles.

要旨

加齢黄斑変性は脈絡膜新生血管の発生の結果、視力障害をきたす原因の一つとなっている。脈絡膜新生血管へ治療方法の一つとして遺伝子治療で網膜下に長期間、血管新生抑制因子を導入する方法が考えられる。レトロウイルスベクターは外来性の遺伝子を標的細胞の染色体中に導入できるため、ラットの実験的脈絡膜新生血管膜(CNVM)にβガラクトシダーゼ発現レトロウイルスベクターを硝子体中に投与してその導入効果を調べた。23眼にレトロウイルスベクターを硝子体投与した結果、5日目からβガラクトシダーゼの発現が観察され(16.2±6.8%)、4か月後まで観察できた(3.7±2.4%)。組織学的検索ではβガラクトシダーゼが導入されたマクロファージと紡錘形細胞がCNVMにみられた。βガラクトシダーゼの発現はCNVMに限局されていて、周囲の正常網脈絡膜には導入されていない。脈絡膜新生血管の発生とβガラクトシダーゼの発現には相関はなかった。脈絡膜新生血管板への遺伝子導入の可能性がレトロウイルスベクターを用いて示された。

Age related macular degeneration is a major cause of acquired blindness as a result of the development of choroidal neovascularization. A novel approach to this problem would be to use gene therapy to produce local long-term expression of anti-angiogenic factors in the subretinal space. Retroviral vectors insert exogenous genes into the host chromosomal DNA. To determine the feasibility of experimental gene transfer to laser-induced choroidal neovascular membrane (CNVM) in rats, with a retroviral vector containing the reporter construct β-galactosidase (β-gal). β-gal expression was identified in the CNVM induced by photocoagulation from day 5 (16.2±6.8%), to 4 months (3.7±2.4%). β-gal expression was restricted to the CNVM, and there was no β-gal transduction in surrounding normal retinochoroidal tissue. There was no correlation between choroidal neovascularization formation and β-gal expression. The feasibility of gene transduction targeted to the photocoagulation-induced CNVM was demonstrated using retroviral vectors.

key words : 遺伝子導入 脈絡膜新生血管膜 レトロウイルスベクター

目的

脈絡膜新生血管は加齢黄斑変性などの疾患で生じ、視力低下の主要な原因となっている。脈絡膜新生血管へ治療方法の一つとして遺伝子治療で網膜下に局所に長期間、血管新生抑制因子を導入する方法が考えられる。レトロウイルスベクターは外来性の遺伝子を標的細胞の染色体中に導入できる。この性質により標的細胞もしくはその娘細胞が生存する限り、導入された遺伝子の発現は継続する。従ってレトロウイルスベクターを用いて血管新生抑制因子の遺伝

子を脈絡膜血管新生膜に導入できれば、脈絡膜血管新生膜が消失し病巣が治癒しない限り、局所における血管新生抑制因子の産生が継続することが期待される。そこで実験的脈絡膜新生血管膜へのβガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターの導入効果を検討する。

方法

実験 I : 有色ラットの23匹23眼にダイオードレーザー光凝固を施行し(10発, 75 μm, 100mW, 0.1秒)

脈絡膜新生血管を誘導した。レーザー照射後2日目にレトロウイルスベクター $20\mu\text{l}$ (G1nBgSvNa, 1×10^8 cfu/ml)を硝子体に投与して β ガラクトシダーゼ遺伝子を導入した。その後何%の光凝固部位に β ガラクトシダーゼが発現しているかを、3、5日、1、2週、1、2、3、4か月の時期に実体顕微鏡下に観察し、X-Gal染色を行った。 β ガラクトシダーゼの発現頻度は β ガラクトシダーゼ発現数を光凝固部位数で割ったものとした。コントロールとして3眼に $20\mu\text{l}$, G1XSvNa (1×10^8 cfu/ml)を投与した。

実験II: 14匹のラットを用いてダイオードレーザーを(3発, $75\mu\text{m}$, 100mW , 0.1 秒)照射した。6眼にレトロウイルスベクター $20\mu\text{l}$ を網膜下投与し

(G1nBgSvNa, 1×10^8 cfu/ml)、6眼に網膜下投与した。1週後と2週後に蛍光眼底造影を行い脈絡膜新生血管の発生を検出した。眼摘後X-Gal染色を行い、 β ガラクトシダーゼ陽性、陰性の光凝固部位での脈絡膜新生血管発生の有無を検討した。コントロールにはレトロウイルスベクター $20\mu\text{l}$ (G1XSvNa)を網膜下(1眼)、硝子体腔(1眼)に投与した。

実験III: X-Gal染色後、光学顕微鏡で核の β ガラクトシダーゼ発現を光学顕微鏡で観察した。

結果

実験I: β ガラクトシダーゼ遺伝子の発現は遺伝子導入後5日目から($16.2 \pm 6.8\%$)確認され、3週後にピークに達し($22.9 \pm 13.8\%$)、4ヶ月後も継続していた($3.7 \pm 2.4\%$)。 β ガラクトシダーゼ遺伝子の発現は脈絡膜血管板に限局し、正常網膜への不必要な遺伝子導入はみられなかった。(Fig. 1)

