

201231094A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

(3 年計画の 2 年目)

研究代表者 小 椋 祐 一 郎

平成 25(2013)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究
平成 24 年度 統括・分担研究報告書

(3 年計画の 2 年目)

研究代表者 小 椋 祐 一 郎

平成 25(2013)年 3 月

目 次

I. 班員構成	1
II. 統括研究報告	3
III. 分担研究報告	17
1. Leber 先天盲を含む常染色体劣性網膜色素変性のマイクロアレイを用いた遺伝子解析	17
藤巻拓郎 ¹⁾ 、宮崎 愛 ¹⁾ 、藤木慶子 ¹⁾ 、新井英介 ¹⁾²⁾ 、近藤峰生 ³⁾ 岩田文乃 ⁴⁾ 、村上 晶 ¹⁾ (1)順天大、2)東京都立小児総合医療センター、3)三重大 4)旗の台駅東口いわた眼科)	
2. 多施設からの網膜変性疾患試料収集および遺伝子診断システムの構築	20
石上智愛 ¹⁾ 、和田裕子 ³⁾ 、高橋一朗 ⁴⁾ 、増井 徹 ⁴⁾ 岩田 岳 ⁵⁾ 、万代道子 ¹⁾²⁾ 、高橋政代 ¹⁾²⁾⁶⁾ (1)理化学研究所、2)神戸市立医療センター中央市民病院、3)わだゆうこ眼科クリニック 4)医薬基盤研究所、5)東京医療センター臨床研究センター、6)先端医療センター病院)	
3. 網膜色素変性に対する 9-ス-βロチン高含有サプリメント摂取の影響の検討	22
加藤亜紀 ¹⁾ 、安川 力 ¹⁾ 、萩原 章 ²⁾ 、藤巻拓郎 ³⁾ 、村上 晶 ³⁾ 、山本修一 ²⁾ 小椋祐一郎 ¹⁾ (1)名古屋市大、2)千葉大、3)順天大)	
4. 網膜色素変性に対する UF-021 投与終了 2 年後の視機能変化	25
中村洋介、萩原 章、熊谷 健、山本修一(千葉大)	
5. 腫瘍随伴網膜症における ON 型双極細胞に対する自己抗体の作用機序	27
上野真治、西口康二、寺崎浩子(名古屋大)	
6. 視神経脊髄炎に対する抗インターロイキン 6 受容体抗体療法	29
荒木 学 ¹⁾ 、荒浪利昌 ²⁾ 、松岡貴子 ²⁾ 、中村雅一 ²⁾ 、三宅幸子 ²⁾ 、山村 隆 ²⁾ (1)国立精神・神経医療研究センター病院神経内科、2)国立精神・神経医療研究センター)	

15. Swept-source OCT を用いた強度近視眼における強膜形状の解析 51
大野京子¹⁾、森山無価¹⁾、石橋達朗²⁾、森田育男³⁾
(¹⁾東京医歯大、²⁾九州大、³⁾東京医歯大・分子細胞機能)
16. 高齢者の黄斑部錐体細胞配列についての検討 53
小畑 亮、譚 雪、呉 香代、柳 靖雄(東京大)
17. 加齢黄斑変性診断基準による前駆病変を認める症例の眼底所見の変化 57
永井由巳、有澤章子、高橋寛二(関西医大)
18. 実用視力測定法を用いた加齢黄斑変性患者の視機能 60
岡本芳史、星 崇人、岡本史樹、平岡孝浩、大鹿哲郎(筑波大)
19. 加齢黄斑変性に起因する網膜下出血に対するガス血腫移動術の成績 63
松村永和、大島佑介、鈴木三保子、坂口裕和、沢 美喜
瓶井資弘、西田幸二(大阪大)
20. 近視性網膜下出血の光干渉断層計所見と予後との関連 65
生野恭司、浅井智子、西田幸二(大阪大)
21. Semaphorin3E/PlexinD1 シグナル経路による脈絡膜新生血管形成の抑制効果 67
須田謙史、郭 从容、大石明生、池田真也、吉村長久(京大)
22. CCR2 阻害剤による脈絡膜新生血管発生抑制と退縮効果 69
瓶井資弘、鈴木三保子、松村永和、崎元 晋、坂口裕和、西田幸二(大阪大)
23. ラットにおけるアスタキサンチンの網膜光傷害抑制効果 73
山本篤志、湯澤美都子(日本大)
24. 極性をもつ網膜色素上皮細胞における TNF- α の VEGF 分泌抑制作用 76
寺崎寛人、白澤 誠、大塚寛樹、園田祥三、坂本泰二(鹿児島大)

