

間後に YM-34403 (50mg/kg/day)を強制経口投与した強制経口投与群、DMSO を強制経口投与した強制経口投与無治療群、YM-34403 (0.1 μ g-10 μ g)を 33 ゲージ針を用いて、レーザー網膜光凝固直後に硝子体内に投与した硝子体投与群、硝子体投与群、DMSO を同様に硝子体内に投与した硝子体投与無治療群にわけた。また、レーザー網膜光凝固直後に DMSO あるいは YM-34403(10 μ g)を硝子体内に投与し、その 3 日後に眼球を摘出、網膜色素上皮(RPE)/脈絡膜中の VEGF 量を ELISA (R&D systems)を行い、測定した。また、同様に3日後に眼球を摘出し、凍結切片を作成し、Ki67 抗体(DAKO)を用いて免疫染色を行った。

C. 研究結果

CCR3 拮抗剤強制投与で無治療(DMSO)群と比較して、有意に CNV 容積が抑制された。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(図 1)。

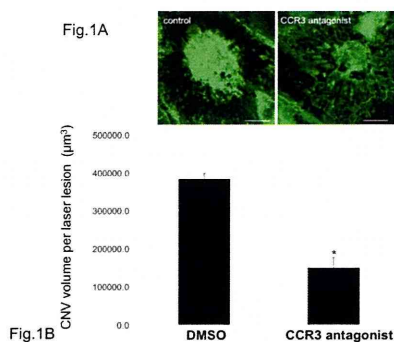


図 1 CNV 容積

無治療群、CCR3 拮抗剤経口投与群。
(* $p < 0.0001$, bar = 100 μ m)

CCR3 拮抗剤硝子体内投与群では、無治療(DMSO)群と比較して、容量依存的に有意に CNV 容積が抑制された。(図 2)。

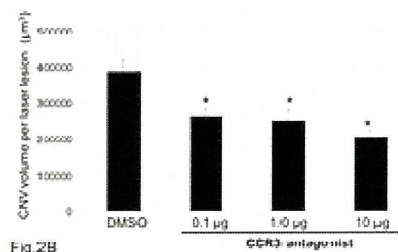
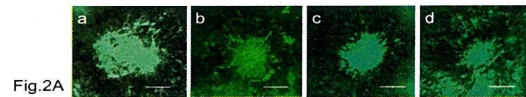


図 2 CNV 容積

無治療群、CCR3 拮抗剤硝子体内投与群 (0.1 μ g, 1 μ g, 10 μ g)
(* , ** , ***: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ vs. 無治療群, bar = 100 μ g)

レーザー網膜光凝固後 7 日目の蛍光眼底造影において、無治療(DMSO)群と比較して、硝子体投与群では有意に血管漏出が抑えられていた(図 3)。

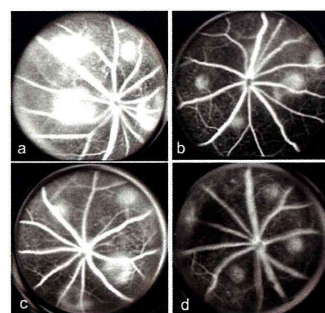


図 3A

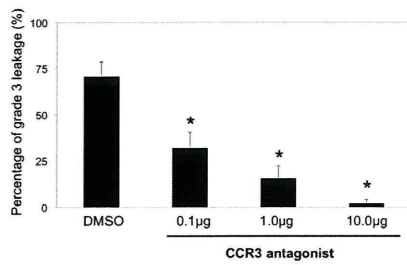


Fig. 3B

図3 血管透過性

A: 蛍光眼底造影後期(a: 無治療(DMSO)群、CCR3拮抗剤 b: 0.1 μg、c: 1.0 μg、d: 10.0 μg)
 B: grade3 の割合 (means ± SEM、*p<0.001)

レーザー網膜光凝固3日後、無治療群、CCR3拮抗剤硝子体内投与群とも、有意に VEGF 蛋白発現が増加していた。また、無治療群と CCR3拮抗剤硝子体内投与群間では有意な差は認められなかった(図4)。

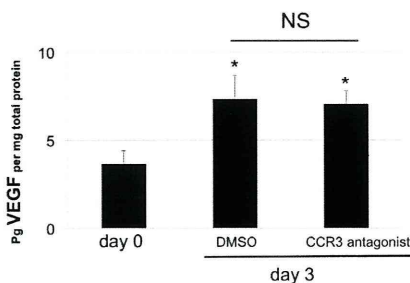


Fig.4

図4 網膜色素上皮/脈絡膜中の VEGF

レーザー照射前、無治療群、CCR3拮抗剤硝子体内投与群
 (*: p<0.05, NS: not significant)

無治療群では、Ki67陽性細胞を多数認めるが、CCR3拮抗剤硝子体内投与群では、Ki67陽性細胞の発現が抑えられている(図5)。

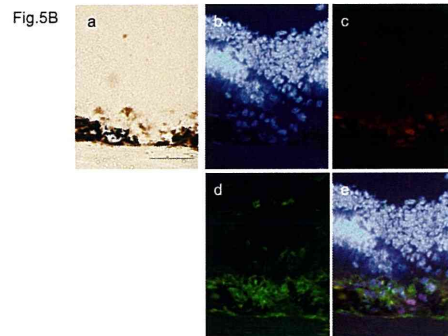
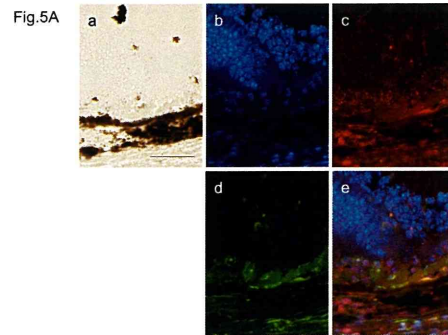


