

factor- α (TNF- α) を Cytometric bead array 法で測定し、群間比較を Mann Whitney-U 検定を用いて行った。

(倫理面への配慮)

Avt、TA 投与、及び患者硝子体の使用は鹿児島大学病院倫理委員会の承認の元に行った。

C. 研究結果

Avt 群での free VEGF 濃度 (18.5pg/ml) は Control 群 (1266.8pg/ml)、TA 群 (568.9pg/ml) のいずれと比較しても有意に低値であり ($P < 0.01$)、Avt 群と同様に TA 群においても低い傾向は見られたが、有意差は認められなかった。一方、SDF-1 濃度は Avt・TA 両群で Control 群より有意に低値であった ($P < 0.05$) が、Avt 群-TA 群間では有意差を認めなかった。その他のサイトカインについては、いずれも有意差を認めなかった。

D. 考察

眼内血管新生疾患に対して、Avt を初めとした抗 VEGF 薬の有効性が多数報告されている。また Avt 投与後、眼内 VEGF 濃度が極端に低下することが報告されている。この研究では、ELISA を用いて VEGF 濃度を評価しており、free の VEGF レベルが低下している可能性が示唆されている。Avt 硝子体内投与においては、Avt に捕捉された VEGF の動態を含めた、より詳細なサイトカインレベルでの変化が起こっている可能性がある。今回我々は、Avt・TA 投与における VEGF を含めたサイトカイン濃度について比較検討した。その結果、TA 群においても Avt 群ほどではないが、VEGF は低値となる傾向が

あることを見出した。また SDF-1 は VEGF と異なる血管新生因子として注目されているが、Avt 群、TA 群ともに有意に低値であった。他のサイトカインについては有意差を認めなかったが、Avt 投与によるサイトカインの変化と TA 投与による変化とは異なっている可能性が示唆された。今後さらに多数例で検討することで、眼内における抗血管新生療法の作用メカニズムの解明や治療法の改良へと繋がるものと考えられる。

E. 結論

硝子体手術前補助療法としての Avt、TA 硝子体内投与は、硝子体中サイトカイン濃度に異なる影響を与え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

投稿予定

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. Sawada O et al: Arch Ophthalmol 125:1363-1366, 2007.

2. Avery RL et al: Ophthalmology
113:1695-1705, 2006.

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

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
(大阪大)

研究要旨 加齢黄斑変性に伴う脈絡膜新生血管など、VEGF が関与すると考えられる疾患を対象として、抗 VEGF 抗体 bevacizumab 硝子体内投与が施行されている。我々は大阪大学医学部附属病院で bevacizumab 1mg の硝子体内投与を施行された 1029 症例（総投与数 2163）について投与施行後に発生した眼および全身性合併症を調査した。眼合併症は 12 例（1.2%）、全身合併症は 10 例（1.0%）に認められ、眼合併症の内訳は、角膜びらん 2 例、結膜浮腫 2 例、水晶体損傷 1 例、ぶどう膜炎 3 例、網膜色素上皮裂孔 1 例、急激な視力低下 1 例、網脈絡膜変性の急激な進行 1 例、細菌性眼内炎 1 例、全身合併症の内訳は、脳梗塞 1 例、高血圧 2 例、顔面皮膚発赤 1 例、広範囲湿疹 1 例、下肢静脈血栓 1 例、生理不順または不正性器出血 4 例であった。投与前、発症しうる合併症についての十分な説明が必要であることは当然のことであるが、今後症例の選択についても十分な検討を行い、安易な抗 VEGF 抗体硝子体内投与の施行は慎むべきであると考えられた。

A. 研究目的

VEGF が関与すると考えられる眼疾患を対象として、抗 VEGF 抗体 bevacizumab 硝子体内投与が施行されており、現在、当院をはじめ、各施設における症例数は増加の一途をたどっている。今回我々は bevacizumab 投与後に発生した眼および全身性合併症を経験したので報告する。

B. 研究方法

大阪大学医学部附属病院で bevacizumab 1mg の硝子体内投与を施行された 1029 症例（総投与数 2163）について、施行後 2 ヶ月以内に生じた眼および全身性合併症の有無を調査した。

症例の平均年齢は 63.7±15.3 歳、男性

562 名、女性 467 名であった。また、病型の内訳は、加齢黄斑変性等に伴う脈絡膜新生血管 662 例、網膜中心静脈閉塞症等に伴う黄斑浮腫 200 例、増殖糖尿病網膜症等網膜新生血管 119 例、血管新生緑内障 44 例、その他 4 例であった。

本薬の使用に関しては全症例に対してインフォームドコンセントおよび当院先進医療審査会の承認を得た。

C. 研究結果

眼合併症は 12 例（1.2%）、全身合併症は 10 例（1.0%）に認められた。

眼合併症として、角膜びらん 2 例（0.19%）、結膜浮腫 2 例（0.19%）、水晶体損傷 1 例（0.10%）、ぶどう膜炎 3 例（0.29%）、

網膜色素上皮裂孔 1 例 (0.10%)、急激な視力低下 1 例 (0.10%)、網脈絡膜変性の急激な進行 1 例 (0.10%)、細菌性眼内炎 1 例 (0.10%) を認めた。

全身合併症として、脳梗塞 1 例 (0.10%)、高血圧 2 例 (0.19%)、顔面皮膚発赤 1 例 (0.10%)、広範囲湿疹 1 例 (0.10%)、下肢静脈血栓 1 例 (0.10%)、生理不順または不正性器出血 4 例 (0.39%)、を認めた。

