

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告

1. マグネトリポフェクション法による網膜色素上皮細胞への遺伝子導入

藤井康生、加地 秀、兼子裕規、寺崎浩子
(名古屋大)

研究要旨 網膜色素上皮細胞の狭い限局した特定の領域のみに選択的に遺伝子を導入するために、マグネトリポフェクションという新しい方法を検討した。磁性微粒子と GFP 遺伝子を持つプラスミドを内包するリボソームを作製し、ヒト RPE 由来の培養細胞である ARPE-19 に対して、遺伝子導入実験を行った。マグネトリポフェクションは磁石を置く位置によって、垂直方向だけでなく、重力に抗して水平方向にも遺伝子導入が可能であり、基礎研究での使用、臨床的な応用が可能と思われた。

A. 研究目的

これまで遺伝子導入の手法としてはウイルスをベクターとして用いるもの、用いないものなど多くの方法が開発されている。しかしながら、網膜色素上皮 (RPE) の狭い限局した特定の領域のみに選択的に遺伝子を導入することはできなかった。本研究の目的は磁性微粒子を用いて RPE の任意の場所を選択的に遺伝子を導入することである。

B. 研究方法

磁性微粒子と GFP 遺伝子を持つプラスミドを内包するリボソームを作製した。ヒト RPE 由来の培養細胞である ARPE-19 をコンフルエントまで培養し、培養液に上記リボソームを混和し、培養皿の裏面に磁石を 5 分あるいは 30 分間設置して遺伝子導入をおこなった (マグネトリポフェクション)。またフラスコでコンフルエントまで RPE を培養したのちにフラスコを立て、横方向への遺伝子導入を行なった。lipofectamin2000 により遺伝子導入したものを対照とした。遺伝子導入 48 時間後に蛍光顕微鏡にて単位面積当たりの GFP 陽性細胞数を計測した。

なお本研究は名古屋大学工学研究科本多研究室の協力の下行われた。

(倫理面への配慮)

本研究は、実験動物やヒトを実験対象としていない。

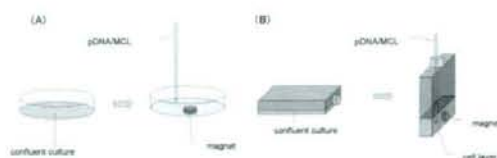


図1 実験方法

- (A) 垂直方向への選択的遺伝子導入
- (B) 水平方向への選択的遺伝子導入

C. 研究結果

マグネトリポフェクションにより磁石を設置した部分に多くの GFP 陽性細胞がみられたが、磁石の設置していない部分にはほとんど遺伝子の発現を認めなかった。磁石を設置した部分における GFP 陽性細胞数は lipofectamin2000 を使用した場合と比べて同等であった。RPE シートを垂直にした場合においてもマグネトリポフェクションにより横方向への遺伝子導入が可能であったが、lipofectamin2000 を使用した場合にはほとんど GFP 陽性細胞がみられなかった。マグネトリポフェクションによって細胞増殖が妨げられるということとはなかった。

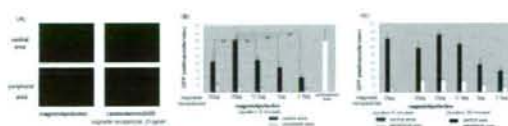


図2 垂直方向での GFP 陽性細胞数

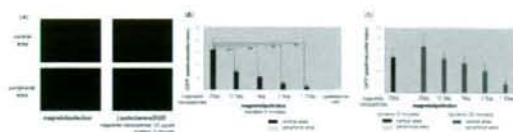


図3 水平方向での GFP 陽性細胞数

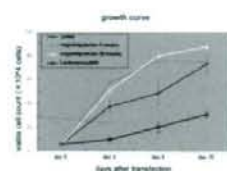


図4 生細胞数の変化

D. 考察

今回の結果により、網膜色素上皮細胞に対して本方法は、非ウイルス性ベクターとして高い導入効率だけでなく、有意な選択性を示すことが明らかとなった。特に選択性という観点では、磁石を置く位置によって、垂直方向だけでなく、重力に抗して水平方向にも導入が可能であった。これは臨床応用を考えた場合、眼球のような3次元空間において、効果を発揮すると思われる。例えば、加齢黄斑変性のような黄斑部（中心視力の部位）が障害される疾患においては黄斑部へ、逆に網膜色素変性症のように周辺視野から障害される疾患においては周辺部へ集中的に遺伝子導入させるといったように、障害部位によって遺伝子導入量を変えるという方法も考えられる。また細胞毒性についてであるが、これまでに human keratinocytes, human aortic endothelial cells, mesenchymal stem cells, human umbilical vein endothelial cells, normal human dermal fibroblast などにおいて、一定の磁性微粒子の濃度以下であれば細胞増殖の妨げにならないことが明らかになっている。RPE においても、今回用いた磁性微粒子の濃度では細胞増殖に影響を与えなかったことから、安全性も高いと考えられるが、将来の臨床応用にむけてはさらなる検討が必要である。

E. 結論

マグネトリポフェクションにより *in vitro* で RPE シートの任意の場所に選択的に遺伝子を導入することが可能であった。この方法は研究目的での使用、あるいは臨床的な応用が可能と思われる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 藤井康生 他：磁性微粒子を用いた網膜色素上皮細胞への遺伝子導入、第 46 回日本網膜硝子体学会総会、青森市、2007

(2) Yasuki Fujii et al: Gene Transfection to Human Retinal Pigment Epithelial Cells Using Magnetite Cationic Liposomes. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2007.

H. 知的財産権の出願、登録情報

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

- Ito A et al: The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting. *Biomaterials* 26: 6185-6193, 2005.
- Ito, A. et al: Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force. *Tissue Engineering* 11: 1553-1561, 2005.

