

は対照群に比して 35%の減少を認めた ($p<0.01$) (図2)。また、Am80 投与による体重減少や脱毛など全身的な副作用は認めなかった。

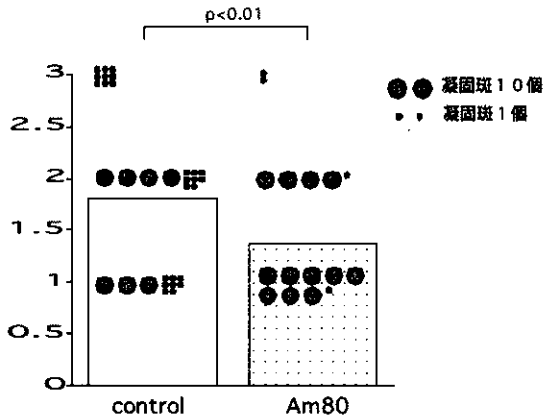


図1 蛍光眼底造影スコア

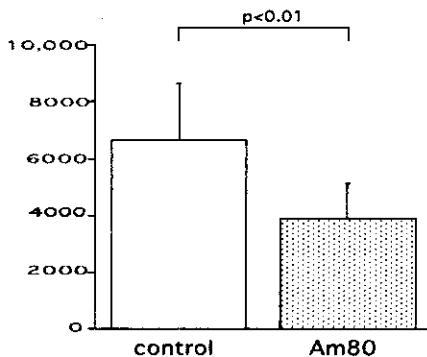


図2 CNVM 断面積

D. 考察

Am80 の経口投与はマウス脈絡膜新生血管モデルにおいて、脈絡膜新生血管膜の形成、および、新生血管からの蛍光漏出を有意に抑制した。また、AM-80 は臨床前試験に用いられており、有害作用は報告されていない。本研究においても体重減少や、脱毛などの副作用は認めなかった。以上より、レチノイン酸は脈絡膜新生血管の形成に関与することが示唆され、CNV 治療の新たな

ターゲットとなりうることが判明した。

E. 結論

マウス CNV モデルにおいて、RAR 特異的アゴニストである Am80 は CNV 抑制効果を有する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Akiyama H, Tanaka T, Maeno T, et al. Induction of VEGF gene expression by retinoic acid through Sp1-binding sites in retinoblastoma Y79 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:1367-74,2002.
2. Arensman RM, Stolar CJ. Vitamin A effect on tumor angiogenesis. *J Pediatr Surg.* 14:809-13,1979.
3. Bollag W. The retinoid revolution. Overview. *FASEB J.* 10:938-9, 1996.
4. Diaz BV, Lenoir MC, Ladoux A, et al.

- Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem*.275: 642-50, 2000.
5. Yanagi Y, Tamaki Y, Obata R, et al. Subconjunctival administration of bucillamine suppresses choroidal neovascularization in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43: 3495-9, 2002.
6. Yanagi Y, Tamaki Y, Inoue Y, et al. Subconjunctival doxifluridine administration suppresses rat choroidal neovascularization through activated thymidine phosphorylase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:751-4,2003.
7. Nagai H, Matsuura S, Bouda K, et al. Effect of Am-80, a synthetic derivative of retinoid, on experimental arthritis in mice. *Pharmacology* 58:101-12, 1999.

39. IFN- γ で刺激した単球による網膜色素上皮細胞の アポトーシス誘導へのカスパーゼ3の関与

吉田綾子¹⁾、吉田茂生¹⁾、石橋達朗¹⁾、Susan Elner²⁾、Victor Elner²⁾

(¹⁾九州大、²⁾ミシガン大)

研究要旨 加齢黄斑変性では、網膜色素上皮細胞(RPE)のアポトーシスがみられること、また、しばしば RPE と単球・マクロファージが隣接していることが報告されている。今回我々は、IFN- γ で刺激した単球による RPE のアポトーシスの誘導について、カスパーゼ3の関与を中心に検討した。無刺激または IFN- γ で刺激したヒト単球と、RPE の共培養を行った。TUNEL 染色を用いてアポトーシスの有無を検討し、また、RPE 内のカスパーゼ3活性を測定した。IFN- γ で刺激したヒト単球と RPE との共培養では、RPE のアポトーシスがみられたが、無刺激の単球と RPE との共培養ではアポトーシスはみられなかった。このアポトーシスの誘導には、単球と RPE の接着が必要であった。IFN- γ で刺激した単球と RPE との共培養では RPE のカスパーゼ3活性は増加しており、カスパーゼ阻害剤により RPE のカスパーゼ3活性、アポトーシスはともに抑制された。また、カスパーゼ3活性、アポトーシスの誘導は、抗 CD18、抗 ICAM1 抗体によっても抑制された。これらの結果より、IFN- γ で刺激した単球の接着により、カスパーゼ3の活性化を介して RPE のアポトーシスが誘導されることが解った。眼内において、活性化した単球/マクロファージの浸潤により RPE のアポトーシスが起きる可能性がある。

A. 研究目的

加齢黄斑変性(AMD)では、しばしば網膜色素上皮細胞(RPE)と、単球・マクロファージが隣接して存在している。単球・マクロファージは fibroblast、neuron、smooth muscle cell などに接触してこれらの細胞のアポトーシスを誘導する¹⁾。また、AMD では RPE のアポトーシスが報告されている²⁾。今回我々は IFN- γ で刺激した単球により RPE のアポトーシスが誘導されるかをカスパーゼ3の関与を中心に検討した。

