

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。不規則型の症例は、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。周辺部網膜毛細血管の拡張は強度近視眼で毛細血管瘤といった所見は正視眼、強度近視眼ともに認められたが、強度近視眼で頻度が高い傾向にあった。また広範囲の無血管領域や血管吻合などの所見は強度近視眼にのみ認められた。周辺部網膜無血管領域を有する群はより年齢が高く、近視度が強かった。

12. 視神経軸索障害の機能的評価と軸索再生の研究

培養網膜神経節細胞の軸索を障害すると軸索輸送が停止し、細胞死が誘導されることをライブで観察出来た。眼圧上昇したマウスでは細胞死の前に視神経軸索輸送が停止することを確認した。ヘパラン硫酸が欠損すると視神経乳頭形成不全が生じた。

13. 緑内障に対する繊維柱帯切除術の危険因子の探索

繊維柱帯切除術の予後不良の危険因子は、血管新生緑内障、ぶどう膜炎続発緑内障(肉芽腫性ぶどう膜炎)、若年者、術前高眼圧、眼

内レンズ挿入眼、硝子体手術既往眼、緑内障手術既往眼、術後早期の水晶体再建術、水晶体再建術との同時手術、前房水のサイトカイン上昇である。

14. iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シート移植

術中、全ての移植片において明らかな損傷はなく、介助者なしで網膜下移植する事ができた。移植片に皺がよることがあったが、網膜剥離の範囲が小さかったことが原因と考えられ、移植片の位置ずれの原因は、移植器具の挿入方向と流路が同軸で無かったことが考えられた。また、保存液中に粘弾性物質を含有したヒト iPS-RPE シートは全例で収縮したため、移植片の収縮の原因として不十分な排液が考えられた。

15. 網膜移植

RX-GFP ES ノックイン細胞および Nrl-GFP トランスジェニックマウス由来 iPS 細胞から、再現性をもってほぼ生体内の発生と同じ期間を経て網膜様組織を立体分化培養により誘導することができ、ほぼ網膜組織のみに純化することができた。これらを分化 14-17 日目(胎生期相当)で移植すると、分化早期の移植では、変性網膜下の環境においても移植片は網膜の神経節層、内層、視細胞層すべての構造に分化する像が観察された。2 次ニューロンである双極細胞と視細胞、または視細胞の前シナプスマーカーである ribeye との接する像が観察され、シナプスが形成されている可能性が示唆された。杵体駆動の弱い光刺激に対する a 波様反応が観察できた。また移植片部位での神経節細胞側からの光反応に対する活動電位も

観察された。

D. 考察

1. 視覚障害者調査

2001～2004年の前回の調査と比較して、上位4疾患の順位に差はなかったが、糖尿病網膜症の割合が少し減少して、治療の進歩や早期診断などの成果による可能性が示唆された。視覚障害者認定の際には身体障害者福祉法に基づく指定医師の診断書を添えて、福祉事務所を経由し、都道府県知事、指定都市市長に身体障害者手帳の交付申請をすることになっているが、判定項目となる視力や視野検査などの詳細な結果は、各地方自治体へ報告されるのみで全国規模で集計されることはない。また、診断名はコード選択ではなく、判定医の裁量に委ねられており、現在の日本では、詳細な統計調査が困難な状況にある。

2. 加齢黄斑変性の治療指針の策定

2008年からの抗VEGF薬の本格的導入によって、我が国での加齢黄斑変性の治療は多様化し、治療方針は施設によって差異を生ずる傾向にあった。このため、我が国における標準的な治療指針が待ち望まれていた。本治療指針によって加齢黄斑変性の管理がより適切に行われることが期待される。

3. 滲出型加齢黄斑変性治療臨床研究

治療前の病変サイズが小さな症例はラニビズマブ硝子体内注射に対する反応が良好である。視力良好なPCVに対するIVRは、2年間で視力の維持はできるが、1年以降も漿液性網膜剥離の残存および再発を認めることから、継続的な経過観察、追加治療が必要である。遺伝

子多型により抗VEGF療法の視力予後を予測することは難しい。狭義PCVは、PCVの疾患感受性遺伝子として報告されているC2、CFB遺伝子とは関連がない可能性が高く、polypoidal CNVとは病態が異なる可能性が示唆された。

