

314 : 989-92, 2006

4. Rivera et al.:Hypothetical
LOC387715 is a second major
susceptibility gene for age-related
macular degeneration,
contributing independently of
complement factor H to disease
risk. Hum Mol Genet. : 3227-36,
2005

43. ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞

および視細胞の分化誘導

平見恭彦¹⁾²⁾、小坂田文隆²⁾、高橋和利³⁾、山中伸弥³⁾、高橋政代¹⁾²⁾

(¹⁾ 理化学研究所、²⁾ 先端医療センター病院、³⁾ 京都大 iPS 細胞研究センター)

研究要旨 【目的】網膜色素変性などの網膜変性疾患に対し、細胞移植は機能回復への一つの手段と考えられる。細胞移植治療の開発に際して患者自身から細胞が安全かつ十分に得られれば移植細胞の供給源として理想的である。今回我々はすでにヒト ES 細胞から網膜色素上皮細胞および視細胞への分化誘導で確立した方法を適用してヒト iPS 細胞から分化誘導を試みた結果を報告する。【対象】未分化ヒト iPS 細胞【方法】未分化ヒト iPS 細胞を無血清培地中で浮遊細胞塊を形成させ培養した後、接着培養を行い網膜前駆細胞のマーカー(Rx、Pax6)および視細胞のマーカー(ロドプシン、リカバリン)の発現を免疫細胞染色で検討した。【結果】Wnt および Nodal シグナルの阻害薬の存在下に浮遊細胞塊を形成させ 20 日間培養した後、接着培養を行うと分化開始後約 40 日目に網膜前駆細胞のマーカーである Rx/Pax6 陽性の細胞が一部に認められた。また 40-60 日目に色素を有する多角形の網膜色素上皮様の細胞が出現した。その後さらに接着培養を続け分化開始後 90 日目以降に培地に視細胞への分化誘導因子であるレチノイン酸とタウリンを加え、分化開始後約 120 日目には網膜視細胞のマーカーであるリカバリンとロドプシンの発現を認めた。【結論】ヒト ES 細胞から網膜細胞への分化誘導法を用いてヒト iPS 細胞においても網膜色素上皮細胞および視細胞のマーカーを発現する細胞の出現を認めた。iPS 細胞が網膜疾患への細胞移植治療の細胞供給源となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

網膜色素変性は遺伝子の異常による網膜視細胞の細胞死が進行性の網膜変性を引き起こす遺伝的網膜変性疾患である。変性が進行した網膜に対しては現在有効な機能回復の手段はなく、視細胞移植による視機能再生が有望な治療法の一つである。これまで国外では本疾患の患者への胎児網膜細胞の移植の報告があるが、いまだ治療法として確立されておらず治療の可能性を示唆するとどまっている。また動物実験レベルでは

国外国内とも疾患モデル網膜に対する胎児あるいは新生児の幼若な網膜、体性幹細胞あるいは胚性幹(ES)細胞から分化誘導された視細胞の移植効果が報告されている。細胞移植を臨床の治療に応用するにあたり移植する細胞を大量に準備する必要があるが、我が国の現状を考えると胎児網膜については大量に準備することは困難であり、ES 細胞の臨床応用については卵子、受精卵の使用に関する倫理的問題がいまだ議論の途上にある上、同種間移植による移植後の拒絶

反応の問題も解決する必要がある。

一方 2006 年にマウス体細胞へのレトロウイルスによる遺伝子導入により胚性幹細胞と近い特性(自己複製能・分化多能性)を持つ人工多能性幹(iPS)細胞が発表された。臨床応用の面で患者本人から採取した細胞を大量に培養して必要な組織や細胞へ分化させることができる可能性を示しており、移植医療の細胞の供給源となりうる。これまで我々は ES 細胞からの網膜細胞への誘導については網膜色素上皮、網膜視細胞と成果を蓄積しており、ES 細胞が網膜再生医療において移植細胞の供給源となりうる可能性が示されている。今回我々は ES 細胞から網膜細胞を分化誘導する方法をヒト iPS 細胞へ応用し同様に網膜細胞への分化誘導が可能かどうか検討した。

B. 研究方法

未分化ヒト iPS 細胞のコロニーを 10-100 個の細胞塊に分散し、無血清培地 (GMEM+ 10%KSR) 中で浮遊細胞塊を形成させ (SFEB 法)、培地中に神経分化を誘導する Dkk-1、LeftyA を添加して培養した後、poly-D-Lysine/ laminin/ fibronectin でコートしたスライド上で接着培養を行い、神経細胞のマーカー(Nestin, β III tubulin)、網膜前駆細胞のマーカー(Rx, Pax6)、網膜色素上皮前駆細胞のマーカー(Mitf)、視細胞前駆細胞のマーカー(Crx)および視細胞のマーカー(Recoverin, Rhodopsin)の発現を免疫細胞染色で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は市販されているヒト由来の培養細胞を用いた In vitro の実験である。

C. 研究結果

SFEB 法での分化誘導によりヒト iPS 細胞の神経細胞への分化を Nestin、 β III tubulin の発現にて確認した。分化開始後 40 日前後で Rx/Pax6 陽性の網膜前駆細胞および Mitf/Pax6 陽性の網膜色素上皮前駆細胞を認めた。さらに培養を継続して 60 日目には色素を有する多角形の網膜色素上皮様の細胞、80 日目には Crx 陽性の視細胞前駆細胞、また 90 日目以降培地に杆体視細胞の誘導因子であるレチノイン酸およびタウリンを添加した結果 120 日目には Recoverin、Rhodopsin 陽性の視細胞様の細胞の出現を認めた。分化誘導効率率は ES 細胞と比較してほぼ同等であった。また一方で iPS 細胞のラインによる分化誘導に対する反応の差を認め、使用し 3 ライン中 2 ラインでは ES 細胞と同様に網膜細胞への分化をみとめた 1 ラインでは網膜細胞への分化は全く見られなかった。