3. Ino K et al: Plasmid DNA transfection using magnetite cationic liposomes for construction of multilayered gene-engineered cell sheet. *Biotechnology and Bioengineering* 100: 171-179, 2008.

2. F/HN 型レンチウイルスベクターによる網膜への遺伝子導入と抗血

管新生治療の検討

村上祐介¹⁾、池田康博¹⁾、米満吉和²⁾、宮崎勝徳¹⁾、長谷川護³⁾、石橋達朗¹⁾

(¹⁾九州大、²⁾千葉大遺伝子治療学、³⁾ディナベック株)

研究要旨 これまでに我々は、サル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用い、網膜への遺伝子治療用ベクターとしての有用性を示してきた。今回、迅速な遺伝子導入能を有するセンダイウイルスの F、HN タンパクを外殻として用いたシュードタイプ SIV ベクター (F/HN-SIV ベクター) を新たに開発したので、その遺伝子導入特性ならびに抗血管新生因子による脈絡膜血管新生 (CNV) 抑制効果について検討した。マウス網膜下に F/HN-SIV ベクターを投与した群では、通常型の VSV-G シュードタイプ SIV ベクター (VSV-G-SIV ベクター) と同様に、網膜色素上皮細胞に一年間以上安定した遺伝子発現を認めた。投与 5 分後にベクター溶液を除去する群 (remove 群) と、溶液を留置する群 (leave 群) に分け、遺伝子発現量を比較したところ、VSV-G-SIV ベクターの remove 群では遺伝子発現量が著しく低下したのに対し、F/HN-SIV ベクターでは remove 群でも高い遺伝子発現量が維持された。F/HN-SIV ベクターを用い、色素上皮由来因子 (PEDF) または可溶性 Flt-1 (sFlt-1) を遺伝子導入した眼球では、レーザー照射後の CNV 形成が有意に抑制された。抗血管新生因子の長期発現による網膜への影響について組織学的に検討したところ、PEDF 遺伝子導入群では明らかな変化を認めなかったのに対し、sFlt-1 遺伝子導入後 6 か月の網膜では視細胞変性および脈絡膜循環障害を認めた。以上の結果より、F/HN-SIV ベクターは短時間の網膜下投与によって、より安全に網膜へ遺伝子導入することが可能と考えられた。PEDF を用いた遺伝子治療は、慢性進行性の網膜疾患に対し、より安全性の高い治療法である可能性が示唆された。

A. 研究目的

レンチウイルスベクターは、単回の投与により長期間の安定した遺伝子導入・発現が可能であり、慢性進行性の網膜疾患に対し有用な治療法として期待されている。今回我々は、迅速な遺伝子導入能を有するセンダイウイルスの F、HN タンパクを外殻として用いたシュードタイプ SIV ベクター (F/HN-SIV ベクター) を新たに開発した

ので、その遺伝子導入特性ならびに抗血管新生因子による脈絡膜血管新生 (CNV) 抑制効果について検討した。

B. 研究方法

in vitro の実験系では、網膜色素上皮由来細胞である ARPE-19 を用い、Luciferase を搭載した F/HN-SIV ベクターまたは従来型の VSV-G シュードタイプ SIV ベクター

(VSV-G-SIV ベクター) を、MOI=10 で添加した。ベクター添加から一定時間(1分-48時間) 経過後、培養液を洗浄・置換し、接触時間による遺伝子発現量の変化について検討した。*in vivo* の実験系では、8週齢のBL/6 マウスの網膜下に、各ベクターを注入した。投与5分後にベクター溶液を除去する群 (remove 群) と、溶液を留置する群 (leave 群) に分け、遺伝子発現量を比較した。また、F/HN-SIV ベクターにより色素上皮由来因子 (PEDF) または血管内皮増殖因子 (VEGF) の可溶性受容体である soluble *fms*-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) を遺伝子導入し、レーザーCNV モデルに対する抑制効果を検討した。また抗血管新生因子の長期発現による網膜への影響を検討するため、各ベクター投与から6か月後に網膜の組織学的評価およびインドシアニングリーン脈絡膜血管造影を行った。

(倫理面への配慮)

実験は当該施設の動物実験委員会の承認を得た後に Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) の規定に従って行った。動物の苦痛は最小限となるよう配慮した。

C. 研究結果

ARPE-19 細胞において、VSV-G-SIV ベクターを用いた場合には、接触時間依存的に遺伝子発現量が増加し、完全な遺伝子導入には24時間以上の接触が必要であった。一方、F/HN-SIV ベクターではわずか数分間の接触で、非常に効率の良い遺伝子導入が得られた。*in vivo* においても同様に、VSV-G-SIV ベクターの remove 群では、leave 群と比べ遺伝子発現量が著明に低下

したのに対し、F/HN-SIV ベクターでは remove 群でも高い遺伝子発現量が得られた(図1)。また F/HN-SIV ベクターの網膜下投与によって、網膜色素上皮細胞に一年以上安定した遺伝子発現が見られた。PEDF ならびに sFlt-1 遺伝子導入群では、コントロールベクター投与群と比較し、レーザー照射後の CNV 形成が有意に抑制された。最後に、抗血管新生因子の長期発現による網膜への影響について組織学的に検討したところ、PEDF 遺伝子導入群では明らかな変化を認めなかったのに対し、sFlt-1 遺伝子導入後6か月の網膜では視細胞変性を認めた。インドシアニングリーン造影検査を行ったところ、sFlt-1 遺伝子導入群では脈絡膜血管造影の部分的な欠損を認めた。