脳梗塞の 1 例、および高血圧の 1 例は、それぞれの既往のある患者に発症したが、その他の全身合併症については、bevacizumab 投与後発症したものであった。

D. 考察

Bevacizumab 硝子体内投与後、眼合併症、全身性合併症を認めた。動物研究にて硝子体内投与後、微量ではあるが、全身血液中に bevacizumab を認めたとする報告があることから、全身性の合併症が生じる可能性は十分考えられ、投与前、発症しうる合併症についての十分な説明が必要であることは当然のことであるが、今後症例の選択についても十分な検討を行い、安易な抗 VEGF 抗体硝子体内投与の施行は慎むべきであると考えられた。

E. 結論

Bevacizumab 硝子体内投与後、眼合併症、全身性合併症が生じ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

1. 島 千春、坂口裕和、日下俊次、瓶井資弘、生野恭司、沢美喜、辻川元一、大島佑介、五味文、田野保雄：抗 VEGF 抗体 Avastin®硝子体内投与後に発生した眼および全身性合併症。第 111 回日本眼科学会総会、大阪、2007.
2. Shima C, Skaguchi H, Gomi F, et al. Systemic and Ocular Adverse Events Following Intravitreal Injection of Bevacizumab. ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, 2007.

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. Shima C, Sakaguchi H, Gomi F, et al: Complications in patients after intravitreal injection of bevacizumab. Acta Ophthalmol Scand. Nov 17, 2007 [Epub ahead of print]
2. Gomi F, Sawa M, Sakaguchi H, et al: Efficacy of Intravitreal bevacizumab for polypoidal choroidal vasculopathy. Br J Ophthalmol. Jun 18, 2007 [Epub ahead of print]

3. Sakaguchi H, Ikuno Y, Gomi F, et al:
Intravitreal injection of bevacizumab
for choroidal neovascularisation
associated with pathological myopia.
Br J Ophthalmol 91(2):161-165, 2007
4. Gomi F, Nishida K, Oshima Y, et al:
Intravitreal bevacizumab for
idiopathic choroidal
neovascularization after previous
injection with posterior subtenon
triamcinolone. Am J Ophthalmol
143(3):507-510, 2007

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

伊藤愛子、櫻井英二、平野佳男、板谷正博、小椋祐一郎
(名古屋市大)

研究要旨 糖尿病網膜症と加齢黄斑変性は本邦での失明原因の主要疾患であるが、臨床的には糖尿病網膜症と加齢黄斑変性との合併は少ないとの報告もある。そこで今回ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスにレーザー誘発の脈絡膜新生血管 (CNV) を作成し対照と比較検討した。雄の生後約8週C57BL/6JマウスにSTZを100mg/kg (STZ100)、200mg/kg (STZ200) 投与し糖尿病マウスを作成した。STZ導入後2週目にレーザー網膜光凝固を行い、その1週間後に眼球摘出し、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の面積を測定し対照と比較検討した。また、対照および糖尿病マウスの網膜色素上皮-脈絡膜のICAM-1およびVEGFの発現量をELISA法により測定した。すべての実験動物の血糖を測定した。血糖は対照が 169.5 ± 78.3 mg/dl、STZ100群が 209.05 ± 70.6 mg/dl、STZ200群が 435.68 ± 227.0 mg/dlであった。CNVの面積は、対照が $2.86 \pm 1.42 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 、STZ100mg/kg投与群は $5.57 \pm 2.46 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ($P < 0.01$ vs control)、STZ200mg/kgは $5.79 \pm 4.34 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ($P < 0.01$ vs control)と糖尿病マウスでは有意にCNVが大きかった。網膜のICAM-1およびVEGFの発現量は対照に比較して有意に亢進していた。レーザー誘発CNVモデルにおいて、糖尿病は有意にCNVを増大させた。機序として感覚網膜および網膜色素上皮におけるICAM-1、VEGFの発現亢進の影響が考えられた。

A. 研究目的

本邦で糖尿病網膜症は主要な失明原因である。加えて近年、加齢黄斑変性も増加傾向にある。

糖尿病状態では網膜におけるVEGFおよびICAM-1は過剰発現^{1, 2)}しているにも関わらず臨床的に糖尿病網膜症と加齢黄斑変性は合併しにくいとの報告もある。基礎的な実験データも少なため、ストレプトゾトシン糖尿病マウスに対し、レーザー誘発の脈絡膜新生血管を作成して対象と比較検討した。

B. 研究方法

雄の6-8週C57BLに対しストレプトゾトシン100mg/kgあるいは200mg/kgを腹腔内投与を行い、糖尿病を発症させた。網膜レーザー光凝固 (200mW、75 μm 、100 ms、532 nm) を行った。網膜レーザー光凝固後1週間後に血糖測定の後、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の体積を測定し対照と比較検討した。また対照および治療群のVEGFあるいはICAM-1の発現を比較検討するため、多数のレーザー光凝固 (20発) をそれぞれの眼に行い、3日後に

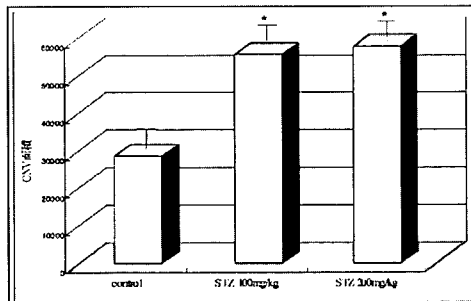
眼球を取り出しそれぞれの群をELISAにより測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験の取り扱いにはARVOに準じた。

