

胞への分化誘導が可能であった。視細胞変性マウスへ移植した視細胞が視細胞外層が維持されている段階では生着することが確認された。サル iPS 細胞は、オスのカニクイザルの腹部の皮膚を培養し、OCT3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 遺伝子を導入したレトロウイルスを感染させ作製した。iPS 細胞から網膜色素上皮細胞を誘導するため、Wnt および Nodal シグナルの阻害薬の存在下で浮遊細胞塊を形成させると Rx/Pax6 陽性細胞が出現し、さらに培養を続けることにより網膜色素上皮細胞へ誘導した。これらの細胞を単離、接着培養を行って、免疫染色によりマーカーの発現を確認した。再生医療の臨床応用に関しては、複数の眼科医と連携して臨床プロトコール作成を開始した。骨髄由来幹細胞は加齢黄斑変性などに関与している可能性があるがエリスロポイエチンなどの投与により加齢により低下した機能を回復できる可能性を確認した。C3H 系マウスは Pde6b(rd1)に遺伝子点変異があり約 4 週で視細胞の消滅および網膜深層血管の委縮を認めた。Alde-Low EPC を投与した群では、Alde-High EPC、HUVEC、PBS 投与群と比較して有意に血管委縮および神経変性に至る速度を抑制した($p < 0.01$)。さらに Alde-Low EPC は視細胞層におけるアポトーシスを有意に抑制した。

人工視覚の長期電極を家兔に埋植後一年では、明らかな組織損傷が見られず、電極自体の安全性も確認された。至適刺激パラメータについてのデータが得られた。

D. 考察

1. 福岡県久山町における疫学調査により、40歳以上の日本人における病的近視及び近視性黄斑変性の患者数を産出すると、我が国における病的近視の者は361万人であり、そのうち近視性脈絡膜新生血管や黄斑変性を伴うものは20万人にのぼると推定された。
 2. 今回の視覚障害の原因疾患調査では、糖尿病網膜症が順位を下げ、網膜色素変性症が二位となった。これは生活習慣病である糖尿病の人口は増加にあるが、受診率の向上や治療、技術の進歩に伴って失明に至る症例の減少したことを示唆する可能性はあるが、サンプルの抽出数などのバイアスも考慮に入れる必要がある。
 3. 身体障害者等級を決めるための視力は良い方の眼の遠見矯正視力で判定し、等級の上限視力は現行の0.6でなく0.3か0.4に設定するのが妥当かと考えられた。
 4. 加齢黄斑変性に対する治療法である抗 VEGF 薬の硝子体内投与は比較的安全で有効な治療法であるが、硝子体内に投与された薬剤は全身へ移行し、心筋梗塞や脳梗塞の原因となりうることを念頭において治療に用いるべきであることが示唆された。また、無硝子体眼では効果が低下すると予測され、ドラッグデリバリーシステムなどを用いた新たな治療法の開発が必要である。
- PCVは自然経過でも視力維持される症例が多いが、PDTによりさらに視力予後が改善することがわかっていたが、3年の長期経過を見ると

再発も多く、加齢性疾患である本疾患は治療後も長期に経過観察、必要なら追加治療を検討することが必要である。低照射エネルギー PDT によっても十分治療効果が得られた。フィブリンや出血を伴ったものでは ranibizumab 硝子体内投与のみでも有効である可能性が示され、視力良好例での選択肢となりうるもの考えられた。

難治性の病型である RAP に対しては、低照射エネルギー PDT と抗 VEGF 薬の併用や、ステロイド、抗 VEGF 療法と PDT の三者併用療法が有効である可能性が示唆された。

近視性脈絡膜新生血管に対しても抗 VEGF 療法が有効であることがわかった。

得られた結果を総合し、病型別の治療指針を作成した。

5. 網膜色素変性の診断に必須とされるフルオレセイン蛍光眼底造影検査による合併症は悪心、嘔吐を初め、重篤なアナフィラキシーショックなどの出現頻度は 0.002〜0.03%と報告されている。より非侵襲的で実用的な眼底自発蛍光や OCT を代替検査として採用すべきであると考えられた。

6. 加齢黄斑変性に関して、今後、遺伝子多型を調査することにより、個々に適した治療法や視力予後の予測が可能となり、テーラーメイド医療が実現する可能性がある。

遺伝子診断のために複数施設からの検体を検査施設に送付し、遺伝解析と結果報告について問題なく行うことができた。今後、さらに大規模に登録できるシステムを作り、遺伝カウ

セリングにおける患者側の要望や問題点も含めて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。網膜色素変性は複数の遺伝子の異常からなる疾患群であり、それぞれの遺伝子異常の解析、病態研究は、遺伝子治療その他の新しい治療法の開発につながる可能性があり意義のあるものである。

7. 網膜色素変性や視神経萎縮に対して、神経保護薬の有用性が示され、今後の新薬の開発が期待できる。

8. Transwell™ 上で培養した網膜色素上皮は良く分化して上皮として特徴的な細胞形態と極性を示し、網膜色素上皮の生理機能を評価する上で有用な培養システムであることが示唆された。

ベスト病は網膜色素上皮細胞に発現しているベストロフィンTMの異常を認める疾患であるが、ベストロフィンのブルッフ膜のメンテナンスへの関与が示されたことで、新しい治療法や類似疾患としての加齢黄斑変性の病態解明につながる可能性がある。また、アミロイドβTM産生は網膜色素上皮細胞のリポ蛋白産生機能に付随するものである可能性が示唆され、今後の加齢黄斑変性の解明につながるものと考えられる。

