

Figure 6. Lobular areas of atrophy. A, Color fundus photograph of the right eye showing a large fibrotic scar with hyperplastic retinal pigment epithelium secondary to choroidal neovascularization. B, Autofluorescence photograph showing multiple lobular areas of atrophy nasal to the nerve (arrow). C, Color fundus photograph of the left eye also showing a scar secondary to choroidal neovascularization. D, Autofluorescence photograph showing a multilobular region of atrophy around the nerve (arrow). Careful examination of both autofluorescence photographs reveals multiple lobular areas of atrophy within the macular region.

were associated with adjacent choroidal neovascularization, and the outer borders of the rip often had a jagged appearance. Retinal pigment epithelium rips in AMD are thought to be related to both increased hydrostatic pres-

sure under the RPE monolayer from exudation and increased tensile forces on the monolayer induced by the neovascularization.<sup>14</sup> In pseudoxanthoma elasticum, patients have the RPE monolayer segmented by preexisting

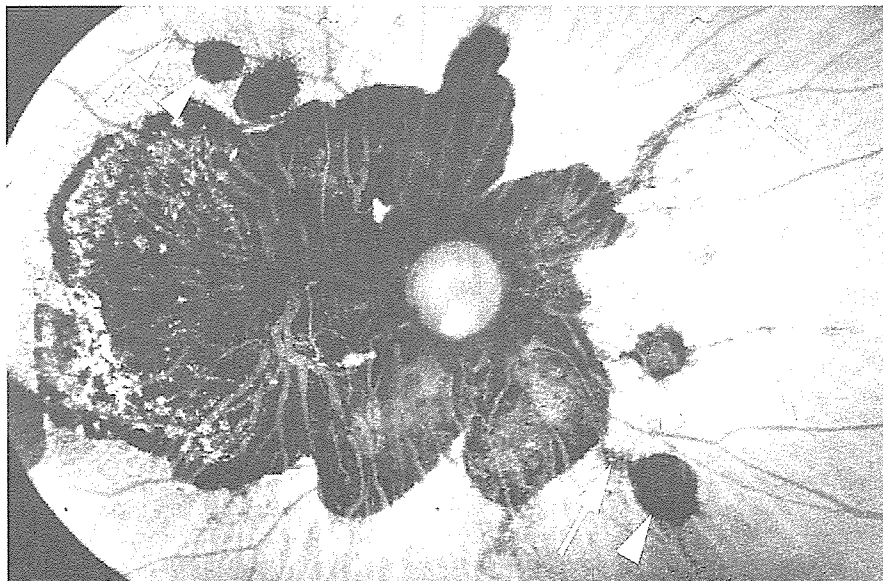
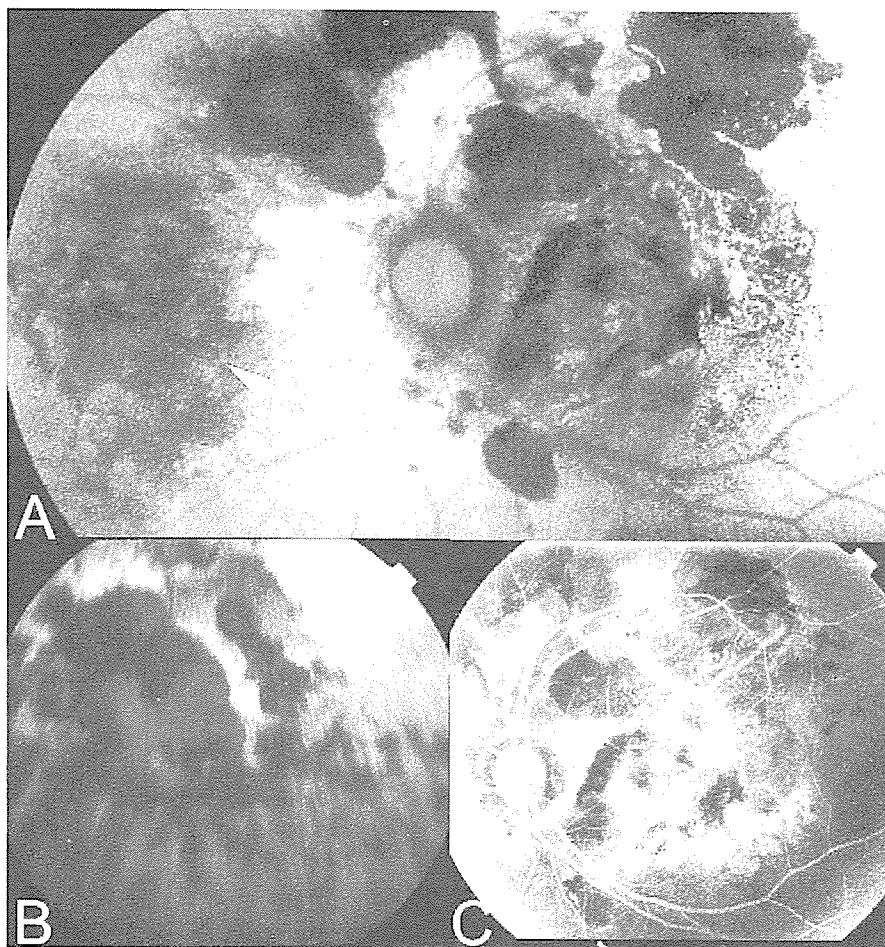


Figure 7. This patient had large lobular areas of atrophy encompassing the macular and circumpapillary regions. There was a druse of the optic nerve visible. There were discrete areas of atrophy arranged like pearls (arrowheads) on multiple radiating angioid streaks (arrows).



**Figure 8.** Retinal pigment epithelial atrophy in pseudoxanthoma elasticum. **A**, Montage autofluorescence photograph of the left eye of a 62-year-old with pseudoxanthoma elasticum showing various atrophic phenotypes. The macular region had a large scar related to choroidal neovascularization. In the nasal periphery, there was a poorly defined region of a decreased autofluorescence signal (arrow). **B**, Inferotemporal to this area were lobular areas of atrophy. **C**, Fluorescein angiogram of the posterior pole, shown for comparison.

angioid streaks and a gene defect that may alter the composition of the extracellular matrix. Preexisting streaks may act as a nidus of an RPE rip and allow propagation of an RPE tear in response to fibrovascular contraction of the choroidal neovascularization.