実験II: 蛍光眼底造影で脈絡膜新生血管の発生を調べた結果 β ガラクトシダーゼ陽性、陰性に関わらず脈絡膜新生血管の発生と β ガラクトシダーゼの導入には相関はなかった。また、 β ガラクトシダーゼを導入することで脈絡膜新生血管の頻度は増加はなかった。

導入効率は硝子体投与より網膜下投与の方が β ガラクトシダーゼの導入効率がよかった。

実験III: 光凝固2週後のX-Gal染色では β ガラクトシダーゼを発現しているマクロファージが脈絡膜新生血管板にと光凝固で損傷を受けた網膜に存在していた。(Fig. 2) 1か月後の脈絡膜新生血管板には β ガラクトシダーゼ陽性の紡錘形や楕円形細胞がみられた。

また、2週後の脈絡膜新生血管板の辺縁の色素上皮細胞が再生、増殖している部位に β ガラクトシダーゼが発現していた。脈絡膜新生血管への遺伝子導入は顕著ではなかった。この組織学的所見は β ガラクトシダーゼ遺伝子の脈絡膜血管板への導入が、脈絡膜新生血管の発生と相関なく観察されたことと一致

するものであった。コントロールのレトロウイルスベクターを投与した眼の脈絡膜新生血管板では β ガラクトシダーゼの発現はみられなかった。

考察

網膜下腔に存在する脈絡膜新生血管板への薬剤投与は網膜血液関門の存在等によって困難である。しかし、レトロウイルスベクターを用いることで脈絡膜新生血管膜の増殖期にある細胞に β ガラクトシダーゼ遺伝子が導入され発現がみられた。そして、正常網膜には発現がみられなかった。これは成熟ラットの正常網膜はほとんど細胞分裂をしないためである。加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管膜は中心窩近くに発生するため、この選択性はレトロウイルスベクターを用いる上で大きな利点となる。また、発現は4か月後まで持続し、これは脈絡膜新生血管膜への治療効果を生むために必要となる。つまり、vascular endothelial growth factorやbasic fibroblast growth factorのアンチセンスなどの血管新生抑制因子を脈絡膜新生血管膜に長期間発現させることができるためである。本研究の結果は、レトロウイルスベクターを用いて血管新生抑制因子の遺伝子を脈絡膜血管新生板に導入すれば、血管新生抑制因子が局所で発現する可能性があることを示唆した。

文献

1. Murata T, Hangai M, Ishibashi T, Spee C, Gordon E. M, Anderson W. F, Hinton D.R and Ryan S. J. Retrovirus-Mediated Gene Transfer to Photocoagulation-Induced Choroidal Neovascular Membranes. IOVS. 1998;39: 2474-2478
2. Murata T, Hoffmann S, Ishibashi T, et al. Retrovirus-mediated gene transfer targeted to retinal photocoagulation sites. Diabetologia. 1998;41:500-506.

