

52. 網膜色素変性に対する細胞性神経保護治療

佐々原学、大谷篤史、亀田隆範、淀井有子、吉村長久
(京都大)

研究要旨 網膜色素変性症は失明につながる重要疾患であるにもかかわらず、治療法が無い。我々は骨髄細胞を使ったユニークな方法で、同疾患に対する新たなアプローチを開発中である。造血幹細胞群である骨髄 lineage negative (Lin⁻) 細胞を硝子体経由で投与することにより、網膜血管を補強、血管量を増やすとともに、複合的に神経栄養因子を分泌させ、網膜神経細胞変性を遅らせることが出来る。自己細胞を利用すること、従来の眼科手術手技を使えること、また、基本的に細胞の修飾を必要としないことから、臨床応用へのハードルはそう高くないと考えられ、近い将来の **Clinical application** を視野に入れている。

A. 研究目的

網膜色素変性に対し、神経保護を目的とした細胞治療法の可能性を探る。マウス網膜色素変性症モデルにおける Lin⁻細胞硝子体投与の効果とそのメカニズムを考える。

B. 研究方法

網膜色素変性症マウス (*rd1*, *rd10*) を治療対象とした。同種マウス骨髄より Lineage negative 造血幹細胞 (Lin⁻細胞) を分離、Lin⁻細胞、コントロール細胞 (CD31⁻細胞) 5×10^5 個を同一個体の右眼、左眼にそれぞれ硝子体投与した。網膜はホルマウントにて血管を、凍結切片にて網膜神経細胞を観察、比較した。網膜機能を ERG にて測定した。ヒト骨髄細胞を用いて免疫抑制 RD マウスに硝子体注射し、ヒト細胞にも同様の効果があるのか検討した。さらに、マイクロアレイ法、免疫組織染色法を利用してメカニズムを解析した。骨髄細胞硝子体投与の安全性についても検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて各施設の基準にのっとり行なった。ヒト細胞については採取時にインフォームドコンセントを取り、承諾の上採取した。

C. 研究結果

硝子体投与 Lin⁻細胞は網膜活性化アストロサイトを特異的にその足場とし、効率的に網膜内、特に血管として取り込まれた。Lin⁻細胞投与 *rd* 眼では通常変性して減少する網膜血管床が有意に保たれており、視細胞を含む網膜細胞が有意に多く観察され、網膜機能も保護されていた。また、この系では1回の細胞投与で6ヶ月以上の効果が確認された。保護された視細胞は opsin 陽性錐体細胞であることがわかった。マイクロアレイ検索によりクリスタリン群がこの神経保護に関与している可能性が示唆されたが、明らかな増殖因子の関与は同定できなかった。ヒト細胞にも同様の効果がある

ことが確認された。骨髄硝子体投与の眼局所、全身における明らかな障害は見つからなかった。

D. 考察

Lin⁻骨髄造血幹細胞硝子体投与はこれまでにない待ったく新しい治療理論であり、網膜色素変性症に対する新たな解明にもなると考える。錐体細胞を救える点は理論的にも効果的にも有効であると考えられる。

E. 結論

Lin⁻骨髄造血幹細胞硝子体投与による神経保護治療の可能性を示した。いくつかの検討項目を解決する必要があるが、自家移植であること、培養などの操作を必要としないこと、そして効果が大きいことから、今後、臨床応用を具体化していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Otani A, Kinder K, Ewalt K, Otero FJ, Schimmel P, Friedlander M: Bone marrow derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. Nat Med. 8:1004-1010, 2002.
2. Otani A, Kinder K, Moreno S, Dorrell M, Nussinowitz S, Heckenlively J, Friedlander M: Neurotrophic rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone

marrow-derived lineage-hematopoietic stem cells.

J.Clin.Invest. J Clin Invest. 114: 765-774, 2004.

2. 学会発表

1. Atsushi Otani, Stacey Hanekamp, Mike Dorrell, Martin Friedlander: Adult Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cells Exhibit Neurotrophic Rescue Effect in rd/rd Mice.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願中（骨髄細胞を使った眼疾患治療）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. 大谷篤史：骨髄幹細胞は網膜疾患に何が出来るか 現代医療の最前線 最新医学 3月増刊号 最新医学社 2003
2. 大谷篤史：二大失明原因疾患＜糖尿病網膜症 老人性黄斑変性症＞の治療を目指して 網膜血管新生研究の最前線 実験医学 9月号 Vol.21 No.13 羊土社 2003
3. 大谷篤史：網膜血管再生 眼科の最新医療 先端医学社 2003

53. 網膜変性症モデルラットに対する

骨髄間葉系幹細胞網膜下移植による網膜変性抑制効果

井上裕治¹⁾、入山 彩¹⁾、高橋秀徳¹⁾、柳 靖雄¹⁾、相原 一¹⁾
玉置泰裕¹⁾、新家 眞¹⁾、上野真治²⁾、近藤峰生²⁾
(¹⁾ 東京大、²⁾ 名古屋大)

