

E. 結論

網膜変性疾患に特徴的な所見と考えられる網膜外層の変化 ORSF を報告した。RPE、脈絡膜の変性過程と関連していることが考えられるが、病理学的意義は不明である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

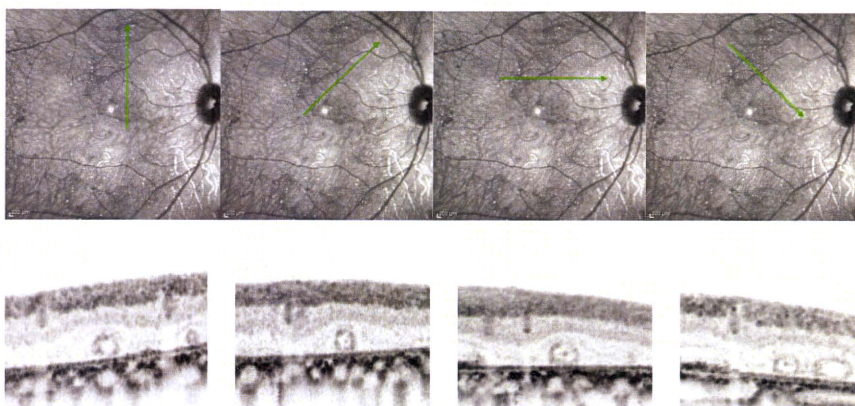
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

Sandrine A et al: Outer Retinal Tubulation. A Novel Optical Coherence Tomography Finding. Arch Ophthalmol 127, 1596-1602, 2009

Figure1



SD-OCT image of Bietti crystalline retinopathy with ORSF

42. NSAIDs による HO-1 を介した脈絡膜血管新生抑制

吉永就正、有村 昇、白澤 誠、大塚寛樹、園田祥三、坂本泰二

(鹿児島大)

研究要旨 非ステロイド性抗炎症鎮痛薬 (NSAIDs)は、眼科炎症性疾患に対し広く用いられており、副作用も少ない薬物である。NSAIDs により誘導される抗酸化タンパク質 Heme oxygenase-1 (HO-1) と脈絡膜血管新生の関連について検討した。NSAIDs 投与により、ARPE-19 細胞で HO-1 が誘導された。ラット CNV モデルでは、NSAIDs 点眼による HO-1 発現に伴い CNV サイズが縮小し、浸潤 ED1 陽性マクロファージ数も減少していた。SnMP による HO-1 阻害でこれらの効果は消失し、眼内容液中 VEGF の上昇がみられた。抗炎症作用のある NSAIDs は同時に抗酸化タンパク質を誘導する。NSAIDs により脈絡膜血管新生は抑制され、その作用の一部に抗酸化タンパク質が関連している可能性が示唆された。NSAIDs には抗酸化的作用があり、加齢黄斑変性などの酸化ストレスが関与する眼疾患に有用である可能性がある。

A. 研究目的

非ステロイド性抗炎症鎮痛薬 (NSAIDs)は、眼科炎症性疾患に対し広く用いられており、副作用も少ない薬物である。ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 とラットレーザー誘発脈絡膜新生血管 (CNV) モデルを用い、NSAIDs により誘導される抗酸化タンパク質 Heme oxygenase-1 (HO-1) と脈絡膜血管新生の関連について検討した。

B. 研究方法

NSAIDs 刺激下の ARPE-19 における、転写因子 NF-E2 related factor 2 (Nrf2) と、その下流の抗酸化タンパク質である HO-1 の発現を Western blotting・免疫染色にて確認した。CNV モデルラットに NSAIDs 点眼の投与を行い、CNV サイズ、CNV 周囲での Nrf2・HO-1 の免疫染色像、ED1 陽性マクロファージ数について非投与時と比較した。さらに脈絡膜血管新生における HO-1 の関連に

焦点を当てるため、ラットに HO-1 阻害剤である Stannic mesoporphyrin (SnMP) の腹腔内投与を行い、同様の検討に加え眼内容液中の Vascular endothelial growth factor (VEGF) の測定を行った。

(倫理面の配慮)

動物を用いた研究は、鹿児島大学の倫理審査委員会の承認を得て行なった(承認番号: MD09091号、MD10076号)。

C. 研究結果

NSAIDs 刺激により、ARPE-19 細胞において、濃度・時間依存的に Nrf2 の核内移行がみられ、HO-1 が誘導された。

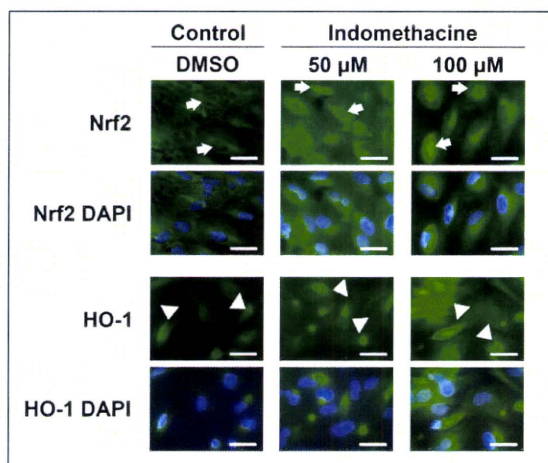


図1 NSAIDs による Nrf2, HO-1 の発現

ラット CNV モデルでは NSAIDs 点眼により CNV 周囲の Nrf2 の核内移行と HO-1 発現の増強が認められた。同時に NSAIDs 点眼により CNV サイズが縮小したが SnMP を用いて HO-1 を阻害すると、この効果は消失した。ED1 陽性マクロファージ数は NSAIDs 投与により減少していたが、SnMP 投与を同時に行った場合には、その効果がなくなり、コントロールと同程度のマクロファージの集積が認められた。眼内容液の検討では SnMP の投与により VEGF の上昇がみられた。