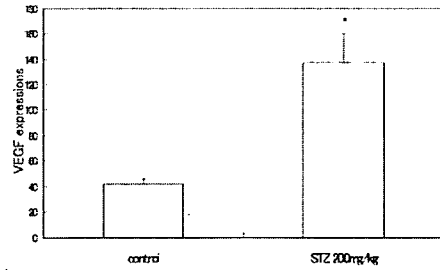
C. 研究結果

血糖は対照が 169.5 ± 78.3 mg/dl、STZ100群が 209.05 ± 70.6 mg/dl、STZ200群が 435.68 ± 227.0 mg/dlであった。CNVの面積は、対照が $2.86 \pm 1.42 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 、STZ100mg/kg投与群は $5.57 \pm 2.46 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ($P < 0.01$ vs control)、STZ200mg/kgは $5.79 \pm 4.34 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ($P < 0.01$ vs control)と糖尿病マウスでは有意にCNVが大きかった。(図1)。網膜色素上皮細胞-脈絡膜におけるVEGFの発現は対照が 41.8 ± 4.5 pg/ml/protein、STZ200が 137.5 ± 23.4 pg/ml/proteinで(図2)、ICAM-1の発現は対照では 18.1 ± 2.4 pg/ml/protein、STZ200は 50.4 ± 4.3 pg/ml/proteinであった。(図3)。



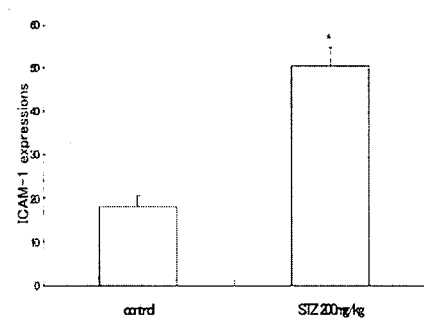
* $P < 0.01$, $n = 30$ for all group

図1 糖尿病マウスにおけるCNV面積 (um²) 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。



* $P < 0.01$, $n = 8$ for all group

図2 正常網膜およびSTZ200m/kg投与群の網膜色素上皮-脈絡膜におけるVEGF発現量 (pg/mg protein) STZ 200mg/kg 投与群は有意に過剰発現を認める。



* $P < 0.01$, $n = 8$ for all group

図3 各群の網膜色素上皮-脈絡膜におけるICAM-1発現量 (pg/mg protein) STZ 200mg/kg 投与群は有意に過剰発現を認める。

D. 考察

ストレプトゾトシン糖尿病マウスの網膜における Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) および Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)が過剰発現していると報告^{1,2)}されている。また、脈絡膜新生血管の発症進展も VEGF³⁾が深く関与しており臨床的にも抗 VEGF 療法が広く用いられるようになった。また ICAM-1 をノックアウトしたマウスでは脈絡膜新生血管発

症⁴⁾。は抑えられるため、脈絡膜新生血管進展に ICAM-1 は深く関わっていると考えられている。レーザー誘発脈絡膜新生血管の発症機序は、ブルッフ膜・網膜色素上皮層の破壊によるバリアー機能の破綻、同部位の局所炎症、それに引き続き起こる白血球の遊走、それに伴う VEGF の発現によるものと考えられている。

直接臨床と結び付けられないが糖尿病網膜症患者で脈絡膜新生血管を併発した場合、増強効果がある可能性も示唆された。

E. 結論

レーザー誘発 CNV モデルにおいて、糖尿病は有意に CNV を増大させた。機序として感覚網膜および網膜色素上皮における ICAM-1、VEGF の発現亢進の影響が考えられた。

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

1. Miyamoto K et al: Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A. 14; 96: 10836-10841, 1999
2. Masuzawa K et al: Effect of endothelin dual receptor antagonist on VEGF levels in streptozotocin-induced diabetic rat retina. Exp Biol Med. 231: 1090-1094, 2006
3. Kwak N et al: VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 41:3158-3164, 2003.
4. Sakurai E et al: Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44:2743-2749, 2003.

9. 血管新生の形態と骨髄細胞の関与

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
(京都大)

研究要旨 加齢黄斑変性 (AMD) に伴う脈絡膜血管新生 (CNV) にはいくつかの特徴的形態があることが知られるようになった。特にポリープ状脈絡膜血管症 (PCV) は他の CNV には見られない特徴的な血管形態を示し、AMD の一型とされているものの、その異同がしばしば議論となる。また、PCV 欧米より日本人を含めたアジア人に多く見られ、治療に対する反応性、自然予後も特徴的であることが知られるようになってきた。PCV、AMD のより深い理解は日本人における加齢黄斑変性を考える上で重要であり、そのために血管新生についてより深い理解が必要と考える。本研究では網膜、脈絡膜における血管新生の形態について、動物モデルによって分類・解析し、新生メカニズムの違いについて考察し、新生血管形態が同一組織であっても異なり、骨髄由来細胞がそのメカニズムの一端となっている可能性が示された。

A. 研究目的

網膜血管新生モデルを用い、異なる血管新生形態に骨髄細胞がどのように関与するかを検討する。

B. 研究方法

未熟児網膜症マウス網膜血管新生 (ROP) モデル、VLDLR (very low density lipoprotein receptor) ノックアウトマウスを用い、網膜血管新生の異なる形態を2つに分類、解析した。ROP モデル高酸素負荷直後 P12 に放射線照射し骨髄機能を抑制した。照射条件、方法は体重、白血球数、赤血球数をモニタリングして決定し、鉛を用いて頭部保護を行った。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

