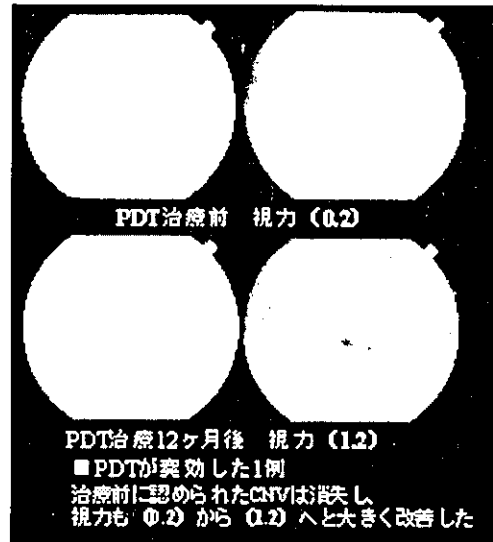
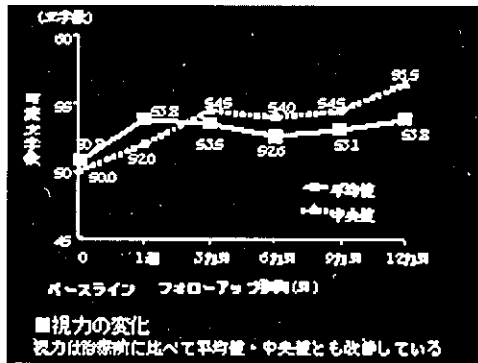


(資料1) 中心窩下脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性に対する
光線力学的療法 -日本人に対する成績-

中心窩下に脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization:CNV) を伴う加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration:AMD) に対してverteporfinを用いた光線力学的療法 (photodynamic therapy:PDT) の日本人に対する治療効果を検討した。

従来の治療では視力低下を抑制することしかできなかったが、PDTでは平均視力を治療前に比べて改善させることができた。欧米の治療成績と比べても極めて良好であった。今後は他の治療との併用や、他の黄斑疾患への適応拡大検討についても検討していきたい。



<難治性疾患克服事業>

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration:AMD) は高齢者の失明原因として増加傾向にあり、我が国でも高齢化が進む近い将来には失明原因の主因になると予測され、社会的にもその病態解明・治療法開発は重要課題の一つである。

日本人における中心窩下にある脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization :CNV) に対しては低容量放射線照射が進行防止に有効であることが確認されてはいるものの、視力改善効果は少なくとも満足できるものではない。今回欧米で視力低下を抑制する効果が確認されているverteporfinを用いた光線力学的療法 (photodynamic therapy:PDT) の日本人に対する治療効果を検討した。

その結果、視力は平均値・中央値とも改善し、また大きく視力が改善する症例も認められた。従来の治療より極めてよい成績であるばかりでなく、視力を改善する効果をも期待できることが確認できた。欧米の成績と比較しても優れた治療効果を挙げており、現時点では中心窩下CNVを有するAMDの第1選択であることには疑いの余地はない程である。

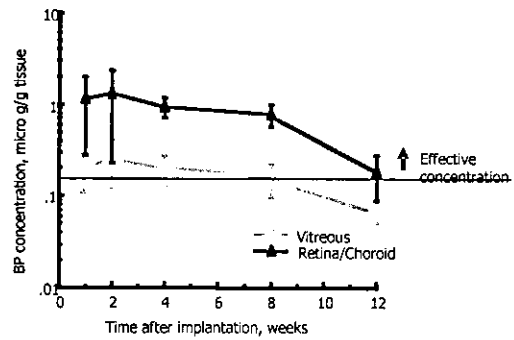
今後は他の治療との併用や、他の黄斑疾患への応用も視野に入れた研究を行っていきいたいと考えている。

(資料2)

脈絡膜新生血管に対する 薬物送達システムの開発



Implant



< 難治性疾患克服事業 >

(解説)