The second manifestation of RPE loss was multiple ovoid lobular areas of decreased autofluorescence. These multilobular regions were not associated with scrolled or heaped-up RPE at their borders, and some of the lobular atrophic areas were well away from any choroidal neovascularization, nasal to the nerve and even in the periphery. Although the shape of these areas did mimic geographic atrophy seen in AMD, they were not surrounded by as prominent a zone of increased autofluorescence.<sup>15</sup> The third configuration of atrophy was broader areas of decreased autofluorescence that subtended larger solid angles of the fundus but had much less sharply defined outer borders than either the rips or lobular areas. In one patient, this type of atrophy appeared to involve the entire posterior pole of each eye.

Pseudoxanthoma elasticum is caused by a defect in the *ABCC6* gene, which is in the same superfamily as the

*ABCA4* gene, a defect of which causes Stargardt's disease.<sup>16</sup> *ABCC6* (and *ABCA4*) appear to code for a transport protein.<sup>17,18</sup> The substrate for the transport protein is not known, but other members of the ABC proteins mediate transbilayer lipid transport in various membranes of cells and cell organelles.<sup>17</sup> More than 80 different *ABCC6* defects causing pseudoxanthoma elasticum have been characterized.<sup>1,19</sup> One defect in *ABCC6* has been reported to cause only accelerated coronary artery disease with atherosclerosis without causing any eye or skin abnormalities.<sup>20</sup> Although the transport defect may involve lipids, the protean manifestations of pseudoxanthoma elasticum suggest that there are a multitude of abnormalities directly or indirectly induced by defects in this transport protein. Curiously, the protein product of *ABCC6* does not appear to be required for elastic fiber assembly.<sup>21</sup> One defect related to *ABCC6* mutation appears to be modification in the extracellular matrix, which is important in the health and vitality of the RPE. The defect caused by the *ABCC6* mutation may affect the RPE directly or may do so indirectly by altering the extracellular matrix of the RPE.<sup>22-24</sup> A common final pathway to severe vision loss in patients with pseudoxanthoma

elasticum is the development of choroidal neovascularization. The breaks in Bruch's membrane may be distributed over a large extent of the fundus and offer multiple ingrowth sites for choroidal neovascularization. The autofluorescence finding of widespread RPE abnormalities in patients with pseudoxanthoma elasticum suggests that abnormal RPE may be an additional risk for the formation of the choroidal neovascularization.

This study has the weakness<sup>3</sup> of a limited number of patients, many of whom had relatively advanced ocular disease, reflecting the referral nature of our practice. However, using autofluorescence photography we found that there were abnormalities in the RPE that would not necessarily be expected from alternate methods of ocular imaging. Given the severity and distribution of these abnormalities, it appears that the RPE may play a significant role in the pathogenesis of ocular disease in pseudoxanthoma elasticum. Prospective analysis of the autofluorescence photographs of patients with pseudoxanthoma elasticum would be helpful in ascertaining the role of RPE abnormalities in the genesis of visual loss.

## References

1. Chassaing N, Martin L, Calvas P, et al. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations. *J Med Genet* 2005;42:881-92.
2. Martínez-Hernández A, Huffer WE. Pseudoxanthoma elasticum: dermal polyanions and the mineralization of elastic fibers. *Lab Invest* 1974;31:181-6.
3. Baccarani-Conti M, Vincenzi D, Cicchetti F, et al. Immunohistochemical identification of abnormal constituents in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. *Eur J Histochem* 1994;38:111-23.
4. Ringpfeil F, Lebowitz MG, Christiano AM, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6001-6.
5. Le Saux O, Urban Z, Tschuch C, et al. Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000;25:223-7.
6. Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, et al. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000;25:228-31.
7. Ringpfeil F, Pulkkinen L, Uitto J. Molecular genetics of pseudoxanthoma elasticum. *Exp Dermatol* 2001;10:221-8.
8. Spaide RF. Fundus autofluorescence and age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2003;110:392-9.
9. Spaide RF, Klancnik JM Jr. Fundus autofluorescence and central serous chorioretinopathy. *Ophthalmology* 2005;112:825-33.
10. Shiraki K, Kohno T, Moriwaki M, Yanagihara N. Fundus autofluorescence in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Int Ophthalmol* 2001;24:243-8.
11. Pierro L, Brancato R, Minicucci M, Pece A. Echographic diagnosis of drusen of the optic nerve head in patients with angioid streaks. *Ophthalmologica* 1994;208:239-42.
12. Clarkson JG, Altman RD. Angioid streaks. *Surv Ophthalmol* 1982;26:235-46.
13. Dreyer R, Green WR. The pathology of angioid streaks: a study of twenty-one cases. *Trans Pa Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1978;31:158-67.
14. Te D, Yannuzzi LA, Spaide RF, et al. Microrips of the retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1443-9.
15. Holz FG, Bellmann C, Margaritis M, et al. Patterns of increased in vivo fundus autofluorescence in the junctional zone of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium associated with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:145-52.
16. Klevering BJ, Deutman AF, Maugeri A, et al. The spectrum of retinal phenotypes caused by mutations in the ABCA4 gene. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:90-100.
17. Pohl A, Devaux PF, Herrmann A. Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* 2005;1733:29-52.
18. Ilias A, Urban Z, Seidl TL, et al. Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J Biol Chem* 2002;277:16860-7.
19. Gheduzzi D, Guidetti R, Anzivino C, et al. ABCC6 mutations in Italian families affected by pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Hum Mutat* 2004;24:438-9.
20. Wegman JJ, Hu X, Tan H, et al. Patients with premature coronary artery disease who carry the ABCC6 R1141X mutation have no pseudoxanthoma elasticum phenotype. *Int J Cardiol* 2005;100:389-93.
21. Beck K, Dang K, Boyd CD. The tissue distribution of murine Abcc6 (Mrp6) during embryogenesis indicates that the presence of Abcc6 in elastic tissues is not required for elastic fiber assembly. *J Mol Biol* 2005;36:167-70.
22. Del Priore LV, Geng L, Tezel TH, Kaplan HJ. Extracellular matrix ligands promote RPE attachment to inner Bruch's membrane. *Curr Eye Res* 2002;25:79-89.
23. Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ. Reengineering of aged Bruch's membrane to enhance retinal pigment epithelium repopulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3337-48.
24. Gullapalli VK, Sugino IK, Van Patten Y, et al. Impaired RPE survival on aged submacular human Bruch's membrane. *Exp Eye Res* 2005;80:235-48.