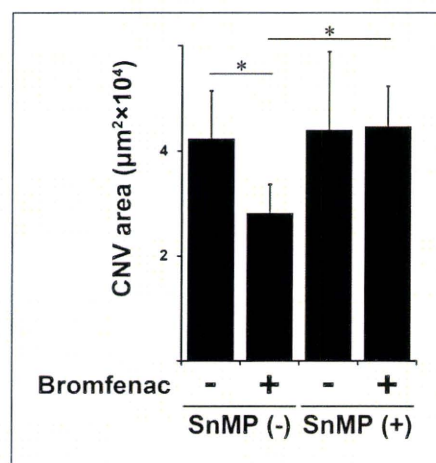


図2 NSAIDs 点眼、HO-1 阻害剤 (SnMP) による CNV サイズの変化

D. 考察

CNV が NSAIDs により抑制されるという報告は過去に幾つかあり、NSAIDs の抗炎症作用により網膜 VEGF の発現が抑制されることその機序とされている¹⁴。今回我々の実験においても、NSAIDs 点眼により眼内容液中の VEGF の低下がみられており、これらの報告と一致していた。一方 ARPE-19 細胞、ラット CNV モデル双方で NSAIDs による Nrf2 の活性化とその下流の抗酸化タンパク質 HO-1 の誘導が確認された。ラットモデルではこれに伴い CNV サイズが縮小し ED1 陽性マクロファージ浸潤も減少していた。NSAIDs によるこれらの効果は HO-1 阻害剤 (SnMP) の追加投与によりなくなり、血管新生抑制における NSAIDs の作用の一部に HO-1 等の抗酸化タンパク質が関連している可能性が示唆された。

E. 結論

抗炎症作用のある NSAIDs は、同時に抗酸化タンパク質を誘導する。NSAIDs により脈絡膜血管新生は抑制されうるが HO-1 を阻害

することでこの効果が見られなくなり、眼内容液中の VEGF も上昇することから、血管新生抑制における NSAIDs の作用の一部に HO-1 等の抗酸化タンパク質が関連している可能性が示唆された。NSAIDs には、抗酸化的作用があり、加齢黄斑変性などの酸化ストレスが関与すると考えられる眼疾患に有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Laboratory Investigation 誌投稿中

2. 学会発表

1. 吉永就正, 有村 昇, 園田祥三, 竹之内和則, 野間 聖, 川原幸一, 橋口照人, 丸山征郎, 坂本泰二: NSAIDs による網膜色素上皮株における抗酸化タンパク質誘導. 第 114 回日本眼科学会総会、名古屋市、2010.
2. Yoshinaga N, Arimura N, Sonoda S, Takenouchi K, Noma S, Kawahara K-I, Hashiguchi T, Maruyama I, Sakamoto T : NSAIDs induce antioxidant proteins in retinal pigment epithelial cells. ARVO2010 Annual Meeting (U.S.A, Greater Fort Lauderdale /Broward County Convention Center) May 03, 2010.
3. 吉永就正、有村 昇、白澤 誠、大塚寛樹、園田祥三、坂本泰二 : NSAID eyedrop による脈絡膜血管新生抑制. 眼創傷治癒研究会、和歌山市、2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記事項なし。

2. 実用新案登録

特記事項なし。

3. その他

特記事項なし。

I. 参考文献

1. Takahashi H, Yanagi Y, Tamaki Y, Uchida S, Muranaka K: COX-2-selective inhibitor, etodolac, suppresses choroidal neovascularization in a mice model. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 461-466, 2004.
2. Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, et al: Topical Nepafenac inhibits ocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 409-415, 2003.
3. Yanni SE, Clark ML, Yang R, Bingaman DP, Penn JS: The effects of nepafenac and amfenac on retinal angiogenesis. *Brain Res Bull* 81, 310-319, 2010.
4. Kim, SJ, Toma, HS: Inhibition of choroidal neovascularization by intravitreal ketorolac. *Arch of Ophthalmol* 128, 596-600, 2010.
5. Kim SJ, Toma HS, Barnett JM, Penn JS: Ketorolac inhibits choroidal neovascularization by suppression of retinal VEGF. *Exp Eye Res* 91, 537-543, 2010.

43. 膜蛋白 CD9 標的治療による脈絡膜血管新生阻害剤

寺崎寛人¹⁾²⁾、上笹貫太郎¹⁾²⁾、小賤健一郎²⁾、坂本泰二¹⁾²⁾

(¹⁾鹿児島大、²⁾鹿児島大遺伝子治療・再生医学)

研究要旨 多くの分野で血管新生が病態悪化の原因となる疾患の治療法として抗血管新生抑制因子(VEGF)薬が用いられており一定の効果をあげているが、正常組織への悪影響などの問題もあり、まだ確立していない。細胞運動に関わると考えられる CD9 に着目し、CD9 を標的とした血管新生抑制効果について検討した。ヒト血管内皮細胞を対象としてその遊走能・浸潤能を調べた。その結果、CD9 発現抑制による明らかな運動能抑制効果を認めた。動物実験においても、有意な血管新生抑制効果を認めた。この新たな CD9 標的治療は臨床での応用が期待できる。