B. 研究方法

無刺激もしくは IFN- γ で刺激したヒト単球と RPE を同一ウェル内で48時間共培養し、TUNEL 染色を行った。また、proliferating cell nuclear antigen(PCNA)に対する免疫染色を行った。共培養後、単球と RPE を分離し、カスパーゼ3活性を caspase-3 cellular activity assay kit を用いて測定し、また、Western blot analysis も行った。抗 CD18、ICAM-1、VCAM-1、TNF- α 、TRAIL、IL1 抗体とともに共培養を行い、

TUNEL 染色、カスパーゼ 3 活性測定を行った。

C. 研究結果

結果：IFN- γ で刺激した単球と RPE の共培養では TUNEL 陽性 RPE の数が優位に増加したが無刺激の単球との共培養では TUNEL 陽性 RPE の数に優位な変化はなかった (図 1)。PCNA 陽性 RPE の数は、無刺激の単球との共

培養では増加し、IFN- γ 刺激した単球との共培養では減少した。

IFN- γ で刺激した単球と RPE の共培養を行うと、RPE 内のカスパーゼ 3 活性が上昇したが、無刺激の単球との共培養では変化は見られなかった (図 2)。カスパーゼ 3 阻害剤である Z-DEVD-fmk によりこのカスパーゼ 3 活性の上昇と TUNEL 陽性 RPE の数は抑制された。Western blot 法においても、IFN- γ で刺激した単球との共培養後、RPE 内で活性化したカスパーゼ 3 がみられた。抗 CD18、ICAM-1 抗体によりカスパーゼ 3 活性

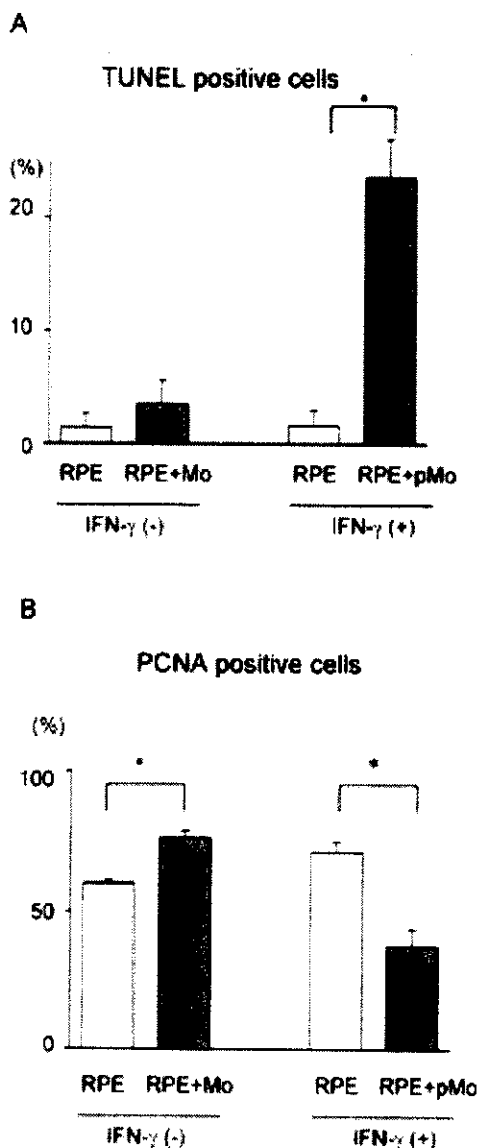


図 1 IFN- γ で刺激した単球による RPE のアポトーシス。単球と RPE の共培養を行い、TUNEL 陽性 RPE (A) と PCNA 陽性 RPE (B) の数を測定した。

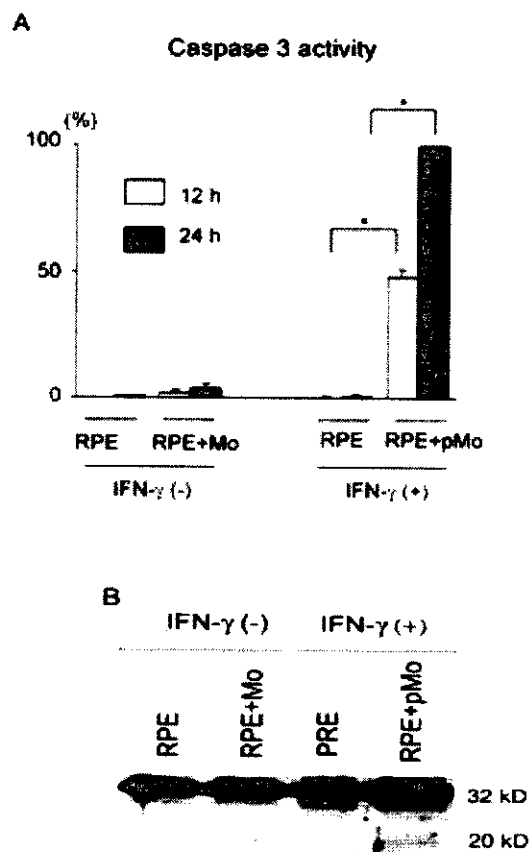


図 2 単球と RPE の共培養による caspase-3 活性の変化。単球と RPE の共培養後、RPE 内の caspase-3 活性の測定 (A)、Western blot 法を行った (B)。

の増加は抑制され、また、TUNEL 陽性 RPE の数も減少した。抗 VCAM1、TNF- α 、TRAIL、IL1 抗体の存在下ではカスパーゼ 3 活性、TUNEL 陽性 RPE 数ともに変化は見られなかった。