タキフィラキシーの発現機序としては、ラニビズマブに対する中和抗体の産生、VEGF受容体のup-regulation、マクロファージによるVEGF産生の亢進、他の経路を介するCNVの再活性化、CNVの成熟化、病変タイプの変化、RPEの機能低下などがあげられる。タキフィラキシーに対する対策としては、ステロイドやPDTといった異なった作用機序をもつ薬物との併用療法を行うこと、休薬期間をもうけること、薬剤を変更することが考えられる。

典型AMDのみならず、特殊型のPCVやRAPにおいても、滲出が消失した後にGAが発生し、拡大傾向にあることから、長期的には中心窩に萎縮が及ぶことで視力低下を招くことが推測される。0.15%ウノプロストン点眼によって予防できる可能性がある。

4. ポリープ状脈絡膜血管症の病態の形態学的・病理学的解明

PCVには異なる2種の病態が存在する可能性が高い。

5. 加齢黄斑変性基礎研究

Semaphorin3E/PlexinD1シグナル経路が脈絡膜血管新生にも関わっていることが示された。病的な血管新生のみを抑制することで、抗VEGF療法と比べ選択的な治療となる可能性がある。生理的な血管新生を抑制しないことが再発抑制につながるのかどうかは今後検討し

ていく必要がある。Ccr2 アンタゴニストである INCB3344 は CNV の発生抑制と既存の CNV の退縮効果があることが示された。

TNF- α は極性 RPE に対し、VEGF 分泌抑制作用をもつことがわかった。一方で、幼若で未分化な非極性 RPE においては、過去の報告と同様に TNF- α は VEGF 分泌促進作用をもった。加齢黄斑変性の初期段階など RPE の極性が保たれている際に局所炎症が起こると、脈絡膜側への VEGF 分泌が低下し、脈絡膜萎縮が起こる可能性がある。

アスタキサンチンの経口投与はラットの網膜光障害に対して予防的な効果がある。

6. 網膜色素変性遺伝解析

網膜色素変性の原因遺伝子は約 140 種、未知を含めると約 190 種と多岐にわたる。中でも乳児期に発症する重症な網膜色素変性である Leber 先天盲と、日本人に頻度の高い常染色体劣性網膜色素変性は有効な治療法がないが、2007 年、米国と英国で Leber 先天盲患者の遺伝子治療が実施されたのは朗報である。わが国でも網膜色素変性、とりわけ重症で頻度の高い常染色体劣性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る。

7. 遺伝診断ネットワーク

難病バンクへ登録した患者試料 DNA は、最適な環境下で保管されるだけでなく、検体配送や DNA 抽出にかかる手間と費用は難病バンクが負担する。一方、難病バンクはバンク事業を行い希望する研究者に患者試料 DNA を分譲する。このように登録する側と分譲される側それぞれが難病バンクを研究サポートに用いる

ことが可能である。

8. 網膜色素変性臨床試験

ウノプロストン点眼液による網膜色素変性における視機能改善効果を、世界で初めて二重遮蔽の臨床試験で証明した。臨床応用に向けて第 3 相臨床試験を実施中である。

SIV による PEDF 遺伝子治療の臨床試験を引き続き実施し、また、生産ラインの安定化など、臨床応用を見据えた開発に着手する。

9. 網膜色素変性基礎研究

Aldehyde dehydrogenase 酵素活性が低い血管内皮前駆細胞は、発現する CCL2 により遊走してきた Ly6c 陽性の幼弱なマクロファージが発現する IGF-1 や TGF- β などの神経保護因子を介して、血管・神経保護作用を発揮することがわかった。

10. 視神経脊髄炎に対する分子標的治療

トシリズマブ投与により末梢血プラズマブラストの割合が著明に減少したことから、プラズマブラストの生体内での生存に IL-6 が重要である可能性が示唆された。

11. 強度近視眼球形状解析

不規則型の形状は、強度近視眼の強膜形状の最終型であると推測された。おそらく加齢や近視の進行により、強膜がある程度以上菲薄化すると、もはや正常の円弧を維持することができず、不規則型となり、強膜形状のこのような変化が直接的に網膜や視神経を障害し、視覚障害の原因となる種々の近視性眼底病変を惹起すると考えられる。また、強度近視眼では周辺網膜血管の変化も生じることが分かった。近視度の進行とともに眼球形状変化が起こり、それに伴い周辺部網膜が高度に伸展していき、

