

マウス実験にて、脈絡膜新生血管発生に、ケモカイン受容体CXCR3とそのリガンドIP-10は抑制的に関与すると考えられた。一方、CCR3は促進作用があり、その拮抗剤はこれまでの抗VEGF薬とは異なる作用機序の治療薬としての可能性が示された。

6. 網膜色素変性遺伝解析

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常染色体劣性網膜色素変性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。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た。

7. 遺伝診断ネットワーク

ONJ は遺伝子検査受託、検体搬送、費用支払いに伴う手続きを代行するため、全国の患者を対象に円滑で継続可能な遺伝子検査サービスを提供することが可能になる。

8. 網膜色素変性臨床試験

網膜色素変性への 0.15%ウノプロストン点眼(UF-021)の投与終了後は視機能は悪化に転じたことより、UF-021 による視機能改善効果が確認された。しかし、高濃度群では投与終了後の進行が緩やかであり、UF-021 による視機能維持効果が長期に持続している可能性があると思われた。

9. 視神経症病態解明研究

plasmablast の増加は視神経脊髄炎の病態を反映したバイオマーカーになり、特にインター

フェロンβ治療などの免疫調整薬の適応を決める上で意義深いと考えられる。plasmablastの生存はIL-6に依存しており、IL-6 シグナルを阻害する治療が有効である可能性が高い。さらに plasmablast は炎症組織移行性を持っていることが示唆され、今後、炎症組織での役割やその分化背景にある免疫病態についての解析を行うことで NMO 病態全体の理解が進むと考えられる。

10. 強度近視眼球形状解析

強度近視眼の眼球形状を数値化することが可能であり、非対称性や鋭な眼球後部の形状といった眼球形状変化があると、近視性眼底病変の発生頻度が高く、より非生理的な変化であると考えられた。眼球形状に定量的解析は、今後の強度近視眼の眼球形状変化の研究に有用であると思われる。

11. 神経機能イメージング

網膜神経節細胞におけるBDNFは、外側膝状核から供給され、緑内障視神経症では、その供給が停止し、アポトーシスが生じると考えられているため、逆行性の軸索輸送が強調されているが、我々の研究データによると、網膜神経節細胞においては、BDNF は順行性にも逆行性にも輸送されている。コルヒチンによる軸索障害実験によって、軸索輸送の停止が網膜神経節細胞のアポトーシス細胞死を誘導されることが証明された。また、軸索誘導の実験では、網膜神経節細胞の軸索に発現するヘパラン硫酸が、軸索ガイダンス因子のシグナリングを増幅させる役割があることが明らかになった。

12. 神経再生医療と人工視覚

iPS 細胞由来網膜色素上皮シートの他家移植片が拒絶された事から、臨床応用には自家移植が適していると考えた。この点で、ES 細胞由来のものより iPS 細胞由来の方が有利な可能性がある。

人工網膜における動物実験で、多孔化電極は限局した網膜部位を刺激し、電極の接触状態コントロールすることで、刺激閾値を低減できることがわかった。

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。今後、併用療法も含め、最善の治療法の評価が必要であり、また新治療法や予防法開発のための病態解明が重要である。

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、遺伝子導入療法の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。

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. 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

G. 知的所有権の取得状況

各分担研究報告に記載

H. 参考文献

各分担研究報告に記載

I. 健康危険情報

各分担研究報告に記載

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告

1. マウス網膜下出血モデルにおける P2X7 受容体の関与と

Brilliant Blue G による神経保護効果の検討

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 我々はこれまでに硝子体手術の手術補助剤である Brilliant Blue G (BBG)の有用性を報告した。一方でBBGはP2X7受容体の阻害作用を持つことが知られている。今回、我々はP2X7受容体のリガンドである ATP(アデノシン三リン酸)の硝子体濃度の検討を行った。黄斑円孔、黄斑上膜と比較し、硝子体出血群では硝子体 ATP 濃度が有意に上昇していた。また網膜初代培養細胞で ATP 投与により視細胞生存率が減少し、BBG 投与により抑制された。マウス網膜下出血モデルにおいて外顆粒層の TUNEL 陽性アポトーシスが BBG 投与により抑制された。眼内出血性病変では細胞外 ATP が上昇しており、P2X7 受容体活性化が病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでに硝子体手術の手術補助剤として Brilliant Blue G (BBG)が安全で優れた内境界膜染色作用を持つことを報告してきた。さらに BBG は P2X7 受容体阻害という生理活性作用によるを持ち、網膜における神経保護効果を示すことを報告した。今回、我々は網膜疾患において P2X7 受容体のリガンドである ATP(アデノシン三リン酸)の眼内濃度の検討を行い、P2X7 受容体阻害剤としての BBG の神経保護効果についても検討した。

B. 研究方法

黄斑円孔、黄斑上膜、硝子体出血の硝子体手術時に採取した硝子体サンプルを用いてルシフェラーゼアッセイにより ATP 濃度を測定した。次に細胞外 ATP の P2X7 受容体活性化による網膜細胞毒性を検討するために、C57BL6

マウスを用いて網膜初代培養細胞系を作成、培養細胞に ATP を投与し視細胞の生存率を calcein AM、CMTMRos にて評価した。また、マウス網膜下に自己血を投与し網膜下出血モデルを作成し、網膜細胞のアポトーシスを TUNEL 法にて評価した。また BBG の投与による細胞死抑制効果についても検討した。

(倫理面への配慮)

十分な麻酔の施行により苦痛を低減し、標本採取に際しては安楽に屠殺した。

C. 研究結果

黄斑円孔、黄斑上膜と比較し、硝子体出血群では硝子体中 ATP 濃度が有意に上昇していた。網膜初代培養細胞では ATP 投与により視細胞生存率が減少し、BBG 投与により細胞毒性が抑制された。マウス網膜下出血モデルでは多量に認められた外顆粒層の TUNEL 陽性

アポトーシスがBBG投与によって抑制された。

D. 考察

眼内出血性病変では細胞外 ATP が上昇しており、P2X7 受容体活性化が病態に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

マウス網膜下出血モデルにおいてBBGによるP2X7受容体阻害は網膜細胞死抑制効果があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Notomi S, et al : Critical involvement of extracellular ATP acting on P2RX7 purinergic receptors in photoreceptor cell death. Am J Pathol 179:2798-2809, 2011.