D. 考察

iPS 細胞は体細胞に遺伝子導入することにより細胞に初期化が起こり幹細胞の特性である自己複製能と多分化能を誘導する技術である。またヒト皮膚細胞からも iPS 細胞の作成に成功したとの報告があり今後細胞移植医療において拒絶反応のない患者由来の細胞を供給源にできる可能性がある。今回我々は ES 細胞から網膜細胞への分化誘導に成功した方法を適用してヒト iPS 細胞の in vitro での分化誘導を試み、iPS 細胞においても網膜前駆細胞、色素上皮前駆細胞、視細胞前駆細胞および視細胞マーカーの発現を確認した。また iPS 細胞において細胞ラインによって分化誘導への反応性に相違

がある可能性があることもわかった。今後は未分化細胞の除去といった移植細胞の純化が必要かどうか、分化した細胞が網膜変性モデル動物などへの移植により実際に機能を回復させられるかどうか、など移植医療の実現化に向けての検討が必要であろう。

E. 結論

ES 細胞から網膜細胞への分化誘導法を用いてヒト iPS 細胞においても網膜前駆細胞および視細胞マーカーを発現する細胞、網膜色素上皮様の細胞の出現を認めた。さらに分化誘導された網膜細胞の機能評価、未分化細胞の除去など今後の検討が必要であるが iPS 細胞が細胞移植治療において移植細胞の供給源となる可能性を示唆する結果であった。

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

第8回日本再生医療学会（東京、2009.3.6-7）で「ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞および視細胞の分化誘導」として発表予定。

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. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676, 2006.
2. Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872, 2007.
3. Haruta M, et al. In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1020-1025, 2004.
4. Ikeda H, et al. Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11331-11336, 2005.
5. Watanabe K, et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8:288-296, 2005.
6. Osakada F, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 26: 215-224, 2008

44. マウス変性網膜への視細胞移植

万代道子¹⁾、本間耕平¹⁾、石上智愛¹⁾、山田千佳子¹⁾、平見恭彦²⁾、高橋政代¹⁾

(¹⁾ 神戸理化学研究所、²⁾ 先端医療センター)

研究要旨 急性傷害モデル (MNU モデル)、遺伝性慢性変性モデル (rd マウス) のそれぞれ変性進行過程で異なる時期に視細胞を移植し、その生着状態について検討した。rd マウスでは杆体細胞の変性進行期 (2 週令)、変性終焉期 (3 週令)、変性後 (4 週令) に、MNU では発症前 (MNU 投与 1 日後)、変性進行期 (5 日後)、変性後 (7 日後) に移植を行い、2 週後に評価を行った。rd マウスでは観察した時点までのグリオーシス反応は強くなく、変性後の移植においても 2 次ニューロンとの接触像がみられ、いずれの時期においても視細胞の生着が得られた。MNU モデルにおいても生着はみられたが、グリオーシスの影響が強く、コンドロイチナーゼの投与により 5 日目、7 日目の生着細胞数は増加したが、同時にマイクログリアの集積数の増加もみられた。

A. 研究目的

野生株マウスにおいては生後 3 日令から 7 日令位の発育段階の視細胞であれば、成体網膜内にきれいに生着することが報告され (1)、我々のところでも確認している。今回は、急性、慢性 2 つの変性モデルを用いてその進行過程の時期をかえて視細胞が生着するかどうかを観察した。また、我々は以前移植時のコンドロイチナーゼ添加が MNU モデルにおいて生着率をあげる可能性を報告したが (2) 異なる移植時期におけるコンドロイチナーゼの効果についても検討した。

B. 研究方法

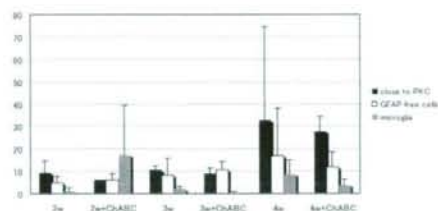
6-8 週令の BL6 に 50mg/kg の MNU を腹腔投与し、急性変性モデルを作成、その 1 日後、5 日後、7 日後に移植を行った。C3H/HeJ(rd) マウスでは 3 週令、4 週令、5 週令で移植を行った。MNU 5 日後、7 日

後及び rd マウスの移植では、コンドロイチナーゼ (0.05U/ μ l) を添加したものとも比較した。移植細胞には生後 3 日から 7 日令の GFP または Nrl-GFP マウス網膜を用いた。移植網膜は 2 週間後に固定し、GFP (移植細胞)、GFAP、Iba1 (microglia) PKC (rod bipolar) の免疫染色を行い、移植細胞の生着数、移植細胞と microglia, glia 細胞、2 次ニューロンとの関係の評価した。

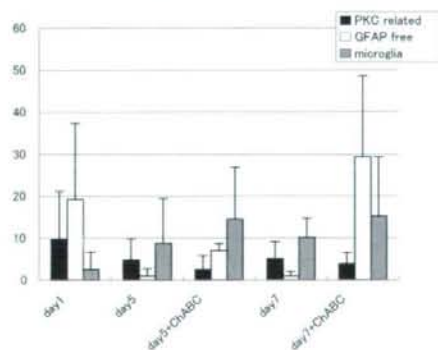
C. 研究結果

rd マウスにおいてはマイクログリア集積数、GFAP 発現とも 2-4 週令では 2 週令が最大で、あとは徐々に低下した。2-4 週令においていずれの時期にも視細胞の生着がみられ、移植細胞による特異的なマイクログリアの活性化や GFAP 強陽性像はみられなかった。2 週令でのコンドロイチナーゼ添加はマイクログリアの集積を増強した。多くの移植細胞は残存した外層のさらに外側

