

22. 網膜血管新生における ABC トランスポーターの発現

楠原仙太郎、田上瑞記、本田 茂、塚原康友、根木 昭
(神戸大)

研究要旨 脳血液関門では ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターが薬剤を含む様々な物質を細胞外に排出することによりバリアとして機能している。一方、網膜血管関門は脳血管と同様のバリア機能を有し、正常成体マウスでは P-gp/ABCB1、Mrp4/ABCC4、Bcrp/ABCG2 等の排出型 ABC トランスポーターの発現が確認されているが、血管新生時における発現については調べられていない。我々が新生仔マウスと酸素誘発網膜症マウスの網膜についてこれらのトランスポーターの発現を免疫染色で調べたところ、生理的網膜血管新生の過程で P-gp、Mrp4、Bcrp の発現が保たれていること、病的新生血管においては P-gp の発現は認められるが Mrp4、Bcrp の発現が弱い傾向にあることを明らかにした。これらの知見は薬剤排出トランスポーターをターゲットにした抗網膜血管新生療法を考える上で有用であると考えられる。

A. 研究目的

ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターは物質輸送に関係する膜タンパク質であり、脳血液関門では P-gp/ABCB1、Mrp4/ABCC4、Bcrp/ABCG2 が発現し、その薬物排泄作用を介して組織の保護に働いていることが知られている。これらのトランスポーターは正常成体マウスの網膜血管においても発現しているとの報告があるが、生理的網膜血管新生や病的網膜血管新生における発現の変化に関しては十分な検討がなされていない。そこで我々は、生理的網膜血管新生の生じる新生仔マウスとマウスの病的血管新生モデルである酸素誘発網膜症 (oxygen-induced retinopathy、OIR) での ABC トランスポーターの発現を調べることとした。

B. 研究方法

生後 0、4、7 日齢および 6-8 週齢の C57/BL6 マウスを 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定した後、4 日齢のマウスから網膜フラットマウントを作成しそれ以外のマウスからは網膜凍結切片を作成した。網膜フラットマウントに関しては、P-gp、Mrp4、Bcrp について 4 型コラーゲンとの二重免疫組織染色を行った。網膜凍結切片については ABC 法を用いた免疫染色を行い P-gp、Mrp4、Bcrp の局在を調べた。次に、7 日齢の C57/BL6 マウスを 5 日間 75% 酸素下においた後に 5 日間通常大気中で飼育することにより OIR モデルを作成した。生後 17 日齢における網膜フラットマウントを作成し、P-gp、Mrp4、Bcrp について 4 型コラーゲンとの二重免疫組織染色をそれぞれ行った。

(倫理面への配慮)

本研究は神戸大学楠地区及び名谷地区動物実験委員会の承認のもと、the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Researchに沿って行われた。

C. 研究結果

P-gp、Mrp4、Bcrp とともに生後 4、7 日齢および 6-8 週齢の網膜血管に強く発現していた (図 1、2)。

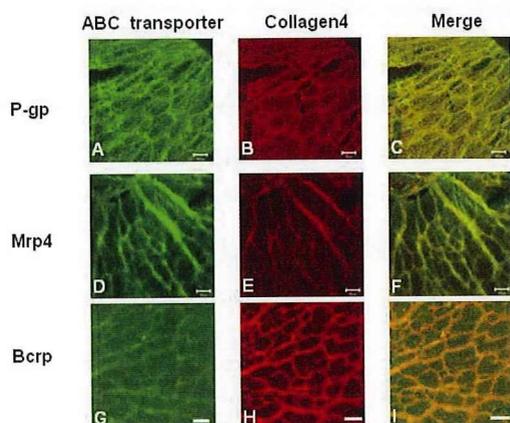


図 1 P3 マウス網膜における ABC トランスポーターの発現

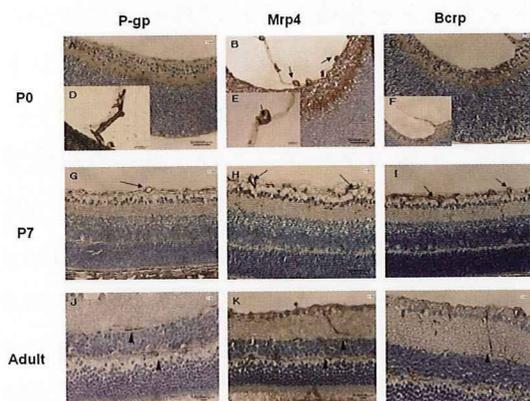


図 2 マウス網膜における P-gp, Mrp4, Bcrp の時間的・空間的発現

OIR モデルにおいては、P-gp が無血管領域の周囲に存在する 4 型コラーゲン陽性の neovascular tuft に強く発現していた。

Mrp4、Bcrp については neovascular tuft への染色性は減弱していた (図 3)。

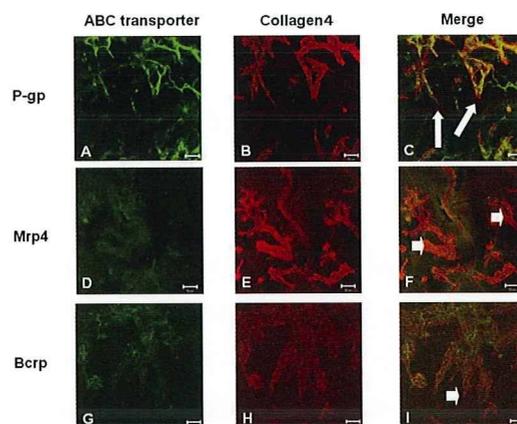


図 3 網膜新生血管における P-gp, Mrp4, Bcrp の発現

D. 考察

網膜血管における P-gp、Mrp4、Bcrp の発現は成体マウスの一部の血管のみで調べられており、我々が発現の詳細を生理的血管新生・病的血管新生において網膜フラットマウント、網膜切片の両方から明らかにしたことは意義があり、未熟網膜における薬物使用の際の貴重な判断材料になり得ると思われる。