2. 学会発表

納富昭司、他: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. 第115回眼科学会総会、東京、2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

Notomi S, et al : Critical involvement of extracellular ATP acting on P2RX7 purinergic receptors in photoreceptor cell death. Am J Pathol 179:2798-2809, 2011.

2. 網膜虚血再灌流障害におけるアルドステロン/ミネラルコルチコイド

受容体(MR)の存在とMR拮抗薬の神経保護効果

廣岡一行、刘 野、藤田智純、白神史雄
(香川大)

研究要旨 ラット網膜におけるアルドステロン/ミネラルコルチコイド受容体(MR)の存在および網膜虚血再灌流障害におけるMR拮抗薬の効果を検討した。ラットの前房内圧を130 mmHgに45分間上昇させて網膜虚血を行い、アンジオテンシン II タイプ1受容体拮抗薬(ARB;カンデサルタン)、MR拮抗薬(スピロラクトン)、アルドステロンを投与した。またウエスタンブロットと免疫染色を用いてMRの発現と局在を調べた。スピロラクトンを投与することにより虚血再灌流による網膜障害は抑制された。カンデサルタン投与にて網膜障害は抑制されたが、アルドステロンとの同時投与でカンデサルタンの神経保護効果は消失した。MRの発現は虚血12時間後で最も多くなり、網膜内層にみられた。網膜にもアルドステロン/MRは存在した。また、MR拮抗薬は網膜虚血再灌流障害に対して保護効果を有した。

A. 研究目的

ラット網膜におけるアルドステロン/ミネラルコルチコイド受容体(MR)の存在および網膜虚血再灌流障害におけるMR拮抗薬の効果を検討すること。

B. 研究方法

ラットの前房内圧を130 mmHgに45分間上昇させることにより網膜虚血を行った。アンジオテンシン II タイプ1受容体拮抗薬(ARB;カンデサルタン)、MR拮抗薬(スピロラクトン)、アルドステロンを投与した。1週後に眼球を摘出し、神経節細胞数および内顆粒層厚で障害の程度を評価した。またウエスタンブロットと免疫染色を用いてMRの発現と局在を調べた。統計解析はダネットの多重比較を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は香川大学動物実験実施指針に基づ

き計画し、香川大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

正常網膜では神経節細胞数、内顆粒層厚はそれぞれ2360 /mm²、28.5 μmであったが蒸留水投与では1390 /mm²(p < 0.05)、17 μm(p < 0.05)であった。カンデサルタン(1870 /mm²; p = 0.14、25 μm; p = 0.68)あるいはスピロラクトン(2030 /mm²; p = 0.16、26 μm; p = 0.16)(図1)を投与することにより虚血再灌流

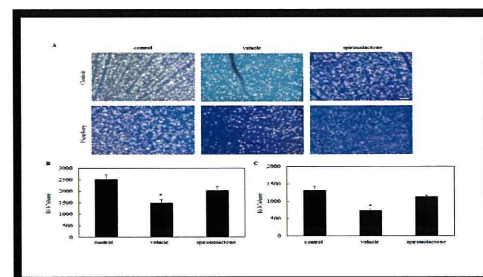


図1 スピロラクトンの効果

による網膜障害は抑制された。しかし、カンデサルタンとアルドステロンの同時投与では、カンデサルタンの保護作用は消失した(1650 /mm²; p < 0.05, 17 μm; p < 0.05)。

またMRの発現は虚血 12 時間後で最も多くなり、網膜内層にみられた。カンデサルタンを投与することにより、レニン・アンジオテンシン系を阻害しても、虚血 12 時間後の網膜にはカンデサルタンを投与していない時とほぼ同等のMRの発現がみられた。

D. 考察

カンデサルタンの単独投与では、虚血再灌流による網膜障害は抑制されたのに対して、カンデサルタンとアルドステロンの同時投与はカンデサルタンの神経保護効果を消失させた。ウエスタンブロットの結果より、カンデサルタンを投与しても虚血後の網膜にはMRの増加がみられた。そのためにアルドステロンとの同時投与でカンデサルタンの神経保護効果が消失したと思われる。これらの結果は、MRを活性化させるのに、アルドステロン非依存的経路の存在を示唆するものである。

E. 結論

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系は網膜にも存在し、スピロラクソンを投与することにより虚血再灌流障害における網膜神経細胞死が抑制される可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Liu Y, Hirooka K, Nishiyama A, Lei B, Nakamura T, Itano T, Fujita T, Zhang J, Shiraga F : Activation of aldosterone/mineralocorticoid receptor system and

protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism in retinal ischemia-reperfusion injury. Exp Eye Res, Epub ahead of print.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

3. 高濃度グルコース及び糖尿病誘導神経細胞死における 小胞体ストレスの関与と NT-4 の小胞体ストレス関連神経細胞死 保護効果の検討

忍足俊幸、芳田奈津代、山本修一
(千葉大)

