

(解説)

現在想定される加齢黄斑性の発症メカニズムこのカスケードのなかで、炎症(①③)と遺伝的背景(②)、およびその両者の関連(④)について証明した。

①病理により炎症の関与を証明

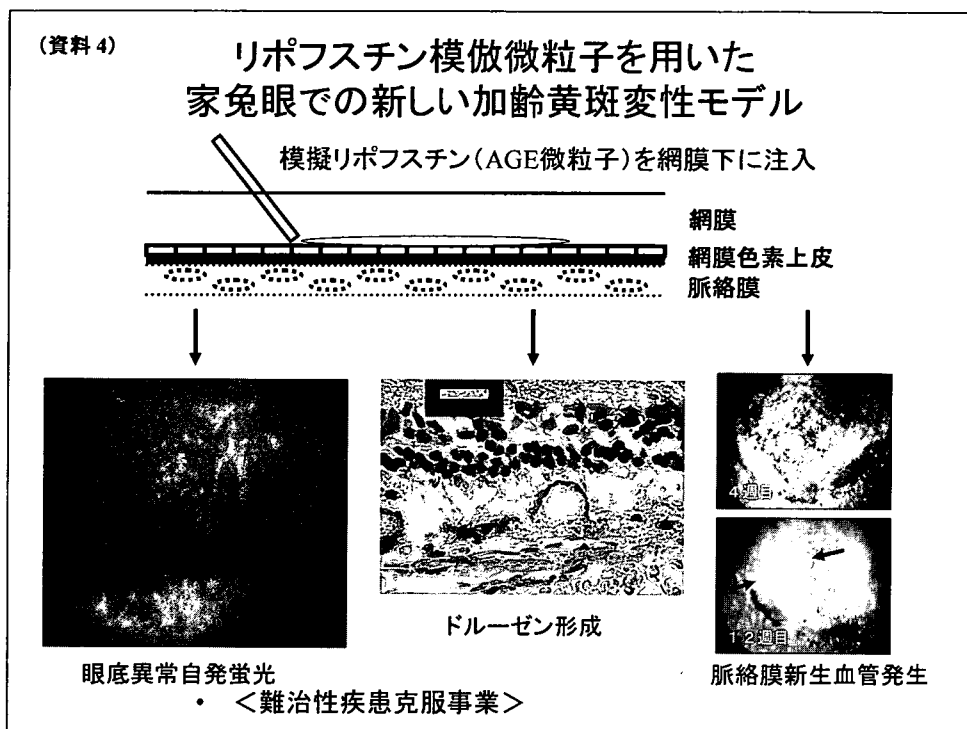
手術により抜去した脈絡膜新生血管の炎症性変化をリンパ球の程度により評価したところ、炎症の程度が強いものほど脈絡膜新生血管の再発があった。

このことから、脈絡膜新生血管の発症には炎症が関与していることが示唆された。

②狭義AMDおよびポリープ状脈絡膜血管症(PCV)の両者に、HTRA1、LOC387715、CFH遺伝子の一塩基多型が関与することを示した。

③狭義AMDおよびポリープ状脈絡膜血管症(PCV)の両者で、血清C-反応性蛋白(CRP、炎症マーカー)濃度が上昇していることを示した。

④ HTRA1およびLOC387715遺伝子に、疾患に関連する一塩基多型を持つ場合、血清CRP濃度が上昇していることを示した。



(解説)

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 (リポフスチン模倣微粒子) を作製し家兔の網膜下に注入することにより、新しい加齢黄斑変性モデルを開発した。

リポフスチン模倣微粒子を網膜下に投与1週目にはRPE細胞の貪食作用によりRPE内に移行しており、リポフスチン蓄積と類似した状態となった。眼底には、加齢眼にしばしば認め、加齢黄斑変性発症に関与すると言われる眼底異常自発蛍光と類似パターンの自発蛍光が観察された。また、4週目にはドルーゼン様沈着物を認めるようになり、その後12週目にかけて蛍光眼底造影で脈絡膜新生血管と考えられる蛍光漏出を認めた。組織的にはドルーゼン様沈着物の他に、時に網膜下およびRPE下の脈絡膜新生血管、遊走してきたマクロファージを認めた。