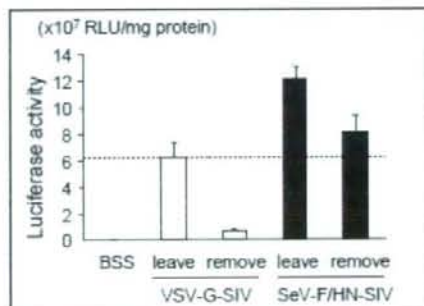


図1 F/HN-SIVベクターの遺伝子導入特性: 接触時間による遺伝子発現量の変化

D. 考察

近年欧米において、アデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターを用いた網膜疾患に対する遺伝子治療臨床研究が行われている。しかし、これらのベクターは遺伝子導入の成立に時間がかかるため、ベクター溶液を網膜下に留置する必要があり、網膜剥離による組織傷害やベクターの全身散布を引き起こす可能性が考えられる。今

回我々が開発した F/HN-SIV ベクターはわずか数分間の接触時間で、非常に効率の高い遺伝子導入が可能であり、より安全性の高いベクターになる可能性が考えられた。また F/HN-SIV ベクターによる PEDF 遺伝子の遺伝子導入により、安全かつ効果的に CNV 形成が抑制された。一方、sFlt-1 遺伝子を導入した網膜では、視細胞変性および脈絡膜循環障害を来すことから、sFlt-1 の長期過剰発現による慢性的な VEGF の阻害には注意が必要と考えられた。

E. 結論

F/HN-SIV ベクターは、極めて短時間の導入時間で効率の高い遺伝子発現が可能であることから、より安全性の高いベクターとなる可能性が示唆された。PEDF を用いた遺伝子治療は、慢性進行性の網膜疾患に対し、より安全性の高い治療法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

【発明の名称/課題名】ヘマグルチニン活性を有する膜蛋白質を含むシュードタイプレトロウイルスベクター

【公報種別】再公表特許 (A1)

【国際公開番号】WO01/092508

【発行日】平成15年8月5日(2003.8.5) 【国際特許分類第7版】

【国際出願番号】PCT/JPO1/04659

【国際出願日】平成13年6月1日(2001.6.1)

【国際公開日】平成13年12月6日(2001.12.6)

【優先権主張番号】特願2000-169090 (P2000-169090)

【優先日】平成12年6月1日(2000.6.1)

【出願人】(株)ディナベック研究所

【発明者】米満吉和、中島俊洋、中丸健治、小林雅典、長谷川護、上田泰次、飯田章博

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

- Ikeda Y et al. Simian immunodeficiency virus-based lentivirus vector for retinal gene transfer: a preclinical safety study in adult rats. *Gene Ther* 2003;10(14):1161-9.
- Murakami Y et al. Newly-developed Sendai virus vector for retinal gene transfer: reduction of innate immune response via deletion of all envelope-related genes. *J Gene Med.* 2008; 10(2): 165-76.
- Murakami Y et al. Inhibition of Nuclear Translocation of Apoptosis-inducing factor is an essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am J Pathol.* 2008; 173(5): 1326-38.

3. 当院におけるコロイデレミア患者の

CHM 遺伝子変異と臨床像

藤巻拓郎、藤木慶子、飯野 裕、和田裕子、早川むつ子、
宮崎 愛、濱畑徹也、溝田 淳、村上 晶
(順天堂大)

研究要旨 コロイデレミア (choroideremia: CHM) は X 連鎖遺伝形式をとる網膜変性疾患の一つで視力予後不良な疾患である。新規の変異を見出した 1 家系 2 症例を含め、現在までに当科に受診、あるいは遺伝子解析を依頼され CHM を疑った患者、35 家系 43 名を対象とし、その遺伝子変異と臨床像に関して報告する。

A. 研究目的

コロイデレミア (choroideremia: CHM, Mendelian Inheritance in Man [MIM] #303100) は X 連鎖遺伝で、1994 年、van Bokhoven ら¹⁾によりエクソン 15、653 個のアミノ酸よりなる CHM 遺伝子がクローニングされた。わが国では藤木⁴⁾、堀田⁵⁾、板橋⁶⁾らが 17 種の変異を報告している。今回新規のコロイデレミア患者 2 例とその娘において遺伝子変異と臨床像を精査し⁷⁾、既報^{4, 8, 9)}と併せ報告する。

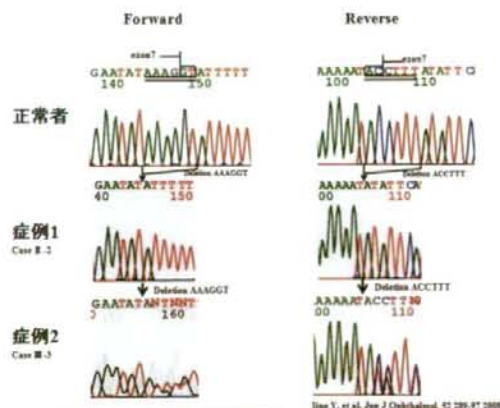
B. 研究方法

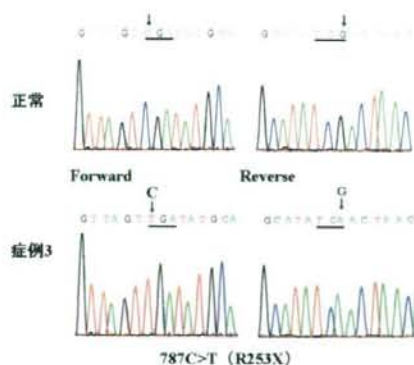
2006 年に CHM と診断された父親 (症例 1)、15 年間網膜色素上皮異常にて経過観察中の娘 (症例 2)、更に昨年受診した患者 (症例 3) を加え、1988 年以降に CHM を疑い当科受診、あるいは精査依頼された 35 家系 43 名を対象とした。インフォームドコンセントを得た上で、患者末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出。CHM 遺伝子のエクソン 1 から 15 を PCR 法で増幅し、Dye-deoxy

terminator 法で直接塩基配列を決定した。矯正視力測定可能であった症例に関して年齢変化の傾向を調べた。なお本研究は順天堂大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