加齢性黄斑変性の病態に、アミロイドβTMや小胞体ストレスの関与が示唆された。

脳回転状脈絡網膜萎縮症は、高オルニチン血症でおこる疾患であるが代謝産物のスペルミンの影響が示唆された。細胞内オルニチン

濃度の上昇だけでなく NO によって細胞傷害が起こっているものと考えられた。また、ミトコンドリアでアルギニンを基質としてオルニチンを産生するアルギナーゼ II の発現上昇を認めるが、細胞内アルギニン濃度を低下させ、NO 産生を抑制して、細胞保護的に働くことが示唆された。

加齢黄斑変性の遺伝子多型が、補体 H 因子や TLR3 などに認められたことにより病態への炎症の関与が示唆されている。TLR3, TWEAK などの網膜色素上皮細胞における役割を解明することにより、病態解明や治療法や予防法の開発につながる可能性がある。

ロドプシン P347L トランスジェニックラビットの ERG は進行性の視細胞変性に伴う網膜内層機能の二次的変化として興味深い所見を呈しており網膜色素変性モデルとしての有用性が示された。遺伝子改変動物としては飼育の簡便性などからマウスが通常用いられているが、大型動物で作製できれば電気生理学的評価や新しい治療法の試行、効果判定に有利である。今回、杆体優位の進行性網膜変性を生じるトランスジェニックラビットを開発できたことは今後の病態解明に役立つものと考えられる。

脈絡膜新生血管の発生にオステオポンチンの関与が示唆され、病態解明および新しい治療法につながる可能性がある。

ADM は網膜色素上皮細胞からの CCL2 の発現を抑制し、マクロファージ遊走を抑制することで脈絡膜新生血管抑制作用を発揮することが示唆された。

脈絡膜新生血管の形態について組織学的に、また臨床上、光干渉断層計(OCT)などで把握

することは、視力予後が良好であるか不良であるかの予測が可能となり、治療方針の決定に役立つものと考えられる。

9. サル由来レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入の臨床応用に向けた研究が進行中で今後の発展が期待される。

マグネトリポフェクタミンを用いて眼内の特定部位に磁力を用いて遺伝子のターゲティング導入の可能性が示唆された。

遺伝子導入のための新規全身投与型 PEG-C6-PA_{sp} (DET)ミセルはマウス CNV に対し、高い遺伝子導入効果と CNV 抑制効果を確認した。今後、副作用等について評価が必要である。

10. 再生医療や人工視覚の研究は既に視機能を失った患者にとって大きな福音となる可能性を秘めている。幹細胞から網膜視細胞や網膜色素上皮細胞、グリア細胞などへの分化誘導が可能となり、今後、生体における移植細胞の生着の効率が改善すれば臨床応用への道が開くものと考えられる。

人工視覚に関して、埋植した電極が生体に長期間寛容であることがわかり、今後、電気刺激の評価など進めていく必要がある。

E. 結論

加齢黄斑変性は最近の視覚障害の原因疾患の第4位に位置しており、今後も生活の欧米化なども影響して増加傾向にある疾患である。PDTに続き抗 VEGF 療法が導入され、治療の道が開けてきたが、視力改善率は3割〜4割

程度で、依然として発症すると治療効果に限界があるのが現状である。今回作成した病型別の治療指針をもとに治療効果の評価を継続し、遺伝子多型などの情報も考慮しながら、最善の治療法を探索していく。また、新治療法や予防法開発のための病態解明を推進していく。

網膜色素変性や視神経萎縮においては、原因遺伝子の解析により今後、遺伝子導入療法が可能となるかもしれない。遺伝子導入に関する研究も重要で臨床応用に向けた研究が進行中である。また、萎縮した網膜や視神経の再生医療や人工視覚に関する研究は、患者がその臨床応用を待望しているものであり、今後も進展を目指す必要がある。

網膜色素変性の特定疾患認定の必須項目である蛍光眼底造影の必要性につき議論を進める必要がある。現状の視覚障害認定基準が加齢黄斑変性を想定したものでなく、再評価の必要性が示唆された。

多方面からの研究により、これら難治性疾患に対して、早期発見・早期治療や社会復帰、QOL 向上といった第二次予防、第三次予防に向けて新しい治療概念や治療法が、着実に臨床の現場へ還元されつつあるとの確信が得られた。

F. 健康危険情報

各分担研究報告に記載

G. 研究発表

1. 論文発表

「IV関連業績一覧」に記載

2. 学会発表

各分担研究報告に記載

H. 知的所有権の取得状況

各分担研究報告に記載

I. 参考文献

各分担研究報告に記載

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告

1. Girdin の生理的および病的網膜血管新生における役割

米今敬一¹⁾、伊藤孝紀¹⁾、安間哲宏¹⁾、榎本 篤²⁾、浅井直也²⁾、
岩瀬紗代子¹⁾、寺崎浩子¹⁾、高橋雅英²⁾

(¹⁾ 名古屋大、²⁾ 名古屋大腫瘍病理学)