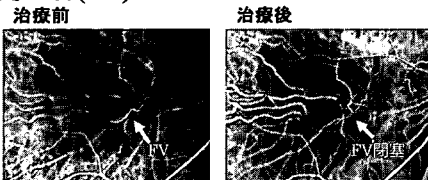
このリポフスチン模倣微粒子による家兔眼加齢黄斑変性モデルは、リポフスチンの病態への関わりを解明する上で有用であると考えられる。

(資料 5)

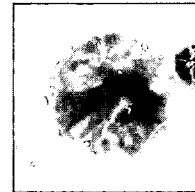
加齢黄斑変性に対する カスタムメイド治療の試み

- ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)
- 小さい脈絡膜新生血管(CNV)
- 低照射エネルギー(25J/cm²)光線力学的療法(PDT)
(IRB承認)
- 大きいCNVを有する狭義AMD
- 栄養血管(FV)PDT
- 網膜血管腫状増殖(RAP)
- 標準PDT (50J/cm²)と薬剤*との併用療法
- * トリアムシロン・アセトド、
抗VEGF抗体硝子体内注入(IRB承認)

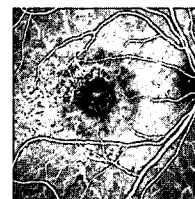
栄養血管(FV)PDT



PDT1週後の脈絡膜循環障害



標準PDT (50J/cm²)



低照射エネルギー(25J/cm²)

(解説)

加齢黄斑変性に日本人において光線力学的療法(PDT)の有効性が証明されているが、症例によって有効性が異なり、また正常の網脈絡膜組織に対する影響も無視できないことがわかってきた。そこで、病態、脈絡膜新生血管のサイズによって治療のカスタムメイド化が必要であると考えている。

視力の良好なポリープ状脈絡膜血管症や小さいCNVに対しては、現在行っている標準PDTの照射エネルギー(50J/cm²)は大きすぎ、脈絡膜血管閉塞による視力低下やPDTそのものによるVEGFのupregulationなどが懸念される。したがって、照射エネルギーを半分(25J/cm²)にして、行くと、治療効果は高いままで、脈絡膜血管閉塞はほとんど無視できる程度になる。

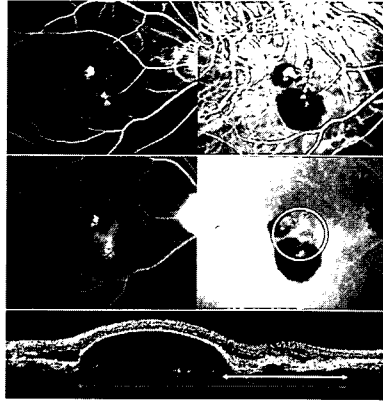
狭義加齢黄斑変性の大きいCNVに対しては、複数回の治療が必要であり、また治療後の栄養血管再疎通による重篤な出血が懸念される。そこで、PDTにおいて、CNV全体と中心窩外の栄養血管に対してレーザー照射を行うことを試みた。3000 μ 以上(平均4761 μ)の大きいCNVを有する12眼中、8眼は1回の治療で安定化し、また11眼で視力の改善もしくは維持が得られた。懸念される治療後の出血も軽症の出血が1眼でみられたのみであった。

最も予後不良な病態である網膜血管腫状増殖(RAP)に対しては、ステロイド薬や抗血管内皮増殖因子(VEGF)抗体の硝子体内注入が有効で、治療回数を減らして効果を得る目的でPDTとの併用療法を行った。従来PDT単独では病変の安定化が得られなかったが、ステロイド併用では8眼中7眼で視力の改善、維持が得られ、また抗VEGF抗体併用(19眼)では更に眼底所見の改善が著明で視力の維持が得られることが判明した。

(資料 6)

滲出型加齢黄斑変性に対する治療研究

より効率的な加齢黄斑変性の治療研究



ポリープ状脈絡膜血管症に対する
インドシアニングリーンガイド光線力学療法

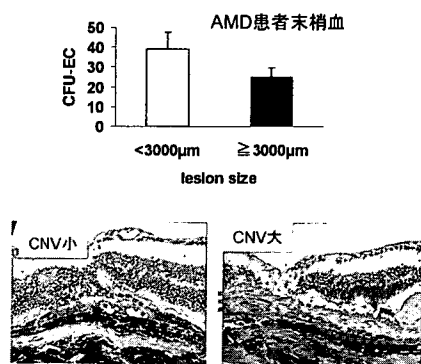
(解説)