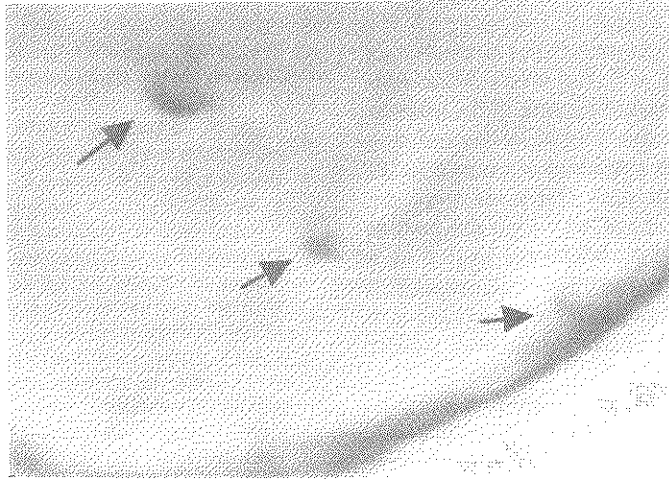


Fig. 1 Xガラクトシダーゼ染色を行ったラット眼球の実体顕微鏡下写真。
3か所の光凝固部位に青く染まっている。βガラクトシダーゼが導
入されて発現している。



Fig. 2 2週間後の蛍光眼底造影で蛍光漏出があるものは新生血管が発生し
ている(arrows)。淡く染まっているものは漏出はない(arrowhead)。

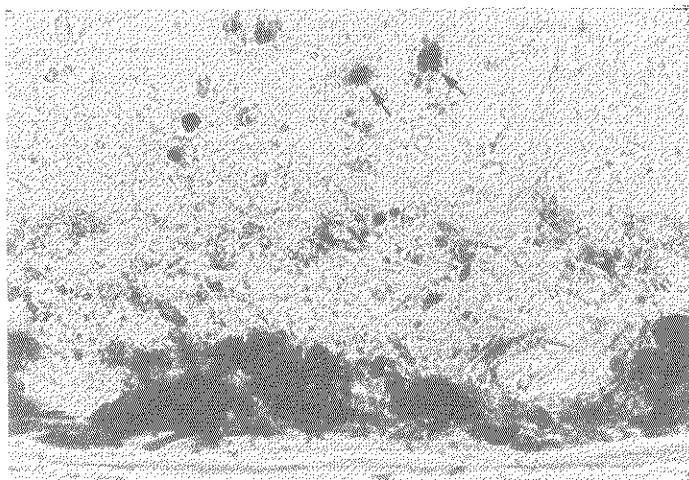


Fig. 3 光凝固2週間後の脈絡膜新生血管板。βガラクトシダーゼを発現し
ているマクロファージが脈絡膜新生血管板または光凝固で障害され
た網膜にみられた。

19980849

報告書 P. 200-204は下記に掲載

**Retrovirus-Mediated Gene Transfer to Photocoagulation-Induced
Choroidal Neovascular Membranes (Reports)**

Toshinori Miura, Masanori Hangai, Tatsuro Ishibashi, Christine Spee,
Erlinda M. Gordon, W. French Anderson, David R. Hinton, and Stephen J.
Ryan

Investigative Ophthalmology Vision Science. Volume 39 Number 12,
pp.2474-2478, 1998

19980849

報告書 P. 205-211は下記に掲載

Retrovirus-Mediated Gene Transfer targeted to retinal photocoagulation sites

T. Murata, S. Hoffman, T. Ishibashi, C. Spee, E. M. Gordon, W. F. Anderson, D. R. Hinton, S. J. Ryan

Diabetologia. Volume 41, pp.500-506, 1998

BDNF導入虹彩色素上皮細胞の性質と網膜神経細胞に対する保護効果 STABLE TRANSFECTION OF BDNF GENE PROTECTED NEURONAL CELLS OF RETINA FROM NMDA INDUCED CELL DEATH AND ITS PHAGOCYTOTIC CAPACITIES

鹿野哲也、櫻木素子、阿部俊明、富田浩史、玉井信

要旨

目的

BDNF導入虹彩色素上皮細胞(BDNF-IPE)のBDNFの発現、貪食能及び網膜神経細胞に対する保護作用を検討する。

方法

ラット虹彩色素上皮細胞にBDNF cDNAを形質転換し、BDNF-IPEを作製、継代培養し、各世代のBDNF遺伝子発現及びタンパク定量を行った。また、牛眼の視細胞外節を用いてBDNF-IPEの貪食能を調べた。さらに胎児ラットから網膜神経細胞を分離し、NMDA誘発細胞死に対するBDNF-IPEの保護効果をtrypan blue exclusion法により評価した。

結果

BDNF-IPEでは、BDNFの遺伝子発現及び十分なタンパク質濃度上昇を認め、継代を重ねても初代培養と著明な差を認めなかった。また、IPEはRPEの約1/2貪食能を有し、BDNF-IPEではさらに亢進した。一方、網膜神経細胞・BDNF-IPE共培養群、MK-801添加群で保護効果が確認された。

To investigate the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) by iris pigment epithelial (IPE) cells with stable BDNF gene transfection, its phagocytic capacities and its neuroretinal cell protection against NMDA induced cell death. Methods. BDNF cDNA was transfected to IPE cells from Long Evans rats using a lipofection technique. BDNF gene transcription and protein translation were examined between primary and passaged transfected cells. We also established primary cultures from fetal Wistar rat retina (gestation days 16-19) and selected neuronal cells. The protective effects of BDNF on the retinal cultures were examined by combination culture and assessed using the trypan blue exclusion method. Results. Significant BDNF expression was observed in the BDNF transfected cells if compared to that of non-transfected cells. The expression was not significant between primary and passaged BDNF transfected IPE cultures. No significant cytokine gene transcription was observed between BDNF transfected and non-transfected IPE cells. Short time exposure of the neurons to NMDA generated delayed neuroretinal cell death, but they were protected by the application of BDNF transfected IPE cells and MK-801. Conclusions. Stable transfection of BDNF gene was established and the transfected cells protected neuroretinal cells from NMDA induced cell death in vitro.

BDNF, IPE, gene expression, phagocytic capacity, neuroretinal cell, NMDA, MK-801

緒言

加齢黄斑変性は本邦において、近年急激に増加している難治性疾患である。これまで、レーザー光凝固術、インターフェロン療法、放射線療法、外科的手術療法など様々な方法が試みられているが、確立した治療法はない。こうした状況下で、当科では網膜下自己虹彩移植術を施行し、良好な結果が得られている。将来的により効果が期待できる遺伝子治療を見据え、基礎的段階として、今回の実験を行った。

目的

brain-derived neurotrophic factor導入虹彩色素上皮細胞(BDNF-IPE)のBDNF遺伝子発現、タンパク質濃度、視細胞外節に対する貪食能、及び網膜神経細胞初代培養系を用いてその生物特性について検討した。

方法

Long Evans ratから網膜色素上皮 (RPE)、虹彩色素上皮 (IPE) を分離、in vitroにて培養し、リポフェクション法によりIPEにbFGF-cDNA、BDNF-cDNAを形質転換し、bFGF-IPE、BDNF-IPE、vector-IPEを作製した。牛眼より視細胞外節 (photoreceptor outer segment, POS) を分離後、蛍光色素AlexaTM 488にて標識し、RPE、上記IPEに十分量のPOSを加え、20時間後に残存するPOSをwash outし、貪食されたPOS量を評価した。評価法は画像解析ソフトIPLabを用い、蛍光を示した面積 (貪食されたPOS) / 色素細胞の面積 (% Fluorescein area / Cell area) を算出し、貪食能を数値化した。

