

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18年度 総括・分担研究報告書

(3年計画の2年目)

主任研究者 石橋達朗

平成19(2007)年3月

目 次

I. 班員構成

II. 総括研究報告 1

III. 分担研究報告

1. CHM 遺伝子 Arg 253X 及び Arg 270X 変異を認めた Choroideremia の 2 家系 3 症例 53
(東 北 大) 目黒 泰彦、和田 裕子
多田 麻子、安田 尚子
助川真里絵、布施 昇男
西田 幸二
2. Peripherin / RDS 遺伝子変異を認めた 3 症例 56
(東 北 大) 多田 麻子、和田 裕子
板橋 俊隆、助川真里絵
佐藤 肇、遠藤 麻衣
西田 幸二
3. 網膜変性疾患患者における SEMA4A 遺伝子解析 63
(東 北 大) 助川真里絵、和田 裕子
板橋 俊隆、多田 麻子
遠藤 麻衣、西田 幸二
4. 日本人の加齢黄斑変性と HTRA1 プロモーター領域の一塩基多型 66
(京 都 大) 後藤 謙元、中西 秀雄
大谷 篤史、辻川 明孝
田村 寛、平見 恭彦
武蔵 国弘、淀井 有子
亀田 隆範、佐々原 学
尾島優美子、岩間 大輔
愛川 裕子、吉村 長久
(福 島 医 大) 齋藤 昌晃、齋藤 国治
飯田 知弘
5. 日本人の近視性脈絡膜新生血管における HTRA1 プロモーター領域の一塩基多型の検討 68
(京 都 大) 中西 秀雄、後藤 謙元
大谷 篤史、辻川 明孝
吉村 長久
(福 島 医 大) 齋藤 昌晃、齋藤 国治
飯田 知弘
(東 京 医 歯 大) 島田 典明、大野 京子
望月 學

| | |
|---|-----|
| 6. 裂孔原性網膜剥離における High mobility group box 1 の病態形成への関与 | 70 |
| (鹿 児 島 大) 喜井 裕哉、山切 啓太 | |
| 園田 恭志、土居 範仁 | |
| 坂本 泰二 | |
| (鹿 児 島 大 血 管 病 態 解 析 学) 橋口 照人、丸山 征郎 | |
| 7. 網膜前組織の expressed sequence tag 解析による遺伝子発現データベース作成 | 75 |
| (九 州 大 眼 科) 吉田 茂生、山地 陽子 | |
| 望月 泰敬、畑 快右 | |
| 石橋 達朗 | |
| (国立遺伝学研究所・日本 DNA データバンク) 小倉 淳、池尾 一穂 | |
| 五條 堀孝 | |
| (九州大・生医研・ゲノム機能制御学) 山本 健 | |
| 8. 糖尿病網膜症に伴う増殖組織の expressed sequence tag 解析 | 87 |
| (九 州 大) 山地 陽子、吉田 茂生 | |
| 仙石 昭仁、野田 和宏 | |
| 江内田 寛、上野 暁史 | |
| 藤澤 公彦、石橋 達朗 | |
| (浜 の 町 病 院) 川野 庸一 | |
| (国立遺伝学研究所・日本 DNA データバンク) 小倉 淳、池尾 一穂 | |
| 五條 堀孝 | |
| (九州大生医研ゲノム機能制御学) 山本 健 | |
| 9. 一般住民を対象とした正常眼の黄斑部網膜厚 | 95 |
| (九 州 大) 野田 佳宏、安田 美穂 | |
| 畑 快右、石橋 達朗 | |
| (九州大医療情報学) 野瀬 善明 | |
| (九州大環境医学) 清原 裕 | |
| (九州大病態機能内科学) 飯田 三雄 | |
| 10. 糖尿病網膜症患者の硝子体液中におけるサイトカイン・ケモカイン濃度の包括的解析 | 99 |
| (九 州 大) 管原 美香、吉村 武 | |
| 園田 康平、望月 泰敬 | |
| 江内田 寛、大島 裕司 | |
| 上野 暁史、畑 快右 | |
| 石橋 達朗 | |
| 11. 網膜静脈閉塞症患者硝子体中の SDF-1、VEGF、炎症性サイトカイン濃度の評価 | 102 |
| (鹿 児 島 大) 有村 昇、喜井 裕哉 | |
| 山切 啓太、土居 範仁 | |
| 坂本 泰二 | |
| (九 州 大) 野田 佳宏 | |
| (鹿児島大・血管代謝病態解析学) 橋口 照人、丸山 征郎 | |
| (N T T 東 北 病 院) 志村 雅彦 | |