研究要旨 網膜変性症に対する細胞移植療法は、将来の治療法の候補のひとつとして期待されている。今回我々は、骨髄間葉系幹細胞を網膜変性モデルラット (RCS rat) 網膜下に移植し、網膜変性に対する網膜変性抑制効果を検討した。RCS rat (4週齢) の網膜下腔に、マウス骨髄間葉系幹細胞の細胞懸濁液を、経強膜的に移植した。組織学的に検討を行うと、移植後2週では対照眼と細胞移植眼で、外顆粒層の細胞数に有意差は認められなかったが、移植後4週および8週では、細胞移植眼が対照眼に比べて有意に外顆粒層に残存する核の数が多く、網膜変性が抑制された。また、電気生理学的にも移植後5週では、対照眼はすでにb波の残存が認められなかったが、細胞移植眼では、6眼中3眼でb波の残存が認められた。同様に移植後8週においても、対照眼と比較し、移植眼は振幅が有意に保たれており、機能的にも細胞移植眼において、網膜変性の進行抑制が示された。網膜変性症モデルラットに対し、骨髄間葉系幹細胞を網膜下移植すると、形態的および機能的に網膜変性抑制効果が認められ、網膜変性症に対する治療として有望であると考えられた。

A. 研究目的

網膜変性症に対する細胞移植療法は、将来の治療法の候補のひとつとして期待されている。骨髄間葉系幹細胞は、成体多能性幹細胞の一つ¹⁾であり、視細胞への分化も報告されている²⁾。また各種神経栄養因子を分泌し、脳梗塞などに神経保護効果があることが報告されている³⁾。今回我々は、骨髄間葉系幹細胞を網膜変性モデルラット (RCS rat) 網膜下に移植し、網膜変性に対する網膜変性抑制効果を検討した。

B. 研究方法

RCS rat (4 週齢) の左眼網膜下腔に、マウ

スより Dexter 法⁴⁾で取得した骨髄間葉系幹細胞の細胞懸濁液を、経強膜的に移植した。右眼には対照として、PBS を同様に網膜下腔に注入した。移植後 2, 4, 8 週に眼球摘出し、外顆粒層の細胞数を計測し、網膜変性を組織学的に評価した。また、細胞移植後 5 および 8 週の網膜機能を ERG を用いて、電気生理学的に評価した。

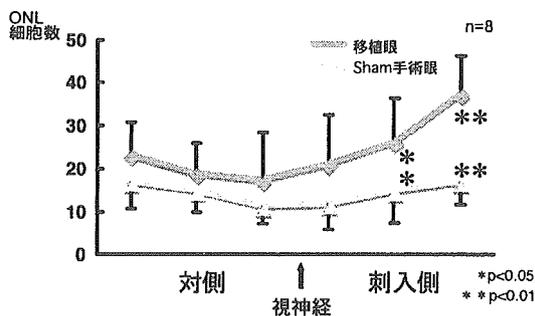
(倫理面への配慮)

すべての実験における動物の取り扱い、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で決められたガイドラインおよび東京大学の動物実験施設の

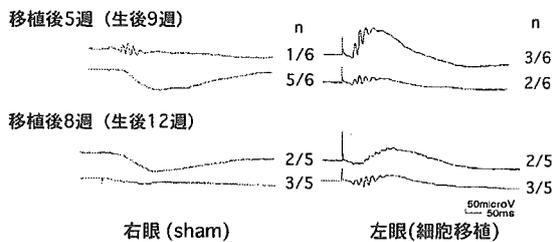
ガイドラインに準じて行った。

C. 研究結果

組織学的検討においては、移植後2週では対照眼と細胞移植眼で、外顆粒層の細胞数に有意差は認められなかったが、移植後4週および8週(図1)では、細胞移植眼が対照眼に比べて有意に外顆粒層に残存する核の数が多く、網膜変性が抑制された。また、電気生理学的にも移植後5週では、対照眼はすでにb波の残存が認められなかったが、細胞移植眼では、6眼中3眼でb波の残存が認められた。同様に移植後8週においても、対照眼と比較し、移植眼は振幅が有意に保たれており、機能的にも細胞移植眼において、網膜変性の進行抑制が示された(図2)。



(図1) 細胞移植8週後の網膜外顆粒層における細胞数



(図2) 細胞移植後のERG

D. 考察

骨髄間葉系幹細胞移植により網膜変性抑制効果が認められたが、そのメカニズムとしては、ニューロンの再形成あるいは細胞外

分泌因子による神経保護効果が考えられる。今回、移植した細胞のうち生着した細胞が多くなかったことおよび骨髄間葉系幹細胞の培養上清に、マウス幼若網膜細胞への保護効果が認められたこと(data not shown)より、後者のメカニズムにより網膜変性抑制効果が認められたと考えられる。

E. 結論

網膜変性症モデルラットに対し、骨髄間葉系幹細胞を網膜下移植すると、形態的および機能的に網膜変性抑制効果が認められ、網膜変性症に対する治療として有望であると考えられた。

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

- Jiang Y et al: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418: 41-49,

2002.

