

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

池田康博¹⁾、宮崎勝徳¹⁾、向野利一郎¹⁾、村上祐介¹⁾²⁾、米満吉和³⁾
村田敏規⁴⁾、後藤純信⁵⁾、長谷川護⁶⁾、居石克夫²⁾、石橋達朗¹⁾
(¹⁾九州大、²⁾九州大病理病態学、³⁾千葉大遺伝子治療学、⁴⁾信州大、
⁵⁾国際医療福祉大リハビリテーション学部、⁶⁾ディナベック(株))

研究要旨 これまでに我々は、網膜色素変性に対する遺伝子治療の可能性と臨床応用へ向けた研究を継続してきた。今回は、網膜色素変性に対する神経栄養因子搭載サル由来レンチウイルスベクター (SIV-hPEDF) を用いた視細胞保護遺伝子治療の前臨床試験として行ったカニクイザルを用いた長期安全性試験の結果について報告する。

A. 研究目的

これまでに我々は、網膜変性モデル動物を用いた効能試験において、神経栄養因子を搭載したサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターの有用性を明らかにしてきた。今回、前臨床試験として、SIV ベクターの網膜下投与の安全性を確認するため、大型動物であるカニクイザル網膜に治療遺伝子を搭載した SIV ベクター (SIV-hPEDF) を投与し、その全身への影響ならびに局所での反応を術後 2 年間にわたり検討した。

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ヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) を搭載した SIV ベクターを経硝子体的に網膜下投与した。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。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、眼科領域の動物使用に関する ARVO の声明、ならびに日本霊長類学会の定めたサル類を用いる実験遂行のための基本原則を遵守し、所属研究機関による承認を得た動物実験プロトコールに従った。

C. 研究結果

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。多局所網膜電図では、ベクター注入部位に一致した電位の低下などは観察されなかった。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。

D. E. 考察・結論

カニクイザルを用いた SIV ベクター網膜下投与の長期安全性試験において、全身ならびに眼局所での安全性が確認された。

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. 池田康博：シンポジウム I. 「分子生物と電気生理」網膜色素変性に対する遺伝子治療. 第 54 回日本臨床視覚電気生理学会. 名古屋. 2007
2. 池田康博：シンポジウム 15 「遺伝子治療」網膜色素変性に対する遺伝子治療～臨床応用までのプロセス～. 第 111 回日本眼科学会総会. 大阪. 2007.
3. 池田康博：最新研究報告. 網膜色素変性に対する遺伝子治療の臨床応用をめざして. 第 3 回 JRPS 網脈絡膜変性フォーラム. 大阪. 2007.
4. 池田康博：シンポジウム 1. 「将来の臨床応用を見据えた網膜硝子体研究」網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療. 第 46 回日本網膜硝子体学会. 青森. 2007.
5. 池田康博：特別企画. 「霊長類を用いた先端医
6. 科学研究の現状」サルを用いたレンチウイルスベクターの長期安全性試験. 第 3 回霊長類医科学フォーラム. つくば. 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

1. 参考文献

1. Ikeda Y, et al: Long-term histological and functional analysis for Simian Immunodeficiency Virus (SIV)-based lentiviral vector-mediated intraocular gene transfer in adult rats. *Gene Ther*, 10: 1161-1169, 2003
2. Miyazaki M, et al: 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*. 10: 1503-1511, 2003

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

井上裕治、柳 靖雄、入山 彩、玉置 泰裕、新家 眞
(東京大)

研究要旨 骨髄には様々な幹細胞が存在することが示されており、再生医療への応用が注目されている。これまでに我々は、マウス骨髄間葉系幹細胞の網膜変性の進行抑制作用を明らかにしてきた。今回は、ヒト骨髄間葉系幹細胞の網膜変性モデルラット (RCS rat) への網膜下移植が、被移植眼へどのような影響を与えているかについて検討した。ヒト骨髄間葉系幹細胞懸濁液を 4 週齢 RCS rat の網膜下腔に、経強膜的に注入した。移植後 3, 7 週に眼球摘出し、網脈絡膜における mRNA の発現をヒト (移植細胞) およびラット (被移植網膜) 特異的なプライマーを用いて RT-PCR で検討した。移植した細胞は網膜色素上皮下に生着し、移植後 3 週目まで細胞の生存が確認された。また、移植後 3 週での mRNA の発現は、ヒト由来 mRNA では FGF9 の発現が亢進しており、ラット由来 mRNA では FGF receptor や GDNF, NGF β の発現が亢進していた。移植後 7 週での mRNA の発現は、ラット由来の mRNA において BDNF の発現が亢進していた。ヒト由来 mRNA の発現には差が認められなかった。ヒト骨髄間葉系幹細胞を網膜変性モデルラット網膜下に移植すると、細胞が移植された眼球では、ドナーだけではなく、ホスト側から神経栄養因子が分泌され、網膜変性に影響を与えている可能性が示唆された。