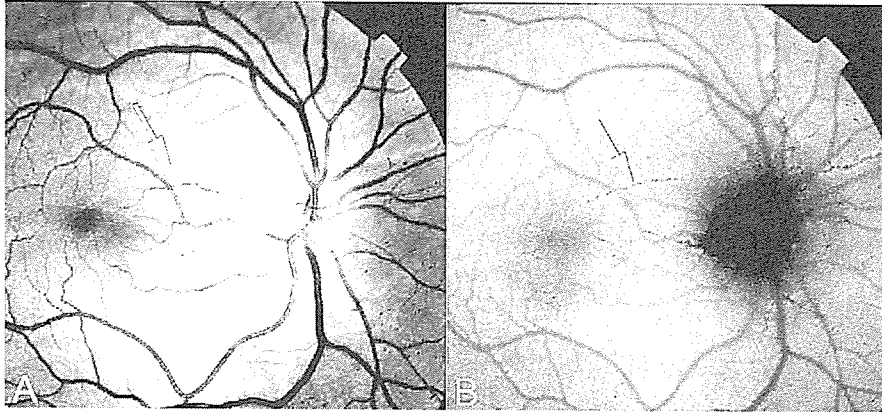


Figure 2. Angioid streaks. This 54-year-old female had whitish lines radiating from the nerve in the right eye, as seen by monochromatic photography (A). Autofluorescence photography (B) shows fine jagged hypoautofluorescent lines consistent with fine angioid streaks.

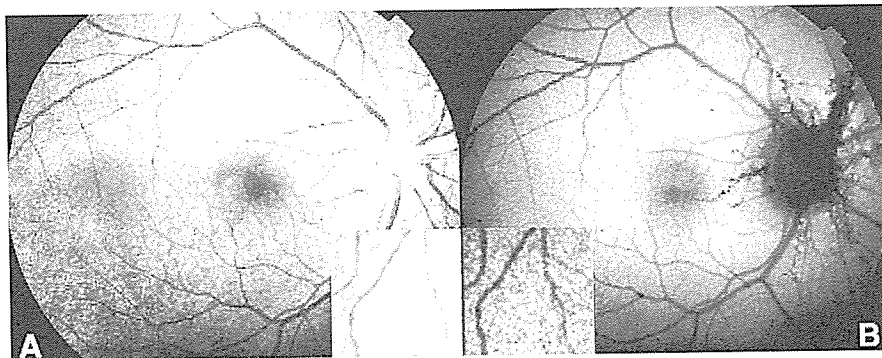
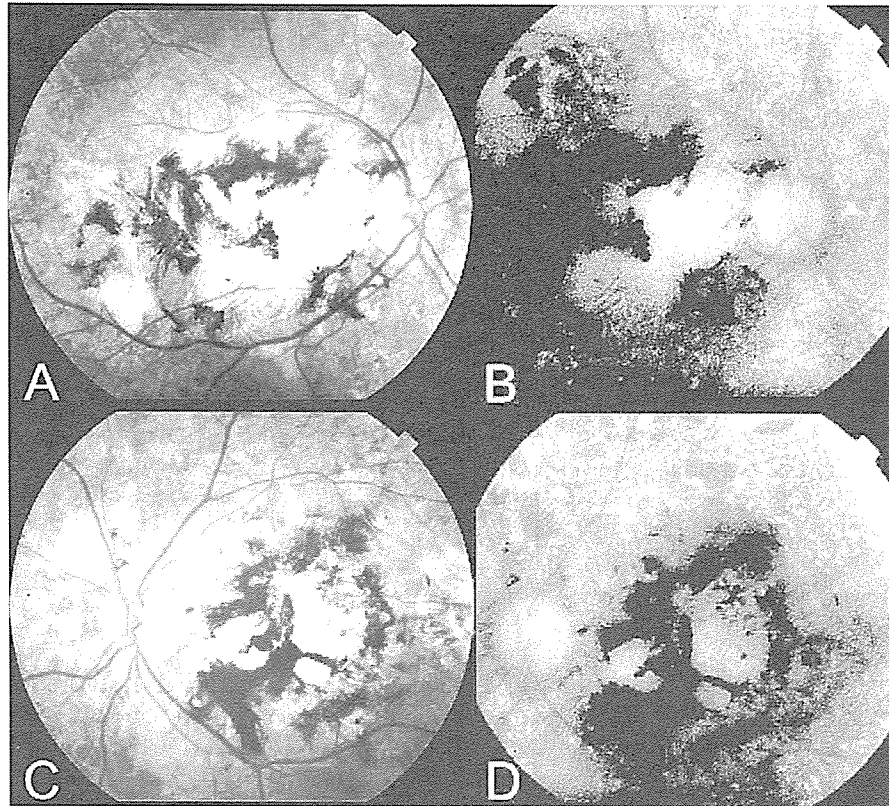


Figure 3. The same patient as shown in Figure 1 also had peau d'orange. This produced an easily seen stippled appearance in a color photograph (A) and a less well seen granularity on an autofluorescence photograph (B). The insets show enlargements of the region superotemporal to the center of the macula.



**Figure 9.** Widespread atrophy of the retinal pigment epithelium (RPE). **A**, Color photograph showing a large fibrovascular scar secondary to choroidal neovascularization. Surrounding the central macula, there appears to be mottling of the pigment of the RPE. **B**, In actuality, there was almost no signal from the RPE present. The gain was turned up so much that the autofluorescence from the nerve, normally barely visible, was prominent. There was almost no signal from the RPE monolayer, except as pinpoint dots. Color (**C**) and autofluorescence (**D**) photographs illustrate the bilateral symmetry of this finding.

## 25. CCR3 阻害による脈絡膜新生血管抑制

野崎実穂<sup>1)</sup>、武田篤信<sup>2)</sup>、Jayakrishna Ambati<sup>2)</sup>、小椋祐一郎<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 名古屋市大、<sup>2)</sup> Kentucky 大)

**研究要旨** ケモカインレセプターの一つである CCR3 は、特に好酸球のケモカインレセプターとして知られており、monocyte chemoattractant protein (MCP)-3 や eotaxin-1、2 といったリガンドを持っている。今回、我々は、CCR3 阻害による実験的レーザー脈絡膜新生血管 (CNV) に対する抑制効果を検討した。

マウスを用いて、レーザー網膜光凝固により CNV を誘導し、7日後に CNV の体積を測定した。抗 CCR3 抗体により CNV 体積は対照と比較して有意に抑制された。脈絡膜内の好中球、マクロファージ、好酸球、肥満細胞の数は抗 CCR3 抗体に影響されなかった。抗 CCR3 抗体により、レーザー後の脈絡膜血管内皮細胞の G0/G1 arrest が促進された。CCR3 の数あるリガンドのうち、eotaxin-1 および eotaxin-2 阻害により CNV は有意に抑制された。これらの結果から、CCR3 阻害による CNV 抑制は白血球を介してではないことが明らかとなった。また eotaxin-1、2 がこれらに参与しているリガンドであり、今後 AMD の治療のターゲットになりうると考えられた。

### A. 研究目的

加齢黄斑変性 (AMD) の病態において、炎症、特にケモカインの様々な関与が示唆されている<sup>1,2)</sup>。ケモカインレセプターの一つである CCR3 は、好酸球のケモカインレセプターとして知られており、RANTES、monocyte chemoattractant protein (MCP)-3 や eotaxin-1、2 といったリガンドを持っている。今回、我々は、CCR3 阻害による実験的レーザー脈絡膜新生血管 (CNV) に対する抑制効果を検討した。

### B. 研究方法

C57BL/6J マウス、好酸球欠損マウス、eotaxin-1 および eotaxin-2 欠損マウスに対し、レーザー網膜光凝固により CNV を誘導し、7日後に CNV の体積を測定した。抗 CCR3 抗体、

抗 eotaxin-1 抗体、抗 eotaxin-2 抗体、抗 RANTES 抗体、抗 MCP-3 抗体をレーザー照射後に硝子体内に投与した。フローサイトメトリーを用いて、脈絡膜内に浸潤した炎症細胞数を測定、CCR3 陽性細胞および細胞周期も検討した。

### C. 研究結果

抗 CCR3 抗体により、CNV 容積は用量依存的に有意に抑制された ( $p < 0.01$ )。脈絡膜内の好中球、好酸球、肥満細胞、マクロファージの数は抗 CCR3 抗体に影響されなかった。また好酸球欠損マウスにおいても抗 CCR3 抗体により有意に CNV は抑制された。レーザー照射後、脈絡膜血管内皮細胞中の CCR3 発現は増加しており、抗 CCR3 抗体により、レーザー後の脈絡膜血管内皮細胞の G0/G1

arrest が有意に促進されていた(図 1、 $p<0.0001$ )。CCR3 の数あるリガンドのうち、eotaxin-1 および eotaxin-2 阻害により CNV は有意に抑制された ( $p<0.01$ )。また eotaxin-1、eotaxin-2 ノックアウトマウスで野生型マウスと比べて、有意に CNV が抑制された( $p<0.01$ )。

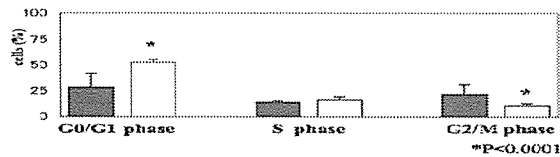


図 1 レーザー照射後の脈絡膜血管内皮細胞における細胞周期 (黒は対照、白は抗 CCR3 抗体投与群)

#### D. 考察

以上の結果から、CCR 阻害により CNV が抑制されることがわかった。また好酸球欠損マウスでも CCR3 阻害により CNV が抑制されること、炎症胞数に変化のなかったことから、CCR3 阻害による CNV 抑制のメカニズムが白血球を介してはいないことが明らかになった。細胞周期の検討から、CCR3 阻害により脈絡膜血管内皮細胞の増殖が抑制されており、それが CNV 抑制のメカニズムと考えられた。また、数ある CCR3 のリガンドのうち、eotaxin-1 および eotaxin-2 が CNV 発生に関与していた。

#### E. 結論

Eotaxin は CCR3 陽性のヒト microvascular endothelial cell で、血管新生促進作用が認められており<sup>3)</sup>、今回の結果を裏付けるものとなった。CCR3 や eotaxin は、今までアレ

ルギー性疾患の治療に関連した研究がされてきたが、今後 AMD のような CNV を来す疾患の治療のターゲットにもなりうると考えられた。

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

Takeda A et al: CCR3 Blockade Suppresses Experimental Choroidal Neovascularization, The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2006.

#### 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. Sakurai E et al: Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 44: 3578-4585, 2003.
2. Ambati J et al: An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. Nat Med 9: 1390-1397, 2003.
3. Salcedo R et al: Eotaxin induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. J. Immunol 166: 7571-7578, 2001.

## 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

山崎 哲、櫻井英二、板谷正博、野崎実穂

Matthias Mack, Jayakrishna Ambati, 小椋祐一郎

(名古屋市大)

**研究要旨** マクロファージは血管新生発症に深く関わっている。単球の走化性因子の monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) に対する中和抗体と、そのレセプターである CCR2 に対する中和抗体 (MC-21) によるレーザー発症の脈絡膜新生血管 (CNV) 抑制効果を検討した。雄の生後約 6 週の C57BL/6J マウスにレーザー網膜光凝固を行い、直後に抗 MCP-1 抗体 (10ng, 1ng)、MC-21 (0.2  $\mu$ g, 2  $\mu$ g)、対照としてハムスター IgG あるいは MC-67 を硝子体内に投与した。2 週間後に眼球摘出し、lectin B4 (FITC) で染色してフラットマウントを作成し、共焦点顕微鏡で CNV の体積を測定し対照と比較検討した。網膜光凝固 25 発施行後、網膜色素上皮-脈絡膜での血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を ELISA により測定し比較検討した。さらにマクロファージの集積をフローサイトメトリーで対照と比較検討した。

対照の CNV の体積は  $6.7 \pm 1.1 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、抗 MCP-1 抗体の 1ng 投与群は  $5.5 \pm 1.7 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、10ng 投与群は  $3.9 \pm 1.1 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、MC-21 の 0.2  $\mu$ g 投与群は  $4.8 \pm 1.8 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、2  $\mu$ g 投与群は  $3.1 \pm 1.3 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  と濃度依存性に抑制効果を認めた VEGF 発現は、網膜光凝固なしでは、 $4.2 \pm 2.2 \text{ pg/protein}$ 、網膜光凝固のみでは  $26.2 \pm 4.2 \text{ pg/protein}$ 、抗 MCP-1 抗体 1ng は  $12.3 \pm 2.3 \text{ pg/protein}$ 、1ng 投与群は  $6.4 \pm 1.7 \text{ pg/protein}$ 、MC-21 の 0.2  $\mu$ g 投与群は  $16.5 \pm 11.6 \text{ pg/protein}$ 、2  $\mu$ g 投与群は  $6.7 \pm 4.4 \text{ pg/protein}$  と有意に抑制効果が見られた。フローサイトメトリーでも、抗 MCP-1 抗体投与による RPE へのマクロファージの集積抑制を認めた。

抗 MCP-1 抗体とそのレセプターの抗 CCR2 抗体の硝子体内投与により、レーザー発症の脈絡膜新生血管を抑制できた。加齢黄斑変性における脈絡膜新生結果の加療の可能性となることが示唆された。

#### A. 研究目的

近年、加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管発症の原因として炎症が取り上げられている<sup>1)</sup>、<sup>2)</sup>。古くから脈絡膜新生血管周囲や網膜色素上皮周囲にマクロファージを認め、脈絡膜

新生血管生成とマクロファージとの関係が論議されてきた。近年我々は、マクロファージを減少させると、レーザー発症の脈絡膜新生血管を有意に抑制されることを報告<sup>3)</sup>した。monocyte chemoattractant



protein-1 (MCP-1) は単球を遊走させ、炎症や血管新生<sup>4)</sup>に深く関わっている。今回、我々は MCP-1 に対する中和抗体と MCP-1 のレセプターである CCR2 に対する中和抗体によるレーザー発症の脈絡膜新生血管の抑制効果を検討した。

## B. 研究方法

雄の6-8週 C57BL に対し網膜レーザー光凝固 (200mW、75um、100 ms、532 nm) を行った。2 週間後に眼球を取り出してフラットマウントを作成し、FITC-Isolectin B4 で血管内皮を染色して共焦点顕微鏡で CNV の体積を測定し比較検討した。対照として PBS をレーザー直後に、治療群は、抗 MCP-1 抗体を 1 ng あるいは 10 ng を、抗 CCR2 抗体 (MC-21) を 0.2 μg、2 μg 硝子体内へ投与した。また対照および治療群の Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の発現を比較検討するため、多数のレーザー光凝固 (25 発) をそれぞれの眼に行い、3 日後に眼球を取り出しそれぞれの群を ELISA により測定した。それぞれの群のマクロファージの脈絡膜・色素上皮細胞に対する集積を測定するために、多数のレーザー光凝固術を行い、3 日後に色素上皮・脈絡膜を取り出して F4/80 で染色して、フローサイトメトリーにより検出した。

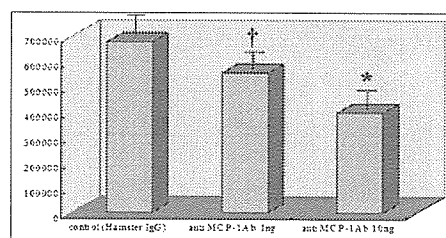
(倫理面への配慮)

動物実験の取り扱いには ARVO に準じた。

## C. 研究結果

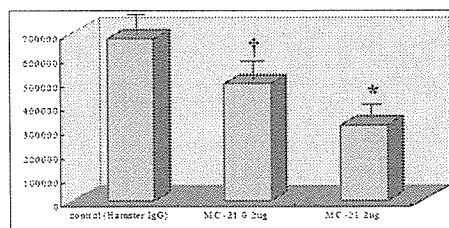
対照の CNV の体積は  $6.7 \pm 1.1 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、抗 MCP-1 抗体の 1ng 投与群は  $5.5 \pm 1.7 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、10ng 投与群は  $3.9 \pm 1.1 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  (図 1)、MC-21 の 0.2 μg 投与群は  $4.8 \pm 1.8 \times 10^5 \mu\text{m}^3$

$\text{m}^3$ 、2 μg 投与群は  $3.1 \pm 1.3 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  と濃度依存性に抑制効果を認めた (図 2)。また VEGF の発現はそれぞれ、網膜光凝固なしでは  $4.2 \pm 2.2 \text{ pg/protein}$ 、網膜光凝固のみでは  $26.2 \pm 4.2 \text{ pg/protein}$ 、抗 MCP-1 抗体 1 ng は  $12.3 \pm 2.3 \text{ pg/protein}$ 、10 ng 投与群は  $6.4 \pm 1.7 \text{ pg/protein}$ 、MC-21 の 0.2ug 投与群は  $16.5 \pm 11.6 \text{ pg/protein}$ 、2ug 投与群は  $6.7 \pm 4.4 \text{ pg/protein}$  と有意に抑制効果が見られた。(図 3)。マクロファージの集積 (Index) はそれぞれ、レーザーを行っていないものはほとんど集積が認められず、レーザーのみおよび治療群は  $12.1 \pm 1.2\%$ 、 $6.3 \pm 1.5\%$  であった (図 4)。



(† P=0.01, \* P=0.0001, N=30 for all groups)

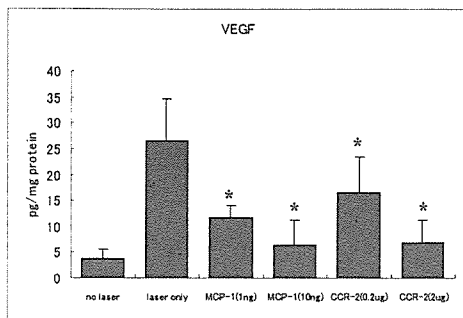
図 1 抗 MCP-1 抗体投与群の CNV 体積 (um<sup>3</sup>) 対照と比較して抗 MCP-1 抗体投与により用量依存性に CNV 生成が抑制されている。



(† P=0.001, \* P=0.0001, N=30 for all groups)

図 2 抗 CCR2 抗体 (MC-21) 投与群の CNV 体積 (um<sup>3</sup>)

対照と比較して抗 CCR2 抗体投与により用量依存性に CNV 生成が抑制されている。



(vs laser only, \* P < 0.001), N = 5 for all groups.

