

図4 1型CNVが別部位に共存するRAP stage IIIの症例
 ドルーゼン様PEDのある眼底に少量の網膜出血を生じている。FAではPEDの過蛍光がみられ、IAではPEDの上方にRAP病巣、下方に1型新生血管の過蛍光(plaque)がみられた。OCTではPEDの中央に瘤状サインを示すRAP病巣がみられ、1型CNVの反射もみられた。この例でも著しいCMEがみられた。

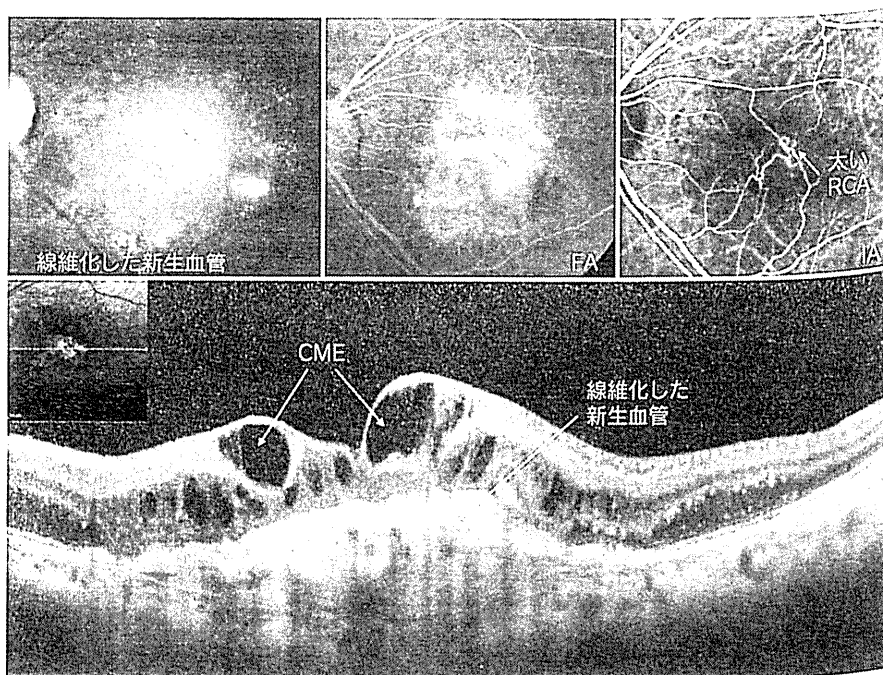


図5 RAP stage IVの進行例
 黄斑部に線維化した新生血管がみられ、IAでは新生血管内に太い網脈絡膜血管吻合(RCA)がみられる。強いCMEが持続している。

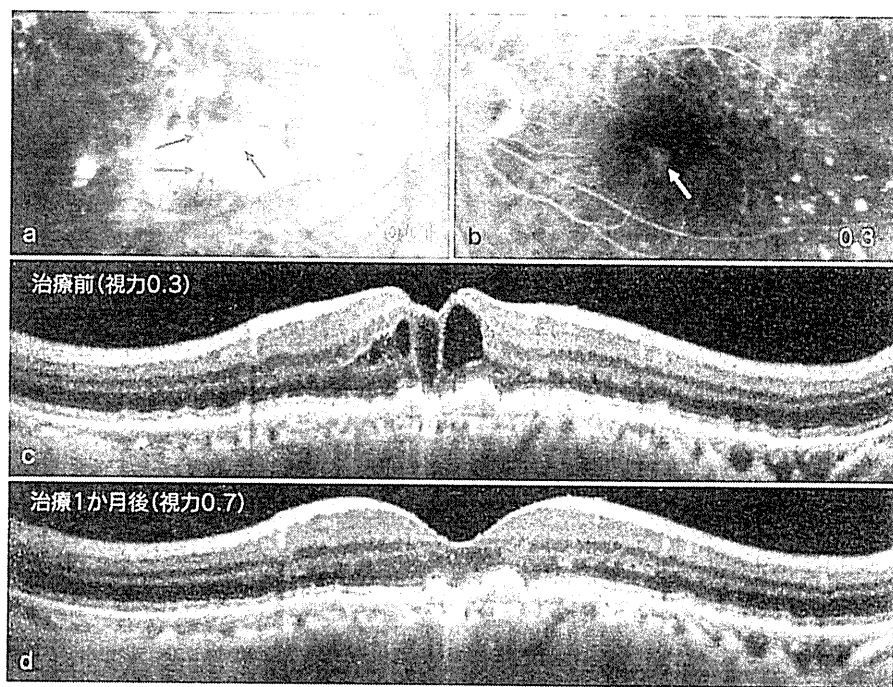


図6 RAP stage I 再発例に対するラニズマブ硝子体内注射の効果
 a : 右眼は古い RAP stage IV で強い線維性瘢痕の中に RCA (青矢印) がみられた (視力 0.01)。
 b : 左眼は RAP stage I ですがすでに 1 年間で 10 回ラニズマブ硝子体内注射を受けており、FA の白矢印部に RAP 病巣を認めた。再発の為、視力は 0.7 から 0.3 に低下していた。
 c : CME が再発した状態でラニズマブ硝子体内注射を行った。
 d : 治療後速やかに反応し、CME が消失、視力が回復した。RAP での視力維持には、このように多数回の注射を要する。

RAP の治療は急速に進化しているが、まだ EBM が確立された治療法はない

RAP の新生血管は、炎症のもととなる軟性ドルーゼンが多くみられる眼に発生し、新生血管の活動性が高く、増大速度が非常に速いという特徴を持つ。これは新生血管が網膜血流に養われ、進行すると網膜、脈絡膜の両者から血流を受けるためでもある。RAP の治療法として、単独療法として現在までレーザー光凝固、栄養血管切断術、新生血管摘出術、光線力学的療法 (PDT)、抗 VEGF 薬、併用療法としては PDT+ステロイド、PDT+抗 VEGF 薬、PDT+ステロイド+抗 VEGF 薬などさまざまな治療法が試みられてきた。ただ、RAP 自体の症例数が少ないだけに RAP 治療の大

規模スタディはなく、現状では EBM (evidence-based medicine) によって証明された有効性の高い治療法は証明されていない。また、stage 別の治療指針も確立されていない。しかし、抗 VEGF 薬が出現してから、RAP の視力予後は明らかに改善されてきているようである。

有効性が低かった過去の治療

レーザー光凝固は RAP の早期症例、特に stage I には有効であるとの報告があったが、実際には stage I で発見される症例は非常に稀であり、それ以降の病期の症例にレーザー光凝固を行っても新生血管が急速に増大し、結果的に大きい線維性瘢痕となる頻度が高く、ほとんどの症例で無効であった。栄養血管切断術は、硝子体手術で RAP

に流入する網膜血管を切断する方法として一時脚光を浴びたが、一時的には滲出の改善が得られても、切断した血管の再疎通と新生血管の再発が高率にみられることが報告され、治療として行われなくなった。

PDT 単独療法は 2004 年頃から報告が出始め、視力維持率は 30~60% とさまざまであったが、やはり新生血管はいったん閉塞しても早期に再灌流が起こって再発するため、長期の視力維持率は低かった。PDT による新生血管の閉塞率について、Boscia ら⁶⁾は 14% という数字を挙げているが、これは非常に低い閉塞率である。筆者らの経験でも、RAP に対する PDT 単独療法の 12 か月の視力改善率は 15% 程度、視力維持率は 55% 程度と決してよい成績とはいえなかった。また、PDT 単独療法では色素上皮裂孔、出血などの合併症の頻度が高いという報告が多かった。

