

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19年度 総括・分担研究報告書**

(3年計画の3年目)

主任研究者 石橋達朗

平成20(2008)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. 日本人の正常眼における眼軸長の性別・年代別分布 7
(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
2. 日本人の病的近視における COL1A1 遺伝子多型の関与 11
(京大) 中西 秀雄、後藤 謙元
林 寿子、大谷 篤史
辻川 明孝、田村 寛
吉村 長久
(東京医科歯科大) 島田 典明、大野 京子
望月 學
(福島県立医科大) 齋藤 昌晃、齋藤 国治
飯田 知弘
3. 近視性脈絡膜新生血管に対する bevacizumab 硝子体内投与の効果 13
(香川大) 白瀧ゆかり、白神千恵子
山下 彩奈、白神 史雄
4. 近視性血管新生黄斑症に対する Bevacizumab 硝子体腔内投与の成績に関与する因子 16
(大 阪 大) 生野 恭司、佐柳 香織
十河 薫、若林 卓
沢 美喜、五味 文
辻川 元一、田野 保雄
5. 網膜色素線条に伴う脈絡膜新生血管に対する bevacizumab 硝子体内投与の効果 24
(日 本 大) 水谷 吉宏、湯澤美都子
6. PDR に対する Bevacizumab、TA 投与における硝子体中サイトカイン濃度の評価 27
(鹿 児 島 大) 大塚 寛樹、有村 昇
喜井 裕哉、山切 啓太
土居 範仁
(鹿児島大血管代謝病態解析学) 橋口 照人、丸山 征郎
坂本 泰二

7. 抗 VEGF 抗体 bevacizumab 硝子体内投与後に発生した眼および全身性合併症	30
(大 阪 大)	坂口 裕和、沢 美喜 辻川 元一、大島 佑介 生野 恭司、五味 文 瓶井 資弘、日下 俊次 田野 保雄
8. ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおける脈絡膜新生血管の検討	33
(名 古 屋 市 大)	伊藤 愛子、櫻井 英二 平野 佳男、板谷 正博 小椋祐一郎
9. 血管新生の形態と骨髄細胞の関与	36
(京 都 大)	大谷 篤史、雛 賀 佐々原 学、淀井 有子 大石 明生、亀田 隆範 小島 洋史、吉村 長久
10. テノモジュリンC末端機能ドメインリコンビナント (rsTeM) による網膜血管新生抑制作用	38
(大 阪 大)	大島 佑介、王 蔚 鈴木三保子、佐藤 達彦 田野 保雄
(帝人ファーマ(株)生物医学総合研究所)	山名 慶
11. マイクロアレイを用いた酸素負荷網膜症モデルマウス網膜の包括的遺伝子発現解析	43
(九 州 大)	石川桂二郎、樋口 直美 石橋 達朗
(福 岡 大 筑 紫)	吉田 茂生
(九州大教育・研究支援センター)	中村 崇徳
(九州大遺伝子細胞療法部)	新納 宏昭、赤司 浩一
12. 未熟児網膜症モデルマウスにおける包括的遺伝子発現解析	46
(大阪大感覚機能形成学)	佐藤 達彦、日下 俊次 不二 門尚
(大阪大感覚器外科学)	橋田 徳康、西信 良嗣 田野 保雄
13. 3次元光干渉断層計による加齢黄斑症の観察	49
(さいたま赤十字)	小畑 亮
(東 京 大)	上田 高志、入山 彩 高橋 秀徳、井上 裕治 足立 知子、柳 靖雄 玉置 泰裕、新家 眞