図3 各群のレーザー3日後の VEGF 発現量 (pg/mg protein) 両抗体ともレーザーのみと比較して有意に VEGF の発現抑制効果を認める。

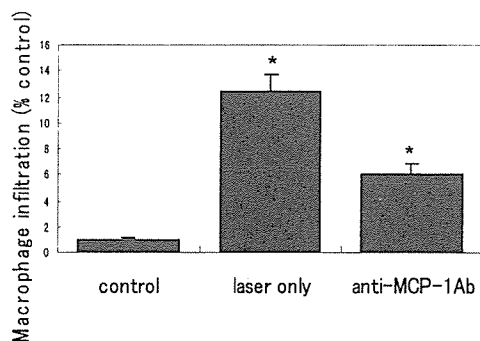
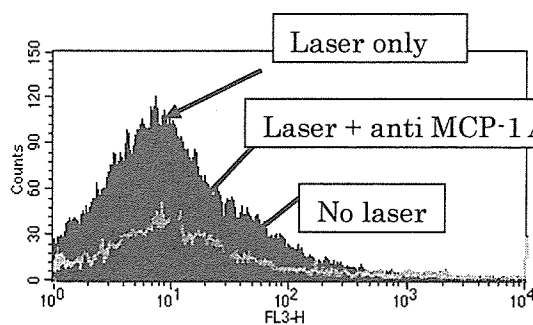


図4 各群のレーザー光凝固3日後のマクロファージ集積 (Index) (\* P < 0.01) 抗 MCP-1 抗体投与群ではレーザーのみに比べ色素上皮・脈絡膜に対するマクロファージの集積抑制を認める。

#### D. 考察

MCP-1 は単球遊走因子の一つで、CCR2 はそのレセプターである。それらはマクロファージの接着、遊走に重要な役割を担っており、炎症および血管新生過程に関与している。

一般的に主な VEGF の源は遊走されたマクロファージとされており、脈絡膜血管新生においても同様のことが考えられている<sup>5</sup>。そのため MCP-1 あるいは CCR2 を抑制することにより、この VEGF の源を断ち切ることができる。現在脈絡膜新生血管の治療に臨床的にも抗 VEGF 療法が盛んに研究されており<sup>6</sup>、同様の効果が期待できる。

今回、我々の結果では抗 MCP-1 抗体あるいは抗 CCR2 抗体投与はレーザーによる CNV の生成を有意に抑制した。機序としてマクロファージの色素上皮・脈絡膜への集積抑制が考えられた。CNV の抑制効果はマクロファージ集積と VEGF 発現量に関連していた。

#### E. 結論

抗 MCP-1 抗体および抗 CCR2 抗体の硝子体投与は脈絡膜新生血管の治療に有用である可能性が示唆された。

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

## 1. 参考文献

1. Anderson DH et al: A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol*, 134: 411-431, 2002.
2. Sakurai E et al: Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 2743-2749, 2003.
3. Sakurai E et al: Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44: 3578-3585, 2003.
4. Salcedo R et al: Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 96: 34-40, 2000.
5. Oh H et al: The Potential Angiogenic Role of Macrophages in the Formation of Choroidal Neovascular Membranes *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40: 1891-1898, 1999.
6. Avery RL et al: Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 113: 363-372, 2006.

## 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

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  
(京都大)

**研究要旨** 骨髄移植モデルを用いて骨髄幹細胞の機能を回復したマウスでは、CNVの重症化が阻止された。骨髄由来幹細胞は本来CNVの重症化を防ぐ方向に機能しており、その機能が低下している場合に、CNVの重症化を招く可能性が考えられる。

### A. 研究目的

骨髄由来幹細胞がさまざまな疾患の病態形成、進行過程に影響を及ぼしていることが、多数報告されている。眼においても、網膜血管新生や脈絡膜血管新生において、その関与が動物モデルにて示されてきた。しかしながら細胞が実際にどのような役割を果たしているかについては詳細不明であった。我々のグループでは、脈絡膜新生血管(CNV)を伴う加齢黄斑変性(AMD)患者の末梢血から骨髄由来幹細胞を分離し、その数や機能を測定することによって、骨髄幹細胞がCNVに果たす役割を明らかにしようと試みてきた。その結果、CNVの活動性が上昇するにつれ末梢血中の骨髄幹細胞の数が上昇すること、また、CNV sizeの大きな重症例において、その細胞機能が低下していることを明らかにしてきた。この結果から我々は、CNVの活動性が上昇するに従い骨髄から末梢血中に骨髄幹細胞が動員されてくるが、その細胞機能が低下している場合にはCNVの重症化を招くのではないかとの仮説を立てた。今回動物モデルを用いて、骨髄幹細胞の機能回復を行った場合、果たしてCNVの重症化が阻止できるのかどうか、検証実験を行った。

### B. 研究方法

雌マウス(C57BL/6)を8週齢(8w)の若マウスと40週齢を超える(>40w)老マウスの2種類用意した。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種類のマウスを作成した。骨髄移植は致死量放射線照射(950cGy)後、別のマウス由来骨髄細胞 $1 \times 10^7$ 個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Bruch膜破碎を行い、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、連続切片を作成し、Masson Trichrome染色にて、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。

### C. 研究結果

>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( $P=0.03$ )。

#### D. 考察

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ってやると、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る。近年眼科以外の領域において、骨髄幹細胞の機能低下がさまざまな疾患の病態進行、重症化に関与していることが報告されている。加齢・喫煙・その他の影響による骨髄幹細胞機能の低下は、一旦CNVが発生した場合の病態安定化・組織修復能力の低下につながり、ひいてはCNVの重症化を促進してしまう可能性が推察される。

#### E. 結論

骨髄由来幹細胞は本来CNVの重症化を防ぐ方向に機能していると推察する。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、CNV重症化阻止を考える上で、重要と思われる。

#### F. 健康危険情報

AMDでは喫煙をやめることが重要と思われる。喫煙はAMD環境因子として最も有名であるが、他方、喫煙は骨髄由来幹細胞の機能低下をひき起こすことが報告されている。

#### G. 研究発表

1. 論文発表 投稿中
2. 学会発表  
佐々原 学 他：骨髄由来幹細胞の機能と変性近視に伴う脈絡膜新生血管。  
第45回日本網膜硝子体学会、東京、2006. にて一部報告

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特許申請考慮中
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

#### I. 参考文献

1. Grant MB, May WS, Caballero S, et al: Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8: 607-612, 2002.
2. Espinosa-Heidmann DG, Caicedo A, Hernandez EP, Csaky KG, Cousins SW: Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4914-4919, 2003.
3. Chan-Ling T, Baxter L, Afzal A, et al: Hematopoietic stem cells provide repair functions after laser-induced Bruch's membrane rupture model of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 168: 1031-1044, 2006.