2. Kicic A et al: Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci* 23: 7742-7749, 2003.
3. Li Y et al: Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59: 514-523, 2002.
4. Dexter TM: Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl* 1: 87-94, 1982.

54. 胎仔網膜細胞移植における MMP-2 活性化物質の効果

鈴木拓也、万代道子、秋元正行、高橋政代、吉村長久
(京都大)

研究要旨 脳、脊髄、網膜などの中枢神経の変性障害に対し、細胞移植が研究され一部で臨床応用されている。その際のひとつの問題点は、移植細胞の生着率、シナプス形成率の低さである。これらの解決には、移植細胞を含めた宿主の環境因子を整える必要があると考えられる。我々は、網膜神経移植の際に、成体ラット海馬由来神経幹細胞(AHSCs)だと網膜に広く侵入するのに対し、胎仔網膜由来神経前駆細胞だと網膜への侵入は限られており、この違いが両細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-2)の発現量の多少によると考えた。この考えに基づいて検討を行った結果、細胞移植の際に、MMP-2 タンパク質あるいは MMP-2 活性化物質を同時に添加させることで、胎仔網膜由来神経前駆細胞を宿主網膜内に広く侵入させることができることを見いだした。変性網膜へ細胞移植を行う際の 1 つの方法として期待される。

A. 研究目的

我々はAHSCsの宿主網膜への高い侵入能に、MMP-2が関与していることを見いだした。今回、MMP-2及びMMP-2 活性化作用のあるコンカナバリン A (Con A)、エストロゲン(E_2)が移植細胞の宿主網膜への侵入に及ぼす効果について検討した。

B. 研究方法

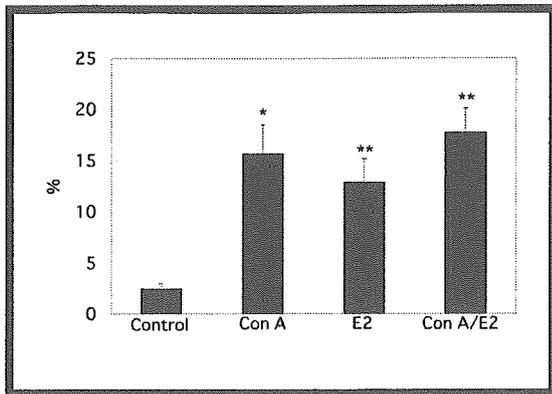
6週齢成体Fisherラット(雄)から網膜を採取し、網膜器官培養を行った。パパイン処理した新生GFPマウスの網膜細胞(網膜前駆細胞含む)を、網膜下(網膜とチャンバーフィルターの間)に移植した。MMP-2、Con A、 E_2 、MMP-2阻害剤を培養液に加え、1週間後に標本を作成し、免疫組織化学的手法等を用いて移植細胞の状態を検討した。

(倫理面への配慮)

この研究における動物使用に関しては、京都大学医学研究科動物実験委員会の承認を得て、ガイドラインに準じて行った。

C. 研究結果

器官培養された宿主網膜への侵入に関して、移植の際にMMP-2を加えた群は対照群と比較して、有意に宿主網膜へ侵入した移植細胞の割合は増加した。またCon A、 E_2 をそれぞれ単独または組み合わせて添加した結果、Con A投与群、 E_2 投与群、Con A+ E_2 投与群では、コントロール群と比較してそれぞれ有意に移植細胞の宿主網膜への侵入率が向上した。さらにCon A及び E_2 の効果がMMP-2を介するものであるかについて検討するため、MMP-2阻害剤を同時に加えて検討した。その結果、MMP-2阻害剤はCon A及び E_2 、Con A+ E_2 の効果を低下させた。



MMP-2 活性化物質の移植された胎仔網膜細胞に与える影響

D. 考察 E. 結論

MMP-2 及び MMP-2 活性化物質の投与が移植細胞の宿主網膜への侵入、生着に効果的であることが示された。移植細胞の宿主網膜への侵入率の向上により移植細胞と宿主網膜のシナプス形成率の増加をもたらすと考えられる。そのため変性網膜へ細胞移植を行う際の 1 つの方法として期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

ARVO meeting 2006.4 にて発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Kinouchi R, Takeda M, et al: Robust neural integration from retinal transplants in mice deficient in GFAP and vimentin. *Nat Neurosci.* 6: 863-868, 2003.
2. Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, et al: Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci.* 12: 340-348, 1998.
3. Uhm JH, Dooley NP, Oh LYS, et al: Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix. *Glia.* 22: 53-63, 1998.
4. Fahime EE, Torrente Y, Caron NJ, et al: In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. *Exp Cell Res.* 258: 279-287, 1998.
5. Prestoz L, Relvas JB, Hopkins K, et al: Association between integrin-dependent migration capacity of neural stem cells in vitro and anatomical repair following transplantation. *Mol Cell Neurosci.* 18: 473-484, 2001.