図5 網膜光凝固部位の Ki67 陽性発現

A: 無治療(DMSO)群、B: CCR3拮抗剤硝子体内投与群
 (a: Normal sky image, b: DAPI staining, c: Ki67 immunostaining, d: FITC-isolectin-B4 fluorescence, e: merged image, bar = 50 μm)

D. 考察

以上の結果から、選択的低分子 CCR3拮抗剤である YM-344031 の経口投与、硝子体内投与ともにマウス実験的レーザー脈絡膜新生血管を解剖学のおよび機能的に抑制した。YM-344031硝子体内投与群において、RPE/脈絡膜中の VEGF 蛋白発現量が抑制されていないことから、CCR3拮抗剤の CNV 抑制は VEGF の抑制を介さない経路であると考えられた。Ki67 は細胞増殖関連抗原であり、増殖を休止している G0 期では発現せず、YM-344031硝子体内投与群では、Ki67陽性細胞の発現が抑制されていたことから、CCR3拮抗剤の CNV 抑制の機序として、レーザー照

射後の細胞増殖の抑制の関与が考えられた。CCR3-eotaxin の経路は人冠動脈の血管内皮細胞の細胞透過性を増強するとの報告がある⁵⁾。CCR3 阻害剤は血管内皮細胞の透過性、増殖、管腔形成を促進すると報告されている Rac1 を抑制するとの報告もある⁶⁾。CCR3 阻害剤の血管透過性の抑制に関しては、Rac1 経路が関与している可能性が考えられた。

E. 結論

選択的 低分子 CCR3 拮抗剤である YM-344031 の経口投与、硝子体内投与ともにマウス実験的レーザー脈絡膜新生血管を解剖学および機能的に有意に抑制した。CCR3 拮抗剤による CNV 抑制の機序は、VEGF 抑制を介さない、レーザー網膜光凝固後の細胞増殖抑制が関与している経路が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Mizutani T, et al: CCR3 antagonist suppresses laser-induced choroidal neovascularization in mice. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (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. Suzuki K, et al: In vitro and in vivo

characterization of a novel CCR3 antagonist, YM-344031. *Biochem Biophys Res Commun* 339:1217-1223, 2006.

2. Takeda A, et al: CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature* 460:225-230, 2009.

3. Sakurai A, et al: Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3578-3585, 2003.

4. Nozaki M, et al: Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A. *J Clin Invest* 116:422-429, 2006.

5. Jamaluddin MS, et al: Eotaxin increases monolayer Permeability of human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:2149-2152, 2009.

6. Wang H, et al: Upregulation of CCR3 by age-related stresses promotes choroidal endothelial cell migration via VEGF-dependent and -independent signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 8271-8277, 2011.

23. 脈絡膜新生血管におけるケモカイン受容体CXCR3の関与

藤村茂人¹⁾³⁾、高橋秀徳¹⁾、湯田健太郎¹⁾、上田高志¹⁾、入山 彩¹⁾、井上達也¹⁾、
蕪城俊克¹⁾、玉置泰裕¹⁾、松島綱治²⁾、柳 靖雄¹⁾
(¹⁾ 東京大、²⁾ 東京大・分子予防医学、³⁾ さいたま赤十字病院)

研究要旨【目的】CXCR3は主にTリンパ球に表出されるケモカイン受容体として知られているが、腫瘍などの新生血管内皮にも発現し、血管新生抑制に関与するとされている。今回我々は、レーザー誘発性モデルを用いCXCR3とそのリガンドの一つであるIP-10の脈絡膜新生血管(CNV)への関与について検討を行った。

【方法】まず、C57BL/6マウスにレーザー誘発性 CNVモデルを作成し、CXCR3の免疫染色を行い、更にCXCR3とその主要リガンド(MIG、IP-10、ITAC)の発現をRT-PCRで検討した。次に、CXCR3ノックアウト(CXCR3KO)マウスと野生型(WT)マウスにCNVモデルを作成し、蛍光眼底造影(FA)と脈絡膜伸展標本によるCNV 面積の比較を行った。WTマウスのCNVモデルに対しCXCR3中和抗体やIP-10中和抗体の硝子体投与も行い、CNVへの影響を検討した。更に、各種炎症性サイトカインの発現をRT-PCRにて検討した。

【結果】蛍光免疫染色にてCNVの血管内皮にCXCR3の発現を認めた。RT-PCRではCNVを誘発した眼球でCXCR3とIP-10の発現上昇が認められた。また、CXCR3KOマウスでは、WTマウスに比較して、CNVの蛍光漏出、CNV面積ともに有意に拡大した($p < 0.01$, nested-ANOVA)。WTマウス硝子体への抗CXCR3中和抗体/抗IP-10中和抗体投与も、CNVを有意に拡大した($p < 0.05$, nested-ANOVA)。更に、CXCR3KOマウスではWTマウスと比較してCNVを誘発した眼球の色素上皮/脈絡膜でCCL2の発現上昇を認めた($p < 0.05$)。