## 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

高瀬綾恵、安川 力、小椋祐一郎  
(名古屋市大)

**研究要旨** 加齢黄斑変性の確実な危険因子である「加齢」により眼内にまず起こる変化は、網膜色素上皮 (RPE: retinal pigment epithelium) 細胞内へのリポフスチンの蓄積である。我々は、リポフスチン内に多く存在すると考えられる最終糖化産物 (AGE: advanced glycation end products) からなる微粒子を作製し家兔の網膜下に注入することにより、ドルーゼンや type I 脈絡膜新生血管が出現し、新しい加齢黄斑変性モデルとして有用である可能性を報告してきた。この AGE 微粒子の *in vitro* における網膜色素上皮細胞への影響について検討した。培養網膜色素上皮細胞に細胞数の 100 倍の微粒子を投与すると、すべての細胞内に複数の微粒子が貯留しているのが認められた。この状態で 24 時間培養後、細胞活性の変化は、AGE 微粒子投与群、コントロール微粒子投与群、非投与群で差は認められなかった。細胞接着能、細胞増殖能に関しても各群で有意差は認められなかった。また、細胞内での各微粒子の動態を観察すると、いずれの微粒子も細胞内から消失する傾向があったが、AGE 微粒子の一部は細胞内に長く滞留していた。以上より家兔の加齢黄斑変性モデルは急性反応に由来するものではなく、慢性的な効果であることが示唆された。

### A. 研究目的

加齢黄斑変性(AMD)は欧米諸国では成人失明の主要原因であり、近年、我が国でも増加傾向にある。病態については不明な点が多い。現在、光線力学療法を初めとして、様々な治療が行われているが、一度低下した視力を改善させることは難しい場合が多く、今後、より早期に行える新しい治療法の開発が望まれるが、そのためにも病態を解明することが重要である。AMD の確実な危険因子は「加齢」であるが、「加齢」によりまず眼内に起こる変化は、網膜色素上皮 (RPE) 内へのリポフスチンの沈着である。我々は、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、

これが網膜色素上皮細胞に与える影響を検討した。

### B. 研究方法

トルエン内でアルブミン水溶液のエマルジョンを形成させた後、AGE 反応の中間産物であるグリコールアルデヒドに反応させて、AGE 微粒子を作製した。グルタルアルデヒドを利用してコントロール微粒子も作製した。ドイツアイバンクより得た眼球から分離、培養したヒト網膜色素上皮細胞に、細胞数の 10 倍、100 倍の数の微粒子を培養液に添加し、これをトリプシン処理し、一部トリパンプルー処理して貪食能及び、細胞生存率の評価を行った。その後、6 ウェル培養皿にまき細胞の接着率と増殖能を評

価した。細胞増殖については 98 ウェル培養皿を用いて、XTT アッセイにても確認をおこなった。

(倫理面への配慮) 網膜色素上皮細胞の使用にあたってはドイツアイバンク協会の規定にしたがった。

### C. 研究結果

細胞数の 100 倍の微粒子を投与した場合に、すべての細胞内に複数の微粒子が貯留している状態を得た。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、増殖能ともに各群で有意差は認められなかった。

### D. 考察

AGE 微粒子は RPE 内に長く滞留する傾向があったが、細胞活性、接着能、増殖能への少なくとも早期の影響を示さなかった。

### E. 結論

以上の結果より、この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新生血管 (CNV) は微粒子の成分に由来する急性反応によるものではないことが示唆された。網膜色素上皮内に滞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、AMD 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。

F. 健康危険情報                   なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Yasukawa T et al: Drug delivery

systems for vitreoretinal diseases. Prog Retin Eye Res 23: 253-281, 2004.

#### 2. 学会発表

1. Yasukawa T et al: A new model of age-related macular degeneration induced by advanced glycation end products. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2002.
2. Yasukawa T et al: Possible role of advanced glycoxidation products accumulated in retinal pigment epithelial cells in the pathology of age-related maculopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2003.
3. 安川 力: 加齢黄斑変性の病態. PDT 研究会, 名古屋市, 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 |

### I. 参考文献

1. Hageman GS et al: An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. Prog Retin Eye Res 20: 705-732, 2001.

- 2 . Schutt F et al: Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 44 : 3663-3668, 2003.
- 3 . Sparrow JR et al: RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. Exp Eye Res 80: 595-606, 2005.



## 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

安川 力、高瀬綾恵、小椋祐一郎  
(名古屋市大)

**研究要旨** 網膜色素上皮は、網膜の生理機能維持において重要な役割を果たしており、加齢黄斑変性、網膜色素変性症などの疾患の病態にその機能障害の関与が示唆されているが、その機能、役割については多くのことがわかっていない。今回、網膜色素上皮細胞の3次元培養が、網膜色素上皮の基底膜側を直接観察可能な有用なシステムであることがわかった。96穴丸底培養皿を用い、メチルセルロース含有培養液中で、ドイツのアイバンクから得た眼球より分離したヒト網膜色素上皮細胞を培養すると、24時間後に球状の細胞塊を形成した。細胞塊の表面に一層の網膜色素上皮が形成された。六角形の網膜色素上皮細胞が観察でき、免疫染色にてオクルーディンの発現を認めた。その他、細胞塊の表面にエラスチン、1型および4型コラーゲンを有するブルッフ膜様の構造物を形成し、網膜色素上皮は基底膜側を外側にして分化していることがわかった。走査型電子顕微鏡にて、4型コラーゲン細線維が分泌され次第に重合して基底膜を形成する過程を観察できた。また、超低比重リポ蛋白よりやや大型のリポ蛋白と考えられる脂肪粒子の基底膜側への排泄を認めた。この培養システムにより、網膜色素上皮の生理機能の解明、評価が可能となり、加齢黄斑変性、網膜色素変性症を初めとした網膜色素上皮に関連した疾患の病態解明にも役立つものと考えられた。

### A. 研究目的

網膜色素変性症および加齢黄斑変性(AMD)は我が国の成人法的失明の主要原因であり、これらの疾患の病態に網膜色素上皮が大きく関与していることは明らかであるが、網膜色素上皮の機能、特に、ブルッフ膜、脈絡膜毛細血管板が存在する基底膜側の機能については多くのことがわかっていない。今回、基底膜側の機能を観察できる網膜色素上皮の3次元培養システムを開発した。