23. 加齢黄斑変性およびポリープ状脈絡膜血管症と HTRA1 プロモーター／LOC387715 遺伝子多型の関連	90
(名 古 屋 大)	中村 誠、安間 哲宏 菊池 雅人、石川 浩平 西原 裕晶、山腰 友珠 兼子 裕規、西口 康二 寺崎 浩子
24. HTRA1 プロモーター／LOC387715 領域の遺伝子多型と血清C反応性蛋白濃度の関係	93
(名 古 屋 大)	安間 哲宏、中村 誠 菊池 雅人、石川 浩平 西原 裕晶、山腰 友珠 寺崎 浩子
25. 滲出型加齢黄斑変性における遺伝子多型と光線力学療法2年後の成績	96
(京 都 大)	後藤 謙元、辻川 明孝 中西 秀雄、林 寿子 大谷 篤史、田村 寛 吉村 長久
(福 島 県 立 医 科 大)	齋藤 昌晃、齋藤 国治 飯田 知弘
26. 視覚障害の原因の変遷—現調査と1988年調査との比較	99
(獨協医大WHO協力センター)	中江 公裕、妹尾 正
(日 本 失 明 予 防 協 会)	増田寛次郎
(日 本 大)	澤 充
(順 天 堂 大)	金井 淳
(九 州 大)	石橋 達朗
27. わが国における視覚障害の現況—WHOとわが国の視能判定基準の比較	104
(獨協医大WHO協力センター)	中江 公裕
(九 州 大)	石橋 達朗
28. 内因性信号計測法によって明らかになったマカクザルにおける経強膜電気刺激の網膜反応分布	111
(日 本 大)	猪俣 公一、湯澤美都子
(東京医療センター感覚器センター)	角田 和繁、花園 元
(理化学研究所脳科学総合研究センター)	谷藤 学
(大 分 大)	篠田 啓
(愛 知 淑 徳 大)	三宅 養三
29. 骨髄由来 microglia のマウス網膜内への生着	115
(名 古 屋 大)	兼子 裕規、西口 康二 中村 誠、加地 秀 寺崎 浩子

30. 毛様体扁平部における視細胞前駆細胞の新生と周辺網膜への移動 118
 (名 古 屋 大) 西口 康二、兼子 裕規
 中村 誠、加地 秀
 寺崎 浩子
31. 網膜色素変性モデルマウスの網膜変性過程における神経栄養因子および受容体の発現変動 ... 120
 (弘 前 大) 中澤 満
 (岩手大連合農学研究科生物資源科学) 佐藤 孝太
 (弘前大農学生命科学部応用生命工学科細胞工学) 水越小百合、石黒 誠一
32. 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 124
 (弘 前 大) 竹内 侯雄、中澤 満
 (弘前大農学生命科学部細胞工学) 水越小百合
33. 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 129
 (大 阪 大) 中尾 武史、辻川 元一
 田野 保雄
34. ロドプシントランスジェニックウサギ作成の試み 139
 (名 古 屋 大) 近藤 峰生、坂井 隆夫
 米今 敬一、栗本 幸英
 子安 俊行、宮田健太郎
 寺崎 浩子
 (名 古 屋 大 細 胞 生 物 学) 西沢 祐治
 (名 古 屋 大 エ コ ト ピ ア 研 究 所) 白倉 二郎
 (大 阪 大) 不二門 尚、田野 保雄
35. 中型動物における視細胞障害モデルの作成 142
 (大 阪 大) 西田健太郎、瓶井 資弘
 坂口 裕和、不二門 尚
 田野 保雄
 (名 古 屋 大) 近藤 峰生
36. PEDF による視細胞死の抑制とその作用機序に関する検討 145
 (九 州 大 病 理 病 態 学) 村上 祐介、鬼丸 満穂
 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
 (神 戸 大) 中村 誠
 (北 里 大 生 命 科 学) 矢部 武士
 (デ ィ ナ ベ ッ ク 株) 井上 誠、長谷川 護