【結論】CXCR3、IP-10はCNVモデルで発現が上昇し、CXCR3はCNVの進展抑制に関与すると考えられる。

A. 研究目的

脈絡膜新生血管(CNV)は滲出型加齢黄斑変性(AMD)の原因病巣であり、これに対して抗VEGF治療を中心とした有効な治療法が近年定着してきた。しかしながらこれが全症例に有効というわけではなく、VEGF以外の治療標的を発見することも依然必要とされている。今回我々は、マウスのレーザー誘発性CNVモデルの網膜色素上皮・脈絡膜組織(RPE-choroid)に対しDNAマイクロアレイを行い、ケモカイン

レセプターCXCR3とその主要リガンドの一つであるIP-10が上昇していることを見出し、このCXCR3とIP-10に着目して研究を行うこととした。CXCR3は主にTリンパ球に表出されるケモカイン受容体として知られているが、腫瘍などの新生血管内皮にも発現し、そこで血管新生抑制に関与するとされている。今回我々は、レーザー誘発性モデルを用いCXCR3とそのリガンドの一つであるIP-10の脈絡膜新生血管(CNV)への関与について検討を行った。

B. 研究方法

動物は、C57BL/6マウスを使用し、その野生型♂(WT, Y/+)とCXCR3欠損マウス♂(CXCR3KO, Y/-)を実験に使用した。まず18週齢WTの片眼にCNVを作成し、5日後のRPE-choroidからmRNAを抽出し、マイクロアレイを行った。次いで標的としたCXCR3とその主要リガンドであるIP-10、MIG、I-TACに関してreal-time PCRでCNV眼での発現を検討した。さらにマウスCNVに対しCXCR3と血管内皮マーカであるCD31を標的とした二重免疫染色とヒトCNVに対しCXCR3の免疫染色を行った。また、成熟WTマウスとCXCR3KOマウスのレーザー誘発性CNVの定量的比較を、蛍光眼底造影(FA)と脈絡膜伸展標本で行った。さらにレーザー照射直後にCXCR3中和抗体、IP-10中和抗体(各 $1\mu\text{g}/2\mu\text{l}$)の硝子体投与を行い、コントロールIgG投与眼との比較も行った。最後にRPE-choroidにおけるCNV関連分子(VEGF、PEDF、C3、CCL2)の発現変動を、WTマウスとCXCR3KOマウス間で比較した。

(倫理面での配慮)

ヒトCNV採取は手術治療の一環として行い、研究での標本使用に関してインフォームドコンセントと書面による同意を得た。それらの扱いに際してはヘルシンキ宣言に準拠している。また、動物実験でのマウスの扱いに関しては、視覚と眼科に関する研究協会で規定されたガイドライン(the guidelines of the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)に準拠して行った。

C. 研究結果

マイクロアレイでは、CNV作成眼でCXCR3とIP-10の発現上昇を認め、それはreal-time RT-PCRでも確認された。マウスCNVの二重免疫

染色では、CNV血管内皮にCXCR3が発現しており、ヒトCNVでもCXCR3染色が確認された。CXCR3KOマウスとWTマウスの比較では、CXCR3KOマウスでWTマウスに比してCNVからの蛍光漏出増加とCNV面積の拡大を有意に認めた($\dagger P < 0.01$, nested-ANOVA)(図1A, B)。また、CXCR3KOマウスでは、CNV部位へのマクロファージ浸潤が亢進していた。

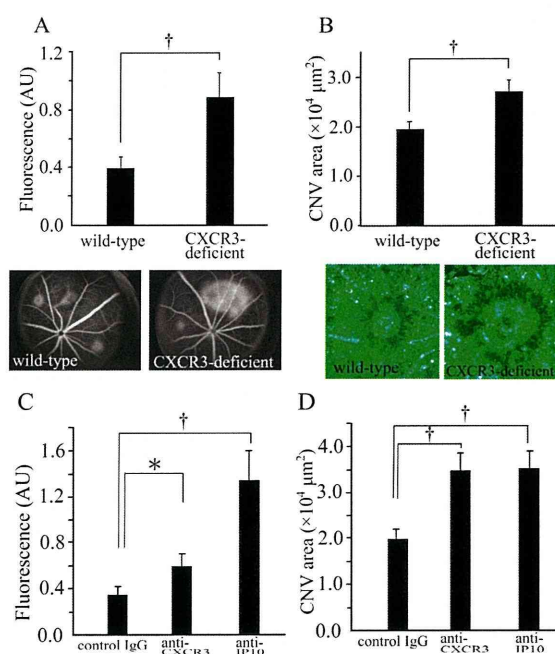


図1: マウスレーザー誘導性CNVの定量的比較

更に、CXCR3中和抗体硝子体投与眼、IP-10中和抗体硝子体投与眼と、Control IgG硝子体投与眼の比較では、各中和抗体投与眼において、Control IgG投与眼と比較して、有意にCNVの蛍光漏出増加・面積拡大を認めた($* P < 0.05$, $\dagger P < 0.01$, nested-ANOVA)(図1C, D)。

WTマウスとCXCR3KOマウスのCNV眼における各種炎症性サイトカインの発現のRT-PCRによる検討では、VEGF、PEDF、C3の発現に、WTマウスとCXCR3KOマウス間で差がなかった。

しかしCCL2のみ、CXCR3KOマウスのCNV眼でWTマウスのCNV眼より強い発現上昇を認めた($P < 0.05$, Mann-Whitney U-test)。