CHM 遺伝子のエクソン 7 に新規の (967-970+2)delAAAGGT の 6 塩基欠失を認めた。症例 3 の CHM 遺伝子のエクソン 6 に 787C>T (R253X) の 1 塩基置換を 1 家系 2 症例に認めた⁷⁾。





当科で *CHM* 遺伝子解析を行った 35 家系 43 名中、22 家系 31 名に変異を認めた^{4, 7, 8)}。30 歳以上に求心性視野狭窄や強度近視例が多い。50 歳以上に視力低下が著明な例が多い。60 歳前後の症例の中に手動弁 2 例と光覚弁 1 例を認め高齢になるに連れ視機能低下の著明な例を認めた⁸⁾。15 年間にわたる保因者の経過観察の結果、傍中心暗点の拡大を認めた⁷⁾。

D. 考察

既報では、日本人のコロイデレミア患者に 17 種の変異と 1 例欠失を認め、60 種類中 20 種が欠失であった欧米の報告¹⁰⁾と異なり、人種による差が考えられた⁵⁾。*CHM* にミスセンス変異の報告が無いことから、ミスセンス変異のみでは疾患に至らない可能性がある。変異の認められなかった症例の場合は、*CHM* 遺伝子のプロモーター領域にあるエンハンサーやサイレンサーといった遺伝子発現制御部分の異常か、あるいはイントロン領域の大規模な挿入や変異などの異常、3' 非翻訳領域の異常を考慮しなければならない。

1. 論文発表

Iino Y, Fujimaki T, Fujiki K, Murakami A. A novel mutation (967-970+2)delAAAGGT in the choroideremia gene found in a Japanese family and related clinical findings. *Jpn J Ophthalmol.* 2008;52:289-97.

2. 学会発表

第 62 回日本眼科学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し。

1. 特許取得

特記事項無し。

2. 実用新案登録

特記事項無し。

3. その他

I. 参考文献

1. van Bokhoven H, van den Hurk JA, Bogerd L, et al. Cloning and characterization of the human choroideremia gene. *Hum Mol Genet* 1994;3:1041-1046.
2. Cremers FPM, van de Pol DJR, van Kerkhoff LPM, Wieringa B, Ropers HH. Cloning of a gene that is rearranged in patients with choroideremia. *Nature* 1990;347:674-677.
3. Merry DE, Jänne PA, Landers JE, Lewis RA, Nussbaum RL. Isolation of a candidate gene for choroideremia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2135-2139.
4. Fujiki K, Hotta Y, Hayakawa M, et al. *REPL1* gene mutations in Japanese patients with

- choroideremia. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1999;237:735-740.
5. Hotta Y, Fujiki K, Hayakawa M, et al. A hemizygous A to CC base change of the *CHM* gene causing choroideremia associated with pinealoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1997;235: 653-655.
6. Itabashi T, Wada Y, Kawamura M, Sato H, Tamai M. Clinical features of Japanese families with a 402delT or a 555-556delAG mutation in choroideremia gene. Retina 2004;24:940-945.
7. Iino Y, Fujimaki T, Fujiki K, Murakami A. A novel mutation (967-970+2)delAAAGGT in the choroideremia gene found in a Japanese family and related clinical findings. Jpn J Ophthalmol. 2008;52:289-97.
8. Hayakawa M, Fujiki K, Hotta Y, et al. Visual impairment and REP1 gene mutations in Japanese choroideremia patients. Ophthalmic Genet 1999;20:107-115.
9. Fujiki K, Hotta Y, Hayakawa M, et al. REP-1 gene mutations in Japanese patients with choroideremia. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39:S294.
10. Retina International's Scientific Newsletter. Mutation database: mutations of the Rab Escort Protein 1. <http://www.retinainternational.org/sci-news/repmut.htm>

4. 網膜色素変性におけるウノプロストン点眼による

黄斑部視機能の保護効果とその背景の検討

平松彩子、菅原岳史、小片一葉、萩原章、山本修一
(千葉大)

研究要旨 近年、ウノプロストンに神経細胞保護効果があることが報告されている。また網膜色素変性 (RP) において、ウノプロストン点眼により視機能が維持または改善したとの報告も散見される。視力良好な定型 RP 患者を対象に、6 カ月間ウノプロストン点眼液を投与し、点眼前後における視機能の評価を行った。点眼により病状の進行や有害事象はみられなかった。またマイクロペリメーターで測定した中心網膜感度が点眼前後で有意に上昇した。改善が見られた群と非改善群とを比較すると、光干渉断層計で測定した中心窩網膜厚が非改善群では改善群より有意に薄くなっていた。変性が進行し、器質的障害を起こしている症例には点眼の効果が得られないことが示唆された。

A. 研究目的

近年、ウノプロストンには網脈絡膜血流の増加を介して、神経細胞保護効果があることが報告されている。また網膜色素変性 (RP) において、ウノプロストン点眼により視機能が維持または改善したとの報告も散見される。

今回の研究では、定型網膜色素変性 (RP) に対し、プロスペクティブなパイロットスタディーを行い、黄斑部視機能の保護効果とその背景について検討した。

B. 研究方法

2007 年 1 月より千葉大学病院に来院した RP 患者の中で、連続した矯正視力 0.6 以上の定型 RP30 例 (男性 16 例、女性 14 例、年齢 23~73 歳、平均 52.9 歳) を対象にした。

6 カ月間、ウノプロストン点眼液を両眼 1 日 2 回、1 回につき 2 滴点眼し、矯正視力

(logMAR 換算)、NEI VFQ-25 のコンボ 10、ハンフリー自動視野計 (HFA) 10-2 の MD 値、Microperimeter 1 (MP-1) の中心 2 度、10 度以内の平均網膜感度について投与前後で検討した。

HFA、MP-1 については矯正視力の良い方の眼の結果を、同一の場合は右眼の結果を採用した。MP-1 は平均網膜感度が 2dB 以上上昇したものを改善、2dB 以上低下したものを悪化とした。視力は logMAR 換算で 0.2 以上の変化を有意な変化とした。

また MP-1 の中心 2 度の平均網膜感度が改善した群と非改善群との間で年齢、確定診断された年齢、性別、遺伝形式、HFA10-2 の MD 値、ゴールドマン視野検査での障害程度、中心窩網膜厚 (光干渉断層計: OCT)、視細胞内節外節境界 (IS/OS) の有無の差について検討した。

C. 研究結果

6カ月間の点眼前後で、平均 logMAR 視力 ($-0.026 \pm 9.7 \rightarrow 0.025 \pm 0.011$, $P=0.002$, Wilcoxon signed-rank test)、と数値上有意な差となったが変化量が 0.2 未満のため有意な視力の変化とはいえなかった。また MP-1 の中心 2 度の平均網膜感度 ($12.33 \pm 4.77 \rightarrow 14.6 \pm 5.51$ dB, $P<0.0001$, Wilcoxon signed-rank test) (図 1)、中心 10 度の平均網膜感度は ($9.12 \pm 5.44 \rightarrow 11.01 \pm 6.20$ dB, $P<0.001$, Wilcoxon signed-rank test) と有意な上昇がみられた。また 10 度以内では平均網膜感度は、40% が 2dB 以上改善、60% が不変と悪化したものは見られなかった。HFA10-2 の MD 値、NEI VFQ-25 スコア に関しては有意な変化は認められなかった。

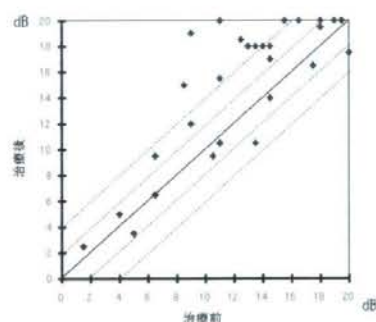


図 1 点眼前後における 中心 2 度の平均網膜感度の変化 (MP-1)

	投与前	投与後	P
視力 (logMAR)	-0.026 ± 0.095	0.025 ± 0.011	0.002
HFA10-2 MD 値	-13.9 ± 9.7	-13.8 ± 9.9	0.70
MP-1 中心 2 度	12.33 ± 4.77	14.67 ± 5.51	<0.0001
MP-1 中心 10 度	9.12 ± 5.44	11.01 ± 6.20	<0.0001
VFQ-25 コンボ 10	68.1 ± 15.2	68.9 ± 14.8	0.54

表 1 点眼前後の各平均値

MP-1 において中心 2 度の平均網膜感度が 2dB 以上上昇した 17 例とその他の 13 例については OCT にて中心窩網膜厚が改善群の平均が 196.4 ± 27.1 、非改善群 176.7 ± 68.1 , $P=0.03$ (Man-Whitney U test) と有意差が見られたが、その他年齢、確定診断された年齢、HFA10-2 の MD 値 (Man-Whitney U test)、性別、遺伝形式、ゴールドマン視野検査での障害程度、IS/OS の有無 (χ^2 検定) では両群間で有意差は認められなかった。

D. 考察

MP-1 では平均網膜感度の上昇がみられ、HFA10-2 の MD 値は有意な変化が見られなかった要因としては、HFA10-2 は中心 20 度以内を測定しているため周辺の感度 0 となっている範囲が大きく含まれており、中心の感度が多少上昇したとしても平均すると小さな変化にしかならず、有意な変化とはならなかったと考えられた。

MP-1 の結果では検査前の平均網膜感度が低すぎても、また高すぎても点眼前後で変化が見られなかった。感度が改善した群と

非改善群とで比較すると、中心窩網膜厚のみ両群間で有意差を認めた。これらの結果から、既に網膜の器質的障害が強い症例では点眼にて改善は得られないことが考えられた。

E. 結論

MP-1にて中心2度、10度内の平均網膜感度が改善したことから、定型RP患者において、ウノプロストンの点眼により黄斑部視機能が維持される可能性が示された。

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) Hiramatsu A et al: Unoprostone can preserve cone function in Retinitis Pigmentosa. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2008.

2) 平松彩子 他: 網膜色素変性におけるウノプロストン点眼による黄斑部視機能の保護効果. 第112回日本眼科学会総会, 横浜市, 2008

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) Tanito M, et al: Delayed loss of cone and remaining rod photoreceptor cells due to impairment of choroidal circulation after acute light exposure in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 48:1864-1872.2007.
- 2) Hayami K, et al: Photoreceptor protection against contrast light-induced damage by isopropyl unoprostone, a prostaglandin F2a metabolite-related compound. Ophthalmic res 33:203-209.2001
- 3) Polska E, et al. Partial antagonism of endothelin 1-induced vasoconstriction in the human choroid by topical unoprostone isopropyl. Arch Ophthalmol 120:348-352.2002.