研究要旨 病的網膜新生血管は、糖尿病網膜症、未熟児網膜症、網膜静脈閉塞症などの虚血性網膜疾患および加齢黄斑変性において、視力低下の直接原因となりうる。網膜血管新生の分子メカニズムを探ることは、これらの疾患の治療法確立のために非常に重要である。今回我々は、名古屋大学腫瘍病理学教室で同定された新規分子 Girdin の網膜血管新生における役割を解明するために2種類の遺伝子改変マウスを用いて実験を行った。

A. 研究目的

セリン/スレオニンキナーゼ Akt の基質である Girdin は血管内皮増殖因子(VEGF)を介した血管新生を制御している(Kitamura T et al. (2008) *Nat Cell Biol.*)。我々は Girdin の発現およびそのリン酸化が、網膜における発達段階の生理的血管新生、および網膜の病的血管新生に及ぼす影響を *in vivo* で調べることを目的に今回の実験を行った。

B. 研究方法

実験では、C57/BL6 マウス、C57/BL6 バックグラウンドの Girdin(+/-)ノックアウトマウスおよび GirdinS1416A ノックインマウスを用いた。Girdin の発現およびリン酸化が網膜血管新生に及ぼす影響を解析するために、それぞれ Girdin(+/-)マウスおよび GirdinS1416A マウスを用いた。まず、生後の発達段階におけるマウス網膜の生理的血管新生に対する Girdin の影響を調べるために、生後 5 日目、7 日目、10 日目の Girdin(+/-)マウスおよび GirdinS1416A マウスの血管伸展の度合いを、共焦点顕微鏡

を用いて網膜フラットマウントの血管を定量して WT のそれと比較した。次に、Girdin が虚血性の病的血管新生に及ぼす影響を調べるために、酸素誘発網膜症(OIR)モデルを用いて、同様のマウスを比較した。最後に、脈絡膜新生血管に対する Girdin の影響を調査するためにレーザー誘発脈絡膜新生血管(CNV)モデルを用いて、同様のマウスを比較した。

(倫理面への配慮)

本邦における動物の保護および管理に関する法律を遵守し、動物実験の範囲内で実験を行った。ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) の定める動物実験の規則を遵守し、遺伝子組換え生物等に係る実験を含む研究については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号)及びこれに基づく政省令・告示を遵守して実験を実施した。

C. 研究結果

上記 3 種類の実験すべてにおいて、

Girdin(+/-)マウス並びに GirdinS1416A マウスでは、WT マウスと比べて血管新生が有意に抑制されることが示された。

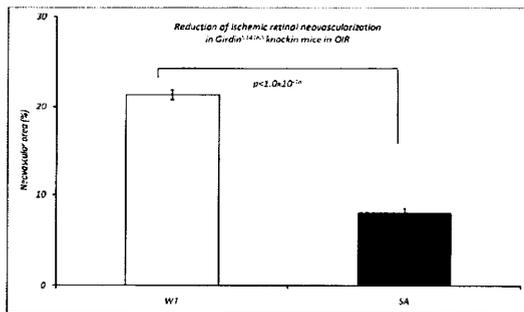


図1 GirdinS1416A マウスとWT マウスにおけるOIRモデルにおける網膜新生血管の比較

D. 考察

上記3種類の *in vivo* における実験いずれにおいても、Girdin の発現量の減少およびGirdin のリン酸化阻害が血管新生の促進を抑制することから、普遍的にGirdin の発現およびそのリン酸化は、網膜血管新生に促進的な役割を果たしていると考えられた。

E. 結論

Girdin はそのリン酸化を介して、網膜の生理的および病的血管新生に対して促進的に働いている。Girdin のリン酸化を阻害することによって、臨床的に糖尿病網膜症、未熟児網膜症、網膜静脈閉塞症、加齢黄斑変性などに合併する病的血管新生を抑えることができる可能性がある。

F. 健康危険情報

動物実験の範囲内で実験を行ったので、該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

現在、投稿準備中

2. 学会発表

1. 米今敬一: The functional role of Akt substrate Girdin in retinal angiogenesis. 第114回日本眼科学会総会、名古屋市、2010.
2. Ito T, et al: Girdin phosphorylation at serine-1416 by Akt/PkB promotes postneonatal angiogenesis and ischemic neovascularization in the retina. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

1. Weng L, et al: Girding for migratory cues: roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis. *Cancer Sci* 101, 836-42, 2010.
2. Enomoto A, et al: Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 63, 774-87, 2009.
3. Jiang P, et al. An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Res* 68:1310-8, 2008.
4. Kitamura T, et al: Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol* 10, 329-37,

2008.

5. Enomoto A, et al: Girdin, a novel actin-binding protein, and its family of proteins possess versatile functions in the Akt and Wnt signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 1086, 169-84, 2006.