25. siRNA は TLR3/ IRF3 を介して網膜変性を誘導する……………78
兼子裕規¹⁾、平野佳男¹⁾、近藤峰生³⁾、寺崎浩子¹⁾、Jayakrishna Ambati⁴⁾
(¹⁾名古屋大、²⁾名古屋市大、³⁾三重大、⁴⁾ケンタッキー大)
26. 中心窩下脈絡膜新生血管に対する強膜短縮による黄斑移動術の長期経過……………80
岩瀬 剛、石川浩平、大島久明、植谷留佳、大岩和博、牛田宏明、寺崎浩子
(名古屋大)
27. 照射困難な病変に対する光線力学的療法(アイロニング PDT)の長期成績……………83
尾辻 剛、正健一郎、津村晶子、小池直子、津田メイ、西村哲哉、高橋寛二
(関西医大)
28. 視力良好なポリープ状脈絡膜血管症に対するラニビズマブ硝子体内投与 2 年の効果…86
森隆三郎、湯澤美都子、春山美穂、田中公二(日本大)
29. 滲出型加齢黄斑変性に対するラニビズマブ治療の治療反応の検討……………89
大島裕司、塩瀬聡美、安田美穂、吉田綾子、狩野久美子
石川桂二郎、納富昭司、吉田茂生、石橋達朗(九州大)
30. ポリープ状脈絡膜血管症における脈絡膜血管透過性亢進とラニビズマブへの反応性…93
園田祥三、有村 昇、大塚寛樹、吉永就正、喜井裕哉、大久保明子、坂本泰二
(鹿児島大)
31. 加齢黄斑変性に対するラニビズマブ治療におけるタキフィラキシー例の検討……………95
小池直子、尾辻 剛、正健一郎、津村晶子、津田メイ、西村哲哉、高橋寛二
(関西医大)
32. ポリープ状脈絡膜血管症の臨床所見と病理所見の関係……………98
中静裕之、湯澤美都子、川村昭之、森隆三郎(日本大)

33. ポリープ状脈絡膜血管症における治療後の地図状萎縮102
 山下彩奈、白神千恵子、藤原篤之、白潟ゆかり、小野 葵、泉端佐枝子
 真鍋紗季、白神史雄(香川大)
34. 網膜血管腫状増殖における治療後の地図状萎縮105
 白潟ゆかり、白神千恵子、山下彩奈、小野 葵、藤原篤之、白神史雄(香川大)
35. 加齢黄斑変性および正常対象眼における後部硝子体剥離と各種サイトカイン濃度の関連
108
 高橋秀徳¹⁾、譚 雪²⁾、野村陽子²⁾、藤村茂人²⁾、湯田健太郎²⁾、入山 彩²⁾、藤野雄次郎³⁾
 大久保裕子¹⁾、佐藤 彩¹⁾、竹澤美貴子¹⁾、川島秀俊¹⁾、柳 靖雄²⁾
 (1)自治医大、2)東京大、3)東京厚生年金病院)
36. 前房水における VEGF_{165b} 濃度の測定111
 馬場隆之、Guzel Bikbova、北橋正康、横内裕敬、櫻井まどか
 窪田真理子、山本修一(千葉大)
37. iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シートの移植用ハンドピースの開発と移植方法の検討
113
 鎌尾浩行¹⁾²⁾、三田 修²⁾、原田宜久³⁾、桐生純一²⁾、高橋政代¹⁾
 (1)理化学研究所、2)川崎医大、3)株式会社ニデック)
38. In vitro におけるレチノールの網膜色素上皮細胞に対する作用115
 譚 雪、高橋秀徳、入山 彩、湯田健太郎、野村陽子、井上達也
 小畑 亮、柳 靖雄(東京大)
39. 極性・非極性網膜色素上皮細胞の細胞間接着装置・細胞骨格についての検討118
 白澤 誠、寺崎寛人、川野浩輝、大塚寛樹、園田祥三、坂本泰二(鹿児島大)
40. 網膜虚血再灌流障害による網膜アンジオテンシノーゲンの増加とアリスキレンの神経保護
 効果120
 廣岡一行、天雲香里、新田恵里、藤田智純、白神史雄(香川大)