D. 考察

CXCR3KOマウスやCXCR3/IP-10中和抗体投与でCNVが拡大することから、CXCR3へのシグナルは、CNVを抑制する作用を持つことが推測される。CXCR3KOマウスでWTマウスと比較してCNVへのマクロファージ浸潤が亢進し、CCL2のmRNA発現が亢進していたことから、CXCR3へのシグナルを抑制すると、CCL2発現亢進を介し、マクロファージ遊走が促進することで、CNV拡大を来たすと考えられた。

E. 結論

今回の研究により、ケモカインレセプターCXCR3へのシグナルはCNV抑制作用を有すと考えられ、AMD治療の新たな標的となりうることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

藤村茂人、他：脈絡膜新生血管におけるケモカイン受容体CXCR3の関与。第115回日本眼科学会総会、東京都、2011.

G. 知的財産権出願・登録状況

なし

24. Girdin の生理的および病的網膜血管新生における役割

安間哲宏¹⁾、米今敬一¹⁾、伊藤孝紀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、Girdin の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、C57/BL6 バックグラウンドの GirdinS1416A ノックインマウス、hVEGF トランスジェニックマウスを用いた。hVEGF トランスジェニックマウスでは、生後 28 日ごろにかけて網膜下に新生血管が生じる。蛍光顕微鏡で観察し、生後 28 日で比較することに決定した。これを、hVEGF トランスジェニックマウスと GirdinS1416A ノックインマウスを掛け合わせたマウスを用いて、生後 28 日齢で網膜フラットマウントを作成し、蛍光顕微鏡で新生

血管を定量、解析した。

(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

hVEGF マウスと比較し、GirdinS1416A と hVEGF を双方もつマウスでは、血管新生が有意に抑制されることが示された。

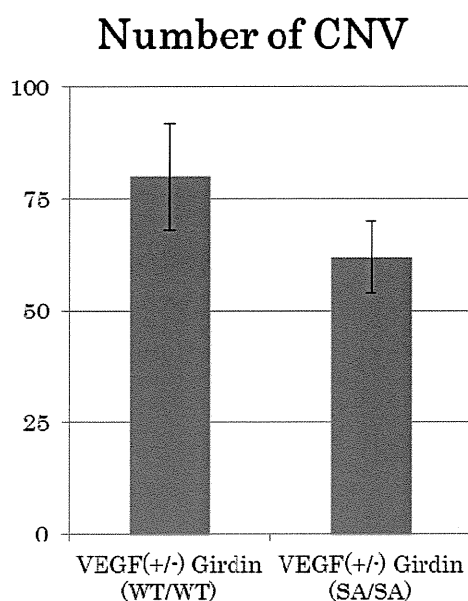


図1 GirdinS1416A/hVEGF マウスと hVEGF マウスにおける網膜下新生血管の比較

D. 考察

in vivo における実験においても、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. 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 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*, 2010, in press.
2. Weng L, et al:Girding for migratory cues: roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis. *Cancer Sci* 101: 836-842, 2010.
3. Enomoto A, et al : Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 63:774-787, 2009
4. Jiang P, et al:An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Res* 68:1310-1318, 2008.
5. Kitamura T, et al : Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol* 10:329-337, 2008.

6. 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: 169-184, 2006.

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

I. 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。

25. 極性を持つ分化培養網膜色素上皮細胞に対する

トロンビンの影響

寺崎寛人、白澤 誠、有村 昇、園田祥三、坂本泰二
(鹿児島大)

研究要旨 生体内の環境を反映している極性をもつ網膜色素上皮細胞(極性 RPE)を用いて、トロンビンの極性 RPE に対する影響を検討した。様々な条件下でトロンビン刺激を行い上皮側・基底側の培養液中血管内皮細胞因子(VEGF)濃度と、透過性の指標である経上皮電気抵抗値を測定した。VEGF は脈絡膜側に多く分泌され、トロンビンは VEGF 分泌促進作用をもつが、透過性には影響しなかった。一方で、極性の弱い幼若な RPE では、トロンビン刺激で透過性が亢進した。RPE が障害を受けていると網膜下出血後に脈絡膜新生血管が促進される理由の一つである可能性がある。

A. 研究目的

生理的条件下では網膜色素上皮(RPE)細胞は、上皮側より基底側への VEGF 分泌量が多い¹⁾。従来、RPE を用いた実験で、トロンビンの VEGF 分泌促進作用が報告されているが²⁾、上皮側のみの評価であり、生体を反映したものとは言えない。今回、極性を持つ分化 RPE 細胞の培養系を利用して、トロンビンの影響を検討した。

B. 研究方法

我々の過去の報告³⁾により、ブタ RPE 細胞を transwell 上で培養し、極性を持つ分化 RPE 細胞を作成した。様々な条件下でトロンビン刺激を行い、ELISA 法で上皮側・基底側の培養液中の VEGF 濃度を測定した。透過性は、Epithelial voltohmmeter (EVOM 社)で Transepithelial electric resistance (TER)を測定した。