- ポリ乳酸およびグリコール酸共重合体から成る強膜インプラントを強膜層間に移植する
- インプラントは薬剤を放出しつつ、生分解して最終的には消失する
- 磷酸ベータメタゾン含有させたインプラントは、網膜硝子体の薬剤濃度を約12週間維持した。

(資料3)

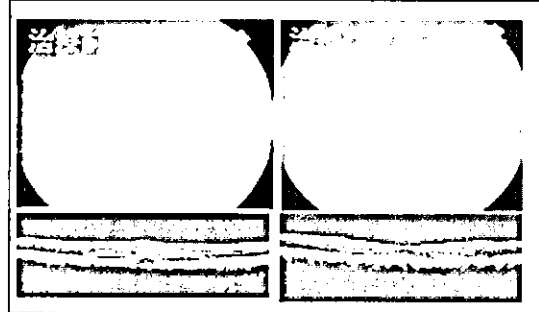
加齢黄斑変性に対する治療戦略の研究

栄養血管凝固、光力学療法などのレーザー治療、トリアムシノロン眼局所投与は、脈絡膜新生血管の閉塞、退縮に効果があることがわかってきたが、その効果は不確実で新生血管の再発、再燃が問題である。そこで、これらの治療を併用することによって脈絡膜新生血管の退縮をより確実にすることを目指している。

加齢黄斑変性の一型である網膜内血管腫状増殖(RAP)は、通常のレーザー光凝固や光線力学療法には抵抗性を示す。そこでこの疾患に対する外科治療の有効性についても検討しているが、新生血管の再発が問題である。そこで、術後の再発新生血管に対するレーザー光凝固、光線力学療法の効果を現在検討中である。

< 難治性疾患克服事業 >

トリアムシノロン硝子体内注入の治療効果



(解説)

加齢黄斑変性において小型の脈絡膜新生血管にはトリアムシノロンの硝子体内注入が有効である。フルオレセイン蛍光造影において新生血管からの漏出は治療後消失し、光干渉断層でも新生血管膜の扁平化が見られた。視力は0.2から0.5と改善した。

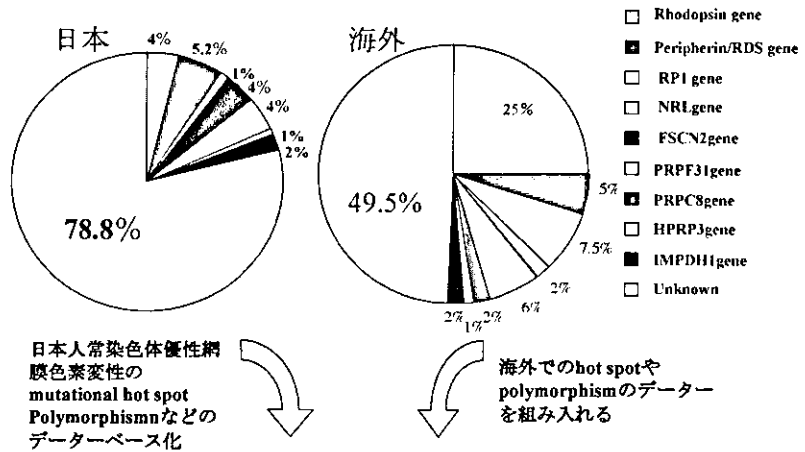
ICG蛍光造影で網膜内新生血管の流入血管と流出血管が鮮明に造影されている。このRAPに対する外科治療はこれらの流入血管と流出血管をマイクロ眼内剪刀で切断することで網膜内新生血管の消失を狙ったものである。現在まで9眼に行い、全て新生血管は術後消失した。しかし、3眼に新生血管の再発がみられた。

(資料4)

日本人常染色体優性網膜色素変性の簡易的変異解析システムの構築

•日本人常染色体優性網膜色素変性96家系に対して現在までに報告されている9つの原因遺伝子を用いてスクリーニングを施行した。

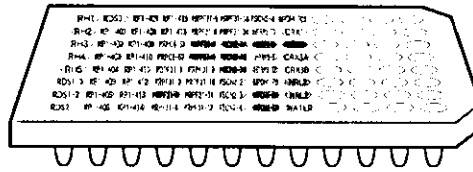
•日本人ではロドプシン遺伝子変異の頻度は海外に比べ著しく低頻度であり人種差が大きく関与していることが判明した。**FSCN2**遺伝子**208delG**変異は日本人患者のみに認められる。



日本人常染色体優性網膜色素変性の mutational hot spot Polymorphism などのデータベース化

海外での hot spot や polymorphism のデータを組み入れる

Screening Plates For ADRP Patients



•我々の遺伝子変異解析の結果をデータベース化し7日以内に候補遺伝子の主要な場所をスクリーニングできるシステムを構築した。

<難治性疾患克服事業>

(解説)

現在では、常染色体優性網膜色素変性は、14個の原因遺伝子、常染色体劣性網膜色素変性ではローカスが4箇所、17個の原因遺伝子、またX染色体劣性網膜色素変性ではローカスが3箇所、2個の原因遺伝子が報告されている。日本人常染色体優性網膜色素変性96家系に対して全ての原因遺伝子を用いてスクリーニングし遺伝子変異の種類と頻度を同定した。

海外ではロドプシン遺伝子変異は常染色体優性網膜色素変性の25%に認められるが日本人では約4%で非常に低頻度である。さらにRP1遺伝子変異も海外では約8%に認められるが日本人では1%で低頻度である。海外での mutational hot spots のロドプシン遺伝子Pro23His、Pro347Leu変異、RP1遺伝子のArg677X変異、IMPDH1遺伝子のAsp226Asn変異は日本人患者では hot spots にならないことを証明した。

一方、FSCN2遺伝子208deG変異は日本人患者のみにみとめら、日本人固有の遺伝子異常であると考えられる。我々の遺伝子変異解析の結果、さらに海外からの遺伝子変異の報告をデータベース化し、日本人患者の主要な遺伝子変異を簡易的にかつ効率的に解析できるシステムを構築した。これにより、1日で解析すべき場所をスクリーニングすること可能になった。

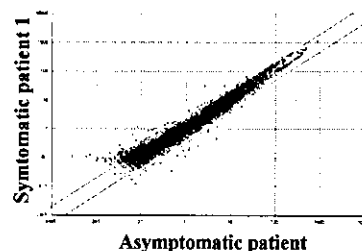
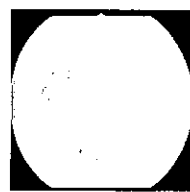
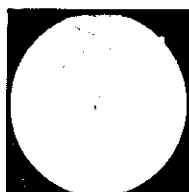
(資料5)

網膜色素変性の重症度を左右する因子についてマイクロアレイを用いた解析

同一家系内でも、重症度がことなる。

.Mutation in the FSCN2

網膜色素変性は表現型の多様性が求められる疾患である。重症度は同じ遺伝子異常をもっている同一家系内でもことなり無発例"Asymptomatic Patient"が存在する。



無発症例の関与する因子を解析することで発症予防さらには進行を防止することができる

同一家系内で発症例、無発症例の患者に対してマイクロアレイを用いた解析を行い、グルタミン代謝、アポトーシスに関与する因子が発現量に大差が認められた。

原因遺伝子のみならず、表現型の多様性には他の遺伝子の関与も考えられ、これらの遺伝子の解明は予防医学の面からも重要である。

同一家系内重症例、軽症例のマイクロアレイを用いて2倍以上発現に差が認められた遺伝子

Accession No	Unigene	染色体	機能	網膜での発現	遺伝子発現差
AB018258	Hs.109358	5q34	Unknown	+	3~7
AK001393	Hs.301895		Unknown	+	2~3
AK057674	Hs.4774		Glutamate	+	-6~-18
NM_000492	Hs.663	7q31.2	Cystic fibrosis,	-	3~5
NM_000844	Hs.83407	3p26.1-p25.1	Glutamate, neurotransmitter	+	-8~-14
NM_001825	Hs.80691	5q13.3	kreatinine kinase acticivy	+	3~14
NM_001853	Hs.53563	20q13.3	Multiple epiphyseal dysplasia.	+	3~7
NM_001955	Hs.2271	6p24.1	Apoptosis	+	-8~-14
NM_002846	Hs.89655	2q35-q36.1	Cell growth,	+	-6~-32
			Differentiation, mitotic cycle		
NM_005052	Hs.45002	17q25.3	Cell growth,	+	2~3
			Cytoskeletal reorganization		
NM_005069	Hs.27311	21q22.13	Cell development, neurogenesisin	+	2~3
NM_018049	Hs.173739	19p13.3	Hypothetical protein	+	2~4
NM_018412	Hs.5814	7q31.1-q31.3	Unknown	+	2~3
NM_019857	Hs.58553	Xp22	Glutamate	+	-6~-11
NM_032414	Hs.14060	1p21	Regulation of angiogenesis	-	-2~-4

<難治性疾患克服事業>

(解説)

網膜色素変性は、同一家系内においても、発症例、無発症例が存在する。現在では有効な治療法が確率されていない疾患であるが、発症予防、または重症、軽症を規定する因子を同定することができれば、予防医学の面でも重要である。説明と同意が得られた患者から、30CC採血をし、RNAを抽出した。CodeLink Bioarray Array System(KURABOU)を用いて、10000万個のヒト遺伝子の発現を蛍光強度で比した。蛍光標識には、Streptavidin-Cy5を使用した。

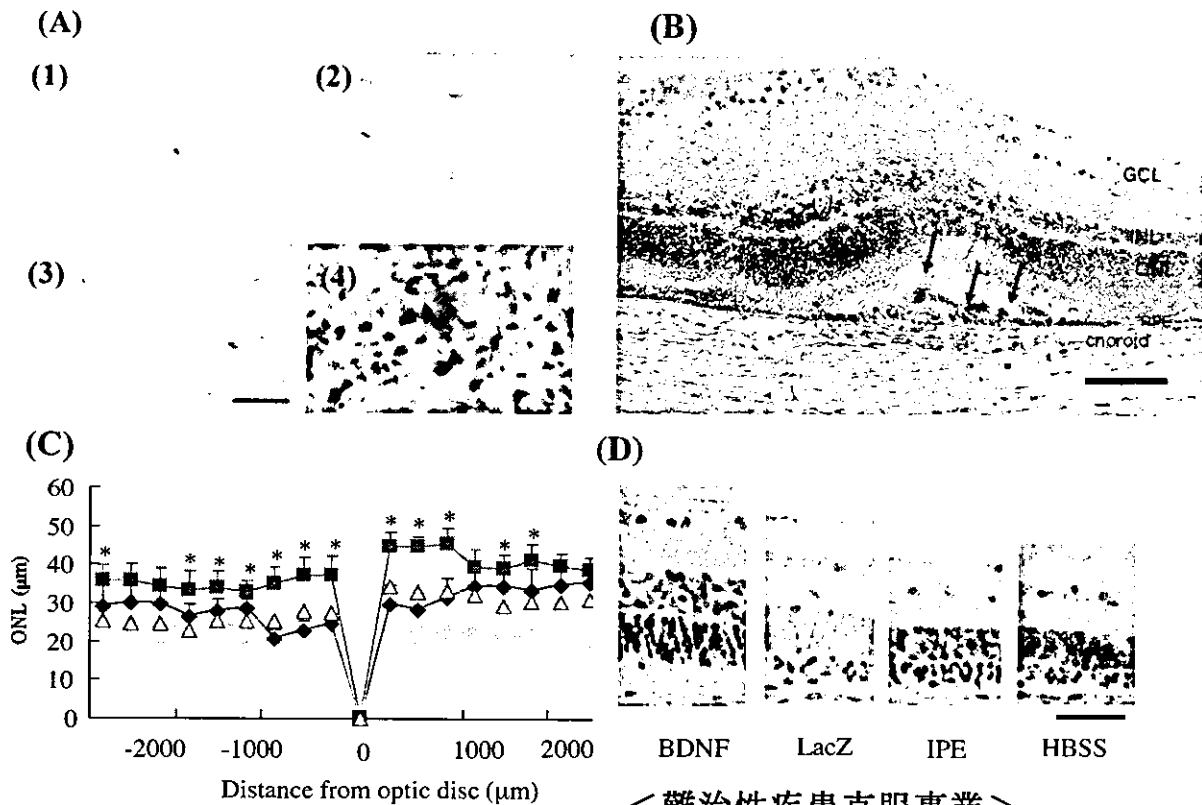
無発症例1例、発症例4例で2倍以上発現量に差が生じた遺伝子は計15遺伝子、発症例で2倍以上発現が上昇していた遺伝子で9遺伝子、無発症例で2倍以上発現が上昇していた遺伝子は6遺伝子であった。

発現量の差が認められた遺伝子は転写因子、ミトコンドリアのエネルギー代謝、血管新生、酸素輸送、グルタミン酸代謝、アポトーシス、細胞の構造、分化に関与する遺伝子である。

とくにグルタミン酸代謝、アポトーシス、細胞の構造、分化に関与する遺伝子の発現量のさが大きく、表現型の多様性には原因遺伝子異常のみならず、他の遺伝子の関与が関わっていることが示唆された。

(資料6)

BDNF遺伝子導入自己虹彩色素上皮細胞の移植



(解説)

(A) BDNF遺伝子搭載AAVベクターを作製。コントロールとしてLacZ遺伝子を搭載させたもので、rat-IPEへの感染率を検討した。(1)(2)(3)とAAV-BDNF濃度を上昇させると感染率は向上した。最終的には2週間でヤク10%と考えられた。ELISAでも同様の結果が得られた。(4)は293T細胞を利用した陽性コントロール。

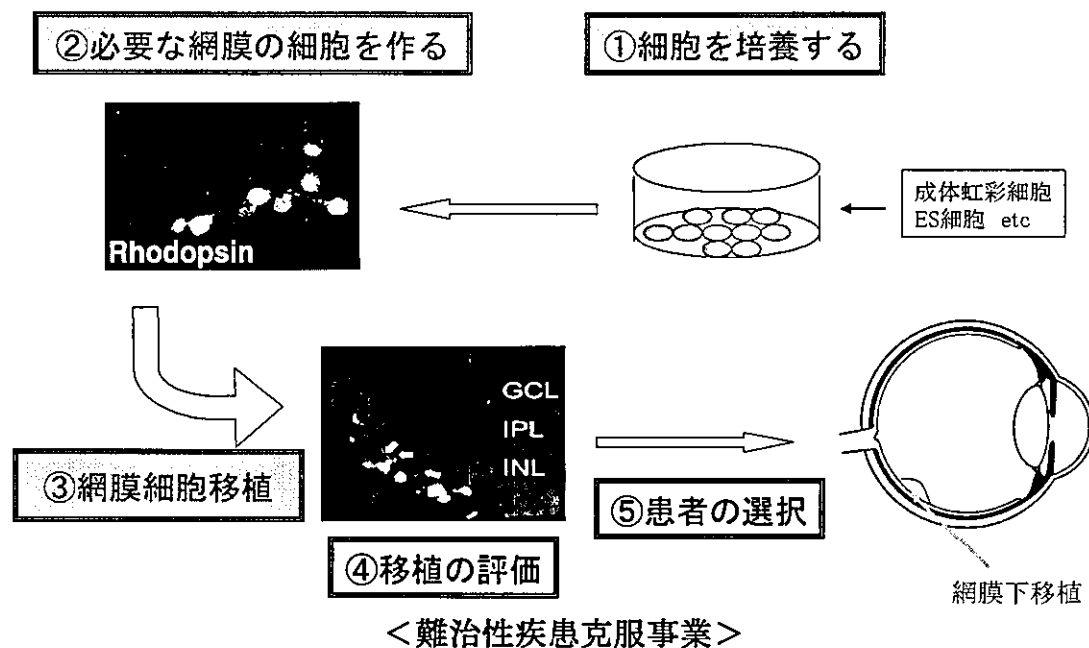
(B) AAV-BDNF感染IPE(AAV-BDNF-IPE)移植後1週間の組織所見。網膜下に移植細胞が確認され、移植細胞はコントロールとして使用したAAV-LacZ-IPE移植でb-Gal染色すると、移植細胞が青く染色された(矢印)。

(C) AAV-BDNF-IPE移植後1週間の連続光照射を行い視細胞保護のレベルを外顆粒層の厚さ(ONL)で比較検討した。AAV-BDNF-IPE(□)はLacZ(菱形), IPE only(▲), HBSS注入コントロール(○)と比較して*の点で統計学的に有意に保護効果がみられた。これは移植後1週間の所見を示すが、移植後3か月を過ぎて光障害をしても同様以上の効果が見られた。図◎右側(+)側は移植した上方網膜、(-)は非移植の下方網膜のONLの厚さを示す。

(D) 移植後の組織学的検討でもリンパ球やマクロファージの侵入は見られなかった。(過去の論文に一致する)いずれもバーは50マイクロを示す。

(資料7)

網膜細胞移植研究



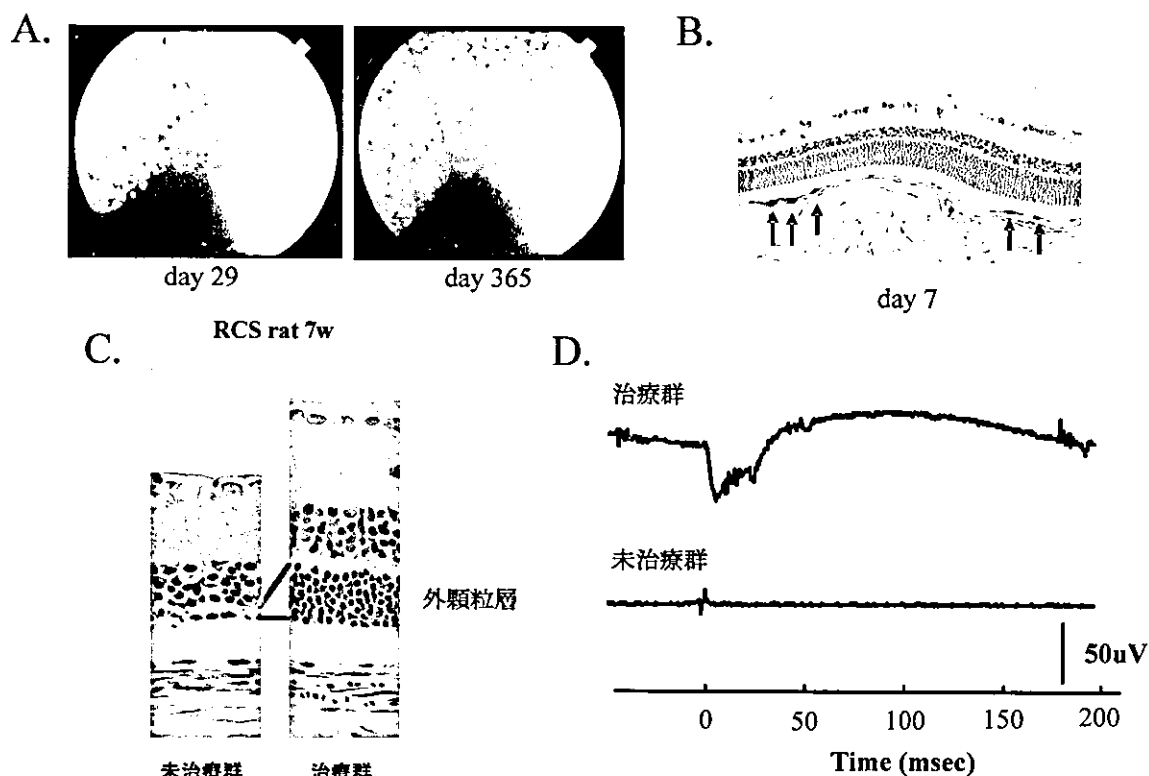
(解説)