A. 研究目的

眼科領域、関節リウマチ、各種癌など多くの分野で血管新生抑制を目的とした治療法が研究されている。臨床では、抗 VEGF 薬が使用され、一定の効果をあげているが、正常組織への悪影響があるなど、更に安全で効果的な薬剤が求められている。血管新生抑制における主な機序として、血管内皮細胞の遊走、浸潤があげられる。血管内皮細胞に豊富に発現する因子として CD9 がある。細胞運動に関わると考えられているが、その機能の多くは未だ不明である。CD9 発現の変化によって血管内皮細胞の運動能が抑制されると仮定し、その検討を行った。CD9 発現抑制には、近年新たな治療法としても注目されている遺伝子干渉法を用いた。

B. 研究方法

細胞遊走能実験としてボイデンチャンバー(24well, pore size 8.0 μ m)の上層にヒト血管内皮細胞 HMVEC を、下層に遊走誘導因子として VEGF または HGF を含有したメディアウム(2%FBS)をいれ、4、8、12 時間後の遊走細胞

数を計測した。CD9 標的 siRNA 導入群(2種類、siRNA-CD9- α 、siRNA-CD9- β)、コントロールとして LamininA/C 標的 siRNA 導入群(siRNA-LaminA/C)、ランダム配列で作成した siRNA 導入群(siRNA-Random)、非導入群を設定した。

さらに細胞浸潤能実験としてマトリゲルコーティングボイデンチャンバーを用いて同様の実験を行った。

動物実験として、角膜マイクロポケット新生血管アッセイを行った。ラットの角膜を半創切開して作成したポケットに、誘導因子として VEGF または HGF を含有させたペレットを挿入し、6 および 24 時間後に siRNA-CD9- α 、siRNA-Random、および PBS を角膜下に注射した。ペレット挿入から 7 日後に、角膜輪部から出現する血管新生領域の面積を定量した。次に、レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを用いて、検討を行った。C57/BL6 マウスの脈絡膜にアルゴンレーザーを照射し、脈絡膜新生血管を誘発し、レーザー当日と 7 日後に siRNA-CD9- α 、siRNA-Random、および PBS

を硝子体内注射した。
併せて、抗 CD9 抗体 (kmc8.8; SantaCruz 社) の脈絡膜新生血管抑制効果も検討した。
実験は、siRNA と同様の計画で行い、コントロールには PBS を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、鹿児島大学動物実験倫理規定に基づき行った。

C. 研究結果

遊走能を調べるマイグレーションアッセイでは、どちらの誘導因子群でも siRNA-CD9 導入群、特に siRNA-CD9- α 導入群において血管内皮細胞の遊走、浸潤能の抑制を認めた。浸潤能を調べるインベイジョンアッセイでも、同様の結果が得られた。

ラット角膜の血管新生領域は、siRNA-CD9- α 注入群は、他の群に比べ、その面積が明らかに減少し、血管新生が抑制されていた。

マウス脈絡膜新生血管モデルでは、siRNA-CD9- α 注射群と抗 CD9 抗体注射群では、コントロール群と比べ、その面積が明らかに減少しており、血管新生が抑制されていた。

D. 考察

CD9 は細胞運動と関わる他のテトラスパニンファミリーやインテグリンなどの細胞膜上タンパクと複合体を形成することから、CD9 の発現を抑制することで、血管内皮細胞膜上に他の膜蛋白質の量や局在の変化が生じるなどなんらかの変化が発生し、正常な細胞運動能が発揮されなかったと考えられる。

E. 結論

細胞実験・動物実験の両方から、CD9 の発現

抑制によって血管内皮細胞の運動能抑制が可能であった。CD9 を標的とすることで、新たな血管新生抑制治療の開発につながる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願した特許)

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

I. 参考文献

1. Davis GE & Senger DR: Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 97, 1093-1107, 2005.
2. Kvanta A: Ocular angiogenesis: the role of growth factors. *Acta Ophthalmol Scand* 84, 282-288, 2006.
3. Bressler NM, et al: Improved vision-related function after ranibizumab vs photodynamic therapy: a randomized clinical trial. *Arch Ophthalmol* 127, 13-21, 2009.
4. Wu, et al: Twelve-month safety of intreal

injections of bevacizumab (Avastin®): results of the Pan-American Collaborative Retina Study Group (PACORES). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246, 81-87, 2008.

5. Zhang F, et al: Tetraspanins and vascular functions. *Cardiovasc Res* 83, 7-15, 2009.

6. Miyado K, et al: Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287, 321-324, 2000.

7. Miyake M, et al: Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility. *J Exp med* 174, 1347-1354, 1991.

8. Ikeyama S, et al: Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J Exp med* 177, 1231-1237, 1993.

44. アルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat による

脈絡膜新生血管抑制

野崎実穂¹⁾、中島淳志²⁾、守本亘孝²⁾、加藤憲明²⁾、小椋祐一郎¹⁾

(¹⁾名古屋市大、²⁾三和化学研究所)