A. 研究目的

骨髄には様々な幹細胞が存在することが示されており、再生医療への応用が注目されている。これまでに我々は、マウス骨髄間葉系幹細胞の網膜変性の進行抑制作用を報告した¹⁾。今回は、ヒト骨髄間葉系幹細胞の網膜変性モデルラット (RCS rat) への網膜下移植が、被移植眼へどのような影響を与えているかについて検討した。

B. 研究方法

ヒト骨髄間葉系幹細胞懸濁液を 4 週齢 RCS rat の網膜下腔に、左眼に経強膜的に、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 3, 7 週に眼球摘出し、網脈絡膜における mRNA の発現をヒト (移植細胞) およびラット (被移植網膜) 特異的なプライマーを用いて RT-PCR で検討した。

(倫理面への配慮)

すべての実験における動物の取り扱いは、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

移植した細胞は網膜色素上皮下に生着し、移植後 3 週目まで細胞の生存が確認された。

また、移植後3週でのmRNAの発現は、ヒト由来mRNAではFGF9の発現が亢進しており、ラット由来mRNAではFGF receptorやGDNF, NGF β の発現が亢進していた。移植後7週でのmRNAの発現は、ラット由来のmRNAにおいてBDNFの発現が亢進していた。ヒト由来mRNAの発現には差が認められなかった。

D. 考察

我々は、骨髄間葉系幹細胞を RCS rat 網膜下に移植することにより、組織学的および電気生理学的に、網膜変性に対する網膜変性抑制効果が認められたことを報告した¹。同様に、Arnholdら²は、ロドプシンノックアウトマウスに対して骨髄間葉系幹細胞を網膜下に移植し、視細胞に対して網膜変性抑制作用があることを報告している。今回我々は、骨髄間葉系幹細胞移植により被移植眼へどのような影響を与えているかについて検討したが、移植後3週では被移植眼において、被移植眼由来と考えられる神経栄養因子やそのレセプターの発現の上昇が認められ、網膜変性に影響を与えている可能性が示唆された。

今後、更なる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

ヒト骨髄間葉系幹細胞を網膜変性モデルラット網膜下に移植すると、細胞が移植された眼球では、ドナーだけではなく、ホスト側から神経栄養因子が分泌され、網膜変性に影響を与え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

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. Inoue Y et al: Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 85:234-241, 2007
2. Arnhold S et al: Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245: 414-422, 2007

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

小坂田文隆、池田華子、高橋政代
(理化学研究所)

研究要旨 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た。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/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。ヒト ES 細胞は SFEB/DL 処置あるいは SFEB/CS 処置により RPE に、SFEB/DL + RA/T 処置あるいは SFEB/CS + RA/T 処置により視細胞に分化した。

A. 研究目的

網膜色素変性は視細胞が非可逆的な変性に陥る疾患であり、現在のところ治療法は確立されていない。そこで、網膜細胞移植による網膜の再生が将来的な治療のひとつとして期待されており、ヒト ES 細胞が移植の細胞源として考えられている。今回、我々はヒト ES 細胞からの網膜色素上皮 (RPE) および視細胞への分化について検討した。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分化誘導系の確立を試みた。

B. 研究方法

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。

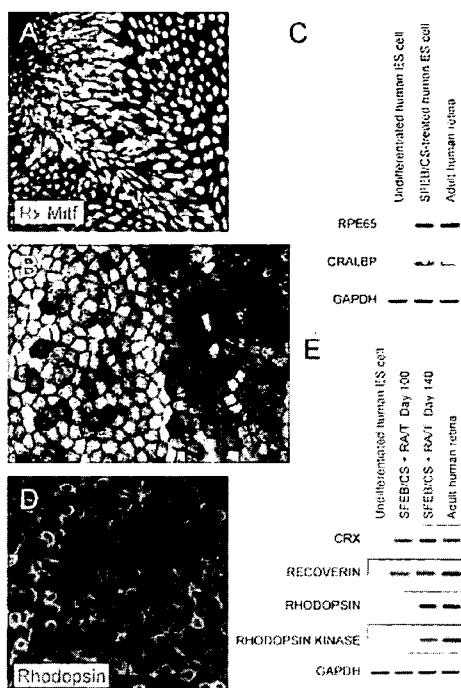
(倫理面への配慮)

ヒト ES 細胞の扱いに関しては、厚生労働省大臣承認のもと「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に従い十分に注意して行っている。

C. 研究結果

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、ビーズの食食能が認められた。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。



D. 考察

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 (1, 2)。今回我々は、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 (3, 4) 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。

E. 結論

ヒト ES 細胞は SFEB/DL 処置あるいは SFEB/CS 処置により RPE に、SFEB/DL + RA/T 処置あるいは SFEB/CS + RA/T 処置により視

細胞に分化した。低分子化合物でも同様に網膜細胞へ分化した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Osakada et al: Generation of rod and cone photoreceptors from mouse and human embryonic stem cells. Nature Biotech. In Press.