37. サル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用いたサル網膜下投与の長期安全性試験 …… 148
 (九州大) 池田 康博、宮崎 勝徳
 向野利一郎、村上 祐介
 石橋 達朗
 (九州大病理病態学) 居石 克夫
 (千葉大遺伝子治療学) 米満 吉和
 (信州大) 村田 敏規
 (国際医療福祉大リハビリテーション学部) 後藤 純信
 (ダイナベック株) 長谷川 護
38. ヒト骨髄間葉系幹細胞の網膜変性モデルラットへの網膜下移植における被移植眼への影響 …… 150
 (東京大) 井上 裕治、柳 靖雄
 入山 彩、玉置 泰裕
 新家 眞
39. ヒト ES 細胞から網膜色素上皮および視細胞への分化誘導方法の確立 …… 152
 (理化学研究所) 小坂田文隆、池田 華子
 高橋 政代
40. 網膜色素変性症における網羅的な遺伝子検査 …… 155
 (理化学研究所) 金子兵、万代 道子
 平見 恭彦
 (京大探索) 秋元 正行、池田 花子
 高橋 政代
 (京大) 吉村 長久
 (わだゆうこ眼科クリニック) 和田 裕子
 (京大検査部) 高倉 俊二
 (京大医療倫理学) 小杉 眞司
41. 網膜色素変性患者における自家蛍光と網膜断層像および視野との関係 …… 158
 (理化学研究所) 高橋 政代
 (京大探索医療センター)
 (京大) 村上 智昭、吉村 長久
42. 網膜色素変性に合併した網膜前膜に対し硝子体手術を施行した 3 例 …… 160
 (九州大) 宮崎 勝徳、池田 康博
 園田 倫子、今木 裕幸
 上野 暁史、石橋 達朗
43. 網膜色素上皮の白色光刺激による Wnt/ β -catenin 経路の活性化の検討 …… 162
 (東京大) 入山 彩、柳 靖雄
 玉置 泰裕、新家 眞

44. In vitro ドルーゼンモデルとしての網膜色素上皮細胞の3次元培養 164
 (名古屋大学) 安川 力、高瀬 綾恵
 西脇 晶子、小椋祐一郎
45. 加齢黄斑変性における酸化リン脂質の関与 167
 (大阪大学) 瓶井 資弘、鈴木三保子
 Zhao-Jiang Du、
 辻川 元一、田野 保雄
 (昭和大薬学部生物化学教室) 板部 洋之
46. 視神経乳頭の鼻側にポリープ状血管を伴うポリープ状脈絡膜血管症 171
 (鹿児島大学) 大久保明子、あべ松徳子
 平川真由美、坂本 泰二
47. 摘出眼でのポリープ状脈絡膜血管症の臨床病理相関 173
 (関西医科大学) 高橋 寛二、永井 由巳
 埜本 慎、金子 志帆
48. 超音波血栓融解療法の眼科応用の検討 186
 (鹿児島大学) 山下 敏史、園田 祥三
 園田 恭志、坂本 泰二
 (福岡大解剖学) 立花 克郎
49. 眼虚血状態での硝子体手術による網膜障害に対するD-アロースの保護効果 189
 (香川大学) 溝手 雅宣、廣岡 一行
 福田 恒輝、白神 史雄
50. 眼内炎におけるHigh-Mobility Group Box 1 Proteinの発現 192
 (鹿児島大学) 有村 昇、喜井 裕哉
 園田 恭志、山切 啓太
 坂本 泰二
 (鹿児島大血管代謝病態解析学) 橋口 照人、丸山 征郎
51. 高血圧ラットの臓器障害に及ぼすFluvastatinの影響と網膜血管の白血球接着との関連性 195
 (東京大学) 高橋 秀徳、入山 彩
 小畑 亮、井上 裕治
 柳 靖雄、玉置 泰裕
 新家 眞
 (東京大保健センター) Wu Yaqiong、上原馨志夫
 (獨協医科大臨床検査部) 沼部 敦司