酸素誘発網膜症モデルを用いた病的新生血管において P-gp の発現が維持されていたことは P-gp が脳血管における血管新生に関連しているという報告を支持するものである。また、Mrp4、Bcrp の染色性が新生血管で弱かったことは正常血管と新生血管の区別に利用できる可能性があり、Mrp4、Bcrp の基質をターゲットにした抗新生血管療法の可能性を示唆するものである。

E. 結論

薬物排泄トランスポーターである P-gp、Mrp4、Bcrp の発現を生理的血管新生と病的

血管新生において明らかにしたことは、網膜血管新生をターゲットとした薬物治療を考える上で重要な知見であると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tagami M, Kusuhara S et al: Expression of ATP-binding cassette transporters at the inner blood-retinal barrier in a neonatal mouse model of oxygen-induced retinopathy. Brain Res. 1283: 186-193, 2009.

2. 学会発表

1. 田上瑞記、楠原仙太郎 他：生理的・病的血管新生における ABC トランスポーターの発現. 第 48 回日本網膜硝子体学会総会, 名古屋, 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. Tachikawa M et al: Gene expression profiles of ATP-binding cassette transporter A and C subfamilies in mouse retinal vascular endothelial cells. Microvasc Res 75: 68-72, 2008.

2. Asashima T et al: ATP-binding cassette transporter G2 mediates the efflux of phototoxins

on the luminal membrane of retinal capillary endothelial cells. Pharm Res 23: 1235-1242, 2006.

3. Barakat S et al: Regulation of brain endothelial cells migration and angiogenesis by

P-glycoprotein/caveolin-1 interaction. Biochem Biophys Res Commun 372: 440-446, 2008.

23. グリコサミノグリカンによる病的網膜血管新生の抑制

西口康二、加地 秀、片岡恵子、寺崎浩子
(名古屋大)

研究要旨 房水中のグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸には、抗血管新生作用があることが報告されている。本研究では、グリコサミノグリカンが、網膜血管の新生にどのように関わるかを調べた。眼の器官形成期前後の比較的若いマウスの眼内液中のヘパラン硫酸濃度は、他の体液に比較して高いことが分かった。マウス眼内のヘパラン硫酸を分解しても、正常の網膜内血管の進展には影響を与えなかった。一方、高濃度酸素負荷後に発生する網膜外に伸展する病的血管新生は、ヘパラン硫酸の分解により増加し、ヘパリンやヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンの投与により減少した。

A. 研究目的

房水中のグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸には、抗血管新生作用があることが報告されている。(参考文献1) 本研究では、マウスを用いて、生理的および病的な網膜血管新生におけるヘパラン硫酸の役割について検討した。

B. 研究方法

生後 7 日～60 日の野生型マウスの眼内液(房水+硝子体液)、血漿、尿のヘパラン硫酸濃度を測定した。マウスを生後 7 日から 12 日まで 80%酸素に暴露した後、room air で飼育することにより病的網膜新生血管を誘発した(酸素負荷モデル)。同モデルで、内液中のヘパラン硫酸濃度を測定した。生後 3 日の野生型及び 12 日の酸素負荷モデルのマウスの片眼の硝子体中にヘパラン硫酸分解酵素、ヘパラン硫酸、あるいはヘパリンを投与し、他眼には PBS を投与した。投与 5 日後に採取した網膜を Griffon

simplicifolia で染色し、伸展標本にて網膜全体に対する生理的あるいは病的な血管の面積を測定した。

(倫理面への配慮)

実験計画は名古屋大学医学部動物実験施設の承認を得た。また、実験動物の取り扱いには、ARVO により提唱されているガイドラインを順守した。

C. 研究結果

7、12、17 日齢のマウスでは、60 日齢のマウ

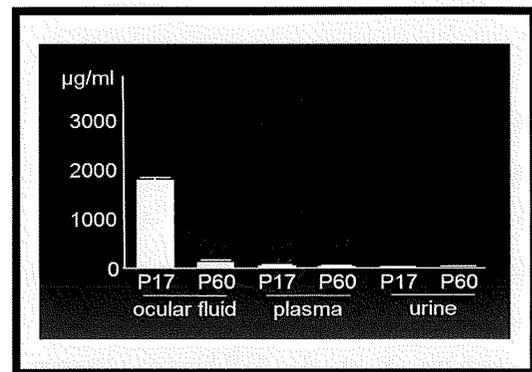


図1 眼内液、血漿、尿のヘパラン硫酸濃度

スに比べて、眼内液中のヘパラン硫酸濃度が非常に高いことが確認された。また17日齢のマウスの眼内液は、同日齢の血漿や尿など他の体液に比較して高濃度のヘパラン

病的血管新生を抑制することができた（ヘパラン硫酸 $0.5 \pm 0.1\%$ vs PBS $1.5 \pm 0.2\%$; ヘパリン $3.8 \pm 0.6\%$ vs PBS $8.1 \pm 1.4\%$ ）。

D. 考察

マウスにおいて、眼内液中のヘパラン硫酸濃度は、血漿や尿など、他の体液に比べて非常に高いことが分かった。また、器官形成期のマウス房水中には、成体のマウスに比してヘパラン硫酸が高濃度で存在した。マウスの眼内のヘパラン硫酸を分解すると、酸素負荷後の病的血管新生は増加した。一方、ヘパラン硫酸やヘパリンなどのグリコサミノグリカンを眼内投与は、病的血管新生を逆に減少させた。