これらの網膜血管変化が生じたものと推察される。

12. 視神経軸索障害の機能的評価と軸索再生の研究

軸索輸送の観察が緑内障視神経障害の進行を予知するバイオマーカーになる。ヘパラン硫酸が網膜神経節細胞の軸索誘導に不可欠な分子であることが明らかになった。

13. 緑内障に対する繊維柱帯切除術の危険因子の探索

繊維柱帯切除術の予後不良の危険因子が明らかになり、手術を計画する上での有益情報となる。

14. iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シート移植

開発した手術器具は、適切な剥離範囲の作製、移植器具の挿入方向と流路を同軸にすることや十分な排液を行う事で、安定した移植を行う事ができたため臨床応用に適していると考えられる。

15. 網膜移植

iPS、ES細胞由来網膜様組織は胎生期相当の移植で、移植後変性網膜下の環境でも成熟し、ホスト2次ニューロンとのシナプスを形成しうる可能性が示唆された。また、シート状網膜は、移植半年以内にほぼ消失した視細胞移植に比べ長期にわたる生着が観察され、視細胞移植ではみられないような外節様形態も観察された。また、層構造を維持した移植片は、GFAP活性上昇は伴わない傾向を示した。これらの点において、シート移植は細胞移植に対する優位性を示した。また、これら移植後ホスト網膜の多電極アレイ解析では、microERG

にて変性末期ホスト網膜ではみられないようなa波を観察することができ、層構造を維持した移植片由来の光応答と考えた。今後、神経節細胞の光応答性活動電位がホスト由来のものかどうか検討する。

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、多くの症例で長期的に治療を継続する必要があり、また、長期的な視力維持が困難な症例や地図状萎縮への進展などが報告されつつあり、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、原因遺伝子の解析の質的向上、遺伝診断ネットワーク構築により、カウンセリングのための情報が得られやすくなり、また、遺伝診断の進歩は今後の病態解明や治療ターゲットの拡大につながる可能性がある。遺伝子導入の臨床応用に向けた研究が進行中である。

病的近視に対しては、画像診断技術の向上により、詳しい形状解析データが得られ、予防法や治療法の開発につながるものと考えられる。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、第一次予防法や、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. 知的所有権の出願・取得取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

細胞シート作製方法:PCT/JP2011/060778.

加齢黄斑変性関連遺伝子:C12N 15/09.

その他、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. ヒト iPS 由来網膜色素上皮細胞の

視細胞保護効果

孫 嘉楠、万代道子、高橋政代
(理化学研究所)

研究要旨 ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞(RPE)、進行の早いrd1網膜変性マウスの変性進行極期である2週令の網膜下に移植し、視細胞保護効果について検討した。またその効果を既に海外で臨床研究の行われているneural stem cells (NSC)、mesenchymal stem cells (MSC)と比較したところ、移植2週後の評価でRPEでのみ有意な視細胞残存がみられた。また3種類の移植細胞の中でRPEはもっとも長期間生存し、移植片へのマイクログリアの浸潤も最も少なかった。色素上皮は神経保護因子として知られるPEDFを分泌し、長期生着することにより、これらの因子を介して視細胞保護効果を示したと考えられた。

A. 研究目的

細胞治療として、近年海外では網膜色素変性や加齢黄斑変性に対し、neural stem cells (NSC) や mesenchymal stem cells (MSC)の網膜下や硝子体移植による視細胞保護効果を期待した治験が行われている。RPEはpigment epithelium-derived factor (PEDF)を分泌するが、PEDFは光障害や遺伝的網膜変性モデルで視細胞保護効果が報告されている。Rd1はpde6 β に遺伝子異常をもち、網膜変性モデルの中でも進行が早く、生後4週令で桿体視細胞がほぼ消失する遺伝的変性モデルである。我々はiPS細胞から分化したRPE細胞をこのモデルの変性極期である生後2週令の網膜下に移植し、その視細胞保護効果をNSC、MSCと比較、さらに各種細胞の既知の栄養因子の分泌能、およびそれぞれのグラフトの生着状態に注目して比較検討した。

B. 研究方法

ヒトiPS細胞由来RPEは我々の研究室の既報のプロトコールにより分化誘導し(1)、形体的、MITF、RPE65、ベストロフィンの免疫染色により色素上皮に分化していることを確認した。MSCは臍帯血由来のものを、特徴的マーカーであるCD73、CD105、CD90、CD146陽性細胞として維持培養して用いた。NSCは米国での治験で用いられている細胞をStem Cells Incより購入して、品質規格としてのnestin、vimentin陽性、Tuj1、MAP2陰性であることを確認して用いた。