41.	白色 LED 全視野光刺激装置を使用したゼブラフィッシュ網膜電図の記録	122
	松原 央 ¹⁾ 、田中利男 ²⁾ 、西村有平 ²⁾ 、山本哲朗 ³⁾ 、近藤峰生 ¹⁾	
	(¹⁾ 三重大、 ²⁾ 三重大・薬理ゲノミクス、 ³⁾ 三重大・システム神経科)	
42.	超広角走査型レーザー検眼鏡による網膜色素変性症の眼底自発蛍光所見	125
	小椋俊太郎、安川 力、吉田宗徳、小椋祐一郎(名古屋市大)	
43.	網膜色素変性患者における黄斑部網脈絡膜血流量と中心視機能との関連	127
	村上祐介、池田康博、秋山雅人、吉田倫子、鍋島崇寛、納富昭司	
	久富智朗、江内田寛、石橋達朗(九州大)	
44.	マイクロアレイを用いた網膜変性疾患の網羅的遺伝子スクリーニング	130
	荻野 颯、大石明生、牧山由希子、中川聡子、栗本雅史	
	大谷篤史、吉村長久(京都大)	
45.	家族性滲出性硝子体網膜症とNorrie 病における遺伝子解析と臨床像	133
	新井英介 ¹⁾²⁾ 、藤巻拓郎 ¹⁾ 、宮崎 愛 ¹⁾ 、藤木慶子 ¹⁾ 、岩田文乃 ³⁾ 、村上 晶 ¹⁾	
	(¹⁾ 順天大、 ²⁾ 東京都立小児総合医療センター、 ³⁾ 旗の台駅東口いわた眼科)	
46.	3D MRI と swept-source OCT による傾斜乳頭症候群の視神経と眼球形状の解析	136
	篠原宏成、森山無価、大野京子(東京医歯大)	
IV.	関連業績一覧	139

I . 班 員 構 成

網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究班

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	小椋 祐一郎	名古屋市立大学医学部眼科	教授
研究分担者	石橋 達朗	九州大学医学部眼科	教授
	稲谷 大	福井大学医学部眼科	教授
	大鹿 哲郎	筑波大学医学部眼科	教授
	坂本 泰二	鹿児島大学医学部眼科	教授
	白神 史雄	香川大学医学部眼科	教授
	高橋 寛二	関西医科大学眼科	教授
	高橋 政代	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター	チームリーダー
	寺崎 浩子	名古屋大学医学部眼科	教授
	西田 幸二	大阪大学医学部眼科	教授
	村上 晶	順天堂大学医学部眼科	教授
	安川 力	名古屋市立大学医学部眼科	准教授
	山本 修一	千葉大学医学部眼科	教授
	湯沢 美都子	日本大学医学部眼科	教授
吉村 長久	京都大学医学部眼科	教授	
研究協力者	飯田 知弘	東京女子医科大学眼科	教授
	大野 京子	東京医科歯科大学医学部眼科	准教授
	近藤 峰生	三重大学医学部眼科	教授
	柳 靖雄	東京大学医学部眼科	講師
	山村 隆	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 免疫研究部	部長
事務局	安川 力	名古屋市立大学医学部眼科 〒467-8601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1番地 TEL 052-853-8251 FAX 052-841-9490 e-mail retina@med.nagoya-cu.ac.jp	准教授
経理事務担当者	渡邊 麗	名古屋市立大学医学部事務室 TEL 052-853-8078 FAX 052-842-0863 e-mail watanabe-urara@sec.nagoya-cu.ac.jp	

Ⅱ. 統括研究報告

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

総括研究報告

網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究

研究代表者 小椋祐一郎

名古屋市立大学大学院医学研究科視覚科学 教授

【研究要旨】

本研究は、難治性・進行性で視力予後不良な疾患である加齢黄斑変性、網膜色素変性などの網膜脈絡膜萎縮をきたす疾患群と視神経萎縮をきたす疾患群を対象としてその実態調査、病態解明、治療法開発を目的とする。これらの疾患は本邦での主要な失明原因であり、研究成果は失明予防に直結し、国民医療・保健に与える影響が極めて大きい。

加齢黄斑変性:先進国の成人失明の主要原因であり我が国でも増加している加齢黄斑変性の現在の標準治療である抗血管内皮増殖因子療法や光線力学的療法の治療効果の評価結果を集約し、本研究班内の加齢黄斑変性治療指針作成ワーキンググループで治療指針を作成した。これに基づき治療を行うことで、治療レベルの標準化、向上が期待できる。また、今後の新規治療法などの評価の基準となる。各研究機関において、加齢黄斑変性の病態解明に向けて、基礎研究が行われている。遺伝子解析に基づくテーラーメイド医療を目指して患者の血液サンプルを収集している。iPS細胞由来の網膜色素上皮細胞シート移植に関しては、基礎実験が十分に行われ、現在、臨床試験のための倫理審査委員会の承認を得る段階である。