2. 学会発表

1. Osakada F, Ikeda H, Watanabe K, Akaike A, Sasai Y, Takahashi M: Primate embryonic stem cells differentiate into photoreceptor cells. Neuroscience 2007 (2007)
2. ヒトおよびサル ES 細胞からの網膜細胞への分化制御. 小坂田文隆、池田華子、赤池昭紀、笹井芳樹、高橋政代. 第 28 回日本炎症・再生医学会 (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. Proc Natl Acad Sci USA. 102:11331-11336, 2005.
2. Proc Natl Acad Sci USA. 103:12769-12774, 2006.

3. Cell. 126:663-676, 2006.

4. Cell. 131:861-872, 2007.

40. 網膜色素変性症における網羅的な遺伝子検査

金子兵¹⁾、万代道子¹⁾²⁾、平見恭彦¹⁾³⁾、秋元正行²⁾、和田裕子⁴⁾
池田花子²⁾、高橋政代¹⁾²⁾、吉村長久³⁾、高倉俊二⁵⁾、小杉眞司⁶⁾

(¹⁾理化学研究所、²⁾京都大探索、³⁾ 京都大

⁴⁾わだゆうこ眼科クリニック、⁵⁾京都大検査部、⁶⁾京都大医療倫理学)

研究要旨 網膜色素変性症 (RP) は 37 個以上の原因遺伝子が報告されている。孤発例患者や遺伝形式不明な家系は半分以上を占めるが、現状では遺伝子診断や遺伝カウンセリングは非常に困難である。我々は効率とコストの面を考えながら dHPLC を用いた方法で遺伝形式を問わず全ての RP 患者における網羅的な変異解析を試みた。約 15% の孤発例や遺伝形式不明な患者で原因と思われる遺伝子変異を検出した。

A. 研究目的

網膜色素変性は網膜視細胞の機能が障害される遺伝性の疾患群である。近年、緑内障と糖尿病網膜症に続いて成人中途失明原因の第三位であり、遺伝性失明、または 60 歳以下視覚障害者の最大の原因である。原因となる遺伝子変異は多数解明されているものの遺伝子診断を一般的な臨床検査とするまでにはまだまだ多くの課題が残っている。まず、これまでに全身疾患を伴わない RP について原因遺伝子が判明しているのは少なくとも 37 個と多数ある。次に、RP 患者の半分以上は孤発や遺伝形式不明であり、遺伝子診断や遺伝カウンセリングはほぼできないのが現状である。また、臨床症状の異質性や多様性も正確診断と遺伝形式判断などに対して難しい点である。今回、我々は dHPLC 法を用いて遺伝形式不明の RP 患者について遺伝形式究明のために変異解析を行った。

B. 研究方法

対象は 2003 年から 2006 年の間に京都大学病院眼科に受診した 203 名の遺伝形式不明の RP 患者である。その内、52 人は孤発例患者で、141 家系 (151 人) は家族歴からは遺伝形式不明な家系である。全ての患者は眼科専門医に診断され、本研究に同意を得た。

方法は、京都大学「医の倫理委員会」承認のもと、対象患者より末梢血を採取し、DNA を抽出した。今まで変異報告がある 30 個遺伝子、108 エキソンを検索した。すべての遺伝子コーディング領域を PCR によって増幅し、dHPLC 法 (WAVE) にてスクリーニングした。変異の疑いのあるサンプルをシーケンスによって確認した。得られた変異結果は正常人 115 人のデータベースと照合し、bioinformatics 手法を用いて全ての missense mutation を解析した。

(倫理面への配慮)

京都大学「医の倫理委員会」承認のもとに

施行した。

C. 研究結果

32 人網膜色素変性症患者において、26 種類の変異を検出した。2つの frameshift 変異と1つの欠失変異の他に、23 個 missense mutation があった。その内、18 個は新規変異であった。弧発例患者の約 21% で変異が検出された。一方、遺伝形式不明な家系の約 10% で遺伝原因が分かった。

全ての変異は 115 人の正常人で検出されなかった。また、PolyPhen など 3 種の in silico 解析によって有意に pathological mutation と予測された。