より効率的な加齢黄斑変性の治療研究

日本人加齢黄斑変性に多いと考えられる、ポリープ状脈絡膜血管症に対し、より低侵襲で効果のある治療法を検討した。これまでのフルオレセイン蛍光眼底造影所見を基準とした方法に比べ、インドシアニングリーン蛍光眼底造影を基準とした方法は、より小さいレーザー照射野で効果的に治療ができることがわかった。

(資料 7)

加齢黄斑変性の新知見・新治療研究

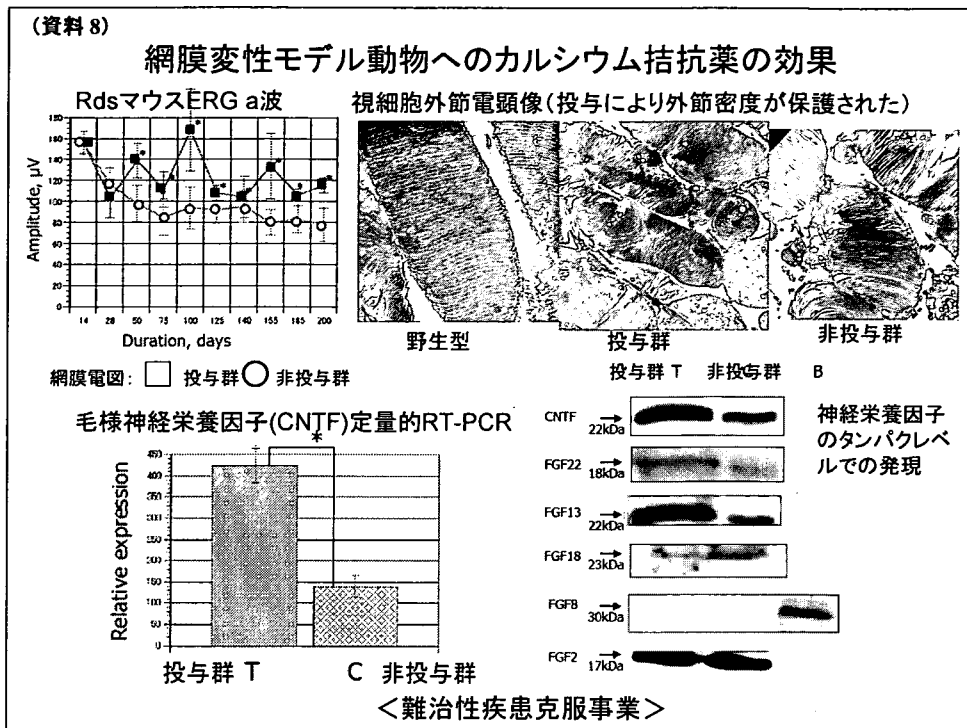


脈絡膜血管新生の重症度と
末梢血骨髄由来幹細胞が関連する

(解説)

加齢黄斑変性の新知見・新治療研究

骨髄由来幹細胞、前駆細胞が滲出型加齢黄斑変性に及ぼす影響を検討した。患者血液を検討した結果、両眼発症症例、大きな血管新生膜形成症例にて、骨髄由来末梢血幹細胞機能が低下していることを明らかにした。また、骨髄由来細胞をコントロールすることが加齢黄斑変性の予防的新治療となる事もわかった。