D. 考察

IFN- γ 刺激した単球により RPE のアポトーシスが誘導された。この反応は CD18、ICAM-1 に対する抗体により抑制されたことより、これらの細胞表面分子を介して IFN- γ で刺激された単球からのシグナルが伝えられると考えられる。また、この共培養において、RPE 内のカスパーゼ 3 の活性化がみられ、その阻害剤で RPE のアポトーシスが抑制されたことにより、このアポトーシスにカスパーゼ 3 の活性化が大きく関与していると考えられる。無刺激の単球と RPE の共培養では RPE のアポトーシスはみられなかった。これらの結果より、単球と RPE をとりまく微小環境の変化により、細胞同士の接着による反応に変化がみられると考えられる。

E. 結論

眼内において、IFN- γ などで活性化した単球・マクロファージの浸潤により RPE のアポトーシスが誘導される可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida A et al: Activated monocytes induce human retinal pigment epithelial cell apoptosis through caspase-3 activation. *Lab Invest*, 83: 1117-1129, 2003.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Arantes RM et al: Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages.: A model of neuronal injury in vitro. *Neuroreport* 11: 177-81, 2000.
2. Dunaief JL et al: The role of apoptosis in age-related macular degeneration.: *Arch Ophthalmol*. 120: 1435-42, 2002.

40. 網膜色素上皮細胞における血管内皮増殖因子発現と

脈絡膜血管新生について

大島裕司¹⁾、Peter A Campochiaro²⁾、石橋達朗¹⁾

(¹⁾九州大、²⁾ Johns Hopkins 大)、

研究要旨 網膜での血管内皮増殖因子(VEGF)の強発現は、網膜深層からの血管新生を促すことは知られているが、一方で網膜表層および脈絡膜毛細血管網からの血管新生をもたらさない。また、アンジオポイエチン2(Ang2)と VEGF を同時に強発現させるとは網膜表層および深層からの新生血管をもたらすが脈絡膜毛細血管網からの血管新生をもたらさない。今回我々は、色素上皮細胞特異的なプロモーターである VMD-2(vitelliform macular dystrophy2)を tetracycline-inducible promoter system(Tet system) を用いて VEGF を強発現し、その効果を検討した。ドキシサイクリン(DOX)を投与することによって遺伝子発現を開始する Tet System を使用した。色素上皮細胞で VEGF を発現するダブルトランスジェニックマウス(VMD2/rtTA-TRE/VEGF) と VEGF と Ang2 を発現するトリプルトランスジェニックマウス(VMD2/rtTA-TRE/VEGF-TRE/Ang2)を作成した。また Ang2 を発現するガットレスアデノウイルス(AGV-Ang2)を網膜下に注入しその経過を観察した。Tet System を用いてトランスジェニックマウスの網膜色素上皮に VEGF を発現したが網膜および脈絡膜とも正常で新生血管は認められなかった。また VEGF と Ang2 をともに発現させたトランスジェニックマウス(VMD2/rtTA-TRE/VEGF-TRE/Ang2)でも同様であったが、VEGF を発現させた VMD2/rtTA-Tre/VEGF トランスジェニックマウスに AGV-Ang2 を網膜下に注入すると網膜下に脈絡膜新生血管が認められた。脈絡膜新生血管は網膜色素上皮細胞における VEGF の発現のみでは形成されない。

A. 研究目的

血管新生は腫瘍増殖、創傷治癒や関節炎など種々の病態において重要な働きを担っており、特に眼内における血管新生は加齢黄斑変性症、糖尿病網膜症や未熟児網膜症の病因となっており、そのメカニズムを解明することは重要である。ロドプシンプロモーターを用いて血管内皮増殖因子(Vascular endothelial cell growth factor; VEGF)を網膜深層で過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、網膜深層の deep capillary bed から色素上皮側へ血管

新生が認められるが、脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization; CNV)は見られない¹⁾。またアンジオポイエチン 2(Ang2)は網膜血管発育過程で VEGF の作用を増強させ血管発育促進を促すことが知られており、網膜血管新生の発生においても血管新生を促すことが知られている。しかし、網膜視細胞層において VEGF と Ang2 を過剰発現させても脈絡膜新生血管は認められない²⁾。そこで我々は tetracycline-inducible promoter system(Tet system) を用いて網膜色素上皮細胞において

VEGF、Ang2 を過剰発現させ、CNV 発生を検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料

ドキシサイクリン(DOX) (Sigma, St. Louis USA), fluorescein dextran (Sigma), Superscript preamplification system for first strand cDNA synthesis (Invitrogen, USA), Biotinylated griffonia simplicifolia lectin B4(GSA) (Vector Laboratories, USA), HistoMark red(Kirkegaard and Perry, USA), ヤギ抗ヒト VEGF 抗体(R&D, USA), ウサギ抗マウス Ang2 抗体(RDI, USA), VMD2/rtTA-TRE/VEGF ダブルトランスジェニックマウス (Tet/VMD/VEGF) 、VMD2/rtTA-TRE/VEGF-TRE/Ang2 トリプルトランスジェニックマウス (Tet/VMD/VEGF/Ang2)

2. 実験方法

Tet/VMD/VEGF ダブルトランスジェニックマウスと Tet/VMD/VEGF/Ang2 トリプルトランスジェニックマウスは 2mg/ml のドキシサイクリンを飲料水に混入して2週間もしくは4週間加療した。加療後、眼球摘出した。摘出眼は固定後 OCT コンパウンドに包埋、薄切を行い病理組織学的検討を行った。また一部の眼球は網膜色素上皮、強膜より TRisol(Invitrogen)を用いて RNA を抽出し RT-PCR を行った。また VMD2/rtTA-TRE/VEGF ダブルトランスジェニックマウスを 2 週間ドキシサイクリン加療後、片眼にアンジオポイエチン 2 を発現するアデノガットレスウィルス(AGVAng2)を 1×10^8 particle 網膜下に注入した。コントロールとして対眼にウィルスベクターのみ(AGVNull)を同量網膜下注入した。さらに 2 週間 DOX 治療後、臨床的にそして病理組織学的に観察した。脈絡膜新