6 人の患者には常染色体劣性遺伝子の変異を見付けた。一方、1 例でホモの CRX 変異が検出された。CRX 遺伝子は常染色体優性遺伝 RP の原因遺伝子であり、ホモの変異は極めて稀なものである。弧発例患者 2 例と遺伝形式不明な 1 家系に digenic mutation が同定された。弧発例患者 2 例は其々 RDS/PDE6B と CRX/RPGR 遺伝子のダブル変異である。その他、同じ家系中の 3 人患者で同定した digenic mutation は RDS/PDE6B 遺伝子であった。

D. 考察

我々は dHPLC 法を用いて日本人 RP の変異。新規変異も将来の遺伝子診断に対して非常に有用である。また、今まで RDS/ROM1 という digenic パターンが報告されているが、それ以外の 3 種の digenic mutation を確認した。

dHPLC 法は比較的成本が低く、効率も良い方法である。網羅的に変異スクリーニングした結果、従来 of 優性遺伝 RP の研究結果

と同様の遺伝子変異検出頻度であった。これまで一部家系患者だけにしか出来ない遺伝子診断だったが、本研究の結果から、全ての RP 患者に遺伝形式を問わず迅速な遺伝子診断ができることが分かった。遺伝子変異がなかった患者に対して、ターゲット対象外の遺伝子やイントロン変異などの可能性が考えられる。これから更なる研究が必要である。

E. 結論

我々は初めて遺伝形式を問わず 203 人網膜色素変性症患者に対する網羅的な遺伝子検査を行った。dHPLC 法を用いて遺伝形式不明の症例でも網羅的に遺伝子診断を行なう事によって、遺伝子変異を確認できる症例があった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Jin Z et al. Large-Scale Mutation Screening in Patients with Simplex or Multiplex Retinitis Pigmentosa by Denaturing High-performance Liquid Chromatography. J Med Genet. In Press.

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. Hata H, et al: Causes of entering institutions for visually handicapped persons during the past fifteen years. *Jpn J Clin Ophthalmol* 57:259-262, 2003.
2. Kajiwara K, et al: Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264:1604-1608, 1994.
3. Bernal S, et al: Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation. *J Med Genet.* 40:e8, 2003.
4. Jin ZB, et al: Mutational analysis of RPGR and RP2 genes in Japanese patients with retinitis pigmentosa: identification of four mutations. *Mol Vis* 12:1167-1174, 2006.

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

高橋政代¹⁾²⁾、村上智昭³⁾、吉村長久³⁾

(¹⁾理化学研究所、²⁾京都大探索医療センター、³⁾京都大)

研究要旨 網膜色素変性症 (RP) は 37 個以上の原因遺伝子が報告されている。弧発例患者や遺伝形式不明な家系は半分以上を占めるが、現状では遺伝子診断や遺伝カウンセリングは非常に困難である。我々は効率とコストの面を考えながら dHPLC を用いた方法で遺伝形式を問わず全ての RP 患者における網羅的な変異解析を試みた。約 15% の弧発例や遺伝形式不明な患者で原因と思われる遺伝子変異を検出した。

A. 研究目的

眼底自発蛍光は網膜色素上皮の機能低下や視細胞外節貪食亢進などの網膜色素上皮細胞の働きと関連していると考えられている。今回我々は、網膜色素変性患者の眼底の自発蛍光と optical coherence tomography (OCT) 像における視細胞の外節内節接合部を表すとされている the third high-reflectance band (3rd HRB) およびゴールドマン視野検査との関係を検討した。

B. 研究方法

固視が良く検査可能な 34 例 (男性 17 例、女性 17 例) の典型的な網膜色素変性患者において、HRA2 を用いて自家蛍光を記録した。また、OCT で得られた 3rd HRB の長さを計測した。自家蛍光とゴールドマン視野検査での残存中心視野の直径、また、3rd HRB の長さを中心視野の直径の関係を検討した。

C. 研究結果

症例を眼底の自家蛍光のパターンによって輪状過蛍光群 (20 例)、中心部過蛍光群 (6

例)、過蛍光を認めない群 (8 例) の 3 群に分類した。年齢の平均はそれぞれ 48.8、54.7、60.0 歳であった。輪状過蛍光群では、3rd HRB は輪状過蛍光の直径と有意に関連した ($P < 0.001$) が、中心視野の直径は関連せず ($P = 0.237$)、視野は輪状過蛍光より大きく、自家蛍光よりは小さかった。中心部過蛍光群は 3rd HRB が確認できなかった。過蛍光を認めない群では、自家蛍光の直径は 3rd HRB、中心視野の直径のどちらとも有意に関連した ($P = 0.024$ and $P < 0.001$)。

D. 考察

眼底自発蛍光の過蛍光のパターンによって分類した 3 群において自家蛍光、3rd HRB の長さ、中心視野の直径の関係が異なった。網膜色素変性の症例の中で、網膜色素上皮と視細胞の変性の順序が異なる症例が混在している可能性がある。

E. 結論

眼底自発蛍光の過蛍光のパターンによって分類した 3 群において自家蛍光、3rd HRB

の長さ、中心視野の直径の関係が異なった。網膜色素変性の症例の中で、網膜色素上皮と視細胞の変性の順序が異なる症例が混在している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Murakami et al: Association between abnormal autofluorescence results and photoreceptor disorganization in retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol. In press.