また、BDNF-IPEを第10世代まで継代培養し、PCR法により各世代におけるBDNF遺伝子の発現、並びにsandwich ELISA法によりタンパク質濃度を測定した。

さらに、Winstler fetal rat (胎生16-19日) から網膜を分離、in vitroにて培養し、cytosine arabinosideにより網膜神経細胞のみを分離培養した。その培養網膜神経細胞をBDNF-IPE、IPEと共培養し、NMDA誘発細胞死数をtrypan blue exclusion法を用いて測定、統計学的に処理 (Bomferroni / Dunnett法) した。また、同時にMK-801添加群との比較を行った。

結果

IPEの貪食能はRPEの約1/2であった。IPEと比しvector-IPEは同程度、bFGF-IPEとBDNF-IPEはそれぞれ2倍、6倍の貪食能を示した (図1)。

また、BDNF-IPEは各世代でBDNF遺伝子の発現 (図2)、またタンパク質濃度の上昇を認めた (図3)。これらの発現量は各世代間で著明な差は認めなかった。

一方、網膜神経細胞はNMDA添加により細胞死に至ったが、網膜神経細胞・BDNF-IPE共培養群、MK-801添加群では細胞死数が減少した。また、網膜神経細胞・BDNF-IPE共培養群、MK-801添加群間に有意差は認めなかった (図4)。

考察

IPEはRPE同様、貪食能を有することが示され、その能力は約1/2であった。この結果は過去の報告と同様である。一方、bFGF、BDNF導入により、貪食能がそれぞれ有意に上昇するという結果が得られたが、その理由、並びに是非は不明で、今後、検討が必要である。

また、BDNF-IPEの継代培養におけるBDNF遺伝子の発現、並びにタンパク質発現は、各世代で有意

に発現上昇を認め、さらに、世代間で大きな差がないことから、安定した形質転換が得られていることを示唆すると考えられる。さらに、BDNF-IPEと網膜神経細胞を共培養することで、NMDA誘発細胞死に対し、保護効果を有することが確認された。この効果は、IPE共培養群の約2倍、NMDA受容体アンタゴニストであるMK-801添加群とほぼ同等であった。このことから、BDNF-IPEは細胞活性を有する十分量のBDNFを発現していると推測される。

以上から、将来的に遺伝子治療を行う場合、網膜神経細胞保護という点でBDNF-IPEは非常に有効な方法になりうることを示唆された。

結論

形質転換により安定したbFGF-IPE、BDNF-IPEを作製し、そのbFGF、BDNFの発現により、IPE貪食能が亢進した。また、網膜神経細胞・BDNF-IPE共培養群はNMDA誘発細胞死に対し保護効果を有したことからBDNF-IPEは細胞活性を有するBDNFを発現していることが確認された。

1. LaVail, M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M., Yancopoulos, G. and Steinberg, R. (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11249-11253.
2. Unoki, K. and LaVail, M. (1994) Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 907-915.
3. Liu, Z. Z., Zhu, L. Q. and Eide, F. F. (1997) Critical role of TrkB and brain-derived neurotrophic factor in the differentiation and survival of retinal pigment epithelium. *Journal of Neuroscience* 17, 8749-8755.
4. Okazawa, H., Kamei, M., Imafuku, I. and Kanazawa, I. (1994) Gene regulation of trk B and trk C in the chick retina by light / darkness exposure. *Oncogene* 9, 1813-1818.
5. Kashii, S., Takahashi, M., Honda, Y., Akaike, A., (1994) Protective Action of Dopamine Against Glutamate Neurotoxicity in the Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 685-695.