網膜色素変性:多施設で得た患者検体を1施設へ集約・解析するシステムを構築中である。遺伝子治療の臨床研究実施計画について厚生科学審議会承認され、臨床試験の準備中である。

視神経萎縮や網膜変性:蛍光標識神経栄養因子やミトコンドリアを持つマウスを用いて、網膜神経節細胞の軸索輸送のライブイメージ観察が可能となった。ES細胞及びiPS細胞から網膜色素上皮細胞や網膜神経組織への再生の方法が確立しつつあり、移植実験においては、組織学的、電気生理学的評価、行動解析装置による移植組織の機能評価を進めている。人工視覚の実験も進行中である。

【分担研究者】

石橋達朗（九州大学・眼科・教授）

大鹿哲郎（筑波大学・眼科・教授）

白神史雄（香川大学・眼科・教授）

高橋政代（理化学研究所・チームリーダー）

西田幸二（大阪大学・眼科・教授）

安川 力（名古屋市立大学・眼科・准教授）

湯沢美都子（日本大学・眼科・教授）

稲谷 大（福井大学・眼科・教授）

坂本泰二（鹿児島大学・眼科・教授）

高橋寛二（関西医科大学・眼科・教授）

寺崎浩子（名古屋大学・眼科・教授）

村上 晶（順天大学・眼科・教授）

山本修一（千葉大学・眼科・教授）

吉村長久（京都大学・眼科・教授）

A. 研究目的

1. 視覚障害者調査

視覚障害認定者数を調査し、我が国の視覚障害の原因、実態を明らかにし、視覚障害の対策をたてる。

2. 滲出型加齢黄斑変性治療臨床研究

滲出型加齢黄斑変性や近視性脈絡膜新生血管の治療法として抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 療法、光線力学的療法 (photodynamic therapy: PDT) の単独および併用した場合の治療効果や正常網脈絡膜組織への影響、長期の視力予後を病型別に検討した。

3. 加齢黄斑変性基礎研究

生化学的手法および動物実験等により加齢黄斑変性や遺伝性網脈絡膜変性疾患の病態や網膜生理機能を探索する。

4. 網膜色素変性遺伝解析

Leber 先天盲を含む常染色体劣性網膜色素変性の各原因遺伝子について、日本人における変異の種類と頻度の概要を明らかにする。

5. 遺伝診断ネットワーク

近年の遺伝子解析研究や次世代シーケンサーなどの解析法の発展により、網膜色素変性における遺伝子変異の検出率は飛躍的に上昇している。多施設における遺伝子診断研究をサポートする難病バンク試料収集システムを構築した。

6. 網膜色素変性臨床試験

網膜色素変性において 0.15%ウノプロストン点眼 (UF-021) が用量依存性に網膜中心部感度を改善することを以前に報告したが、今回、UF-021 投与終了 2 年後の視機能変化を報告した。

7. 視神経脊髄炎に対する分子標的治療

視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica, NMO) は、視力低下や視野欠損、感覚・運動障害などの症状が、再発と寛解を繰り返す慢性炎症性中枢神経疾患である。以前は多発性硬化症 (MS) の一病型とも考えられていたが、患者末梢血中の自己抗体 (抗アクアポリン 4 抗体、抗 AQP4 抗体) が発見されて以来、MS とは異なる自己免疫病態であると考えられている。我々は NMO 末梢血において、MS や健常者と比較して、未熟形質細胞 (プラズマブラスト、PB) が有意に増加しており、末梢血中の主要な抗 AQP4 抗体産生細胞であること、さらにインターロイキン 6 (IL-6) が PB の生存を促進することを報告した (*PNAS*, 2011)。難治性 NMO 患者における抗 IL-6 受容体抗体 (トシリズマブ) 療法の効果を検討した。

8. 強度近視眼球形状解析

強度近視では眼軸延長や後部ぶどう腫形成といった眼球形状異常をきたすことが知られている。高深達の新しい光干渉断層計 (Swept-source optical coherence tomography: SS-OCT) を用いて強度近視眼の強膜形状と厚さを解析し、強膜形状と近視性眼底病変との相関を明らかにした。

9. 神経機能イメージング

緑内障性視神経症では眼圧ストレスによる篩状板での網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) 軸索の絞扼が軸索輸送障害を生じ細胞死を引き起こす。ほ乳類では唯一、神経細胞ミトコンドリア特異的に CFP を発現するミトマウスの末梢神経 *in vivo* イメージングが報告された (Nat Methods, 2007)。本研究目的は、緑内障モデルマウスと加齢マウスにおける、RGC のミトコンドリア軸索輸送変化を *in vivo* イメージングで評価し、ミトコンドリア軸索輸送と緑内障、加齢の関係を明らかにすることである。

10. iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シート移植

臨床研究を目指しているヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) 細胞シート (hiPS-RPE シート) は、現在の手術器具では移植することができないため、網膜下移植器具を開発する必要がある。臨床応用を前提とした介助者を必要としない移植器具を開発し、これを用いた手術手技に関する検討を行った。

11. 網膜移植

ホスト網膜の視細胞層構造が保たれていれば、視細胞前駆細胞を移植すると生着、機能することが報告されている。しかし、実際の生体においては、外層構造が保たれていながら機能のみ障害されている症例は稀であり、特に移植治療の応用については視細胞層がすでに失われているような進行例/部位が初期臨床

応用の対象と考えられる。永楽らは胚性幹細胞 (ES 細胞) から網膜組織を立体的に分化誘導出来ることを報告した。この分化方法により、分化網膜細胞/組織の純化及び移植に必要な細胞数の確保が現実的なものとなった。そこで我々は異なる ES 及び iPS 細胞株を用い、これらが再現性をもって網膜組織様に分化するか、またこれらを移植すると末期の変性網膜下においても生着し成熟するか、またその生着状態および機能について検討した。

B. 研究方法

1. 視覚障害者調査

全国を 7 ブロックに分け、1 ブロックから 1 県あるいは 1 都市の自治体が無作為に抽出した。これらの自治体において、平成 19~21 年の 3 年間に身体障害者診断書・意見書に基づいて新規に視覚障害認定を受けた 18 歳以上の視覚障害者 4852 名について調査した。

2. 滲出型加齢黄斑変性治療臨床研究

術前視力が 0.6-1.0 と比較的良好的な、ポリープ状脈絡膜血管症 (Polypoidal choroidal vasculopathy: PCV) 45 例 45 眼 (男性 36 例 女性 9 例 平均年齢 66.5 歳) に、導入期は 1 か月に 1 回計 3 回のラニビズマブ硝子体内注射 (intravitreal ranibizumab: IVR) (0.5mg/0.05mL) を施行し、維持期は、1 か月毎の診察で再治療の適応所見を認めれば IVR を施行した。

滲出型加齢黄斑変性の視力予後に関わる因子を検討するため、IVR を 1 ヶ月ごと連続 3 回の投与を行い、初回投与後 1 年以上経過観察

できた滲出型加齢黄斑変性およびその特殊型 337 眼(男性 214 例、女性 123 例)(典型加齢黄斑変性 183 眼、PCV141 眼(PCV)、網膜血管腫状増殖(retinal angiomatous proliferation: RAP) 13 眼を対象に、初回投与時をベースラインとして、治療導入期終了時に視力改善が得られた症例のうち、1 年後に 0.1logMAR 以上の視力低下が認められた群を改善・維持不可群、それ以外を改善・維持群、導入期終了時に視力改善が得られなかった群を非改善群と分類し、治療への反応と性別、年齢、病型、糖尿病、高血圧の有無、喫煙歴、GLD、CNV サイズ、治療前視力、中心窩網膜厚、投与回数などの因子との関連を調査した。

滲出型加齢黄斑変性に対し IVR1 か月ごと連続 3 回投与(導入期治療)を終え、その後 1 年以上経過観察できた 141 例 142 眼を対象とし、導入期には一定の効果があるが、治療の反復により効果が減弱する症例(いわゆるタキフィラキシー例)がある。これらの症例について後ろ向きに検討した。

治療後、滲出が消失し、1 年以上経過観察できた PCV37 例 40 眼と RAP34 例 41 眼を対象に、眼底所見と HRA2 の眼底自発蛍光所見から地図状萎縮(geographic atrophy: GA)を検出し、RegionFinder を用いて GA 面積を測定した。

3. 加齢黄斑変性基礎研究

C57/BL6 マウスを用いて、レーザー脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization: CNV)モデルを作製した。レーザー照射後に眼球の凍結切片を作成し免疫染色にて CNV 中の

PlexinD1 の局在を観察した。レーザー照射後 1、3、5、7 日目に網膜色素上皮/脈絡膜複合体を採取、mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて Semaphorin3E、PlexinD1 の経時的変化を計測した。またレーザー直後に Semaphorin3E 0.1 μ g または VEGFR Fc 2 μ g または BSA 0.1 μ g を硝子体中に投与し、7 日後にフラットマウント法を用いて CNV サイズを 3 群間で比較した。