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. Robson AG et al: Pattern ERG correlates of abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44:3544-3350, 2003
2. Robson AG et al: Functional characterization and serial imaging of abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. Br J Ophthalmol

90:472-479, 2006

3. Popovic P et al: Abnormal fundus autofluorescence in relation to retinal function in patients with retinitis pigmentosa. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 243:1018-1027, 2005

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

宮崎勝徳、池田康博、園田倫子、今木裕幸、上野暁史、石橋達朗
(九州大)

研究要旨 定型網膜色素変性に黄斑病変が合併しやすいことが知られているが、疾患特有の視細胞の脆弱性からも手術適応に関しては統一された見解はない。網膜前膜を合併した3症例に硝子体手術を施行し、術前後の視機能を評価することでその手術適応と有用性を検討した。対象は平成19年7月から12月に当科にて硝子体手術を施行した、網膜色素変性に合併した網膜前膜症例3例3眼。OCT所見では術後1か月の時点で全例中心窩陥凹が出現し、黄斑部形態は正常に近い所見を示した。中心窩網膜厚は3症例とも著明に減少した。矯正視力は3例とも2段階以上の変化を認めず、ハンフリー10-2の非手術眼を対照としたMD値は術後改善傾向を示した。このように術後早期において硝子体手術の有用性が考えられたが、光障害を含む手術侵襲の影響や、黄斑部形態の正常化に伴う視機能改善の可能性を考え合わせた長期経過観察の必要性が考えられ、また症例数を重ねることでその手術適応に関して今後検討する予定である。

A. 研究目的

定型網膜色素変性は求心性視野狭窄を示すことから黄斑機能の維持は非常に重要であるが、黄斑病変が合併しやすいことが知られている。網膜前膜を合併した3症例に硝子体手術を施行し、術前後の視機能を評価することで、その手術適応と有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

平成19年7月から12月に当科にて硝子体手術を施行した、網膜色素変性に合併した網膜前膜症例3例3眼（男性2名、女性1名、年齢30～72歳、光干渉断層計（Cirrus HD-OCT Model4000）にて中心窩陥凹が消失）を対象とした。全例内境界膜剥離を施行している。矯正視力、光干渉断層計（OCT）

による黄斑形態と中心窩網膜厚、ハンフリー視野計（SITA standard 10-2）による黄斑部感度、ゴールドマン視野計による視野変化を術前と術後1か月で比較検討した。

C. 研究結果

OCT所見では術後1か月の時点で全例中心窩陥凹が出現し、黄斑部形態は正常に近い所見を示した。（図1）

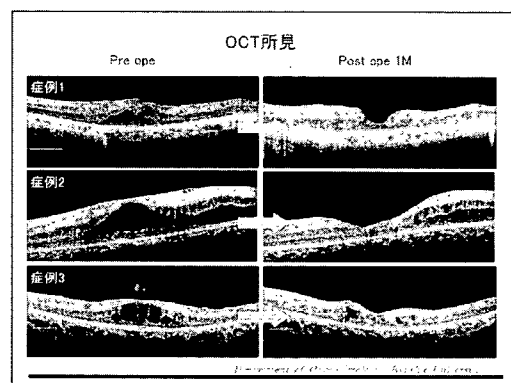


図1

中心窩網膜厚は3症例とも著明に減少した。
(図2)

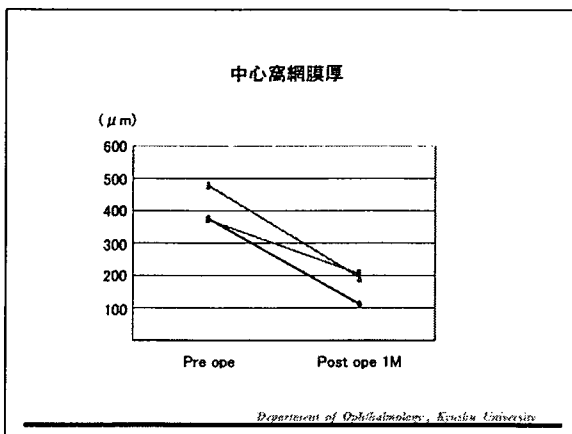


図2

矯正視力は3例とも2段階以上の変化を認めず、ハンフリー10-2の非手術眼を対照としたMD値は術後改善傾向を示した。(図3) ゴールドマン視野計では明らかな変化を認めなかった。