ステロイド + PDT 併用療法の効果は

上述のように、RAP に対しては単独療法では十分な治療効果が得られないことが判明したため、トリアムシノロンアセトニド (triamcinolone acetonide : TA) の硝子体内あるいはテノン嚢下注射と PDT の併用療法が多く試みられた。欧米では TA 硝子体内注射 (intravitreal triamcinolone acetonide : IVTA)、わが国ではテノン嚢下投与 (sub-Tenon injection of triamcinolone acetonide : STTA) を好んで用いる傾向があった。結果的にこの併用療法は PDT 単独療法と比べて視力維持率が高く (70~80%)、合併症が少なく、また治療回数も減少可能であるとの報告が多くなされた。

Rouvas ら⁷⁾は RAP 眼に対してラニビズマブ硝子体内注射 (intravitreal ranibizumab : IVR)、IVR + PDT、IVTA + PDT の前向き比較試験 (6 か月) を行い、IVTA + PDT が視力維持率、網膜厚の減少率が最も高く、また薬剤注入回数も最少であったという結果を報告している。また、2010 年、Gupta ら⁸⁾は過去の文献の review から、レーザー光凝固、PDT、抗 VEGF 薬、抗 VEGF 薬 + PDT、IVTA +

PDT の比較を行い、6 か月までは IVTA + PDT の効果が最良であったが、その後、ステロイドの副作用としての白内障の発生によって視力低下が起こったと述べている。このように、なぜか欧米では IVTA + PDT の良好な成績が報告されている。

抗 VEGF 薬出現以後はどう変わったか

■抗 VEGF 薬単独療法

RAP は主として網膜内に発生する新生血管を基盤としているため、硝子体内に投与した抗 VEGF 薬が通常の CNV よりもダイレクトに作用するとの考えから、近年は抗 VEGF 薬の単独療法を推奨する報告が多く現れている。抗 VEGF 薬としてはベバシズマブ、ペガブタニブ、ラニビズマブの 3 種の報告があるが、最近では IVR を用いた報告が多い。これらの報告では視力維持率は 80~90% と比較的高い。

IVR 単独療法では、2007 年の Lai らの報告⁹⁾をはじめとして 6 編以上の報告が出ているが、いずれも単独療法で平均視力の改善と網膜厚の減少が得られたとの報告である。これらの報告では、視力改善率は 30~80% と幅が広く、視力を維持するためにはかなりの多数回投与が必要であるという結果が出ている。実際、treat and extend の投与方法を用いて RAP 11 眼の 3 年経過を追った Engelbert らの報告¹⁰⁾では、IVR の回数は 1 年目 7 回、2 年目 6 回、3 年目 7 回と非常に多くの投与を要している。つまり、RAP に対する抗 VEGF 薬単独療法は、視力の改善・維持は良好であるが、長期間の視力維持には多数回の投与が必要であるという結果であった。実際、筆者らも RAP の早期例 (Stage I の視力良好例) には IVR 単独療法を行っているが、治療反応は非常に迅速で、非常に短期間のうちに網膜浮腫、視力ともに改善をみることが多い (図 6)。治療に対する医師の考え方にもよると思われるが、このような多数回投与を厭わず、また許される状況では非常によい治療法であるといえる。

しかし、その反面、効率性には欠け、患者・医

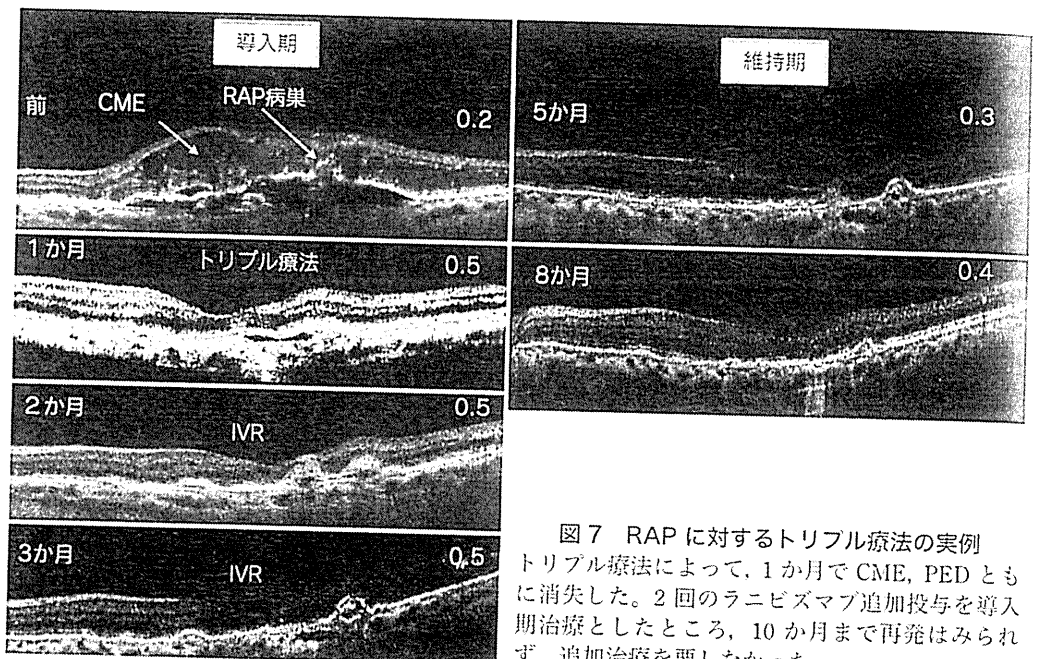


図7 RAPに対するトリプル療法の実例
トリプル療法によって、1か月でCME、PEDともに消失した。2回のランビズマブ追加投与を導入期治療としたところ、10か月まで再発はみられず、追加治療を要しなかった。

師ともに再発への心理的負担、そして経済的な問題が大きいことが難点と思われる。なお、抗VEGF薬単独療法の合併症として、RAP病巣の急速な収縮による色素上皮裂孔が5%未満に発症すると報告されている。

■抗VEGF薬+PDT併用療法

RAPに対して、抗VEGF薬（ベバシズマブまたはランビズマブ）とPDTの併用療法が多く報告され始めている。この併用療法の意義は、なるべく少ない治療回数で視力の改善を得、効率的に長期間良好な視力を維持しようとするものである。

Saitoら¹¹⁾はIVB+PDT併用療法の報告を行い、11眼の6か月の視力改善率54.5%、視力維持率100%という結果を報告し、その続編で25眼においてIVTA+PDTとIVB(intravitreal bevacizumab)+PDTの12か月の治療成績の比較を報告¹²⁾している。そして治療後視力はIVB+PDTのほうが良好で、平均治療回数もIVB+PDTのほうが1.6回で少なかったと述べている。また、Violaらは同じIVB+PDTを用いた21眼の9か月の成績において、視力改善19%、維持71%という結果を報告¹³⁾