網膜細胞移植の治療開発のためには、以下のステップが考えられる。

- ①移植細胞源を確保して培養する
- ②必要な種類の細胞を分化させる方法を検討する
- ③網膜細胞移植法を確立する。
- ④移植細胞が機能するかの評価
- ⑤対象となる患者を正確に選択するための臨床的評価方法

過去3年間で、細胞移植源の候補を検討し、必要とする細胞(特に視細胞と網膜色素上皮細胞)への分化誘導方法を開発した。さらに今年度は細胞移植の効率化をめざしその端緒を示した。

(資料8) ラット網膜へのSIVベクターを用いた遺伝子導入



<難治性疾患克服事業>

(解説)

- (A)ラット網膜へのSIVベクターを用いた遺伝子導入により、少なくとも1年間の安定した遺伝子発現が確認できた。
- (B)SIVベクターによる網膜への遺伝子導入では網膜色素上皮細胞に特異的に遺伝子が導入された。
- (C)網膜変性モデル動物であるRCSラットへのSIV-PEDFを用いた遺伝子治療により視細胞の変性を抑制することができた。
- (D)網膜電図を用いた評価において、電気生理学的な治療効果も証明された。

以上の結果より、神経栄養因子を搭載したSIVベクターにより網膜色素変性をはじめとする慢性網膜変性疾患に対する遺伝子治療の可能性が示された。

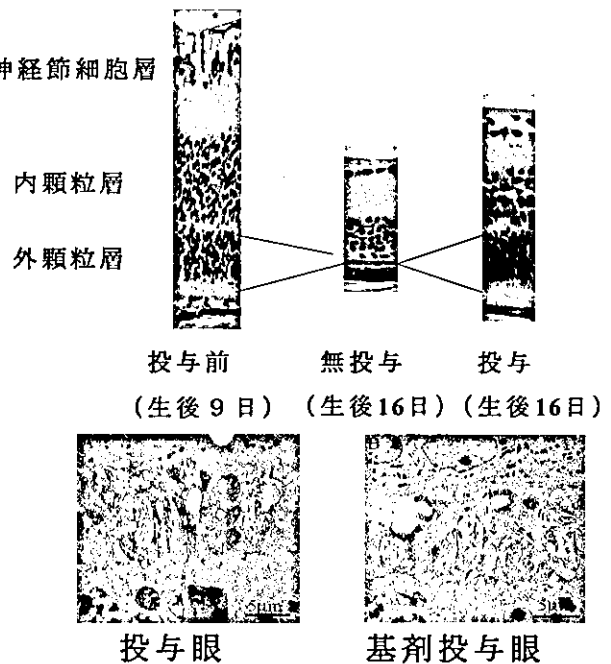
今後はこれらの小動物での効能試験に基づき臨床応用へと展開する予定であるが、まずSIVベクター投与による全身ならびに眼局所への影響を検討するために大型動物での安全性試験を開始する。

(資料9)

網膜色素変性の分子病態と治療法開発

■ 網膜色素変性の分子病態の理解が進み、視細胞の細胞死が本疾患の本体であることが分かってきている。以前、ヒト網膜色素変性のモデル動物であるRCSラットにてCa²⁺拮抗剤の視細胞保護効果を報告したが、今年度はrdマウスにても同様の効果が見られることを報告した。

■ rd (retinal degeneration) マウスは同様の遺伝子変異がヒト網膜色素変性でもみられることから網膜色素変性のモデル動物とみなされる。rdマウスにニルバジピンの全身投与を行ったところ、視細胞保護効果がみられ、本薬剤の有効性がより普遍的であることが示唆された。



< 難治性疾患克服事業 >

(解説)

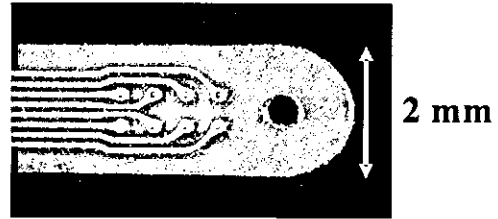
我々はこれまで網膜色素変性の薬物治療の開発をひとつの目標としてきた。これまでヒト網膜色素変性と共通の遺伝子変異をもつRCSラットに対し、Ca²⁺拮抗剤ニルバジピンが視細胞保護効果を示すことを報告した。さらに、異なる遺伝子変異 (pde β 遺伝子変異) による網膜色素変性モデル動物であるrd (retinal degeneration) マウスに対するニルバジピンの視細胞保護効果について検討した。

生後9日目のrdマウスの腹腔内にニルバジピンを連日投与し、対照群との差異を光学的、電顕的および電気生理学的に検証した。その結果、光学的組織計測では投与群の外顆粒層の厚さは対照群に比べ有意に保存されており、その所見は電顕的にも支持された。網膜電図では投与群にてa波およびb波の振幅が有意差はなかったものの対照群に比し、大きい傾向があった。これはRCSとは異なり、rdマウスの網膜変性が本来、より高度であるため今回用いた網膜電図の感度では有意差が出にくかったものと解釈された。以上の結果からニルバジピンがRCSラットのみならずrdマウス網膜変性にも視細胞保護効果が発揮されることが分かり、この薬物が単一の遺伝子変異にのみ有効なのではなく、より普遍的な効果がある可能性が示唆され、ヒト網膜色素変性に対する一般的な効果が期待される結果が示されたものと思われる。

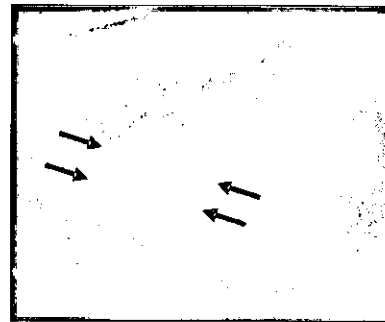
(資料10)

経強膜的刺激電極による家兎眼網膜刺激実験

- 人工視覚は、電気刺激装置によって人工的に網膜を刺激し、最終的に大脳皮質で電位を誘発させることによって視覚を人工的に認知させるものである。加齢黄斑変性や網膜色素変性など難治性の疾患により喪失した視力を回復させる有力な手段として期待されている。
- 刺激電極を設置する場所によっていくつかのタイプがあるが、我々は経強膜的刺激型電極と視神経乳頭刺激型電極の制作を試みている。実際に家兎眼を用いて網膜を電気刺激すると大脳皮質に誘発電位が検出される。
- 家兎眼で刺激装置の安全性が確立できれば、次は実際にヒトへの応用が期待されている。このように人工視覚は難治性の眼疾患に悩む人々にとって大きな福音と考えられる。



試作網膜刺激電極



家兎眼上脈絡膜腔に埋植された電極

<難治性疾患克服事業>

(解説)

加齢黄斑変性などで網膜が重度に障害されてしまった場合、人工視覚が唯一視力回復の手段である。我々は人工視覚電極を家兎眼に設置して電気刺激をおこない、臨床応用の可能性を検討した。経強膜的電気刺激で網膜を刺激すると電気刺激の大きさに比例して大脳皮質で視覚誘発電位が測定され、網膜の障害はみられなかった。このように実用的な電気刺激によって大脳皮質に誘発電位を生じせしめたことは、人工視覚の実用化という面で大きな進歩である。今後は実用化に向け改良を重ねていく予定である。