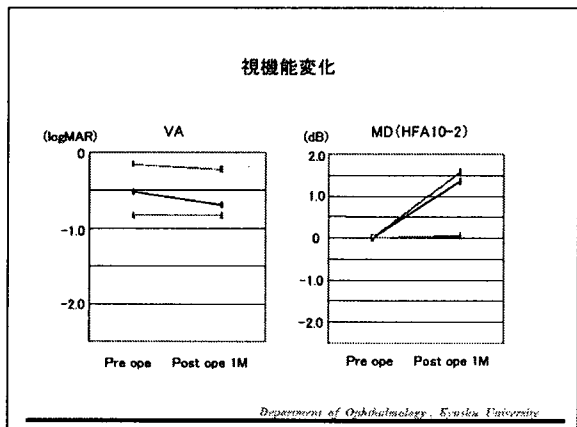


図3

D. E. 考察・結論

網膜色素変性に合併する網膜前膜は比較的高頻度に認められるが、その硝子体手術に関するまとまった報告はこれまでない。疾患特有の視細胞の脆弱性から手術に躊躇することも考えられ、その手術適応や有用性に関しては統一した見解がないと考えられる。

今回網膜色素変性に合併する網膜前膜に対し硝子体手術を施行した3症例に関し、術後早期に黄斑部形態は正常に近い形状を示し、術後1か月の視機能も改善傾向を示した。このことから視細胞の脆弱性を特徴とするこの疾患に対し、網膜前膜に対する手術は術後1か月の段階で視機能の損失を認めず、その有用性が考えられた。

しかしながら、光毒性を含めた手術侵襲による視機能障害や、黄斑部形態の改善による視機能向上に関して、今後長期の経過観察が必要であると考えられた。また症例数も少ないため、様々な進行段階、及び黄斑部形態による症例数を重ねることで、その手術適応に関して検討していくことを予定している。

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

なし

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

入山 彩、柳 靖雄、玉置泰裕、新家 眞
(東京大)

研究要旨 近年、光線暴露による酸化ストレスが加齢黄斑変成症 (AMD) の発症に関与していると考えられているが、その分子メカニズムの多くは不明な点が多い。今回我々は白色光が、網膜色素上皮 (RPE) に及ぼす影響について Wnt/ β -catenin 経路に着目して検討した。その結果、白色光刺激により RPE において Wnt/ β -catenin 経路が活性化され、その下流遺伝子の発現の増減が認められ、上皮間葉移行が生じる事が明らかになった。又 RPE の貪食能が低下する可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、光線暴露による酸化ストレスが加齢黄斑変成症 (AMD) の発症に関与していると考えられているが、その分子メカニズムの多くは不明な点が多い [1, 2] [3, 4]。今回我々は白色光による酸化ストレスが、網膜色素上皮 (RPE) に及ぼす影響について Wnt/ β -catenin 経路に着目して検討した。

B. 研究方法

ヒト RPE 細胞株の ARPE19 細胞を用い白色光刺激による、Wnt/ β -catenin 経路の活性化を Western blotting 法、免疫染色法を用い検討した。次にその下流の因子である、vimentin, MMP7, α -SMA, ZO-1 の発現を RT-PCR 法を用い検討した。又、phagocytosis assay を用い、白色光刺激が ARPE19 細胞の貪食能に与える影響を検討した。更に、siRNA を用い β -catenin を knock down させこれらの白色光刺激の影響の変化を検討した。

C. 研究結果

Western blotting 法、免疫染色法により、ARPE19 細胞において白色光刺激による、Wnt/ β -catenin 経路の活性化が認められた (図 1)。

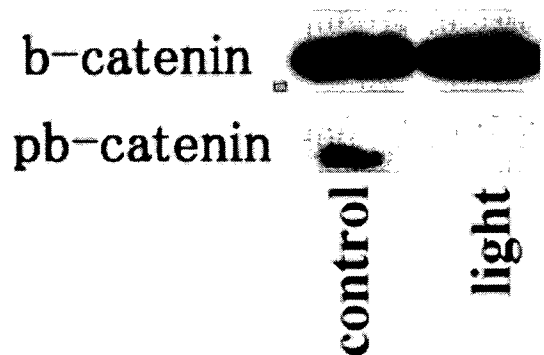


図 1 光線照射による b-catenin の活性化 (Western blot)

また vimentin, MMP7, α -SMA の mRNA の発現の上昇が認められ (2.5 倍~5 倍)、ZO-1 の mRNA の発現の減少が認められた (0.8 倍)。siRNA を用いた β -catenin の knock down 実験においてこれらの遺伝子の光刺激によ

る発現変化は減少した。更に、光線暴露により、ARPE19 細胞の貪食能の低下を認めた (0.6 倍)。この光刺激による貪食能の低下は siRNA を用いた β -catenin の knock down により緩和された (図 2)。