に位置したが、PKC 陽性細胞の突起伸長によりシナプス形成は可能な位置にあるものも多く見られた。



MNUモデルにおいては3-5日目にマイクログリア集積とGFAPが増強するが、早期のMNU投与後1日目は比較的生着がよかった。このモデルではグリオーシスの影響がみられ、5日目、7日目の移植においてはコンドロイチナーゼを添加しなければグリアのバリアを超えての生着は極めて少なかった。しかし、コンドロイチナーゼ添加は同時にマイクログリアの集積も増強する傾向がみられた。



D. 考察

遺伝的網膜変性モデルにおいては杆体変性直後の時期の時期でもグリオーシスは穏やかで、マイクログリアによる炎症所見なども比較的穏やかと思われた。異所性であってもPKC陽性細胞の突起と移植細胞の突起が接する像がみられ、シナプスを形成しうる可能性が示唆された。MNU傷害モデ

ルにおいても細胞は生着しうるが、グリオーシス及びマイクログリアによる炎症増強をコントロールすることが移植細胞生着のための一つのポイントと考えられた。

E. 結論

遺伝的慢性変性モデル、及び急性傷害モデルにおいて、変性早期、後期、いずれにおいても移植細胞が生着しシナプス形成しう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

万代道子：移植時宿主網膜の環境の検討—成体網膜と新生児網膜 日本臨床眼科学会2008
万代道子：マウス網膜への視細胞移植の条件検討、再生医療学会 2009

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) MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. NATURE 444: 203-207, 2006;

- 2) Suzuki T, Akimoto M, Imai H, et al.
Chondroitinase ABC treatment enhances
synaptogenesis between transplant and
host neurons in model of retinal
degeneration. Cell Transplant.16:493-503,
2007

45. 未熟児網膜症における G-CSF の病的新生血管抑制作用 と神経保護効果作用

小島洋史、大谷篤史、佐々原学、牧山由希子、吉村長久
(京都大)

研究要旨 未熟児網膜症、糖尿病網膜症など、正常血管退縮と病的血管新生が生じる病態の治療として、未熟児網膜症モデルマウスに G-CSF を投与し検討する。血管に対しての影響、また神経に対しての影響を観察し、そのメカニズムを探る。

A. 研究目的

医療が発展する中、未熟児は現在も増加しており、未熟児網膜症も小児の視機能障害の原因として重要度が増している。大部分は軽症であり、また、治療法の発達により一部の重症例を除いて、その予後は改善しつつある。しかしながら重症例は存在し、軽症例でも長期経過で視力障害、屈折異常、白内障などの合併症が報告されている。そこで、未熟児網膜症モデルマウスを用い、G-CSF の網膜血管に対する作用と網膜の神経保護作用を検討し G-CSF の眼科臨床応用の可能性を探る。

B. 研究方法

C57BL/6J マウスを 7 日齢から 12 日齢まで 75% の酸素条件下で飼育した後、通常酸素下に戻し、未熟児網膜症モデルマウスを作成した。G-CSF は 6 日齢から 10 日齢まで連続 5 日間腹腔内注射をする早期投与群と、12 日齢から 16 日齢の間に注射する後期投与群で比較した。どちらの群も 17 日齢にて眼球摘出し、血管染色のうえ網膜を展開、無血管野面積と病的新生血管面積を測定した。また、30 日齢にて bright flash ERG, cone ERG を測定し、視機能を検討した後、網膜凍結切片を作成し組織を観察した。また、培養した人網膜血管内皮細胞

に G-CSF を 24 時間投与し、その後 1 時間 10mM の過酸化水素を投与。flow cytometry を用いてアポトーシスを検出した。

C. 研究結果

17 日齢において、後期投与群ではコントロール（生食注射）と比べ差は認めなかったが、早期投与群においては無血管野面積と病的新生血管面積ともに有意に減少した ($P<0.05, P<0.01$)。また早期投与群は 30 日齢においてコントロールと比べ、ERG で a 波、b 波ともに有意に振幅が高く、かつ網膜凍結切片で外網状層の減少が抑制された。培養細胞では G-CSF を加えることによりアポトーシスの減少がみられた。

D. 考察

今回の研究結果は G-CSF が従来より認められている神経保護効果の確認したことと、病的血管退縮の抑制作用があることがわかった。ただ、神経保護効果に関しては直接的効果か、血管が保護されたことによる二次的な効果かはわからない。今後は、神経保護、血管内皮保護のメカニズムを調べていきたい。

E. 結論

G-CSFには血管細胞・神経細胞への直接的な保護作用があり、未熟児網膜症では形態的・機能的に網膜症の重症化を防ぐことができる可能性がある。また、同じく病的血管退縮が起こる糖尿病網膜症、放射線網膜症、血管病態に関わる神経変性などにも応用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Oishi A et al: Granulocyte colony-stimulating factor protects retinal photoreceptor cells against light-induced damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 49(12):5629-35,2008 .

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

なし

46. 骨髄由来幹細胞の薬剤による賦活で網膜疾患を治療する

大谷篤史、佐々原学、牧山由希子、小島洋史、吉村長久
(京都大)

研究要旨 骨髄由来末梢血幹細胞を賦活し、網膜・脈絡膜疾患の治療を行うことを目的とする。骨髄由来細胞の中でも特に眼疾患への関与が強いと考えられる、ミエロイド系細胞の機能を指標とし、既存薬剤を用いた賦活法を提案し、その治療効果を動物実験で実証した。骨髄由来細胞の薬剤（顆粒球コロニー刺激因子・エリスロポエチン）による賦活で脈絡膜新生血管膜に拡大阻止と網膜色素変性進行遅延効果が得られた。新たな治療戦略としてヒト疾患での臨床応用を考えたい。

A. 研究目的

我々はこれまで骨髄由来幹細胞が網膜疾患の病態に強く関わっている可能性を実験的、臨床的に研究し、骨髄由来幹細胞は網膜疾患に対し保護的に働く可能性を見出してきた。今回、骨髄由来幹細胞の機能を薬剤により賦活することが可能か、さらに賦活が難治性網膜疾患の新たな治療となりうるか検討した。