移植はそれぞれの細胞を $10^5/\mu\text{l}$ 片眼の網膜下に移植し、反対眼には懸濁液のみを網膜下に注入した。各実験の評価時期までシクロスポリンによる免疫抑制下で飼育した。

(倫理面への配慮)

施設倫理委員会の承認を得て研究をおこなった。

C. 研究結果

ELIZAによりPEDF、VEGF、TGF-beta、BDNF、DNTF、beta NGF、NT-3、GDNF、IGF-1のそれぞれの細胞による分泌能を調べた。PEDF、VEGFの分泌はRPEで有意に高く、それぞれ 240 ± 62 ng/ml/ 10^6 cells/48、 3 ± 0.4 ng/ml/ 10^6 cells/48hrという値であった。MSCもPEDFを 8 ± 1 ng/ml/ 10^6 cells/48hrの濃度で分泌していた。その他、低濃度ながらRPEでbeta-NGF、NT-3、MSCでBDNF、NSCでPEDF、TGF-bが検出された。

2週令で移植後、2週後に残存視細胞を係数し、色素上皮移植群で有意な視細胞の残存が確認された(図1)。また、移植細胞の生着を経時的にみると、色素上皮が有意に長く生着していた(図2)。また、移植片へのマイクログリアの浸潤は色素上皮で最も少なかった。

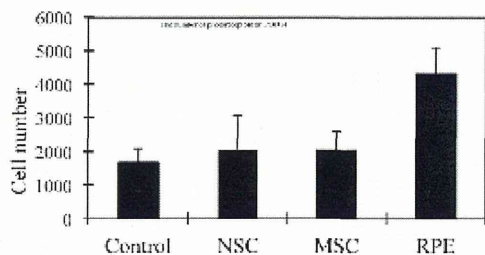


図1 移植2週後のホスト残存視細胞

D. 考察

MSC、NSC、RPEの移植細胞間では、RPEがもっとも安定的に生着し、本来眼内組織を構成しない細胞は移植されてもすみやかに除去されると考えられた。一方変性極期であってもRPEは生着し、また、RPEによる保護効果はそのPEDF分泌能も一端で寄与していると考えられた。

E. 結論

iPS由来RPEは変性極期の炎症の強い病態

時期であっても安定的に生着し、NSCやMSCではみられない視細胞保護効果を示した。

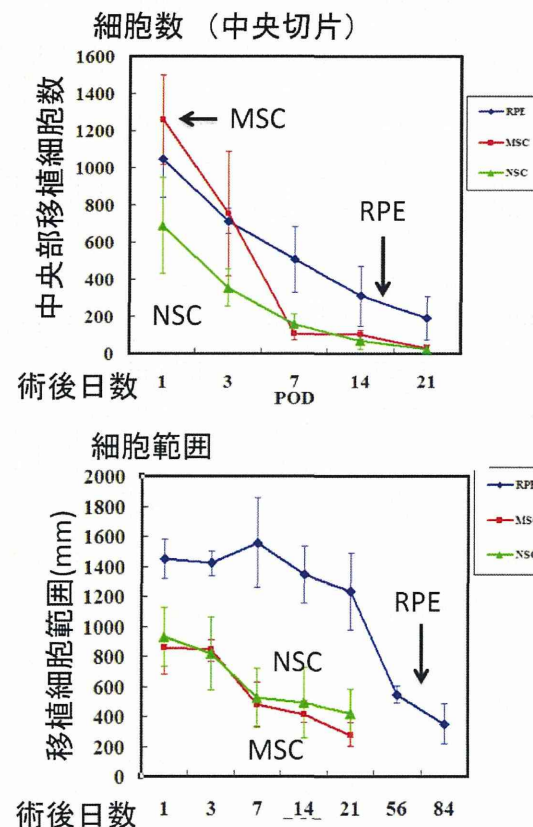


図2 術後日数と残存移植細胞

H. 参考文献

1. Kamao H, Mandai M, Okamoto S, Sakai N, Suga A, Sugita S, Kiryu J, Takahashi M: Characterization of human iPSC-derived RPE cell sheets aiming for clinical application. Stem Cell Reports, in press.