低酸素網膜症モデル、VLDLR ノックアウトモデル、レーザー脈絡膜血管新生モデルを用いて血管形態を検討し、網膜血管新生を樹状突起 (filopodia) を伸ばしながら直線的に伸長するもの (網状) と、先端が瘤状塊を形成してしまうもの (瘤状) に大きく分類した。放射線により体重、赤血球数は変化がなかったが、白血球数、骨髄幹細胞機能 (コロニー形成能) は有意に減少し、骨髄由来前駆細胞群の機能を特異的に低下させることが出来ることが示された。この条件で ROP を作成すると放射線照射したマウス網膜ではコントロールに比べ、網状血管新生は有意に抑制されたが、瘤状血管新生は抑制されず、むしろ増加した。

D. 考察

同じ組織での血管新生であっても形態が異なるものがある。それらは異なるメカニズムでコントロールされている可能性が示唆される。骨髄由来幹細胞はそれらの血管コントロールの相違にある役割があると考えられた。

E. 結論

骨髄由来細胞が血管新生に関与することが明らかになりつつあるが、その関与は同じ血管新生でも血管新生の条件、形態により異なる可能性が示された。骨髄細胞の網膜、さらに脈絡膜血管新生疾患への関与は単純ではないことが示唆された。

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

I. 参考文献

1. Yodoi Y, Sasahara M, Kameda T, Yoshimura N, Otani A: Circulating

hematopoietic stem cells in patients with neovascular age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 48:5464-5467, 2007

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

大島佑介¹⁾、王 蔚¹⁾、山名 慶²⁾、鈴木三保子¹⁾、佐藤達彦¹⁾、田野保雄¹⁾

(¹⁾ 大阪大、²⁾ 帝人ファーマ(株)生物医学総合研究所)

研究要旨 我々は無血管組織である眼球の角膜や水晶体、さらには結合組織の腱や靭帯に、硝子体や軟骨組織に存在する血管新生抑制因子 (コンドロモジュリン) のC末端機能ドメインに高い相同性を有する 45kD の膜貫通型タンパクであるテノモジュリン (TeM) が存在することを見出した。今回、TeMのC末端機能ドメインを含むsTeMのリコンビナント(rsTeM)を精製し、網膜新生血管に対する生理活性を検討した。大腸菌 (*E. coli*) より精製回収した rsTeM はヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) ならびに網膜血管内皮細胞 (HREC) の VEGF 刺激下の DNA 合成能を抑制し、管腔形成作用も有意に阻害した。さらに rsTeM を硝子体内投与したマウス (C57BL/6) 未熟児網膜症 (ROP) モデルにおいては、非投与群に比較して、血管新生の発生が抑制され、無灌流領域の面積は rsTeM 投与群で有意に ($p < 0.001$) 減少していたことから、rsTeM は眼内血管新生を抑制する効果があり、眼内血管新生疾患に対する硝子体注入薬としての可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は以前にマウスの無血管組織である眼球の角膜、強膜や水晶体、さらには結合組織の腱や靭帯に、硝子体や軟骨組織に存在する血管新生抑制因子 (コンドロモジュリン: ChM-I) のC末端機能ドメインに高い相同性を有する 45kD の膜貫通型タンパクであるテノモジュリン (TeM) が存在することを見出した¹⁻⁶⁾。その後、TeM には 16kD の分泌型タンパク (sTeM) も存在することが判明し、TeM は ChM-I に同じく無血管組織の恒常性の維持、すなわち、血管侵入の阻止に関わっている可能性がある。

今回、TeM のC末端機能ドメインを含むsTeMのリコンビナント(rsTeM)を精製し、網膜新生血管に対する生理活性を検討したので報告する。

B. 研究方法

ヒト TeM タンパクのC末端アミノ酸配列 (237-317) をコードする塩基配列を組み込んだトランスフェクションベクター (pET30) を大腸菌 (*E. coli*) に遺伝子導入し、産生された分泌型リコンビナント (rsTeM) をアフィニティーカラムにて精製回収し、エンドトキシン除去処理を行った。ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) ならびに網膜血管内皮細胞 (HREC) に対する rsTeM の生理活性の定量測定を行った。血管内皮細胞のDNA合成能の評価にはBrdU取込試験を行い、*in vitro* の血管形成モデルとして、マトリジェル内における血管内皮細胞による管腔形成試験を行い、NIH image ソフトにて管腔形成の長さを定量的に測定した。いずれのアッセイも血管内皮増殖因子

(VEGF) 刺激下 (100ng/mL) での rsTeM の濃度依存的な抑制効果の有無を検討した。血管新生動物モデルには高圧酸素負荷 (75%酸素) によるマウス (C57BL/6) 未熟児網膜症 (ROP) モデルを用い、胎生後4日 (P7) の段階で、rsTeM (1 μ g/0.5 μ l) を32ゲージ針にて硝子体内注入を行い、対照としてもう片眼にはPBSを同じく0.5 μ l硝子体内投与を行った。

P12の時点で、マウスを麻酔下にてフルオレセインデキストランによる網膜灌流を行ったのち安楽死させ、眼球摘出を行い、フラットマウントならびに組織切片にて網膜無血管領域の面積ならびに硝子体内への血管新生の発芽の程度を検討した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験はヘルシンキ宣言の精神に基づいて行われている。