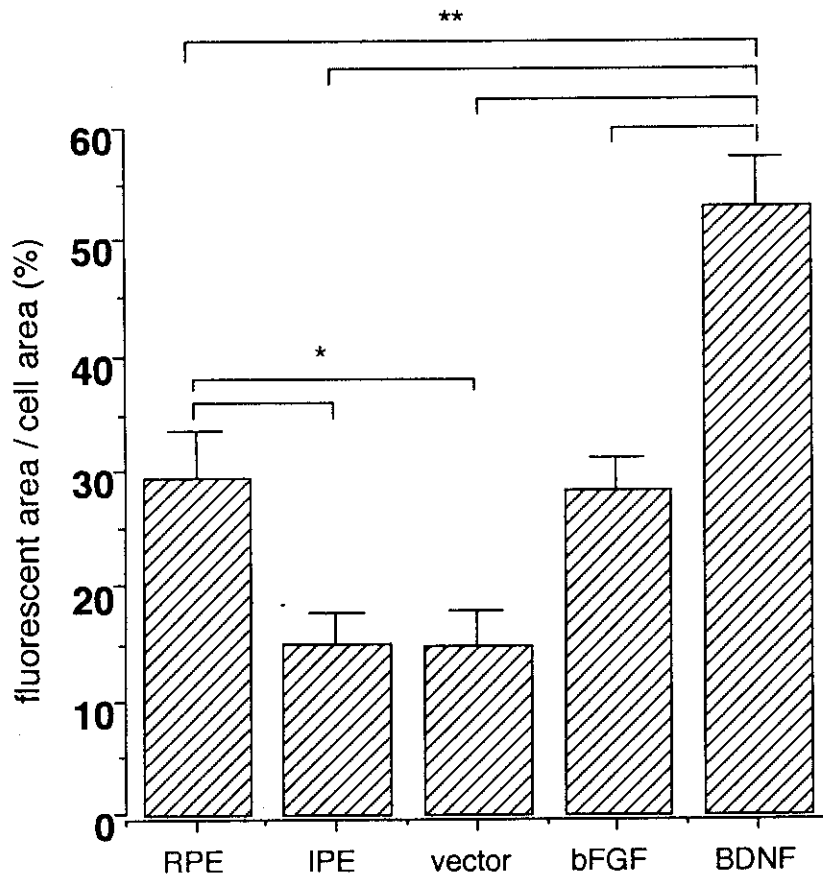


図1 phagocytic capacities
 Bomferroni / Dunnet : * p<0.01, ** p<0.05

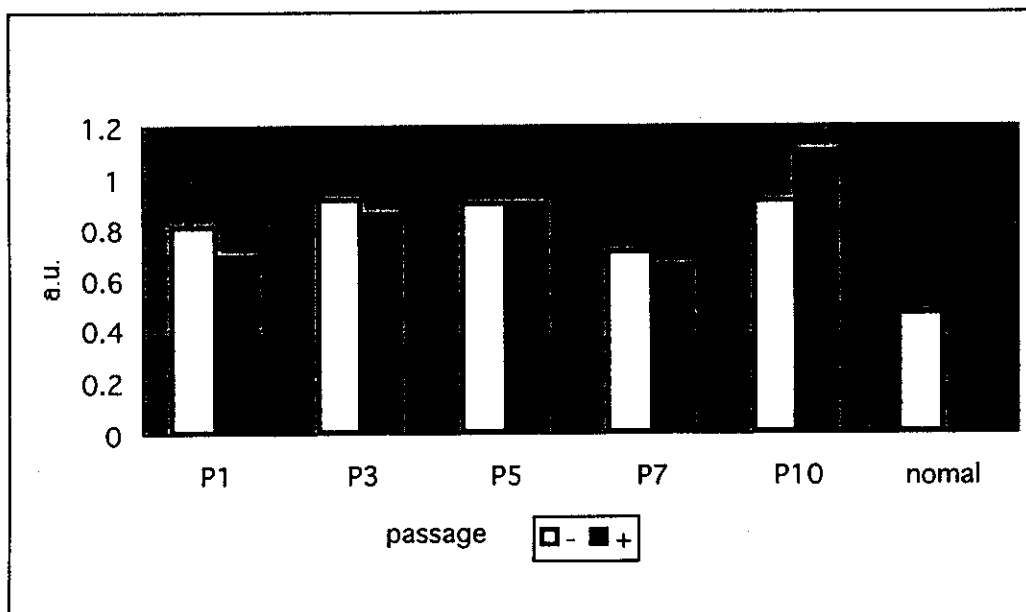


図2 BDNF遺伝子発現

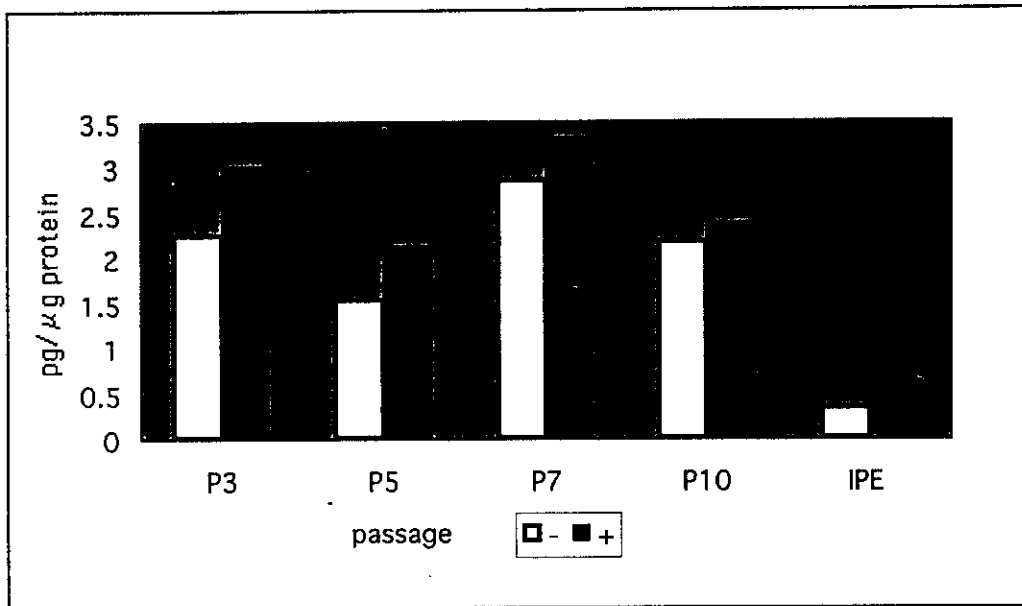


図3 BDNFタンパク発現

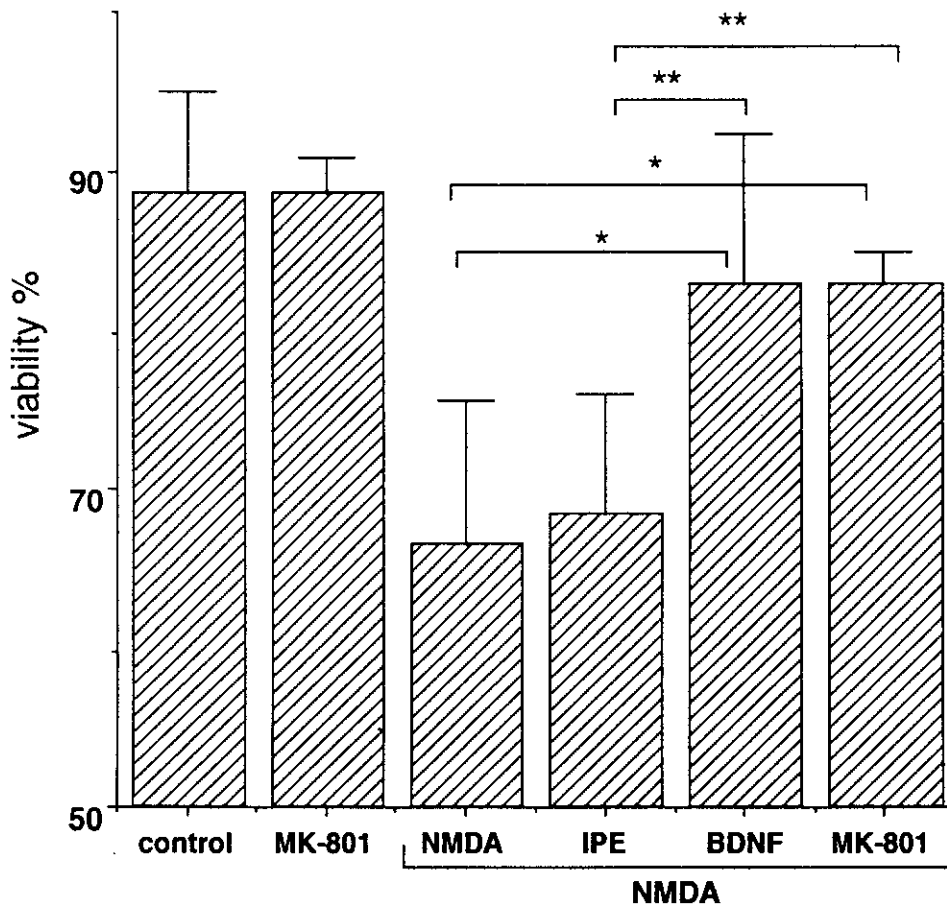


図4 網膜神経細胞の保護作用

Bonferroni / Dunnet: * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ (n=5)
 viability % = unstained cell / all cell

加齢黄斑変性に対する細胞移植の基礎実験と臨床応用

Iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration from basic and clinical study

阿部俊明、富田浩史、吉田まどか、鹿野哲也、大橋利吏、佐藤雅美、玉井信（東北大学医学部眼科）
Abe T, Tomita H, Madoka Y, Kano T, Ohashi T, Sato M, and Tamai M.
Department of Ophthalmology School of Medicine, Tohoku University

要旨

目的：海外では加齢黄斑変性(AMD)に網膜色素上皮細胞(RPE)移植の報告があるが、一部に拒絶反応を推測させる報告がある。我々は、虹彩色素上皮細胞(IPE)がRPEと起源が同じであることに着目して、基礎的実験を施行し、また実際AMDの症例より自己IPEを採取培養し網膜下に移植したので報告する。
方法、結果：IPEはRCSラットの視細胞変性を遅らせた。自己血清を利用してIPEを培養する方法を確立した。この細胞を移植した場合でも、これまでのところ動物実験で拒絶反応を示唆する所見はない。また、AMDに自己IPEを移植したがこれまでのところ拒絶反応を推測させる所見は認められず、視力が低下した症例はない。
結論：経過観察期間はまだ短い、自己IPEは臨床応用可能であることが推測された。

Retinal pigment epithelial (RPE) cell transplantation was reported in patients with age-related macular degeneration (AMD). However, some of them manifested local rejection at the transplanted area. We performed several basic and clinical study of autoiris pigment epithelial (IPE) cell transplantation for replacement of RPE. Methods and Results: IPE delayed the photoreceptor cell degeneration in RCS rats. IPE cell culture using autoserum was developed. Auto IPE transplantation in patients with AMD demonstrated no rejection by clinical examination. No patients showed decreased visual acuities. Conclusion: Auto IPE cell transplantation was considered to be useful for clinical study.