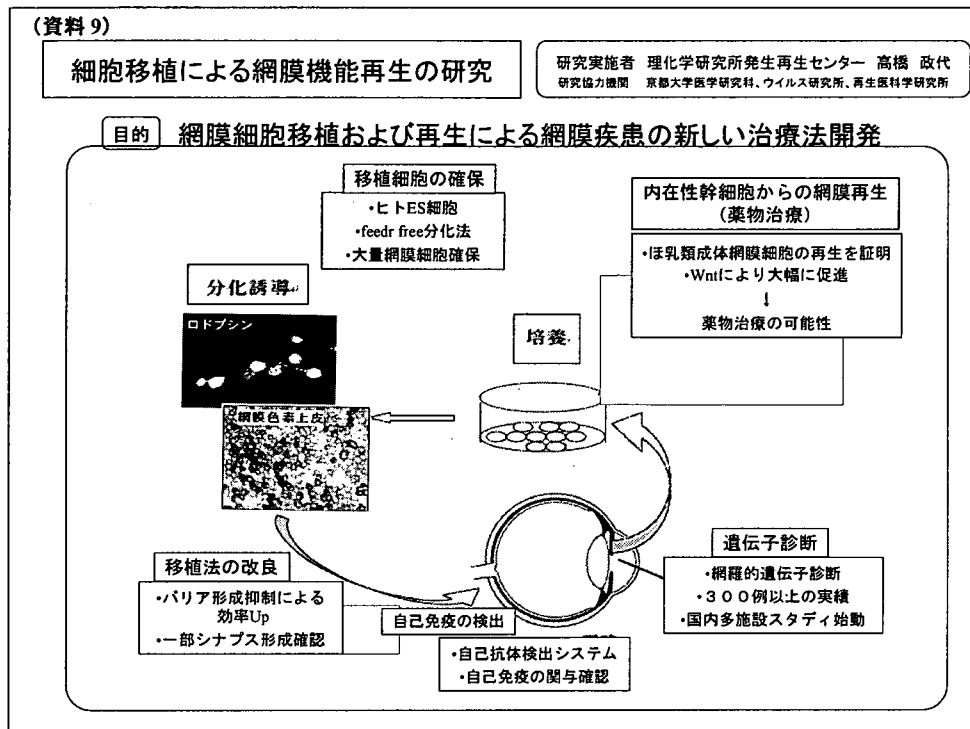


(解説)

網膜変性モデルラットにたいするカルシウム拮抗薬の効果

我々は網膜色素変性の進行予防として薬物療法の開発を最重要目標として研究してきた。これまでRCSラットとRdマウスの網膜変性に対してカルシウム拮抗薬ニルバジピンの全身投与を行い、網膜変性の進行抑制を明らかにしてきた。本年度はさらに異なる原因遺伝子によって発症するRdsマウス(ペリフェリンRDS遺伝子異常)網膜変性に対するニルバジピンの効果について実験を進めた。ペリフェリンRds遺伝子異常はヒト優性網膜色素変性でも発見されていることからRdsマウス(ヘテロ接合体)はヒト優性網膜色素変性のモデルとみなすことができる。

ヘテロRdsマウスは自然経過で緩徐に変性が進み、ERG波形が徐々に振幅低下をきたすが、ニルバジピン腹腔内投与マウスではERG波形が有意に保たれていた。形態的な観察では、電顕像にて薬物投与群では非投与群に比べて、単位長さ当たりの外節の円板数は有意に保存されていた。また、ciliary neurotrophic factor (CNTF)などが網膜細胞の転写レベル(mRNAレベル)と翻訳レベル(タンパク質レベル)の両者にて増加しており、ニルバジピン投与によってこれらの遺伝子レベルでの変化が視細胞や網膜感度を高めている可能性が示された。



(解説)

現在治療法のない網膜外層の障害については、網膜色素上皮細胞や視細胞を再生させる治療が必要である。

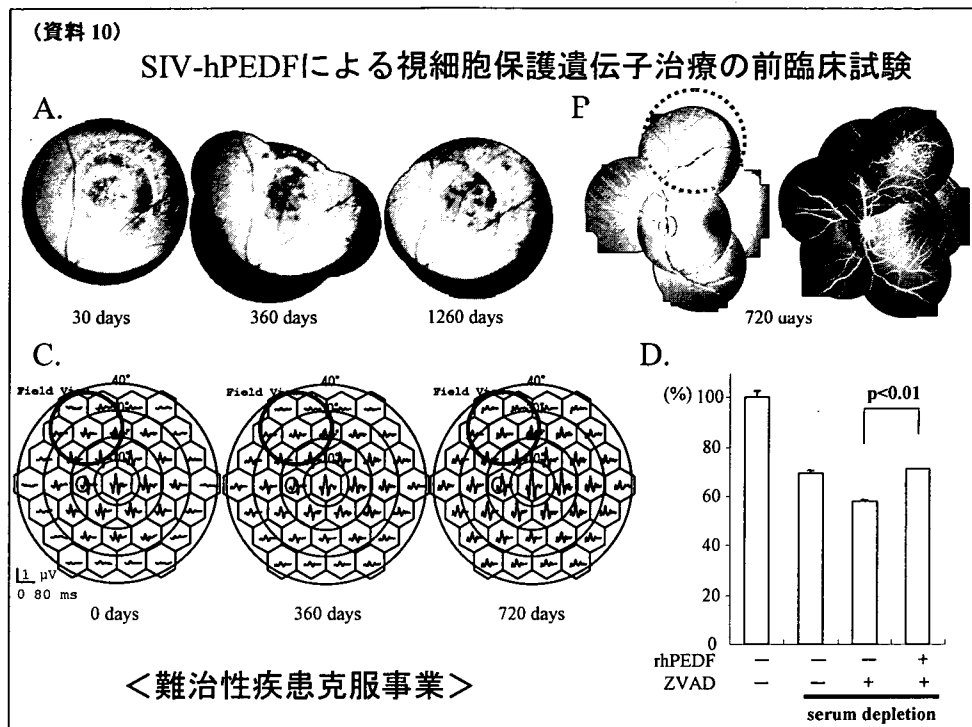
そのためには、内在性幹細胞からの網膜再生（薬物治療）と各種幹細胞から分化誘導した幼弱な網膜色素上皮細胞や視細胞を移植する方法が考えられる。