C. 研究結果

極性をもたない未分化 RPE 細胞では VEGF 総分泌量は、トロンビン 4U/ml 刺激により、対照比で 2.3 倍増加した。分化 RPE 細胞では、トロンビン 1-20U/ml で 24 時間刺激をすると VEGF 分泌総量は、対照と比べ、濃度依存性に増加した(4U/ml 2.3 倍)。また時間依存性増加も見られた(24 時間刺激 2.34 倍)。上皮・基底側別の解析では、無刺激で基底側の VEGF 分泌が上皮側に比べ 2.5 倍多かった。トロンビン刺激で、VEGF 分泌は基底膜側でより増加した。一方、透過性は未分化 RPE 細胞では 20U/ml で対照比 10% 亢進した。一方、分化 RPE 細胞では、トロンビン 4-80U/ml 刺激による透過性亢進作用は認めなかった。

D. 考察

過去の報告では、RPE に対してトロンビンは VEGF の分泌促進作用と透過性亢進作用^{4, 5)}

が報告されている。しかしこれらの報告の多くは極性をもたない RPE を用いた実験系を用いた報告である。我々は、極性 RPE を用いて、より生体内の環境に近い条件でトロンビンの影響を検討した。

その結果、トロンビンは極性 RPE に対し、VEGF 分泌促進作用をもつが透過性には影響を与えないことがわかった。一方で、幼若な RPE においては、トロンビンは VEGF 分泌促進作用をもち、透過性を亢進させた。加齢黄斑変性など RPE が障害されていると網膜下出血後に脈絡膜血管新生が促進される理由の一つである可能性がある。

E. 結論

分化に関わらず RPE においては、VEGF は脈絡膜側により多く分泌され、トロンビンは VEGF 分泌促進効果をもつが透過性には影響しない。一方で、幼若な RPE においては、トロンビンは VEGF 分泌促進作用をもち、透過性を亢進させる。AMD など RPE が障害されていると網膜下出血後に脈絡膜血管新生が促進される理由の一つである可能性がある。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

1. Blaauwgeers HG, et al: Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris evidence for a trophic

paracrine relation. *Am J Pathol* 155:421-428, 1999.

2. Bian ZM, et al: Thrombin-induced VEGF expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2738-2746, 2007.

3. Sonoda S, et al: A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc* 4: 662-673, 2009.

4. Sakamoto T, et al: Intercellular gap formation induced by thrombin in confluent cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:720-729, 1994.

5. Ruiz-Loredo AY, et al: Thrombin promotes actin stress fiber formation in RPE through Rho/ROCK-mediated MLC phosphorylation. *J Cell Physiol* 226:414-423, 2011.

26. 極性を持つ分化網膜色素上皮細胞のバリア機能の解析

白澤 誠、寺崎寛人、有村 昇、園田祥三、坂本泰二
(鹿児島大)

研究要旨 網膜色素上皮 (RPE) によって構成される血液網膜関門およびその破壊は滲出型加齢黄斑変性や中心性漿液性網脈絡膜症、糖尿病黄斑症などの病態形成に重要な役割を担っている。今回、我々は極性を持つブタ RPE を用いてバリア機能の解析を行ったので報告する。

A. 研究目的

RPE によるバリアの維持と破壊は滲出型加齢黄斑変性 (AMD) や中心性漿液性網脈絡膜症 (CSC) などの病態形成に重要な働きをしている。従来、RPE 細胞機能解析は培養細胞を用いて行われてきたが、通常培養では、神経網膜側/脈絡膜側に異なる血管内皮増殖因子 (VEGF) を分泌するという生理的狀態を反映できないため、加齢黄斑変性における RPE 細胞の役割を十分に解析することが困難であった。今回、transwell 上培養により、生理的狀態に近い狀態に分化した RPE 細胞を用いて、バリア機能を解析した。

B. 研究方法

transwell 上培養で、分化ブタ RPE を得た。経上皮電気抵抗 (TER) が $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上・VEGF 極性分泌を確認済のものを分化 RPE 細胞とした。腫瘍壊死因子 ($\text{TNF-}\alpha$: 10 ng/ml) を上下チャンバーに添加、24 時間培養後に解析した。バリア機能の機能的評価には TER を、形態的評価には tight junction 蛋白 ZO-1 の解析を行った。また、TNF レセプターとの結合により活性化されるシグナル経路について p38MAPK, $\text{NF-}\kappa\text{B}$, JNK, caspase の各阻害薬を $\text{TNF-}\alpha$ 添加 1 時間前に加え、その影響を

調べた。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いにあたっては、ARVO の動物取扱いガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

分化 RPE は $\text{TNF-}\alpha$ 刺激により $17.5 \pm 2.7 \%$ の TER の低下を認めた。ZO-1 は、 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激により発現低下を認めた。シグナル伝達に関しては、p38MAPK 阻害薬 SB203580 を添加した場合のみ、 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激による TER の減少及び ZO-1 発現低下が抑制された。 $\text{NF-}\kappa\text{B}$, JNK, caspase 阻害薬では TER 減少は阻害できなかった。

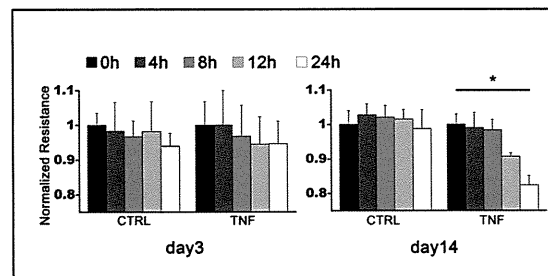


図 1: TNF 刺激による分化・未分化 RPE の TER 変化

D. 考察

$\text{TNF-}\alpha$ 刺激による RPE バリア機能障害は、体内の慢性炎症を主体とする黄斑疾患の病態と類似しており、AMD や CSC などの *in vitro*