C57BL/6 マウスを用い、レーザー照射による CNV モデルを作成した。レーザー誘導 CNV に対して、レーザー照射直後に Ccr2 アンタゴニストである INCB3344 (1.8 μ M)をマウス硝子体腔に注入した(Day 0)。Day 3 の時点で、マクロファージの浸潤を免疫染色と FACS で評価し、VEGF の発現を ELISA と qPCR で定量した。Day 14 に CNV 面積を RPE-choroid フラットマウントで評価した。次に、長期光照射により CNV を誘導した SOD1^{-/-}マウスの硝子体内に INCB3344 を投与し、2 週間後に蛍光眼底造影を用いて CNV のサイズを測定し、投与前と比較した。

ブタ RPE 細胞を transwell 上で培養し、極性 RPE 細胞を作成した。一方では、通常の 12 穴培養皿で培養し非極性 RPE を作成した。TNF- α (10ng/ml)で刺激を行い、ELISA 法で培養液中の VEGF 濃度を測定した。

4. 網膜色素変性遺伝解析

患者血液からゲノム DNA を抽出し、LCA 原因遺伝子 16 種、*AIPL1*、*CABP4*、*CEP290*、*CRB1*、*GUCY2D*、*IQCB1*、*KCNJ13*、*LCA5*、*LRAT*、*NMNAT1*、*RD3*、*RDH12*、*RPE65*、

RPGRIP1, *SPATA7*, *TULP1*, *ARRP* 原因遺伝子 17 種、*ABCA4*, *ADAM9*, *CNGA1*, *CNGA3*, *CNGB1*, *CNGB3*, *DHDDS*, *EYS*, *FAM161A*, *IMPG2*, *MERTK*, *PDE6A*, *PDE6B*, *PDE6C*, *PDE6G*, *PRCD*, *RLBP1*, 計 33 種のエクソン領域を、PCR 法にて増幅し、翻訳領域 (509 配列、84389 塩基) をマイクロアレイにて塩基配列を決定した。Single nucleotide variants: SNV の機能予測ソフトウェア PolyPhen-2 と SIFT、および dbSNP のデータベースと照合し、多型あるいは変異を調査した。

5. 遺伝診断ネットワーク

難病研究資源バンク(医薬基盤研究所)に、日本全国の医療機関から患者試料を収集、バンク化するシステムを構築し、2012年10月より運用を開始した。また、Orphan Net Japan (ONJ) に10の遺伝子検査を登録し、2012年9月より受託遺伝子解析サービスを開始した。

6. 網膜色素変性臨床試験

対象は、24 週間の UF-021 治験を行い、その後も経過観察可能であった網膜色素変性患者 22 名 22 眼である。治験では無作為二重盲検により、1 回 2 滴点眼の高濃度群(H)6 眼、1 回 1 滴点眼の低濃度群(L)8 眼、プラセボ群(P)8 眼に割り付けられていた。治験終了後は全例で投薬は中止されている。治験開始時と治験終了 120 週後の静的視野計 (Humphrey Field Analyzer: HFA)10-2 の中心 4 点平均網膜感度と mean deviation (MD) 値および矯正視力について検討した。

7. 視神経脊髄炎に対する分子標的治療

対象は、抗 AQP4 抗体陽性であり、通常の NMO 治療に抵抗性の難治性 NMO 患者 1 名。関節リウマチにおける投与法に従い、8mg/kg 体重のトシリズマブを 4 週毎に 6 ヶ月間静脈内投与した。投与開始前および各回投与前に神経学的診察及び採血を行った。末梢血より単核球細胞(PBMC)を分離し、フローサイトメトリーにより、末梢血中の PB の割合、および血清中の抗 AQP4 抗体価を測定した。

8. 強度近視眼球形状解析

強度近視患者に SS-OCT を施行して強膜を観察した。OCT は中心窩を中心とした 12 mm の長さの radial scan を施行した。近視性眼底病変は、近視性牽引黄斑症、近視性脈絡膜新生血管、近視性網膜脈絡膜萎縮、近視性視神経症を対象とした。

9. 神経機能イメージング

神経細胞特異的に CFP 蛍光標識されたミトコンドリアを有するマウス(ミトマウス)の RGD を 2 光子顕微鏡を用いて観察した。RGC のミトコンドリア軸索輸送をタイムラプス法で動画撮影した。緑内障モデルとして、4 ヶ月齢マウスの上強膜静脈をレーザー照射し眼圧を上昇させた。

10. iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シート移植

手術器具は留置針外筒、1mm シリンジとこれに着脱可能なハンドピースで構成され、留置針外筒の先端部分を、網膜下鑷子と同程度の

角度で扁平形状に加工した。手術手技の検討は、12羽のウサギに1.3mm×3.0mmのhiPS-RPEシートを網膜下移植した。移植の評価は、術直後の移植片の①損傷・fold、②表側・裏側、③移植位置(center・near・far)、④長軸の方向(前方・後方・右方・左方)と、術2週後の移植片の収縮・foldを眼底写真にて評価した。また8羽のウサギに、移植片の保存液を粘弾性物質濃度50%としたhiPS-RPEシートを網膜下移植し同様の評価を行った。