55. サル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用いた

網膜虚血再還流モデルにおける網膜神経節細胞保護効果の検討

宮崎勝徳¹⁾、池田康博¹⁾、米満吉和²⁾、後藤純信³⁾、向野利一郎^{1,2)}、坂本泰二⁴⁾、
田畑寿晃⁵⁾、長谷川護⁵⁾、飛松省三³⁾、居石克夫²⁾、石橋達朗¹⁾

(¹⁾九州大、²⁾九州大病理病態学、³⁾九州大神経生理学、⁴⁾鹿児島大、⁵⁾DNAVEC(株))

研究要旨 これまでに我々は、独自に開発したサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用い、眼組織における長期遺伝子発現、ならびに網膜色素変性モデル動物における治療効果を報告し、現在臨床応用に向けた安全性試験を現在実施している。今回網膜虚血再還流モデルラットにおいて、網膜神経節細胞をターゲットとした神経保護効果を組織学的、及び電気生理学的保護効果を検討した。ヒト色素上皮由来因子 (human pigment epithelium-derived factor : hPEDF) を搭載した SIV ベクター (SIV-hPEDF) 網膜下投与群において、逆行性網膜神経節細胞標識における生存細胞数の増加を認め、またパターン網膜電図 (pattern ERG) による有意に高い振幅を認めた。レンチウイルスベクターの長期発現特性を考えると、網膜神経節細胞の障害に起因する慢性疾患に対し、この遺伝子治療戦略が有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は、ヒトに病原性を有しないサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを独自に開発し、その眼内導入特性、さらに網膜変性モデルにおける視細胞保護効果を報告してきた。さらに現在は臨床応用に向けた大動物 (サル) を対象とする安全性試験を実施しており、現在までのところその安全性を確認している。今回網膜神経節細胞をターゲットとし、ヒト PEDF を発現させることにより、網膜虚血再還流モデルラットにおける網膜神経節細胞の保護効果を組織学的、及び電気生理学的に検討した。

B. 研究方法

SIV-hPEDF、SIV-empty(コントロールベクタ

ー) (各 2.5×10^7 TU/ml) を Wistar ラット 4 週齢の網膜下腔に約 20 μ l 投与し、遺伝子導入を行った。導入 2 週後に網膜虚血再還流 (110mmHg, 60min) を行い、網膜神経節細胞を傷害した。障害 7 日後における、網膜神経節細胞の逆行性標識による生存網膜神経節細胞数、さらにパターン網膜電図 (pattern ERG) により、その神経保護効果を評価した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、九州大学の動物実験施設のガイドラインをふまえ、学内委員会の許可を得ている。DNA 組換え実験・それに準ずる実験は、「大学等における組換え DNA 実験指針」をふまえ、文部科学大臣の

承認に加え、学内審査による実験許可を得ている。

C. 研究結果

逆行性網膜神経節細胞標識における単位面積当たりの生存細胞数において、コントロールベクター投与群と比較して、SIV-hPEDF 投与群で有意に高い標識細胞数を認め、組織学的に網膜神経節細胞保護効果が認められた。パターン ERG では、SIV-hPEDF 群で有意に高い振幅が認められ、電気生理学的検討においても保護効果が認められた。観察期間を通じて、局所炎症・網膜変性等の合併症は認められなかった。

D. 考察・E. 結論

SIV ベクターを用いたヒト PEDF 遺伝子発現による網膜神経節細胞保護は、その長期発現という特性から、網膜神経節細胞障害に起因する慢性疾患の有効な治療の一つとして期待できると考えられた。現在感染宿主であるサルを対象とした安全性試験を実施中であり、このベクターが眼科臨床の場でその高い性能を発揮し、治療の一助としての立場を確立できると考えられている。

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. Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Sakamoto T, Tabata T, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Ishibashi T, Sueishi K.: Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. *Gene Ther.* Aug 10(17): 1503-1511, 2003.

56. サル由来レンチウイルス (SIV) ベクターによる

サル網膜での長期遺伝子発現

池田康博¹⁾、米満吉和²⁾、宮崎勝徳¹⁾、向野利一郎^{1,2)}、村上祐介^{1,2)}

村田敏規³⁾、後藤純信⁴⁾、長谷川護⁵⁾、居石克夫²⁾、石橋達朗¹⁾

(¹⁾九州大眼科、²⁾九州大病理病態学、³⁾信州大、⁴⁾九州大神経生理学、⁵⁾ディナベック(株)

研究要旨 これまでに我々は、国産ウイルスベクターであるサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用い、小動物において網膜への遺伝子導入特性や疾患モデル動物に対する治療効果を検討してきた。将来の臨床応用に備え、よりヒトに近い霊長類を用いた遺伝子導入特性の検討やベクター投与の安全性を検討することは、必要不可欠な研究課題であると考えられた。そこで、霊長類であるカニクイザルにおける SIV ベクターの遺伝子導入特性をレポーター遺伝子と治療遺伝子を用いて検討した。小動物で得られた知見と同様に、遺伝子は網膜色素上皮細胞で発現され、長期間安定していることが確認できた。さらに、治療蛋白が分泌され、眼内に豊富に存在していることも確認できた。以上の結果より、SIV ベクターの眼科領域の慢性疾患に対する治療用ベクターとしてのポテンシャルが示された。今後は、ベクター投与の安全性を検討し、臨床応用を目指した研究を進めていく予定である。