している。さらにLeeら¹⁴⁾はIVR+IA-guided PDTを用いた10眼、12か月の報告で、平均視力の改善は3.86 lineであり、併用療法1回で56%において病状安定が得られたとしている。なお、併用療法の実施に当たっては、抗VEGF薬投与とPDTの時間的間隔が問題になるが、わが国では最近ではPDT1週間前よりもPDT2~3日前の抗VEGF薬前投与が多く用いられているようである。

■筆者らの考え方

筆者ら¹⁵⁾はRAP眼には多数の軟性ドレーゼンが存在するため、理論的に炎症の関与も大きいと考えていることから、視力が0.5以下に低下したRAP症例には、IVR+STTA+PDTのトリプル療法の方針で治療を行い、長期成績を検討中である。これは初回治療として同日内にPDT→IVR(無灯顕微鏡下)→STTA(同)の順に治療を行い、その後1か月ごとにIVRを2回追加する治療を導入期としている。その結果、初回治療ののち速やかな病状の改善がみられ、6か月までは再発がみられなかった例を複数例経験している(図7)。

以上述べたように、RAPの診断と治療について

は常識がめまぐるしく変化している。病態解明とともに、RAP が真に克服できる日が来ることを期待したい。

文献

- 1) 高橋寛二：網膜血管腫状増殖の概念と治療. 臨眼 52 (増刊号) : 250-261, 2008
- 2) Yannuzzi LA, Negrao S, Iida T et al : Retinal angiomatic proliferation in age-related macular degeneration. *Retina* 21 : 416-434, 2001
- 3) Yannuzzi LA, Freund KB, Takahashi BS et al : Review of retinal angiomatic proliferation or type 3 neovascularization. *Retina* 28 : 375-384, 2008
- 4) Yannuzzi LA : Retinal angiomatic proliferation, type 3 neovascularization. *The Retinal Atlas*. pp592-602, Elsevier, Philadelphia, 2010
- 5) Freund KB, Zweifel SA, Engelbert M : Do we need a new classification for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Retina* 30 : 1333-1349, 2010
- 6) Boscia F, Furio C, Sborgia L et al : Photodynamic therapy for retinal angiomatic proliferation and pigment epithelium detachment. *Am J Ophthalmol* 138 : 1077-1079, 2004
- 7) Rouvas AA, Papakostas TD, Vavvas D et al : Intravitreal ranibizumab, intravitreal ranibizumab with PDT, and intravitreal triamcinolone with PDT for the treatment of retinal angiomatic proliferation ; a prospective study. *Retina* 29 : 536-544, 2009
- 8) Gupta B, Jyothi S, Sivaprasad S : Current treatment options for retinal angiomatic proliferation (RAP). *Br J Ophthalmol* 94 : 672-677, 2010
- 9) Lai TYY, Chan W-M, Liu DT et al : Ranibizumab for retinal angiomatic proliferation on neovascular age-related macular degeneration. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 245 : 1877-1880, 2007
- 10) Engelbert M, Zweifel SA, Freund KB : "Treat and extend" dosing of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy for type 3 neovascularization/retinal angiomatic proliferation. *Retina* 29 : 1424-1431, 2009
- 11) Saito M, Shiragami C, Shiraga F et al : Combined intravitreal bevacizumab and photodynamic therapy for retinal angiomatic proliferation. *Am J Ophthalmol* 146 : 935-941, 2008
- 12) Saito M, Shiragami C, Shiraga F et al : Comparison of intravitreal triamcinolone acetate with photodynamic therapy and intravitreal bevacizumab with photodynamic therapy for retinal angiomatic proliferation. *Am J Ophthalmol* 149 : 472-481, 2010
- 13) Viola F, Mapelli C, Villani E et al : Sequential combined treatment with intravitreal bevacizumab and photodynamic therapy for retinal angiomatic proliferation. *Eye* 24 : 1344-1351, 2010
- 14) Lee MY, Lee WK : Combination therapy of ranibizumab and photodynamic therapy for retinal angiomatic proliferation with serous pigment epithelial detachment in Korean patients ; twelve-month results. *Retina* 31 : 65-73, 2011
- 15) 高橋寛二：加齢黄斑変性の治療戦略. *日本の眼科* 81 : 608-613, 2010

III. 臨床応用の進歩

眼科角膜領域再生医療

辻川 元一 西田 幸二

Regenerative medicine in cornea

Motokazu Tsujikawa, Kohji Nishida

Department of Ophthalmology, Osaka University Graduate School of Medicine

Abstract

Cornea is unique organ in its transparency. It consists of three different layers epithelium, stroma, and endothelium. Defect of each layers decrease the transparency resulting in blindness. Corneal transplant from donors is performed for these conditions. However it sometimes does not work because of immuno-rejection and shortage of donors is still problem. Regenerative medicine resolves these problems. According to epithelium, we had succeeded in making epithelial sheet from oral mucosa epithelium. The sheet is clear and very resembles normal corneal epithelium in histology. We have auto transplantation of this epithelial sheet to severe corneal deficiency patients and obtained good clinical results. According to endothelium, we are trying to make the sheet from various stem cells including iPS cells.

Key words: regenerative medicine, cornea, epithelium, endothelium

はじめに

角膜は光感覚器受容体である眼の光学的特性を担うため、透明で強固なドーム上の組織である。角膜上皮、角膜実質、角膜内皮の3層からなり、その機能上血管をもたない無血管組織である。疾患、外傷などでその透明性が損なわれた場合、ドナー角膜を用いた角膜移植法が実施されている。現在の角膜移植は献眼に依存しているが、我が国における提供数は絶対的に少なく、多くの患者が移植を待っている状態である。更に、後述するように Stevens-Johnson 症候群などの重篤な角結膜疾患では、拒絶反応などのため他家移植の術後成績は良好ではない。これ

らのドナー不足および拒絶反応の問題を解決する手段として、患者自身の幹細胞・前駆細胞を用いた再生治療法の開発が進められている。

本稿では、著者らが開発し、既に臨床応用されている自家細胞による角膜上皮再生治療法と、現在、研究開発中である角膜内皮再生医療について述べる。

1. 角膜上皮の再生医療

角膜上皮は角膜の最表層に存在する厚さ約 50 μm の非角化重層扁平上皮である (図 1-a)。角膜上皮は、表層細胞のタイトジャンクション形成やムチン産生により外界とのバリア機能を担っている。他の重層扁平上皮と同様、ターンオ