B. 研究方法

顆粒球産出促進・好中球機能増強作用があるサイトカイン、顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte-colony stimulating factor；GCSF）と赤血球産生促進ホルモンであるエリスロポエチン（erythropoietin；EPO）をマウスに投与し、網膜疾患と関連が深いと考える骨髄由来幹細胞機能としてコロニー形成能（CFU-GM）を測定した。効果は網膜色素変性症マウスモデル（rd1, rd10）とレーザー誘発脈絡膜新生血管（CNV）モデルで評価した。

C. 研究結果

GCSF、EPO単独投与より、GCSF（300 g/kg）とEPO（1000 IU/kg）の同時5日間投与で、CFU-GMを約3倍にすることが出来た。この条件で両薬剤を網膜色素変性症マウス、CNVモデルマウスに投与したところ、有意な神経変性の遅延効果、CNVの拡大抑制効果が得られた。これらは、色素変性症では骨髄細胞硝子体投与、CNVモデルでは若年骨髄移植による治療効果と同じものであった。また、これらの効果は骨髄由来幹細胞を介している事も確認できた。

E. 結論

上市されている薬剤を使って、骨髄由来幹細胞の機能を治療効果が得られるレベルにまで上げられることがわかり、網膜疾患治療に応用できる可能性を示すことが出来た。これまでに無いメカニズムの治療であり、今後発展させることで難治網膜疾患の解決に少しでも寄与したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Activation of bone marrow-derived microglia promotes photoreceptor survival in inherited retinal degeneration. Sasahara M, Otani A, Oishi A, Kojima H, Yodoi Y, Kameda T, Nakamura H, Yoshimura N. Am J Pathol. 2008;172:1693-703

Circulating Hematopoietic Stem Cells in Patients with Idiopathic Choroidal Neovascularization. Sasahara M, Otani A, Yodoi Y, Yoshimura N. Invest Ophthalmol Vis Sci. in press

Circulating hematopoietic stem cells in patients with choroidal neovascularization secondary to pathologic myopia. Sasahara M, Otani A, Yodoi Y, Gotoh N, Kameda T, Yoshimura N. Eye. in press

2. 学会発表

大谷篤史 網膜脈絡膜手術と生体反応—生体反応の個人差が疾患予後に影響する？日本眼科学会シンポジウム 2008 横浜

大谷篤史、佐々原学、大石明生、小嶋 洋史、牧山由希子、中村元、吉村長久 骨髄由来細胞活性化による網膜色素変性治療
網膜硝子体学会 2008 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

骨髄由来幹細胞、前駆細胞機能賦活による網膜疾患治療 (特願 2008-033267)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1. 参考文献

なし

47. 網膜色素変性の遺伝相談に関する課題

岩田文乃、高林雅子、村上 晶
(順天堂大)

研究要旨：網膜色素変性の遺伝相談（遺伝カウンセリング）について、実際の相談事例の記録を分析し、抽出された具体的な課題を検討した。多様な心理社会的課題があることが示されたが、今後、遺伝子診断や治療法の開発とともに遺伝に関する相談の内容や課題は変化してゆくと考えられ、それらの変化に応じたより良い対応のためにさらに研究を重ねてゆく必要があると考えられる。

A. 研究目的

網膜色素変性の治療法は確立されておらず変異遺伝子の検出は罹患者の一部にとどまるため、遺伝に関する対応は単純、容易ではない。

一方、「遺伝カウンセリング」は2008年診療報酬改定により加算が一部導入されるなど、診療面での位置づけの変化が起きている。また、「遺伝カウンセリング」の定義は時代とともに変化し、医学的な情報提供や再発率の推定、自己決定の支援から、来談者が人生をどのようにとらえ、生きてゆくのかという心理社会的側面での視点に発展している¹。

網膜色素変性による視覚障害は、さまざまな日常の適応に問題を生じ、それは糖尿病よりも顕著である²とする報告があり、日本においても障害や診断告知に関する心理社会的課題^{3,4,5,6}が重視されてきている。しかし本疾患の遺伝が与えている心理社会的影響について日本ではアンケート調査による報告^{7,8}が散見される程度である。

社会の変化や診断技術・治療法の開発とともに変化し、呼応する医療上の対応のためには、診断や治療法と並行して遺伝相談に関しても研究し備えておく必要がある。

また、眼科診療や他科との連携の中でどのように対応してゆくべきか、今後起きうる課題を医療制度を含めて検討する必要がある。

網膜色素変性の遺伝相談（遺伝カウンセリング）について、臨床での相談事例の記録の分析により、具体的な課題を抽出し、今後のより適切な対応を検討するための基盤とすることを目的とする。

B. 研究方法

ある6ヶ月間、順天堂大学眼科遺伝外来に網膜色素変性の遺伝相談で受診した症例のうち、医師1名、非医師2名が同席し、この3

名の書き取り記録を検討に用いることができた4症例の記録を対象とした。

担当者が課題と感じた点を抜き出し分類することで、質的に解析した。

（倫理面での配慮）個人が特定されないよう配慮し、質的分析を行った。

C. 研究結果

今回扱った面談記録から抽出された課題として、3点あげられた。

（1）来談理由と面談の中心テーマに関する課題として、来談者が予約時あるいは面談開始時にあげた来談理由は必ずしも面談の中心テーマと一致しなかったり、来談理由が予約時から問診票記入、面談時にわたり変化したりする事例が散見された。遺伝の相談といつて来談されていても、話し合う中で見えてくる主たるテーマは他の健康問題や疾患の治療そのものに関する事、あるいは家族とのコミュニケーションなどの心理社会的問題である場合も少なくなかった。そうした中には眼科での遺伝相談の範囲を越えていると考えられるテーマも存在した。

（2）要求された情報を提供しても満足がえられない状況として、来談理由としてあげられた「遺伝する確率を知りたい」などの要望に対応して情報を提供しても、心理的には納得できず満足が得られないケースが複数存在した。「求めている答えは0%」であると語られた事例は複数あり、情報を得ても納得できずに来談を繰り返している事例もあった。

（3）時間経過とともに変化がみられた例としては、初期は複数回の面談を通して家族に疾患や遺伝の可能性を伝えることについて方向性が見出せない状況だったが、時間を経て家族に話ができ状況に変化がみられたケースが存在した。

D. 考察

一般的な診療では最初に「主訴」を聞いてそれに従って診察・面談を進めるが、遺伝相談においては、来談者が抱える真の問題は必ずしも最初にあげられる来談理由とは一致せず、対話の中で新たにテーマが見出されてくる可能性や、遺伝以外の医学的問題や心理社会的問題がある可能性も念頭において面談を実施することが重要である。

また、遺伝医学的情報提供が来談者の問題の解決や満足をもたらさない状況に対しては、心理カウンセリング技術の応用も検討するとともに、遺伝相談の限界を考慮し他の専門職との連携なども考えるべきであると考えられた。そのための日頃他科との協力体制を構築することが望ましいと考えられる。

同時に、効果があがらず行き詰まったように思われても時間経過とともに進展がみられる可能性があることを認識するべきである。

遺伝に関する相談の課題は多様であり、眼科診療の中の位置づけやどのように個々の遺伝に関する相談に対応してゆくの望ましいのか更なる検討が必要であると考えられる。

E. 結論

遺伝相談の書き取り記録を分析し、現在の網膜色素変性の遺伝相談における課題を分析した。それらの課題は遺伝医学的情報の現状とは別に、いずれも心理社会的課題といえるものであった。眼科での対応と時間経過により変化が見られた例もあったが、眼科のみの対応では困難と考えられた例もあり、他の専門職などとの連携も重要であると考えられた。

今後の遺伝子診断や治療法の開発とともに遺伝に関する相談の内容や課題は変化してゆくと考えられ、その変化に応じたより良い対応のために常に研究を重ねてゆく必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

岩田文乃：網膜色素変性の長期予後—情報提供のあり方を考える。眼科臨床紀要 11, 1108. 2008.

2. 出版物

岩田文乃：網膜色素変性を診断したとき、若倉雅登、稲富誠（編）：眼科実践Q&A、南江堂（東京）pp240-241. 2008

3. 学会

（学会一般演題）

高林雅子、岩田文乃、村上晶：ロービジョンへの対応が困難な患者の支援の課題。第62回臨床眼科学会、東京、2008.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1 特許	なし
2 実用新案登録	なし
3 その他	なし

I. 参考文献

1. Biesecker BB, Erby L. Adaptation to living with a genetic condition or risk: a mini-review. Clin Genet. 2008; 74: 401-7.
2. Jandra D, Ganesh A et. al. Psychosocial adjustment to visual loss in patients with retinitis pigmentosa. Ophthalmic Genet. 2007; 28:25-30.
3. 高林雅子. 網膜色素変性患者の視点からみた心理的援助の課題. ロービジョン学会誌. 2003; 3:39-45.
4. 高林 雅子、岩田 文乃、村上 晶：網膜色素変性患者の「心理的援助」の課題—順天堂大学眼科学教室同窓会アンケート調査と患者の声から。2007；臨眼 61, 1233-1236.
5. 河野友信、若倉雅登 編。：中途視覚障害者のストレスと心理臨床。銀海舎、2003.
6. 上野英子ら. 中途視覚障害者における価値転換の過程に関する探索的研究 障害に対する気持ちの変容を中心に. 第9回日本ロービジョン学会抄録集. p 125, 2008.
7. 武田美鈴ら. 網膜色素変性患者を対象とした遺伝カウンセリングおよび遺伝子診断における意識調査. 第29回日本遺伝カウンセリング学会抄録集 p27, 2005.
8. 鈴木智子. 網膜色素変性患者に心理社会的影響を与える医療情報の要因. 日本ロービジョン学会誌. 2008; 8:66-70.

48. 網膜色素変性の黄斑体積と黄斑部局所 ERG の相関

近藤峰生、杉田糾、朴昌華、伊藤逸毅、寺崎浩子
(名古屋大)

研究要旨 網膜色素変性 (RP) では黄斑部の機能は比較的後期まで保たれるので黄斑部の評価は重要である。今回我々は光干渉断層計 (OCT) を用いて黄斑部の形態、特に黄斑体積を計測し、この値と黄斑部局所 ERG の振幅との相関について研究した。その結果、両者の値は相関したものの、その相関の程度は非常に低いことがわかった。相関の程度が低い理由は、黄斑体積が正常でありながら局所 ERG の振幅が低い患者が存在するためであった。今回の結果から、黄斑の形態のみから黄斑機能を完全に把握することはやはり困難であり、形態と機能の両面から黄斑部を評価することが重要であることが示唆された。

A. 研究目的

網膜色素変性 (RP) では黄斑部の機能が比較的後期まで保たれるため、病態の把握や予後の予測には黄斑部の評価が重要である。RP の黄斑機能評価として黄斑部局所網膜電図 (ERG) がしばしば用いられ、また黄斑形態評価としては光干渉断層計 (OCT) が最近よく使用される。しかしその両者の相関について詳細に調べた報告は少ない。そこで今回我々は、43 名の RP 患者において黄斑部局所 ERG と OCT の計測を行い、両者の相関について検討した。

B. 研究方法

視力が 0.3 以上の定型網膜色素変性患者 43 名 43 眼を対象とした。黄斑形態評価には Zeiss 社の OCT3 を用い、Fast macular thickness map protocol にて直径 6 mm 内の黄斑体積を計測した。また、OCT のグレイスケール画面によって視細胞内節/外節境界 (IS/OS) が検出可能な長さを計測した。黄斑部局所 ERG は直径 15 度のスポット刺激を

用いて記録し、a 波と b 波の振幅を計測した。

(倫理面への配慮)

今回の研究は、検査についての十分な説明後に患者の承諾を得て行なった。

C. 研究結果

黄斑部局所 ERG の振幅と黄斑体積には有意な相関がみられた ($P < 0.05$)。また視細胞内節外節境界 (IS/OS ライン) が長く残存している患者の方が、そうでない患者よりも黄斑部局所 ERG の振幅が有意に保たれていた ($P < 0.05$)。しかしながら、これら 2 つの相関の程度は非常に弱いものであった。相関の程度が弱かった理由は、正常な黄斑体積や長い IS/OS を有していながら黄斑部局所 ERG の振幅が非常に低い患者が数例存在していたためであった。

個々の患者の OCT データと局所 ERG の振幅を解析すると、特に 4 名の RP 患者では、黄斑体積が全く正常で IS/OS ラインの長さも 4mm 以上保たれていながら、黄斑部局所 ERG の振幅が a 波 b 波ともに正常下限より

小さな値であった (図1)。

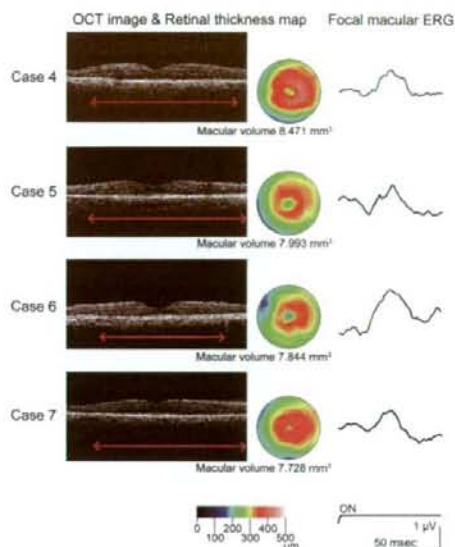


図1 黄斑体積が正常で、IS/OSラインも4mm以上保たれているが黄斑部局所 ERG が正常以下であった4名のRP患者

D. 考察

黄斑の形態が保たれているが黄斑部局所 ERG の振幅が小さかった4名のRP患者の機序として、(1) RP患者の黄斑ではまず機能低下があり、その後に黄斑形態の変化が現れてくる可能性、(2) RP患者の中には、形態が比較的保たれたまま黄斑機能が低下する subgroup が存在する可能性、の2つが考えられた。黄斑部の形態が比較的保たれている状態では遺伝子治療も細胞移植も効果が得られやすいといわれている。形態と機能の両者の解析は、RPの将来の治療適応に向けても重要な情報になりうると考えられた。

E. 結論

今回の結果により、黄斑の形態は比較的保たれていてもその機能が重度に障害されて

いるRP患者が存在していることがわかった。黄斑部の形態と機能の両方を評価することは、患者の視機能予後や将来の治療適応を考える上で重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sugita T, Kondo M, Piao CH, Ito Y, Terasaki H. Correlation between macular volume and focal macular electroretinogram in patients with retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49:3551-3558.

2) Nishihara H, Kondo M, Ishikawa K, Sugita T, Piao CH, Nakamura Y, Terasaki H. Focal macular electroretinograms in eyes with wet-type age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49:3121-3125.

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) Ikenoya K, Kondo M, et al. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes of patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48:3312-3317.

49. 網膜色素変性モデルゼブラフィッシュにおける視細胞死の検討

中尾武史、松村永和、辻川元一、田野保雄

(大阪大)

研究要旨

網膜色素変性をはじめとした遺伝性網膜疾患は視細胞死を引き起こすことが知られており、現在までに多くの原因遺伝子が単離されてきた。我々はその中でもヒトの常染色体優性遺伝網膜色素変性に注目し、その原因の1つとしてすでに報告のあるロドプシン変異 Q344X (Gln-344-ter) をもつゼブラフィッシュ変異体を作成し、さらにこの変異体の表現型を検討した。このトランスジェニック体は受精後5日目から桿体が細胞死を起こしていた。しかしながら光照射によりその視細胞死は顕著には促進されないと考えられた。

A. 研究目的

網膜色素変性は遺伝子座異質性が高く、その病態を解明するために種々のモデル動物を用いての研究が報告されている。この研究の目的はヒトのロドプシン変異をもつモデルゼブラフィッシュを作成しその表現型について検討することである。

B. 研究方法

ヒトのロドプシン Q344X 変異をもつトランスジェニック体を作成するために、ゼブラフィッシュトランスポゾン *tol2* システムを用いた。*tol2* システムはゲノム上を移動するトランスポゾンと呼ばれる配列を使ったゼブラフィッシュの遺伝子導入システムであり、遺伝研の川上により開発された。これにより非常に高い効率でゲノムに目的の遺伝子を導入することが可能である。このシステムを用い、ゼブラフィッシュのロドプシン RH1 プロモータの下流にヒトのロドプシン Q344X 変異を導入するためのコンストラクトを作成し、受精卵にマイクロインジェクションすることにより G0 トランスジェニック体を得た。さらに G0 フィッシュを野生型と交配することにより得た

F1 フィッシュとロドプシンプロモーターで駆動した GFP により桿体を可視化したラインとを交配することにより桿体が GFP により標識された Q344X 変異体を得た。野生型およびロドプシン Q344X 変異体、それぞれについて受精後 2、3、4、5、7 日目の冷凍切片を作成し、蛍光顕微鏡にて視神経を含む断面の視細胞の数をカウントすることにより視細胞の生存を定量的に比較した。また、光毒性による視細胞死を検討するために Q344X 変異体について受精後 5 日間 800 lux の光を照射し続けた群とコントロール群として通常の光サイクル (200 lux 14 時間、遮光 10 時間) 群との視細胞数を比較した。