生血管は 50mg/ml の fluorescein dextran (Sigma)を心腔内投与後眼球摘出、固定のち脈絡膜フラットマウント標本を作製、蛍光顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

DOX 投与によって色素上皮細胞で VEGF を過剰発現させた Tet/VMD/VEGF ダブルトランスジェニックマウスでは RT-PCR にて強い RNA の発現が認められ、免疫組織学的にも網膜色素上皮で VEGF の強い発現が認められた。しかし、組織学的に網膜血管異常や CNV は認められなかった。同様に Tet/VMD/VEGF/Ang2 トリプルトランスジェニックマウスでも網膜血管異常や CNV は認められなかった。しかし、Tet/VMD/VEGF ダブルトランスジェニックマウスに AGVAng2 を網膜下注入した群では注入した領域に CNV が認められ、その面積は AGVNull 網膜下注入群に比して優位に大きかった。

D. 考察

Tet system を用いて成熟した大人マウスの網膜色素上皮細胞で VEGF 単独もしくは VEGF と Ang2 を過剰発現させても CNV は認められなかった。しかし、VEGF を過剰発現させたマウスの網膜下に AGVAng2 を注入すると CNV が認められた。このことより色素上皮細胞とブルッフ膜は物理的そして生化学的バリアを果たしており、脈絡膜からブルッフ膜を破って CNV が発生するにはそのバリア破綻を来す何らかの因子が必要であると推察される。その因子解明は CNV 発生の予防および治療に貢献すると考えられる。

E. 結論

脈絡膜新生血管は網膜色素上皮細胞における VEGF の発現のみでは形成されない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Ohno-Matsui K, Hirose A, Yamamoto S, Saikia J, Okamoto N, Gehlbach P, Duh EJ, Hackett SF, Chang M, Bok D, Zack DJ, Campochiaro PA: Inducible expression of vascular endothelial growth factor in photoreceptors of adult mice causes severe proliferative retinopathy and retinal detachment. *Am J Pathol.* 160:711-9,2003.
2. Oshima Y, Oshima S, Takahashi K, Nambu H, Apte RS, Duh E, Hackett SF, Zack DJ, Campochiaro PA:

Angiopoietin2(Ang2) increases or decreases neovascularization depending upon the setting. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:E·abstract 4519.

図1

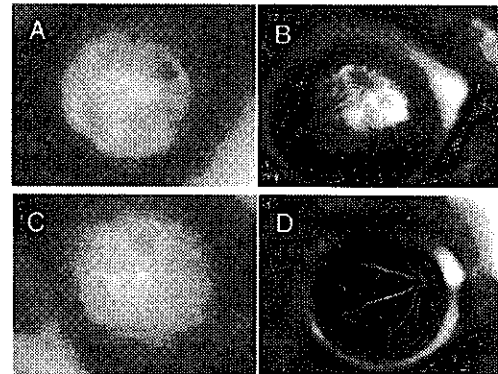


図2

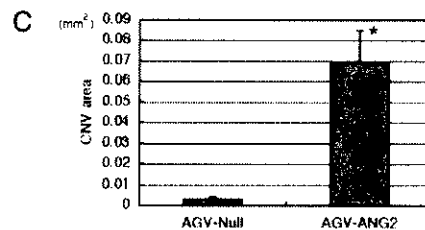
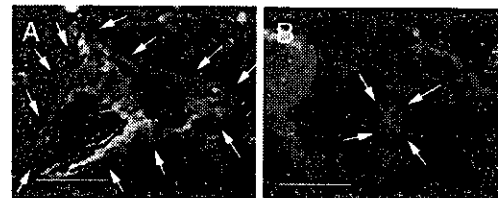


図 1. Tet/VMD/VEGF ダブルトランスジェニックマウスにアデノガットレスウイルス網膜下注入後2週間の眼底写真(A,C:眼底写真、B,D:蛍光眼底写真)

AGVAng2 注入群(A,B)、AGVNull 注入群(C,D)。AGVAng2 注入群では注入部位に一致して脈絡膜新生血管と網膜下出血が認められた。しかし AGVNull 注入群には脈絡膜新生血管は認められなかった。

図 2. アデノガットレスウイルス網膜下注入後の Tet/VMD/VEGF ダブルトランスジェニックマウス(A,B; 脈絡膜フラットマウント、C,D; GSA 染色写真、E;脈絡膜新生血管面積)
AGVAng2 注入群(A,C)、AGVNull 注入群(B,D)。AGVAng2 注入群は AGVNull 群に比して明らかに大きな CNV が認められた。
(*P<0.01)

41. 網膜色素上皮再生についての基礎的研究

～網膜色素上皮細胞の培養～

小林千晶¹⁾、各務秀明²⁾、鬼頭和裕¹⁾、石川浩平¹⁾、寺崎浩子¹⁾、上田 実³⁾

(¹⁾名古屋大、²⁾名古屋大組織工学寄附講座、³⁾名古屋大外科学)