モデルとなりうる可能性がある。

E. 結論

分化 RPE 細胞は TNF- α 刺激によりバリア機能障害が引き起こされ、p38MAPK pathway がその中心的な役割を持つ可能性がある。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- 1.Zech JC, Pouvreau I, Cotinet A, Goureau O, Le Varlet B, de Kozak Y:Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 39:1600-1608, 1998.
- 2.Wan L, Lin HJ, Tsai Y, et al:Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in age-related macular degeneration. Retina 30:1595-1600, 2010.
- 3.Shi G, Maminishkis A, Banzon T, et al: Control of chemokine gradients by the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 49:4620-4630, 2008.
- 4.Arakawa S, Takahashi A, Ashikawa K, et al: Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. Nat Genet 43:1001-1004, 2011.
- 5.An E, Gordish-Dressman H, Hathout Y: Effect of TNF-alpha on human ARPE-19-secreted proteins. Mol Vis 14 : 2292-2303, 2008.

27. iPS細胞由来網膜色素上皮細胞の免疫原性

鎌尾浩行¹⁾²⁾、万代道子¹⁾、桐生純一²⁾、高橋政代¹⁾

(¹⁾理化学研究所、²⁾川崎医大)

研究要旨 日本における中途失明原因の上位に位置する疾患のひとつに加齢黄斑変性がある。現在、臨床ではレーザー治療と抗 VEGF 治療が行われているが、いずれも脈絡膜新生血管を抑制する治療で、根本的な背景にある網膜色素上皮 (RPE) の機能低下に対する治療ではない。このため我々は RPE の機能低下に対する治療として、iPS 細胞由来 RPE 移植の研究を行っている。この iPS 細胞を用いる利点の一つに自家移植による拒絶反応の回避があるが、その点を検証すべく iPS-RPE の免疫原性について検討した。その結果、ヒト iPS-RPE はヒト RPE と同程度の主要組織適応抗原 (MHC) を発現していた。またサル iPS-RPE 移植実験では、他家移植は全て拒絶され、一方自家移植では明らかな拒絶反応は認められなかった。以上より、iPS-RPE 移植の臨床応用には自家移植が適していると考えた。

A. 研究目的

現在我々は、網膜色素上皮細胞 (RPE) の機能低下を一因とする加齢黄斑変性に対し、ヒト iPS 細胞由来 RPE (iPS-RPE) 移植の臨床応用にむけて検討を行っており、すでに移植片である iPS-RPE シートの作製とサルへの移植にまで成功している。iPS 細胞を用いる利点の一つに自家移植による拒絶反応の回避があるが、その点を検証すべく今回 iPS-RPE の細胞表面抗原である MHC の発現と、サル iPS-RPE を用いて自家移植と他家移植を行い、iPS-RPE の免疫原性について検討した。

B. 研究方法

ヒトとサルの iPS 細胞から我々の標準化プロトコールにより RPE 細胞を分化、培養した。

in vitro: ヒト iPS-RPE の MHC-I 及び MHC-II の発現をフローサイトメトリーにて解析し、インターフェロンガンマ (IFN- γ) 刺激による発現

の変化を調べた。

in vivo: サル iPS-RPE シートを作製し、これを他家 (3 匹) と自家 (1 匹) の網膜下に移植した。移植後の評価は、眼底写真、FA、OCT にて移植後 1 年まで行った。

(倫理面への配慮)

動物実験時には Association for Research in Vision and Ophthalmology の定めた動物実験のためのガイドラインを厳守し、動物愛護上の配慮を十分に行った。

C. 研究結果

in vitro: ヒト iPS-RPE は IFN- γ 刺激の有無に関わらず MHC-I を発現していた。一方、MHC-II は IFN- γ 刺激により発現を認めるようになった。

in vivo: サル iPS-RPE シート移植は、他科移植では全ての移植片に眼底の線維性瘢痕や FA での蛍光漏出、また OCT では網膜浮腫や網

膜下高輝度病変といった拒絶反応所見を認めた。一方、自家移植では術後 1 年まで経過観察したが拒絶反応を示唆する所見は認めなかった。

D. 考察

ヒト iPS-RPE が MHC-I や MHC-II を発現している事や、サル iPS-RPE 移植にて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。今後は自家 iPS-RPE 移植の安全性を確認するため、さらに自家移植による検討を行う予定である。

E. 結論

ヒト iPS-RPE の臨床応用には自家移植が適していると考えた。

F. 研究発表

1. 論文発表

鎌尾浩行、他:iPS 細胞を用いた網膜再生医療. 医学のあゆみ 239、14、1422-1426、2011.

2. 学会発表

1. 鎌尾浩行、他:サル iPS 細胞から網膜色素上皮細胞への分化誘導. 第 114 回日本眼科学会、名古屋、2010.

2. 鎌尾浩行、他:ES/iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の移植方法の検討. 第 11 回日本再生医療学会、東京、2011.

3. 鎌尾浩行、他:iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シートの作製. 第 115 回日本眼科学会、東京、2011.