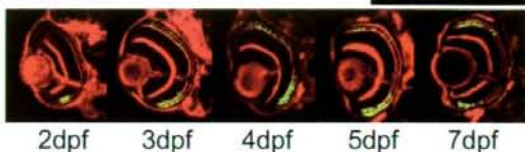
(倫理面への配慮)

本研究において該当事項はない。

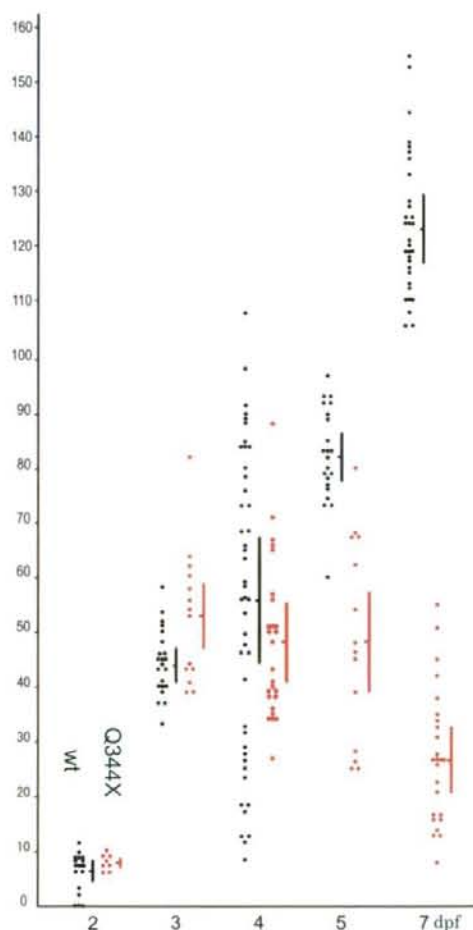
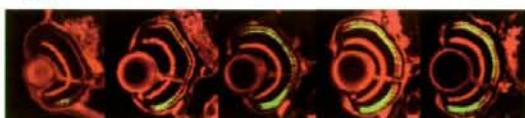
C. 研究結果

Q344X 変異体は野生型と比較し受精後 2、3、4 日目においては視細胞数に有意差を認めなかったが、5、7 日目では有意に ($p < 0.01$) 生存視細胞の数が少なかった。受精後 5 日間光を照射し続けた群はコントロール群と比較し有意な差がなかった。

Q344X



wt



Wt と Q344X 変異体における視細胞数の比較

D. 考察

ロドプシン Q344X 変異はヒトの表現型では比較的軽度と報告されているが、Q344X 変異をもつゼブラフィッシュにおいて5日目から視細胞の減少を認めたが、他の色素変性モデル動物にみられるような光毒性による視細胞死は確認できなかった。さらには遮光により視細胞死が抑制されるのかの検討も今後の課題と思われる。今回検討した Q344X 変異はロドプシンの C 末端から 5 番目のアミノ酸に変異があり、ロドプシン変異の Class I に分類され、ロドプシンの外節への輸送に異常をきたすことによりロドプシンの局在異常をおこすと報告されている。今後さらに他のヒト常染色体優性遺伝ロドプシン変異についてもモデルフィッシュによる検討を準備している。ヒトの変異をもつモデルフィッシュを作成し、表現型を検討することにより視細胞死のメカニズムの解明につながる可能性があると考えられる。

E. 結論

tol2 システムにより網膜色素変性の原因の 1 つであるヒトロドプシン変異 Q344X をもつゼブラフィッシュ変異体を作成することができた。この変異体は受精後 5 日目より有意な視細胞死をおこした。しかしながら光照射によりその視細胞死は顕著には促進されないと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Nakao T, Tsujikawa M, Tano Y:

Phototransduction Accelerates Photoreceptor Cell Death in a Zebrafish Model. The

association for research in vision and ophthalmology May 6 2007

2. 中尾武史、辻川元一、田野保雄: ゼブラフィッシュ変異体 *ov1* における視細胞死とフォトトランスダクション 第112回日本眼科学会総会(横浜) 2008年4月17日

3. Nakao T, Tsujikawa M, Tano Y: Phototransduction and photoreceptor cell death are closely related in a zebrafish model. The association for research in vision and ophthalmology April 30 2008

4. Nakao T, Tsujikawa M, Tano Y: Suppression of Cyclic GMP-Phosphodiesterase Beta Subunit Has an Insignificant Effect on Photoreceptor Cell Death in a Zebrafish Model. 2008 World Ophthalmology Congress (Hong Kong) July 1 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. Tsujikawa M, Malicki J: Intraflagellar transport genes are essential for differentiation and survival of vertebrate sensory neurons. *Neuron*. 2004 Jun 10;42(5):703-16.

2. Kawakami K: Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol*. 2007;8 Suppl 1:S7. Review.

50. 網脈絡膜変性疾患の *in vitro* モデルの確立および細胞変性機構におけるアミノ酸輸送の関与

安藤 彰、大中誠之、金子志帆、中内正志、山田眞末、伊藤誠二、高橋寛二
(関西医大)