5. 網膜色素変性と類縁疾患の遺伝子診断

高橋政代¹⁾²⁾、和田裕子³⁾⁴⁾、村上 晶⁴⁾、岩田 岳⁵⁾、石上智愛¹⁾、万代道子¹⁾²⁾

(¹⁾ 理化学研究所、²⁾ 神戸市立医療センター中央市民病院、³⁾ わだゆうこ眼科クリニック、

⁴⁾ 順天堂大、⁵⁾ 東京医療センター臨床研究センター)

研究要旨 【目的】網膜色素変性の原因遺伝子は多岐にわたるため、遺伝子診断を各施設の人員、研究費で行なっていくことには限界があり、多施設の症例を臨床検査として集中した施設で行なえるシステムを検討する必要がある。今回この前段階として数カ所の施設間の検体のやりとり、登録、遺伝子解析を検討した。

【対象と方法】2007年4月から2008年9月まで網膜色素変性およびクリスタリン網膜症疑い例について、2カ所の病院（神戸市立医療センター中央市民病院、わだゆうこ眼科クリニック）からの検体合計108例を他施設に送付し、網膜色素変性については常染色体優性遺伝形式の原因遺伝子として報告のある遺伝子17個エクソン26個を、クリスタリン網膜症についてはCYP4V2を解析した。登録はサーバー上にインターネットを通じて病型や家族歴を登録した。

【結果】網膜色素変性は102例中18例クリスタリン網膜症疑いは6例中4例で遺伝子変異箇所を検出した。網膜色素変性と診断されていたがCYP4V2の変異を認めた例や、家族歴から常染色体優性か劣性かの判断がつかない例や家族歴のない孤発例の遺伝形式が判明した。

【結論】複数施設の検体を検査施設に送付し、遺伝子解析と結果報告について問題なく行なうことができた。今後、さらに大規模に登録できるシステム作り、多施設のニーズに答えられる検査集約施設を構築することが必要である。

A. 研究目的

網膜色素変性の遺伝子診断は新規変異の研究がピークを過ぎ、現在は遺伝形式や病型解析のための臨床診断を目的とする相にある。これらを各施設の人員、研究費で行なっていくことには限界があるため、多施設の症例を臨床検査として集中した施設で行なえるシステムを検討する必要がある。今回この前段階として数カ所の施設間の検体のやりとり、登録、遺伝子解析を行なったので報告する。

B. 研究方法

2007年4月から2008年9月までに受診した明らかな常染色体劣性遺伝以外の網膜色素変性およびクリスタリン網膜症疑い例について、2カ所の病院（神戸市立医療センター中央市民病院、わだゆうこ眼科クリニック）からの検体合計108例を他施設に送付し、網膜色素変性については常染色体優性遺伝形式の原因遺伝子として報告のある遺伝子17個エクソン26個を、クリスタリン網膜症についてはCYP4V2を解析した。登録はサーバー上にインターネットを通じて病型や家族歴を登録した。

(倫理面への配慮)

各施設の倫理委員会に計画書を提出し承認された。計画は厚労省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」にのっとり、患者からのインフォームドコンセントを得て採血した。個人情報には連結可能匿名化して厳重に管理している。

C. 研究結果

常染色体網膜色素変性は102例中18例 クリスタリン網膜症疑いは6例中4例で遺伝子変異箇所を検出した。

検体は宅配便にて送付し、症例はサーバーに登録する方法で問題はなかった。

D. 考察

網膜色素変性と診断されていたが CYP4V2 の変異を認めた例や、家族歴から常染色体優性か劣性かの判断がつかない例や家族歴のない孤発例の遺伝形式が判明し遺伝カウンセリングに有用であった。

E. 結論

複数施設の検体を検査施設に送付し、遺伝子解析と結果報告について問題なく行なうことができた。今後、さらに大規模に登録できるシステム作り、多施設のニーズに答えられる検査集約施設を構築することが必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

特になし。

I. 参考文献

1. Oishi A, Akimoto M, Kawagoe N, Mandai M, Takahashi M, Yoshimura N. Novel mutations in GRK1 gene in Japanese patients with Oguchi's disease. Am J Ophthalmol. 144: 475-477, 2007
2. Jin ZB, Mandai M, Yokota T, Higuchi K, Ohmori K, Ohtsuki F, Takakura S, Itabashi T, Wada Y, Akimoto M, Ooto S, Suzuki T, Hiram Y, Ikeda H, Kawagoe N, Oishi A, Ichiyama S, Takahashi M, Yoshimura N, Kosugi S. Identifying pathogenic genetic background of simplex or multiplex retinitis pigmentosa patients: a large scale mutation screening study. J Med Genet. 45:465-72, 2008.

6. 網膜色素変性における視覚関連 QOL と視野障害の関係

山本修一、平松彩子、菅原岳史、小片一葉、萩原 章
(千葉大)

研究要旨 網膜色素変性 (RP) 患者では、従来の視機能検査法では自覚的な「見え方」の評価が困難であり、視覚関連 QOL の評価が注目されている。NEI VFQ25 を用いて、視力が良好な RP 患者を対象に、視野障害が視覚関連 QOL に及ぼす影響を調査した。周辺視野障害の程度は 7 段階に分類した。VFQ25 の平均スコアは正常対照に比較して、RP 患者で有意に低下していた。また RP 患者では視野障害が重度となるにつれスコアは低下し、有意な負の相関がみられた。またハンフリー自動視野計とマイクロペリメーターで測定した中心部の網膜感度も VFQ-25 スコアと有意に相関しており、周辺視野だけでなく中心部網膜感度も RP 患者の QOL に大きく影響することが明らかになった。

A. 研究目的

眼疾患が日常生活に及ぼす影響を評価するために視覚関連 QOL が注目されている。特に米国で開発された NEI Visual Function Questionnaire 25 (VFQ25) は、日本語版の臨床応用が報告されている。