A. 研究目的

これまでに我々は、神経栄養因子を搭載したサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用いた網膜変性モデル動物に対する治療効果を明らかにし、現在、前臨床研究を進めている。今回、大型動物であるサルの網膜下に SIV ベクターを投与し、その遺伝子発現の経時的変化と治療遺伝子であるヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) の発現を検討することを目的とした。

B. 研究方法

カニクイザルの片眼に、ガラスシリンジを用いて SIV ベクターを経硝子体的に網膜下投与した。術後経時的に (14, 28, 90, 180, 270, 360, 540 日)、GFP 発現を蛍光眼底カ

メラにて観察した。また、ヒト PEDF 発現を免疫組織化学的に検討した。

C. 研究結果

GFP 発現は少なくとも術後 540 日までは安定に持続していた。免疫組織学的検討にて、ヒト PEDF 遺伝子は網膜色素上皮細胞で発現しており、分泌された蛋白は視細胞外節部に沈着していた。さらに、前房水、硝子体液中にも多量のヒト PEDF 蛋白が分泌されていることが確認された。また、SIV-hPEDF 投与眼において炎症細胞浸潤はほとんど認められなかった。

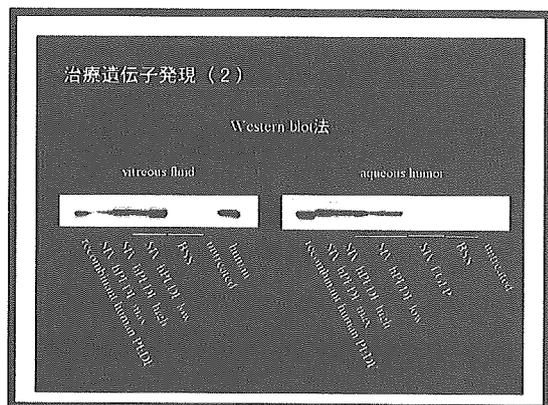


図1 治療遺伝子 hPEDF の眼内への分泌

D. 考察

SIV ベクターの網膜下投与により、小動物の場合と同様、サル網膜でも安定した遺伝子の発現が可能であることが示唆された。さらに、網膜色素上皮細胞で発現した治療蛋白は眼内へと分泌され、眼内に治療蛋白が豊富に存在することが確認できた。

E. 結論

SIV ベクターは霊長類網膜での長期遺伝子発現に有用であり、眼科領域の慢性疾患に対する治療用ベクターとして臨床応用が期待できる。

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

1. 参考文献

- Ikeda Y, Goto Y, Yonemitsu Y, et al: Simian Immunodeficiency Virus-Based Lentiviral Vector For Retinal Gene Transfer: a preclinical safety study in adult rats. *Gene Ther.* 10: 1161-1169, 2003.
- Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, et al: Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. *Gene Ther.* 10: 1503-1511, 2003.

57. 脳神経由来神経因子以下 BDNF と視細胞保護効果：

リセプターの発現量とアイソフォームの関係

齋藤孝恵¹⁾、阿部俊明²⁾、佐藤 肇¹⁾、浅井晴信²⁾、嶋田有美²⁾

涌澤亮介¹⁾、伊勢屋貴史¹⁾、和田裕子¹⁾、西田幸二¹⁾

(¹⁾東北大、²⁾東北大創生応用医学研究センター)

研究要旨 アデノアソシエイトウイルスベクター (AAV) に脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子を組み込み、虹彩色素上皮細胞 (IPE) に感染させた後、網膜下に移植し、BDNF リセプターである TrkB の網膜内での発現を検討した。TrkB のアイソフォームである TrkB-FL と-T1 は局在が異なることが考えられ、網膜全体では AAV-BDNF-IPE 移植により、FL、T1 ともに発現が増加する。これらの増加は主として Muller 細胞に見られた。

A. 研究目的

脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子導入虹彩色素上皮細胞 (BDNF-IPE) をラット網膜に移植し、BDNF リセプターである TrkB の網膜内での発現の変化を検討する。

B. 研究方法

アデノアソシエイトウイルスベクター血清型 2 型 (AAV2) に BDNF 遺伝子を導入し (AAV2-BDNF) (図 A, B)、 1×10^{12} capsids/ml に調整後精製ベクターを段階希釈し、各々の濃度でラット IPE に感染させ、ラット網膜下に移植後、TrkB の網膜内での発現の変化を検討した。BDNF レセプターである TrkB (TrkB-FL と TrkB-T1) の発現を Western blotting 解析、in situ hybridization、免疫組織化学で検討した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いは Association for Research in Vision and Ophthalmology

(ARVO) で決められた方法に従っておこなった。

C. 研究結果

Western blotting 解析において TrkB 発現量は AAV-BDNF 濃度が 1×10^5 capsids/ml 以下では正常とかわらず、 1×10^7 capsids/ml 以上では増加すると考えられた。in situ hybridization では、AAV-BDNF-IPE 移植で発現が強まり、とくに TrkB-T1 は内顆粒層で発現が上昇、TrkB-FL では全体的にやや発現が上昇すると考えられた。免疫組織化学では TrkB-FL は、AAV-BDNF-IPE 移植では神経節細胞、内顆粒層の一部、内網状層で発現が強まると考えられた。TrkB-T1 は外網状層と Muller 細胞の細胞質で発現が増強されると考えられた。