研究要旨 網脈絡膜変性疾患の一つである脳回転状脈絡網膜萎縮症 (Gyrate atrophy of the choroid and retina) は網脈絡膜変性病巣と健常部が混在して脳回転様の特徴的な眼底所見を呈する疾患で、オルニチンアミノ基転位酵素 (OAT) の欠損と高オルニチン血症を伴う (参考文献 1)。オルニチンはアルギニンから産生されプロリンへと代謝されるアミノ酸であり、高オルニチンあるいは低プロリン状態が病態に関係することが示唆されており、遺伝子組み換えによる OAT 遺伝子欠損マウスを用いた実験で、最初に障害されるのは網膜色素上皮細胞であることが分かっているが (参考文献 2)、網膜色素上皮細胞が特異的に障害される理由は不明である。我々はヒト培養網膜色素上皮細胞に OAT 阻害剤である 5-フルオロメチルオルニチン (5-FMOrn) を作用させて OAT を失活させるとオルニチンが細胞毒性を示すことを見出し、脳回転状脈絡網膜萎縮症の *in vitro* モデルを作製した (論文発表 1、学会発表 1, 2)。さらにこのモデルを初代培養のウシ網膜色素上皮細胞に適用し、オルニチンの細胞毒性がヘテロ性を示すことを見出した (論文発表 2、学会発表 3)。初代培養網膜色素上皮細胞はアクチンフィラメントの分布が異なる 2 種類の形態 (敷石様細胞と紡錘状細胞) が存在し、敷石様細胞でのみオルニチンの細胞毒性が見られ、特徴的な眼底所見に関連があると推察している。またオルニチンによる網膜色素上皮細胞障害がその代謝産物であるプロリンによって抑制されるため (論文発表 1、学会発表 1, 2)、網膜色素上皮細胞のオルニチンの細胞毒性に関して他のアミノ酸の効果を検討したところ中性および非電荷極性アミノ酸がオルニチンの細胞毒性を減少させることを見出した (論文発表 4)。オルニチンはポリアミンに代謝されるため、ポリアミンの細胞障害への関連を疑い細胞毒性を検討したところ 10mM の濃度のスペルミンで網膜色素上皮細胞に障害がみられた (論文発表 3)。OAT 欠損と高オルニチン状態がもたらす網膜色素上皮細胞障害にアミノ酸輸送とポリアミンが密接に関連していることを明らかにした。

A. 研究目的

脳回転状脈絡網膜萎縮症はオルニチンアミノ基転位酵素 (OAT) の欠損とそれによる高オルニチン血症を伴う。高オルニチンあるいは低プロリン状態が病態に関係すると考えられているが、網膜色素上皮細胞が特異的に障害される理由は解明されていない。OAT 失活状態の網膜色素上皮細胞に対するオルニチンの影響を調べ、網膜色素上皮細胞の変性機構を解明する。

B. 研究方法

1. ヒト培養網膜色素上皮細胞株に OAT 阻害剤である 5-フルオロメチルオルニチン (5-FMOrn) を作用させて OAT を失活させてからオルニチンを作用させて細胞毒性が生じるかどうか、またその濃度、時間依存性を検討する。
2. ウシ初代培養網膜色素上皮細胞を用いてより *in vivo* に近い状態での検討を行う。
3. オルニチンの代謝物の一つであるポリアミンを各種濃度で網膜色素上皮細胞に添加して培養し、細胞の増殖能、生存率への影響を検討する。

4. オルニチンのもう一つの代謝物であるプロリンによる OAT 失活網膜色素上皮細胞のオルニチンによる障害への影響を検討する。

5. 同様に他のアミノ酸による細胞障害への影響を検討する。

C. 研究結果

1. 5-FMOm による OAT 失活網膜色素上皮細胞ではオルニチンの濃度依存的に DNA 合成が抑制されていた(図 1)。

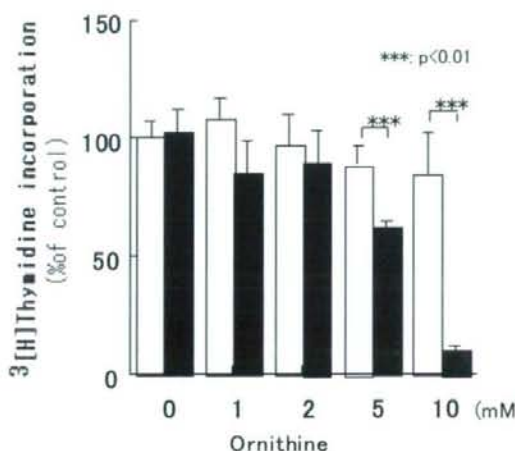


図 1 オルニチンによる DNA 合成抑制

細胞の形態では 3 種類のヒト網膜色素上皮細胞株で細胞障害が確認できた(図 2)。

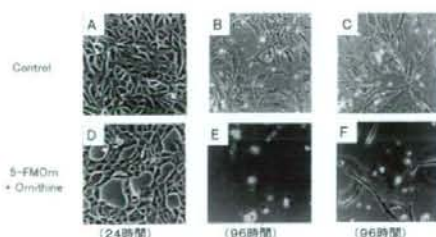


図 2 ヒト網膜色素上皮細胞株#240、#286、#297の OAT 失活状態でのオルニチンによる細胞障害

2. 初代培養のウシ網膜色素上皮細胞を用いて検討した。ウシ初代培養網膜色素上皮細胞には形態的に 2 種類のサブグループが存在し、アクチンフィラメントの分布が異なる 2 種類の形態(敷石様細胞と紡錘状細胞)を示し、敷石様細胞のみでオルニチンによる細胞障害がみられた(図 3)。

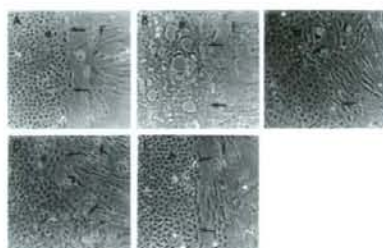


図 3 敷石様と紡錘様網膜色素上皮細胞におけるオルニチンの細胞障害の違い

3. ポリアミンに関しては、4mM の濃度のスペルミンで網膜色素上皮細胞の DNA 合成が抑制され、また 10mM の濃度のスペルミンで細胞に障害がみられた(図 4)。

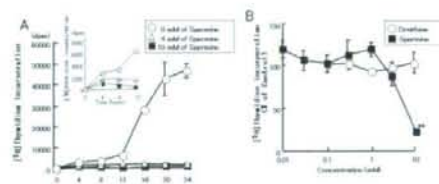


図 4 ポリアミンの網膜色素上皮細胞の DNA 合成能への影響

4. オルニチンによる網膜色素上皮細胞障害は、その代謝産物であるプロリン(10mM 濃度)によって抑制された(図 5)。