4. Kamao H, et al:Preparation of iPS-derived RPE sheets for transplantation therapy. The Association for Research in Vision and

Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(申請中)(特願 2011-040130) 網膜色素上皮細胞シートの製造方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

28. 抗血管内皮増殖因子治療後に眼球癆に陥った

血管新生緑内障の2例

喜井裕哉、山下高明、田中 実、坂本泰二
(鹿児島大)

研究要旨 抗血管内皮増殖因子薬(抗 VEGF 薬)は、加齢黄斑変性(AMD)の治療に有用であり広く使用されているが、その他の疾患でも off-label で使用されている。VEGF は血管新生作用のみならず、神経栄養作用があるので、抗 VEGF 薬の長期大量使用により、有害作用を起こす可能性が指摘されているが、現在まで眼局所有害作用の報告は限られている。われわれは、血管新生緑内障(NVG)に対するベバシズマブ硝子体注射(IVB)後に眼球癆になった症例を報告する。

A. 研究目的

抗血管内皮増殖因子薬(抗 VEGF 薬)は、加齢黄斑変性(AMD)の治療に有用であり広く使用されているが、その他の疾患でも off-label で使用されている。

血管新生緑内障(NVG)も VEGF が主要な原因分子であると報告されており、治療に抗 VEGF 薬が使用されることが多い。

VEGF は血管新生作用のみならず、神経栄養作用があるので、抗 VEGF 薬の長期大量使用により、有害作用を起こす可能性が指摘されているが、現在まで眼局所有害作用の報告は限られている。

われわれは、NVG に対するベバシズマブ硝子体注射(IVB)後に眼球癆になった症例を報告する。

B～C. 症例

①66 歳男性

【既往歴】

高血圧症

27 歳～ 2 型糖尿病(腎症・末梢神経障害合

併)

高脂血症

【家族歴】

特記事項なし

【現病歴】

H20.2.6 当科初診

視力 右(0.2) 左(0.4)

眼圧右 52 左 27 [mmHg]

両)増殖糖尿病網膜症、血管新生緑内障の診断

2.7～ 汎網膜光凝固(PRP)追加したが右眼の眼圧は 40 台で推移

2.18 右)IVB

2.21 右) 経毛様体扁平部硝子体切除術 +毛様体レーザー(2 象限)

3.6 右眼圧は 16mmHg に下降

6.25 右眼圧 8mmHg

その後、右眼の眼圧は急速に下降し、

9.2 右眼は眼球癆になった

②33 歳男性

【既往歴】

23 歳～ 2 型糖尿病

【家族歴】

特記事項なし

【現病歴】

H221.18 当科初診

視力 右(0.3) 左(0.1)

眼圧 右 16 左 13 [mmHg]

両)増殖糖尿病網膜症、糖尿病黄斑症の診断

両眼に PRP を施行したが、約 1 年間放置

12.27 視力 右(0.1) 左光覚なし

眼圧 右 55 左 60 [mmHg]

両)NVG の診断

1.3 右)IVB

1.4 右) 経毛様体扁平部硝子体切除術 +毛様体レーザー(2 象限)

2.1 右)線維柱帯切除術

3.9 右眼圧 40mmHg→右)IVB

6.8 右眼圧 50mmHg→右)IVB

6.22 右眼圧 4mmHg

現在 右眼圧 2mmHg で眼球瘻になりつつある

この間、その他に硝子体手術 1 回、濾過胞再建 2 回を施行した

D. 考察

海外で AMD に対して実施された 3 つの比較対照試験 (MARINA 試験、ANCHOR 試験、PIER 試験)での副作用は、硝子体炎 5.3%、虹彩炎 4.6%、硝子体出血 1.7%などがあるが、眼球瘻の報告はない。

一方、大腸癌などに対するベバシズマブの全身投与では、消化管穿孔や出血、動脈塞栓症、蛋白尿などの合併症が報告されている。

当科では、血管新生緑内障に対し、網膜光凝

固、経毛様体扁平部硝子体切除術、毛様体光凝固、線維柱帯切除術を組み合わせた治療も行っている。2008 年 3 月から 2011 年 12 月までに当科で NVG に対して毛様体レーザー併用硝子体手術を施行したのは 22 眼だった(経過観察期間 3 か月以上)が、眼球瘻の合併症はなかった。

E. 結論

今回の 2 症例では、眼球瘻と IVB の因果関係は明らかではないが、IVB が眼球瘻の要因になった可能性がある。

長期コントロール不良眼や手術既往眼は、IVB の負荷に耐えられない可能性がある。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

1. Avery RL, Pieramici D, Rabena M, et al: Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 113:363-372, 2006.

2. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al: Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480-1487, 1994.

3. Avery RL: Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 26: 352-254, 2006.

4. Wakabayashi T, Oshima Y, Sakaguchi H, et

al : Intravitreal bevacizumab to treat iris neovascularization and neovascular glaucoma secondary to ischaemic retinal diseases in 41 consecutive cases. *Ophthalmology* 115 : 1571-1580, 2008.

5. Saito Y, Higashide T, Takeda H, Ohkubo S, Sugiyama K: Beneficial effects of preoperative intravitreal bevacizumab on trabeculectomy outcomes in neovascular glaucoma. *Acta Ophthalmol* 88:96-102, 2010.

6. Saif MW, Elfiky A, Salem RR : Gastrointestinal perforation due to Bevacizumab in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 14:1860-1869, 2007.

7. Badgwell BD, Camp ER, Feig B et al: Management of bevacizumab-associated bowel perforation: a case series and review of the literature. *Ann Oncol* 16:1-6, 2007.

8. Heinzerling JH, Huerta S: Bowel perforation from bevacizumab for the treatment of metastatic colon cancer: incidence, etiology, and management. *Curr Surg* 63 : 334-337, 2006.