一方、網膜色素変性 (RP) では視力と視野の障害が RP の QOL を著しく損なっており、視覚関連 QOL を患者毎に定量的に評価することは重要と考えられる。

今回の研究では、視野障害が視覚関連 QOL に及ぼす影響を調査するために、NEI VFQ25 とゴールドマン視野 (GP)、ハンフリー自動視野 (HFA)、マイクロペリメトリの関係を検討した。

B. 研究方法

矯正視力 0.7 以上の定型 RP40 例 (男性 20 例、女性 20 例、年齢 20~71 歳、平均 51 歳) を対象にした。正常者 30 例を対照とした。NEI VFQ-25 は日本語版を用いて、自己

回答により施行した。NEI VFQ-25 は 25 の質問があり、以下の 12 の下位尺度で構成されている。1) 全体的健康感、2) 全体的見え方、3) 目の痛み、4) 近見視力による行動、5) 遠見視力による行動、6) 社会的機能、7) 心の健康、8) 役割機能、9) 自立、10) 運転、11) 色覚、12) 周辺視力。このうち、全体的健康感は RP による影響を受けにくいこと、運転はほとんどの RP 患者が行っていないことから除外し、残りの 10 項目 (コンボ 10) について平均スコアを算出した。

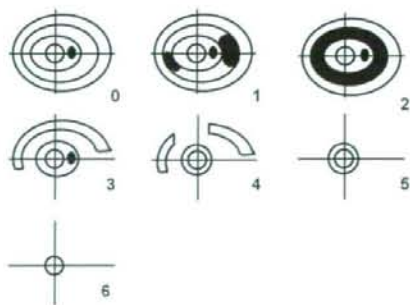


図 1 周辺視野の障害程度分類

周辺視野の障害程度はGPによって図1のような7段階に分類し、Grade 0と1を軽度群、2~4を中等度群、5と6を重度群とした。中心部網膜感度はHFA 10-2とMP-1の中心10° 24ポイントにより測定した。

C. 研究結果

下位尺度別に RP 患者と正常者と比較すると、全体的健康感、目の痛み、色覚以外の項目で RP において有意に低下し、コンボ 10 の平均スコアは軽度群 76.4、中等度群 67.6、重度群 58.9 であり、軽度群と重度群の間には有意差がみられた ($P < 0.01$)。周辺視野障害の程度が重いほどコンボ 10 のスコアは低下し、有意な負の相関がみられた (図2)。また HFA 10-2 の MD 値とコンボ 10 スコアの間 (図3)、MP-1 の平均感度とコンボ 10 スコアとの間にそれぞれ有意な相関がみられた (図4)。

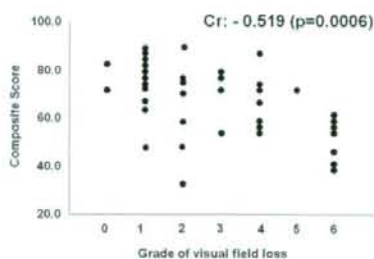


図2 周辺視野の障害とコンボ10スコア

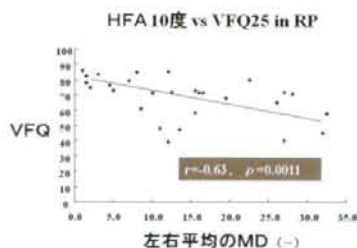


図3 HFAのMD値とコンボ10スコア

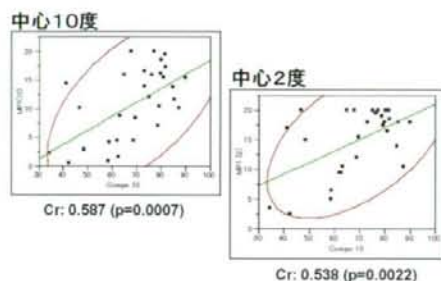


図4 MP-1の平均感度とコンボ10スコア

D. 考察

周辺視野障害が軽度な症例では、コンボ 10 の平均スコアは正常者にきわめて近い値となったが、障害が重度となるにつれスコアは低下し、中心視力が良好であっても周辺視野障害が QOL に大きな影響を与えていることが明らかとなった。また周辺視野だけでなく、眼底の中心10~20°の網膜感度もQOLにコンボ10のスコアと有意に相関しており、QOLに影響することが明らかとなった。したがって RP 患者の QOL にとって視野検査が重要と考えられる。

E. 結論

視力良好な RP 患者においては、NEI VFQ-25 のスコアは、周辺視野障害の程度や、中心部網膜の感度と良く相関しており、視覚関連 QOL を測定する上で、この方法の有用性が示された。また患者の QOL を考える場合、視野検査が指標となることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Aizawa S, et al: Correlation between visual function and photoreceptor inner/outer segment junction in patients with retinitis pigmentosa.

Eye 2008 Jan 11. [Epub ahead of print]

2) 三田村佳典、山本修一. 眼底視野計 (MP-1). あたらしい眼科 2007;24(臨時増刊):21-27.

2. 学会発表

1) Watanabe M, et al: Relationships between macular function and the NEI VFQ-25 in patients with retinitis pigmentosa, The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, 2008.

2) Ohira T, et al: Relationships between peripheral visual field loss and vision-related quality of life in patients with retinitis pigmentosa, The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, 2008.

patients with retinitis pigmentosa. Arch Ophthalmol 1997;115:53-59.

2) Mangione CM, et al. Development of the 25-item National Eye Institute Visual function Questionnaire (VFQ-25). Arch Ophthalmol 2001;119:1050-1058.