6. Enomoto A, et al: Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* 9, 389-402, 2005.

2. 低分子量 G 蛋白質 RhoJ による網膜血管新生の制御

植村明嘉¹⁾、福嶋葉子²⁾、西川伸一³⁾、根木 昭¹⁾

(¹⁾神戸大、²⁾大阪大、³⁾理化学研究所)

研究要旨 新生血管の伸張ないし退縮は、内皮細胞が形成する糸状仮足の伸縮を通じて規定される。血管内皮細胞の糸状仮足形成を制御するシグナル伝達機構を同定できれば、網膜血管新生病変に対する新規治療法の開発につながる事が期待される。本研究では、網膜血管内皮細胞に発現する低分子量 G 蛋白質 RhoJ が、Sema3E-PlexinD1 シグナルにより活性化され、糸状仮足形成を抑制することを明らかにした。

A. 研究目的

新生血管内皮細胞における糸状仮足の形成は、VEGF シグナルにより促進される一方で、Sema3E-PlexinD1 シグナルにより抑制される¹⁾。本研究では、血管内皮細胞の糸状仮足形成を制御する細胞内シグナル伝達分子を同定することを目的に、低分子量 G 蛋白質 RhoJ の機能を解析した。

B. 研究方法

フローサイトメトリー法により、新生仔マウス網膜から血管内皮細胞を精製し、マイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。In situ hybridization 法により、マウス網膜における遺伝子発現局在を同定した。リポフェクション法により、培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に遺伝子発現ベクターまたは siRNA を導入し、細胞形態の変化を観察した。G-LISA 法により、HUVEC における RhoJ の活性を測定した。Cre-loxP 遺伝子組換え後に RhoJ 遺伝子を過剰発現する R26-RhoJ マウスを作成し、新生仔期および高酸素誘導網膜症 (OIR) モデルにおける網膜血管新生の変化を

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、血管内皮細胞に限局して RhoJ 遺伝子の発現が観察された(図1)。網膜血管の成熟に伴い、RhoJ 遺伝子の発現は低下するが、OIR モデルマウスでは病的網膜新生血管に RhoJ 遺伝子の発現が認められた(図1)。

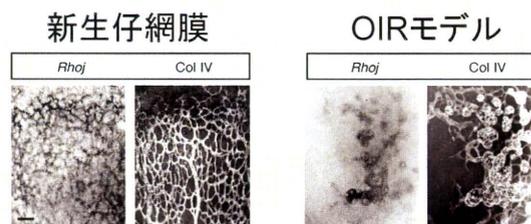


図1 網膜新生血管における *Rhoj* 遺伝子の発現

培養 HUVEC では、RhoJ 遺伝子の過剰発現により細胞が収縮するが、RhoJ 遺伝子ノックダウ

ンにより Sema3E 刺激時の細胞収縮作用が解消された。また、HUVEC において RhoJ は VEGF 刺激により GDP 結合不活性型に、Sema3E 刺激により GTP 結合活性型に転換された(図2)。

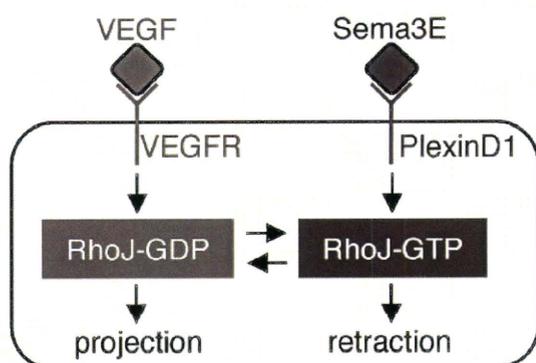


図2 血管内皮細胞における RhoJ の活性化制御機構と糸状仮足形成

血管内皮細胞において RhoJ 遺伝子を過剰発現する Tie2Cre;R26-RhoJ マウスの網膜では、新生血管先端部の内皮細胞における糸状仮足の退縮が観察された。一方、OIR モデルにおける RhoJ 遺伝子過剰発現では、異常血管新生が抑制された(図3)。



図3 RhoJ 遺伝子過剰発現による病的網膜血管新生の抑制

D. 考察

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、これまでに約 20 分子が同定されており、遊走・増殖・分化・接着などの様々な細胞現象を制御することが知られている²⁾。RhoJ は Cdc42 サブファミリーに分類され、培養神経細胞では糸状仮足の形成を促進することが報告されている^{3), 4)}。今回の研究により、血管内皮細胞に発現する RhoJ が、Sema3E-PlexinD1 シグナルにより活性化され、糸状仮足形成を抑制すること、さらに RhoJ が病的網膜血管新生を抑制することが明らかとなった。

RhoJ は網膜新生血管のほか、加齢黄斑変性や癌における新生血管においても発現すると考えられ、広汎な病態において抗血管新生作用を持つと期待される。

E. 結論

新生血管内皮細胞において、RhoJ は Sema3E-PlexinD1 シグナルにより活性化され、糸状仮足の形成を抑制する。今後、RhoJ は眼内血管新生病変の治療における新規創薬標的分子となりうることを期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Elmi M et al: TLX activates MASH1 for induction of neuronal lineage commitment of adult hippocampal neuroprogenitors. Mol Cell Neurosci 45, 121-131, 2010.
2. Tagami M et al: MRP4 knockdown enhances migration, suppresses apoptosis, and produces aggregated morphology in human retinal

vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 400, 593-598, 2010.

3. 植村明嘉: 網膜血管新生におけるガイダンス分子の役割. *日本臨床* 68, 349-353, 2010.

4. 植村明嘉: 網膜における生理的血管発生と病的血管新生. *実験医学* 28, 2825-2830, 2010.

5. 植村明嘉: 中心窩にはなぜ血管がないのか? *視覚のサイエンス* 146-147, 2010.

2. 学会発表

1. Uemura A et al: Sema3E-PlexinD1 signaling facilitates vascular regeneration in ischemic retina by selectively suppressing disoriented angiogenesis. *ARVO Annual Meeting, FL*, 2010.

2. Uemura A: How to promote regeneration of functional capillaries in the ischemic retina. *World Ophthalmology Congress, Germany*, 2010.

3. Uemura A et al: Sema3E-PlexinD1 signaling facilitates vascular regeneration by selectively suppressing disoriented angiogenesis in a mouse model of ischemic retinopathy. *6th International Kloster Seeon Meeting "Angiogenesis: Molecular Mechanisms and Functional Interactions"*, Germany, 2010.

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

2. Heasman SJ and Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701, 2008.

3. Vignal E et al: Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 and Cdc42. *J Biol Chem* 275, 36457-36464, 2000.

4. Abe T et al: Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J Cell Sci* 116, 155-168, 2003.

3. マウス変性網膜モデルでの視細胞移植

万代道子、本間耕平、高橋政代

(理化学研究所)

研究要旨 マウス変性網膜(C3H/HeJ:rd 1)を用いて、臨床応用を念頭に杵体視細胞消失後の視細胞移植の生着効率について検討した。これまでの検討から、視細胞移植は4週から8週までの間で検討した。valproic acid (VPA) の添加(1mM)は時期が早いほど、生着に優位な効果を与えた。また、glatiramer acetate の術前接種はやはり早い時期において生着数を増やすと共に、マイクログリアの移植部位への集積を緩和した。術後の生着細胞数は1ヶ月までに一旦減少するものの、その後10週後まではシクロスポリンの有無に関係なくほぼ一定していた。

A. 研究目的

我々は昨年度までに rd1マウスモデルにおいて、杵体視細胞変性の進行が落ち着いた後、グリオシスの進行するまでの4-8週の時期が視細胞移植に適しているであろう事を示した。移植細胞が生着を阻害する原因として、うまくシナプス形成がされず神経ネットワークから排除される機構、変性過程を経てマイクログリアなどの細胞毒性が高まっている可能性、移植による拒絶の可能性などが考えられる。今回、移植細胞の分化と共にシナプス形成促進の手助けとして valproic acid (VPA) の効果、ホストの neuroprotective な免疫学的環境を作るための glatiramer acetate, 及び拒絶の可能性に対し cyclosporin の効果を検討した。valproic acid は神経分化を促進する報告があり、我々も内在性幹細胞を活性化させる系で valproic acid 添加が幹細胞の視細胞への分化促進に働くことを以前示している(1)。また、glatiramer acetate は免疫系を Th1から Th2にシフトさせる作用をもつ他、regulatory Tを増加させるなど、免疫寛容性を高める他、マイクログリアなどの neuroprotective な効果を高める

事などが報告されている(2-4)。また、cyclosporine については中長期の移植後 10週後の効果まで検討した。

B. 研究方法

生後4週から8週令の rd マウスに対し、生後3から7日令の Nrl-GFP 網膜細胞を 600000/眼で移植し、2週後、眼球をパラフィン固定し、100 μ m 毎に網膜に生着している細胞数を計数し、もっとも生着良好なものから3眼の生着数で比較した。glatiramer acetate (copaxone:300 μ g/匹)は complete Freund's adjuvant と共に移植1週間前に皮下接種した。また、シクロスポリン投与群では 100mg/l を移植3日前より飲水に混ぜ、トラフ値が有効レベルであることを確認しつつ、移植後1週後、4週後、10週後で網膜細胞に付着している視細胞総数について計数し、投与の有無での違いを比較した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は ARVO の動物実験規定に従った。

C. 研究結果

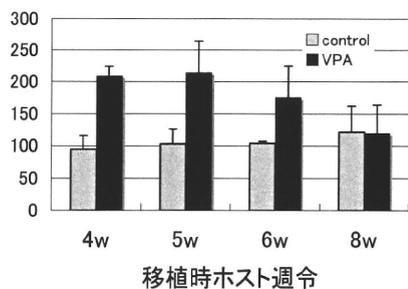


図1 VPA 添加による移植細胞の生着細胞数に対する効果。

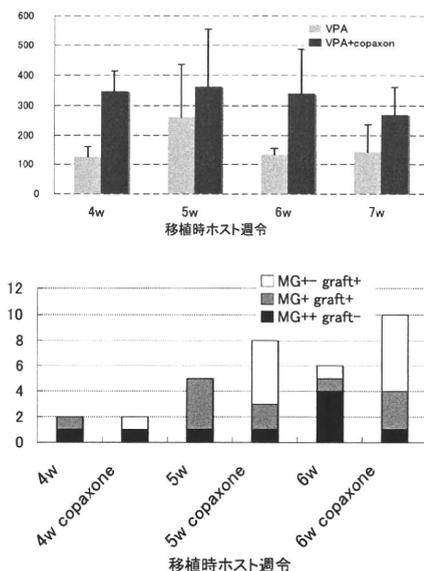


図2 copaxone の移植細胞生着への効果。上 各週令で移植時の生着細胞数。下 移植部位へのマイクログリアの集積を、ほとんど無いもの(MG+-graft+)、集積しているが移植片も健在のもの(MG+graft+)、マイクログリアが集積し、graft がほとんど消失しているもの(MG++graft-)の3群に分類し、それぞれの眼数を評価した。

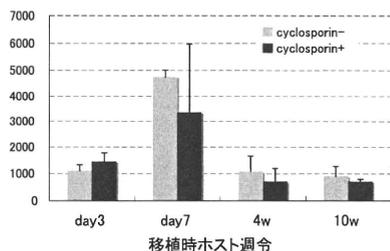


図3 cyclosporine 投与と中長期の移植細胞の生着。

valproic acid は $10 \mu\text{M}$ ~ 10mM の添加において、 1mM の細胞懸濁液への添加が最も有効であった。また、変性後移植時期が早いほどコ

ントロールに比べ効果がみられ、4週時の移植では有意な生着数の増加がみられた(図1)。glatiramer acetate の術前接種は移植部位へのマイクログリアの集積を抑制し、移植細胞の生着数の増加がえられた(図2)。また、シクロスポリンの投与群、非投与群で、網膜細胞に付着してくる細胞数を数えると、1週間後で一旦最大となり、4週後までに一旦減少するものの、その後10週目まで有意な減少はなかった。また、この過程においてシクロスポリンの投与の有無では差はみられなかった。

D. 考察

シクロスポリンの有無で生着に差が無く、また移植後1ヶ月での細胞数がその後10週目まで変化なかったことより、最初の1ヶ月以内にホストネットワークに組み込まれるかどうかが中長期の生着の大切なポイントと思われた。この中長期までの移植細胞生着には免疫抑制で差なかったことより拒絶反応は影響なかったと思われるが、半年以上の長期生着については拒絶の可能性も報告されており(5)、拒絶の影響についてはより長期に検討する必要がある。また、移植2週後の総帰省着の評価で glatiramer acetate や valproic acid が有効であったことから、これらの因子が術直後の炎症抑制や、移植細胞の分化成熟、ホストとの接触に寄与した可能性が示唆された。以前の報告では6週目以降にはグリオースの影響がでてきており、コンドロイチナーゼなどの添加が効果があったことより、valproic acid の効果は特にグリオースが進行する前の段階で有意であったと思われる。後期の移植にはコンドロイチナーゼとの併用など考慮する必要があるかもしれない。

これらの移植細胞が実際にシナプスを形成しているか、視細胞として機能しているか、今後より

詳細な検討を進める予定である。

E. 結論

網膜変性モデルでは、移植後1ヶ月以内の生着率を上げる事が大切であり、そのためにはVPA添加や glatiramer acetate の術前処置などによる、炎症抑制や移植細胞の分化、シナプス形成促進が大切であると思われた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 万代道子: 視細胞移植による網膜の再生治療、第9回日本再生医療学会総会、広島。
2. 万代道子: マウス変性網膜への視細胞移植の条件検討。第68回日本眼科学会。
3. 万代道子、網膜の移植による再生医療。第42回日本臨床分子形態学会総会、静岡。

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. Osakada F, Ooto S, Akagi T, Mandai M, Akaike A, Takahashi M: Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci* 27(15), 4210-4219,

2007.

2. Butovsky O, Koronyo-Hamaoui M, Kunis G, Ophir E, Landa G, Cohen H, Schwartz M: Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(31), 11784-11789, 2006.

3. Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, Sela M, Arnon R: Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24), 14157-14162, 2003.

4. Gorantla S, Liu J, Sneller H, Dou H, Holguin A, Smith L, Ikezu T, Volsky DJ, Poluektova L, Gendelman HE: Copolymer-1 induces adaptive immune anti-inflammatory glial and neuroprotective responses in a murine model of HIV-1 encephalitis. *J Immunol* 179(7), 4345-4356, 2007.

5. West EL, Pearson RA, Barker SE, Luhmann UF, Maclaren RE, Barber AC, Duran Y, Smith AJ, Sowden JC, Ali RR: Long-term survival of photoreceptors transplanted into the adult murine neural retina requires immune modulation. *Stem Cells* 28(11), 1997-2007, 2010.

4. 低線量・低線量率放射線による 網膜色素変性マウスモデルの変性抑制効果

大谷篤史、小嶋洋史、郭从容、中川聡子、牧山由希子、吉村長久
(京大)

研究要旨 低線量放射線照射が生物に有益な効果がある可能性が報告されており、放射線ホルミシスといわれる。我々は放射線ホルミシスが網膜神経変性に対する保護作用を持つことを見出し、効果とメカニズムについて検討した。

A. 研究目的

低線量放射線照射が生物に有益な効果がある可能性が報告されており、放射線ホルミシスといわれる。我々は放射線ホルミシスが網膜神経変性に対する保護作用を持つことを見出し、効果とメカニズムについて検討した。

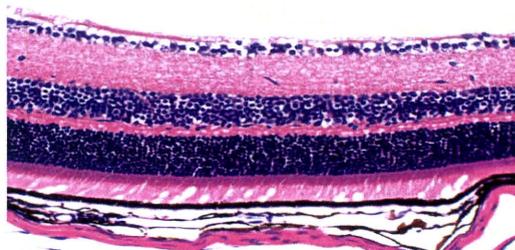
が出来た。Peroxi-redoxin-2 (Prdx2) が特徴的に放射線照射後の網膜において発現増加していたが、これをブロックすることにより低線量放射線の神経変性抑制効果が減弱したことから、この抗酸化関連遺伝子がメカニズムの一翼を担っていると考えた。

B. 研究方法

rd10 (B6.CXB1-Pde6brd10/J) 網膜色素変性マウスを対象に、様々な線量の放射線(ガンマ線、Gammacell 40 Exactor、Nordion, Vancouver, Canada)を様々な線量率をもってマウス眼に照射し、網膜神経変性の変化を形態学的(組織切片)機能的(ERG)を用いて網膜変性の進行が変化するか検討した。PCRアレイを用いて照射により変化する因子を検索し、サイレンシングを行うことで関連因子か否か確認した。



コントロール照射網膜



低線量低線量率照射網膜

C. 研究結果 考察

低線量放射線照射は特徴的なU字型の線量依存性に網膜変性マウスの視細胞変性を抑制した。線量 650mGy、線量率 26mGy/min の照射が最も効果的であった。効果は一時的であったが、複数回の照射でその効果を延長させること

D. 結論

低線量・低線量率放射線照射が網膜神経変性に対して保護的に働く可能性を示した。治療としての有用性を実証していきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

大谷篤史、他：網膜色素変性症マウスモデルにおける低線量・低線量率放射線の神経保護作用放射線ホルミシス. 第48回網膜硝子体学会、名古屋.

G. 知的財産出願 登録

なし

H. 参考文献

1. Luckey TD: Physiological benefits from low levels of ionizing radiation. Health Phys 43, 771-789, 1982.
2. Yonezawa M, Misonoh J, Hosokawa Y: Two types of X-ray-induced radioresistance in mice: presence of 4 dose ranges with distinct biological effects. Mutat Res 358, 237-243, 1996.

5. Leber 先天盲を含む常染色体劣性網膜色素変性の

網羅的遺伝子解析

藤巻拓郎、宮崎 愛、藤木慶子、岩田文乃、
高林雅子、田村智英子、和田裕子、早川むつ子、村上 晶
(順天大)

研究要旨 Leber 先天盲 (Leber congenital amaurosis: LCA) は生後早期に視細胞変性が進行する網膜色素変性で遺伝的異質性がある。原因遺伝子は優性遺伝形式 3 種、劣性遺伝形式 13 種が知られている。LCA を含む常染色体劣性網膜色素変性 (autosomal recessive retinitis pigmentosa: ARRP) は日本人において頻度が高く重症型が多く含まれているが、各原因遺伝子の頻度は明らかでない。本研究では 12 遺伝子の全翻訳領域を含む DNA アレイを用いることで、LCA を含む ARRP 計 73 例について、その変異の種類と頻度の概要を明らかにすることを目的に解析を進める。

A. 研究目的

LCA を含む ARRP の各原因遺伝子について、日本人における変異の種類と頻度の概要を明らかにする。

例を対象から除外した。

対象の内訳

発症年齢	病型	症例数
0 歳	LCA	8
1~2 歳	幼年型網膜色素変性	4
3~12 歳	早期発症型網膜色素変性	28
13 歳~	ARRP のみ	33
		計 73 例

B. 研究方法

対象: 1988 年から現在までに当科を受診し、以下の条件に該当する LCA を含む ARRP 73 例 (男性 45 例、女性 28 例、平均発症年齢 16.1 ± 14.6 歳、初診時年齢 33.6 ± 20.3 歳)。

・現時点で診療録と試料の双方が保存されている。・常染色体劣性遺伝形式は、親・子・血縁者に発症がなく、同胞発症、両親が近親婚、祖父母の出身地が同じ。・X 連鎖遺伝形式と判別不能の場合も対象に含めた。・12 歳までに自覚症状が出現した症例を早期発症例とした。・早期発症例の ARRP は、孤発例も対象に含めた。・早期発症例以外の ARRP は、孤発

方法: 説明と同意が得られた患者血液からゲノム DNA を抽出。RPE65、AIPL1、CEP290、CRB1、GUCY2D、LCA5、RDH12、RPGRI1、TULP1、EYS、PDE6A、PDE6B 計 12 種の遺伝子のエクソン領域を含む、0.5~10Kbp を PCR 法で増幅。RPE65 遺伝子に関しては直接塩基配列決定法でも解析。網羅的遺伝子解析に関しては RPE65 を含む上記遺伝子の

エクソン部分の DNA アレイを作成。増幅した DNA は Fragmentation、Labeling、Hybridization、Wash/Stain/Scan の行程を経て塩基配列を決定し、変異の有無を確認する。

(倫理面への配慮)

厚生労働省ガイドラインに準拠し順天堂大学医学部倫理委員会の承認を得て施行した。

C. 研究結果

先行して解析した早期発症の 5 症例に関して RPE65 遺伝子変異は認められなかった。12 遺伝子 (242 配列、42016 塩基) の全翻訳領域の配列解析が可能な DNA アレイの作成が終了した。

D. 考察

近年、日本人の視覚障害の原因として網膜色素変性をはじめとする遺伝性網膜疾患は、緑内障、糖尿病網膜症に次ぎ第3位¹⁾となり、厚生省班研究の全国疫学調査では約23000人の患者がいると推定されている²⁾。原因遺伝子は約140種、未知を含めると約190種³⁾と多岐にわたり、遺伝的異質性のある疾患である。中でも Leber 先天盲は乳児期に発症する網膜色素変性の重症型で、日本人に頻度の高い ARRP と同様に有効な治療法がない。2007年、米国と英国で Leber 先天盲患者の遺伝子治療が行なわれ、患者の視機能改善が報告された^{4,5)}。現在までに20名以上が同様の治療を受けている^{6,7)}。これは原因遺伝子の中で、常染色体劣性遺伝形式の RPE65 遺伝子変異を持つ患者に適応となる。この遺伝子治療の成功により米国内におよそ3000名と考えられている Leber 先天盲患者の遺伝子診断プロジェクト⁸⁾も同時に進められている。遺伝子治療と

遺伝子診断とは表裏一体の関係にあり、将来わが国でも網膜色素変性、中でも重症型で頻度の高い ARRP の遺伝子治療を目指すにあたり、変異の種類と頻度の概要を知る必要があると考えられる。

E. 結論

DNA アレイは従来の直接塩基配列決定法と比較し、ARRP の遺伝子診断に有用と考えられるが、実際に解析を進め検証する必要がある。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

I. 参考文献

1. 中江公裕、他：日本人の視覚障害の原因 15 年前との比較。医学のあゆみ 225、691-693、2008。
2. 網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究：平成 15 年度総括・分担研究報告書：厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業。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。2004。
3. Retinal Information Network：
<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis>。

htm

4. Maguire AM et al: Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 21, 2240-8, 2008.

5. Bainbridge JW et al: Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 21, 2231-9, 2008.

6. Hauswirth WW et al: Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 19, 979-90, 2008.

7. Maguire AM et al: Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374, 1597-605, 2009.

8) Project 3000.

<https://www.carverlab.org/project3000>

6. AO-SLO による黄斑部毛細血管拡張症の視細胞異常

大音壮太郎¹⁾、板谷正紀¹⁾、高山弘平¹⁾、荒川奈央子¹⁾、辻川明孝¹⁾、
古泉英貴²⁾、吉村長久¹⁾
(京都大¹⁾、京都市立医大²⁾)

研究要旨 目的:補償光学適用走査型レーザー検眼鏡(AO-SLO)を用いて黄斑部毛細血管拡張症(MacTel) type2 の視細胞構造異常について調べ、視機能との相関を検討し、種々の眼底イメージング機器より得られる所見との比較を行った。

対象:正常眼 10 例 10 眼および京都大学医学部附属病院にて MacTel type2 と診断され、脈絡膜新生血管を認めない非増殖型の 7 例 13 眼。

方法:被検者全員に眼科一般検査・スペクトラルドメイン光干渉断層計(SD-OCT)・AO-SLO を施行し、中心窩から 0.5mm, 1mm の領域における視細胞密度を測定した。MacTel type2 症例においては全例フルオレセイン蛍光眼底造影(FA)、眼底自発蛍光(FAF)、confocal blue reflectance (CBR)、眼底視野計(MP)を併せて施行し、各機器で得られた画像の異常領域を計測した。

結果:AO-SLO により正常眼では全例視細胞モザイク構造を示したが、MacTel type2 症例では全例輪状もしくは斑状の視細胞モザイク消失像を認めた。MacTel type2 症例では正常眼に比べ、中心窩から 0.5mm の全方向で視細胞密度の低下を認めた。AO-SLO における視細胞密度の低下は、SD-OCT における視細胞内節・外節接合部の状態と関連していた。MacTel type2 症例では全例、CBR における反射増強領域が FA における蛍光漏出領域・FAF における過蛍光領域・AO-SLO における視細胞欠損領域・MP における感度低下領域より広範囲であった。AO-SLO での視細胞欠損領域は FA における蛍光漏出領域とほぼ一致していたが、11 眼では FA で蛍光漏出のない領域まで視細胞欠損像を認め、また FA に異常を認めない極早期の症例においても斑状の小欠損像が認められた。中心窩から 1mm 耳側の領域において、早期症例(stage1・2)では進行期症例(stage3・4)に比べ、有意に視細胞密度が低下していた(P=0.001)。更に中心窩から 0.5mm の位置において、視細胞密度は視力および網膜感度と関連していた(P=0.003, P<0.001)。

結論:AO-SLO により MacTel type2 における視細胞構造異常が明らかとなり、視細胞密度の低下が視機能の低下と関連していた。正常血管の領域まで視細胞欠損像を認めることから、MacTel type2 における視細胞欠損は血管異常に伴う二次的な障害ではなく、より早期の神経細胞障害が病態に関与していることが示唆される。

A. 研究目的

黄斑部毛細血管拡張症(MacTel)は特発性の黄斑部毛細血管の拡張所見を特徴とする疾

患群の総称である。2006 年に Yannuzzi らによって提唱された分類では 2 群に分けられる¹⁾。Type1 は片眼性の明瞭な血管瘤の形成およ