研究要旨 アルドース還元酵素阻害剤は、糖尿病合併症治療薬として開発されてきた経口薬剤であるが、最近、炎症に関連するサイトカインを抑制させる作用も発見され、炎症性疾患治療薬として新たに注目されている。今回、我々は、炎症の関与が示唆されている加齢黄斑変性(AMD)に対するアルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat の治療効果について、マウスを用いた実験的レーザー脈絡膜新生血管(CNV)モデルで検討した。CNVは7日目にレーザー共焦点顕微鏡で容積を測定した。無治療群、Fidarestat 強制経口投与群、血管内皮増殖因子(VEGF)中和抗体投与群(2ngあるいは10ng)、Fidarestat 強制経口投与および VEGF 中和抗体投与併用群(併用群)にわけた。Fidarestat 強制経口投与は、レーザー後から7日目まで行う群と、レーザー3日目から行う群にわけ、VEGF 中和抗体も、レーザー直後に硝子体内に投与する群とレーザー3日目に投与する群にわけた。Fidarestat 強制経口投与で、用量依存的に CNV 容積は有意に抑制された。VEGF 中和抗体 2ng 投与群では有意な CNV 容積の抑制はみられなかったが、VEGF 中和抗体 2ng と Fidarestat の併用群では、有意な CNV 容積の抑制がみられた。レーザー照射後3日目から治療を開始した場合は、Fidarestat 投与群、VEGF 中和抗体投与群ともに有意な CNV 容積の抑制は見られなかったが、Fidarestat と VEGF 中和抗体 2ng 併用群で最も CNV 容積が抑制されていた。アルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat は、実験的レーザー CNV モデルにおいて、低用量の VEGF 中和抗体との併用で有意な CNV 容積抑制を認めた。Fidarestat はすでに他の治験でヒトへの安全性が確認されており、今後、AMD の治療において、Fidarestat を抗 VEGF 治療と併用し、抗 VEGF 治療回数を減らせる可能性が考えられた。

A. 研究目的

加齢黄斑変性(AMD)に対する治療は、抗 VEGF 薬の硝子体内投与が主流となっているが、硝子体内投与にまつわる眼内炎のリスクなど問題がある。アルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat¹⁾は、糖尿病神経障害治療薬として

開発されてきたが、最近、炎症に関連するサイトカインを抑制させる作用も発見され、炎症性疾患治療薬として新たに注目されている^{2, 3)}。そこで、今回、我々は、炎症の関与が示唆されている加齢黄斑変性(AMD)に対するアルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat の抑制効果につ

いて、マウスを用いた実験的レーザー脈絡膜新生血管(CNV)モデルで検討した。

B. 研究方法

実験動物は、雄の生後約6週のC57BL/6Jマウスを用い、CNVはレーザー網膜光凝固により誘導し、7日目にレーザー共焦点顕微鏡でCNV容積を測定した。無治療群、Fidarestat (8-32mg/kg/day)強制経口投与群、血管内皮増殖因子(VEGF)中和抗体投与群(2ngあるいは10ng)、Fidarestat強制経口投与およびVEGF中和抗体投与併用群(併用群)にわけた。Fidarestat強制経口投与は、レーザー後から7日目まで行う群と、レーザー3日目から行う群にわけ、VEGF中和抗体も、レーザー直後に硝子体内に投与する群とレーザー3日目に投与する群にわけた。

C. 研究結果

Fidarestat強制経口投与で、用量依存的にCNV容積は有意に抑制された(図1)。

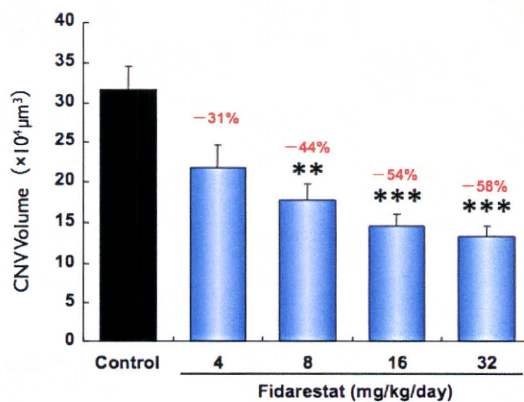


図1 CNV容積

Control; 無治療群、Fidarestat; Fidarestat治療群。
(Bar:Mean±SEM, **p<0.01, ***p<0.001, Dunnett test)

VEGF中和抗体2ng投与群では有意なCNV容積の抑制はみられなかったが、VEGF中和抗体2ngとFidarestatの併用群では、有意なCNV容積の抑制がみられた(P<0.001)(図2)。

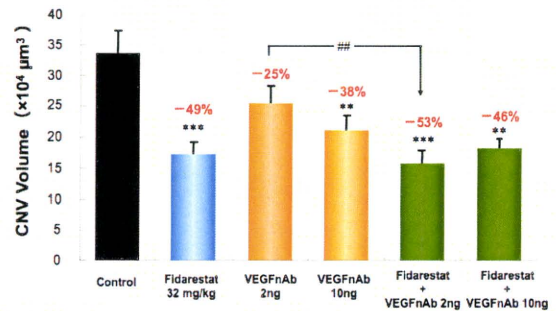


図2 CNV容積

control;無治療群、Fidarestat; Fidarestat治療群、VEGFnAb; VEGF中和抗体群、Fidarestat+VEGFnAb; 併用群。

(Bar:Mean±SEM,

, *: p<0.01, p<0.001 vs. Control

##: p<0.01 vs. VEGF nAb 2ng)

レーザー照射後3日目から治療を開始した場合には、Fidarestat投与群、VEGF中和抗体投与群ともに有意なCNV容積の抑制は見られなかったが、FidarestatとVEGF中和抗体2ng併用群で最もCNV容積が抑制されていた(p<0.01)(図3)。

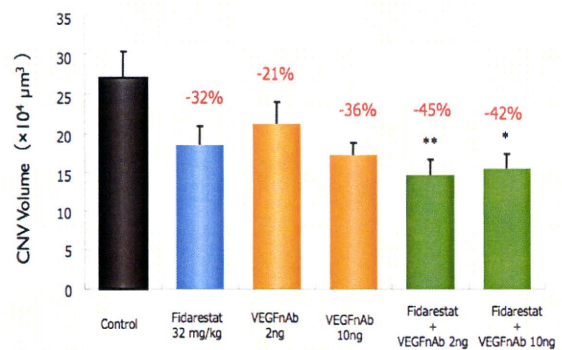


図3 CNV容積

(Bar:Mean±SEM,

*, **: p<0.05, p<0.01 vs. Control)