(A) AAV2-LacZ感染後の導入率

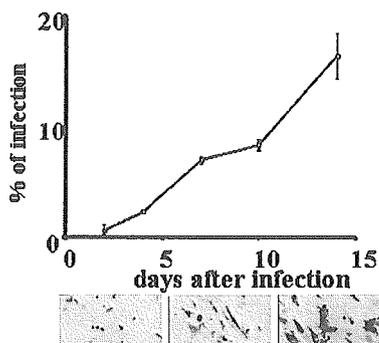


図 A. AAV2 型 (AAV2) に LacZ 遺伝子を組み込み IPE に感染させた。14 日目で感染効率は約 15%であった。

(B) AAV2-BDNF感染後のBDNF濃度

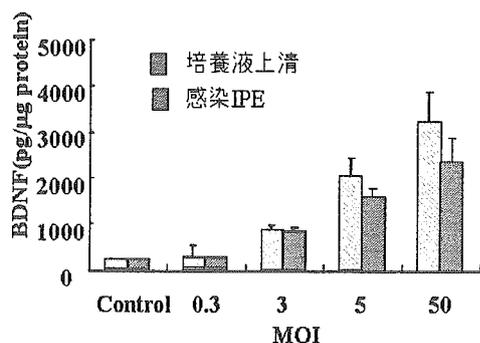


図 B. ELISA の結果、濃度依存的に BDNF が分泌されている。

D. 考察

BDNF 分泌細胞移植で網膜光障害における網膜内の反応をリセプターである TrkB の発現から確認した。TrkB-FL と-T1 で局在が異なることが考えられる。

網膜全体では AAV-BDNF-IPE 移植により、FL、T1 ともに発現が増加する。

とくに Muller 細胞で発現が増加すると考

えられるが、FL と T1 はそれぞれ細胞突起と細胞質で発現が刺激されると考えられた。

E. 結論

AAV2-BDNF 濃度が 1×10^7 capsids/ml 以上の移植は光障害による視細胞保護効果を認めた。この濃度以上で網膜内（特に Muller 細胞）でも TrkB の発現が増加した。

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

1. 齋藤 孝恵 他：BDNF 遺伝子搭載 AAV 感染虹彩色素上皮細胞移植の視細胞保護効果と BDNF 濃度の関係. 第 110 回日本眼科学会, 京都市, 2005
2. Saito T et al: AAV mediated-BDNF transduced iris pigment epithelial cell transplantation: Correlation of photoreceptor rescue effect and AAV-BDNF concentration. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2005.

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. Hojo M, et al: Photoreceptor protection by iris pigment epithelial transplantation transduced with AAV-mediated brain-derived neurotrophic factor gene. IOVS 45: 3721-3726, 2004.
2. Saigo Y, et al: Transplantation of transduced retinal pigment epithelium in rats. IOVS. 45: 1996-2004, 2004.
3. Yoshioka Y, et al: Recombinant AAV-Transduced Iris Pigment Epithelial Cell Transplantation May Transfer Vector to Native RPE but Suppress Systemic Dissemination. IOVS. 47: 745-752, 2006.

58. 網膜色素変性症例に対する

脈絡膜上-経網膜刺激人工視覚の臨床試験

瓶井資弘¹⁾、不二門尚²⁾、神田寛行^{2, 3)}、森本 壮¹⁾、坂口裕和¹⁾
中内一揚²⁾、小澤素生³⁾、生野恭司¹⁾、日下俊次²⁾、田野保雄¹⁾
(¹⁾ 大阪大、²⁾ 大阪大感覚機能形成、³⁾ (株)NIDEK)

研究要旨 目的:我々は人工網膜用の網膜電気刺激手法として脈絡膜上-経網膜刺激(STS)を考案し、動物実験にてその有効性と安全性を示してきた。今回、網膜色素変性症例に対し急性臨床試験を行なったので、その結果を報告する。

方法:対象は網膜色素変性症例2例で、十分な説明と同意の上、臨床試験を施行した。視力は2例とも光覚弁であった。結膜切開を施した後、外直筋および下斜筋の一部を切離し眼球を内転させ耳側の強膜を露出した。強膜上から白金球電極で通電し、低い電流強度で phosphene が生じる部位を探索した。その部位に 5x5mm の強膜ポケットを作成し、9点電極(4x5mm)を挿入し、さらに硝子体内に白金線電極(φ0.1 mm)を設置し、両電極間に刺激装置を用いて2相性双極波(パルス幅0.5又は1.0ms, 周波数20 Hz, パルス数20)を通電した。phospheneの有無、大きさなどについて被検者が口頭で表現したものを記録した。結果:症例1では0.3~0.5mA(0.5ms)、症例2では0.4mA(1.0ms)程度の刺激強度で限局した phosphene が生じた。隣り合う2極の電極で同時に刺激すると二つの独立した phosphene 又は、ひょうたん型の phosphene が生じることがあった。2極の組み合わせを変えて刺激した場合、症例1では方向の違いを感知した。結論:多極型STS人工視覚により重症の網膜色素変性症患者に対して限局し、独立した phosphene が生じることが確認できた。これはSTS方式による2点弁別が可能であることを示唆し、この方式による人工網膜臨床応用の可能性があるかと推察できた。