C. 研究結果

rsTeM (16kD) はVEGF刺激によるHUVECとHRECのDNA合成能を有意 ($p < 0.01$) に抑制した (図1)。

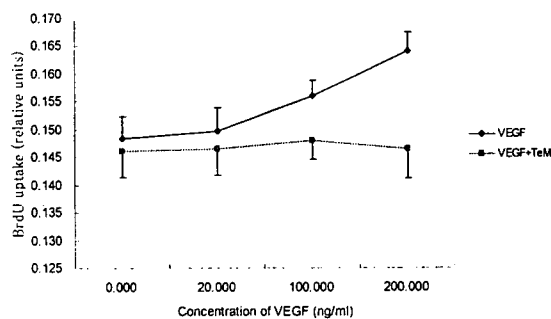


図1 rsTeM にHRECのDNA合成抑制

VEGF刺激によるHRECのDNA合成能はrsTeM (1 μ g/mL) 存在下では、有意に抑制されている

またVEGF刺激による血管内皮細胞の管腔形成を dose-dependent に阻害した (図2A, B)。

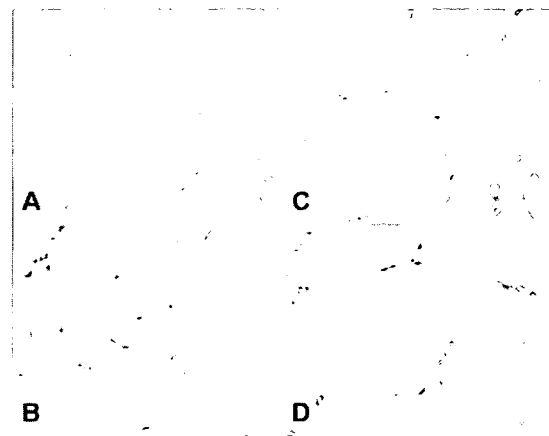


図2 HRECによる管腔形成

A) VEGF (100ng/mL) による刺激のみ、B) rsTeM (10ng/mL)、C) rsTeM (100ng/mL)、D) rsTeM (1 μ g/mL) 添加下による管腔形成

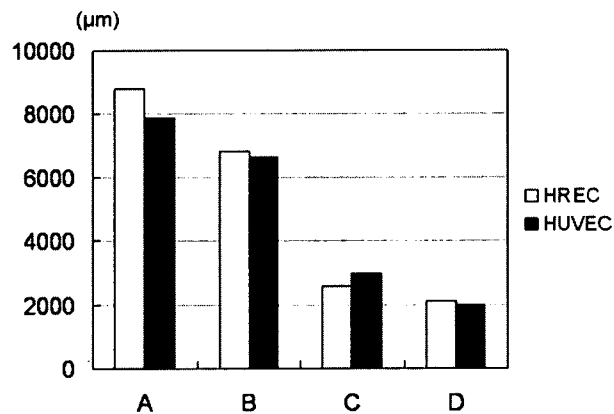
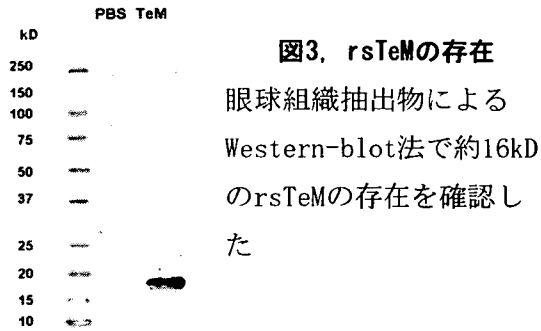


図2B, HRECおよびHUVECの管腔形成の測定

A) VEGF (100ng/mL) による刺激のみ、B) rsTeM (10ng/mL)、C) rsTeM (100ng/mL)、D) rsTeM (1 μ g/mL) 添加下による管腔形成。rsTeM 添加群 B~D) はいずれも対象群A) に比べて有意に管腔形成が抑制された ($p < 0.01$)。

一方、rsTeM (1 μ g/0.5 μ l) を硝子体内注入したマウスROPモデルの眼球組織の抽出物から確かに約16kDのrsTeMが存在したことがWestern-blot法にて確認され (図3)、

rsTeMを硝子体内注入したマウスROPモデルでは、対照群(PBS投与群)に比較して、血管新生の発生が抑制され、無灌流領域の面積(図4A, B)はrsTeM投与群で有意に減少していた($p < 0.001$)。



A) 正常マウス, B) PBS注入のROPモデルマウス, C) rsTeM (1 μ g/0.5 μ L) 硝子体内注入のROPモデルマウス. 赤ラインは無血管野(無灌流野)を囲んでいる。

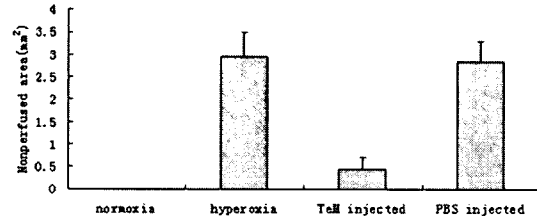


図4B, 無血管野面積の比較



図4A, マウス (P7) 網膜フラットマウント

rsTeM (1 μ g/0.5 μ L) を硝子体内投与したROPモデルは無注入群(hypoxia)や対象群(PBS注入)に比べて無血管野の面積が有意に少なかった($p < 0.001$)。