29. Swept source OCT を用いた

強度近視眼における視神経周囲構造の観察

大野京子¹⁾、秋葉正博²⁾、森山無価¹⁾、島田典明¹⁾、石橋達朗³⁾

(¹⁾東京医歯大、²⁾(株)トプコン、³⁾九州大)

研究要旨 強度近視(屈折度 $<-8D$ 、または眼軸長 ≥ 26.5 mm)119名 198眼および正視(屈折度 $\pm 3D$)32名 32眼において、高侵達の swept source OCT(トプコン社製)を用いて強度近視眼の視神経周囲深部構造を観察した。その結果、強度近視眼の93.2%において、拡張した視神経周囲くも膜下腔が、眼球に近い方を基底部とした三角錐状の低反射領域として描出された。くも膜下腔内部には、arachnoid trabeculaeも明瞭に観察された。また、強度近視眼198眼中22眼では乳頭耳側のコーヌス内に pit 様の裂隙が見られた。うち1眼では、乳頭耳側の pit を介して硝子体腔とくも膜下腔が直接交通していた。すべての pit において pit 上の網膜神経線維走行の連続性は途絶しており、障害された神経線維走行に一致した視野欠損が認められた。一方、正視眼ではくも膜下腔は観察できず、pit もなかった。

強度近視眼では、このような乳頭周囲の構造変化が視神経障害発症に関与している可能性がある。

A. 研究目的

高侵達の swept source OCT を用いて、強度近視眼の視神経周囲くも膜下腔および乳頭周囲構造を観察する。

B. 研究方法

対象は強度近視(屈折度 $<-8D$ 、または眼軸長 ≥ 26.5 mm)119名 198眼および正視(屈折度 $\pm 3D$)32名 32眼である。これらに対し swept source OCT(トプコン社製)を用いて視神経周囲構造を観察した。強度近視群の平均年齢は 53.5 ± 11.9 歳、平均屈折度は -15.6 ± 3.7 D、平均眼軸長は 30.8 ± 2.0 mmであった。Swept source OCT 似て視神経乳頭を中心とした3D scan, radial scan, raster scan を施行した。

C. 研究結果

強度近視眼の93.2%において、くも膜下腔が眼球を基底部とした逆三角形に描出された(図1)。

一方、正視群ではくも膜下腔が観察された症例はなかった。くも膜下腔の境界を縁取る dura mater と pia mater、およびこれらと強膜の移行部も観察された。

くも膜下腔内部を縦横する arachnoid trabeculae が観察された。くも膜下腔と硝子体腔の平均距離は 252.4 ± 110.9 μm 、くも膜下腔上の最も薄い強膜厚は 190.6 ± 51.2 μm であった。

さらに22眼において乳頭耳側のコーヌス内(特にIX型ぶどう腫のridgeの内側の斜

面)に pit 様の裂隙を認めた。Pit 上の網膜神経線維は全例で途絶していた。22 眼中 1 眼ではコーヌス内 pit を介してくも膜下腔と硝子体腔が直接交通していた。

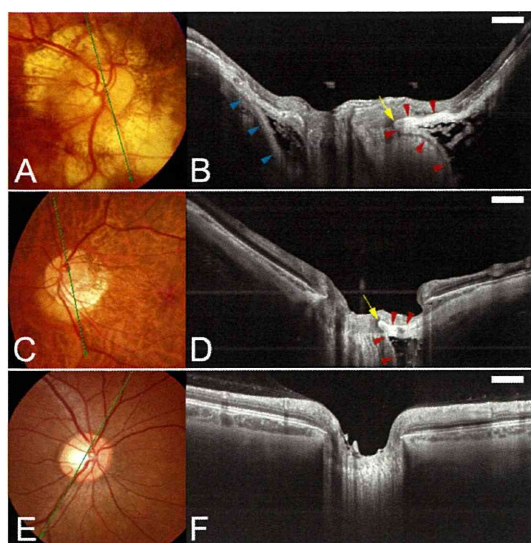


図 1. A~D; 強度近視眼。E~F; 正視眼。
強度近視眼では視神経周囲に低反射のくも膜下腔がみられる。
くも膜下腔内部を走行する arachnoid trabeculae も見える。
強膜の内層はそのままくも膜下腔周囲の軟膜に移行し(赤矢頭)、強膜の外層は硬膜に移行する(青矢頭)。
軟膜への移行部は視神経に食い込んだような形状になっている(黄矢印)。

D. 考察

強度近視眼では視神経乳頭周囲の機械的伸展や輪状コーヌスの形成により、くも膜下腔が眼球に近い部位で拡大し、くも膜下腔上の強膜が菲薄化することにより、眼内腔との距離が顕著に短くなり、ついにはくも膜下腔と硝子体腔が直接交通することがあると考えられた。IX 型ぶどう腫にみられる乳頭耳側の ridge 形成によりさらに乳頭耳側強膜の菲薄化が進行し、ついには後天的 pit を生じることが示された。

E. 結論

強度近視眼では視神経乳頭の機械的伸展に伴い、くも膜下腔の拡大や、後天的 pit 形成など様々な病態が生じており、これらが視野障害の一因である可能性がある。Swept source OCT は強度近視眼の視神経深部構造の観察に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohno-Matsui K, et al: Imaging retrobulbar subarachnoid space around optic nerve by swept-source optical coherence tomography in eyes with pathologic myopia. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:9644-9650, 2011.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし