

200/c828

厚生労働省特定疾患

網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班
平成13年度 研究報告書

Research Committee on
Chorioretinal Degenerations and Optic Atrophy,
The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, 2001

平成14年3月

班 長 玉 井 信
東北大学医学部 眼科

Chairman : Makoto Tamai, M. D.
Department of Ophthalmology and Visual Sciences
Tohoku University School of Medicine
Sendai, Japan

網膜脈絡膜 視神経萎縮調査研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	玉 井 信	東北大学眼科	教 授
班 員 (監 事)	安 達 恵美子	千葉大学眼科	教 授
	阿 部 俊 明	東北大学眼科	助 教 授
	飯 島 裕 幸	山梨医科大学眼科	教 授
	石 橋 達 朗	九州大学眼科	教 授
	小 口 芳 久	慶応大学眼科	教 授
	小 椋 祐 一 郎	名古屋市立大学眼科	教 授
	高 橋 寛 二	関西医科大学眼科	講 師
	高 橋 政 代	京都大学探索医療センター開発部	助 教 授
	中 沢 満	弘前大学眼科	教 授
	堀 勝 義	東北大学加齢研究腫瘍循環	助 教 授
	三 宅 養 三	名古屋大学眼科	教 授
	梁 島 謙 次	国立身体障害者リハビリテーションセンター	部 長
	湯 沢 美 都 子	日本大学駿河台病院眼科	助 教 授
	吉 村 長 久	信州大学眼科	教 授
若 倉 雅 登	北里大学眼科	助 教 授	
疫 学 班	辻 一 郎	東北大学公衆衛生	助 教 授
登録センター 事務局 経理事務担当 登 録	和 田 裕 子 相 良 淑 子 早 津 直 子	東北大学眼科 〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1 T E L (022) 717-7294 F A X (022) 717-7298	助 手 文部技官

目 次

巻 頭 言 網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究	1
(東北大学大学院医学系研究科感覚器病態学講座眼科学分野)	玉井 信
緑内障モデルラットにおける各種緑内障点眼薬の神経保護作用の検討	3
(弘前大学医学部眼科)	日時 友美、大黒 浩 高野 淑子、山崎 仁志 丸山 幾代、中沢 満
BDNF 遺伝子導入による網膜神経節細胞の保護	16
(千葉大学大学院医学研究院視覚病態学)	溝田 淳、莫 暁芬 横山 暁子、根岸 久也 忍足 俊幸、安達恵美子
ES 細胞を用いた人工移植片による視神経再生と分化誘導	23
(千葉大学大学院医学研究院視覚病態学)	根岸 久也、窪田 伸矢 安達恵美子
網膜神経細胞死のメカニズムの解明と実験的治療法の開発	36
(信州大学医学部眼科)	片井 直達、吉村 長久
視神経症に対する mtDNA SSCP 解析の成果について	38
(済安堂井上眼科病院)	若倉 雅登
(北里大学眼科)	若倉 雅登、市邊 義章 嶺井利沙子
(北里大学病院DNA検査室)	豊岡 裕子、山辺 晴美
視神経萎縮患者の OPA 1 遺伝子異常と臨床像	74
(名古屋大学医学部)	上野 真治、中村 誠 伊藤 正、寺崎 浩子、 三宅 養三
遺伝子治療を目的としたマウス網膜特異的アミノキシダーゼ遺伝子のクローニング	77
(慶應義塾大学医学部眼科)	真島 行彦、張 強 小口 芳久

千葉大学最近3年間の網膜色素変性症患者初診例	80
(千葉大学大学院医学研究院視覚病態学)	朴 栄華、池尻 充哉 渡辺 悠里、溝田 淳 安達恵美子
網膜色素変性症の中心30度視野障害進行評価	83
(諏訪赤十字病院)	平川 博秀
(山梨医科大学眼科)	飯島 裕幸
正常者と視野異常患者における多局所瞳孔視野	87
(名古屋大学医学部眼科)	近藤 峰生、譚 麗 佐藤 美保、近藤 永子 三宅 養三
CRX 遺伝子 Arg41Trp 変異を認めた錐体ジストロフィーの1家系	106
(東北大学医学部眼科)	板橋 俊隆、和田 裕子 佐藤 肇、川村 后幸 玉井 信
ペリフェリン/RDS遺伝子の新規変異 (Arg195Leu) をともなった 常染色体優性中心性輪紋状脈絡膜ジストロフィー家系の臨床像と遺伝子変異の連関	108
(弘前大学医学部眼科)	柳橋さつき、中沢 満 佐藤 元哉、宮川 靖博 大黒 浩
(黒滝眼科)	黒滝 淳二
GUCY 2D 遺伝子に変異が認められた錐体桿体ジストロフィー4家系とその臨床像	119
(名古屋大学医学部眼科)	中村 誠、伊藤 正 三宅 養三
(山口大学医学部眼科)	布 佳久
(和歌山県立医科大学眼科)	大西 克尚
FSCN 2 遺伝子 208delG 変異をともなう錐体桿体ジストロフィーの2家系	125
(東北大学医学部眼科)	和田 裕子、板橋 俊隆 川村 后幸、佐藤 肇 阿部 俊明、玉井 信
強膜内インプラントを用いた網膜硝子体への薬物送達の試み	133
(名古屋市立大学医学部眼科)	岡部 純子、木村 英也 岡部 高明、久納 紀之 小椋祐一郎

近視性黄斑症に対する強膜短縮黄斑移動術	137
(日本大学医学部眼科)	島田 宏之、福田 匠 藤田 京子、湯沢美都子
Royal College of Surgeons(RCS)ラットの adeno associated virus(AAV)ベクターを用いた遺伝子治療	143
(信州大学医学部眼科)	宮原照良、秋元正行 新井純、黒川徹 菊池孝信、吉村長久
(自治医科大学分子病態治療研究センター)	水上浩明、卜部匡司 小澤敬也
RCS ラットの網膜変性に対するカルシウム拮抗剤の効果	147
(弘前大学医学部眼科)	佐藤 元哉、大黒 浩 山崎 仁志、柳橋さつき 中沢 満
網膜変性ラットに対するCa拮抗剤の効果	158
(弘前大学医学部眼科)	山崎 仁志、大黒 浩 目時 友美、佐藤 元哉 柳橋さつき、中沢 満
癌関連網膜症類似の自己免疫性網膜症	167
(信州大学医学部眼科)	太田 浩一、吉田 紀子 黒川 徹、菊池 孝信 吉村 長久
癌関連網膜症の患者血清が認識する新しい網膜特異抗原遺伝子の解析	173
(信州大学医学部眼科)	菊池 孝信、立岩 尚 市川 正樹、後藤 謙元、 吉村 長久
Melanoma-associated retinopathy における自己抗原の同定	177
(弘前大学医学部眼科)	大黒 浩、山崎 仁志 柳橋さつき、目時 友美 中沢 満
遺伝子導入による虹彩色素上皮細胞の機能変化	187
(東北大学医学部眼科)	富田 浩史、桜木 素子 菅野江里子、阿部 俊明 玉井 信

レンチウイルスベクター（SIV）を用いた網膜への遺伝子導入による 病理組織学的及び電気生理学的影響の検討	196
（九州大学大学院医学研究院病理病態学）	池田 康博、米満 吉和 宮崎 勝徳、居石 克夫
（九州大学大学院医学研究院眼科）	坂本 泰二、石橋 達朗
（九州大学大学院神経生理学）	後藤 純信、飛松 省三
（DNAVEC 研究所）	田畑 寿晃、上田 泰次 長谷川 護
ロービジョン患者の日常生活行動と LoVE（Low Vision Evaluator）スコアとの関係	198
（国立身体障害者リハビリテーションセンター）	李 俊哉 築島 謙次、林 弘美 三輪まり枝、菅野 和子 中西 勉
（慈恵会医科大学眼科）	滝本 正子
LoVE スコアとハンフリー10-2 視野	203
（山梨医科大学眼科）	戸田 義喜、関根 新 飯島 裕幸
グラデーション化した遮光レンズの試作	207
（国立身体障害者リハビリテーションセンター第三機能回復訓練部）	林 弘美、三輪まり枝 菅野 和子、中西 勉 李 俊哉、築島 謙次
（HOYA（株）ビジョンケアカンパニー）	川合 忠章
虹彩、毛様体細胞からの視細胞様細胞の分化誘導	212
（京都大学附属病院探索医療センター開発部）	高橋 政代、春田 雅俊
（京都大学大学院医学研究科視覚病態学）	本田 孔士
（JST PRESTO 研究者）	小阪美津子
（東京大学医科学研究所遺伝子解析施設）	斉藤 裕美、斉藤 泉
（京都大学ウイルス研究所増殖制御学、大阪大学大学院医学研究科眼科）	井上 智之
（京都大学ウイルス研究所増殖制御学）	影山龍一郎
血小板由来増殖因子によるヒアロサイトの増殖・遊走能促進	219
（九州大学大学院医学研究院眼科学）	野田 佳宏、畑 快右 中村 由香、佐々由季生 中尾新太郎、久富 智朗 坂本 泰二、石橋 達朗

実験的脈絡膜新生血管における Pigment Epithelium DerivedFactor (PEDF) と 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現	223
	緒方奈保子、尾辻 剛 和田 光正、城 信雄 松村 美代
脈絡膜血管新生におけるマクロファージの役割	233
(九州大学大学院医学研究院眼科)	堤 千佳子、園田 康平 石橋 達朗
加齢黄斑変性における傍・外中心窩の脈絡膜新生血管抜去術	239
(日本大学医学部眼科)	島田 宏之、三國 絵梨 森 隆三郎、根本 愛 湯沢美都子
脈絡膜新生血管に対する経瞳孔的温熱療法 (TTT)	245
(信州大学医学部眼科)	臥雲 聡子、立岩 尚 新井 純、黒岩さち子 吉村 長久
経瞳孔温熱療法における脈絡膜下温度	249
(日本大学医学部眼科)	中島 正巳、湯沢美都子 島田 宏之、左近允徳啓 森 隆三郎、石原菜奈恵
経瞳孔温熱療法の短期経過と造影所見	252
(日本大学医学部眼科)	松本 容子、湯沢美都子
実験的脈絡膜新生血管に対する経瞳孔温熱療法後の臨床所見と組織所見の対比	256
(日本大学医学部眼科)	中島 正巳、左近允徳啓 森 隆三郎、石原菜奈恵 湯沢美都子
脈絡膜新生血管を伴わない網膜色素上皮剥離の光凝固	261
(日本大学医学部眼科)	湯沢美都子、石原菜奈恵 左近允徳啓
新生血管網に対する放射線照射の影響：照射後の血管密度、組織血流量および間質液圧の変化	265
(東北大学加齢医学研究所腫瘍循環研究分野)	堀 勝義
(東北大学加齢医学研究所機能画像研究分野)	窪田 和雄
(東北大学医学部眼科)	玉井 信

加齢黄斑変性に対する放射線治療の長期予後	270
(名古屋市立大学医学部眼科)	奥田 正俊、富田 一之 尾関 年則、森田 裕 吉田 宗徳、桜井 英二 小椋祐一郎
(名古屋市立東市民病院)	玉井 一司
脈絡膜新生血管に対するモノクローナル抗体を用いた薬物ターゲティング療法	273
(名古屋市立大学医学部眼科)	木村 英也、小椋祐一郎
(京都大学大学院医学研究科視覚病態学)	上水流広史、安川 力
(京都大学再生医科学研究所)	田畑泰彦
日本人における加齢黄斑症の危険因子：久山町研究	279
(九州大学大学院医学研究院眼科)	宮崎 美穂、石橋 達朗
(九州大学大学院病態機能内科学)	中村 秀敏、久保 充明 清原 裕
軟性ドローゼンの自然経過	283
(日本大学医学部眼科)	石原葉奈恵、湯沢美都子
滲出型加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管の自然退縮機序	287
(関西医科大学眼科)	高橋 寛二、三間由美子 西川 真紀、正 健一郎 福地 俊雄、西村 哲哉 松村 美代
加齢黄斑変性瘢痕期における固視点の視機能とロービジョンエイド	299
(日本大学医学部眼科)	藤田 京子、湯沢美都子
加齢黄斑変性症に対する低用量放射線治療、 光凝固療法の効果に関する無作為割付け比較対照試験	303
(東北大学大学院医学系研究科公衆衛生学分野)	辻 一郎
(東北大学医学部眼科)	玉井 信

網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究

主任研究者 玉井 信

東北大学大学院医学系研究科感覚器病態学講座眼科学分野

網膜色素変性及び加齢性黄斑変性等の網膜変性疾患および視神経萎縮は、Quality of life が著しく低下する疾患である。我々はこれらの疾患に対して、過去2期6年間に渡って特定疾患調査研究班に指定され、その分子遺伝学的解析、動物実験による病態解明、治療法の開発を行って成果をあげてきた。主な業績を列挙する。

1. 網膜色素変性及び加齢黄斑変性に関与する分子遺伝学的研究をすすめて、早期診断を可能にし、遺伝子治療への可能性を模索した。またすでに判明している原因遺伝子の解析のみでなく、網膜に多く発現している新しい遺伝子の同定、解析を行い、眼疾患の原因になりうるか否かを検討した。網膜色素変性の原因遺伝子解明の研究として、常染色体優性遺伝型の原因遺伝子である rhodopsin, peripherin/RDS、ROM 1、RP 1、FSCN 2 遺伝子の解析、常染色体劣性網膜色素変性における原因遺伝子として arrestin、cGMP phosphodiesterase alpha、beta subunit、X 染色体劣性に対しては、RP 2 遺伝子、若年性網膜分離症に対しては XLRS 1 遺伝子、choroideremia については REP-1 遺伝子異常の解析を行い、多くの遺伝子異常及びそれが引き起こす臨床像を検討することが出来た。その結果、遺伝子異常の種類、頻度には人種差が認められることが判明した。さらに、FSCN 2 遺伝子異常は、日本人固有の網膜色素変性の原因遺伝子異常であることを発見した。これによってそれまで欧米の白人における分子遺伝学的解析しかなかったものが、日本人に特異的な遺伝子異常による網膜色素変性の発見につながった。
2. 加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管発生の病態解明と放射線照射の感受性、サイトカイン療法、遺伝子治療等に対する臨床的、基礎的研究では、手術時に得られる増殖膜の検討より終末糖化産物 (AGE) のドルーゼンへの沈着、様々なサイ

トカイン遺伝子の発現を報告した。新生血管を示す動物モデルの作成においては、光凝固によるものや、種々の血管新生因子を網膜下に投与することで作成に成功してきた。加齢黄斑変性から得られるサンプルから、血管内皮細胞のサイトカインとその受容体を制御する遺伝子機構を解明するとともに、この疾患モデルを作成して放射線に対する感受性をみた。網膜細胞移植による治療の試みでは、異種の細胞移植による移植部位へのさまざまなサイトカイン遺伝子の発現を確認するとともに、虹彩色素上皮細胞も網膜色素上皮細胞と同様な移植効果を示すことが判明した。臨床研究では、加齢黄斑変性の新生血管膜の外科的切除後に、自己虹彩 (IPE) 移植をすること、さらに移植された IPE を画像化して評価した。また、神経幹細胞 (stem cell) 移植が、網膜において視細胞へ変化するか否かの可能性を研究した。その結果、ラットおよびヒト胎児網膜から未分化な神経幹細胞の培養に成功し、さらにホメオボックス遺伝子を導入する事で視細胞のマーカーであるオプシン陽性細胞を得ることに成功した。神経幹細胞移植についても実験段階ではあるが、視細胞への分化は示され、今後新たな治療法として発展するかもしれない。

3. 視神経萎縮に対してはミトコンドリア遺伝子を中心とした解析を行い、副腎皮質ステロイド薬を中心とした薬物療法の有効性を検討した。視神経萎縮に対し神経節細胞の軸索再生に対する効果は今までまったく治療法がなかった本疾患に対する夢を与えるものである。
4. 我々は極低視力のグレード分類のための機器 (LoVE) を開発・改良している。Low vision evaluator (LoVE) を用いて網膜色素変性に対する薬物効果の判定を多施設で行うという過去にない治療研究をおこなった。これは今後 EBM にもとづく治療が問題になる時、大きな意義を持つも

のと考える。班が対象とする3疾患の治療法の開発とその有効性の評価をこの機械を用いて行った。また網膜色素変性患者に投与されているヘレニエン、ビタミンAの薬物が有効か否かをLoVEを用いて検討した。これは今までに例のない有効な解析方法であり今後の治療研究の評価に用いられるものと思われる。

以上の研究の中には、遺伝性網膜変性疾患に関しては日本人眼底白点症患者におけるRDH5遺伝子1085delC/insGAAG変異はfounder effectであることが判明し、さらにもFSCN2遺伝子異常が日本人常染色体優性網膜色素変性患者の高頻度変異であることを解明し十分目標は達成した。加齢黄斑変性に対する自己虹彩色素上皮移植は臨床例が増加し、拒絶反応、合併症が認められず良好な結果を得、十分目標は達した。ラットおよびヒト胎児網膜から未分化な神経幹細胞の培養に成功し、さらにホメオボックス遺伝子を導入する事で視細胞のマーカーであるオブシン陽性細胞を得ることに成功し、十分な成果をあげた。網膜色素変性の視機能を正しく評価する方法を確立し、Low Vision Evaluator (LoVE) と名付けた測定器を開発した。以上のことより、6年間で90%の目標は達成できた。

まとめ

我々が、6年間行ってきた研究成果の学術的、国際的、社会的意義は、日本のみならず世界の研究者の注目をうけ、独創的な研究が多く発表された。

網膜色素変性とその類縁疾患の原因遺伝子、特に日本人固有の遺伝子異常を発見した。さらに遺伝性網膜変性疾患の遺伝子異常の頻度は、かなり人種差があり日本人に高頻度におこる遺伝子異常を指摘した事は、今後遺伝子治療等を行う上で重要な意味を持つであろう。加齢黄斑変性に対する虹彩色素上皮移植は拒絶反応もなく良好な結果を得、今後網膜色素変性に対しても応用可能である。このような基礎実験、臨床研究により、我々がとりあげた3疾患の治療法開発への大きな足がかりを築いたと考えられる。

平成13年度は現在の班員で続けてきた2期6年間の本特定疾患調査研究班体制の最終年度であった。この6年間毎年研究課題を掲げ、班員全員が一体となって調査・研究に協力してきた。これまで難病として疫学調査や診断基準の作成などを除いて取り掛かる術もなかったこの疾患に対して、生命科学の進歩や班員の方々の努力によって、少なくとも原因究明と今までよりは科学的な評価に耐えうる治療法を見出す糸口にたどり着いたことは特記すべきことであろう。

班員すべての努力と協力を深く感謝したい。特に小口芳久教授（慶応大）には班会議ごとに伝統ある北里講堂をお貸し頂き、また運営をお手伝い頂きました。また事務局を担当し班会議の開催、業績集をまとめて頂いた和田裕子先生、班研究の経理および其の他事務一切を取り仕切り、間違いなく運営してくれた相良淑子技官、2期目から厚生労働省の依頼で全国の網膜色素変性患者のデータベースを作成して頂いた早津さんに心から感謝したい。さらにこの研究班が継続され、有効な治療法の確立までこぎつけるには、新たに班員になられる先生方をはじめ、多くの方々の協力が是非必要で、新しく班長になられた先生の下で、さらに強力な組織になることを心から願っている。又厚生労働省の温かいご支援を期待したい。

緑内障モデルラットにおける各種緑内障治療薬の神経保護作用の検討

Neuroprotective effects of anti-glaucoma agents on glaucoma model rats

日時友美、大黒 浩、高野淑子、山崎仁志、丸山幾代、中沢 満
(弘前大学医学部眼科学教室)

Tomomi Metoki, Hiroshi Ohguro, Yoshiko Takano, Hitoshi Yamazaki, Ikuyo Maruyama,
and Mitsuru Nakazawa
(Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine)

【抄 録】

目的：緑内障モデルラットを用いて各種緑内障治療薬の神経保護作用について組織学的、免疫組織化学的および電気生理学的に検討した。

方法：ラット眼の硝子体中に20mM NMDAを注入し、各種緑内障点眼薬の1回硝子体投与あるいは2週間点眼投与及びCa拮抗剤であるニルバジピンの全身投与後、網膜機能及び組織学的検討を行った。

結果：NMDAの硝子体注入により、ERGでは濃度依存的に波形が障害された。ニプラジロール硝子体注入、レボブノロール点眼、ニルバジピン全身投与によりERGでは保護効果を認めた。また、レボブノロール点眼により網膜神経節細胞の厚さの保存を認め、さらに免疫組織染色でGFAPの染色性が減少した。

考察：網膜神経節細胞障害ラットを用いた検討から、点眼薬ではニプラジロールとレボブノロールが、内服薬ではニルバジピンが神経保護薬として期待される可能性が示唆された。

Abstract

Purpose : The purpose of the present paper is to study the drug neuroprotective effects of anti-glaucoma agents on glaucoma model rats.

Methods : Rat eyes were treated with intravitreal injection of 20 mM NMDA. Several anti-glaucoma drops were once vitreous administrated or instilled for two weeks to the rat eyes and Ca-inhibitors were abdominal injected for two weeks and the retinal function and morphology were evaluated.

Results : Intravitreal administration of NMDA caused significant decrease of electroretinogram(ERG) responses in a dose-dependent manner. Intravitreal administration of nipradilol, topical administration of levobunolol and nilvadipin retained significant effects of preservation of ERG responses. In retinal morphology thickness of GCL was significantly thicker in levobunolol treated eye. In addition, levobunolol caused marked suppression of upregulation of grail fibrally acidic protein caused by excitotoxicity by NMDA.

Conclusion : Our present study suggest that nipradilol, levobunolol and nilvadipin had a beneficial effects on NMDA-induced retinal dysfunction in rat.

キーワード：緑内障、神経保護作用、NO作用、 α ブロック作用、細胞内Caイオン濃度

<緒言>

緑内障の発症機序には高眼圧と眼圧に依存しない因子の両者が働き、緑内障性視神経障害を起こすことが知られており、これらに対する治療法としては、高眼圧に対しては眼圧下降、眼圧非依存性因子に対しては神経保護というすう勢になりつつある。

今回我々は、NMDA硝子体注入による網膜神経節細胞障害ラットを用いて各種緑内障治療薬の神経保

護作用について、組織学的、免疫組織化学的および電気生理学的に検討した。

<方法>

1、抗緑内障薬の硝子体内投与

NMDA (20mM) 5 μ lまたは抗NSE抗体をラット硝子体中に注入し、網膜神経節細胞障害ラットモデルとし、抗緑内障薬であるチモロール、ベタキソ

ロール、ニブラジロールの1回硝子体内投与後2週間後に網膜機能を検討するためにERGを施行した。

2、抗緑内障薬の点眼投与

前述した網膜神経節細胞障害ラットモデルに、抗緑内障薬であるチモロール、ベタキソロール、ニブラジロール、カルテオロール、ラタノプロスト、イソプロピルウノプロストン、アブラクロニジン、レボブノロールの2週間点眼投与後に網膜機能を検討するためにERGを施行、その後眼球を摘出し、HE染色後組織学的検討を行った。また、GFAPによる免疫染色も行った。

3、Ca拮抗薬（ニルバジピン）の全身投与

網膜神経節細胞障害ラットモデルに、Ca拮抗剤であるニルバジピンの2週間全身投与後に、上記と同様の方法により網膜機能及び組織学的検討を行い、その基材によるもの、イソプロピルウノプロストンの2週間点眼投与によるもの、またニルバジピンとともにET-1を全身投与したものとを比較検討した。

<結果>

1、抗緑内障薬の硝子体内投与

硝子体中に注入したNMDAは濃度依存的にERGの波形を障害し、またNMDAと同様に抗NSE抗体でもERG障害を起こした。

NMDA硝子体注入ラットの硝子体内にチモロールを0.1, 1, 10nmolの濃度で注入したものではERGの波形に変化はなかった。ベタキソロールを1pmol, 0.1, 1nmolの濃度で注入したものでもERGの波形に変化はなかった。 α 、 β ブロッカーであるニブラジロールを2.5pmol, 0.1, 1nmolの濃度で注入したものでは、2.5pmolと低濃度のものではERGの保護効果が見られた。また、NOを除いたデスニトロ体を注入したところ、ERGの保護効果は消失した。

2、抗緑内障薬の点眼投与

ERGでは、チモロール、ベタキソロール、ニブラジロール、カルテオロール、ラタノプロスト、イソプロピルウノプロストン、アブラクロニジンを点眼したものでは有意な差は見られなかったが、レボブノロールを点眼したものでは有意なERGの保護効果を確認した。

また、各抗緑内障薬での網膜各層の厚さを計測したところ、ERGと同様にレボブノロール点眼により有意な網膜神経節細胞の厚さの保存が見られた。一方、他の薬剤でも統計学的に有意ではなかった。若干の保護効果が見られたものもあった。

3、Ca拮抗薬（ニルバジピン）の全身投与

ERGでは、ニルバジピンの全身投与により保護効果が認められた。また血管収縮作用をもつET-1をニルバジピンと一緒に全身投与してもニルバジピンによるERGの保護効果は消失しなかった。

<考察>

ニブラジロールは、 α 、 β ブロッカーであるが、ニトロ基を持ち、NO作用も併せ持つということが知られている。1の実験結果より、ニブラジロールにはERG改善作用があり、その機序としては、ニブラジロールの持つNO作用による血管の拡張が血流量を増加させていることに関係しているものと考えられた。しかし、このような薬剤の硝子体内投与は、薬剤による網膜への直接の毒性も否定できないと思われるために、方法2のような点眼投与による検討を行った。

2の実験結果からは、レボブノロールがERG改善また網膜神経節細胞の厚さの保存に効果があった。これらのことより、レボブノロールは神経保護作用に効果があることが示唆された。そしてこのことは、さらに免疫染色によっても証明された。レボブノロールもニブラジロールと同様に α 、 β ブロッカーであり、 α 1ブロック作用による眼内血流量増加作用を持つ。またその他に、レボブノロールは脂肪親和性による角膜からの浸透性が高いという特徴を併せ持つ。よって、レボブノロールの神経保護作用には眼内血流量増加作用と角膜からの浸透性という2つの機序が関係しているものと考えられた。

ニルバジピンはCa拮抗薬であり、血流量増加作用を持つことが知られている。

また、イソプロピルウノプロストンにも血流量増加作用があると言われているが、方法3の実験による比較検討からは、ニルバジピンによるERGの保護効果は血管収縮作用をもつET-1をニルバジピンと一緒に全身投与しても消失しなかったということより、細胞内のCaイオンの濃度がERGの保護効果に関係しているのではないかと考えられた。

<結論>

NMDA硝子体注入による網膜神経節細胞障害ラットを用いた検討より、点眼薬ではニブラジロールとレボブノロールが、内服薬ではニルバジピンが神経保護薬として期待される可能性が示唆された。その機序としては、ニブラジロールの持つ内因性のNO作用、レボブノロールが持つ α 1ブロック作用による眼内血流量増加や、脂肪親和性による角膜からの浸透性、ニルバジピンの持つ細胞内Caイオン濃度の制御作用などが考えられた。

参考文献

- 1 Ohguro H, Ogawa K, Nakagawa T. Both recoverin and hsc 70 are found as autoantigens in patients with cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40 : 82-89.
- 2 Maeda A, Ohguro H, Maeda T, Kuroki Y. Low expressions of α -A crystallins and rhodopsin kinase of photoreceptors in retinal dystrophy rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40 : 2788-2794.
- 3 Ohguro H, Ogawa K, Maeda T, Maeda A, Maruyama I. Cancer-associated retinopathy induced by both anti-recoverin and anti-hsc70 antibodies in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40 : 3160-3167.
- 4 Suzuki J, Ohguro H, Oguri N, Satoh M, Kon S, Kogawa K, Nakagawa T. Clinicopathologic and immunologic analysis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas arising in conjunctiva. *Jan J Ophthalmol* 1999, 43:155-161.
- 5 Ohguro H, Ohguchi S. A case of retinoblastoma suspected by optic nerve invasion by MR imaging. *Tumor Res* 1999, 34 : 83-87.
- 6 Masaoka N, Emoto Y, Sasaoka A, Fukushima A, Ueno H, Ohguro H. Fluorescein angiographic findings in case of cancer-associated retinopathy. *Retina* 1999, 19 : 462-464.
- 7 Ohguro H. Retinal 33kDa protein is recognized by autoantibodies from patients with melanoma-associated retinopathy. *Tumor Res* 1999, 34:41-48.
- 8 Maeda T, Ohguro H, Maeda A, Ogawa K, Nakagawa T, Hirai I, Sato N. Identification of antigenic site within hsc 70 by serum autoantibody in patients with cancer-associated retinopathy. *Tumor Res* 1999, 34 : 49-56.
- 9 Maeda A, Ohguro H, Maeda T, Wada I, Sato N, Kuroki Y. Aberrant expression of photoreceptor specific calcium binding protein (recoverin) in cancer cell lines. *Cancer Res* 2000, 60 : 1914-1920.
- 10 Maruyama I, Ohguro H, Ikeda Y. Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against g-enolase found in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41 : 1657-1665.
- 11 Maeda T, Ohguro H, Sohma H, Kuroki Y, Wada H, Okisaka S, Murakami A. Purification and characterization of bovine cone arrestin (cArr). *FEBS Lett* 2000, 470 : 336-340.
- 12 Maruyama I, Ohguro H, Ikeda Y. Two cases of normal tension glaucoma and two of primary open angle glaucoma with serum autoantibody against retinal ganglion cells. *Sapporo Med J* 2000, 69 : 11-18
- 13 Ikeda Y, Ohguro H, Maruyama I. Two cases of primary open angle glaucoma with serum autoantibody against retinal ganglion cells. *Jpn J Ophthalmol* 2000 ; 44 : 648-652.
- 14 Maeda, A., H. Ohguro, Y. Nabeta, Y. Hirohashi, H. Sahara, T. Maeda, T. Sato, Y. Chuns, Y. Nishimura, Y. Kuroki N. Sato. Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes with recoverin, cancer-associated retinopathy antigen, related with a preferable prognosis in paraneoplastic syndrome. *Eur J Immunol* 2001, 31 : 563-572.
- 15 Maeda T, Maeda A, Maruyama I, Ogawa K, Kuroki Y, Sahara H, Sato N, Ohguro H. Mechanisms of photoreceptor cell death in cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 42 : 705-712.
- 16 Ohguro H, Ogawa K, Maeda T, Maruyama I, Maeda A, Takano Y, Nakazawa M. Retinal dysfunction in cancer-associated retinopathy is improved by Ca²⁺ antagonist administration and dark adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 42 : 2589-2595

20010828

P. 6-15 は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので下記の資料をご参照ください。

資料

- 14 Maeda, A., H. Ohguro, Y. Nabeta, Y. Hirohashi, H. Sahara, T. Maeda, T. Sato, Y. Chuns, Y. Nishimura, Y. Kuroki N. Sato. Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes with recoverin, cancer-associated retinopathy antigen, related with a preferable prognosis in paraneoplastic syndrome. *Eur J Immunol* 2001, 31 : 563-572.

BDNF 遺伝子導入による網膜神経節細胞の保護

Rescue of Retinal Ganglion Cells by BDNF Gene Transfection

溝田 淳、 莫 曉芬、 横山 暁子、 根岸久也、 忍足俊幸、 安達恵美子

(千葉大学大学院医学研究院視覚病態学)

(Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medicine, Chiba University)

【抄 録】

ラットにおいて、BDNF 遺伝子を硝子体内に注入し電トロポレーションをかけることにより、網膜神経節細胞での遺伝子の発現および神経保護効果について検討した。

BDNF 遺伝子を注入し、電トロポレーションをかけた群では、免疫組織化学的に明らかに BDNF の発現が多くみられたが、BDNF 遺伝子を注入して電トロポレーションをかけていない群や、PBS を注入して電トロポレーションをかけた群では、無処置のものとほぼ同様であった。また視神経切断による障害に対して、BDNF 遺伝子を注入し、電トロポレーションをかけた群では、有意にアポトーシスが抑制されていた。

BDNF 遺伝子を電トロポレーションを導入することにより BDNF 蛋白が過剰発現し、神経節細胞に対する保護効果がみられた。

Abstract

To determine whether the intravitreal injection of BDNF gene can be transfected into retinal ganglion cells by electroporation, and whether axotomized RGCs can be rescued after tranfection by BDNF in adult rats.

In the rats with BDNF gene injection with electroporation, the over expression of BDNF protein was observed immunohistochemically. But in the rats with BDNF gene injection without electroporation or with PBS injection, the overexpression was not found. BDNF gene injection could rescue retinal ganglion cells from axotomy.

BDNF gene injection with electroporation can overexpress the protein and rescue the retinal ganglion cells.

キーワード：BDNF 遺伝子、電トロポレーション、網膜神経節細胞

Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) は虚血^{1,2}や N-methyl-D-aspartate (NMDA) 投与³による網膜傷害に対し保護作用があることが知られている。しかし、BDNF を直接投与したのではその作用時間が短く、臨床応用を考えた場合より長期にその作用を維持するためには多数回の投与が必要であり、投与による障害もかなりありえるものと考えられる。それを解決するためには、眼内の何らかの細胞に BDNF を過剰に発現させることによって、より長期にわたってその効果の持続する可能性のあるものと考えられる。今回我々は、電トロポレーションを併用することにより神経節細胞に BDNF の遺伝子の導入を行い、視神経切断による神経節細胞への障害からの保護に関して検討した。

対象および方法

動物

9 週令の Wister ラット(体重 200-300 g)を用いた。

BDNF プラスミド注入と電トロポレーション

pRc/CMV ベクターにマウスの BDNF の cDNA を組み込んだものを大腸菌内で増殖させ、そのプラスミドを抽出した。そのプラスミドを 4 μ l (プラスミド 10 μ g) を 30 ゲージの注射針にて硝子体内に注入した。

BDNF プラスミドの注入直後に、ピンセットの先につけた電極で眼球を前後方向にはさみ、角膜方向を陰極、強膜を陽極として、電トロポレー

ションを行った。エレクトロポレーションの条件は、刺激時間99msの矩形波で強度12V/cmの刺激を1秒の間隔にて5回連続で行い、5分後にもう一度、同様の5回の刺激を行った⁴ (BDNF E (+)群)。

今回コントロールとして、PBSをBDNFプラスミドの代わりに注入しエレクトロポレーションを行った群 (PBS群)、BDNFプラスミドを注入しエレクトロポレーションを行わない群 (BDNF E (-)群)、BDNFのDNAを含まないプラスミドのみを注入しエレクトロポレーションを行った群 (プラスミド群)を用いた。

免疫組織化学

注入後1週にて、眼球を摘出し、網膜を取り出し凍結切片を作り、抗ヒトBDNF抗体を1次抗体として、FITCにてラベルされた2次抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。

視神経切断

網膜神経節細胞にアポトーシスを誘導するために視神経の切断を行った。視神経に沿って外眼筋と視神経鞘を切開し、血管を傷つけないように注意して、眼球より1mm後方で視神経を切断した。切断後、眼底を観察し、血流が保たれていることを確認した。

TUNEL染色

視神経の切断後 TUNEL 染色を行った。同時に propidium iodide (PI) にても染色し、神経節細胞の核と、TUNEL 陽性となった細胞の数を計算した。

視神経切断後の生存神経節細胞

トレーサーである DiI を上丘に注入し、逆行性に神経節細胞を標識し、視神経切断後2、4、6週後に生存している神経節細胞数を数えた。

結果

BDNF蛋白の発現

BDNF プラスミドを注入して1週間後に、免疫組織化学的にBDNFの蛋白を染色すると、BDNF

E (+)群でのみBDNF蛋白の過剰発現が神経節細胞に認められた。その他のBDNF E (-)群やPBS群、プラスミド群では、無処置群と同様で、まばらに染色が見られるのみであった。

TUNEL染色

視神経を切断1週間後 TUNEL 染色を行うと、無処置群では TUNEL 陽性の細胞が2%前後みられたのに対して、BDNF E (+)群では約30%、その他の群ではいずれも80%前後の神経節細胞で TUNEL 陽性となり (図1)、BDNF E (+)群において、アポトーシスの抑制がみられた。

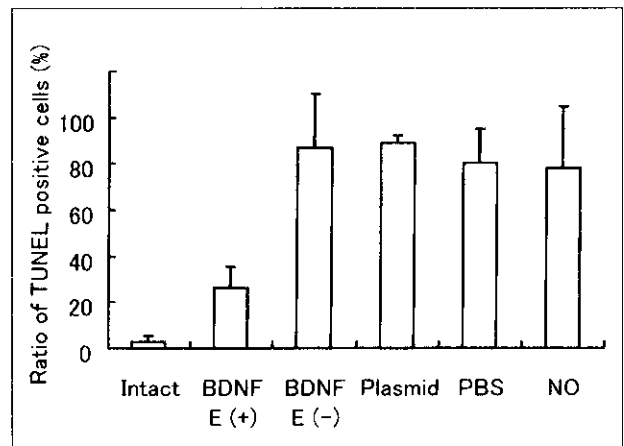


図1. BDNFプラスミド注入1週間後の網膜神経節細胞のTUNEL染色陽性となった細胞数の比率。

視神経節細胞の生存数

表1に視神経切断後の視神経節細胞の生存数を示す。PBS群およびBDNF E (-)群では共にほぼ同様の経過を示しているのに対して、BDNF E (+)群では時間の経過と共に徐々に生存細胞数が減少しているが、切断6週後でも40%前後の神経節細胞が生存している。

考案

今回の結果をまとめると、BDNFの遺伝子はエレクトロポレーションを行うことにより細胞内に導入されBDNF蛋白の過剰発現が免疫組織学的に確認さ

表1 視神経切断後の網膜神経節細胞の生存数

	BDNF E (+)	BDNF E (-)	PBS	プラスミド
2週後	1429 ± 638*	142 ± 72	114 ± 36	129 ± 25
4週後	1169 ± 415*	9 ± 11	3 ± 2	14 ± 6
6週後	879 ± 436*	1 ± 1	2 ± 2	7 ± 1

* : P<0.01

れ、BDNF遺伝子のみあるいはエレクトロポレーションのみ、プラスミドのみではBDNFの発現はPBSを注入したものと差は見られなかった。また、BDNF遺伝子をエレクトロポレーションを行って導入することにより、視神経切断による網膜神経節細胞の保護効果がみられた。遺伝子導入により、蛋白注入と比較してより長期にわたってその効果の発現がみられる可能性があり、それによって、注入手技による網膜障害の可能性を低下する可能性があるものと考えられる。

文献

1. Unoki K, LaVail MM. 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* 1994 ; 35 : 907-915.
2. Ikeda K, Tanihara H, Honda Y, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C. BDNF attenuates retinal cell death caused by chemically induced hypoxia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 ; 40 : 2130-2140.
3. Kido N, Tanihara H, Honjjo M, Inatani M, Tatsuno T, Nakayama C, Honda Y. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Res* 2000 ; 884 : 59-67.
4. Yokoyama A, Oshitari T, Negishi N, Dezawa M, Mizota A, Adachi-Usami E. Electrically Applied Hsp27 Protected Retinal Ganglion Cells Against Ischemia-Reperfusion in Rat Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 ; 42 : 3283-3286.

20010828

P. 19-22 は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので下記の資料
をご参照ください。

資料

4. Yokoyama A, Oshitari T, Negishi N, Dezawa M, Mizota A, Adachi-Usami E. Electrically Applied Hsp27 Protected Retinal Ganglion Cells Against Ischemia-Reperfusion in Rat Retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42: 3283-3286.

ES細胞を用いた人工移植片による視神経再生と分化誘導

Transplanted embryonic stem cells differentiate
and provide substrate for optic nerve regeneration in adult rats

根岸久也、 窪田伸矢、 安達恵美子
(千葉大学大学院医学研究院視覚病態学)

(Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medicine, Chiba University)

【抄 録】

我々は、培養 Schwann 細胞を高密度に含む人工移植片を切断視神経へ移植することにより、人為的環境下において視神経再生を誘導してきた。今回我々は、胚性幹細胞 (Embryoni Stem Cell (ES Cell)) を人工移植片の主成分とし、視神経再生を誘導可能かどうか検討した。ES 細胞は細胞外基質成分とともに物質半透過性チューブに充填し、切断視神経に移植した。移植術後 3 週目において、移植片内は血管新生を伴う実質性の組織で満たされていた。免疫組織化学にて、移植片内に再生神経線維を観察することが可能であった。また、中枢グリアであるアストロサイトやオリゴデンドロサイト、さらにニューロンが、移植した ES 細胞より分化誘導された。これらの結果より、ES細胞は視神経再生を誘導し、各種神経系細胞へと分化誘導されることが確認された。

Abstract

We have reported that optic nerve fibers regenerate into an artificial graft composed of cultured Schwann cells. The purpose of this study was to determine whether transplanted embryonic stem (ES) cells can provide a substrate into which axotomized optic nerve fibers can regenerate. ES cells were suspended in an extracellular matrix, and transferred into permeable tube. The graft was transplanted onto the retinal stump of a transected adult rat optic nerve. 3 weeks post-operation, the graft remained intact and was filled with parenchymatous tissue together with neovascular tissue. Immunohistochemical analysis showed that the retinal ganglion cell axons regenerated into the artificial graft. The transplant ES cells survived and differentiated into astrocytes (GFAP positive cells), oligodendrocyte (gal-c and 04-positive cells), and neurons (tublin-positive cells) in the graft. These results suggest that ES cells are an efficient substrate that can support optic nerve regeneration. The ES cells can differentiate into astrocytes, oligodendrocytes, and neurons in the artificial milieu.

キーワード：神経再生、神経分化、幹細胞、神経グリア、移植、網膜神経節細胞

<目的>

哺乳類の視神経は、損傷や変性後、末梢神経を移植するなど適切なグリア環境が与えられることにより再生可能である⁽¹⁾。これまで我々は、末梢神経の主要なグリア細胞であり神経再生に対して促進的に作用する Schwann 細胞を単離培養し、これを主成分とした人工移植片を用いて効果的に視神経再生を誘導することに成功した。また、各種神経成長因子を加えることにより、末梢神経移植と比べ遥かに高い再生率を得ることに成功した⁽²⁾。しかしながら、末梢神経移植片や培養 Schwann 細胞を用いた人工移植片によって再生した視神経は、本来の視神

経の形態とは異なり、末梢神経に近い形態を有する。今回我々は、本来の視神経の形態に近い形で視神経を再生させるために、胚性幹細胞 (ES 細胞) に着目した。この ES 細胞を人工移植片の主成分とし、視神経再生が誘導可能かどうか、また、その際移植された ES 細胞は、どのような細胞へと分化誘導されるか合わせて検討した。

<方法>

マウス由来 ES 細胞を細胞外基質成分と混合し、分子量 1 万以下の物質のみ通す半透膜に裏打ちされた物質半透過性チューブに、この混合液を充填し人

工移植片とした。成体ラット（Wistar種）の左視神経を露出し、視神経硬膜上をはしる網膜中心動脈を傷つけない様にして、眼球より1ミリのところで完全に切断し、この移植片を10-0ナイロン縫合糸を用いて縫合した。移植術後3週目に動物を固定し、移植片を眼球とともに取り出し凍結切片を作成した。各種抗体を用いて免疫組織化学を行った後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。神経線維は β -tublin, neurofilament, MAP-2に対する抗体を用いて染色し、アストロサイトはGFAP、オリゴデンドロサイトはO4, gal-Cをマーカーとした。移植した細胞は、マウスの細胞を認識する抗H-2K抗体を用いて標識した。

<結果>

移植術後3週目に移植片内は、血管新生を伴う実質性の組織で満たされていた。免疫組織化学にて、再生関連タンパクのGAP-43やNCAMのような細胞接着分子を発現しながら移植片内に伸長する再生神経線維を観察することが可能であった。また、再生神経線維は、アストロサイト（GFAP陽性細胞）に導かれる形で再生してゆく像が確認された。オリゴデンドロサイトは再生線維の先端に誘導されていた。これらのグリア細胞は、H-2K陽性細胞であり、移植したES細胞より分化誘導されたものであった。移植片内には、網膜神経節細胞の再生神経線維のみならず、ES細胞より分化誘導された神経細胞や神経線維も観察することができた。

<結論>

以上のことより、(1) ES細胞を主成分とした人工移植片を用いて、視神経再生を誘導することが可能であった。(2) 視神経再生時、移植されたES細胞はアストロサイトやオリゴデンドロサイトのようなグリア細胞のみならず、ニューロンへの分化も誘導された。(3) 再生神経線維はES細胞より分化したアストロサイトに導かれる形で、NCAMを発現しながら再生した。(4) 移植されたES細胞がニューロンへと分化したことより、網膜-視神経回路網再構築において、ES細胞が介在ニューロンとして働く可能性が示唆された。

<文献>

- 1) So KF, Aguayo AJ. Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. Brain Res, 328 : 349-354, 1985.
- 2) Negishi H, Dezawa M, Oshitari T, Adachi-Usami E. Optic nerve regeneration within artificial Schwann cell graft in the adult rat. Brain