網膜切片における単位面積当りの硝子体腔内への新生血管の発芽もrsTeM投与群で有意に($p < 0.01$)減少していた(図5A, B)。

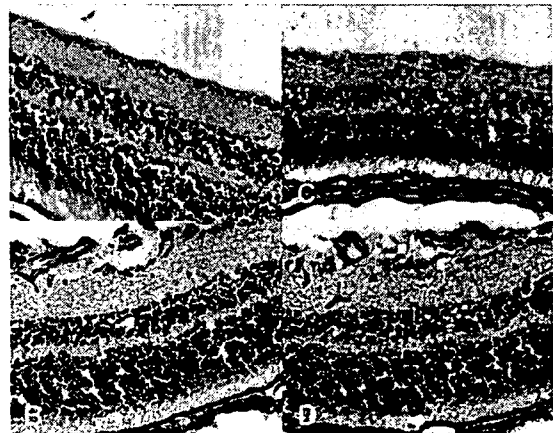


図5A, マウス (P7) 網膜切片

A) 正常マウス, B) ROPモデルマウス, C) rsTeM (1 μ g/0.5 μ L), D) PBS注入の硝子体内注入のしたROPモデルマウス.

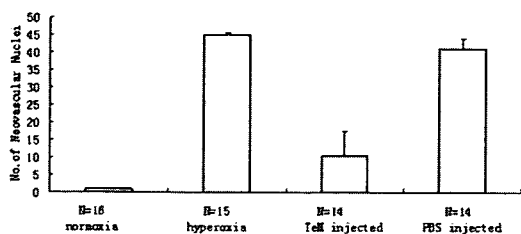


図5B. 硝子体腔内への新生血管の発芽

単位面積あたりの硝子体腔内への新生血管の発芽を血管内皮細胞核で定量的に測定.

N=測定切片数. rsTeM (1 μ g/0.5 μ L) を硝子体内投与したROPモデルは無注入群

(hypoxia) や対象群 (PBS注入) に比べて硝子体腔内への新生血管の発芽が有意に少なかった ($p < 0.001$).

D. 考察

我々の以前の研究から ChM-I および TeM の C 末端塩基配列が非常に高い相同性を有することで、当該タンパクの機能ドメインであることを推測し、実際にアデノウイルスベクターによる遺伝子導入によって一過性に発現した分泌型 C 末端ドメインタンパクが血管内皮細胞の増殖ならびに接着能を阻害し、さらにはメラノーマ腫瘍塊における栄養血管の抑制を介した抗腫瘍効果があることを示した⁵⁾。今回は実際に精製した無糖鎖の C 末端機能ドメインを含むリコンビナントタンパクの血管新生に対する生理活性を *in vitro* と *in vivo* の両面から確認することができ、すなわち、TeM の C 末端機能ドメインを含むリコンビナントタンパクは有意に血管内皮細胞の増殖や管腔形成を阻害し、実際の ROP モデルにおいても血管新生や無血管野形成を有意に抑制したことが証明された。

現在のところ、C 末端機能ドメインが

VEGF を介する血管新生を抑制できる分子メカニズムがまだ明らかにできていないが、生理的に存在する血管新生抑制物質 (ChM-I や TeM) による抗血管新生治療への応用は、より副作用の少ない創薬となること可能性が期待できる。血管新生抑制する分子メカニズムの解明と硝子体腔内やテノン囊などへの局所投与による組織への副作用の検討を継続的に行うことが今後の課題と思われる。

E. 結論

rsTeM は眼内血管新生を抑制する効果があり、眼内血管新生疾患に対する新たな硝子体注入薬としての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

投稿中

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

- Shukunami C, Oshima Y, Hiraki Y: Identification and expression of tenomodulin, a novel

- chondromodulin-I related gene.
 Biochem. Biophys. Res. Commun.
 280:1323-1327, 2001
2. Funaki H, Sawaguchi S, Yaoeda K,
 Koyama Y, Yaoita E, Funaki S,
 Shirakashi M, Oshima Y, Shukunami
 C, Hiraki H, Abe H, Yamamoto T:
 Expression and localization of
 angiogenic inhibitory factor,
 chondromodulin-I, in adult rat eye.
 Invest Ophthalmol Vis Sci 42:
 1193-1200, 2001
 3. Sachdev SW, Dietz UH, Oshima Y,
 Knapik EW, Hiraki Y, Shukanami C.
 Sequence analysis of zebrafish
 Chondromodulin-I and expression
 profile in the notochord and
 chondrogenic regions during
 cartilage morphogenesis. Mech. Dev.
 105:157-162, 2001
 4. Oshima Y, Shukunami C, Honda J,
 Nishid K, Tashiro F, Miyazaki J,
 Hiraki Y, Tano Y: Expression and
 localization of Tenomodulin, a
 transmembrane type
 Chondromodulin-I related angiogenic
 inhibitor, in mouse eyes. Invest
 Ophthalmol Vis Sci.44:1814-1823,
 2003
 5. Oshima Y, Sato K, Tashiro F,
 Miyazaki JI, Nishida K, Hiraki Y,
 Tano Y, Shukunami C:
 Anti-angiogenic action of the
 C-terminal domain of tenomodulin
 that shares homology with
 chondromodulin-I. J Cell Sci
 117:2731-2744, 2004
 6. Shukunami C, Oshima Y, Hiraki Y.
 Chondromodulin-I and tenomodulin:
 A new class of tissue-specific
 angiogenesis inhibitors found in
 hypovascular connective tissues.
 Biochem Biophys Res Commun
 333:299-307, 2005

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

石川桂二郎¹⁾、吉田茂生¹⁾²⁾、樋口直美¹⁾、石橋達朗¹⁾

中村崇徳³⁾、新納宏昭⁴⁾、赤司浩一⁴⁾

(¹⁾九州大、²⁾福岡大筑紫、³⁾九州大教育・研究支援センター、⁴⁾九州大遺伝子細胞療法部)