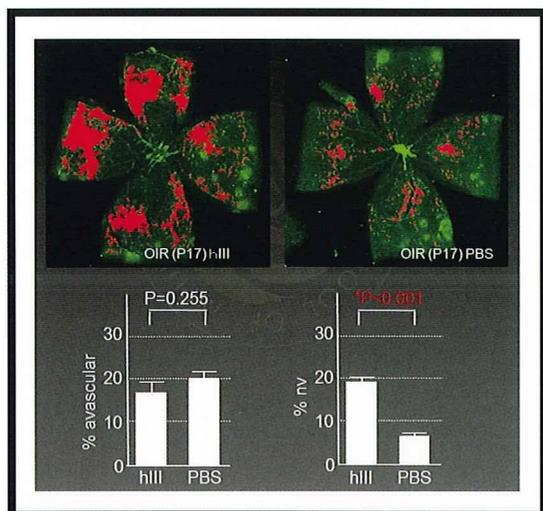


図2 酸素誘発網膜症に対するヘパリン分解酵素の作用

硫酸を含有していた（図1）。一方、野生型マウスと酸素負荷モデルの眼内液を比較すると、7、12、17日齢で濃度の差は検出されなかった。野生型マウスの眼に対するヘパラン硫酸分解酵素の投与は、網膜内の生理的な血管新生に影響しなかった。一方、酸素負荷モデルにおいては、ヘパラン硫酸分解酵素の投与眼により、PBS投与眼に比べて、病的な網膜新生血管の面積は増大した（図2ヘパラン硫酸分解酵素 $8.5 \pm 0.9\%$ vs PBS $3.9 \pm 0.5\%$ ）。その効果は、ヘパラン硫酸分解酵素により分解されにくいヘパリンを同時に投与することにより完全に中和された（ヘパラン硫酸分解酵素+ヘパリン $1.9 \pm 0.3\%$ vs PBS $3.2 \pm 0.3\%$ ）。さらに、酸素負荷モデルに対して、ヘパラン硫酸あるいはヘパリンいずれかのグリコサミノグリカンを眼内投与することにより、

E. 結論

マウス眼内液中のグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸は、器官形成期に一致して濃度が特に高く、眼組織の正常な発達に関与している可能性がある。また、未熟児網膜症など眼の器官形成期特有の病態において、ヘパラン硫酸は、病的血管新生を抑制する役割を担っていることが示唆された。

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. Fannon M, Forsten-Williams K, Dowd CJ, Freedman DA, Folkman J, Nugent MA: Binding inhibition of angiogenic factors by heparan sulfate proteoglycans in aqueous humor: potential mechanism for maintenance of an avascular environment. FASEB J 17(8): 902-904, 2003.



24. Sema3E-PlexinD1 シグナルの眼内操作による網膜血管網の再生

植村明嘉¹⁾、西川伸一²⁾、根木 昭¹⁾

(¹⁾ 神戸大、²⁾ 理化学研究所)

研究要旨 増殖糖尿病網膜症や未熟児網膜症に対して、血管新生阻害剤の眼内投与療法が検討されている。しかし、これらの病態を根本的に改善する上では、新生血管を虚血網膜内に誘導し、有効な血流を供給する血管網を再生することが望ましい。我々は新生仔マウスにおける網膜血管発生の解析を基に、神経細胞由来の Sema3E リガンドが血管内皮細胞上の PlexinD1 受容体に結合することにより、網膜新生血管の伸長方向が規定されることを見出した。さらに虚血性網膜症モデルマウスでは、眼内に投与した Sema3E 蛋白が PlexinD1 を発現する新生血管に選択的に作用することによって血管再生を促進することを明らかにした。Sema3E-PlexinD1 シグナルは、網膜血管再生療法における新規創薬標的分子として期待される。

A. 研究目的

新生血管の伸長方向は、内皮細胞が形成する糸状仮足により決定される¹⁾。糸状仮足の伸長が VEGF シグナルにより促進される一方で、その退縮を制御するシグナル分子の存在が示唆されている²⁾。本研究では、可溶性リガンド Sema3E および膜貫通型受容体 PlexinD1 によるシグナルを操作することにより、網膜新生血管の伸長方向を是正し、虚血網膜内に血管網を再生しうる可能性を検討した。

B. 研究方法

新生仔マウスおよび高酸素誘導網膜症 (Oxygen-Induced Retinopathy, OIR) モデルマウスにおける *Vegf*、*Plxnd1*、*Sema3e* 遺伝子の発現局在を *in situ* hybridization 法により検討した。内在性リガンド分子の中和を目的に、VEGF 受容体 (VEGFR1) および PlexinD1 受容体の合成蛋白を眼内に投

与した。*Sema3e* 遺伝子ノックアウトマウスに加え、タモキシフェン誘導型 Cre-loxP 遺伝子組換えシステムを応用した *Vegfr2* および *Plxnd1* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを用いた³⁻⁶⁾。抗 PECAM-1 抗体を用いた免疫染色法により、網膜血管構造の変化を観察した。

(倫理面への配慮)

動物の取扱いにあたっては、ARVO の動物取扱いガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

新生仔マウス網膜では、*Vegf* 遺伝子発現アストロサイトに隣接する血管内皮細胞において、*Plxnd1* 遺伝子の発現が認められた。神経節細胞由来の Sema3E は PlexinD1 に結合することによって血管内皮細胞の糸状仮足の形成を抑制し、網膜血管新生の伸長方向を規定することが明らかとなった (図 1)。