D. 考察

以上の結果から、アルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat は、実験的レーザーCNV モデルにおいて、低容量の VEGF 中和抗体とともに CNV を有意に抑制させた。アルドース還元酵素阻害剤 Fidarestat は、ラット虚血再灌流モデルで TNF- α 、ICAM-1 の発現を抑制し、保護作用を示すと報告されている²⁾。またアルドース還元酵素阻害剤が、マウス気管支喘息モデルで、TNF- α 、IL-6、IL-8 の発現を抑制したという報告もある³⁾。AMD の発症機序に、マクロファージ⁴⁾、IL-6 や TNF- α といった炎症性サイトカイン、VEGF が関与していると考えられているが、今回の結果からも、Fidarestat は VEGF 更には VEGF 以外のサイトカインを抑制することにより、低容量の VEGF 抗体との併用で、有意な CNV 抑制が得られたと考えられた。

E. 結論

アルドース還元酵素阻害剤である Fidarestat は、実験的レーザーCNV モデルにおいて、低用量の VEGF 中和抗体との併用で有意な CNV 容積抑制を認めた。

Fidarestat はすでに他の治験でヒトへの安全性が確認されており、今後、AMD の治療において、Fidarestat を抗 VEGF 治療と併用し、抗 VEGF 治療回数を減らせる可能性が考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Sugitani K, et al: Oral anti-cytokine therapy for age-related macular degeneration: Fidarestat suppresses laser-induced choroidal neovascularization in mice. 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

出願完了(出願番号：特願 2010-006159)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Mizuno K et al: Profile of a new aldose reductase inhibitor, (2S, 4S)-6-Fluoro-2', 5'-Dioxospiro-[Dhroman-4', 4'-Imidazolidine]-2-Carboxamide (SNK-860). In: Current concepts of aldose reductase and its inhibitions. Ed by Sakamoto N et al. Elsevier Science Publisher B.V., p89-96, 1990.
2. Agardh CD et al: The aldose reductase inhibitor fidarestat suppresses ischemia-reperfusion-induced inflammatory response in rat retina. Pharmacology 84, 257-263, 2009.
3. Yadav UC et al: Inhibition of aldose reductase prevents experimental allergic airway inflammation in mice. PLoS One 6, e6535, 2009.

4. Sakurai E et al: Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 3578-4585, 2003.

45. 酸化脂質によるラット脈絡膜新生血管モデル

馬場隆之、山本修一

(千葉大)

研究要旨 滲出型加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管(CNV)の動物実験モデルを酸化脂質 13(S)-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (HpODE)を用いて作成しその特徴を検討した。SD ラット網膜下に HpODE を注入 3 週間後に眼球摘出し、脈絡膜フラットマウントを作製し CNV 面積測定を行った。また、蛍光眼底造影による CNV の活動性の評価を HpODE 注入後 5 週間目まで行った。組織学的には、CNV は脈絡膜毛細血管板から網膜下へ進展しており、免疫染色にて ED1 陽性マクロファージが CNV 周囲に局在していた。CNV の活動性は 3 週目に最大となり、5 週間で減弱した。*in vitro* では、30ng/ml の HpODE が血管内皮細胞の増殖および遊走を誘導した。また濃度依存性に、血管内皮、神経細胞、網膜色素上皮細胞に対する細胞毒性を示した。HpODE はヒト高齢者のブルッフ膜に多く含まれており、現在の高出力レーザーによる創傷治癒を利用した CNV モデルに比べてより実際の CNV に近いモデルであると考えられた。

A. 研究目的

加齢黄斑変性は高齢者における失明原因として重要であるが、現在までのところ治療法が確立しているとは言い難い。今後高齢化に伴い症例数が増加すると考えられる本疾患に対してより効果的な治療法の確立は必須である。現代において、治療法を検討するうえで動物実験モデルは欠かせないものとなっている。加齢黄斑変性の原因である脈絡膜新生血管(CNV)に関しては高出力レーザーによる動物モデルが主流となっているが、創傷治癒機転を利用しているに過ぎず、本来の病態とは異なる。そこで我々は、ヒト高齢者のブルッフ膜に多く含まれる酸化脂質 13(S)-hydroperoxy-9Z,11E octadecadienoic acid (HpODE)を用いて動物モデルを作製し、

その特徴を検討した。

B. 研究方法

成熟オス SD ラット網膜下に 30 μ g の HpODE を注入し、3 週間後に眼球摘出後、前眼部組織、網膜を除去し脈絡膜フラットマウントを作製し CNV を lectin にて染色し面積を測定した。また、vWF、ED1、ED2 を用いて免疫組織染色を行った。組織学的には、エポキシ包埋による薄切切片、透過電顕による検討を行った。また、蛍光眼底造影により CNV の活動性を 1 週間ごとに 5 週目まで観察した。*in vitro* での検討として、ウシ血管内皮細胞、マウス神経細胞、ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE19) にて、HpODE 存在下での細胞増殖・遊走能および細胞毒性を検討した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いはずべて ARVO Statement 及び Institute の動物実験プロトコールに従って行った。