研究要旨 自己の網膜色素上皮細胞を培養する際、3T3-J2細胞をフィーダーレイヤーとして共培養する方法の有用性を検討した。対象は dutch ウサギの眼球から分離培養した網膜色素上皮細胞、ヒト網膜色素上皮 cell line である ARPE-19 および脈絡膜新生血管 (CNV) 抜去術にて抜去したヒト脈絡膜新生血管膜である。ウサギ網膜色素上皮細胞と ARPE-19 を用いて 3T3-J2細胞と共培養を行った群と共培養を行わなかった群の細胞増殖率を比較した。また CNV 由来の細胞を 3T3-J2細胞と共培養し、免疫染色、RT-PCR にてキャラクタライゼーションを行った。結果はウサギ網膜色素上皮、ヒト網膜色素上皮 cell line とも 3T3-J2細胞と共培養を行った群が共培養を行わなかった群に比較して高い増殖を示した。CNV 由来細胞の培養においては、選択的に培養された細胞はまた、cytokeratin18 による免疫染色陽性であり、網膜色素上皮の分化マーカーである CRALBP、RPE65 を発現していた。これらの結果から、網膜色素上皮細胞は、3T3-J2細胞と共培養することにより増殖が促進され、また CNV のような小さな組織から選択的に網膜色素上皮を培養する方法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

加齢黄斑変性など脈絡膜新生血管 (CNV) の発生する疾患では、通常 CNV は中心窩に存在し、CNV を抜去しても網膜色素上皮の脱落、欠損などにより視力は予後が不良のことが多い。そこで自己の網膜色素上皮移植の可能性が検討されている。自己の培養網膜色素上皮を移植する際の問題点としては、細胞採取の部位、方法の他に、少量の細胞からの効率良い培養や、培養細胞の正常な分化の問題などが挙げられる。われわれは、網膜色素上皮の効率的な培養法の確立を目指して、3T3-J2細胞をフィーダーレイヤーとして共培養する方法の有用性を

検討した。

B. 研究方法

- ① Dutch ウサギの眼球を摘出し、眼球から、前眼部、硝子体、感覚網膜、強膜を実体顕微鏡下で取り除き、脈絡膜と色素上皮のみとした。この小片を酵素処理後、摂子にて脈絡膜と網膜色素上皮を分離し、細胞を単離した。その際、マイトマイシンC処理した3T3-J2細胞と共培養した。
- ② ウサギ網膜色素上皮細胞とヒト網膜色素上の cell line である ARPE-19 を用いて、3T3-JD2細胞と共培養した群 (3T3-J2細胞の密度 $1.5 \times 10^5 \text{cell/cm}^2$ で播種した群と密度 $5.0 \times 10^3 \text{cell/cm}^2$ で播

種した群を比較)と共培養しない群の細胞増殖率を測定した。3T3-J2細胞はあらかじめ蛍光マーカーである PKH26 で標識しておき、細胞数測定の際には蛍光をもつ細胞をマイナスすることにより網膜色素上皮のみを計測した。細胞数の測定は3日毎に行った。

- ③ CNV 抜去術の際抜去したヒト CNV を explant 法にて培養を開始した後 3T3-J2 細胞と共培養し、cytokeratin18 による免疫染色、CRALBP,RPE65 に対する RT-PCR にてキャラクタライゼーションを行った。

(倫理面への配慮)

ヒトの CNV の使用に際しては名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た。

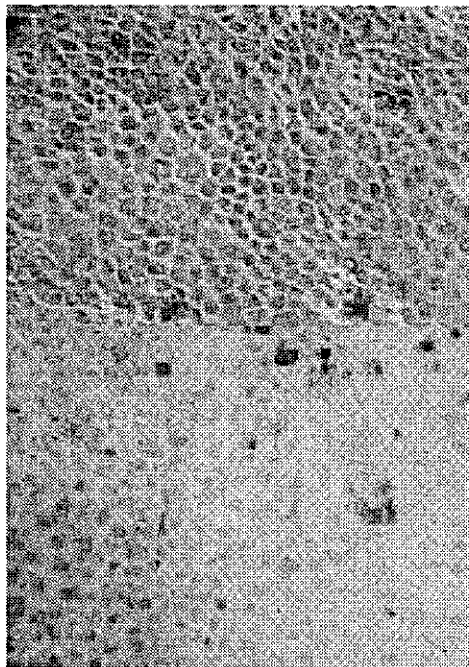


写真1上 ウサギ網膜色素上皮
下 cytokeratinAE1/AE3

C. 研究結果

- ① 2 継代目のウサギ網膜色素上皮細胞シートを示す。cytokeratinAE1/AE3 にて上

皮系の細胞であることを確認できた。(写真1)

- ② ウサギ網膜色素上皮細胞においても ARPE-19 においても、3T3-J2 細胞と共培養した群が共培養しなかった群より有意に高い増殖を示した。今回の結果では 3T3-J2 細胞の密度による増殖率の統計学的有意差は認めなかった。(表1,2)

3T3-J2 細胞と共培養することにより、CNV から網膜色素上皮細胞を選択的に培養することが可能であった。培養した網膜色素上皮細胞は cytokeratin18 に陽性で、RT-PCR にて網膜色素上皮細胞の分化マーカーである CRALBP,RPE65 を発現していた。(写真2,3)

D. 考察

今回、3T3-J2 細胞をフィーダーレイヤーとして共培養する方法の有用性を検討した。

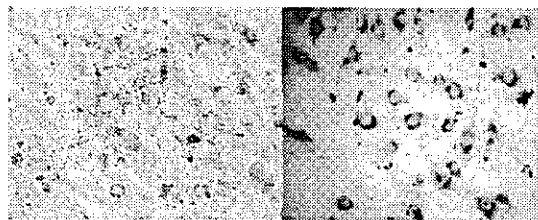


写真2 左 CNVより培養した網膜色素上皮
右 cytokeratin18による免疫染色

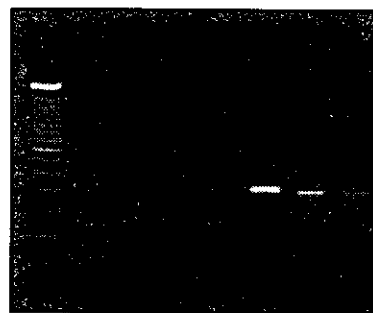


写真3 RT-PCR (左よりCRALBP, RPE65, β -actin)
3T3-J2 細胞とは、胎児マウス由来の線維芽細胞で、上皮細胞と共培養することにより、