加齢黄斑変性、移植、網膜色素上皮細胞、虹彩色素上皮細胞、自己虹彩色素上皮細胞、拒絶反応

目的

加齢黄斑変性は黄斑部局限した病変であるが、視力低下を余儀なくされ、患者は不自由な生活を強いられる。本邦にも増加傾向があり、厚生省の特定疾患にも指定されている。しかしながら、本疾患に確立された治療法はこれまでのところ報告されていない。さまざまな方法が試みられているが、網膜移植も最近注目を浴びている治療法の一つである。しかし、移植につきまとう重要な問題として拒絶反応がある。これまでの報告では眼内は免疫学的に特殊な部位（前房免疫偏位, ACAID）と報告されているが、動物実験で異種の細胞移植を施行すると、拒絶反応を推測させる結果が報告された。¹⁾ また、海外では網膜色素変性症患者に胎児の視細胞移植や網膜色素上皮細胞(RPE)移植の報告があるが、一部に拒絶反応を推測させる報告がある。^{2) 3)} さらに、この拒絶反応は手術成功の重要な因子になることも報告された。したがって我々は、虹彩色素上皮細胞(IPE)がRPEと起源が同じであることに着目して、

採取の容易な自己IPE移植の臨床応用をめざし数々の基礎的実験を施行してきた。⁴⁾ さらに今回は実際加齢黄斑変性の症例より自己IPEを採取培養し、網膜下に移植したので報告する。

方法

実験動物はラット、サル、ウシを利用した。それぞれのIPE、RPEを利用したが、まず自己血清を利用してIPEを培養する方法を確立した。さまざまな濃度の自己血清を培地に加えるとともに、さまざまな種の血清も利用してIPEを培養した。ウシ外節をラベルして貪食能を確認するとともに、RCSラットの網膜下にIPEを移植し視細胞救出効果をRPE移植と比較して効果を確認した。さらにサルを用いた自己IPE移植実験では蛍光眼底撮影や組織学的検査を利用して、拒絶反応の有無を確認した。臨床症例の加齢黄斑変性6症例は術前視力が手動弁より0.05であり、全例片眼性であった。また視力低下より移植手術までの期間は3ヶ月より15ヶ月であった。

これらの症例は術前、術後とも視力、ERG、flicker ERG、色覚、視野、VEP、EOG、SLOにて解析した。

1996.

結果

IPEはRPEと同様に視細胞貪食能があることが判明したが、RPEに問題のあるRCSラットに移植した場合、RPEを移植するのと同様に視細胞の変性を遅らせることも判明した。また、サルの自己IPEはラットやマウスの血清では細胞死を示したが、自己の血清を利用することで培養する方法を確立した。この自己血清は10-15%でもっとも効果を示し、ウシやヒトの血清を使用した場合と有意差はなかった(図1)。サルより自己IPEを採取し、その培養した細胞を同一サルに移植した場合でも、これまでのところ検眼鏡的な所見や画像検査では拒絶反応を示唆する所見は認められていない。さらに我々は、倫理委員会より承認を得て、加齢黄斑変性の症例より自己IPEを採取、自己の血清を利用してIPEを培養し、色素上皮細胞であることを確認後、網膜下新生血管除去術と同時に網膜下に移植した。移植した細胞は1から21万個までさまざまであった。施行した6例にこれまでのところ拒絶反応を推測させる所見は認められていない。いずれも経過観察期間は6カ月未満であるが、この6症例に視力が低下した症例は、現在のところいない。しかし、すべての検査所見が向上したわけではなく、VEPやHumphrey視野検査で徐々に低下する症例も存在した(図2)。

結論

動物実験でIPEの有効性が確認された。また、サルやヒトの自己血清を利用したIPEの培養方法も確立した。さらにヒトへこの培養細胞を移植した場合、まだ経過観察期間は短い、これまでのところ拒絶反応を推測させる所見や移植細胞の網膜下あるいは硝子体中でも異常増殖は確認されておらず、自己IPEは臨床応用可能であることが推測された。

文献

- (1) 山本修一：網膜色素上皮細胞移植の臨床応用
眼科New Insight 9 眼組織の移植 149-155.
- (2) 玉井信：厚生省網脈絡膜視神経萎縮研究班報告書 平成9年度, 91-93.
- (3) Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y, KoppED: Transplantation of RPE in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 235:149-158,1997.
- (4) 玉井 信: 網膜色素上皮移植, 100: 982-1006,