52. 糖尿病ラットの網膜における病態プロテオミクス解析 198
 (信 州 大) 羽二生 久、佐野 令奈
 小山 省三、村田 敏規
53. 硝子体内液性因子の包括的解析：各種網膜硝子体疾患の比較 202
 (九 州 大) 管原 美香、園田 康平
 吉村 武、肱岡 邦明
 望月 泰敬、江内田 寛
 大島 裕司、上野 暁史
 畑 快右、石橋 達朗
54. 糖尿病網膜症に伴う線維血管増殖組織中の新生血管における tumor endothelial marker 7 の発現 206
 (九 州 大) 吉田 茂生、山地 陽子
 佐藤 孝太、仙石 昭仁
 大内田研宙、吉田 綾子
 江内田 寛、石川桂二郎
 石橋 達朗
 (福 岡 大 筑 紫) 向野 利寛
 (九 州 厚 生 年 金 病 院) 藤澤 公彦

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	獨協医科大学WHO協力センター	主任研究員
	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	
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	准教授
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	准教授
	沖崎 史枝	E-mail: fumie@eye.med.kyushu-u.ac.jp	秘書
経理事務担当	倉富 剛生	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@jimukyushu-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、現在の日本における失明原因の実態を調査・把握するとともに、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・改善、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。

疫学調査：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、黄斑変性で、15年前の順位（糖尿病網膜症、白内障、先天性視覚障害、視神経・網膜脈絡膜萎縮の順）と比べて大きく変動していた。顕著に増加した疾患は、黄斑変性と緑内障性視神経萎縮であった。

加齢黄斑変性は、高齢者の失明原因として、著明に増加傾向にある。加齢黄斑変性の病態への炎症の関与を示唆するエビデンスとして、HTRA1プロモーター領域およびLOC387715遺伝子の一塩基多型（SNP）（rs11200638、rs10490924）の疾患リスクアレルを持つ場合、血清CRP濃度が上昇していた。これらの多型が炎症に関与することにより、本疾患の病態形成に関係している可能性が示唆された。

網膜色素変性：網膜色素変性の原因となる遺伝子変異の1つをウサギに導入することにより、進行性の網膜変性をおこす中型動物モデルの作成を試み、80匹中12匹がDNA検査にてトランスジェニック陽性であることが確認できた。今後、徐放剤などの評価をしていくうえで非常に有用と考えられる。

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たとともに、色素上皮由来因子PEDFの作用機序としてAIF(apoptosis-inducing factor)の核内移行阻害によることを証明できた。

また、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、フィーダー細胞非存在下でも、低分子化合物を用いることでの分化誘導に成功した。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すことができた。

神経萎縮：網膜神経幹細胞を利用した神経再生治療の開発を前提とし、網膜障害下の毛様体扁平部上皮における網膜神経幹細胞の分化・分布について検討した。網膜形成後も毛様体上皮に多数の神経前駆細胞が存在し、網膜形成後に網膜幹細胞より分化したものが含まれていた。さらにそれらの細胞が網膜内に移動することを示唆する結果を得た。本研究の成果は、毛様体内に存在する網膜神経幹細胞を利用した網膜疾患に対する神経再生治療の可能性を提起するものである。

【分担研究者】

新家 真（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（独協医大・WHO協力センター・主任）	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）

A. 研究目的

1. 疫学調査を行うことにより、時代により変化しつつある失明原因の実態を調査・把握し、今後の眼科医療における課題を明確にする。

2. 加齢黄斑変性(AMD)には炎症の関与が示唆されている。また AMD 発症に HTRA1 プロモーター領域および LOC387715 遺伝子の一塩基多型 (SNP) (rs11200638、rs10490924) が関連することが報告されている。今回はこれらの多型と血清 C-反応性蛋白(CRP)濃度の関連を検討する。

3. 網膜色素変性の原因となる遺伝子変異の1つを家兎に導入し、進行性の網膜変性をおこす中型動物モデルの作成を試みる。

4. ヒト ES 細胞からフィーダー細胞やタンパク質を用いず、低分子化合物を用いた網膜色素上皮 (RPE) および視細胞への分化誘導系の確立を試みる。

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の開発を前提とし、網膜色素変性モデル動物 retinal degeneration slow (rds)マウスにおけるカルシウム拮抗剤ニルバジピン長期投与による網膜変性遅延効果を明らかにする。