| | |
|---|-----|
| 12. 抗血管内皮増殖因子抗体のラット網膜神経節細胞に及ぼす影響 | 105 |
| (東 京 大) 入山 彩、柳 靖雄 玉置 泰裕、新家 眞 | |
| 13. Bevacizumab 片眼投与における非投与眼への移行性の評価 | 108 |
| (香 川 大) 野本 浩之、福田 恒輝 溝手 雅宣、廣岡 一行 田中 茂登、山地 英孝 白神 史雄 | |
| 14. 網膜血管腫状増殖に対するトリアムシノロン後部テノン嚢下注入併用光線力学療法 | 110 |
| (日 本 大) 風戸 陽子、森 隆三郎 川村 昭之、湯沢美都子 | |
| 15. 巨大網膜下血腫に対する組織プラスミノーゲンの術前硝子体内投与を併用した 硝子体手術の長期成績の検討 | 114 |
| (大 阪 大) 大島 佑介、坂口 裕和 五味 文、生野 恭司 瓶井 資弘、日下 俊次 田野 保雄 (滋 賀 医 大) 大路 正人 | |
| 16. 初期のポリープ状脈絡膜血管症の特徴 | 124 |
| (鹿 児 島 大) 大久保明子、平川真由美 坂本 泰二 | |
| 17. ポリープ状脈絡膜血管症の病理組織学的所見 | 126 |
| (日 本 大) 中静 裕之、島田 宏之 川村 昭之、湯沢美都子 (日 本 大 ・ 病 理) 三俣 昌子 (防 衛 医 大) 沖坂 重邦 | |
| 18. 高精度化処理フーリエドメイン光干渉断層計によるポリープ状脈絡膜血管症の観察 | 129 |
| (京 都 大) 板谷 正紀、尾島優美子 辻川 明孝、坂本 篤 淀井 有子、後藤 謙元 大谷 篤史、吉村 長久 | |
| 19. ポリープ状脈絡膜血管症に伴った網膜色素上皮剥離における microrips と網膜色素上皮裂孔 | 132 |
| (京 都 大) 辻川 明孝、武蔵 国弘 佐々原 学、大谷 篤史 平見 恭彦、淀井 有子 後藤 謙元、亀田 隆範 岩間 大輔、尾島優美子 中西 秀雄、愛川 裕子 田村 寛、万代 道子 吉村 長久 | |

20. ポリープ状脈絡膜血管症に対する光線力学的療法後の出血と視力への影響 134
 (香 川 大) 白神千恵子、富田 有栄
 山下 彩奈、福田 恒輝
 白神 史雄
21. ポリープ状脈絡膜血管症に対する光線力学的療法におけるポリープ凝固併用の出血予防効果 137
 (香 川 大) 山下 彩奈、白神千恵子
 藤田 智純、福田 恒輝
 白神 史雄
22. 偽 classic 所見を有するポリープ状脈絡膜血管症に対する光線力学療法の治療成績 140
 (関 西 医 科 大) 正 健一郎、永井 由巳
 有澤 章子、長央由里子
 武田 丹音、津村 晶子
 尾辻 剛、高橋 寛二
23. 強度近視眼に伴う中心窩分離症の中心窩形態と視力 144
 (大 阪 大) 生野 恭司、佐柳 香織
 十河 薫、田野 保雄
24. 網膜色素線条の眼底自発蛍光・インドシアニンググリーン蛍光眼底造影所見 163
 (大 阪 大) 沢 美喜、五味 文
 辻川 元一、田野 保雄
25. CCR3 阻害による脈絡膜新生血管抑制 175
 (名 古 屋 市 大) 野崎 実穂、小椋祐一郎
 (K e n t u c k y 大) 武田 篤信
 Jayakrishna Ambati
26. 単球走化性因子とそのレセプターに対する中和抗体による実験的脈絡膜新生血管抑制効果 177
 (名 古 屋 市 大) 山崎 哲、櫻井 英二
 板谷 正博、野崎 実穂
 Matthias Mack
 Jayakrishna Ambati
 小椋祐一郎
27. 骨髄幹細胞の機能回復による脈絡膜新生血管の重症化阻止 181
 (京 都 大) 佐々原 学、大谷 篤史
 淀井 有子、亀田 隆範
 鄒 賀、西田 佳代
 吉村 長久
28. 網膜色素上皮細胞へのリポフスチン模倣微粒子の影響 183
 (名 古 屋 市 大) 高瀬 綾恵、安川 力
 小椋祐一郎

| | |
|--|-----|
| 29. In vitro 網膜色素上皮機能評価システムとしての3次元培養 | 186 |
| (名古屋大学) 安川 力、高瀬 綾恵 小椋祐一郎 | |
| 30. 加齢黄斑変性に対する bevacizumab 硝子体注入後早期の黄斑形態と機能変化 | 189 |
| (名古屋大学) 石川 浩平、菊池 雅人 西原 裕晶、山腰 友珠 小澤 信介、八田 善幸 近藤 峰生、寺崎 浩子 | |
| 31. 加齢黄斑変性および加齢黄斑症と日光曝露量の関係 | 192 |
| (鹿児島大学) 平川真由美、田中 最高 田中 実、大久保明子 坂本 泰二 | |
| 32. 放射状配列を示す家族性ドルーゼン Malattia levantine の臨床像 | 194 |
| (関西医科大学) 永井 由巳、高橋 寛二 正 健一郎、津村 晶子 宇山 昌延 | |
| 33. 狭義滲出型加齢黄斑変性とポリープ状脈絡膜血管症の片眼発症症例の傍眼発症率の比較 | 201 |
| (東京大学) 高橋 秀徳、上田 高志 柳 靖雄、小畑 亮 入山 彩、井上 裕治 足立 知子、玉置 泰裕 新家 眞 | |
| 34. 光線力学療法後にみられる出血に影響する要因 | 204 |
| (日本大学) 森 隆三郎、松本 容子 川村 昭之、藤田 京子 柏倉 志歩、李 才源 湯沢美都子 | |
| 35. トリアムシノロン後部テノン嚢下注入を併用した光線力学療法の治療成績 | 208 |
| (名古屋大学) 倉知 豪、伊藤 愛子 安川 力、櫻井 英二 吉田 宗徳、小椋祐一郎 (眼科 杉田病院) 杉田元太郎 | |
| 36. 光干渉断層計による光線力学療法後の経過観察 | 211 |
| (東京大学) 入山 彩、高橋 秀徳 井上 裕治、足立 知子 上田 高志、柳 靖雄 玉置 泰裕、新家 眞 (さいたま赤十字病院) 小畑 亮 | |

37. 視力不良例に行った光線力学療法（PDT）の成績 215
 （ 関 西 医 大 ） 長 央 由 里 子、高 橋 寛 二
 永 井 由 巳、正 健 一 郎
 有 澤 章 子、津 村 晶 子
 松 村 美 代
38. 加齢黄斑変性患者に対する光線力学療法1年後のQOL評価 219
 （ 日 本 大 ） 姜 哲 浩、湯 沢 美 都 子
 栃 木 香 寿 美、松 本 容 子
 （ 東 京 大 生 物 統 計 学 ） 山 口 拓 洋
 （ 流 通 科 学 大 ） 下 妻 晃 二 郎
 （ 京 都 大 理 論 疫 学 ） 福 原 俊 一
39. 加齢黄斑症の読書困難に対するロービジョンケア前後のQOL評価 232
 （ 日 本 大 ） 藤 田 京 子、湯 沢 美 都 子
 （ 東 京 大 生 物 統 計 学 ） 山 口 拓 洋、柏 原 康 祐
 斉 藤 真 梨、大 橋 靖 雄
 （ 流 通 科 学 大 ） 下 妻 晃 二 郎
 （ 関 西 医 大 ） 高 橋 寛 二、正 健 一 郎
 （ 京 都 大 ） 高 橋 政 代
 （ 大 阪 大 ） 不 二 門 尚、五 味 文
 阿 曾 沼 早 苗
 （ 久 留 米 大 ） 山 川 良 治、新 井 三 樹
 （ 東 北 大 ） 鈴 嶋 よ し み
 （ 京 都 大 理 論 疫 学 ） 福 原 俊 一
40. 加齢黄斑変性の新しい診断基準加齢黄斑変性診断基準作成ワーキンググループ 235
 （ 関 西 医 大 ） 高 橋 寛 二
 （ 名 古 屋 市 大 ） 小 椋 祐 一 郎
 （ 日 本 大 ） 湯 沢 美 都 子
 （ 九 州 大 ） 石 橋 達 朗
41. 正常眼圧緑内障の視野障害に対するアンジオテンシン変換酵素阻害薬の効果 238
 （ 香 川 大 ） 廣 岡 一 行、馬 場 哲 也
 高 岸 麻 衣、白 神 史 雄
 （ 済 生 会 西 条 病 院 ） 藤 村 貴 志
42. OPA1 遺伝子異常を有する常染色体優性視神経萎縮の網膜電図所見 248
 （ 名 古 屋 大 ） 宮 田 健 太 郎、中 村 誠
 近 藤 峰 生、上 野 真 治
 寺 崎 浩 子
 （ 東 京 医 療 セ ン タ ー ） 三 宅 養 三

| | |
|---|-----|
| 43. 網膜色素変性の黄斑部局所 ERG における律動様小波の保存 | 251 |
| (名 古 屋 大) 近藤 峰生、池野谷一輝 朴 昌華、加地 秀 寺崎 浩子 (感 覚 器 セ ン タ ー) 三宅 養三 | |
| 44. 網膜色素変性における自己免疫の影響 | 254 |
| (理化学研究所発生再生科学総合研究センター) 高橋 政代、万代 道子 (京 都 大) 川越 直顕、平見 恭彦 大石 明生、吉村 長久 (兵 庫 県 立 尼 崎 病 院) 秋元 正行 | |
| 45. 色素変性モデルにおけるフォトトランスダクション経路と視細胞死の検討 | 256 |
| (大 阪 大) 辻川 元一、中尾 武史 田野 保雄 | |
| 46. Retinal Degeneration Slow (rds) マウスヘテロ接合体の網膜変性に対するニルバジピンの効果 | 283 |
| (弘 前 大) 竹内 侯雄、中澤 満 間宮 和久、山崎 仁志 (弘前大農学生命科学部細胞工学) 水越小百合 | |
| 47. 網膜色素変性モデルラットへのニルバジピン投与とカルパインの変化 | 309 |
| (弘 前 大) 中澤 満、大黒 浩 (弘前大農学生命科学部細胞工学) 水越小百合、尾崎 卓 石黒 誠一 | |
| 48. フーリエドメイン OCT による網膜色素変性の網膜 3 次元解析 | 321 |
| (京 都 大) 川越 直顕、板谷 正紀 大石 明生、坂本 篤 秋元 正行、大谷 篤史 高橋 政代、吉村 長久 (筑 波 大) 安野 嘉晃、巻田 修一 | |
| 49. 超音波とバブルリポソームを利用した培養角膜上皮細胞およびラット結膜への遺伝子導入 | 323 |
| (鹿 児 島 大) 山下 敏史、園田 祥三 坂本 泰二 (福 岡 大 解 剖 学) 立花 克郎 (帝京大薬学部生物薬剤) 丸山 一雄、鈴木 亮 | |
| 50. 硝子体手術併用眼内超音波遺伝子導入法の開発 | 326 |
| (鹿 児 島 大) 園田 祥三、内野 英輔 坂本 泰二 (帝京大薬学部生物薬剤教室) 鈴木 亮、丸山 一雄、 (福 岡 大 医 学 部 解 剖 学) 立花 克郎 | |

51. 全膜蛋白欠損型センダイウイルスベクターの網膜への遺伝子導入特性に関する検討 329
 (九州大病理病態学) 村上 祐介、岡野 慎士
 居石 克夫
 (九州大) 池田 康博、向野利一郎
 宮崎 勝徳、石橋 達朗
 (千葉大遺伝子治療学) 米満 吉和
 (DNAVEC 株) 井上 誠、長谷川 護
52. 毛様体網膜幹細胞による視細胞の分化と周辺網膜の形成 332
 (名古屋大) 西口 康二、兼子 裕規
 中村 誠、加地 秀
 寺崎 浩子
53. 骨髄間葉系幹細胞網膜下移植による杆体細胞、錐体細胞への効果 335
 (東京大) 井上 裕治、柳 靖雄
 入山 彩、玉置 泰裕
 新家 眞
54. ヒトおよびサル ES 細胞からの網膜色素上皮細胞及び視細胞分化誘導 338
 (理化学研究所発生再生科学総合科学センター) 万代 道子、高橋 政代
 (京大薬学研究所) 小坂田文隆
 (滋賀県成人病センター) 池田 華子
55. 骨髄由来幹細胞と網膜色素変性 341
 (京都大) 大谷 篤史、佐々原 学
 亀田 隆範、淀井 有子
 大石 明生、鄒 賀
 吉村 長久
56. 網膜色素変性に対する遺伝子治療 ～進行状況の報告～ 342
 (九州大) 池田 康博、宮崎 勝徳
 向野利一郎、村上 祐介
 石橋 達朗
 (九州大遺伝子治療臨床研究準備室) 米満 吉和
 (信州大) 村田 敏規
 (国際医療福祉大) 後藤 純信
 (ディナベック 株) 長谷川 護
 (九州大病理病態学) 居石 克夫

I. 班 員 構 成

網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班

| 区分 | 氏名 | 所属等 | 職名 |
|--------|-------|---|-------------|
| 主任研究者 | 石橋 達朗 | 九州大学眼科 | 教授 |
| 分担研究者 | 新家 眞 | 東京大学眼科 | 教授 |
| | 小椋祐一郎 | 名古屋市立大学眼科 | 教授 |
| | 坂本 泰二 | 鹿児島大学眼科 | 教授 |
| | 白神 史雄 | 香川大学眼科 | 教授 |
| | 田野 保雄 | 大阪大学眼科 | 教授 |
| | 寺崎 浩子 | 名古屋大学眼科 | 教授 |
| | 中江 公裕 | 南九州大学食品栄養学科 | 教授 |
| | 中澤 満 | 弘前大学眼科 | 教授 |
| | 湯沢美都子 | 日本大学眼科 | 教授 |
| | 吉村 長久 | 京都大学眼科 | 教授 |
| | 和田 裕子 | 東北大学眼科 | 講師 |
| 研究協力者 | 村田 敏規 | 信州大学眼科 | 教授 |
| | 高橋 政代 | 理化学研究所 発生再生科学総合研究センター | チームリーダー |
| | 高橋 寛二 | 関西医科大学眼科 | 助教授 |
| 事務局 | 畑 快右 | 九州大学眼科 〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 TEL : (092)642-5648 FAX : (092)642-5663 E-mail: hatachan@med.kyushu-u.ac.jp | 助教授 |
| | 沖崎 史枝 | E-mail: fumie@eye.med.kyushu-u.ac.jp | 秘書 |
| 経理事務担当 | 小野厚志 | 九州大学医系学部等事務部 財務課経理第一係 TEL (092) 642-6006 FAX (092) 642-6022 E-mail: ijzkeiri@jimu.kyushu-u.ac.jp | 文部科学 事務官 |

II. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告

主任研究者 石橋 達朗

九州大学大学院医学研究院眼科学分野教授

【研究要旨】

本研究は、未だ原因究明が不十分かつ有効な治療法が未確立な疾患群（主として加齢黄斑変性、遺伝性網膜変性疾患、視神経萎縮症）を対象とする。研究事業として、疾患の発症・増悪因子の検索、手術標本や疾患モデルを用いた病態の解明、新規薬物や遺伝子導入による病態の増悪阻止、さらには細胞移植による網膜再生法の開発を行うことで患者のQOL向上を目指すとともに医療経済への貢献を図る。

加齢黄斑変性は、高齢者の失明原因として、今後は後天性失明原因の主因になると予測されている。

そこで、我が国において広く一般眼科医にも通用する標準的な加齢黄斑変性の分類と診断基準を作成した。前駆病変として軟性ドルーゼンと網膜色素上皮異常、加齢黄斑変性として滲出型加齢黄斑変性と萎縮型加齢黄斑変性に分類し、滲出型加齢黄斑変性の特殊型としてポリープ状脈絡膜血管症と網膜血管腫状増殖を正式に明文化した。

加齢黄斑変性の病態としては、リポフスチンの網膜色素上皮細胞への慢性的な蓄積が病態形成に関与している可能性が示唆された。また、脈絡膜血管新生への炎症系の関与を再確認し、マクロファージの集積阻害や機能阻害による治療の可能性を示した。さらに、骨髄間葉系幹細胞は脈絡膜新生血管の活動性抑制に働いており、幹細胞の機能制御による病態コントロールの可能性を明らかにした。

網膜色素変性の原因遺伝子は多岐にわたり、あらゆる遺伝形式をとり、表現型も多様である。そこで、今回新たに「網膜色素変性の診断の手引き」を作製した。

網膜組織への神経保護因子の遺伝子を直接導入することによる治療法開発については、小動物ばかりでなくサル網膜でも2年以上の長期に安定した遺伝子発現と安全性が確認され、臨床応用に到ろうとしている。

また、骨髄幹細胞を用いた細胞治療の有効性についても明らかにし、ES細胞からの網膜色素上皮細胞や視細胞への効率的な分化誘導にも成功した。さらにはカルシウム拮抗薬を用いることで視細胞のアポトーシスを阻害可能なことも示し、今現在応用の可能性がある治療法の一つとして示した。

神経萎縮に関し、網膜に隣接した毛様体の上皮には網膜神経細胞に分化する可能性を持った幹細胞が存在することが知られている。しかし、これらの細胞が網膜の形成・再生にどのように関与するかは分かっていない。今回、毛様体内に存在する網膜神経幹細胞を利用し、網膜疾患に対する神経再生治療の可能性を提起する結果が得られた。

【分担研究者】

| | |
|-----------------------|----------------------|
| 新家 眞（東京大学・眼科・教授） | 小椋祐一郎（名古屋市立大学・眼科・教授） |
| 坂本泰二（鹿児島大学・眼科・教授） | 白神史雄（香川大学・眼科・教授） |
| 田野保雄（大阪大学・眼科・教授） | 寺崎浩子（名古屋大学・眼科・教授） |
| 中江公裕（南九州大学・食品栄養学科・教授） | 中澤 満（弘前大学・眼科・教授） |
| 湯沢美都子（日本大学駿河台・眼科・教授） | 吉村長久（京都大学・眼科・教授） |
| 和田裕子（東北大学・眼科・講師） | |

A. 研究目的

1. 本研究班が昨年報告したように、加齢黄斑変性は我が国の高齢者の失明原因の第4位となり、確実に増加傾向にある。正確な診断の重要性が増すとともに、様々な新しい治療が検討されている。そこで、我が国において一般眼科医にも通用し、広く用いられる標準的な加齢黄斑変性の診断基準を作成し確立する。

2. 加齢黄斑変性の病態解明ならびにモデル動物の解析。

3. 加齢黄斑変性に対する新規治療法の開発（脈絡膜血管新生における骨髄由来幹細胞の役割に関する検討）。

4. 網膜色素変性に対する骨髄幹細胞を用いた細胞移植療法の開発。

（昨年骨髄間葉系幹細胞を網膜変性モデルラットの網膜下に投与することで、変性抑制効果があることを報告したが、今回変性抑制効果があるか錐体細胞、杆体細胞いずれにみられるかを検討する。

また、網膜色素変性患者の末梢血中骨髄由来幹細胞が病態に何らかの影響をおよぼしているか検討する。

さらに、ヒトおよびサルES細胞からの網膜色素上皮細胞および視細胞への分化誘導について検討する。）

5. 網膜色素変性に対する新しい治療法として、神経栄養因子であるヒト色素上皮由来因子（hPEDF）を用いた遺伝子治療法を

臨床応用するため、その有効性と安全性について検討する。

6. 網膜色素変性に対する薬物療法を開発する。

7. 網膜神経幹細胞を利用した神経再生治療の開発に関し検討する。

B. 研究方法

1. 加齢黄斑変性の専門家4名からなる加齢黄斑変性診断基準作成ワーキンググループで2回の会合を持ち、昨年の班会議で報告した加齢黄斑変性の分類をもとに、分類の改訂を行い、確診例の規定を含めた診断基準を作成した。また、診断基準の各項目に合致する標準的な眼底写真と画像所見を再確認した。

2. 加齢黄斑変性の確実な危険因子は「加齢」であり、それに伴い網膜色素上皮内へのリポフスチンの沈着が起こる。今回、リポフスチンの主要成分と考えられる最終糖化産物（AGE）の反応を利用してリポフスチンを模倣した微粒子を作製し、網膜色素上皮細胞に与える影響について、細胞の接着能や増殖能を評価した。

3. 骨髄移植モデルを利用し、>40w マウスに致死量放射線照射後、別の>40w マウスの骨髄を移植したマウス(>40w+ >40w BM)と、>40w マウスに8w マウスの骨髄を移植したマウス(>40w+8w)の2種類のマウスを作製した。骨髄移植は致死量放射線照射後、別のマウス由来骨髄細胞を静脈注射すること

によって行った。骨髄移植1ヶ月後に、ダイオードレーザーにてブルッフ膜破砕を行い、脈絡膜新生血管(CNV)を誘導した。レーザー照射2週後に眼球摘出、パラフィン固定、連続切片を作製し、CNVの最大直径、最大厚、最大面積を定量した。また、骨髄由来幹細胞の機能測定としてマクロファージ系コロニー形成能を用いた。

4. 疾患モデル動物(RCSラット)の網膜下腔に骨髄間葉系幹細胞を移植後8週に眼球摘出し錐体杆体視細胞両方に発現が認められるCrx, recoverinのmRNA発現量をRT-PCR法で定量するとともに、免疫組織学的に錐体細胞の残存を検討した。

また、疾患モデルマウス(rd1)の骨髄抑制後、GFPマウス由来骨髄の移植を行い、網膜伸展標本を作製し、骨髄由来細胞の果たす役割を検討した。

さらに、ヒトおよびサルES細胞を浮遊培養後poly-D lysine/laminine/fibrinectinコーティングしたスライドチャンバーを用いて接着培養を行った(SFEB法)。種々の分化誘導因子を添加し、網膜色素上皮細胞および視細胞への分化について検討した。

5. 網膜色素変性に対する遺伝子治療として、有効性については、疾患モデル動物(RCSラット、rdsマウス)を用い、神経保護効果を病理学的ならびに網膜電図を用いて電気生理学的に評価した。安全性に関しては、カニクイザルを用いてコントロールベクターの網膜下投与に対する安全性試験を施行した。

6. ホモ rds マウスから、その野生型

balb/cマウスとのヘテロ rds マウスを作製した。ヘテロ rds マウスにニルバジピンを連日腹腔投与し、網膜電図の経過を非投与群と比較した。網膜組織の変化も光学顕微鏡にて比較観察した。ニルバジピン投与にともなう網膜細胞での遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法にて網羅的に検索した。マイクロアレイ法にて高発現を示した成長因子について、リアルタイム RT-PCR 法とウエスタンブロット法にて発現を検討した。また、網膜色素変性原因遺伝子として知られている各種遺伝子の発現の強弱を検討した。

7. 生後3日から生後60日までのマウスにBrdU150mg/kgを腹腔内に投与し、その3時間後に眼球を採取した。眼球より作製した網膜凍結切片、eye cupに対し抗 rhodopsin 抗体、抗 recoverin 抗体、PNA を用いて毛様体・網膜境界部における BrdU 陽性細胞、視細胞前駆細胞の性質、形態、分布を組織学的に解析した。

(倫理面への配慮)

対象とする遺伝性変性疾患の遺伝子診断を行う場合は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・経済産業省告示第1号)を遵守した。対象者に対する不利益・危険性を除去し、インフォームドコンセントを得た上で検体を採取し、結果に関しては本人の知る権利および知らない権利を尊重した。個人のプライバシーは厳守するとともに、本人の自主性を尊重し、治験の途中であっても本人の申し出により中止の希望があればそれ以上の継続はしないこととした。ま

た細胞移植による治療に関しては当該施設における倫理委員会の許可のもとに行った。

動物実験時には Association for Research in Vision and Ophthalmology の定めた動物実験のためのガイドラインを厳守し、動物愛護上の配慮を十分に行った。

C. 研究結果

1.

<加齢黄斑変性の分類>

1. 前駆病変

- 1) 軟性ドルーゼン
- 2) 網膜色素上皮異常

2. 加齢黄斑変性

- 1) 滲出型加齢黄斑変性*
- 2) 萎縮型加齢黄斑変性

滲出型加齢黄斑変性特殊病型

- ① ポリープ状脈絡膜血管症
- ② 網膜血管腫状増殖

<加齢黄斑変性の診断基準>

年齢 50 歳以上の症例において、中心窩を中心とする直径 3000 μ m 以内の領域に以下の病変がみられる。

1. 前駆病変

軟性ドルーゼン、網膜色素上皮異常

2. 滲出型加齢黄斑変性

主要所見：以下の少なくとも一つを満たすものを確診例とする。

- ① 脈絡膜新生血管
- ② 漿液性網膜色素上皮剥離
- ③ 出血性網膜色素上皮剥離
- ④ 線維性瘢痕

随伴所見：以下の所見を伴うことが多い

- ① 滲出性変化
- ② 網膜または網膜下出血

3. 萎縮型加齢黄斑変性

脈絡膜血管が透見出来る網膜色素上皮の境界鮮明な地図状萎縮を伴う

4. 除外規定

近視、炎症性疾患、変性疾患、外傷などによる病変を除外する。

2. 網膜色素上皮細胞の細胞数の 100 倍のリポフスチン模倣微粒子を投与した場合に、全ての細胞内に複数の微粒子が蓄積していることが確認された。この状態で 24 時間培養後、細胞活性の変化は各微粒子投与群、非投与群で差は認められなかった。また、細胞接着能、増殖能ともに有意差は認められなかった。

3. >40w+ >40w BM に比較し、>40w +8w BM では CNV の最大直径、最大面積が有意に小さくなった (P=0.01, P=0.02)。骨髄幹細胞の機能は、>40w+ >40w BM に比較し、>40w +8w BM において有意に回復していた (P=0.03)。

4. RT-PCR法では、細胞移植眼において Crx および recoverin の mRNA 発現がそれぞれ 3.3 倍、4.2 倍亢進していた。免疫組織学的には M-cone opsin 陽性細胞数が対照眼と比較して約 2 倍認められた。

また骨髄移植した網膜色素変性モデルマウスにおいては、対照に比較し、多数の GFP 陽性細胞を網膜内に認め、主に血管周皮細胞やマイクログリア細胞に分化していることが確認された。

さらに、サルおよびヒト ES 細胞において、SFEB 法に Dkk-1, Lefty-A さらにレチノイン酸、taurine、N2 supplement を加えることによって効率よく網膜色素上皮細胞および視

細胞と考えられる細胞を得ることが出来た。

5. 神経保護効果については、hPEDFのみでなく、FGF-2（線維芽細胞増殖因子）でも同様の有効性が確認でき、これら両者による相乗効果も確認できた。安全性については、既に急性期試験は終了し、長期安全性試験が継続中である。2年以上を経過した現在、全身および眼局所での重篤な副作用は観察されていない。

6. ヘテロ rds マウスに対するニルバジピン投与では、網膜電図において a 波・b 波とも非投与群に比べ長期にわたり振幅が有意に保たれていた。しかし網膜組織の形態においては明らかな差異はみられなかった。マイクロアレイ法では FGF-8 の発現がニルバジピン投与により 3 倍以上転写レベルで亢進していたが、ウエスタンブロット法では検出できなかった。PRPF31 や RPGR 遺伝子などが 2 倍以上の発現亢進を示した。

7. 生後 6 日までの眼の凍結切片では、網膜・毛様体境界部において毛様体の BrdU 陽性細胞の一部が網膜内の BrdU 陽性神経前駆細胞よりなる neuroblast layer と連続していた。その後、網膜の neuroblast layer は生後 9 日までにほぼ消失したが、毛様体の BrdU 陽性細胞は網膜に隣接した部位を中心に生後 30 日まで残存した。

毛様体の flat-mount を用いて再解析すると、生後 6 日のマウスにおいては、毛様体と網膜の BrdU 陽性細胞はやはり連続しており、これらが発生学的に同一である可能性が示唆された。これらの毛様体 BrdU 陽性細胞の間には、神経突起や視細胞内節・外

節様の構造物を持った BrdU 陰性・ロドプシン陽性の杆体視細胞前駆細胞が多数存在した。しかし、これらの細胞は生後 12 日目までに消失した。これは、網膜の組織学的な完成時期とほぼ一致していた。

一方、毛様体には PNA 陽性の小突起をもった錐体視細胞前駆細胞も存在した。これらの細胞は網膜の組織学的な完成時期をはるかに過ぎた生後 60 日においても確認された。

D. 考察

1. 加齢黄斑変性に対して、近年種々の新しい治療アプローチが可能となり、正確な治療適応決定と治療評価のための的確な診断の重要性が増している。加齢黄斑変性の分類としては、国際加齢黄斑症疫学調査グループによって1995年に報告された加齢黄斑症および加齢黄斑変性に関する国際分類とグレードシステムが国際的に最もよく用いられている。今回の分類は基本的にはその概念を踏襲したものであるが、用語を加齢黄斑変性に統一した。加齢黄斑変性の病名は広く認知されつつあったが、これまで疾患の捉え方や診断は研究者によってなお隔たりがみられた。今回作成した基準での統一された診断を行うことは、今後、治療適応や治療効果を判定していくうえで、意義あるものと考えられる。

2. リポフスチン模倣微粒子を投与した家兎で誘導されるドルーゼンや脈絡膜血管新生は、微粒子の成分による急性反応ではないことが示唆された。網膜色素上皮細胞内に貯留していることによる慢性的な影響が関与している可能性があり、加齢黄斑変性

においてもリポフスチンの蓄積が病態に関与している可能性が示唆された。

3. 脈絡膜新生血管 (CNV) の重症度は一般的に眼局所因子と全身因子との相互作用において決まると考えられるが、ヒトでは眼局所因子も全身因子もともに個体において影響度がさまざまであり、どちらの因子がどの程度重症度に関与しているか不明である。今回の動物実験で、眼局所因子を揃えた状態で、骨髄細胞を若返らせ細胞機能の回復を行うことで、CNV の重症化が阻止できることが判明した。骨髄幹細胞は本来 CNV の重症化を防ぐような方向に機能していると考えられた。骨髄幹細胞の機能を維持すること、また、可能であれば骨髄幹細胞の機能を改善することが、滲出型加齢黄斑変性の鍵を握る病態である脈絡膜新生血管の重症化阻止を考える上で、重要と思われる。

4. 今回、骨髄間葉系細胞移植により変性が抑制される細胞が杆体細胞、錐体細胞のいずれであるかを検討し、免疫組織学的に少なくとも錐体細胞については変性が抑制されると考えられたが、杆体細胞については更なる検討が必要であると考えられた。

また、骨髄由来幹細胞は網膜色素変性の変性過程に大きな影響を及ぼしている可能性が示唆された。内因性骨髄由来細胞と網膜色素変性の関連を初めて示した意義深い研究であると考えられる。

一方、これまでも網膜との共培養などでロドプシン陽性細胞の分化誘導を示した報告はあるが、今回のように純粋な培養系で明確な外的因子の添加により効率よく視細胞を分化誘導した報告は初めてである。

ただし、これらの細胞を用いた移植用細胞の選別と、移植における細胞の安全性や移植条件等については今後の検討が必要である。

5. 今後、臨床研究プロトコールが所属機関ならびに厚労省において審議される予定であるが、神経栄養因子を搭載したSIVベクターによる網膜色素変性に対する遺伝子治療は安全性が高く、有望であると考えられた。

6. ニルバジピンの腹腔内投与により、ヘテロ rds マウスの網膜変性の進行が網膜電図上遅延することが明らかとなった。その分子レベルでの要因は明らかではないものの視細胞にとって重要な働きをする遺伝子の発現がより維持されていた。また各種遺伝子の発現パターンは我々がかつて報告した RCS ラットでの発現パターンとは異なっており、原因遺伝子の差異により薬物による反応の分子機構が異なってくる可能性が示唆された。

7. 我々の知る限りでは哺乳類において毛様体を flat-mount にて組織学的に解析した研究は稀である。本研究は、この方法を用いて生後間もないマウスの毛様体内に BrdU 陰性の杆体・錐体視細胞前駆細胞が存在することを明らかにした。その後、網膜の組織学的な成熟に伴い毛様体内の杆体視細胞前駆細胞は消失したが、錐体視細胞前駆細胞は毛様体扁平部に生後 60 日においても残存した。このことは、哺乳類において、同部位が下等脊椎動物における CMZ と analogous である可能性を示唆している。

E. 結論

本研究班が昨年度報告したように、最近の視覚障害の原因疾患は上位から緑内障、糖尿病網膜症、網膜色素変性、加齢黄斑変性、高度近視による網脈絡膜萎縮といった疾患であり、まさしく本研究班が対象とする疾患群である。

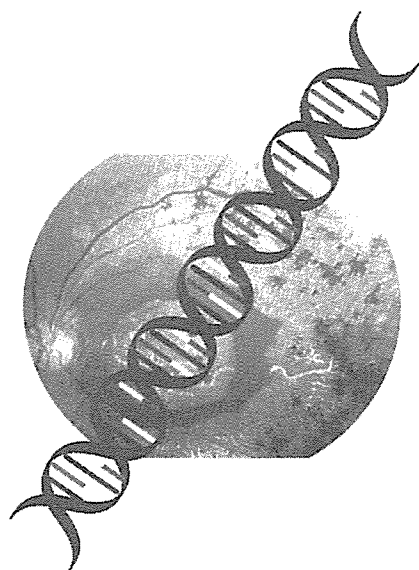
依然として難治性の疾患群ではあるが、今回の報告でも示すように病態解明が進む一方で、徐々にではあるものの治療の方向性が見えつつある。

WHO の唱える VISION2020 project は、避けることのできる失明 (avoidable blindness) を根絶しようという取り組みである。本研究班が対象とする疾患群の一部でも avoidable blindness の対象疾患とすることがさしあたっての目標ではあるが、その一方で、単に失明を予防するばかりではなく、身体能力に問題さえなければ生涯にわたって読書や自動車の運転が可能な視力を維持することが本来の目的であることを忘れてはならない。

最大の情報源である視覚情報を失って生活していく苦痛と恐怖は計り知れない。全世界で失明の恐怖と戦う患者の QOL の向上に貢献すべく、当該研究を更に発展させ一次予防を含めた安全かつ有効な治療法開発へと導かねばならない。

網膜色素変性の診断の手引き

Retinitis Pigmentosa



厚生労働省難治性疾患克服研究事業
網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班