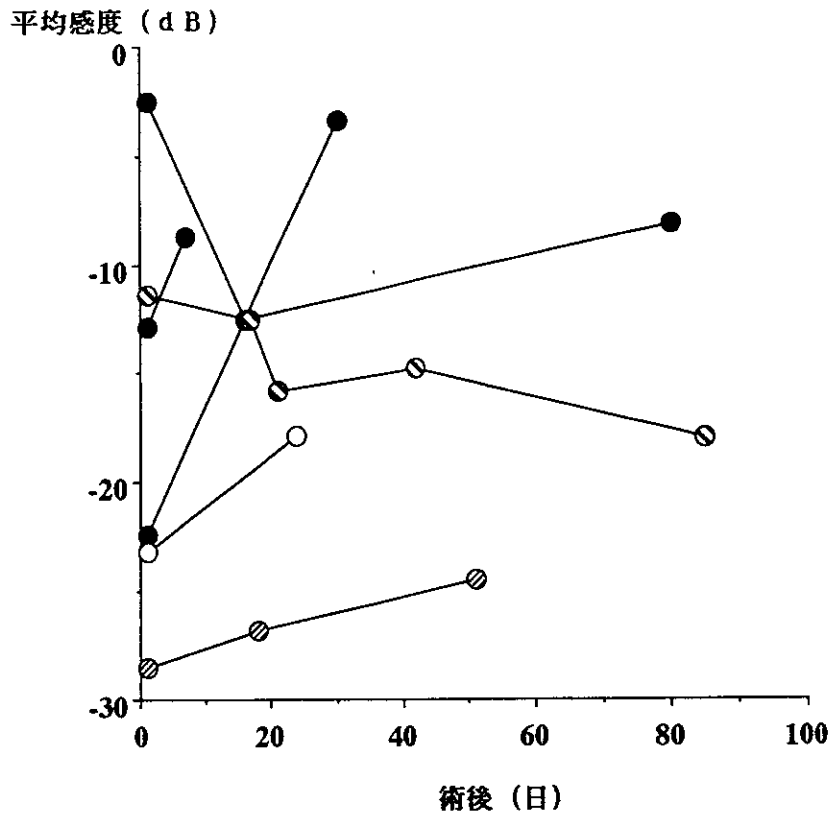


図1：サルの自己血清とマウスの血清を利用してサルIPEを培養した。サル血清は10-15%でもっとも効果を示し、マウス血清は逆に濃度依存的にサルIPEに対して毒性を示した。

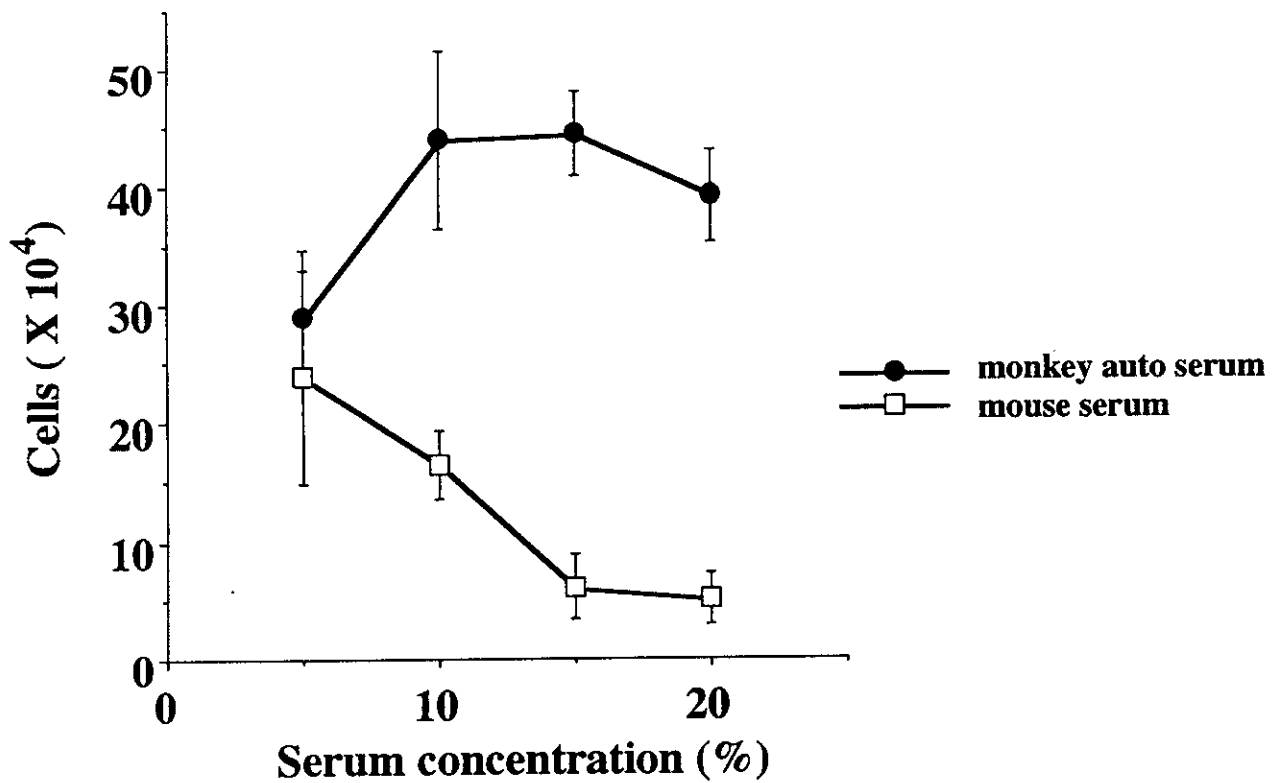


図2：加齢黄斑変性患者の自己IPEを採取培養し、新生血管除去後に網膜下に移植した。その後のHumphrey視野検査の経過を示した。