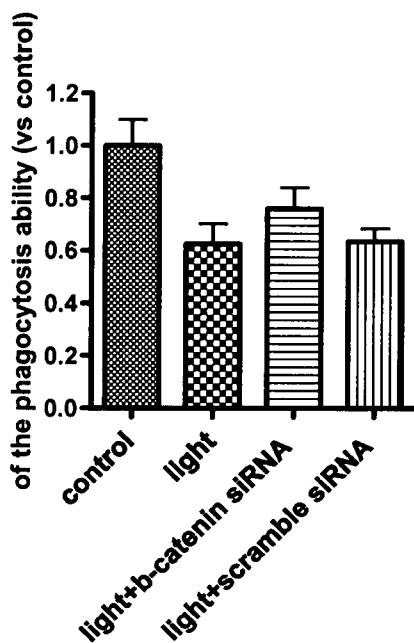


図 2 phagocytosis assay

D. 考察

これまでにも、酸化ストレスによって Wnt/ β -catenin 経路が活性化されると言う報告がなされている [5]。今回、我々の実験において、白色光刺激により、ARPE19 細胞にて Wnt/ β -catenin 経路が活性化し、その下流遺伝子の発現の増減を生じる事が明らかになった。又白色光刺激により Wnt/ β -catenin 経路により、ARPE19 細胞にて貪食能が低下する事が明らかになった。これらの RPE の上皮間葉移行が生じる事が AMD の発症に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

光刺激により RPE において Wnt/ β -catenin 経路が活性化され上皮間葉移行が生じると同時に、RPE の貪食能が低下す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. Kasahara E, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 46(9): 3426-3434, 2005
2. King, A., et al., Photochem Photobiol, 79(5): 470-475, 2004
3. Justilien V, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 48(10): 4407-4420, 2007
4. Higgins G.T, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 44(4): 1775-1782, 2003
5. Korswagen H.C: Dev Cell 10(6):687-688, 2006

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

安川 力、高瀬綾恵、西脇晶子、小椋祐一郎
(名古屋市大)

研究要旨 加齢眼にしばしば認めるドルーゼンは網膜色素上皮下の沈着物で加齢黄斑変性発症に関与しているがその生成機序は不明である。我々は以前に、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の機能を解析するために有用であることを報告した。今回、この培養系で認めるドルーゼン様の沈着物について免疫学的検討を行った。96穴丸底培養皿を用いて、メチルセルロース添加培養液中で、ヒト眼球より分離した網膜色素上皮細胞を培養すると、球状の細胞塊を形成する。細胞塊の表面に基底膜側を外側にして一層の網膜色素上皮が形成され、表面にリポ蛋白を主体とした排泄物を認める他、一部の細胞塊に光学顕微鏡にて球状で透明なドルーゼン様沈着物を認めた。1週間後に細胞塊を回収して、4%パラホルムアルデヒドで固定し免疫染色を行ったところ、ビトロネクチンとアポEはリポ蛋白を含む沈着物にび漫性に分布していた。一方、アミロイドβ、補体H因子は膜様沈着物やドルーゼン様沈着物の内部や周囲に分布しており、ドルーゼン様沈着物の生成に関与している可能性が示唆された。網膜色素上皮細胞の3次元培養がin vitro ドルーゼンモデルとしても有用である可能性が示唆された。ドルーゼンの形成には網膜色素上皮のみが関与しているものと考えられた。この培養系は、ドルーゼン生成機序や加齢黄斑変性の病態解明に役立つものと考えられた。

A. 研究目的

加齢眼の眼底においてしばしば観察されるドルーゼンは網膜色素上皮下の沈着物で加齢黄斑変性発症に関与しているがその生成機序は不明である。我々が以前に報告した網膜色素上皮の基底膜側の機能を解析するために有用な網膜色素上皮細胞の3次元培養において、低頻度であるがドルーゼン様の沈着物が観察されることがある。今回、この沈着物について免疫組織学的検討を行った。

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。1週間後に細胞塊を回収して、4%パラホルムアルデヒドで固定し、ビトロネクチン、アポE、アミロイドβ、補体H因子に対する一次抗体を用いて免疫染色を行った。

C. 研究結果

以前報告したように細胞塊の表面に基底膜側を外側にして一層の網膜色素上皮が形成された。その表面（基底膜側）にリポ蛋白を主体とした排泄物を認める他、一部の細胞塊に光学顕微鏡にて球状で透明な沈着物を認めた。ビトロネクチンとアポ E はリポ蛋白を含む沈着物にび漫性に分布していた。一方、アミロイド β、補体 H 因子は膜様沈着物やドルーゼン様沈着物の内部や周囲に分布しており、ドルーゼン様沈着物の生成に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