2. 視細胞移植のための中型モデル動物の作成

白井博志¹⁾、万代道子¹⁾、寺崎浩子²⁾、高橋政代¹⁾

(¹⁾ 理化学研究所、²⁾ 名古屋大)

研究要旨 iPS 細胞由来視細胞移植の臨床応用に向けて片眼性に視細胞特異的な障害を持つ中型モデル動物が必要となる。われわれは猿での応用を前提に、家兎に対して塩化コバルトの網膜下注射を行うことで局所任意部分への視細胞障害作成を試みた。障害は濃度依存性で、適正濃度では水平細胞およびアマクリン細胞は残存していることが示唆された一方で、高濃度では網膜色素上皮(RPE)および双極細胞も障害されることが示唆された。Focal cone ERG では濃度依存性に b 波の電位の減弱および潜時の遅延を認めた。霊長類でも網膜下注射による同様の効果が示唆されており、今後さらに検討を行っていく。

A. 研究目的

iPS 細胞由来視細胞移植の臨床応用に向けて手技操作や生着・機能の確認のために、よりヒトに近い中型モデル動物が必要である。動物愛護の観点から特に霊長類では片眼モデルが望ましいが、われわれは霊長類への応用を前提に、機能評価系をふまえた上で、家兎網膜の任意の部位での視細胞選択的な障害の作成を試みた。塩化コバルトは低酸素と同様の作用すなわち低酸素時の global gene expression レベルに関与する遺伝子群を調節し、細胞をアポトーシスに導く作用を有する。今回我々は塩化コバルトの網膜下注射によるモデル作りを試みたので報告する。

B. 研究方法

家兎 6 匹・12 眼に対し、20 μ l の生食水単独 (0 mg/ml) または塩化コバルトの網膜下注射を行い (0.06mg/ml、0.15 mg/ml、0.30 mg/ml)、直径 2-3 乳頭径のブレイブを作成した。家兎 1、2 は 2 日後に TUNEL 染色をおこなった。家兎 3

～6 は 4、7、14、21 日後に光干渉断層計 (OCT) による撮影を、14 日後に蛍光眼底造影検査 (FA) を、21～26 日後に中心部 15° の Focal cone ERG を行った。26 日後に固定を行い、Hematoxylin and eosin (HE) 染色および免疫染色 (ロドプシン、PKC、Calretinin、Calbindin、GFAP) を行った。併せて、別の家兎を用いて塩化コバルト 0.06mg/ml の網膜下投与を行い、その 14 日後に同部位を剥離し、移植片を挿入することができるか確認した。また、応用としてカニクイザルに対しても家兎と同様の方法で塩化コバルトの網膜下注射を行い、OCT および Focal cone ERG で評価した。

(倫理面への配慮)

全ての処置は ARVO の規定に則った。

C. 研究結果

TUNEL 染色では生食水単独および 0.06mg/ml で陽性細胞が外顆粒層 (ONL) 選択的にみとめられた。0.15 mg/ml・0.30 mg/ml では内顆粒層 (INL) にも陽性細胞をみとめた。

OCT では生食水単独でもある程度網膜外層の菲薄化を認めたが、塩化コバルト投与群では濃度依存性に網膜障害が起こり、特に 0.06 mg/ml では外層のみ著しく障害された一方、内層の構造変化を認めなかった。FA 所見は 0.06 mg/ml では著変を認めず RPE の機能が保たれていることが示唆された。他方、0.15mg/ml・0.30 mg/ml では window defect による過蛍光を認め、RPE への障害が示唆された。Focal cone ERG では、生食単独投与した部位では未処理網膜と違いを認めなかったが、塩化コバルト投与群では濃度依存性に電位の減弱および b 波の潜時の遅延を認め、0.30 mg/ml ではフラットになった。HE 染色では 0.06mg/ml では 1 層の ONL は残ったものの、著名な ONL 厚の減少を認め、免疫染色でもわずかにロドプシン陽性細胞を認めるのみであった。0.15 mg/ml・0.30mg/ml では ONL に加えて INL も障害されているような外観を示し、ロドプシン陽性細胞も消失していた。さらに 2 次ニューロンである内層細胞の免疫染色では生食単独・0.06mg/ml 投与群では PKC 陽性細胞の双極細胞の残存が確認されたが、0.15mg/ml では PKC の染色性は低下し 0.30mg/ml では全く陽性細胞を認めなかった。他方、Calretinin および Calbindin は全濃度で陽性であり、アマクリン細胞および水平細胞の残存が示唆された。GFAP は未処理網膜では発現がみられなかったものの、それ以外のすべての濃度において発現を認め、網膜剥離に伴うミューラー細胞の反応を反映しているものと考えられた。移植モデルの実用性を確認する実験では、塩化コバルト 0.06mg/ml 投与 14 日後に同部位に再剥離を作成し、移植片が挿入できることを手技的に確認した。家兎と同様の効果を期待し、カニクイザルに塩化コバルトを網膜下注射したところ、