研究要旨 糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症などの網膜血管新生病では、虚血が前駆病変であり、その病態には VEGF や MCP-1 など、いくつかの関連分子が報告されているが、詳細は明らかでない。今回、酸素負荷網膜症モデルマウス網膜での包括的遺伝子発現解析を行った。生後 7 日目のマウスを 75%酸素濃度下で 5 日間飼育し、酸素負荷網膜症モデルを作製した。75%酸素暴露直後の網膜（高酸素網膜）、暴露終了 12 時間後の網膜（虚血網膜）および対照網膜から RNA を抽出し、逆転写後に biotin ラベルした cRNA を作製した。Illumina 社製マイクロアレイにハイブリダイズ、洗浄、スキャン後、各遺伝子発現を数値化し、GeneSpring を用いて、データ解析を行った。対照網膜と高酸素網膜の比較では、免疫やクロマチン関連遺伝子などの発現レベルの変動を認めた。一方、虚血網膜と高酸素網膜の比較では、Vegfa に加えて、解糖系、免疫やアポトーシス関連遺伝子の発現レベルが変化した。これらの抽出遺伝子の一部は、網膜血管新生に関わる可能性が示唆された。

A. 研究目的

糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症などの網膜血管新生病では、虚血が前駆病変であり、その病態には VEGF や MCP-1 など、いくつかの関連分子が報告されているが、詳細は明らかでない。今回、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での包括的遺伝子発現解析を行い、酸素変動に伴い変動する遺伝子の抽出を試みた。

B. 研究方法

生後 7 日目のマウスを 75%酸素濃度下で 5 日間飼育し、酸素負荷網膜症モデルを作製した^{1,2)}。75%酸素暴露直後の網膜（高酸素網膜）、暴露終了 12 時間後の網膜（虚血網膜）および対照網膜から total RNA を抽出

し、逆転写後に biotin ラベルした cRNA を作製した。Illumina 社製マイクロアレイにハイブリダイズ、洗浄、スキャン後、各遺伝子発現を数値化し、GeneSpring を用いて、データマイニングを行った(図 1)。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いにあたっては、ARVO の動物取り扱いガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

本モデルマウス網膜において、酸素変動に反応して種々の機能遺伝子群の発現レベルが変化することを確認した(図 2)。本解析で、Vegfa の発現比は、対照、高酸素網膜、虚血網膜で 1 : 0.78 : 1.48 の動態を示し、我々の以前のノーザンブロットによる解析

結果と合致した³⁾。高酸素網膜では対照に比べ、免疫やクロマチン関連遺伝子などの発現レベルの変動を認めた。一方、虚血網膜では、高酸素網膜に比べ、解糖系、免疫やアポトーシス関連遺伝子の発現レベルが変化した。

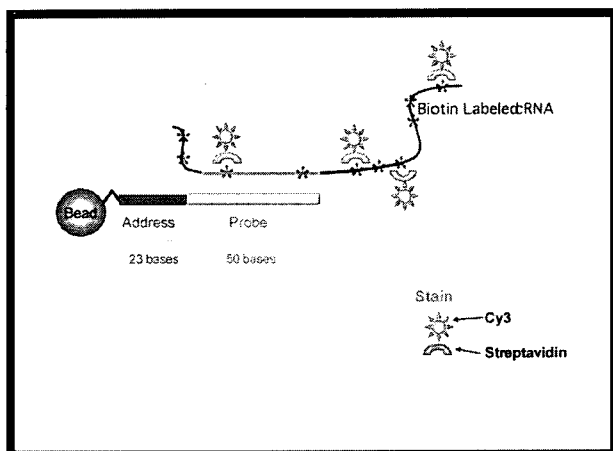


図1 Illumina Sentrix BeadChip Array

D. 考察

本マイクロアレイシステムを用いることで、VEGF や STAT3⁴⁾ など既報告の遺伝子に加え、これまでに報告されていない遺伝子の変動を確認できた。これらの抽出遺伝子群の構造と機能を詳細に検討することで、虚血網膜における新たな分子シグナル経路を明らかにできる可能性があると考えられた。

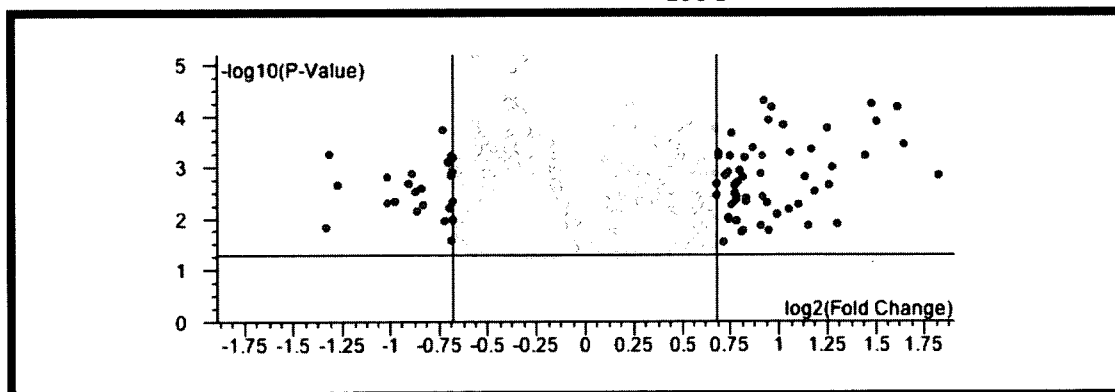


図2 Gene SpringGXによるデータ解析 : volcano plot(虚血網膜 vs 高酸素網膜)