内在性幹細胞による網膜細胞再生は成体ほ乳類でもおこっていることを確認し、Wnt 3 aの投与により20倍以上に増加することを見い出した。

また、細胞移植に関しては、移植源となる網膜色素上皮細胞や視細胞をマウス、サル、およびヒトES細胞から効率良く分化誘導する事に成功し、純化をすれば移植に十分な質と量を得る事ができる。

さらに、移植細胞が宿主の神経ネットワークに組み込まれるかどうかについて、MMP2やCon A, estrogenの投与による移植細胞の網膜内への侵入増加や、コンドロイチナーゼABCの同時投与により、グリア細胞バリアの形成を抑制し、神経突起の網膜内への侵入とシナプス様形態の形成を確認した。

臨床側の準備として、網膜色素変性の網羅的遺伝子診断と、視細胞に対する自己抗体のひとつである抗リカバリン抗体のELISAによる検出システムを構築した。



A) EGFP (enhanced green fluorescent protein) 遺伝子導入後の経時的な蛍光眼底写真

レポーター遺伝子であるEGFPを搭載したサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターの網膜下投与により、カニクイザル網膜において少なくとも3年半という長期間の安定した遺伝子発現が確認できた。同様に、治療遺伝子であるhPEDFの発現も少なくとも2年間は確認できている。

B) hPEDF搭載SIVベクター (SIV-hPEDF) の網膜下投与後720日の眼底写真 (左) と蛍光眼底造影写真早期 (右)

検眼鏡的には、遺伝子導入部 (青点線部) に一致した色素上皮の色調ムラを軽度認めたが、網膜に大きな変化は認められなかった。また、蛍光眼底造影検査では、早期にwindow defectを認めたが、後期に蛍光漏出などの所見は認めなかった。

C) hPEDF搭載SIVベクター (SIV-hPEDF) の網膜下投与前後の多局所網膜電図

遺伝子導入部 (青い円) の反応は術前、術後1年、術後2年で大きな変化を認めなかった。

D) R28細胞を用いたhPEDFの神経保護作用のメカニズム解析

hPEDFの血清除去刺激により生じる神経細胞死 (アポトーシス) に対する保護効果が、Caspaseの拮抗薬であるZVADによって影響を受けないことから、caspase非依存的経路を抑制している可能性が示唆された。

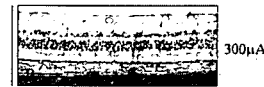
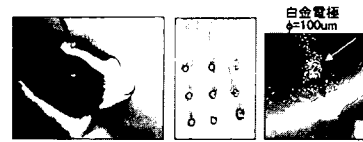
これまでのカニクイザルを用いた検討により、長期間の遺伝子発現とSIV-hPEDF投与の眼局所ならびに全身の安全性が少なくとも術後2年の時点で確認できた。今後は少なくとも術後5年間は安全性試験を継続する予定である。また、培養細胞ならびに疾患モデル動物を用いて、hPEDFの視細胞保護作用のメカニズムを一部明らかにすることができた。

今後は、網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療の臨床研究を実現するべく、臨床プロトコルの審査を施設内倫理委員会、ならびに厚生科学審議会 (厚生労働省) において進めていく予定である。

(資料 11)