### B. 研究方法

96穴丸底培養皿を用い、メチルセルロース含有F10培養液中で、ドイツのアイバン

クから得た眼球より分離したヒト網膜色素上皮細胞を培養すると、24時間後に球状の細胞塊を形成した。この細胞塊を回収し、4%パラホルムアルデヒドで30分固定後、免疫染色を行った。2.5%グルタルアルデヒド+4%パラホルムアルデヒドにて固定したものを走査型および透過型電子顕微鏡で観察した。

### C. 研究結果

細胞塊の表面に一層の網膜色素上皮が形成された。六角形の網膜色素上皮細胞が観察でき、免疫染色にてオクルーディンの発現を認めた。その他、細胞塊の表面にエラス

チン、1型および4型コラーゲンを有するブルッフ膜様の構造物を形成し、網膜色素上皮は基底膜側を外側にして分化していることがわかった。走査型電子顕微鏡にて、4型コラーゲン細線維が分泌され次第に重合して基底膜を形成する過程が観察できた。また、超低比重リポ蛋白よりやや大型のリポ蛋白と考えられる脂肪粒子の基底膜側への排泄を認めた。透過型電子顕微鏡にて、リポ蛋白の他、大きな脂肪滴も観察できた。

#### D. 考察

網膜色素上皮細胞は、3次元培養下で密着結合を認める上皮として良く分化し、外側に基底膜、弾性線維層と1型コラーゲンの分泌を認め、ブルッフ膜類似の構造物を形成した。またリポ蛋白と考えられる微粒子の分泌を認め、最近、網膜色素上皮細胞がapoB-100, apoE等を含むリポ蛋白を産生しているという報告を裏づける証拠となった。網膜色素上皮は、視細胞外節を常時貪食し、メンテナンスを行うと同時に、リポ蛋白としてブルッフ膜側に排泄していると考えられる。加齢によるリポフスチンの沈着が顕著となる30代頃からブルッフ膜の脂質沈着が次第に増強することから、リポフスチン沈着がこの脂質の代謝、輸送を障害し、これがブルッフ膜への脂質沈着、加齢黄斑変性などの発症に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

この網膜色素上皮の3次元培養システムを用いることにより、網膜色素上皮の生理機能の解明、評価が可能となり、加齢黄斑変性、網膜色素変性症を初めとした網膜色素

上皮に関連した疾患の病態解明にも役立つものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Wang YS, et al: Impact of endostatin on bFGF-induced proliferation, migration, and matrix metalloproteinase-2 expression/secretion of bovine choroidal endothelial cells. *Curr Eye Res* 30: 479-489, 2005.
2. Thumann G, et al: Characteristics of iris and retinal pigment epithelial cells cultured on collagen type I membranes. *Curr Eye Res.* 31: 241-249, 2006

##### 2. 学会発表

1. Yasukawa T, et al: In vitro observation system for basal functions of retinal pigment epithelium. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2006.
2. Yasukawa T, et al: Drusen in aging eyes: a masterpiece of retinal pigment epithelium. The 25<sup>th</sup> meeting of the Club Jules Gonin, Cape Town, South Africa, 2006.
3. 安川 力: 加齢黄斑変性初期の病態とドルーゼンの生成機序, 黄斑研究会, 第110回日本眼科学会総会, 大阪市, 2006.

4. 安川 力：脈絡膜新生血管に対するターゲティング療法の可能性、シンポジウム7：加齢黄斑変性に対する治療の新たな展開，第110回日本眼科学会総会，大阪市，2006.
5. 安川 力 他：最終糖化産物微粒子を用いた家免リポフスチン蓄積モデルの加齢黄斑変性との類似性，第110回日本眼科学会総会，大阪市，2006.

#### 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. Hartzell C, et al: Looking chloride channels straight in the eye: bestrophins, lipofuscinosis, and retinal degeneration. *Physiology* 20: 292-302, 2005.
2. Sparrow JR et al: RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res* 80: 595-606, 2005.
3. Curcio CA, et al: Basal deposits and drusen in eyes with age-related maculopathy: evidence for solid lipid particles. *Exp Eye Res* 80: 761-775, 2005.

## 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

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  
(名古屋大)

**研究要旨** 加齢黄斑変性に伴う脈絡膜新生血管に対する bevacizumab 硝子体注入の有効性が報告され<sup>1)</sup>、広く臨床応用され始めている。我々は、光干渉断層計、中心 15° 刺激黄斑部局所網膜電図を用い、bevacizumab 硝子体注入後の黄斑形態・機能を評価した。Becavizumab の硝子体注入は治療後早期より、視力、黄斑部網膜厚、FMERG a、b 波振幅の改善がみられ、黄斑部網膜機能への障害がほとんどなく、形態が改善する治療である可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

我々は、加齢黄斑変性(AMD)に伴う脈絡膜新生血管(CNV)に対する治療法として光線力学療法(PDT)施行後早期に黄斑部網膜機能が障害され、その障害が強い症例はインドシアニングリーン蛍光眼底造影検査によるレーザースポットに一致した脈絡膜の低蛍光も強いことを報告した<sup>2)</sup>。近年、AMDに伴う CNV に対する bevacizumab 硝子体注入の有効性が報告されてきており<sup>1)</sup>、本研究では、bevacizumab 硝子体注入後の短期的な視力、黄斑形態・機能の変化について検討した。

#### B. 研究方法

2006年11月1日から2006年12月25日までに、病変が大きい、病変が中心窩外、主要病変が線維血管性網膜色素上皮剥離であり PDT の効果が十分期待されず PDT の適応とならなかった症例、PDT の適応であったが bevacizumab による治療の希望が

強い症例に対し bevacizumab 1.25mg 硝子体注入を施行した広義 AMD 12例 12眼を対象とした。治療前と治療後9~12日に視力、光干渉断層計(OCT)、中心15°刺激の黄斑部局所網膜電図(FMERG)を施行した。黄斑部網膜厚は当院開発手動ソフト<sup>3)</sup>を用いて、OCT3のFast Macular Thickness Map画像から直径3mmの平均網膜厚を解析した。網膜厚には漿液性網膜剥離も含んだ。

#### (倫理面への配慮)

Becavizumab は、学内の審査委員会の承諾を得て、他の治療法についても十分に説明した後に投与した。

#### C. 研究結果

男性7眼、女性5眼、年齢は53~77歳、平均72.2±1.9歳、疾患はAMD11眼、ポリープ状脈絡膜血管症1眼、病変タイプは predominantly classic 2眼、minimally classic 1眼、occult with no classic 9眼だ