11. 網膜移植

RX-GFP ES ノックイン細胞およびNr1-GFPトランスジェニックマウス由来iPS細胞から、立体分化培養により網膜組織を誘導できるか検討した。これらの分化組織を分化14日から17日で細切し、生後4週令から8週令のrd1マウスに移植し、1ヶ月および半年後に免疫組織学的に観察した。また、後期変性網膜(8週令)に分化15日目のシート移植を行った網膜を2ヶ月後にとりだし、多電極アレイ解析を試みた。

(倫理面への配慮)

臨床研究においては参加者のプライバシー保護のため、個人を識別する生命、生月日、現住所など個人特定につながる情報が一切マスクされるように配慮した。

遺伝子解析・診断を行う場合は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・経済産業省告示第1号)を遵守した。対象者に対する不利益・危険性を除去し、インフォームドコンセントを得た上で

検体を採取し、結果に関しては本人の知る権利および知らない権利を尊重した。個人のプライバシーは厳守するとともに、本人の自主性を尊重し、治験の途中であっても本人の申し出により中止の希望があればそれ以上の継続はしないこととした。また細胞移植による治療に関しては当該施設における倫理委員会の許可のものを行った。

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

C. 研究結果

1. 視覚障害者調査

視覚障害の原因の第1位は緑内障21.0%であった。2位は糖尿病網膜症15.6%、3位は網膜色素変性12.0%、4位は黄斑変性9.5%、5位は網膜・脈絡膜萎縮8.4%であった。

2. 滲出型加齢黄斑変性治療臨床研究

視力良好なPCVに対するラニズマブ硝子体内注射(IVR)の成績は、平均視力は治療前logMAR 0.11、1年0.07($p < 0.01$)、2年0.11($p = 0.22$)で、2年では治療前と差がなくなった。視力の推移は改善1眼(2%)、不変39眼(87%)、悪化5眼(11%)であった。中心窩網膜厚は治療前273 μm 、1年187($p < 0.01$)、2年196 μm ($p < 0.01$)で有意に改善した。平均再治療回数は、3-11か月1.6回(0-6回)、12-23か月1.2回(0-5回)であった。

病型別に治療前背景を比較すると平均年齢は、滲出型加齢黄斑変性:74.7歳、PCV:72.7

歳、RAP:80.3歳とRAP群が他群より有意に高かった(P=0.034)。治療前平均小数視力は、滲出型加齢黄斑変性:0.35、PCV:0.46、RAP:0.23とPCV群が一番良好であった(P=0.0006)。1年後の視力変化は全症例で改善80眼(23.7%)、不変214眼(63.5%)、悪化43眼(12.8%)であった。改善・維持群は140眼(42%)、改善・維持不可群は80眼(24%)、非改善群は117眼(35%)であった。治療前5400 μm 以上の群に比して治療前GLDが1800~3500 μm と1800 μm の群が有意に予後良好であった。

タキフィラキシー例は全142眼中4.2%にあたる6例6眼にみられた。平均年齢は74歳であった。治療前の病変サイズは平均4584.8 μm であり他の症例と比較して有意差はなかった。病型は全例典型加齢黄斑変性で、病変タイプはoccult with no classic CNVが4眼、predominantly classic CNVが2眼であり他の症例と有意差はなかった。タキフィラキシー発症までの平均IVR回数は6.5回であった。

治療開始1年でのGA発生率はPCV、RAPでそれぞれ、57.5%、75.6%で、最終観察時点では、65.0%、89.3%であった。GAの発症部位はPCVでは異常血管網・ポリープ状病巣に一致しており、特に造影で漏出が強い部分より出現する傾向が見られた。RAPでは高率に中心窩を含んでいた。平均GA面積はPCVでは、治療後1年で3.79 mm^2 、最終観察時で5.31 mm^2 であった。RAPでは、1.51 mm^2 /年のGA拡大率を認めた。