C. 研究結果

HpODE を網膜下注入後 85.7%で CNV が発生した。CNV からの蛍光漏出は 3 週間で最大となり、5 週間で減弱した。組織学的には CNV は脈絡膜毛細血管板から網膜下へ進展しており、免疫染色では ED1 陽性細胞が CNV 周囲にみられた。透過電顕および脂肪染色により、網膜色素上皮およびマクロファージへの酸化脂質の取り込みと色素上皮細胞の変性がみられた。HpODE は 30ng/ml の濃度にて血管内皮細胞の増殖・遊走を誘導した。(図1・2) また、HpODE は濃度依存性に、神経細胞、血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞に対して細胞毒性を示した。

図 1 HpODE の血管内皮増殖刺激

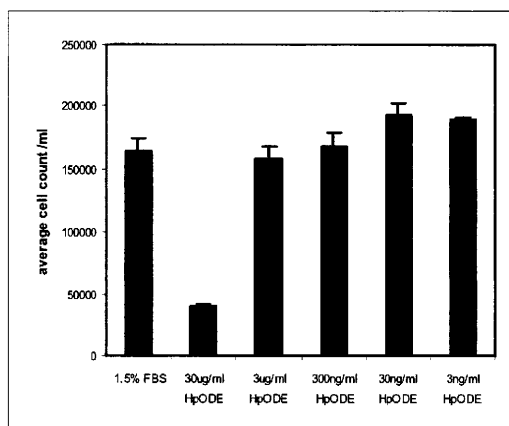
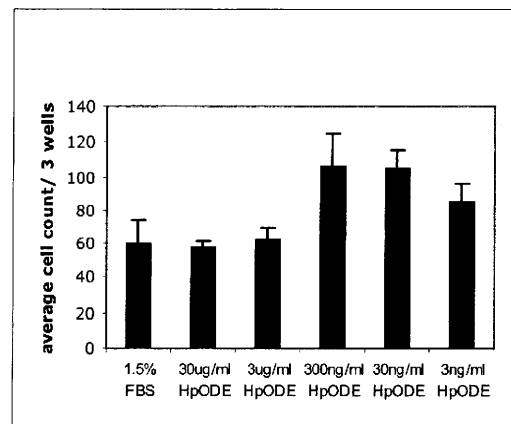


図 2 HpODE の血管内皮遊走刺激



D. 考察

酸化脂質 HpODE は網膜下に注入されたのち、網膜色素上皮細胞に取り込まれ、これを刺激することにより血管新生因子の放出を促し、CNV を誘導するものと考えられた。また、ED1 陽性マクロファージを動員し、局所における組織障害因子を発生し、ブルッフ膜を破壊することにより CNV が網膜下に成長可能な経路を生じたと考えられた。HpODE はヒト高齢者ブルッフ膜に多く存在する酸化脂質であることから、実際の高齢黄斑変性でも同様のプロセスが起きている可能性があり、本モデルをさらに詳細に検討することにより、治療法の糸口が見いだせる可能性がある。

E. 結論

ヒト高齢者ブルッフ膜に多く存在する酸化脂質である HpODE を用いてラット CNV モデルを作製した。本モデルは再現性が高く、経過も治療法の検討に適したものであった。今後この動物モデルを用いて、より効果的な加齢黄斑変性の治療手段の探究を行っていく予定であ

る。

Angiogenesis 2, 93-104, 1998.

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

Baba T et al: A rat model for choroidal neovascularization using subretinal injection of lipid hydroperoxide. The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (ARVO). Fort Lauderdale, Florida. 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Spaide RF et al: Characterization of peroxidised lipids in Bruch's membrane. Retina 19, 141-147, 1999.

2. Armstrong D et al: Lipid hydroperoxide stimulates retinal neovascularization in rabbit retina through expression of tumor necrosis factor- α , vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor.

46. 種々の網膜疾患の硝子体手術中における眼底動脈圧測定

杉浦好美、岡本史樹、岡本芳史、大鹿哲郎

(筑波大)

研究要旨 種々の網膜疾患において、Vented Gas Forced Infusion(VGFI)システムを用いて硝子体手術中に眼底動脈圧を測定した。硝子体手術を施行した 169 例を対象とし、測定した眼底動脈圧と影響因子との関連を検討した。測定された眼底動脈圧は拡張期血圧との間に有意な正の相関を認めたが、収縮期血圧との間には関連がなかった。また、糖尿病群と非糖尿病群の拡張期血圧に差はなかったが、糖尿病群の眼底動脈圧は非糖尿病群と比べて有意に低値であった。高血圧の有無で群分けしても同様の結果が得られた。また増殖糖尿病網膜症(PDR)群のみでさらに詳しく検討したところ、PDR 患者の眼底動脈圧は拡張期血圧、術前虹彩ルベオーシスの有無、PDR 重症度に関連があった。糖尿病や高血圧を有する患者で眼底動脈圧は低く、さらに PDR 患者では虹彩ルベオーシスがあり、重症度が高いほど眼底動脈圧は低いことが明らかになった。

A. 研究目的

種々の網膜疾患において、VGFIシステムを用いて硝子体手術中に眼底動脈圧を直接測定すること。

B. 研究方法

種々の網膜疾患で初回硝子体手術を施行した 169 例を対象とした。硝子体切除を行った後、VGFI を用いて徐々に圧負荷をかけ、視神経乳頭上の網膜中心動脈又はその分枝が拍動を始めた値を眼底動脈圧とした。対象疾患は増殖糖尿病網膜症 (PDR) 78 例、裂孔原性網膜剥離 (RD) 25 例、糖尿病黄斑浮腫 (DME) 29 例、黄斑円孔 (MH) 17 例、黄斑前膜 (ERM) 12 例、BRVO 4 例、CRVO 3 例、網膜細動脈瘤破裂 1 例。眼底動脈圧と関連する因子として年齢、性別、body mass index、高血圧