家兎同様に濃度依存性に視細胞障害から内層障害がみとめられ、適正濃度を設定することで、視細胞特異的障害モデルを作成できる可能性が示唆された。

D. 考察

家兎に対する塩化コバルトの網膜下注射により、視細胞への障害を引き起こす一方で水平細胞およびアマクリン細胞を残存させられることが示唆された。しかしながら塩化コバルトが高濃度になると PRE および双極細胞も障害されることも示唆された。ONL の著名な減少により Focal cone ERG もフラットに近づくと考えられたが、生食単独および 0.06mg/ml 投与群では明らかな a 波および b 波が検出され錐体の機能が残存していることが示唆された。0.06mg/ml の網膜下注射にて片眼・局所的に視細胞特異的な障害を持つ家兎モデルの作成することができた。カニクイザルにおいても塩化コバルトの網膜下注射により家兎と同様の効果が期待できることが示唆された。

E. 結論

家兎に対する塩化コバルトの網膜下投与にて局所任意部位に視細胞選択的な障害を引き起こすことができた。サルへの最適条件に関してさらに検討していく。

3. マウス iPS 細胞より作製した人工 3 次元網膜組織での

視細胞変性の誘導法の確立

大西暁士、伊藤晋一郎、伊良波諭、高橋政代
(理化学研究所)

研究要旨 網膜疾患患者もしくは変性モデル動物由来の iPS 細胞は、病態解析や薬物試験など臨床研究モデルに有用である。そこで、マウス iPS 細胞より分化誘導した人工 3 次元網膜において薬理的に視細胞変性を誘導し、その過程を評価した。

視細胞特異的転写因子 ERRbeta の阻害剤であるタモキシフェンを含む培地で人工 3 次元網膜を維持培養したところ、視細胞における ERRbeta の発現時期以降より視細胞特異的な細胞死の増加が認められた。また、Nrl プロモーター制御下で視細胞特異的に発現する GFP の蛍光強度をモニターする事により、視細胞変性の状態を定量・評価する実験系を確立した。

A. 研究目的

網膜色素変性症は光を感じる視細胞が徐々に障害され失明に至る疾患であり、現在根本的な治療法は確立されていない。これまで分子遺伝学的解析より多くの原因遺伝子が同定されたが、総患者数の 3~4 割程度であり、未だ原因不明のものに対してはモデル生物・細胞による病理解析が不可能である。そのため、原因遺伝子の既知・未知を問わず患者の視細胞変性の病態を解析し、薬物試験を行うことのできる研究モデルが必要とされる。

我々は、網膜色素変性患者より作製した iPS 細胞より分化誘導した杆体視細胞が培養過程で変性する事を示した[1]が、分化視細胞が生体網膜に比して少ないため、臨床応用には視細胞の分化誘導効率を上げる必要があった。近年、マウスおよびヒト ES 細胞より立体網膜組織への分化誘導法が確立され、生体網膜と同様の視細胞層を含む立体的な網膜を作成で

きるようになった[2]。

そこで、我々はマウス iPS 細胞より分化誘導した人工 3 次元網膜組織を用いて視細胞変性を誘導する系を再現し、生体網膜と比較・評価した。

B. 研究方法

人工 3 次元網膜組織の視細胞変性は以下の 2 通りの方法で誘導した。(1)野生型マウスより作製した iPS 細胞より分化誘導した人工 3 次元網膜組織に対し、視細胞特異的に作用する阻害剤を暴露することにより視細胞特異的な細胞死を誘導する。(2)網膜色素変性症の原因遺伝子を持つマウス(Rd1)より樹立した iPS/ES 細胞より分化誘導した人工 3 次元網膜組織を維持培養し、視細胞組織の形態変化を野生型由来の 3 次元網膜組織と比較する。