上皮細胞の増殖促進、線維芽細胞の増殖抑制、分化のコントロールなどの機能をもつといわれており、皮膚や口腔粘膜、角膜上皮の培養に広く用いられている。網膜色素上皮は表層外胚葉由来の上皮ではなく神経外胚葉由来だが、上皮としての性質も一部もっているといわれており、3T3-J2細胞共培養の効果が期待できると考えた。今回の結果より網膜色素上皮細胞は3T3-J2細胞と共培養することにより増殖を高めることができた。またCNVのような小さい組織で様々な細胞が混在しているものから選択的に網膜色素上皮細胞を培養できることが示された。また培養された網膜色素上皮細胞は、分化のマーカーを発現していたことから、3T3-J2細胞との共培養によって一定の分化を維持できる可能性があると考えられた。

E. 結論

3T3-J2細胞をフィーダーレイヤーとして共培養することにより、網膜色素上皮細胞は一定の分化を維持しながらも効率良く培養する事が可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Rheinwald, J. G., Green, H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes *Cell* 6:331-4, 1975.
2. Dunn, K. C., Aotaki-Keen, A., E. Putkey, F. R., Hjelmeland, L. M. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res.* 62:155-69, 1996.
3. Grossniklaus, H. E., Hutchinson, A., K. Capone, A., Jr., Wolfson, J., Lambert, H. M. Clinicopathologic features of surgically excised choroidal neovascular membranes *Ophthalmology* 101: 1099-111, 1994.
4. Schlunck, G., Martin, G., Agostini, H., T. Camatta, G., Hansen, L. L. Cultivation of retinal pigment epithelial cells from human choroidal neovascular membranes in age related macular degeneration. *Exp Eye Res* 74: 571-6, 2002.
5. Campochiaro, P. A., Jerdon, J. A., Glaser, B. M. The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells

in vivo and its synthesis in vitro,

Invest Ophthalmol Vis Sci.

27:1615-21,1986.

42. アデノアソシエイトウイルスベクター(AAV)を用いた

虹彩色素上皮細胞への遺伝子導入

菅野江里子、富田浩史、阿部俊明、西郷陽子、吉岡由貴、山下あさひ、玉井 信
(東北大)

研究要旨 網膜色素変性症、視神経萎縮または加齢黄斑変性症は、有効な治療法は確立されていない。網膜色素変性症は、近年、分子科学的技術の進歩により様々な原因遺伝子の同定が進んでいるにもかかわらず、有効な治療法はなく、経過観察が行われているのみである。

近年、これらの疾患の動物モデルを用いた研究から、ある種の神経保護因子が視細胞変性阻止することが報告されてきている。このことから、網膜にこれら因子を何らかの方法で供給できれば、有効な治療法になると考えられる。我々はこれまでに加齢黄斑変性に対して、自己の虹彩色素上皮細胞 (IPE) を移植することによる治療を試みてきた。その結果、細胞移植による副作用は全く認められず、安全な治療法であることが示されたが、その視機能については満足されるものではない。しかし、これら移植細胞にある種の神経保護遺伝子を導入することにより、視細胞変性阻止効果を高めることが可能と思われる。以上のことから、本研究では、臨床応用可能な遺伝子導入法の確立を目指した。

A. 研究目的

臨床応用のための遺伝子導入法の確立を目的とした。現在、臨床上で遺伝子治療に用いられているベクターはレトロウイルス、アデノウイルス(Ad)、およびアデノ随伴ウイルス(rAAV)が主要なものであるが、それぞれのベクターには短所、長所があり、目的に適したベクターを選択することは非常に重要である。我々は日本での臨床応用の可能性を考慮し、Ad および rAAV をベクターとして用いることとして研究を進めてきた。しかし、Ad は近年、ウイルス粒子の全身への伝播による炎症反応が報告されており、

現段階では臨床応用は難しいとされている。一方、rAAV は染色体 DNA に導入遺伝子が組み込まれることもあり、発現期間が長期であり、6 ヶ月とも 1 年ともいわれる。また、今までに副作用に関する報告もなく、安全性の高いベクターとして世界で広く臨床応用に向けて研究されている。中でもアデノ随伴ウイルス type-2 (rAAV2) は実際に臨床応用に使用されている唯一のベクターである。rAAV2 は眼科領域においては、神経細胞と網膜色素上皮細胞 (RPE) に導入効率が高いとされているが、IPE への遺伝子の導入については報告がない。本研

究では、この rAAV2 を用い、IPE に遺伝子

導入する為の導入法について検討した。

B. 研究方法

IPE を血清添加培地 (F12+20%FBS または DMEM+10%FBS) で培養した。これら培養細胞に Hydroxyurea (HU) と Sodium butyrate (SB) (HU-SB) (DNA synthesis inhibitor) または, tyrphostin-1 (epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor) で処理した後、rAAV-LacZ を感染させた。2 日間培養後、感染効率を LacZ 染色により求めた。また、感染後の感染効率を、経過日数を追って観察した。rAAV-BDNF を感染させた細胞における BDNF の発現は RT-PCR と ELISA 法により確認した。rAAV-BDNF については、上記条件の他にウイルス濃度についても検討を加えた。HU-SB または tyrphostin-1 の細胞毒性については MTS assay にて調べた。

C. 研究結果

IPE は RPE や高導入効率をもつ HT1080 細胞に比べて、低い導入効率であった。これを改善するため、HU-SB、Tyrphostin-1 またはこれらの combination による処理を感染前の細胞に行ったところ、導入効率の増加が rAAV-LacZ、rAAV-BDNF の両者において見られた。中でも HU-SB と Tyrphostin-1 の処理を同時に行った細胞において高い導入効果が見られた。細胞への感染効率は感染後の培養日数に従い増加し、14 日目では 16.33 ± 20.55 % であった。rAAV-BDNF 感染細胞においては、感染する際のウイルス濃度により発現の違いが見られた。

D. 考察

AAV2 の IPE への導入効率は RPE などに比較すると低いことが判明した。しかし、HU-SB や Tyrphostin-1 により導入効率を上げることができた。HU-SB については、現在腫瘍の治療薬として用いられている Hydrea を代用することで同等の効果を持ち臨床応用可能であることが分った。時間経過による遺伝子の発現効率の変化を調べた結果、14 日まで継続的に発現が見られ、その発現は時間を追って上昇していることがわかった。これは Ad では発現が短期間であり、10 日前後で発現が減少するのとは比べ、長期に渡る目的遺伝子の発現が可能であることを示している。また、AAV を用いて IPE に BDNF を発現させるには virus particle と感染させる細胞との比率が重要な要因であることが分かった。

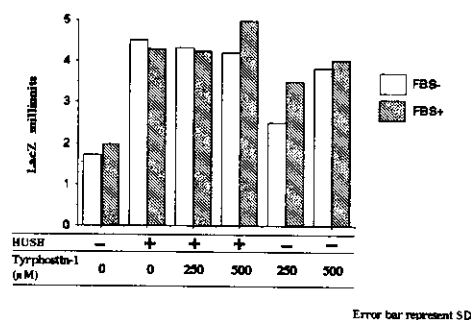


図1. Tyrphostin-1によるrAAV-LacZ遺伝子導入効率

E. 結論

IPE 細胞において AAV2 ベクターによる目的遺伝子発現を行う為には、Hydroxyurea や Tyrphostin 等の処理により、その発現を増強させる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Russell, D. W., Alexander, I. E., Miller, A. D.; DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 5719-23, 1995.
2. 玉井 信 遺伝子導入細胞の移植による網膜特定疾患治療の臨床応用に関する研究 研究成果報告書 2002
3. Kano, T., Abe, T., Tomita, H., Sakata, T., Ishiguro, S., Tamai, M. Protective effect against ischemia and light damage of iris pigment epithelial cells transfected with the BDNF gene.
Invest Ophthalmol Vis Sci.

43. ウイルスベクター法を用いた遺伝子導入虹彩色素上皮細胞移植

におけるベクターの局所および全身への播種の検討

吉岡由貴、阿部俊明、富田浩史、菅野江里子、涌沢亮介、北條昌芳、西郷陽子、玉井 信
(東北大)

研究要旨 虹彩色素上皮 (IPE) 細胞にウイルスベクターを感染させ、遺伝子を付加した IPE 細胞を網膜下に移植し、ベクターの眼外への播種の可能性と移植部位の機能的形態的变化について調べた。網膜下投与後、PCR 法によるベクターの検出、組織学的検討、網膜電図と網膜蛍光造影を施行した。感染 IPE 細胞移植群ではベクターの全身への伝播は少なかった。また、移植部位においては、ベクターによる移植眼網膜全体への影響は少ないと思われた。よって、この方法は目的臓器以外にウイルスベクターが伝播することから懸念される副作用を少なくできる方法ではないかと考えられた。

A. 研究目的

ウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、有効性と同等に安全性も確立される必要がある。局所に投与されたウイルスベクターが目的臓器から他臓器に伝播されると、全身的な副作用を懸念しなければいけない。よって、網膜変性に対する遺伝子治療の研究において、ウイルスベクターを安全に使用する方法を証明することを目的とした。

B. 研究方法

対象としたウイルスベクターは、アデノウイルス (adenovirus; Ad) ベクターとアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus; AAV) ベクターであり、IPE 細胞をこれらのベクターで感染させウイルス感染 IPE 細胞とし、この感染細胞をラット網膜下腔に移植した群と、ウイルスベクター液を直接網膜下注入した群を作成

した。全身臓器からゲノム DNA を抽出し、ウイルスベクター DNA の一部を増幅する PCR 法でベクターを検出した。また、移植部位への影響を検討するため、移植眼の凍結切片からベクターに組み込まれた LacZ 遺伝子の発現を調べた。さらに、網膜電図と網膜蛍光造影を施行し、網膜への機能的形態的影響を調べた。

C. 研究結果

PCR 法の結果、ウイルス注入群に比較して感染細胞移植群ではウイルスの混入

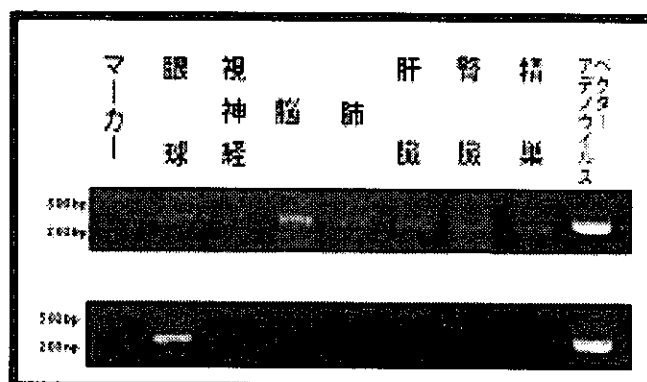


図1 PCR産物の電気泳動の結果 (上段; ウイルス注入、下段; 細胞移植)

は少なかった (図 1)。
組織学的検討の結果、ウイルス注入群では宿主の RPE 細胞、脈絡膜細胞、神経節細胞、虹彩上皮細胞、毛様体上皮細胞が染色されていたが (図 2)、

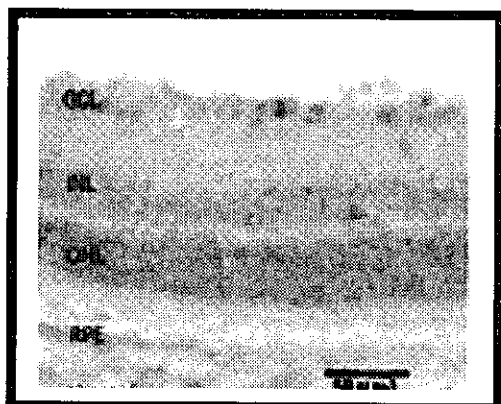


図 2 Ad 網膜下注入眼 (網膜)

感染細胞移植群では、特異的に β -Gal 染色された移植細胞が網膜下に存在し、宿主細胞は染色されていなかった (図 3)。

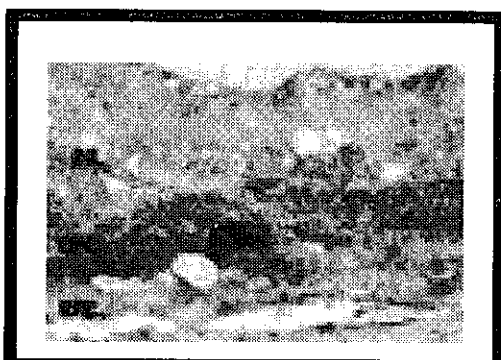


図 3 Ad 感染 IPE 細胞移植眼 (網膜)

また、網膜電図と網膜血管造影では、非感染 IPE 細胞移植と感染 IPE 細胞移植に有意差はみられなかった。

D. 考察

ウイルスベクター直接網膜下注入群では、眼内のさまざまな部位にウイルスベクターが広がるだけでなく、移植のために作成された損傷部位では血管のバリアーが

破壊され、ウイルスベクターが血行性に眼外に伝播する可能性を示唆すると考えられた。一方、感染 IPE 細胞移植群では、移植細胞周囲の宿主組織にはウイルスベクターによる感染は認められず、全身臓器中のベクター DNA 検出率が低かったことから、移植細胞が局所に留まり導入された遺伝子が発現していたといえる。また、網膜電図と網膜血管造影の結果より、移植細胞をウイルスベクターで感染させることによる移植眼への影響は少ないのではないかと考えられた。

E. 結論

ウイルスベクターで遺伝子導入された細胞を網膜下に移植する方法は、全身へのウイルスベクターの伝播をより少なくし、眼球に局限した遺伝子導入が可能であることが示唆された。また、観察期間内において、移植部位にウイルス感染細胞が原因と思われる機能的な障害は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

吉岡由貴 他：虹彩色素上皮細胞移植法を応用した網膜遺伝子治療におけるウイルスベクターの全身副作用の検討. 第 103 回日本眼科学会総会, 仙台市, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

1. 阿部俊明 他：色素上皮細胞を利用した網膜再生医療の可能性. 日本眼科会雑誌 106,778-804.2002.
2. Bennett J et al: Gene therapy for ocular disease. *Mol Ther.* 1 : 501-5, 2000.

44. アデノウイルスベクターを用いた神経栄養因子

の発現とその視細胞保護効果

山下あさひ、阿部俊明、吉岡由貴、菅野江里子、玉井 信
(東北大)

研究要旨 脳由来神経栄養因子、毛様体由来神経栄養因子、そのアナログである Axokine の組換えアデノウイルスを作製し、ラット虹彩色素上皮細胞へ遺伝子導入を行った。この遺伝子導入細胞は simian virus 40 large T antigen transgenic rat からクローニングした視細胞との共培養にて、視細胞の保護作用が *in vitro* で証明された。さらに Axokine 遺伝子を導入した虹彩色素上皮細胞を網膜下に移植すると光障害モデルラットの視細胞保護効果が認められ、*in vivo* でもその有効性が確認された。

A. 研究目的

神経栄養因子遺伝子を用いた組み換えアデノウイルスを作製し、虹彩色素上皮細胞 (IPE) 細胞に感染後、この IPE 細胞の視細胞保護効果を *in vitro* 及び *in vivo* で検討する。

B. 研究方法

神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF)、毛様体由来神経栄養因子 CNTF、Axokine の遺伝子組み換えアデノウイルスを作成した。更に温度感受性抗原をもつ simian virus (SV) 40 large T antigen transgenic rat の視細胞を分離し、33°C で培養した。この細胞の細胞死を促す 37°C で血清を抜いた状態で上記した細胞と遺伝子導入した IPE 細胞を共培養し、5 日後テトラゾリウム化合物を加え、490nm の波長で吸光値を測定した。また、遺伝子導入した IPE 細胞をラット網膜下に移植し、1 週間

の光障害の後、外顆粒層の厚さを測定し、視細胞保護効果を検討した。

以上の使用した動物の管理は「動物の保護及び管理に関する法律」と「実験動物の飼養及び保護等に関する基準」に従った。

C. 研究結果

作成したアデノウイルスによって IPE 細胞の神経栄養因子の発現が高められることが確認できた。SV40 large T antigen transgenic rat の視細胞との共培養では、BDNF・Axokine 遺伝子導入 IPE 細胞にてコントロールに比べて有意に保護効果が認められた。また、ラット網膜下への移植でも BDNF・Axokine 遺伝子導入 IPE 細胞を移植した網膜の外顆粒層がコントロールに比べて有意に厚く、視細胞保護効果があることが示唆された。