3) Suzukamo Y, et al. Psychometric properties of the 25-item National Eye Institute Visual Function Questionnaire (NEI VFQ-25), Japanese version. Health and Quality of Life Outcomes 2005;3:65-75.

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) Szlyk JP, et al. Relationship between difficulty in performing daily activity and clinical measures of visual function in

7.網膜色素変性の経過における自発蛍光、

視細胞内節外節境界、視機能の変化

相澤さやか、萩原 章、小片一葉、菅原岳史、三田村佳典、山本修一
(千葉大)

研究要旨 網膜色素変性 (RP) において、眼底自発蛍光での過蛍光領域 (AF ring) の大きさや、光干渉断層計 (OCT) で検出される視細胞内節外節境界 (IS/OS) の長さが視機能と関連していることが報告されている。そこで RP の進行に伴う AF ring や IS/OS の変化が視機能の変化とどのように関連するか検討した。1年以上の経過観察中に、網膜感度の変化量は AF ring の直径の変化量と関連したが、IS/OS の変化とは関連しなかった。視力の変化量はいずれの変化とも関連せず、RP の進行による視機能変化は、網膜感度と眼底自発蛍光によく反映されていると考えられた。

A. 研究目的

網膜色素変性 (RP) において、眼底自発蛍光 (fundus autofluorescence; FAF) での過蛍光領域 (AF ring) の大きさや、光干渉断層計 (OCT) で検出される視細胞内節外節境界 (photoreceptor inner/outer segment junction; IS/OS) の長さが視機能と関連していることが報告されている。しかし RP の経過における AF ring や IS/OS の変化と視機能の変化との関連について検討した報告はほとんどない。今回我々は RP の経過中に AF ring、IS/OS の変化と、視力、網膜感度の変化の関係について検討したので報告する。

B. 研究方法

対象は2005年8月から2008年5月までに千葉大学眼科外来にて1年以上経過観察し、FAF、OCT、MP-1を施行できたRP12例24眼で、年齢は24~63(平均47.1)歳、観察期間は12~24(平均15.6)月間であった。明らかな

黄斑疾患 (黄斑前膜、黄斑浮腫など) を認める症例、固視不良例、視力に影響する前眼部および中間透光体の異常を認める症例

は除外した。

(1) AF ring の測定 : 眼底カメラ (TRC-50IX) にて FAF を記録 (Spaide, 2003)。TOPCON の付属ソフトウェアにて AF ring の直径 (横径) を測定。

(2) IS/OS の測定 : OCT3000、グレイスケールにて IS/OS の長さを計測。

(3) 網膜感度の測定 : マイクロペリメータ (MP-1) にて黄斑中心 10° の平均網膜感度を測定。

(4) 視力 : logMAR 視力に換算

C. 研究結果

経過観察期間中に、全症例で AF ring の半径、IS/OS の長さ、視力、MP-1 による平均網膜感度はほぼ不変もしくは減少、悪化して

いた。網膜感度の変化量は、AF ring直径の変化量と有意に相関した ($P=0.0389$) (図1)が、IS/OSの長さの変化量との間には有意な相関はみられなかった ($P=0.7825$) (図2)。視力の変化量はAF ring直径およびIS/OSの長さの変化量のいずれとも有意な相関はみられなかった ($P=0.1045$, $P=0.9765$) (図3, 4)。

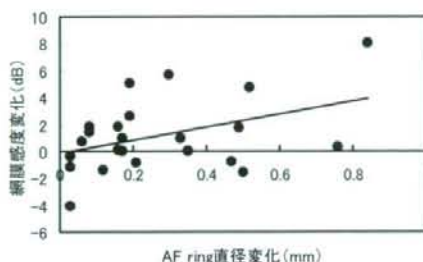


図1 AF ring と網膜感度の変化量の関係

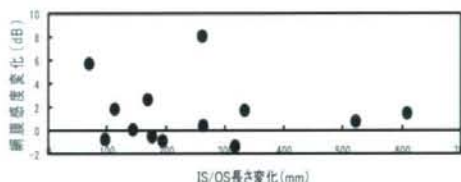


図2 IS/OS と網膜感度の変化量の関係

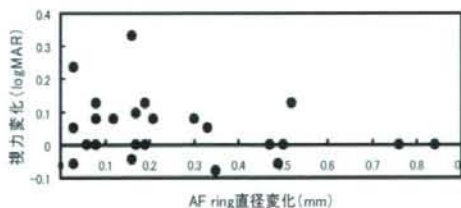


図3 AF ring と視力の変化量の関係

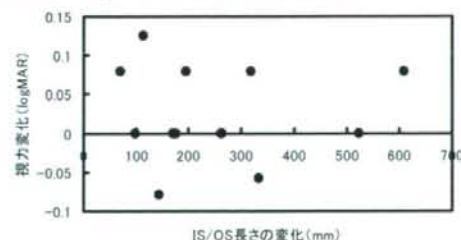


図4 IS/OS と視力の変化量の関係

D. 考察

網膜色素変性において視力や網膜感度の低下に伴って、AF ringの縮小、IS/OSの短縮化が観察されたが、変化量に関してはAF ringと網膜感度でのみ有意な相関がみられた。

E. 結論

網膜色素変性における視機能の経時的変化は網膜感度および眼底自発蛍光に良く反映される可能性が高く、今後更なる検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Aizawa S et al: Correlation between visual function and photoreceptor inner/outer segment junction in patients with retinitis pigmentosa. Eye 2008 Jan 11. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) Aizawa S et al: Correlation between visual function and photoreceptor inner/outer segment junction in patients with retinitis pigmentosa. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2007.

2) 相澤さやか 他: 網膜色素変性症における視細胞内節外節境界と視力との関連. 第111回日本臨床眼科学会、大阪市、2007.