経強膜的刺激電極(STS)による急性臨床試験

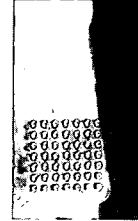
- 電気刺激装置で網膜を刺激することによって、視覚を人工的に認知させる人工視覚の1つとして、我が国独自の方式である脈絡膜上経網膜電気刺激(STS)法を開発した。
- 家兎およびラットでSTSの安全性と有効性を確立し、その結果を踏まえて、ヒトへの応用を目指した急性臨床試験を施行した。
- 網膜色素変性により失明した患者ボランティア2名に対しSTSの埋植、電気刺激を行い、擬似光覚を得た。また、2点弁別が可能になると考えられる反応を得た。
- 加齢黄斑変性や網膜色素変性など有効な治療法のない網膜変性疾患患者にとって、人工視覚は大きな福音と考えられる。
- STSが実用化し普及すれば、現在欧米中心の人工臓器技術に対して、わが国より発信できる新技術となるものと期待される。



家兎への慢性通電試験



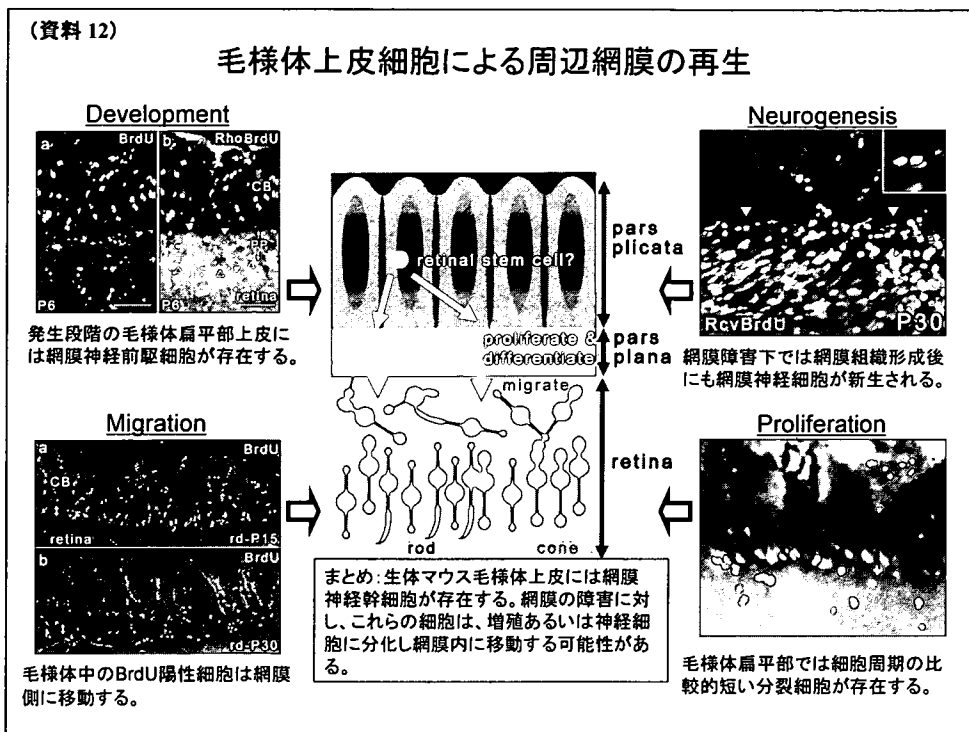
網膜色素変性患者へのSTS埋植



最新のSTS電極(7x7)

(解説)

加齢黄斑変性や網膜色素変性など有効な治療法のない網膜変性疾患に対して、本邦独自の人工網膜である、脈絡膜上経網膜電気刺激(STS)法を開発した。動物実験に引き続き、急性臨床試験を行い、失明した患者に擬似光覚が得られることを確認した。さらに長期埋植における安全性・有効性の確認と、電極改良を進めている。



(解説)

マウス毛様体上皮に網膜幹細胞が存在することはin vitroの実験で報告されている。しかし、これらの細胞が、生体のマウスで実際どのような役割を果たしているかは不詳である。

毛様体は皺襞部と扁平部より構成される。本研究の結果より、後者は発生学的にも網膜に非常に近く、器官形成期に局限して周辺網膜の形成に関与することが分かった。一方、遺伝性の網膜変性症を有するマウスでは、器官形成後にも毛様体扁平部における網膜神経細胞の新生が確認された。さらに、正常な成体マウスに薬剤による網膜障害を与えると、毛様体扁平部と周辺網膜に新生された網膜神経細胞が存在した。これらの細胞は網膜に移動し、網膜の再生に関与していると考えられた。本研究により、毛様体上皮由来の網膜神経幹細胞の潜在的な役割の一端が明らかになった。その結果は、これらの細胞の再生医療への応用を理論的に支持するものであった。