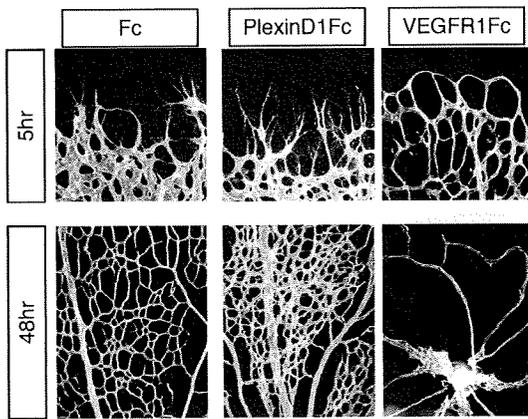


図1 VEGF・PlexinD1 シグナルによる内皮細胞糸状仮足形成の制御

OIR モデルでは、*Vegf* 遺伝子発現の局在異常により新生血管が網膜外に逸脱するが、*Plxnd1* 遺伝子の発現は網膜外新生血管に限局して認められた。眼内に投与した Sema3E 蛋白は網膜外血管新生を選択的に抑制し、虚血網膜内の血管再生を促進した (図2)。一方、眼内 VEGF リガンドの中和により網膜血管再生が阻害され、網膜無血管領域が残存した。

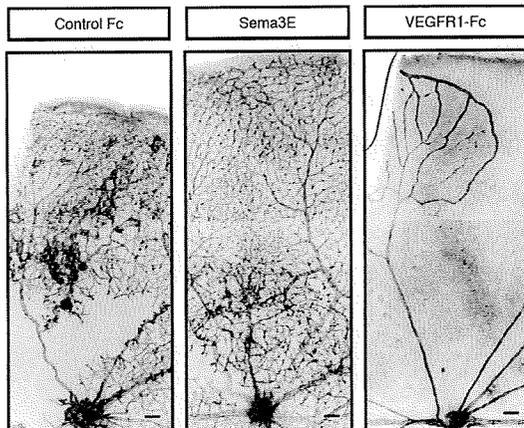


図2 Sema3E 眼内投与による網膜血管再生

D. 考察

近年、増殖糖尿病網膜症や未熟児網膜症に対する抗 VEGF 薬の眼内投与療法が施行されている^{7,8)}。しかし、VEGF シグナルは健

常血管の内皮細胞や神経・グリア細胞の恒常性を維持する上でも重要であり、抗 VEGF 薬による網膜機能への影響が懸念されている⁹⁾。

Sema3E-PlexinD1 シグナルは、血管内皮細胞の糸状仮足形成において VEGF シグナルに拮抗するが、細胞増殖や抗アポトーシス機能には影響を与えない¹⁰⁾。また、虚血性網膜症モデルマウスでは PlexinD1 の発現が網膜外新生血管に限局することから、眼内に投与された Sema3E 蛋白は異常血管に選択的に作用すると考えられる。

本研究では、Sema3E 蛋白の眼内投与による網膜血管再生療法の可能性を提示したが、今後さらに、加齢黄斑変性等における血管新生阻害作用も期待される。

E. 結論

Sema3E-PlexinD1 シグナルの眼内操作による、網膜血管再生治療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

1. Uemura A: Pharmacological treatment of retinopathy of prematurity: anti-angiogenic or pro-angiogenic? *Expert Rev Ophthalmol*, in press.
2. Uemura A: Stability and functional integrity of new blood vessels. *Encyclopedia of the Eye*, 1st Edition, Elsevier, in press.
3. Moriya J et al: Inhibition of Semaphorin as a novel strategy for herapeutic angiogenesis. *Circ Res*, in press.

4. Egawa G et al: Transient expression of ephrin B2 in perinatal skin is required for maintenance of keratinocyte homeostasis. *J Invest Dermatol* 129: 2386-2395, 2009.

5. 植村明嘉：網膜血管網の形成におけるガイダンス分子の役割. *実験医学* 27 : 1710-1714, 2009.

2. 学会発表

1. Uemura A: Sema3E-PlexinD1 signaling prevents extraretinal vascular growth without affecting intraretinal vascular regeneration in proliferative ischemic retinopathies.

The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, Seoul, Korea, 2009.

2. 植村明嘉：網膜血管再生療法の可能性. 第 63 回日本臨床眼科学会、福岡市、2009.

3. 植村明嘉：網膜新生血管内皮細胞における糸状仮足形成を制御するシグナル分子. 第 17 回日本血管生物医学会、東京、2009.

4. 植村明嘉：虚血網膜内における機能的血管再生をめざして一発生期網膜をモデルとしたアプローチ. 第 113 回日本眼科学会総会、東京、2009.

5. 植村明嘉：虚血性網膜疾患における血管再生の可能性. 第 308 回関西眼疾患研究会、京都市、2009.

6. 植村明嘉：虚血性網膜疾患における血管再生の可能性. 第 165 回関西眼科先進医療研究会、吹田市、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. Koga H et al: Plexin family-like polypeptide, and uses thereof. US Patent 7482322. Issued Date: January 27, 2009.

2. Koga H et al: Novel Plexin polypeptide, DNA encoding the same and use thereof. EUROPEAN PATENT EP1679372 B1. Publication Date: 18.02.2009.

3. 古閑比佐志 他：新規PlexinポリペプチドとそれをコードするDNA、及びその用途. WO/2005/056791. Publication Date: 23.06.2005.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Gerhardt H et al: VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161: 1163-1177, 2003.

2. Carmeliet P & Tessier-Lavigne M: Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436: 193-200, 2005.

3. Gu C et al: Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* 307: 265-268, 2005.

4. Egawa G et al: Transient expression of ephrin B2 in perinatal skin is required for maintenance of keratinocyte homeostasis. *J Invest Dermatol* 129: 2386-2395, 2009.

5. Albuquerque RJ et al: Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med* 15: 1023-1030, 2009.

6. Zhang Y et al: Tie2Cre-mediated inactivation of plexinD1 results in congenital heart, vascular and skeletal defects. *Dev Biol* 325: 82-93, 2009.

7. Jardeleza MS & Miller JW: Review of anti-VEGF therapy in proliferative diabetic

retinopathy. *Semin Ophthalmol* 24: 87-92, 2009.