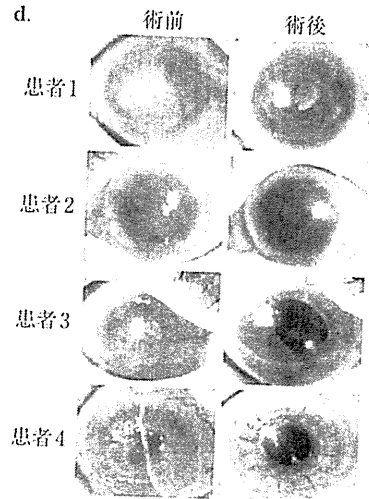
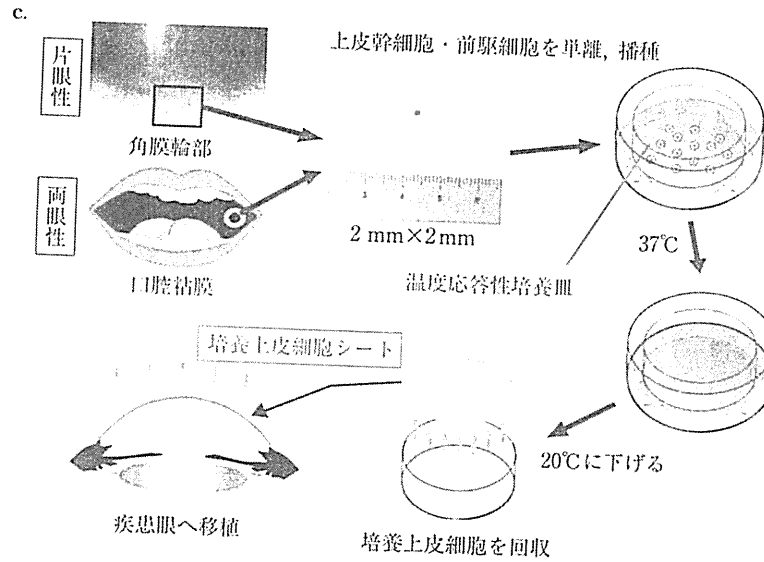
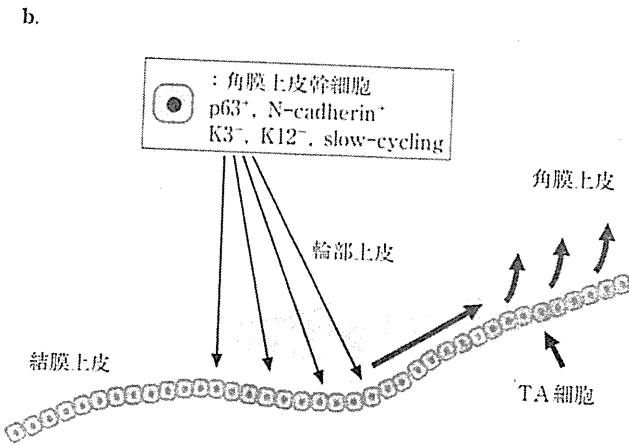
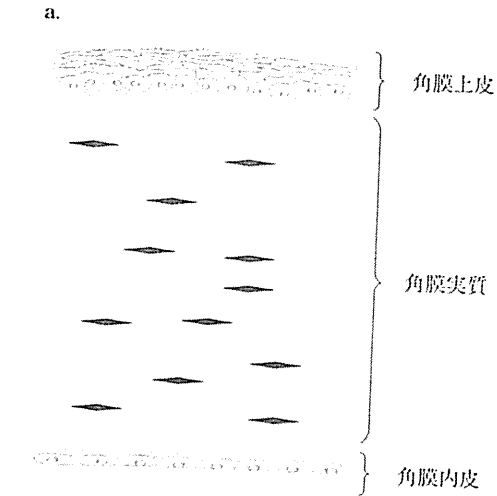


図1 角膜上皮幹細胞と角膜上皮幹細胞疲弊症 (文献^{*)}より引用)

- a. 角膜は上皮, 実質, 内皮の3層からなる。
- b. 角膜上皮幹細胞は輪部組織の上皮基底部に局在している。
- c. 自家培養上皮細胞シートによる角膜上皮再生治療の概要. 2×2mmの輪部組織(片眼性)あるいは口腔粘膜組織(両眼性)を患者自身から採取→酵素処理で幹細胞・前駆細胞を含む上皮細胞を単離→上皮細胞を温度応答性培養皿上で培養(37°C)→温度を下げて(20°C)培養上皮細胞シートを剥離→疾患眼へ移植。
- d. 自家培養上皮細胞シート移植による臨床成績. 培養上皮細胞シート移植術前後の眼表面像(左:術前, 右:術後)。

ーバーが激しく、1週間ほどで入れ替わるといわれている。この角膜上皮細胞を供給する角膜上皮幹細胞は、角膜と結膜の境界に位置する輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在すると考えられている(図1-b)。角膜上皮幹細胞は、角膜上皮型分化マーカー(ケラチン3, 12)を発現せず、p63やN-cadherinなどの幹細胞・前駆細胞マーカーを発現し、また細胞分裂が緩やかであるなどの特性を有している¹⁻³⁾。この上皮幹細胞が外傷や疾患によって機能不全となり喪失すると(角膜上皮幹細胞疲弊症)幹細胞からの角膜上皮細胞の供給ができなくなり、角膜混濁などの重篤な視力障害が起きる。これに対して、角膜上皮前駆細胞を含むとされる角膜輪部を用いた他家角膜移植が実施されてきたが、拒絶反応などのため、術後成績は良好でなかった。

この問題に対処するため、まず、片眼性の疾患に対して、健常な角膜輪部(上皮幹細胞を含むと考えられる)をソースとして培養角膜上皮細胞シートを作製し、疾患眼へ移植する方法が開発された⁴⁻⁷⁾。この方法では上皮細胞シート移植により完成された組織だけでなく、上皮幹細胞も移植されることにより、角膜上皮の恒常性が保たれる。これにより角膜上皮疾患に対して再生医療的アプローチによる治療の道が開かれた。しかしながら、臨床的には角膜上皮幹細胞疲弊症は両眼性のものが多く、また、両眼性の方が患者QOLの低下は当然著しい。この場合は、健常な角膜輪部をソースとして使用できないため、新たな幹細胞供給源が必要であった。

著者らはこの問題を解決すべく幹細胞供給源として、口腔粘膜細胞を使用し細胞シートを作製した。このシートは*in vivo*角膜と同様に重層化しており、基底には上皮幹細胞・前駆細胞が保持されている。更に著者らはこれに、温度応答性培養皿の技術を組み合わせ、移植に使用でき、基質や酵素処理を必要としない独自の自家培養上皮細胞シート移植法を世界に先駆けて開発した⁸⁾(図1-c)。片眼性疾患の場合には、健常眼の輪部上皮、両眼性疾患の場合では口腔粘膜上皮より上皮幹細胞・前駆細胞を単離し、温度応答性培養皿上で培養する。この温度応答

性培養皿は、37℃では培養皿表面が疎水性となるため細胞が接着するが、32℃以下では、相転移により表面が親水性となり細胞が接着できない。このため、この培養皿上で培養した細胞は酵素処理を必要とせず、温度を下げるという極めて非侵襲的な方法により、細胞接着装置を保持したまま培養上皮細胞シートを回収することが可能である。これにより、基底面の細胞接着分子が保持されているため、移植後に短時間で無縫合でも眼表面に接着することが可能となり、羊膜やフィブリンゲルなどの基質を必要としない。著者らは世界に先駆けてStevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡、化学腐食などの角膜上皮幹細胞疲弊症患者に対して、この自家口腔粘膜培養上皮細胞シート移植を行い、良好な成績を得ることに成功している⁹⁾(図1-d)。現在は、この治療を本疾患の標準治療とすべく、多施設臨床試験を計画している。

2. 角膜内皮の再生

角膜内皮は角膜の最内層に存在する単層の組織であり、実質側から前房内に水を能動輸送する機能(ポンプ機能)およびバリア機能により、実質内の含水率を一定に維持し、角膜の透明性を維持している(図1-a)。この機能が低下した場合、角膜実質および上皮の含水率が上昇し、透明性が維持されず、角膜が混濁し視力は大きく低下する水疱性角膜症と呼ばれる病態となる。また、ヒト角膜内皮細胞は一度障害を受けると、基本的に再生せず、不可逆的に角膜内皮細胞数が減少してしまう。このような状態は、先天性、加齢、手術による影響などで比較的容易に起こり、この減少が大きい場合水疱性角膜症となる。この状態に対して、以前はドナーの角膜全層を移植することが行われていたが、近年、ドナー角膜の内層(実質の一部と内皮)を移植するパーツ移植が行われるようになり、視力予後の改善に貢献している。しかしながら、ドナー角膜が必要であることには変わりがなく、むしろ、術式改良に伴う適応の拡大により、よりドナー角膜の不足は深刻になっているといえる。

この問題に対処するため、著者らは培養細胞

シート移植技術を用いた角膜内皮再生治療法の開発を行っている(図2-a)。ヒト角膜内皮細胞は *in vivo* では増殖しないが、*in vitro* ではある程度、増殖することが知られている。著者らはこれまでに、研究用輸入アイバンク角膜より採取したヒト角膜内皮を温度応答性培養皿上で培養することで、ヒト培養角膜内皮細胞シートを作製、回収することに成功している(図2-b)。回収した培養角膜内皮細胞シートは、*in vivo* 角膜内皮同様の機能を有しており、更に家兎水疱性角膜症モデルへの移植により、角膜厚および角膜透明性の有意な改善を認めている¹⁰⁾(図2-c)。この方法を用いて角膜内皮細胞をある程度増幅することは可能であるが、1つのドナー角膜から多数の培養角膜内皮細胞シートを作製することは現時点では困難である。つまり、現在の技術では1つの献眼から多数の移植シートは作れず、ドナー不足の解決にはつながらない。

一方で、拒絶反応の問題を完全に克服するために、自家細胞源を用いた角膜内皮再生治療法の開発が必要である。そのためには、自家細胞源として角膜内皮疾患の患者自身の角膜内皮細胞を採取することは不可能であるため、角膜内皮以外の(幹)細胞源を探索することが急務である。これまでに著者らは、成体の虹彩実質中に角膜内皮と同様に神経堤より由来し、多分化能を有する細胞が存在することを見いだしている¹¹⁾。この虹彩実質中に存在する多能性の組織幹細胞を用いて、角膜内皮細胞へ分化誘導あるいは再プログラムすることが可能であれば、自家移植も可能になると考えられ、現在更に詳細な解析を行っている。

3. 角膜再生医療の今後

著者らは再生医学に基づいた角膜再生治療法の開発に取り組んできた。角膜上皮再生医療については、世界に先駆けて温度応答性培養皿を用いた自家の培養上皮細胞シート移植法の臨床応用に成功し、拒絶反応とドナー不足という2つの問題を同時にクリアすることが可能となり、

今後は標準医療として確立していくことが重要となっている。しかしながら、解明すべき課題はまだある。角膜上皮再生医療においては完成された角膜上皮組織を移植するだけでは不十分で、角膜上皮幹細胞を同時に移植し、維持しなくてはならない。現在、実験レベルでは幹細胞が長期に移植角膜に認められること、臨床的にも長期成績が良好なことより、幹細胞が維持されているのはほぼ確実であるが、その詳細な機構については現在も不明のままである。著者らは移植された上皮細胞シートが均一に幹細胞を含んでいるのではなく、部位によって含まれる幹細胞やその増殖能に差があることを突き止めている。今後は、その詳細な機構メカニズムを解明し、より長期に安定で良好な幹細胞の維持を目指すべきである。

内皮細胞は完成された組織を移植することができれば、幹細胞を移植、維持しなくても病態を改善することができる分、ハードルは低く思われるが、現実には上皮に比べ、再生医療の応用は遅れているといえる。その原因の一つとして、角膜上皮の場合とは異なり、ヒト角膜内皮細胞、内皮幹細胞・前駆細胞の特性、あるいは、幹細胞・前駆細胞についてはその存在自体ですら不明であることが挙げられる。例えば、信頼性の高い内皮細胞マーカーもない状態である。そのため、現在、角膜内皮細胞・幹細胞・前駆細胞の存在を検証し、それらを増幅・分化させるための様々なアプローチを試みているのが現状である。

また、日本が誇るべき再生医療の技術はいうまでもなく iPS 細胞である。著者らもまた、iPS 細胞から角膜上皮、内皮への分化誘導法の開発、また、それを用いた移植用の細胞シートの開発を鋭意行っている。この技術が完成すれば、ドナー不足と拒絶反応の問題を一気に解決することができる。この iPS 細胞を利用した再生医療を我が国発の世界標準治療として確立し、一人でも多くの患者に光を届けることが我々の使命と考えている。

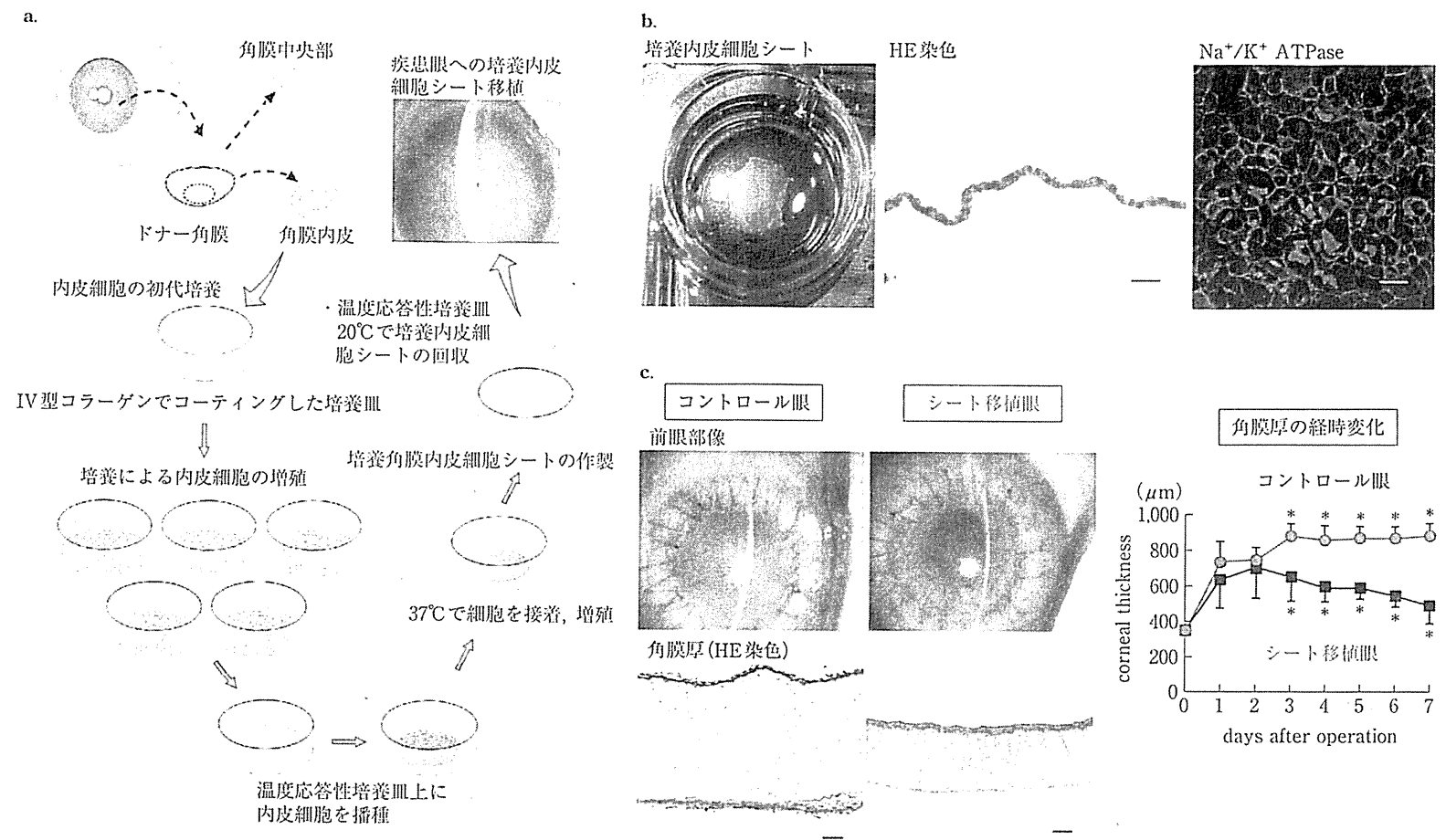


図2 培養角膜内皮細胞シート移植法の概要(文献¹⁰⁾より引用)

a. 輸入アイバンク角膜の周辺部より角膜内皮を採取→IV型コラーゲンコーティング培養皿上で初代培養→細胞継代により細胞数を増幅→生体と同密度で温度応答性培養皿に播種、37°Cで培養→20°Cに温度を下げて培養角膜内皮細胞シートを回収→疾患眼へ移植。

b. 温度応答性培養皿より回収した培養角膜内皮細胞シートのHE染色像およびNa⁺/K⁺ ATPaseの免疫染色。回収した培養角膜内皮細胞シートは *in vivo* 角膜内皮組織同様に単層構造を呈し、ポンプ機能を担うNa⁺/K⁺ ATPaseの発現も認められた(Bar: 20 μm)。

c. 家兎水拖性角膜症モデルへの培養角膜内皮細胞シート移植後の眼表面観察像およびHE染色像。非移植眼に比較して移植眼では角膜透明性と角膜厚の改善が認められた。また経時的な角膜厚測定の結果、移植後3日以降で統計学的に有意な角膜厚の改善が認められた(グラフ)。

■ 文 献

- 1) Schermer A, et al: Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103: 49-62, 1986.
- 2) Cotsarelis G, et al: Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57: 201-209, 1989.
- 3) Hayashi R, et al: N-Cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 25(2): 289-296, 2007.
- 4) Pellegrini G, et al: Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349: 990-993, 1997.
- 5) Tsai RJ, et al: Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal cells. *N Engl J Med* 343: 86-93, 2000.
- 6) Koizumi N, et al: Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108: 1569-1574, 2001.
- 7) Rama P, et al: Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 72: 1478-1485, 2001.
- 8) Nishida K, et al: Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77: 379-385, 2004.
- 9) Nishida K, et al: Corneal reconstruction using tissue-engineered cell sheets comprising autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351: 1187-1196, 2004.
- 10) Sumidé T, et al: Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J* 20(2): 392-394, 2006.
- 11) Kikuchi M, et al: Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes Cells* 16(3): 273-281, 2011.

1 **Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for**
2 **age-related macular degeneration**

3

4 Mihoko Suzuki¹, Motokazu Tsujikawa¹, Hiroyuki Itabe², Zhao-Jiang Du¹, Ping Xie¹, Nagakazu
5 Matsumura¹, Xiaoming Fu³, Renliang Zhang³, Koh-hei Sonoda⁴, Kensuke Egashira⁵, Stanley L.
6 Hazen³, Motohiro Kamei¹

7

8 1. Department of Ophthalmology, Osaka University Graduate School of Medicine,
9 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871 JAPAN

10

11 2. Department of Biological Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University,
12 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, JAPAN

13

14 3. The Center for Cardiovascular Diagnostics and Prevention, Cleveland Clinic, Cleveland Ohio
15 USA. NE10 9500 Euclid Avenue NE10, Cleveland, Ohio, USA 44195

16

17 4. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1
18 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, JAPAN

19

20 5. Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu
21 University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-Ku, Fukuoka 812-8582, JAPAN

22

23

24 Corresponding author

25 Motohiro Kamei, MD, PhD

26 Department of Ophthalmology

27 Osaka University Graduate School of Medicine

28 2-2 Yamadaoka, #E7, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

29 Tel: +81-6-6879-3456

30 Fax: +81-6-6879-3458

31 e-mail:mkamei@ophthal.med.osaka-u.ac.jp

1

1 Abbreviations: AMD, age-related macular degeneration; CNV, choroidal neovascularization;
2 MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; RPE, retinal pigment epithelium; ON-PC (oxidized
3 phospholipids), 9-oxononanoic acid esters of 2-lyso-phosphatidylcholine; PL-PC (non-oxidized
4 phospholipids), 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine; Ccr2, C-C chemokine
5 receptor2; PBN, α -phenyl-N-tert-butylnitron; VEGF, vascular endothelial growth factor; PEDF,
6 pigment epithelium-derived factor; Cx3cr1, C-X3-C chemokine receptor 1

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

1 Summary

2 Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of blindness among the elderly in
3 developed countries. Although pathogenic factors, such as oxidative stress, inflammation, and
4 genetics are thought to contribute to the development of AMD, little is known about the
5 relationships and priorities between these factors. Here, we show that chronic photo-oxidative
6 stress is an environmental factor involved in AMD pathogenesis. We first demonstrated that light
7 exposure induced phospholipid oxidation in the mouse retina, which was more prominent in aged
8 animals. The induced oxidized phospholipids led to an increase in the expression of monocyte
9 chemoattractant protein-1, which then resulted in macrophage accumulation, an inflammatory
10 process. Antioxidant treatment prevented light-induced phospholipid oxidation and the
11 subsequent increase of monocyte chemoattractant protein-1, which are the beginnings of the
12 light-induced changes. Subretinal application of oxidized phospholipids induced choroidal
13 neovascularization, a characteristic feature of wet-type AMD, which was inhibited by blocking
14 monocyte chemoattractant protein-1. These findings strongly suggest that a sequential cascade
15 from photic stress to inflammatory processes via phospholipid oxidation has an important role in
16 AMD pathogenesis. Finally, we succeeded in mimicking human AMD in mice with low level,
17 long-term photic stress, in which characteristic pathological changes, including choroidal
18 neovascularization formation, were observed. Therefore, we propose a consecutive pathogenic
19 pathway involving photic stress, oxidation of phospholipids, and chronic inflammation, leading
20 to angiogenesis. These findings add to the current understanding of AMD pathology and suggest
21 protection from oxidative stress or suppression of the subsequent inflammation as new potential
22 therapeutic targets for AMD.

23
24
25
26
27
28
29
30
31

1 Introduction

2 Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of blindness among the elderly in
3 developed countries (Beatty et al., 2000). AMD is a progressive, polygenic, and multifactorial
4 disease with a poorly understood etiology, although numerous studies have suggested the
5 involvement of factors such as oxidative stress, inflammation, immune response, and genetics in
6 the onset of AMD (Baba et al., 2010; Edwards et al., 2005; Grossniklaus et al., 2002; Haines et
7 al., 2005; Klein et al., 2005; Yates et al., 2007).

8 Some age-related diseases may have pathologically common molecular mechanisms, and we
9 focused on the histopathologic similarities between AMD and atherosclerosis. We previously
10 demonstrated that photoreceptor phospholipids in the macula are more oxidized in eyes with
11 AMD than in age-matched normal eyes (Suzuki et al., 2007) and that accumulated macrophages
12 in AMD lesions express scavenger receptors for oxidized phospholipids (Kamei et al., 2007).
13 Other studies analyzing human eyes with AMD also suggest the involvement of lipid uptake
14 (Malek et al., 2003) and an immune response to oxidized lipids produced by oxidative stress
15 (Hollyfield et al., 2008). Oxidized phospholipids stimulate the expression of vascular endothelial
16 growth factor(VEGF) (Bochkov et al., 2006), which induces inflammatory gene expression
17 (Furnkranz et al., 2005) as well as neovascularization. The detailed mechanisms underlying the
18 involvement of oxidized phospholipids in AMD, however, remain unknown. Therefore, in the
19 present study, we examined the molecular mechanisms underlying the involvement of oxidized
20 phospholipids in AMD pathogenesis and compared them with the pathogenic mechanisms of
21 atherosclerosis.

22 AMD affects the macula, the center area of the retina, where light is focused throughout life. We
23 hypothesized that light causes oxidative stress to the macula. Although there are numerous
24 reports that intensive light irradiation causes retinal damage, known as phototoxicity, we
25 evaluated low-intensity, long-term, light exposure as an enhanced model of the effects of light in
26 daily life.

27 In this paper, we propose a pathogenic pathway from light exposure to choroidal
28 neovascularization (CNV) formation, a characteristic feature of AMD, involving oxidative stress
29 and chronic inflammation.

30

31

1 Results

2 Light induces phospholipid oxidation in the retina.

3 We first investigated whether subacute mid-level light exposure (1000 lux for 1 week, Fig. 1A)
4 induces lipid oxidation in the retina. After light exposure in the mouse retina, mass spectrometry
5 analyses revealed a significant increase in 9-oxononanoic acid esters of 2-lyso-
6 phosphatidylcholine (ON-PC; $p < 0.001$), 4,7-dioxohept-6-enoic acid esters of 2-lyso-
7 phosphatidylcholine (KOHA-PC; $p = 0.037$), and succinic acid esters of 2-lyso-
8 phosphatidylcholine (S-PC; $p = 0.006$), and no changes in azeleic acid esters of 2-lyso-
9 phosphatidylcholine (A-PC; $p = 0.642$), 4-hydroxy-7-oxohept-5-enoic acid esters of 2-lyso-
10 phosphatidylcholine (HOHA-PC; $p = 0.533$) and 4-oxobutyric acid esters of 2-lyso-
11 phosphatidylcholine (OB-PC; $p = 0.812$; Fig. 1B). Therefore, ON-PC was used as a representative
12 oxidized phospholipid. Oxidized phospholipids were observed in the retinas of untreated normal
13 animals (Fig. 1C,E), but seemed more prominent in aged animals (Fig. 1E), and their distribution
14 involved the entire sensory retina from the nerve fiber layer to the photoreceptor outer segments,
15 the retinal pigment epithelium (RPE), and the choroid. Light irradiation increased
16 immunostaining for oxidized phospholipids in the retinas of both 2-month-old and 12-month-old
17 mice (Fig. 1D,F). Oxidized phospholipids in the outer plexiform layer, the photoreceptor outer
18 segments, RPE, and the choroid were more prominent in the older mice (Fig. 1F) compared with
19 the younger mice (Fig. 1D). A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (competitive
20 ELISA) revealed a significant increase in oxidized phospholipids in the retinas of irradiated mice
21 compared with non-irradiated mice in both 2-month-old and 12-month-old mice ($p < 0.001$; Fig.
22 1G). Irradiated older mice had significantly more oxidized phospholipids than irradiated
23 younger mice ($p = 0.003$). Although the sleep duration of irradiated mice was not monitored
24 closely, there was no obvious interruption of normal sleep patterns because they didn't show any
25 weight loss, epilation, abnormal behavior, or early mortality compared with control mice. Thus,
26 photic stress induced phospholipid oxidation in the retina, and older animals were more
27 susceptible to photic stress than younger animals.

28

29 Oxidized phospholipids induce monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in RPE cells 30 and light irradiation elicits MCP-1 in the retina in vivo.

31 We next investigated reactions induced by phospholipid oxidation in the retina. We examined

5

1 whether oxidized phospholipids induce MCP-1 (also known as CCL2), an important chemotactic
2 factor for macrophages (Lu et al., 1998), which have a key role in human AMD (Grossniklaus et
3 al., 2002). Both oxidized phospholipids (ON-PC) and non-oxidized phospholipids (1-palmitoyl-
4 2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine [PL-PC]), increased the amount of MCP-1 protein
5 released by RPE cells in a dose-dependent manner. RPE cells released more MCP-1 following
6 treatment with oxidized phospholipids compared with non-oxidized phospholipids
7 (concentrations up to 50 μ g/ml, Fig. 2A). In the *in vivo* analysis, MCP-1 mRNA and protein
8 significantly increased after light irradiation in both 2-month-old and 12-month-old mice
9 ($p < 0.001$; Fig. 2B,C). The increase was more evident in older mice. MCP-1 immunostaining in
10 the RPE was notable in the retinas of light-irradiated 12-month-old mice, whereas there was no
11 apparent staining in non-irradiated retinas (Fig. 2D). Macrophages accumulated in the choroid of
12 the 12-month-old mice after long-term low-intensity light irradiation (500 lux for 2 months; Fig.
13 2E). These findings suggest that photo-oxidative stress induces the expression of MCP-1 via the
14 oxidation of phospholipids, which have an important role in inducing inflammation, especially in
15 older animals.

16

17 **Oxidized phospholipids induce CNV.**

18 To confirm that the cascade subsequent to photo-oxidative stress has an important role in AMD
19 development, oxidized phospholipids (ON-PC) or non-oxidized phospholipids (PL-PC) were
20 injected into the subretinal space of wild-type mice. Although CNV was not observed in the
21 control eyes injected with non-oxidized phospholipids (Fig. 3A), all eyes receiving oxidized
22 phospholipids exhibited apparent CNV formation within 4 weeks following the subretinal
23 injection (Fig. 3B).

24

25 **Oxidized phospholipids induce CNV in wild-type retinas but not in $CCR2^{-/-}$ and $MCP-1^{-/-}$ 26 mice.**

27 We then injected oxidized phospholipids into the subretinal space of two different knockout
28 (KO) mouse lines, $MCP-1^{-/-}$ and $CCR2^{-/-}$ (MCP-1 receptor KO), to examine the involvement of
29 the MCP-1 pathway in CNV formation. CNV did not develop after subretinal injections of
30 oxidized phospholipids into $MCP-1^{-/-}$ mice (Fig. 3D) or $CCR2^{-/-}$ mice (Fig. 3F), whereas CNV
31 developed in the eyes of their wild-type siblings (Fig. 3B). CNV was not observed in any eyes

6

1 injected with non-oxidized phospholipids (Fig. 3A,C,E). These results indicated that activation
2 of the MCP-1 pathway by oxidized phospholipids has a pivotal role in CNV formation *in vivo*.

3
4 **Long-term, low-intensity photo-oxidative stress induces basal laminar deposits,
5 macrophage accumulation, and CNV formation.**

6 The results of the above experiments confirmed that the cascade from photic stress to MCP-1
7 activation via phospholipid oxidation in the retina could have a pivotal role in CNV formation *in vivo*. We, therefore, attempted to mimic human AMD in mice using long-term, low-level light
8 irradiation. Basal laminar deposits, an essential histopathologic feature of AMD, were observed
9 in the eyes of animals exposed to low-level blue-light irradiation (500 lux) every 2 days for 4 to
10 6 months (Fig. 4A). Subsequently, in 4 of 8 eyes, CNV was observed by fundus examination (Fig.
11 4B). Fluorescein angiography revealed that the CNV was the occult-dominant type (Fig. 4C), the
12 major CNV type observed in human AMD, and typical histopathologic features of CNV in
13 human AMD, including a thickened and proliferated vascular lesion between the RPE and
14 Bruch's membrane (Fig. 4D). Electron microscopic and immunohistochemical examinations
15 showed that macrophages accumulated around the CNV and engulfed the photoreceptor outer
16 segments, including the oxidized phospholipids (Fig. 4E), as observed in human CNV lesions
17 (Lu et al., 1998). The lack of CNV in both MCP-1^{-/-} (n=4) and CCR2^{-/-} mice (n=6) under the
18 same irradiating conditions confirmed that the MCP-1 pathway is key in CNV development
19 induced by long-term low-intensity light irradiation (Fig. 4F).

20
21
22 **Prevention of oxidative changes and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)
23 induction by α -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN).**

24 To confirm that oxidative stress itself is the cause of light-induced changes, α -phenyl-N-tert-
25 butyl nitron (PBN), an antioxidant, was daily injected intraperitoneally to 12-month-old mice
26 during light irradiation (1000 lux for 1 week). PBN (Fig. 5C) suppressed the increased
27 immunostaining for oxidized phospholipids after light irradiation (Fig. 5A, B). The light-induced
28 increases of MCP-1 immunoreactivity (Fig. 5D, E), mRNA (Fig. 5G), and protein (Fig. 5H) were
29 significantly suppressed by the PBN treatment ($p < 0.05$; Fig. 5F,G,H).

30
31 **VEGF expression in the light-induced CNV and decrease of VEGF expression by MCP-1**

7

1 siRNA treatment in RPE cells

2 To investigate whether VEGF, a major angiogenic cytokine, and PEDF, a potent angiogenic
3 inhibitor, are involved in CNV formation by long-term, low-intensity light exposure, the
4 expression of VEGF and PEDF were examined in light-induced CNV. Strong VEGF
5 immunoreactivity was detected in light-induced CNV lesions (Fig. 6A), where strong VEGFR2
6 immunoreactivity was also detected (Fig. 6B). PEDF immunoreactivity was weak in light-
7 induced CNV lesions (Fig. 6C). Next, we examined whether or not RPE-derived MCP-1
8 mediates the expression of VEGF and PEDF. RPE cells released VEGF with both oxidized and
9 non-oxidized phospholipids in a dose-dependent manner, and more VEGF was released
10 following treatment with oxidized phospholipids than with non-oxidized phospholipids
11 (concentrations 10, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.001$) (Fig. 6D). These elevated VEGF levels were
12 significantly decreased by MCP-1 siRNA treatment ($p < 0.05$, $n = 6$; Fig. 6D). PEDF protein levels
13 did not differ significantly in RPE cells treated with either oxidized or non-oxidized
14 phospholipids (concentrations 10, 25, and 50 $\mu\text{g/ml}$). MCP-1 siRNA treatment did not affect
15 PEDF production following treatments with either oxidized or non-oxidized phospholipids (Fig.
16 6E).

18 Discussion

19 The development of an AMD animal model following long-term, low intensity light exposure in
20 the present study suggests that light exposure is an environmental factor that contributes to AMD
21 pathogenesis. Light exposure inevitably causes oxidative stress to the retina, especially in
22 modern life, as we are surrounded by artificial lights such as indoor illumination, computer
23 monitors, and television. Some epidemiological studies suggest that light exposure is linked to
24 AMD (Cruickshanks et al., 1993; Taylor et al., 1992), while others do not (Clemons et al., 2005).
25 Even the study finding no apparent link between light exposure and AMD development, however,
26 reported that low levels of dietary antioxidants, including lutein and vitamin C, are associated
27 with an increased risk for AMD, which is supported by other studies (Age-Related Eye Disease
28 Study Research Group et al., 2007; Tan et al., 2008; van Leeuwen et al., 2005).

29 The present findings demonstrated that blue light exposure induces oxidative stress and
30 chronic inflammation, which are more prominent in aged animals. These effects seem to be due
31 to light directly and not to the interruption of normal sleep patterns by continuous irradiation

1 because the mice in the experiments appeared to have normal sleep/wake patterns. In addition,
2 these changes are suppressed by an antioxidant. This suggests that AMD is more likely to
3 develop in persons who are more susceptible to oxidative stress due to decreased antioxidant
4 activity or in persons who have an exaggerated immune response to oxidized products.
5 Our results also demonstrate that elevated VEGF expression by oxidized phospholipids in RPE
6 cells is suppressed by MCP-1 siRNA. Therapeutic strategies to protect phospholipids from
7 photic stress-induced oxidation or to suppress the subsequent inflammation induced by
8 biologically active lipid peroxidation products warrant further investigation.

9 The present study suggests that photic stress induces MCP-1 via the oxidation of
10 phospholipids in the retina, which may have an important role in inducing inflammation in AMD
11 pathogenesis. The mechanism of the oxidized phospholipid-mediated inflammatory response
12 plays an important role in other age-related diseases, including atherosclerosis (Bochkov et al.,
13 2006), where MCP-1 plays a key pathogenic role. In the current study, MCP-1 or its cognate Ccr-
14 2 KO mice did not show obviously cardinal features of AMD, including drusen, which are
15 deposits of a protein/lipid complex, photoreceptor atrophy and CNV, as previously reported
16 (Ambati et al. 2003), although in both wild-type and MCP-1 or Ccr-2 KO mice, the white spots
17 increased with age at the same level. The role of MCP-1 in AMD pathogenesis is controversial;
18 some research groups reported that downregulation of MCP-1 suppressed CNV formation
19 (Yamada et al., 2007), while others showed the AMD-like phenotype in Ccl-2 (identical to MCP-
20 1) KO mice (Ambati et al., 2003). The former demonstrated that the downregulation of MCP-1
21 decreased CNV size via reduction of macrophage infiltration, while the latter showed that MCP-
22 1 deficiency caused less macrophage accumulation and allowed accumulation of C5a and IgG,
23 which induces VEGF production by RPE and provides an environment permissive for CNV.
24 Ccl-2/Cx3cr1-deficient mice with aberrant MCP-1 signaling show retinal angiomatous
25 proliferation, a type of CNV in AMD (Zhou et al., 2011). Considering these previous reports and
26 our current study together, we speculate that MCP-1 impairment can serve both pro-and anti-
27 angiogenesis roles depending on the circumstances.

28 The findings of the present study make a significant contribution to AMD research by
29 providing an animal model that mimics the human disease. Mimicking human CNV in model
30 animals has been difficult to date. Laser-induced CNV is currently the only widely used model.
31 The CNV in the laser-induced model, however, is pathologically different from human CNV