分化視細胞を可視化するため、視細胞特異的な転写因子 Nrl プロモーター制御下で GFP を

発現するトランスジェニックマウス[3]と掛けあわせたマウスより iPS を樹立した。分化誘導した人工3次元網膜における発現および視細胞変性過程を免疫組織化学的解析により解析・評価した。

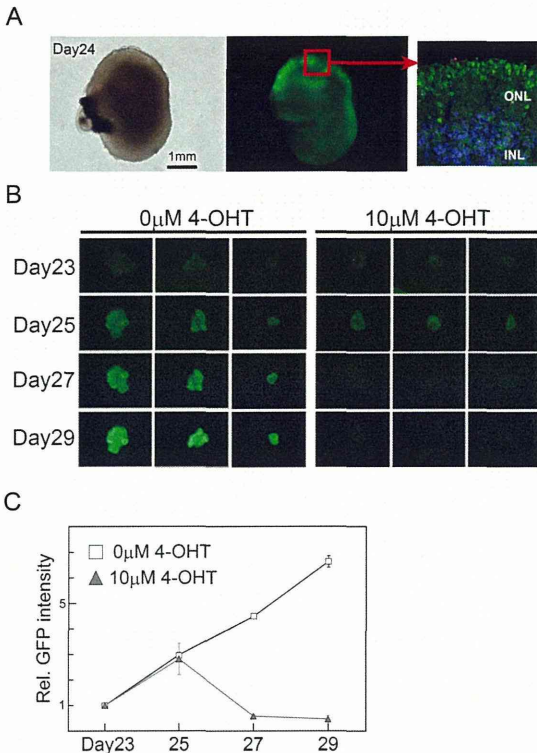


図 人工3次元網膜組織における視細胞変性

- (A) 分化誘導 24 日後における細胞塊。分化視細胞は GFP を発現する。
 (B) ERRβ阻害剤 4-OHT 添加培地で維持培養した人工3次元網膜における視細胞 GFP マーカーの減弱。
 (C) B における GFP 蛍光強度の経時変化。

(倫理面への配慮)

全ての実験は ARVO の動物実験規定に従った。

C. 研究結果

pNrl-GFP トランスジェニックマウスより作製した iPS 細胞より 3 次元網膜組織を分化誘導し、分

化後 20 日前後から GFP の発現を確認した。GFP 陽性細胞はロドプシンと共局在することから、ES 細胞と同様に iPS 細胞からも 3 次元網膜を分化誘導できることが確認できた(図 A)。

次に、分化後 23 日より人工 3 次元網膜に杆体で高い発現を示す転写因子 ERRbeta に対する阻害剤 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) [4]を添加して維持培養した。この結果、暴露 4 日目(分化後 27 日)よりロドプシンの発現の減少および TUNEL 陽性視細胞の有意な増加が認められた。また、同期して GFP 蛍光強度が有意に減弱した。これらは分化視細胞の ERRbeta の発現時期より観察された(図 B、C)。

D. 考察

マウス iPS 細胞より分化させた人工 3 次元網膜における 4-OHT 暴露による視細胞変性は、マウス生体網膜を用いた場合と同様の結果[4]を示した事より、人工 3 次元網膜でも生体と同様の機序で視細胞変性が誘導されている可能性が高い。

E. 結論

マウス iPS 細胞より分化誘導した 3 次元網膜において、視細胞特異的転写因子の活性を阻害する事により視細胞変性が誘導された。また、視細胞特異的に発現する GFP の蛍光強度の変化と視細胞死が相関する事が確認された。即ち、視細胞変性の進行を GFP 蛍光強度の経時変化より簡便かつ定量的に評価する実験系を確立した。

H. 参考文献

- Jin ZB, et al: Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. PLoS ONE 6(2): e17084, 2011.

2. Eiraku M, et al: Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472: 51-56, 2011.
3. Akimoto M, et al: Targeting of GFP to newborn rods by Nrl promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *PNAS* 103(10): 3890-3895, 2006.
4. Onishi A, et al: The orphan nuclear hormone receptor ERRbeta controls rod photoreceptor survival. *PNAS* 107(25): 11579-11584, 2010.