(HT)の有無、糖尿病(DM)の有無、血清コレステロールを検討項目とした。また PDR 患者ではこれら因子に加え空腹時血糖、HbA1c、PDR 重症度、術前虹彩ルベオーシスの有無を調査した。

(倫理面への配慮)

筑波大学倫理委員会の承認を得た後、本研究の内容について患者へ十分なインフォームドコンセントを行い、研究を行った。

C. 研究結果

測定された眼底動脈圧は 15.5～103.7 mmHg、平均 66.9mmHg であった。眼底動脈圧は拡張期血圧との間に有意な正の相関を認めたが、収縮期血圧との間には関連がなかった(図1)。また、DM 群と non-DM 群の拡張期血圧に差はなかったが、DM 群の眼底動脈圧は

non-DM 群と比べて有意に低値であった。HT の有無で群分けしても同様の結果が得られた。多変量解析にて眼底動脈圧は拡張期血圧、DM の有無、HT の有無と関連があった。また PDR 群のみでさらに詳しく検討したところ、PDR 患者の眼底動脈圧は拡張期血圧、術前虹彩ルベオシスの有無、PDR 重症度に関連があった。

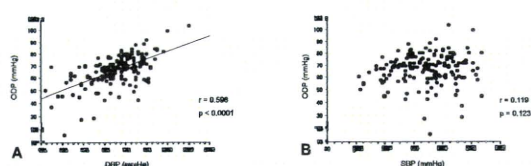


図 1 眼底動脈圧と血圧との関連
A:拡張期血圧との関連, B:収縮期血圧との関連

D. 考察

測定された眼底動脈圧は収縮期血圧には関連がなく、拡張期血圧に相関した。今回の測定法では網膜中心動脈の拡張期の圧を測定しているためと考えられる。また DM や HT を有する患者では眼底動脈圧は低い値を示した。このような患者では、末梢の網膜毛細血管床閉塞だけではなく、網膜中心動脈自身に循環障害が生じていたり、動脈硬化によりもって中枢の眼動脈、内頸動脈に循環障害が生じて、眼底動脈圧が低下している可能性が考えられる。さらに PDR 患者では術前虹彩ルベオシスがあり、重症度が高いほど眼底動脈圧は低かった。眼底動脈圧の低下は眼灌流圧低下、眼虚血を示唆するため、このような患者は術後の血管新生緑内障に注意する必要があるのかもしれない。

E. 結論

硝子体手術中に VGFI を用いて眼底動脈圧を直接測定した。眼底動脈圧は拡張期血圧と強い関連があった。DM や HT を有する患者で眼底動脈圧は低く、さらに PDR 患者では虹彩ルベオシスがあり、重症度が高いほど眼底動脈圧は低かった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiura Y et al: Ophthalmodynamometric pressure in eyes with proliferative diabetic retinopathy measured during pars plana vitrectomy. Am J Ophthalmol 2011, in press.
2. Okamoto F et al: Measurement of ophthalmodynamometric pressure with the vented-gas forced-infusion system during pars plana vitrectomy. Invest Ophthalmol Vis Sci 51, 4195-4199, 2010.

2. 学会発表

1. Sugiura Y et al: Measurement of ophthalmodynamometric pressure using Vented Gas Forced Infusion (VGFI) system during pars plana vitrectomy. Association for Reserch in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 2010.
2. Sugiura Y et al: Ophthalmodynamometric pressure in eyes with proliferative diabetic retinopathy. WOC, Berlin, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

I. 参考文献

1. Jonas JB, et al: Ophthalmodynamometric determination of the central retinal vessel collapse pressure correlated with systemic blood pressure. Br J Ophthalmol 88, 501-504, 2004.
2. Morgan WH, et al: Relation between pressure determined by ophthalmodynamometry and aortic pressure in the dog. Br J Ophthalmol 82, 821-825, 1998.
3. Fujioka S, et al: Differences of ocular circulation in eyes with proliferative diabetic retinopathy after panretinal photocoagulation with and without rubeosis iridis. Nippon Ganka Gakkai Zasshi 113, 11-15, 2009.

47. Brilliant Blue G の細胞染色性と細胞膜透過性の検討

久富智朗、納富昭司、武田篤信、池田康博、江内田寛、石橋達朗

(九州大)

研究要旨 我々は手術アジュバントとして開発した Brilliant Blue G(BBG)が細胞の基底膜である内境界膜を良好に染色することを報告した。今回 BBG の安全性評価のために細胞染色性を検討した。また近年 BBG は細胞表面の P2X7 受容体の選択的阻害剤であることが報告され、細胞内取込みへの受容体の関与を調べた。BBG は生細胞では細胞内取込みは見られず、高い安全性を裏付けた。また死細胞での BBG の細胞染色は、アポトーシス後期、ネクロトーシスでの細胞膜透過性亢進に依存し、P2X7 受容体には依存していなかった。このことから通常の硝子体手術中には生細胞の染色は見られず、BBG の高い生体適合性を裏付けていると考えられた。

A. 研究目的

我々は手術アジュバントとして開発した Brilliant Blue G(BBG)が細胞の基底膜である内境界膜を良好に染色することを報告した。今回 BBG の安全性評価のために細胞染色性を検討した。また近年 BBG は細胞表面の P2X7 受容体の選択的阻害剤であることが報告され、細胞内取込みへの受容体の関与を調べた。

B. 研究方法

C57BL6 マウスの網膜から初代細胞培養系を作製した。コントロール群と B27 及び栄養因子を除去した栄養飢餓群を作製した。24時間後に生細胞を評価するために Calcein AM、CMTMRos 取込みを、死細胞を評価するため Propidium iodide の取込みを調べた。続いて BBG を投与、洗浄後、固定し TUNEL 法を用いて apoptosis を検討した。また P2X7 受容体ノックアウトマウスを用いて同様の実験を行い比較した。

結果: 飢餓条件下では細胞のアポトーシスが観察された。Calcein AM、CMTMRos 陽性細胞では BBG の細胞染色は見られなかった。TUNEL 陽性細胞の一部と Propidium iodide 陽性細胞では BBG の染色が見られた。ノックアウトマウスでは BBG の細胞染色は野生型と差が無かった。

(倫理面への配慮)

The Association for Research in Vision and Ophthalmology の動物取り扱い規約に準拠して、動物実験を行った。

C. 研究結果

飢餓条件下では細胞のアポトーシスが観察された。Calcein AM、CMTMRos 陽性細胞では BBG の細胞染色は見られなかった。TUNEL 陽性細胞の一部と Propidium iodide 陽性細胞では BBG の染色が見られた。ノックアウトマウスでは BBG の細胞染色は野生型と差が無かった。

D. 考察

BBG は生細胞では細胞内取込みは見られず、高い安全性を裏付けた。また死細胞での BBG の細胞染色は、アポトーシス後期、ネクローシスでの細胞膜透過性亢進に依存し、P2X7 受容体には依存していなかった。

E. 結論

我々は硝子体手術時の使用において黄斑上膜や網膜の細胞には染色が見られず、内境界膜が良好に染色されることを報告している。今回の実験から通常の硝子体手術中には生細胞の染色は見られず、BBG の高い生体適合性を裏付けていると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

出願;神経保護作用を持つ薬剤配合(10-194P)国立大学法人九州大学

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Hisatomi T, Enaida H, Matsumoto H, Kagimoto T, Ueno A, Hata Y, Kubota T, Goto

Y, Ishibashi T: Staining ability and biocompatibility of brilliant blue G: preclinical study of brilliant blue G as an adjunct for capsular staining. Arch Ophthalmol 124(4), 514-519, 2006.

2. Enaida H, Hisatomi T, Goto Y, Hata Y, Ueno A, Miura M, Kubota T, Ishibashi T: Preclinical investigation of internal limiting membrane staining and peeling using intravitreal brilliant blue G. Retina 26(6), 623-630, 2006.

3. Enaida H, Hisatomi T, Hata Y, Ueno A, Goto Y, Yamada T, Kubota T, Ishibashi T: Brilliant blue G selectively stains the internal limiting membrane/brilliant blue G-assisted membrane peeling. Retina 26(6), 631-636, 2006.

4. Ueno A, Hisatomi T, Enaida H, Kagimoto T, Mochizuki Y, Goto Y, Kubota T, Hata Y, Ishibashi T: Biocompatibility of brilliant blue G in a rat model of subretinal injection. Retina 27(4), 499-504, 2007.

48. P2X7 受容体遮断薬 Brilliant Blue G による

網膜神経細胞保護効果の検討

納富昭司、久富智朗、武田篤信、池田康博、江内田寛、石橋達朗

(九州大)

研究要旨 目的・対象:近年、白内障手術・硝子体手術の手術アジュバントとして使用頻度の増えつつある Brilliant Blue G (BBG) は P2X7 受容体の選択的阻害剤として知られている。今回、我々は BBG の P2X7 受容体阻害効果と網膜細胞保護効果について検討した。網膜初代細胞培養および硝子体内投与により P2X7 受容体アゴニストは網膜細胞死を評価し、さらに飢餓培養条件下における BBG の神経保護効果について検討した結果、P2X7 受容体アゴニストは vitro、vivo で細胞死を誘導し、P2X7 受容体アンタゴニストである BBG は網膜神経細胞死を抑制した。P2X7 受容体は網膜細胞死に関与し、P2X7 受容体阻害剤である BBG は神経保護効果を持つことが示された。網膜疾患において神経保護を目的とした BBG の応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、白内障手術・硝子体手術の手術アジュバントとして使用頻度の増えつつある Brilliant Blue G (BBG) は P2X7 受容体の選択的阻害剤として知られている。P2X7 受容体は、細胞外に存在する ATP をリガンドとして機能するイオンチャンネル型受容体である P2X 受容体のサブタイプの一つである。細胞外 ATP は神経疾患などで増加し、P2X7 受容体を介し細胞死に関与することが報告されている。今回、我々は BBG の P2X7 受容体阻害効果と網膜細胞保護効果について検討した。

B. 研究方法

細胞外 ATP の細胞毒性を検討するために、C57BL/6 マウスを用いて網膜初代培養細胞系を作成し、ATP 及び P2X7 受容体のより特異的

なアゴニストである 2' - and 3' -O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) を投与し、細胞生存率を評価した。また BBG 同時投与による抑制効果について検討した。さらに飢餓培養条件下における BBG の神経保護効果について検討した。Vivo においても ATP および BzATP の硝子体投与を行い、網膜細胞のアポトーシスを TUNEL 法にて検討した。同様に BBG 同時投与による抑制効果について検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験において、動物組織を採取する場合には、文部科学省・動物実験指針にしたがい、可能な限り麻酔下で行い実験動物に苦痛を与えないように配慮した。さらに、研究に使用した動物を処分する際は、必ず安楽死させるよう十分に配慮した。