7. 網膜神経幹細胞を利用した神経再生治療の開発を前提とし、網膜障害下の毛様体扁平部上皮における網膜神経幹細胞の分化・分布について検索する。

B. 研究方法

1. 全国をブロック (88 調査時 8、現調査 6) に分け、1ブロックから1県または1指定都市を抽出して、身体障害者診断書・意見書に基づき、1年間の18歳以上の視覚障害新規認定者 (88 調査 2112 名、現調査 2034 名) について調査した。原因疾患が複数ある場合はその全部を原因疾患とした。

2. AMD は造影検査で脈絡膜新生血管を確認できた症例を対象とした。末梢血より DNA を抽出し、各多型の遺伝子型をダイレクトシーケンスにより決定した。また、ラテックス免疫比濁法を用い血清 CRP 濃度を測定した。各群内で各 SNP の遺伝子型、すなわち疾患リスクアレル (rs11200638 では A、rs10490924 では T) をホモ接合体またはヘテロ接合体で持つか、あるいは持たないかにより、血清 CRP 濃度の違いを比較した。

3. 国際的に中型実験動物として広く用いられている NZW 種ウサギの遺伝子ライブラリーからロドプシン遺伝子の全領域を含む BAC クローン (100-150kb のゲノム断片) を抽出し、ロドプシン遺伝子の 347 番目の Pro を Leu に置換した BAC transgene を作成し、ウサギの受精卵に注入した。その後偽妊娠処理した 17 匹の雌ウサギに合計 456 個

の受精卵を移植した。

4. サルおよびヒト ES 細胞をフィーダー細胞非存在下において血清不含培地中で浮遊培養を行い、細胞塊を形成させた。その細胞塊を poly-D-Lysine および Fibronectin、Laminin でコートした culture slide に播種し、免疫細胞化学、RT-PCR および電子顕微鏡により評価した。

5. 搭載遺伝子の発現期間や遺伝子導入による安全性を検討すべく、SIV (Simian Immunodeficiency Virus)-based lentivirus vector を用いて、神経保護因子である PEDF 遺伝子をカニクイザルの網膜下に投与した。術後、定期的に採血・採尿・バイタルサインを記録した。また、眼科的検査として細隙灯検査・眼底検査・蛍光眼底造影検査・網膜電図の記録を定期的に行った。

また、網膜由来細胞株 R28 を用い、血清除去によりアポトーシスを誘導し、recombinant PEDF の作用を検討した。さらに、SIV ベクターを用いて疾患モデル動物である RCS ラットの網膜下に遺伝子導入し、AIF(apoptosis-inducing factor)の細胞内局在を蛍光免疫染色にて確認し PEDF の神経保護効果のメカニズムについて検討した。

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 マウスを作成した。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。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、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をおこない転写レベルと翻訳レベルでの遺伝子発現を検討した。さらに網膜における発現局在につき免疫染色にて検討した。

7. 生後 3 日から生後 60 日までの先天性の網膜変性症を有する rd1 マウスに BrdU50~150mg/kg を腹腔内に投与し、その 3 時間後に眼球を採取した。眼球より作成した網膜凍結切片、flat-mount 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、視細胞前駆細胞の形態、分布を組織学的に解析した。

(倫理面への配慮)

疫学調査については個人の識別が不可能な状態で行われた調査で、いわゆる匿名化された連結不可能な情報にあたり個人情報保護法に定める定義の「個人情報」に該当しない。調査は「疫学研究に関する倫理指針」に基づいて行われた。

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 文部科学省・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。