研究要旨 高濃度グルコース及び糖尿病ラット網膜の神経細胞死における小胞体ストレスの関与と、NT-4 の小胞体ストレス関連神経細胞死に対する神経保護効果を 3 次元培養したラット網膜で検討した。3 次元培養した正常 SD ラット網膜及び STZ 誘導糖尿病ラット網膜(DM) 切片を無菌下で単離し、網膜切片を作成、コラーゲンに包埋、無血清培養液で培養・維持した。正常網膜切片は正常濃度(NG)・高濃度グルコース(HG)群に分け、HG 群、DM 群の培養液に NT-4、HG 群に TUDCA を付加した。培養 7 日で切片を固定し、TUNEL 染色及び PERK、CHOP の免疫染色を施行した。HG 群、DM 群では GCL の TUNEL 陽性率及び PERK、CHOP 免疫陽性率は有意に増加した。NT-4、TUDCA を付加した群では TUNEL 陽性率 PERK、CHOP 免疫陽性率は有意に減少した。糖尿病ストレスによる神経細胞死に小胞体ストレスが関与することが示唆され、NT-4 及び TUDCA は小胞体ストレス関連神経細胞死を有意に救済した。これらの保護作用には PERK、CHOP の抑制効果が関与していた。過去の報告と踏まえて慢性的な糖尿病ストレス環境では小胞体とミトコンドリアの神経細胞死経路に crosstalk があることが示唆された。

A. 研究目的

糖尿病網膜症は失明原因の第 2 位であり、その病態に血管病変と神経病変が関与することが知られている。しかしながら、糖尿病網膜症の初期から観察される神経細胞死の正確なメカニズムについては不明である。神経細胞死は視機能の悪化に直結する不可逆的な変化であり水面下で蓄積していくためそのメカニズム究明、救済策の検討は早急の課題である。

我々はミトコンドリアーカスペース依存性経路が糖尿病網膜神経細胞死に関与することを報

告してきた。今回高濃度グルコース(HG)及び糖尿病ラット(DM)培養網膜の神経細胞死に小胞体(ER)ストレスが関与するかをラット網膜 3 次元培養を用いて検討した。また、NT-4、低分子シャペロンが ER ストレス関連神経細胞死を抑制できるかを TUNEL 染色、PKR-like ER kinase (PERK)、C/EBP homologus protein (CHOP)免疫染色を用いて解析した。

B. 研究方法

4 匹の成熟 SD ラット網膜に 55mg/kg ストレプト

ゾトシンを静脈投与し DM ラットを作成、10 匹の SD ラットをコントロールとした。3 週の DM ラット及び同週齢のラット網膜を無菌下で単離し、type I コラーゲンのゲルに包埋し無血清培養液で培養維持した。正常ラット網膜切片は正常濃度グルコース(7.5 mM;NG)と高濃度グルコース(45 mM;HG)に分け HG 群及び DM 群に 100 ng/ml neurotrophin-4 (NT-4)、HG 群に低分子シャペロンである 100 mm Taurine-conjugated ursodeoxycholic acid (TUDCA) を付加した。培養 7 日後網膜切片を固定し凍結切片を作成した。次いで TUNEL 染色及び PERK、CHOP の免疫染色を施行し、DAPI で核染色を行った。網膜神経節細胞層(GCL)における TUNEL 陽性率及び PERK、CHOP 免疫陽性率を(GCL における TUNEL 陽性数または免疫陽性数)/(GCL における DAPI 染色数)で解析した。統計解析は Mann-Whitney U test を用いた。P<0.05 を統計的有意とした。また、変性神経での局在を確認するため変性神経のマーカーである Fluoro-Jade B (FJB)との同時染色を施行した。(倫理面への配慮)

動物の取り扱いはずべて ARVO Statement に従って行った。また、本研究の動物実験計画は千葉大学大学院医学研究院動物実験計画(動-22-236)で受理された。

C. 研究結果

HG 群及び DM 群では TUNEL 陽性率は NG 群に比べて有意に増加した(32.5 ± 11.6% vs. 19.9 ± 7.2%; p=0.0007, 34.6 ± 17.6% vs. 19.9 ± 7.2%; p=0.0211)。PERK 及び CHOP

免疫陽性率も HG 群及び DM 群では NG 群に比べ有意に増加した(30.5 ± 17.4% vs. 12.0 ± 4.0%; p=0.003, 27.2 ± 9.5% vs. 12.0 ± 4.0%; p=0.0002, 21.2 ± 6.5% vs. 11.6 ± 8.0%; p=0.0183, 24.9 ± 7.4% vs 11.6 ± 8.0%; p=0.001)。NT-4 を付加した HG 群及び DM 群では付加しなかった群に比べて TUNEL 陽性率は有意に改善した(13.8 ± 6.0% vs. 32.5 ± 11.6%; p<0.0001, 14.9 ± 5.3% vs. 34.6 ± 17.6%; p=0.0012)。同様に NT-4 を付加した HG 群及び DM 群では付加しなかった群に比べて PERK、CHOP 免疫陽性率も有意に改善した(7.0 ± 3.8% vs. 30.5 ± 17.4%; p=0.0004, 9.6 ± 2.1% vs. 27.2 ± 9.5%; p=0.0003, 6.9 ± 2.9% vs. 21.2 ± 6.5%; p=0.0004, 7.7 ± 3.3% vs. 24.9 ± 7.4%; p=0.0003)。TUDCA を付加した HG 群では付加しなかった HG 群に比べて TUNEL 陽性率は有意に改善した(13.1 ± 4.3 vs. 32.5 ± 11.6%; p<0.0001)。同様に TUDCA を付加した HG 群では付加しなかった HG 群に比べて PERK、CHOP 免疫陽性率は有意に改善した(9.9 ± 3.8% vs. 30.5 ± 17.4%; p=0.0014, 7.3 ± 2.6% vs. 21.2 ± 6.5%; p=0.004)。また GCL における大部分の FJB 陽性細胞と PERK、CHOP 発現の局在は一致していた。

D. 考察

我々は、糖尿病ストレスで誘導される神経細胞死にミトコンドリアーカススペース依存性経路が関与することを過去に報告してきた。また、種々の栄養因子の中で NT-4 が最も救済効果・再生誘導が強い結果であった。今回の報

告で、糖尿病ストレスによって誘導される神経細胞死に ER ストレスが関与することが示唆された。NT-4 のみならず低分子シャペロンである TUDCA もこの小胞体ストレス関連神経細胞死を有意に救済した。これらの保護作用には PERK、CHOP の抑制効果が関与していた。

PERK-CHOP 細胞死経路は最近緑内障モデルにおいても細胞死への関与が示唆されているが、我々の報告でも、FJB 陽性細胞で PERK、CHOP 発現の局在が一致したことから糖尿病ストレスによる変性神経において PERK-CHOP 経路が関与することが示唆された。

慢性的な ER ストレス環境下では BH-3 only proteins のような Bcl-2 ファミリーの一員がミトコンドリアに細胞死のシグナルを伝える媒介因子となることが最近になって報告されてきている。我々の過去の報告と踏まえて慢性的な糖尿病ストレス環境下においても ER とミトコンドリアの神経細胞死経路に crosstalk が存在することが示唆された。また、NT-4 はミトコンドリアと ER ストレス両方の経路を抑制することにより神経保護作用を発揮することが示唆された。

E. 結論

糖尿病ストレスによる神経細胞死に ER ストレスが関与することが示唆され、NT-4 及び低分子シャペロン TUDCA は小胞体ストレス関連神経細胞死を有意に救済した。これらの保護作用には PERK、CHOP の抑制効果が関与していた。過去の報告を踏まえて、慢性的な糖尿病ストレス環境では ER とミトコンドリアの神経細胞死経路に crosstalk があることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Oshitari T, et al: Effect of neurotrophin-4 on endoplasmic reticulum stress-related neuronal apoptosis in diabetic and high glucose exposed rat retinas. *Neurosci Lett* 501:102-106, 2011.

2. 学会発表

Oshitari T, et al: Effect of NT-4 on ER stress-related neuronal apoptosis in cultured rat retinas exposed to high-glucose. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (ARVO). Fort Lauderdale, Florida, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

1. Oshitari T, et al: Diabetes: a potential enhancer of retinal injury in rat retinas. *Neurosci Lett* 390:25-30, 2005.
2. Oshitari T, et al: Mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 92: 552-556, 2008.
3. Oshitari T, et al: Effect of neurotrophic factors on neuronal apoptosis and neurite regeneration in cultured rat retinas exposed to high-glucose. *Brain Res* 1346:43-51, 2010.

4. 視神経軸索障害の機能的評価法の確立と

視神経軸索再生の分子メカニズムの解明

稲谷 大

(福井大)

研究要旨 網膜神経節細胞の軸索輸送をライブイメージで観察し、視神経障害を機能的に評価する手法を確立するための研究に取り組んだ。蛍光標識した脳由来神経栄養因子 (BDNF) をビデオカメラで撮影すると、BDNF が順行性と逆行性に軸索輸送されるのを観察できた。軸索障害を加えると、軸索輸送が停止し、アポトーシスが誘導されることが明らかになった。軸索輸送のライブイメージングを緑内障などによる視神経障害を細胞死よりも鋭敏に捉える評価系として応用出来る可能性がある。視神経再生に関する研究として、我々は視神経軸索誘導に不可欠な分子を明らかにした。遺伝子改変マウスを作成し、その表現型を解析することによって、Netrin-1 と Slit がヘパラン硫酸と結合することが適切な視神経軸索誘導に不可欠であることが明らかになった。

A. 研究目的

緑内障患者の視神経障害を機能的に評価する方法を確立する研究と、視神経再生に関する研究をおこなった。視神経障害の機能評価の研究として、軸索流をライブイメージで観察することで、網膜神経節細胞のアポトーシスを予測できるかを明らかにする研究をおこなった。視神経再生研究として、視神経軸索投射に関わる分子メカニズムを明らかにするための研究をおこなった。

B. 研究方法

生直後のラットの網膜神経節細胞の初代培養をおこない、蛍光標識された脳由来神経栄養因子 (BDNF) をトランスフェクションし、軸索内に発現した BDNF の蛍光信号をタイムラプスイ

メージで撮影することによって、その分子輸送を観察した。さらに、コルヒチンを投与し、軸索輸送を停止させ、網膜神経節細胞のアポトーシスが誘導されるかを観察した。網膜の発生段階で一過性に発現上昇する分子であるヘパラン硫酸の欠損マウスを作成して、視神経の軸索投射の表現型を解析した。

(倫理面への配慮)

学内における動物実験等の実施に関する基本指針に従い、申請し許可された動物実験計画書に基づいて実験をおこなった。

C. 研究結果

網膜神経節細胞の軸索内を輸送する BDNF をライブイメージで観察することに成功した (図 1)。BDNF は軸索内を順行性と逆行性、両方

向に輸送されていることを確認した。さらに、コ

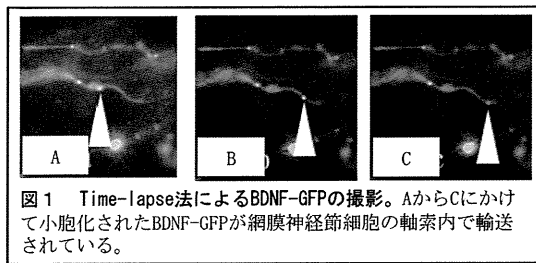


図1 Time-lapse法によるBDNF-GFPの撮影。AからCにかけて小胞化されたBDNF-GFPが網膜神経節細胞の軸索内で輸送されている。

ルヒチン投与による軸索障害によって、BDNFの軸索輸送は、コルヒチン投与後2時間目以降著明に停滞し、投与後24時間後にアポトーシスが誘導された。視神経軸索誘導実験では、ヘパラン硫酸欠損マウスにおいて、視神経乳頭低形成が引き起こされた(図2)。軸索ガイ

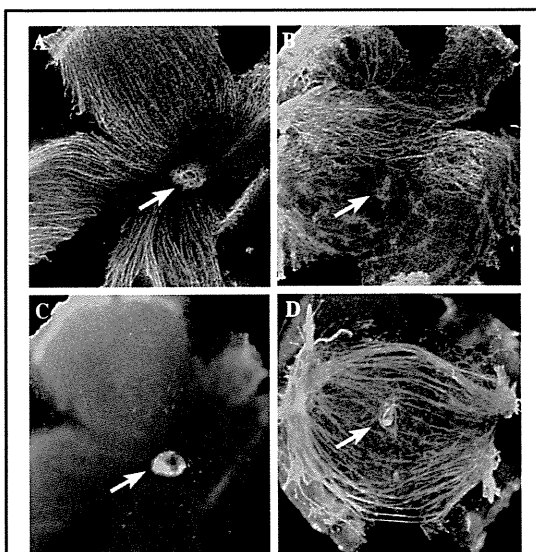


図2 ヘパラン硫酸欠損マウスの網膜神経節細胞の軸索投射異常。網膜の展開標本を作成し、硝子体側(A, B)と網膜色素上皮側(C, D)から見た抗TuJ1抗体での免疫染色の結果。網膜神経節細胞の軸索が染色されている。野生型(A, C)では、硝子体側の網膜に軸索が放射状に染色され、視神経乳頭を形成している。ヘパラン硫酸欠損マウス(B, D)では、無秩序に軸索が投射し、網膜色素上皮側の網膜にも迷入している。矢印は視神経乳頭。

ス因子のNetrin-1とSlitによる軸索誘導シグナルが障害された。

D. 考察

網膜神経節細胞におけるBDNFは、外側膝状核から供給され、緑内障視神経症では、その供給が停止し、アポトーシスが生じると考えられているため、逆行性の軸索輸送が強調されているが、我々の研究データによると、網膜神経節細胞においては、BDNFは順行性にも逆行性にも輸送されている。コルヒチンによる軸索障害実験によって、軸索輸送の停止が網膜神経節細胞のアポトーシス細胞死を誘導されることが証明された。また、軸索誘導の実験では、網膜神経節細胞の軸索に発現するヘパラン硫酸が、軸索ガイダンス因子のシグナリングを増幅させる役割があることが明らかになった。

E. 結論

本研究における軸索輸送の研究によって、網膜神経節細胞の細胞死を予測するバイオマーカーとして、軸索流が有効である可能性が示唆された。また、適切な視神経軸索投射には、軸索に発現するヘパラン硫酸が不可欠であることが証明された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takihara Y, et al: Combined intravitreal bevacizumab and trabeculectomy with mitomycin C versus trabeculectomy with mitomycin C alone for neovascular glaucoma. J Glaucoma 20:196-201, 2011.

2. Takihara Y, et al: Trabeculectomy with mitomycin C for open-angle glaucoma in

phakic eyes vs pseudophakic eyes after phacoemulsification. Arch Ophthalmol 129 : 152-157, 2011.

3. Yamamoto T, et al : Interim clinical outcomes in the collaborative bleb-related infection incidence and treatment study. Ophthalmology 118:453-458, 2011.

4. Iwao K, et al : Success rates of trabeculotomy for steroid-induced glaucoma: a comparative, multicenter, retrospective, cohort study. Am J Ophthalmol 151 : 1047-1056, 2011.

5. Takihara Y, et al: Dynamic imaging of axonal transport in living retinal ganglion cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:3039-3045, 2011.

6. Yasumura R, et al : Investigation of the association between SLC1A3 gene polymorphisms and normal tension glaucoma. Mol Vis 17:792-796, 2011.

7. Ogata-Iwao M, et al : Heparan sulfate regulates intraretinal axon pathfinding by retinal ganglion cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:6671-6679, 2011.

8. Awai-Kasaoka N, et al : Impact of phacoemulsification on failure of trabeculectomy with mitomycin C. J Cataract Refract Surg 38:419-424, 2012.

9. Goto A, et al: Frequency and risk factors for neovascular glaucoma after vitrectomy in eyes with proliferative diabetic retinopathy. J Glaucoma, In press.

2. 学会発表

瀧原祐史、他：培養網膜神経節細胞軸索流の動的画像解析。第115回日本眼科学会総会、東京都、2011。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

5. 双極細胞が障害される癌関連網膜症における自己抗体の同定

近藤峰生¹⁾、上野真治²⁾、寺崎浩子²⁾、西沢祐治³⁾、山本修一⁴⁾、大黒 浩⁵⁾、
町田繁樹⁶⁾、Grazyna Adamus⁷⁾、佐貫理佳子⁸⁾、古川貴久⁸⁾
(¹⁾三重大、²⁾名古屋大、²⁾中部大、⁴⁾千葉大、⁵⁾札幌医大、⁶⁾岩手医大、
⁷⁾オレゴン大、⁸⁾大阪バイオサイエンス研究所)

研究要旨 腫瘍関連網膜症は、腫瘍組織中に網膜細胞と共通する抗原が発現することによって血清中に自己抗体が産生され、それが網膜機能を障害する症候群である。これまで視細胞が障害されるタイプの腫瘍関連網膜症ではリカバリンなど多くの自己抗原が同定されているが、双極細胞が障害されるタイプの腫瘍関連網膜症では双極細胞に特異的な自己抗原は同定されていない。今回我々は肺癌と悪性黒色腫によって双極細胞機能が低下した腫瘍関連網膜症患者の血清から、TRPM1 に対する自己抗体を初めて同定した。

A. 研究目的

腫瘍関連網膜症は、腫瘍組織中に網膜細胞と共通する抗原が発現することによって血清中に自己抗体が産生され、それが網膜機能を障害する症候群である。今回我々は、肺癌による癌関連網膜症で双極細胞機能が低下した症例の血清から TRPM1 に対する自己抗体を同定し、同時にこの抗体が悪性黒色腫関連網膜症 (MAR) の原因抗体の 1 つでもあることも見いだしたので報告する。

B. 研究方法

肺癌による腫瘍関連網膜症患者 1 名、および MAR 患者 26 名を対象とした。対象患者に対し一般的な眼科検査および網膜電図 (ERG) を記録し、血清を免疫組織と Western blot で調べた。

(倫理面への配慮)

患者から今回の研究目的を十分に説明して書面による同意を得た。また、学内倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

名大眼科を受診した原因不明の視野欠損患者の網膜機能を詳細に検査した。この男性は 1 か月前から両眼の視力が低下し、視野検査では両眼に全体的な感度低下がみられたが眼底は正常であった。杆体 ERG は平坦、フラッシュ ERG は陰性型を示し、長時間刺激による錐体 ERG では ON 反応が欠損して OFF 反応は正常であった。この患者は PET で肺癌があることがわかり、患者血清中に双極細胞に対する自己抗体があることが予想された。Western blot によりこの患者の血清から TRPM1 に対する自己抗体が同定された。また、日本と米国から 26 例の MAR の血清を集めて

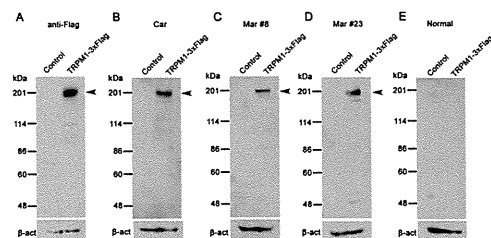


図1 Western blot の結果

検査した結果、2例の血清中にTRPM1自己抗体が検出された。

D. 考察

TRPM1 (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1)がON型双極細胞の光情報伝達に重要なカチオンチャネルであることは2010年に古川らの研究グループによって発見された。さらに、このTRPM1は完全型先天停夜盲(complete-type CSNB)の原因遺伝子の1つであることも2010年に証明されている。TRPM1はON型双極細胞における光伝達に重要なカチオンチャネルであると同時に、完全型CSNBの原因遺伝子であり、またMARを含む腫瘍関連網膜症の原因抗原になりうるということがわかった

E. 結論

ON型双極細胞のカチオンチャネルであるTRPM1に対する自己抗体は、双極細胞機能を障害するタイプの癌関連網膜症の原因抗体になりうるということがわかった

F. 研究発表

1. 論文発表

Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T: Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. PLoS One:6:e19911, 2011.

2. 学会発表

Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S,

Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. Florida, USA. May 3, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

1. Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, et al:(2010) TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. Proc Natl Acad Sci U S A 107:332-337, 2009.
2. Nakamura M, Sanuki R, Yasuma TR, Onishi A, Nishiguchi KM, Koike C, et al: TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness. Mol Vis 16:425-437, 2010.

6. 視神経脊髄炎 (NMO) における plasmablasts の関与と

抗 IL-6 受容体抗体療法の可能性

山村 隆¹⁾、千原典夫¹⁾²⁾、三宅幸子¹⁾、林 幼緯²⁾、岡本智子²⁾、
小川雅文²⁾、大木伸司¹⁾、荒浪利昌¹⁾

(¹⁾国立精神・神経医療研究センター、²⁾国立精神・神経医療研究センター病院・神経内科)

研究要旨 視神経脊髄炎(NMO)は主に視神経炎と脊髄炎を繰り返す中枢神経系の炎症性疾患である。近年 NMO における疾患特異的自身抗体として抗アクアポリン 4 抗体 (抗 AQP4 抗体) が発見され、多発性硬化症(MS)とNMOの鑑別が容易になった。臨床、病理、あるいは動物モデルによる解析を通じて、抗 AQP4 抗体は疾患マーカーであるのみならず、NMO の本態であるアストロサイト障害を惹起し病態とも関連が深いことが示唆されている。一方でこの抗 AQP4 抗体産生メカニズムは不明であった。最近我々は NMO に特有の B 細胞異常として plasmablasts の増加を発見した。NMO 患者から分離した plasmablasts は、IL-6 依存性に AQP4 抗体を産生し、抗 IL-6 受容体抗体を添加することによって、AQP4 抗体の産生及び plasmablasts の生存が阻害された。Plasmablasts は NMO 末梢血における抗 AQP4 抗体の主な産生源であり、我々の研究結果はヒト型抗 IL-6 受容体抗体が NMO に有効である可能性を示唆している。

A. 背景と目的

NMO は主に視神経炎と脊髄炎を繰り返す中枢神経系の炎症性神経疾患である。NMO と多発性硬化症 (MS) は治療薬に対する反応性が異なり、両者を鑑別することは臨床の要点である。近年 NMO ではアストロサイトに強く発現する水チャネルアクアポリン 4 (AQP4) に対する自己抗体が疾患特異的に上昇することが明らかになった。さらに臨床、病理あるいは動物モデルの解析から、抗 AQP4 抗体はそれ自身がアストロサイト障害を惹起し病態に関与することが示唆されている。抗 AQP4 抗体産生細胞を標的とした治療法は病態に即していると考えられる。最近我々は MS 患者や健常人と

比較して抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者末梢血に増加した未熟形質細胞(plasmablast: PB)が末梢血における主な抗 AQP4 抗体産生細胞であることを発見し報告した¹⁾。PB は分化段階の進んだ活性化 B 細胞で、この細胞の生存や抗 AQP4 抗体産生能は主にインターロイキン 6 (IL-6) シグナルに依存していたことから、抗 IL-6 受容体抗体が抗 AQP4 抗体産生細胞を標的とした治療法になり得ると提唱している。今回、我々は MS と異なる NMO 特有の B 細胞異常として PB に注目した。また、末梢血で増加している PB がどこで病原性を発揮するのかについて末梢血と髄液内での比較解析を行った。

B. 対象と方法

本研究では年齢・性別をマッチさせた健常人 20 例、抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者（以下、抗体陽性患者）41 例（NMO spectrum disorder を含む）、抗 AQP4 抗体陰性で Wingerchuk 2006 診断基準²⁾を満たす NMO 患者 4 例、McDonald 診断基準³⁾を満たし RRMS の臨床病型をとる通常型 MS 患者（以下、MS 患者）17 例を対象とした。各々の末梢血単核球を分離し B 細胞亜分画の頻度やケモカインなどの表面分子発現をフローサイトメトリー (FACS) で解析した。

（倫理面への配慮）

本研究においては、NCNP の倫理委員会の承認を得た上で、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。また、患者から得られた情報は当研究部でのみ使用し、厳重に保管されている。

C. 結果

NMO 患者末梢血における PB の増加

NMO における末梢血 B 細胞の特徴を解析するため、B 細胞を各種表面抗原 (CD19、CD27、CD38、CD180) を用いて単離した。NMO 患者において全 B 細胞に占める PB (CD19^{int}CD27^{high}CD38^{high}CD180⁻細胞) の細胞割合が健常人や MS 患者と比して有意に多く ($P < 0.05$) 他の B 細胞亜分画であるナイーブ B 細胞 (CD19+CD27⁻細胞) やメモリー B 細胞 (CD19+CD27+CD38^{low-mid}CD180⁺細胞) の割合には各群間で差がなく、PB の割合は抗 MS と NMO で差がなかった。

D. 結論

PB の増加は NMO の病態を反映したバイオマーカーになり、特にインターフェロン β 治療な

どの免疫調整薬の適応を決める上で意義深いと考えられる。PB の生存は IL-6 に依存しており、IL-6 シグナルを阻害する治療が有効である可能性が高い。さらに PB は末梢血での増加や抗 AQP4 抗体産生能のみでなく、炎症組織移行性を持っていることが示唆され、NMO 病態に多方面で関与している可能性がある。今後、PB の炎症組織での役割やその分化背景にある免疫病態についての解析を行うことで NMO 病態全体の理解が進むと考えられる。

E. 謝辞

本研究の対象患者の抗 AQP4 抗体陽性診断を行っていただいた、東北大学 藤原一男先生、高橋幸利先生、および血液検体の提供にご協力頂いた順天堂大学 横山和正先生、横浜市立大学 岸田一帯先生、富田敦子先生、国立精神医療研究センター・神経内科 村田美穂先生、スタッフの先生方に深謝いたします。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 千原典夫、山村隆:ここまでわかった自己免疫疾患-多発性硬化症・視神経脊髄炎-、臨床検査 55、1241-1248、2011.

2. 学会発表

1. Chihara N, Aranami T, Sato W, et al: Interleukin 6 signaling enhances anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS) 11th annual meeting, Concurrent Thematic Symposium: Pathogenic Role of Antibodies, Washington, 2011.

2. 千原典夫、佐藤和貴郎、荒浪利昌、他:視神経脊髄炎(NMO)における未熟形質細胞の関与. 第 52 回日本神経学会総会、名古屋、2011.
3. 千原典夫、佐藤和貴郎、荒浪利昌、他:視神経脊髄炎(NMO)における plasmablasts の関与. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会、東京、2011.

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

1. Chihara N, Aranami T, Sato W, et al: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Proc Natl Acad Sci U S A 108:3701-3706, 2011.
2. Wingerchuk DM, et al: Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. Neurology 66, 1485-1489, 2006.
3. Polman CH, et al: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". Ann Neurol 58:840-846, 2005.

7. 緑内障手術による眼圧変化に伴う脈絡膜厚と眼軸長の変化

加地 秀、植谷留佳、長屋佐千子、長屋匡俊、伊島 亮、伊藤逸毅、寺崎浩子
(名古屋大)

研究要旨 中心窩下脈絡膜厚に影響を与える因子としては年齢、屈折などが報告されているが、本研究では眼圧が中心窩下脈絡膜厚に影響を与える因子であるかを検討した。名古屋大学医学部附属病院にて緑内障手術を施行した 25 例 30 眼の術前、術後 3 か月の眼圧、スペクトラルドメイン光干渉断層計による中心窩下脈絡膜厚と、併せて IOL マスターによる眼軸長測定を行った。術前後の眼圧差と脈絡膜厚差との間には負の相関($P < 0.01$, $r = -0.514$)が、眼圧差と眼軸長差との間には正の相関 ($P < 0.05$, $r = 0.504$)がみられた。緑内障手術に伴う脈絡膜厚の増加は眼圧の低下によるものであると考えられ、眼圧は脈絡膜厚に影響を与える因子であることが示唆された。

A. 研究目的

Enhanced depth imaging によりスペクトラルドメイン光干渉断層計を用いた中心窩下脈絡膜厚の測定が可能となり、加齢黄斑変性などの発症、治療効果との関係が注目されている。中心窩下脈絡膜厚に影響を与える因子としては年齢、屈折などが報告されている¹が、本研究の目的は眼圧が中心窩下脈絡膜厚に影響を与える因子であるかを調査することである。そのため、緑内障手術前後の眼圧変化に伴う脈絡膜厚の変化とあわせて眼軸長の変化を調査した。

B. 研究方法

名古屋大学医学部附属病院にて緑内障手術を施行した 25 例 30 眼の診療録をレトロスペクティブに検討した。対象の年齢は平均 64.8 歳、男性 17 例 20 眼、女性 8 例 10 眼であった。術式としては 12 眼に線維柱帯切除術を施行(そのうち 4 眼は水晶体再建術を併施)し、18 眼には線維柱帯切開術を施行(そのうち 9 眼は水

晶体再建術を併施)した。

術前、術後 1 週間、術後 1 か月、術後 3 か月の眼圧、スペクトラルドメイン光干渉断層計による中心窩下脈絡膜厚と、IOL マスターによる眼軸長について検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は当院の生命倫理審査委員会の承認のもと施行した。また本研究は後ろ向き研究であり、患者のデータは匿名化したうえで、解析を行った。

C. 研究結果

眼圧は術前の 19.2mmHg と比べ、術後は1週間後に 13.7mmHg、1 か月後に 14.6mmHg、3 か月後に 13.7mmHg と有意に低下していた(図 1。全て術前に対して $P < 0.01$)。

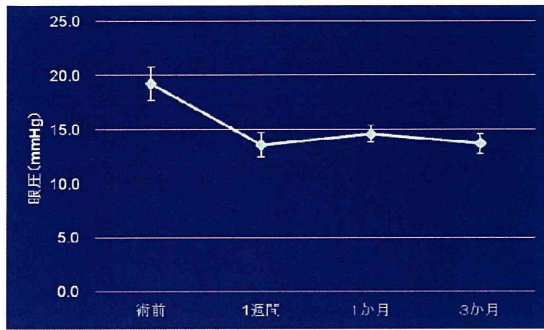


図1 術前、術後1週間、1か月、3か月の眼圧

脈絡膜厚は術前の $188 \mu\text{m}$ と比べ、術後は1週間後に $212 \mu\text{m}$ 、1か月後に $202 \mu\text{m}$ 、3か月後に $207 \mu\text{m}$ と有意に増加していた(図2。全て術前に対して $P < 0.01$)。

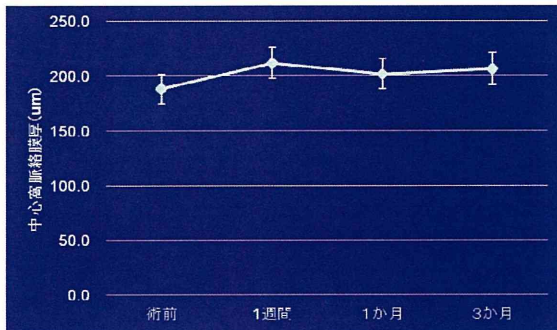


図2 術前、術後1週間、1か月、3か月の中心窩脈絡膜厚

眼軸長は術前の $25.34 \pm 1.34\text{mm}$ と比べ、術後は1週間後に 13.7mmHg 、1か月後に 14.6mmHg 、3か月後に 13.7mmHg と有意に短縮していた(図3。全て術前に対して $P < 0.01$)。

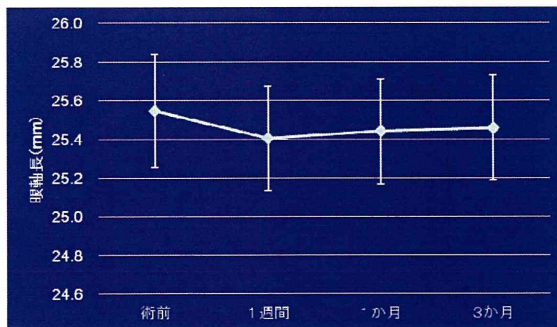


図3 術前、術後1週間、1か月、3か月の眼軸長

また術前後の眼圧差と脈絡膜厚差の間には負の相関(図4。 $P < 0.01$ 、 $r = -0.514$)が、

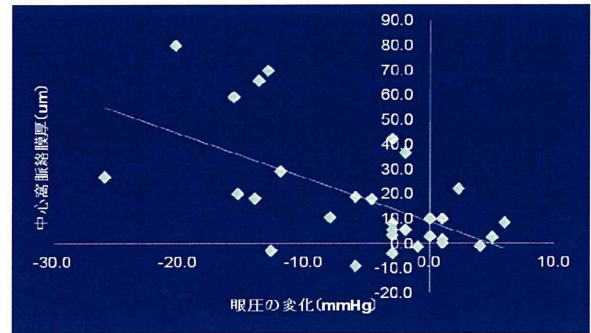


図4 術後3か月での眼圧変化と中心窩脈絡膜厚変化

眼圧差と眼軸長差の間には正の相関(図5。 $P < 0.05$ 、 $r = 0.504$)がみられた。

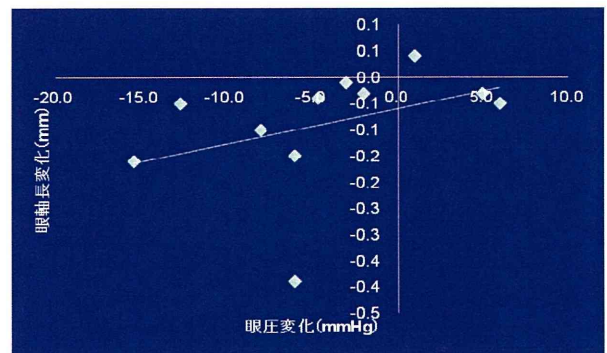


図5 術後3か月での眼圧変化と眼軸長変化

D. 考察

眼圧との関係については、閉塞隅角緑内障患者へのうつぶせ試験において、脈絡膜厚は負の相関が、眼軸長は正の相関があったことを知らが第21回日本緑内障学会において報告している。一方で De Moraes らは飲水試験においては脈絡膜厚、眼軸長ともに正の相関があったと報告しており²、どのような関係にあるか、結論が出ていない。今回の我々の結果は前者と一致していた。飲水試験においては循環血液量の増加により、眼圧の上昇とともに、脈絡膜厚の増加が見られるのかもしれない。

E. 結論

緑内障手術後に、眼圧下降と、脈絡膜厚の増加、眼軸長の短縮が観察された。緑内障手術