A. 研究目的

従来より難治性眼疾患とされてきた加齢黄斑変性などの黄斑疾患のうち、新鮮例の加齢黄斑変性は我々が開発した黄斑移動術などで視力回復の可能性が得られたが、視細胞の機能が喪失した陳旧性の加齢黄斑変性、および、網膜色素変性に対しては依然として有効な治療法がない。われわれは、このような疾患に対して視覚回復を目指し

て、網膜刺激型電極による人工視覚システムの開発を行ってきた。これまでの研究の成果として、本邦独自の人工網膜の方式である、脈絡膜上-経網膜電気刺激(STS)法を開発し、急性、そして、慢性の動物実験において、安全性と眼前指数弁程度程度の視覚が得られることを確認した。しかし、確実に指数弁程度の視覚が得られているかを確認することは、これ以上動物実験を行っ

ても不可能であるので、STS法を用いて2点弁別が可能であるかを調べるため、急性臨床試験を行なった。

B. 研究方法

臨床試験を行う準備として、正常者に対してプローブ型電極を用いて経強膜的に電気刺激を行ない、最適なパルスパラメータを検討した結果、パルス幅は0.5-1.0 msec, 正負のパルス間隔は、0.5 msec, 周波数は20-50 Hz, パルス数は20程度が、同一の電荷量を注入した場合に最も高輝度のPhosphene（擬似光覚）が得られることが分かった。以上の結果に基づき、視力光覚弁の網膜色素変性の2症例に対して、大阪大学医学部倫理委員会の承認を経て、急性の臨床試験を行った。

症例1は65歳男性で、眼底検査で網膜全周の萎縮と骨小体様色素沈着を認めること、および、網膜電図（ERG）で電位変化を認めないことより網膜色素変性と診断した。視力は光覚弁であった。症例2は65歳女性で、同じく眼底検査とERGで網膜色素変性と診断され、視力は光覚弁であった。この両者に、今回の試験の目的と方法、予想される結果、可能性のある合併症、および、結果の公表に関して説明し、文書による同意を得た。

術式は、2%キシロカインによる顔面神経ブロックと点眼麻酔のみを用い、症例1のみ試験終了直前にフェンタネスト20mgの静脈注射を追加した。結膜を約200°切開し、外直筋を切腱した後、下斜筋を露出した。プローブ型モノポーラー電極を下斜筋の後極側に挿入し、経強膜的に刺激して擬似光覚（phosphene）の得られる電流閾値

の小さい部位を探索した。参照電極は掌に設置した。低閾値領域を確認した後、その部位に強膜半層切開を加え、STS電極を挿入するための5x5mm強膜ポケットを作成した。強膜ポケット前方縁に電極固定用の5-0ダクロン糸を仮結紮した。角膜輪部の後方4mmの位置に、白金線硝子体電極（直径0.1mm）を設置した。9極電極（4x5mm、ユニークメディカル、大阪）（図1）を強膜ポケット内に挿入し、ケーブルを縫合固定した（図2）。各白金電極は直径200μmで、各電極の中心間距離は1mm、シリコン基盤からの電極隆起は50μmであった。

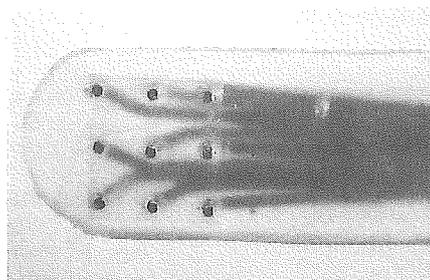


図1 STS 9極電極

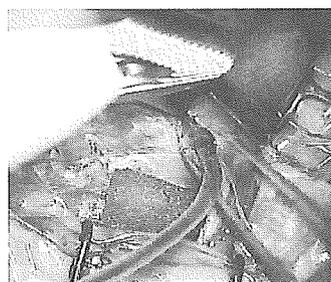


図2 STS電極埋植

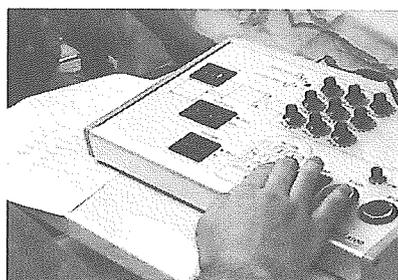


図3 刺激装置

刺激装置は本試験用に開発したもので、各電極の刺激電流を独立して調節することが可能である(図3)。2相性双極波(パルス幅0.5又は1.0ms,周波数20Hz,パルス数20)を選択した電極に通電した。刺激電極を1極ずつ選択した後、隣接する2極、直行する3極ずつの組み合わせを選択した。

phospheneの有無、大きさなどについて被検者が口頭で表現したものを記録した。刺激直前に刺激開始の合図を口頭で行なったが、被検者に答えを誘導することのないように注意して対応した。