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. 現調査の原因疾患第一位は緑内障 (20.9%)、第二位は糖尿病網膜症 (19.0%)、第三位は網膜色素変性 (13.5%)、第四位は黄斑変性 (9.3%) で、88 調査の糖尿病網膜症 (18.0%)、白内障 (15.9%)、先天性視覚障害 (15.4%)、視神経・網膜脈絡膜萎縮 (10.4%) の順位と比べて、原因疾患の順位はこの 15 年間で大きく変動していた。15 年前と比べて顕著な増加が見られた疾患は、黄斑変性 1.97 倍、緑内障 1.47 倍であり、顕著に減少した疾患は、白内障 0.21 倍、角膜疾患 0.59 倍であった。

糖尿病網膜症は 1 位から 2 位へと順位は落としたが、比率はむしろ 19% と 88 調査の 18% より上昇していた。網膜色素変性や高度近視の比率はあまり変化がなかった。

2. 血清 CRP 濃度の相乗平均値(mg/dl)は AMD 患者:0.093、黄斑疾患を持たない者 0.060 であった。AMD 患者では、rs11200638 のリスクアレルをヘテロもしくはホモ接合体で持つ群の血清 CRP 濃度平均値(mg/dl)は 0.101 で、持たない群の 0.064 よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。rs11200638 と rs10490924 の各々で、CRP 値最小群を基準としたリスクアレルの出現リスクの相対危険度 (95% 信頼区間) は、CRP 値最高群では 3.53 (1.05-11.8)、4.21 (1.28-13.9) であり、両多型とも血清 CRP 濃度の増加に伴いリスクアレルの出現リスクは有意な増加傾向を示した ($P < 0.05$)。

3. 移植した 17 匹中 12 匹が妊娠し、合計 80 匹の産仔を得た。DNA 検査にてトランスジェニック陽性であることが確認された 10 匹のファウンダーを生殖期 (約 12 週) まで

飼育して交配させ、F1 世代を得た。10 個のラインのうち 6 つのラインでトランスジェニック陽性 F1 個体を得た。この 6 ラインのうち 3 ライン (#7, #8, #16) が網膜電図と組織学検査によって進行性の網膜変性をおこなっていることがわかった。また変異遺伝子の発現量は、網膜変性のスピードにほぼ比例していた。

4. サルおよびヒト ES 細胞を Wnt シグナルの阻害タンパク質および Nodal シグナルの阻害タンパク質の存在下で浮遊培養し、その後接着培養すること (SFEB/DL) により、網膜前駆細胞への誘導に成功した。その後、多角形状の色素を有する細胞が多数観察され、RPE マーカーである RPE-65 の発現、タイトジャンクションの形成、ビーズの貪食能が認められた。さらに、retinoic acid、taurine (RA/T) を添加したところ、Crx 陽性の視細胞前駆細胞および錐体・杆体視細胞が観察され、光応答に必要な遺伝子の発現が認められた。低分子化合物を用いて Wnt シグナルおよび Nodal シグナルを阻害したところ、同様にヒト ES 細胞は RPE および視細胞へ分化した。

5. レポーター遺伝子ならびに治療遺伝子 (hPEDF) の発現は少なくとも 2 年間は維持されることが確認された。また、眼局所に重篤な合併症は認めなかった。さらに、全身的には多臓器不全などの重篤な副作用は観察されなかった。

PEDF は血清除去刺激による R28 のアポトーシスに対して保護作用を示した。この細胞死はカスパーゼ非依存的なアポトーシス誘導因子である AIF の発現を抑制す

ることで有意に抑制された。血清除去刺激による AIF の核内移行は、PEDF の投与により著明に抑制された。RCS ラットにおいても同様に、アポトーシスに陥った視細胞では AIF の核内移行が観察された。さらに、SIV ベクターを用いた PEDF 遺伝子発現により AIF の核内移行は著明に抑制され、視細胞のアポトーシスは有意に減少した。

6. ヘテロ rds マウスでは自然経過群ならびにコントロール群いずれも、200 日間で ERG の振幅が徐々に低下した。ニルバジピン投与群では、コントロール群および自然経過群と比べ、ERG 波形は a 波および b 波とも有意にその振幅が保たれていた。マイクロアレイ法による転写レベルでの遺伝子発現の検討では fibroblast growth factor(FGF)-13・22 および ciliary neurotrophic factor(CNTF)の亢進がみられ、蛋白発現の亢進も見られた。また、網膜色素変性の原因遺伝子として知られる *PRPF31* 遺伝子や *RPGR* 遺伝子などが 2 倍以上の転写亢進を示した。

7. 毛様体扁平部には多数の視細胞前駆細胞が存在することが確認された。生後 30 日の rd1 マウスの毛様体扁平部においては、同日齢の野生型マウスには見られない杆体視細胞前駆細胞の存在が認められ、リカバリン陽性細胞の数も野生型マウスに比べて約 30 倍多いことが判明した。これらのリカバリン陽性網膜神経前駆細胞のうち、網膜組織形成後の生後 12 日以降に新生されたと考えられるものは約 3%以上であると推測された。さらに、生後 12 日に BrdU を注射して分裂細胞をラベルし、生後 15 日と 30

日に眼球を回収して毛様体と周辺網膜における BrdU 陽性細胞の分布を組織学的に比較検討したところ、生後 30 日において、網膜内の BrdU 陽性細胞の数が有意に多かった。

D. 考察

1. 視覚障害の原因疾患の変遷は、これら疾患の原因となる諸要因の増減が直接的に関与することは言うまでもないが、高齢化に伴う人口ベースの変化、視覚障害となる基礎疾患の増減、治療・技術の進歩などが原因疾患の増減に大きな影響を与えている。1988 年から 2001~2004 年の約 15 年間の変遷で、本報告にみられる顕著な傾向は、高齢化の影響と、治療技術の進歩であろう。

糖尿病網膜症はベースの糖尿病患者の激増が報告されているにも拘わらずわずか 1%の増加に止まっている。この 15 年間の内科・眼科における治療技術の向上が大きく貢献していることは勿論であるが、内科と眼科の連携した協力が糖尿病に関してはより一般的になったことも看視できない。

2. 本研究により、rs11200638、rs11200638 の一塩基多型と血清炎症反応との関連が示唆された。よって、これらの多型は炎症に関与することを介して AMD の病態形成と関係している可能性があると考えられた。

3. これまで本邦ではラットより大きな動物の網膜変性モデルの系統が樹立されていなかった。今回、実際に日本人の網膜変性患者にも確認されているロドプシン P347L 変異をウサギに導入し、ウサギ種で進行性の網膜変性モデルを作成することに成功し

た。ウサギは眼球構造でヒトと異なる点はあるが、眼球サイズはヒトに近く、また扱いやすい動物である。細胞シート移植や人工視覚などの実験に用いる動物モデルとして役立つ可能性がある。

4. これまでのES細胞から視細胞への分化誘導は、発生期の網膜と共培養をすることにより行われており、既知組成培養条件下での視細胞への分化誘導は不可能であった。今回、発生期の網膜に含まれる視細胞への分化因子を探索した結果、retinoic acid および taurine が視細胞への分化を促進することを明らかにした。本分化誘導方法はiPS細胞においても有用と考えられる。今後、分化細胞の純化、機能解析、網膜変性モデル動物への移植を行う予定である。

5. これまでに、網膜変性モデルにおいて、カスパーゼの活性を阻害しても視細胞死に変化がなかったことが報告されている。一方AIFは、本検討に加え、別の遺伝子異常を有するrd1マウスにおいても視細胞死に重要な役割を担うことが報告されており、網膜変性疾患の病態に共通する経路である可能性が考えられた。さらに、本検討によりPEDFがAIFの核内移行を制御しアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