これまでドルーゼンへの局在が知られているタンパクの中の多くが今回、*in vitro* の網膜色素上皮細胞の 3 次元培養で、基底膜側のドルーゼン様沈着物においても発現を確認できた。ビトロネクチンやアポ E についてはブルッフ膜側にび漫性に沈着しており、アポ E については網膜色素上皮が排泄するリポ蛋白の構成成分であると考えられ、ビトロネクチンに関してはリポ蛋白の排泄機構に伴うブルッフ膜のメンテナンスの中で役割を果たしているものと推測される。一方で、アミロイド β や補体 H 因子はドルーゼン様の沈着物の周囲や内部に局在しており、ドルーゼンの生成に何らかの形で関与している可能性が示唆された。

E. 結論

網膜色素上皮細胞の 3 次元培養が *in vitro* ドルーゼンモデルとしても有用である可能性が示唆された。ドルーゼンの形成には網膜色素上皮のみが関与しているものと考えられた。この培養系は、ドルーゼン生成機

序や加齢黄斑変性の病態解明に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. Yasukawa T, et al: Development of drug-delivery systems to the posterior segments of the eye. *Expert Rev Ophthalmol* 2: 197-211, 2007
2. Yasukawa T, et al: Glycooxidized particles mimic lipofuscin accumulation in aging eyes: a new age-related macular degeneration model in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245: 1475-1485, 2007

2. 学会発表

1. Yasukawa T, et al: Drusen formation in a three-dimensional culture system of retinal pigment epithelial cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2007.
2. 安川 力: 3 次元培養による網膜色素上皮機能評価システム, 第 111 回日本眼科学会総会, 大阪市, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

1. Mullins RF, et al: Drusen associated

- with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit diseases. *FASEB J* 14:835-846, 2000
2. 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
 3. Hageman GS, et al: A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *PNAS* 102:7227-7232, 2005

45. 加齢黄斑変性における酸化リン脂質の関与

瓶井資弘¹⁾、鈴木三保子¹⁾、板部洋之²⁾、Zhao-Jiang Du¹⁾

辻川元一¹⁾、田野保雄¹⁾

(¹⁾ 大阪大、²⁾ 昭和大薬学部生物化学教室)

研究要旨 加齢黄斑変性(AMD)の発症に関し、酸化ストレスの関与を示す報告は多いが、現象間の関連はまだ不明な点が多い。今回、光照射による酸化ストレスを、網膜におけるリン脂質酸化と、それにより惹起されると考えられる炎症反応の2点について検討した。その結果、青色光照射によりマウス網膜に酸化リン脂質、MCP-1がともに有意に($p < 0.001$)増加していることが免疫染色、ELISAで判明した。それらの増加は2ヶ月マウスと比べ、12ヶ月マウスで著明であった。培養ヒト網膜色素上皮細胞に酸化リン脂質を投与すると、添加容量に依存してMCP-1の発現上昇を認めた。以上より、加齢に伴い、光照射によるリン脂質酸化が増強され、炎症が惹起されることが判った。酸化リン脂質はMCP-1の発現増加を介して、AMDの発症に関わっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

加齢黄斑変性(AMD)の発症に関し、酸化ストレスの関与を示す報告は多いが、現象間の関連はまだ不明な点が多い。我々もAMD眼で酸化リン脂質が増加していること(*Mol Vision*, 2007)、AMD眼より摘出した脈絡膜新生血管(CNV)に酸化リン脂質を認識するスカベンジャーレセプターがマクロファージに発現していること(*IOVS*, 2007)を報告してきた。今回、光照射によるマウス網膜での酸化リン脂質誘導、光照射に対する加齢による感受性の差異、および、網膜におけるリン脂質酸化により惹起されると考えられる炎症反応について検討したので報告する。

B. 研究方法

2ヶ月、12ヶ月のマウスに、青色LED光

($2\text{mW}/\text{cm}^2$)の下で1週間飼育した。照射1週間で安楽死させ、眼球摘出を行った。酸化リン脂質の網膜内分布を抗酸化リン脂質抗体(DLH3)を用いて免疫染色した。網膜内の酸化リン脂質の定量を、competitive ELISA法を用いて検討した。また、monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1)に対する免疫染色とELISAをおこない、分布と定量を行なった。またヒト網膜色素上皮細胞(ARPE-19)の培養液に酸化リン脂質(1-Palmitoyl-2-(9'-oxo-Nonanoyl)-sn-Glycero-3-Phosphocholine (9CHO-PC))を添加し、MCP-1の発現変化をPCRとELISAを用いて、mRNAレベルと蛋白質レベルで検討した。

C. 研究結果

青色光照射によりマウス網膜全層に酸化リ