(倫理面への配慮)

本試験はヘルシンキ宣言の内容に即して遂行し、事前に大阪大学医学部倫理委員会の承認を得た。被検者は本研究の参加を表明した後も、自由に辞退できる旨伝え、結果の公表に関しては、個人情報保護に努めた。

C. 研究結果

プローブ型モノポーラー電極による経強膜刺激を行ない低閾値領域を探索したところ、症例1では、下斜筋の約2mm後極側に0.4mA程度の低い閾値でphospheneを知覚する部位が検出できたので、その部位に強膜ポケットを作成し、9極電極を埋植した。症例2では、症例1よりもさらに後極部よりの位置で電流値を1mAまで上げないとphospheneは得られなかった。症例1よりも更に約1mm後方で黄斑部に向かう方向に強膜ポケットを作成した。STSでは、9極の電極のうち1極を選択した場合、症例1は0.3~0.5mA(0.5ms)、症例2は0.4mA(1.0ms)程度の刺激強度で限局したphospheneが生じた。隣り合う2極の電極

を同時に刺激すると、二つの独立したphosphene又は、ひょうたん型のphospheneが生じることがあった。2極の組み合わせを変えて刺激した場合、症例1では方向の違いを感知した。

D. 考察

ヒトにおいて、脈絡膜上-経網膜電気刺激により人工的に視覚を誘導できることが、本試験で初めて示された。電極埋植部位の決定に当たっては、経強膜プローブ型電極による低閾値領域の探索が有用であった。2例とも、黄斑に近づくほど感度がよくなり、閾値が低下していた。症例2において、経強膜刺激では1mAまで刺激電流値を上げなければphospheneが得られなかったが、STSでは0.4mAでphospheneが得られた。その理由としては、強膜ポケット内に電極を埋植することにより刺激電極が網膜により近づいたことと、参照電極を硝子体腔に設置したので、電流の拡散が減少し、より高密度の電流束が網膜を貫いたことが挙げられる。

今回の被検者は2症例とも進行した網膜色素変性で、大部分の視細胞が萎縮変性に陥っていると考えられる。このような症例に対しても、STS方式で残存神経節細胞を刺激すれば、限局したphospheneが得られることが判明した。さらに、2点刺激で独立したphospheneが知覚されたことから、このSTS方式で2点弁別が得られることが実証されたと言える。また、刺激電極の組み合わせを変えることで、方向性の違いが知覚され、パターン認識も可能であることが示唆された。以上より、今後電極や周辺デバイスの改良により、STS方式で指数弁

の獲得が可能であると確認でき、今後の開発に方向性とモチベーションを与えることができた。

E. 結論

STS 方式による 2 点弁別が可能であることを示唆し、この方式による人工網膜臨床応用の可能性があるかと推察できた。本研究は、現在治療方法がない網膜変性による視覚障害者に、復明の希望を与えるものであり、また、わが国より発信できる新技術となり、新たな医療産業の創出にも繋がるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakauchi K, et al.: Transretinal electrical stimulation by an intrascleral multichannel electrode array in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243:169-174, 2005.
2. Morimoto T, et al.: Transcorneal electrical stimulation rescues axotomized retinal ganglion cells by activating endogenous retinal IGF-1 system. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 46: 2147-2155, 2005.

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. Fang X, Sakaguchi H, Fujikado T, Osanai M, Kanda H, Ikuno Y, Kamei M, Ohji M, Gan D, Choi J, Yagi T, Tano Y: Direct stimulation of optic nerve by electrodes implanted in optic disc of rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 243(1): 49-56, 2005.
2. Yi-Li Pan, T. Tokuda, A. Uehara, K. Kagawa, J. Ohta, M. Nunoshita, "A Flexible and Extendible Neural Stimulation Device with Distributed Multi-chip Architecture for Retinal Prosthesis," *Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 44: No. 4B, 2099-2103, 2005.*
3. Sakaguchi H, Ohji M, Gomi F, Sawa M, Oshima Y, Ikuno Y, Kamei M, Tano Y: New micro vertical scissors for the surgical ablation of retinal angiomatous proliferation. *Am J Ophthalmol.* 139: 377-380, 2005.

厚生労働科学研究研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究
平成17年度 総括・分担研究報告書

(3年計画の1年目)

平成18年3月31日 印刷・発行

発行者 厚生労働省難治性疾患克服研究事業
網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究班

主任研究者 石橋達朗

福岡市東区馬出3-1-1
九州大学医学部 眼科学教室
TEL 092-642-5648 (直通)
FAX 092-642-5663
E-mail fumie@eye.med.kyushu-u.ac.jp

印刷所 (株) 津村愛文堂
福岡市早良区室見2-16-8
TEL 092-821-0173 FAX 092-831-3329
E-mail:t-aibundo@h3.dion.ne.jp