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. RCS ラットとヘテロ rds マウスでは同じ網膜変性でも重症度や進行度に差があり、

視細胞変性の分子機構にも差があるのではないかと考えられる。したがってこの考えによれば、今回の研究の結果を説明する機序として、網膜変性の原因遺伝子や網膜変性の重症度・進行度の違い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もあると考えられた。

7. 神経前駆細胞が時間とともに網膜側へ移動することが示唆されたことから、毛様体内に存在する網膜神経幹細胞を利用した網膜疾患に対する神経再生治療の可能性を提起する成果が得られた。

E. 結論

視覚障害の原因疾患に関する疫学像は、この15年間の医療・技術の進歩、高齢化の影響によって大きく変貌している。白内障などのように非神経組織の疾病に起因する失明は確実・著明に減少しているが、網膜以降の神経組織の障害に起因する視覚障害は依然として難治である。それでも、本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。

ヒトが生活していくうえで最大の情報源である視覚情報を失う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、一次予防を含めた低侵襲で価値ある治療法開発へむけて、当該研究を更に発展させねばならない。

Ⅲ. 分担研究報告

1. 日本人の正常眼における眼軸長の性別・年代別分布

野田佳宏¹⁾²⁾、安田美穂¹⁾、畑 快右¹⁾、野瀬善明²⁾

清原 裕³⁾、飯田三雄⁴⁾、石橋達朗¹⁾

(¹⁾九州大、²⁾九州大医療情報学、³⁾九州大環境医学、⁴⁾九州大病態機能内科学)

研究要旨 【背景・目的】日本人には近視が多く、また増加傾向にあると推測されているが一般住民における大規模な調査は少ない。白内障の影響を除いた実態を把握するべく正常眼における眼軸長について性別・年代別に検討する。

【対象】2005年に久山町住民健診を受診し、疫学調査に同意された40歳以上の男女1969名（男性：800名、女性：1169名）のうち、少なくとも片眼に角膜疾患および後眼部の眼疾患（糖尿病網膜症、高血圧性網膜症、網膜静脈閉塞症、黄斑前膜、黄斑萎縮、緑内障性視神経萎縮、加齢黄斑変性、黄斑円孔など）をもたず、かつ眼底写真、眼軸長が全て解析可能な精度で測定された1696名（全受診者の86.1%、正常眼の95.3%）を対象とした。

【方法】眼軸長の測定にはZeiss社のIOL Master™を用いた。

【結果】眼軸長の平均は男性で23.8mm、女性で23.4mmであった。年代別にみると40歳代は24.2mm、50歳代は24.1mm、60歳代は23.6mm、70歳代は23.3mm、80歳代以上では23.2mmであった。年代別に男女差を検討したところ50歳代以上では男性が有意に長眼軸であった。

【結論】日本人の正常眼における眼軸長は年代が若くなるにつれて長かった。また男性の方が眼軸は長いことがわかった。

A. 研究目的

屈折と眼疾患の関連は未知の領域が大きい。アジア人には近視が多く¹⁾、また増加傾向にあると推測されているが一般住民における大規模な調査は少ない^{1,2)}。また高齢者の屈折には白内障の影響を考慮する必要がある。眼軸長の測定は白内障の影響を受けにくい³⁾ため、高齢者の近視を把握するのに適した手段である。それらをふまえて、今回正常眼における眼軸長について性別・年代別に検討した。

B. 研究方法

【対象】2005年に久山町住民健診を受診し、疫学調査に同意された40歳以上の男女1969名（男性：800名、女性：1169名）を対象とした。そのうち、少なくとも片眼が網膜疾患、角膜疾患などの眼疾患をもたず、かつ眼底写真、眼軸長、身長が全て解析可能な精度で測定された1696名（全受診者の86.1%、正常眼の95.3%）を統計解析の対象とした。両眼が解析可能であった場合は、右眼のデータを用いた。

【方法】

《眼底写真》トプコン社無散瞳眼底カメラ