E. 結論

抽出遺伝子の一部は、網膜血管新生に関わ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

I. 参考文献

1. Smith L E, et al: Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 35(1):101-111, 1994

2. 吉田茂生, 他: In vivo 血管新生モデル.
血管新生と疾患. 最新医学
53(11):59-64
3. Yoshida S, et al: Role of MCP-1 and
MIP-1 α in retinal neovascularization
during postischemic inflammation in
a mouse model of retinal
neovascularization. *Journal of
Leukocyte Biology* 73:137-144, 2003
4. H.Mechoulam, et al: Expression and
Activation of STAT3 in
Ischemia-Induced Retinopathy.
Invest Ophthalmol Vis Sci
46(12):4409-4416, 2005

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

佐藤達彦¹⁾、日下俊次¹⁾、橋田徳康²⁾、西信良嗣²⁾、不二門尚¹⁾、田野保雄²⁾
(¹⁾大阪大感覚機能形成学、²⁾大阪大感覚器外科学)

研究要旨 未熟児網膜症 (ROP) は、網膜血管の未熟性を基盤に発症する眼内血管新生病である。Terry による最初の報告以来¹⁾、半世紀以上経過しているが、未だその病態に関するメカニズムは完全に解明されておらず、失明児を完全になくすに至っていない。そればかりか、近年の周産期医療の発達に伴い、きわめて未熟な児でも生存可能となり、厚生省分類 II 型に相当する重症未熟児網膜症症例が増加しており、ROP の病態解明は急務となっている。

今回我々は、ROP モデルマウスにおいて包括的遺伝子解析を行い、その発現パターンと臨床経過との相関について調べた結果、特徴的なくつかの遺伝子発現パターンが得られた。

A. 研究目的

ROP モデルマウスにおいて包括的遺伝子解析を行い、遺伝子発現パターンと臨床経過の相関について調べること。

B. 研究方法

既報に準じて²⁾、C57BL/6N マウスを生後 7 日目から 5 日間 75%酸素下で飼育して、ROP モデルマウスを作製した。ROP モデルマウスの臨床経過を評価する為、生後 12 日目から 21 日目までの 10 日間、FITC デキストランを灌流した網膜フラットマウントを、既報に準じた³⁾スコアリングシステムを用いて評価した。次に、遺伝子レベルでの経時変化を調べる為、生後 17 日の ROP モデルマウスとコントロールマウスの網膜サンプルを用いて、マイクロアレイ解析を行い、その結果から選択した 96 種類の遺伝子について、TaqMan® low-density array (TLDA) を用いてリアルタイム PCR を行った。さら

に得られた結果について階層的クラスター解析を行い、遺伝子発現パターンと臨床経過の相関について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪大学実験動物倫理審査委員会の承認を得て、また、ARVO 憲章に基づいて行われている。

C. 研究結果

網膜フラットマウントの経時変化を評価した結果、中心無血管野及び中心血管収縮は生後 12 日目 (高濃度酸素負荷から開放された直後) に最も顕著で、以降、徐々に寛解した。血管の蛇行は生後 12 日目、13 日目には目立たないものの、その後急激に発現して生後 15 日目に最も顕著となり、徐々に寛解した。網膜外新生血管は生後 16 日目、17 日目に最も発現した。TLDA クラスター解析の結果、コントロールマウスに比較して ROP モデルマウスにおいて、27 種類の遺伝

子が経過中に強い発現上昇を示した。さらに、これら 27 種類の遺伝子について再度クラスター解析したところ、VEGF-A⁴⁾、angiopoietin-2⁵⁾、等の代表的な血管新生促進遺伝子が網膜外新生血管が最も顕著となる時期に一致して最も発現上昇を示した。また、多くの炎症関連遺伝子が病初期より発現上昇し、病後期に至るまで発現上昇を維持し続けた。

D. 考察

ROP の病態形成に関与する因子については過去にも様々な報告があるが^{6),7)}、それらの因子が、ROP のどの時期での病態形成に関与しているのかについて、未だ詳細には解明されていない。今回、ROP モデルマウスにおいて、臨床経過と遺伝子レベルでの経時変化の相関について包括的に検討した結果、これまでも報告されている代表的な血管新生促進遺伝子が、網膜外血管新生が最も顕著となる時期に一致して最大発現を示した。このことは、これらの因子が ROP モデルマウスにおける血管新生に直接的に関与している可能性が示唆された。また、炎症関連遺伝子が血管新生発現以前の病初期より発現上昇していることから、ROP モデルにおいて炎症性変化は血管新生発現以前より発生している可能性が示唆された。

E. 結論

ROP モデルマウスにおいて、炎症関連遺伝子は、血管新生発現時期、血管新生促進遺伝子の発現上昇時期に先立ち、発現上昇が認められた。これらの遺伝子レベルでの経時変化は臨床経過とよく相関していた。

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

1. Terry T.L.: Fibroblastic overgrowth of persistent tunica vasculosa lentis in infants born prematurely: II. Report of cases-clinical aspects. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 40:262-284, 1942.
2. Smith L.E. et al: Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35:101-111, 1994.
3. Higgins R.D. et al: Diltiazem reduces retinal neovascularization in a mouse model of oxygen induced retinopathy. *Curr Eye Res.* 18:20-27, 1999
4. Aiello L.P. et al: Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc.*