3. 加齢黄斑変性基礎研究

免疫染色した凍結切片にて、CNVの辺縁部にPlexinD1の存在を確認した。PlexinD1の発現はレーザー照射後5日目から1.72倍と有意に上昇していた。一方Semaphorin3Eの発現量はレーザー照射後5日目に0.38倍と有意に減少していた。フラットマウントでのCNVの面積はBSA投与群では16320.9 \pm 8316.0 μm^2 、Semaphorin3E投与群では9487.4 \pm 4424.1 μm^2 とCNV形成はSemaphorin3Eによって有意に抑制された(n=6-9眼、p<0.01)。またVEGFR Fc投与群は8091.6 \pm 3947.6 μm^2 とSemaphorin3E投与群と有意差を認めなかった(n=5-9眼、p=0.31)。

INCB3344投与によりレーザー照射部位へのマクロファージ浸潤は有意に抑えられ(p<0.001)、VEGFは組織中の蛋白量とマクロファージ中のmRNA発現が有意に抑制されていた(各々p=0.012、p<0.001)。平均CNV面積はINCB3344投与眼で対象眼に比べ42.4%抑制されていた(p<0.001)。長期光照射誘導CNVにおけるCNVサイズは、溶媒投与の対照群では変化なかった(102%)が、INCB3344投与では70.4%INCB3344投与群では有意な縮小(70.4%、p<0.001)が認められた。

極性RPEは、非極性RPE細胞に比べ、約3倍のVEGFを分泌した。TNF- α (10ng/ml)は非極性RPEのVEGF分泌を約2倍に増加させ、極性RPEではVEGFの分泌を約40%減少させた。今回のTNF- α が与えた影響が細胞死によるものかを調べるために、様々な濃度のTNF- α で極性RPE細胞を刺激し、TUNEL染色とMTT assayを行った。その結果、TNF- α 10ng/mlでは、細胞死が見られず、今回の

結果が細胞死によるものではないことがわかった。半定量 PCR も行ったが、ELISA 法による VEGF 分泌の結果と同様の結果を認めた。

4. 網膜色素変性遺伝解析

105 例中 12 例に病因となり得る変異を認めた。

5. 遺伝診断ネットワーク

構築したシステムのもと、病院、難病バンク、理研間で問題なく試料(血液、ゲノムDNA)と情報のやり取りが行われた。検査会社SRLが抽出したゲノムDNAの半分は難病バンクの試料データベースに登録された。理研は残りの半分のゲノムDNAを用いて網羅的遺伝子解析を行った。

6. 網膜色素変性臨床試験

治験開始時に対する治験終了 120 週後の中心網膜感度の平均変化値(dB)は、H 群 1.03 ± 2.34 、L 群 -1.30 ± 2.08 、P 群 -0.78 ± 1.74 であり、MD 値の変化は、H 群 -0.36 ± 1.67 、L 群 -1.50 ± 2.15 、P 群 -1.23 ± 1.81 であった。いずれも統計学的有意差はみられなかったが、L 群と P 群では悪化傾向を示すものの、H 群では治験終了 2 年を経ても、治験開始時の網膜感度を維持していた。また矯正視力は全例で不変であった。

7. 視神経脊髄炎に対する分子標的治療

神経性疼痛の数値的評価スケールおよび総合障害度スケール(Expanded Disability Status Scale, EDSS)はトシリズマブ投与により、徐々

に改善した。特に神経性疼痛の数値的評価スケールは、トシリズマブ数回投与後よりゼロとなり、疼痛が消失したと考えられる。また、トシリズマブ投与後、末梢血中のPBの割合と抗AQP4抗体価の減少が認められた。重篤な有害事象は認められなかった。

8. 強度近視眼球形状解析

272 名 544 眼の強度近視患者に対し、中心窩を中心とした radial scan を SS-OCT を用いて施行した結果、278 眼で強膜の全層を観察できた。一方、対照眼の正視眼では強膜の内面のみ観察可能であった。正視眼では RPE カーブはほぼ直線状に乳頭に向かい傾斜するタイプ、中心窩を中心としたお椀型の 2 種類があったが、いずれのタイプでも中心窩下の脈絡膜が厚いために、強膜内面のカーブは中心窩を底としたお椀型の形状であった。一方、強度近視眼では脈絡膜が高度に菲薄化しているために RPE カーブと強膜カーブはほぼ同じであり、強膜カーブは乳頭傾斜型、対称型、非対称型、不規則型の 4 つに分類された。統計解析では、不規則型の症例では、他のタイプと比較して有意に年齢が高く、近視度が強く、眼軸長が長く、また中心窩下強膜厚が有意に薄かった。さらに、近視性牽引黄斑症、近視性脈絡膜新生血管、近視性網膜脈絡膜萎縮のすべてが、不規則型の症例において、他のタイプよりも有意に高頻度に認められた。さらに不規則型の強膜形状を有する症例の 3D MRI では眼球全体は耳側偏位型の形状であった。

9. 神経機能イメージング