8. Mintz-Hittner, HA & Best LM: Antivascular endothelial growth factor for retinopathy of prematurity. *Curr Opin Pediatr* 21: 182-187, 2009.

9. D'Amore PA: Vascular endothelial cell growth factor-a: not just for endothelial cells anymore. *Am J Pathol* 171: 14-18, 2007.

10. Kruger RP et al: Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 789-800, 2005.

25. 生理的および病的血管新生における骨髄由来細胞の役割

片岡恵子、西口康二、加地 秀、寺崎浩子

(名古屋大)

研究要旨 マウスを用いて、生理的な血管新生や高濃度酸素負荷に続発する病的な血管新生における骨髄由来細胞の関与を検討した。生後 7 日の網膜では、マイクログリアは均一に分布していた。一方、高濃度酸素負荷後に血管新生が起きた網膜では、新生血管にマイクログリアが集中していた。生後 1 日で GFP マウス由来の骨髄細胞を移植した正常 C57BL/6 マウスでは、生後 8 日、17 日、30 日の網膜に GFP 陽性骨髄由来細胞はほとんどみられなかった。高濃度酸素負荷後の網膜では、一部の新生血管に GFP 陽性細胞の集積があり、その多くはマイクログリアの特徴を有していた。しかし、GFP 陽性細胞のない新生血管もあるなど網膜内でも骨髄由来細胞の分布は不均一であり、骨髄由来細胞の病態への関与は大きくないと考えられた。

A. 研究目的

骨髄由来造血幹細胞が発達段階及び虚血網膜の血管新生に関与するとの報告（参考文献 1、2）や、硝子体に注射された骨髄細胞がマイクログリアに分化し、虚血網膜の血管再生を促進するとの報告がある（参考文献 3）。網膜発生過程の生理的な血管新生および虚血に続発する病的な血管新生における、末梢血由来のマクロファージの特性を、骨髄移植を用いて分析し、その役割を検討した。

B. 研究方法

生後 1 日 (P1) の C57BL/6 マウスに放射線照射 (2.5 Gy) した後、GFP マウス由来の骨髄細胞を経静脈的に移植した。P5~P30 での末梢血における移植骨髄細胞の生着率をフローサイトメトリー (FACS) で測定した。P7 で 80 %酸素を 1 日だけ投与し (網膜血管閉塞モデル)、網膜内の GFP 陽性骨髄細胞

の分布を検討した。また、P7 から P12 まで 80 %酸素付加した後、room air で飼育し (網膜血管新生モデル)、P17 と P30 で同様に解析した。網膜は伸展標本にて血管を染色した。また、抗 Iba1 抗体、抗 NG2 抗体、抗 PECAM-1 抗体などを用いて切片標本を染色し、GFP 陽性細胞の免疫学的特徴を調べた。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、眼と視覚の研究における動物使用に関する ARVO のガイドライン、および名古屋大学における動物実験等に関する取扱規定に従い施行された。

C. 研究結果

抗 Iba1 抗体は、単球・マクロファージおよび網膜内マクロファージであるマイクログリアに特異的な抗体である。P7 では Iba1 陽性細胞は網膜内に均一に分布していた

(図 1a)。網膜血管新生モデルでは新生血

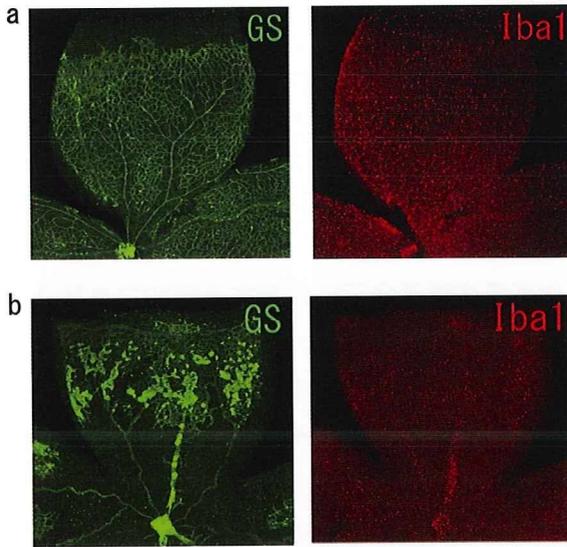


図1 P7 野生型マウスとP17 新生血管モデルにおける Iba1 陽性細胞の網膜内分布

管に集中して分布していた (図 1b)。次に、GFP マウスの骨髄移植を用いて、それら Iba1 陽性細胞が血球由来であるかを検討した。P5、P8、P17、P30 において、末梢血での移植 GFP 陽性細胞の生着率は、それぞれ 20.9±9.5 %、23.0±4.1 %、39.8±7.0 %、54.9±16.0 %であった (図 2)。P8、P17、

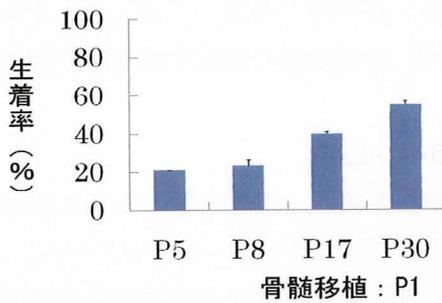


図2 移植 GFP 陽性細胞の末梢血生着率

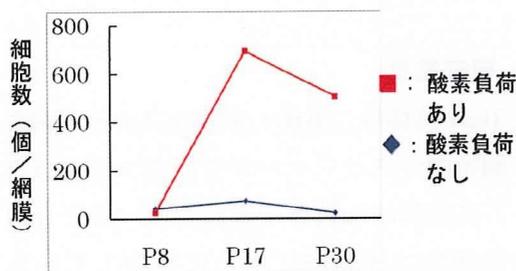


図3 網膜内の GFP 陽性細胞

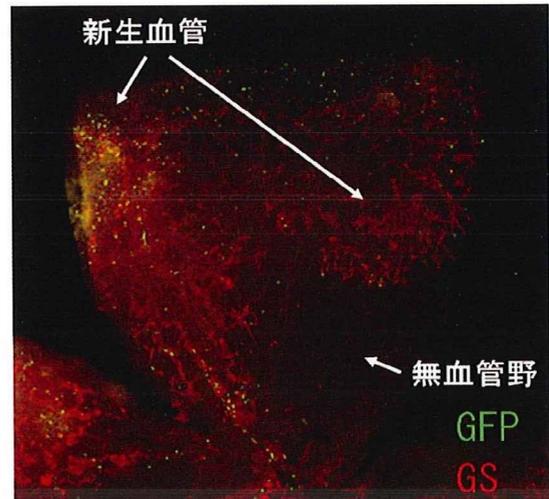


図4 網膜血管新生モデル(P17)における GFP 陽性細胞の分布

P30 では、網膜あたりの GFP 陽性細胞は少なかった (41.3±4.7、74.2±22.1、24.8±5.5、図 3)。酸素を 24 時間負荷した網膜血管閉塞モデルでも、同様な結果 (26.8±0.1) であった。一方、新生血管モデルでは、17 日齢と 30 日齢にそれぞれ 694.0±61.1、504.9±101.6 の GFP 陽性細胞が新生血管を中心に存在した (図 4)。しかし、GFP 陽性細胞のない新生血管もあるなど網膜内でも GFP 陽性細胞の分布は不均一であり、個体

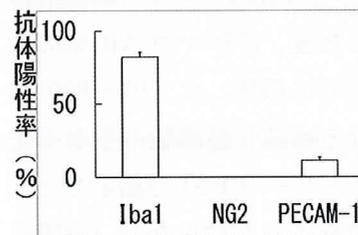


図5 網膜血管新生モデル(P17)における GFP 陽性細胞の免疫学的特性

差も大きかった。生後 17 日の血管新生モデル網膜では、GFP 陽性細胞の Iba1、NG2、PECAM-1 陽性率は、それぞれ $82.3 \pm 7.8\%$ 、 $0.0 \pm 0.0\%$ 、 $11.5 \pm 4.9\%$ であった (図 5)。

D. 考察

発生過程において、GFP 陽性細胞は網膜内にほとんど見られなかった。網膜血管閉塞モデルにおいても、GFP 陽性細胞は網膜内にほとんど見られなかった。網膜新生血管モデルにおいては、骨髄由来細胞が特定の病的な新生血管に集積していることもあったが、ほとんど存在しない新生血管もあった。網膜に生着した GFP 陽性細胞の多くは、マイクログリアの形態的・免疫組織学的特徴を有していた。

E. 結論

生理的な網膜血管の発達に骨髄由来細胞はあまり関与しないと考えられた。骨髄由来細胞が病的な網膜新生血管に集中して存在することがあった。しかし、その生着数は少なく、分布も不均一であり、病態への関与は大きくないと考えられた。

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

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. Otani A et al: Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. Nat Med. 2002.
2. Grant MB et al: Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. Nat Med. 2002.
3. Ritter MR et al: Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. J Clin Invest. 2006.

26. ロドプシン P347L トランスジェニックウサギの網膜電図所見

近藤峰生、坂井隆夫、上野真治、子安俊行、米今敬一、寺崎浩子
(名古屋大)

研究要旨 我々はウサギの網膜色素変性(RP)モデルであるロドプシン P347L トランスジェニック(Tg)ウサギを作製した。このウサギの ERG は、週齢とともに全ての成分が減弱したが、b 波よりも a 波の方がより障害されており、律動様小波(OPs)が全ての成分の中で最も保たれていた。興味深いことに、若い Tg ウサギの OPs は同じ週齢の野生型ウサギよりも有意に大きかった。薬理的な実験により、若い Tg ウサギにみられるこの大きな OPs は、網膜内層の二次的機能変化に起因していることが示唆された。

A. 研究目的

我々は、bacterial artificial chromosome の遺伝子改変技術を用いて、ウサギの網膜色素変性(RP)モデルであるロドプシン P347L トランスジェニック(Tg)ウサギを作製した。このウサギが RP のモデルとして適当であることを証明するには、組織学的解析とともに網膜電図(ERG)を用いた機能解析が重要である。そこで今回我々は、ERG を用いて Tg ウサギの網膜機能を詳細に解析した。

B. 研究方法

生後 12, 24, 48 週の Tg ウサギと野生型ウサギ合計 62 羽を対象とした。Tg ウサギから全視野刺激による ERG を記録した。錐体 ERG と杆体 ERG の a 波と b 波の解析には、それぞれ Hood による a-wave fitting と Naka-Rushton fitting を用いた。

(倫理面への配慮)

全ての実験は名古屋大学動物実験委員会の承諾を得て、ARVO の動物実験規定に従って

行った。常に動物の苦痛を最小限とするように配慮して実験を行った。

C. 研究結果

Tg ウサギの ERG は週齢とともに全ての成分が減弱した。成分別にみると、錐体成分より杆体成分の方が障害が強かった。また、b 波よりも a 波の方がより障害されており、OPs が最も保たれていた。生後 12 週の若い Tg ウサギの OPs は、同じ週齢の野生型ウサギよりも有意に大きかった。薬理学的実験により、若い Tg ウサギにみられるこの大きな OPs は、テトロドトキシンに感受性のあるスパイク性ニューロンの機能変化に起因していることがわかった。

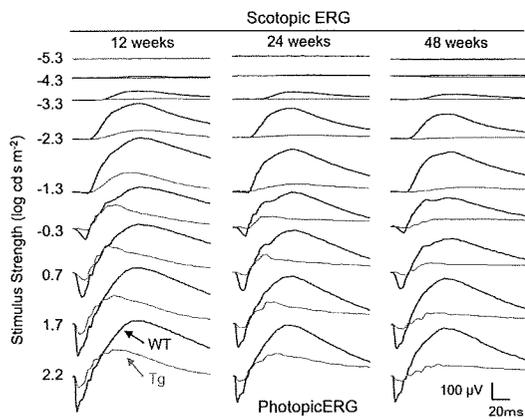


図1 野生型(WT)およびトランスジェニック(Tg)ウサギの暗順応下網膜電図の波形

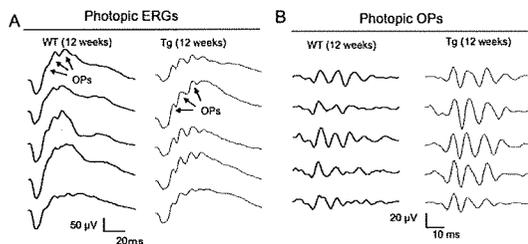


図2 生後12週の野生型(WT)およびトランスジェニック(Tg)ウサギの明順応下網膜電図の波形。Bでは律動様小波(OPs)のみを抽出している。WTよりもTgのほうがOPsが大きいことがわかる。

D. 考察

OPsの起源としては、網膜内層における抑制系フィードバック回路が関与していると考えられており、特にアマクリン細胞と神経節細胞の一部がOPsの発生に重要な役割を果たしていると考えられている。今回の薬理的な結果により、Tgウサギの変性早期におけるOPsの増大現象の起源として、アマクリン細胞と神経節細胞の中でも特にTTXに感受性のあるスパイク性ニューロンの活動増大が関与していることがわかった

E. 結論

我々の作製したTgウサギは、週齢とともに杆体優位の進行性網膜変性をおこし、RPのウサギモデルとして使用できる可能性が示唆された。若いTgウサギにみられた網膜内層成分の増大は、進行性の視細胞変性に伴う内層機能の二次的変化として興味深いと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo M, et al: Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 1371-1377, 2009.
2. Sakai T, et al: Supernormal ERG oscillatory potentials in transgenic rabbit with rhodopsin P347L mutation and retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50: 4402-4409, 2009.

2. 学会発表

1. 近藤峰生: 網膜・視神経疾患動物モデルのERG解析. 日本眼科学会評議員会指名講演. 第113回日本眼科学会総会. 東京, 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. Petters RM, et al: Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. Nat Biotechnol 15: 965-970, 1997.

27. 加齢黄斑変性の日常生活困難

藤田京子、湯澤美都子

(日本大・駿河台)

研究要旨 加齢黄斑変性の日常生活困難について検討した。対象は平成 20 年 11 月から平成 21 年 4 月に駿河台日本大学病院を受診した少なくとも 1 眼が加齢黄斑変性に罹患している 151 例で、平均年齢 77.4 歳である。よい方の眼の視力は 0.5 以上が 31 眼、0.2 から 0.4 が 40 眼、0.05 から 0.1 が 40 眼、0.04 以下が 40 眼で、滲出型が 149 眼、萎縮型が 2 眼であった。これらに日常生活困難を問う質問票である Daily living Tasks Dependent on Vision (DLTV) を用いて質問を行った。遠見および近見矯正視力と DLTV 総合得点とは有意な相関がみられ ($p < 0.05$)、視力が不良なほど日常生活困難が大きかった。視機能による行動別では、視力に関わらず「近見視による行動」が障害され、視力が不良なほど「できない」日常生活動作が多岐にわたっていた。

A. 研究目的

加齢黄斑変性の日常生活困難を明らかにする。

B. 研究方法

対象は平成 20 年 11 月から平成 21 年 4 月に駿河台日本大学病院眼科を受診し、調査に同意が得られた少なくとも一眼が加齢黄斑変性に罹患している 151 例。年齢は 53 歳から 89 歳 (平均 77.4 歳)、男性 111 例、女性例である。両眼性 132 例、片眼性 19 例、滲出型 149 例、萎縮型 2 例。良好な方の視力は 0.5 以上 31 眼、0.2 から 0.4 が 40 眼、0.05 から 0.1 が 40 眼、0.04 以下が 40 眼。これらの症例に遠見および近見矯正視力測定を行った。

日常生活困難に関する質問は Daily Living Tasks Dependent on Vision (DLTV)¹⁾ を用いて、医療従事者ではないインタビュアーに

より行った。DLTV は「遠見視による行動」、「近見視による行動」、「周辺視による行動」、「順応に関連する行動」を問う計 22 項目からなる質問票で、それぞれの質問に対し「困難なくできる」、「少し困難」、「かなり困難」、「できない」から 1 つ選んで回答してもらった。それぞれの回答を 4、3、2、1 と分類した後、1 から 100 点に標準化し、得られた総合得点と良い方の眼の遠見および近見矯正視力との相関をみた (Pearson coefficient)。また「視機能に関連する行動」別にみた「できない」項目と視力との関連についても検討した。

(倫理面への配慮)

本調査は駿河台日本大学病院倫理委員会の審査・承認のもとに行われた。なお、調査はインフォームドコンセントを十分行い、患者の文書による同意を得た上で行った。

C. 研究結果

DLTV 総合得点は 8 点から 100 点 (平均 57.8 点) であり、遠見矯正視力および近見矯正視力と有意に相関した ($r^2=0.58$, $p<0.05$)。全 22 項目中、1 項目以上で「できない」と回答した症例は視力 0.5 以上が 31 例中 9 例 (29%)、0.2 から 0.4 が 40 例中 30 例 (75%)、0.05 から 0.1 が 38 例 (95%)、0.04 以下が 40 例中 40 例 (100%) で、「できない」項目数はそれぞれ 1 から 5 (平均 2.3)、1 から 12 (平均 3.7)、2 から 16 (平均 5.5)、3 から 18 (平均 8.8) であった。視機能行動別の「できない」項目は 0.5 以上 (N=9) が「遠見視による行動」が 2 例、「近見視による行動」が 8 例、「順応に関連する行動」が 1 例、0.2 から 0.4 (N=30) では「遠見視による行動」が 11 例、「近見視による行動」が 30 例、0.05 から 0.1 (N=38) では「遠見視による行動」が 21 例、「近見視による行動」が 38 例、「周辺視による行動」が 1 例、「順応に関連する行動」が 1 例、0.04 以下 (N=40) では「遠見視による行動」が 34 例、「近見視による行動」が 40 例、「周辺視による行動」が 12 例、「順応に関連する行動」が 3 例であった。

D. 考察

加齢黄斑変性は我が国の視覚障害原因疾患の第 4 位である²⁾。昨今の医療技術の進歩、高齢化の影響で視覚障害者に認定される患者数は今後も増加すると予測される。治療面では抗血管内皮増殖因子薬などにより、視力改善が期待できるようになってきたが、完治は望めないのが現状であり、患者は障害をもちながらの生活を余儀なくされる。加齢黄斑変性の主な症状である、視力低下、

中心暗点、変視症が日常生活行動をどの程度妨げているのか、またどのような行動が妨げられるのか、は明らかではない。これまでに加齢黄斑変性では「顔の認知」、「読書」が障害されることが報告されている³⁾が、今回の調査結果から視力が低下した症例では「近見視による行動」のみならず、「遠見視による行動」、「周辺視による行動」、「順応に関連する行動」など、多岐にわたり困難がみられることが明らかになった。患者の日常生活を支える家族または介護者は、患者の「できない」行動を知る必要がある。今回視力が 0.04 以下ではほとんどの行動に制限がみられることが明らかになり、このことは医療側から家族または介護者へ、介護をする上での情報提供に役立つと考えた。

「近見視による行動」は視力良好例でも「できない」と回答した症例がみられた。これは、網膜感度低下や変視症など視力以外の視機能異常によるものと考えられる。今後、それらの視機能との関連も明らかにしていく必要がある。

E. 結論

加齢黄斑変性の日常生活困難は良い方の視力と関連し、視力が不良なほど困難度が高く、「できない」行動が多岐にわたっていた。また、視力に関わらず、「近見視による行動」は障害されていた。

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. Hart PM, et al: A vision specific functional index for use in patients with age related macular degeneration. Br J Ophthalmol 83: 1115-1120, 1999.

2. 中江公裕 他：わが国における視覚障害の現状、厚生労働省難治性疾患克服研究事業 網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究班平成 17 年度研究報告書：263-267、2006.

3. Tejeria L et al: Face recognition in age related macular degeneration: perceived disability, measured disability, and performance with a bioptic device. Br J Ophthalmol 86: 1019-1026, 2002.

28. 網膜色素変性に合併した黄斑浮腫に対する

塩酸ドルゾラミド点眼の効果

池田康博、宮崎勝徳、吉田倫子、納富昭司、向野利一郎、村上祐介、石橋達朗
(九州大)

研究要旨 網膜色素変性 (RP) に生じる黄斑部合併症のひとつである黄斑浮腫に対する、緑内障治療薬として使用されている塩酸ドルゾラミド点眼 (炭酸脱水酵素阻害剤) の治療効果について検討した。対象は、九州大学病院で黄斑上膜や硝子体牽引のない黄斑浮腫を合併した定型 RP 患者で、対象眼に 1.0%塩酸ドルゾラミド点眼を 1 日 3 回使用し、投与前後の平均中心窩網膜厚、視力、ハンフリー10-2 における中心 4 点の平均感度の変化を経時的に測定した。投与後 6 ヶ月の時点において、平均中心窩網膜厚は減少傾向を示し、平均感度は上昇傾向を示したことより、RP に合併した黄斑浮腫に対し、塩酸ドルゾラミド点眼は有用である可能性があると考えられた。

A. 研究目的

網膜色素変性 (RP) に生じる黄斑部合併症のひとつに黄斑浮腫があり、発症率は 10% 前後とされている (文献 1、2)。これまでに、硝子体手術やトリウムシノロンアセトニド投与などによる治療が報告されているが (文献 3、4)、一定の見解は得られていない。今回、RP に合併した黄斑浮腫に対する塩酸ドルゾラミド点眼液 (炭酸脱水酵素阻害薬) の治療効果について検討すること。

B. 研究方法

対象は、九州大学病院で黄斑上膜や硝子体牽引のない黄斑浮腫を合併した定型 RP 患者 7 例 13 眼 (男性 1 例、女性 6 例)。全例で対象眼に 1.0%塩酸ドルゾラミド点眼を 1 日 3 回使用した。投与前、投与後 1、3、6 ヶ月に、視力、眼圧、細隙灯検査、静的視

野検査 (ハンフリー視野計プログラム 10-2)、眼底検査、光干渉断層計 (SD-OCT; Cirrus) による平均中心窩網膜厚測定を施行した。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言を遵守し、臨床研究を行った。十分な説明を行った後にインフォームドコンセントを得、個人情報の機密保持を厳守する。学内の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

投与後 6 ヶ月まで観察できた 5 例 10 眼では、平均中心窩網膜厚は、投与前が 442.0 μm 、投与後 6 ヶ月が 368.4 μm 、と減少した (図 1)。ハンフリー10-2 における中心 4 点の平均感度は、投与前が 30.78 dB、投与後 6 ヶ月が 32.55 dB、と有意な改善が得られた。最高視力が投与前よりも悪化した症例が 1 眼あったが網膜厚は減少していた。また、