4. 低濃度終末糖化産物による網膜神経細胞の生存・再生への影響

忍足俊幸、Bikbova Guzel、山本修一

(千葉大)

研究要旨 低濃度終末糖化産物(advanced glycation end-products: AGEs)の神経細胞生存・再生に与える影響を、ラット網膜3次元培養を用いて検討した。正常SDラット網膜を無菌下で単離し、コラーゲンに包埋後、1)無血清培養液、2)10mg/ml glucose-AGE-BSA、3)10mg/ml glycolaldehyde-AGE-BSA、4)10mg/ml glucose-AGE-BSA、5)glucose-AGE+100ng/ml neurotrophin-4 (NT-4)、6)glycolaldehyde-AGE+NT-4、7)glyceraldehyde-AGE+NT-4付加群を作成、培養7日で網膜を固定し、凍結切片作成、TUNEL染色及びapoptosis-inducing factor (AIF)・caspase-9の免疫染色を施行した。また、神経節細胞層(ganglion cell layer: GCL)におけるTUNEL陽性率、AIF・caspase-9免疫陽性率を各々の群で比較した。3種類のAGE投与群ではTUNEL陽性率はコントロールに比べて有意に増加し、NT-4付加によりTUNEL陽性率は有意に減少した。同様にcaspase-9・AIF免疫陽性率もAGE投与群では有意に増加し、NT-4付加群で免疫陽性率は有意に減少した。再生突起数は3種類のAGE投与群では有意に減少し、NT-4付加により再生突起数は有意に増加した。低濃度AGEはラット網膜神経細胞に細胞死を誘導し、再生を有意に抑制した。また、AGE誘導神経細胞死にはカスパーゼ依存性・非依存性経路両方が関与していた。

A. 研究目的

糖尿病網膜症の病態には血管病変の他に神経細胞死に代表される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は神経保護治療を確立する上で早急の課題である。

AGEは糖尿病患者だけでなく、緑内障・加齢黄斑変性など多くの視神経・網膜疾患の病態に関与することが知られている。今回我々は低濃度(10 mg/ml)のAGEを培養液に付加し、

低濃度AGEの網膜神経細胞に与える影響を網膜3次元培養を用いて検討した。糖尿病患者ではglycated BSA換算で4-480 mg/mlのAGEが全身を還流していることが知られており、今回検討した濃度は多くの糖尿病患者において全身を還流していると予想される濃度である。また過去に我々はミトコンドリアーカスパーゼ依存性経路が糖尿病誘導網膜神経細胞死に関与することを報告してきたが、今回の研究ではAGE誘導神経細胞死にカスパーゼ依存性経路・非依存性経路両方が関与するかどうかを検討に加えた。

B. 研究方法

4 匹の成熟 SD 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 1) 無血清培養液、2) 10 mg/ml glucose-AGE-BSA (Glu)、3) 10 mg/ml glycolaldehyde-AGE-BSA (Glycol)、4) 10 mg/ml glyceraldehyde-AGE-BSA (Glycer)、5) 10 mg/ml Glu+100ng/ml NT-4 (G_B+NT-4)、6) 10 mg/ml Glycol+100ng/ml NT-4 (Glycol+NT-4)、7) 10 mg/ml Glycer+100ng/ml NT-4 (Glycer+NT-4)を付加して培養した。培養 7 日後、各々の群で再生突起数を観察した。その後、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 AIF、活性型 caspase-9 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 AIF、caspase-9 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 One Way ANOVA を用いた。P<0.05 を統計的有意とした。

(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-25-68) で受理された。

C. 研究結果

3 種類の AGE 投与群 (Glu、Glycol、Glycer) では TUNEL 陽性率はコントロールに比べ有意に増加し (48.6±10.5% vs. 11.8±6.3%、44.9±9.9% vs. 11.8±6.3%、44.2±10.6% vs. 11.8±10.5%; 各々 P<0.0001)、NT-4 付加により TUNEL 陽性率は有意に減少した (17.9±7.3% vs. 48.6±10.5%; P<0.0001、26.6±10.7% vs. 44.9±9.9%; P=0.005、21.8±4.1% vs. 44.3±

10.6%; P=0.0003)。同様に caspase-9 及び AIF 免疫陽性率も AGE 投与群 (Glu、Glycol、Glycer) ではコントロールに比べて有意に増加し (25.3±4.4% vs. 7.5±4.4%; P<0.0001、28.3±3.6% vs. 7.5±4.4%; P<0.0001、27.3±6.5% vs. 7.5±4.4%; P<0.0001 (caspase-9)、44.7±17.5% vs. 21.2±11.4%; P=0.0004、45.0±4.9% vs. 21.2±11.4%; P=0.0002、37.9±14.8% vs. 21.2±11.4%; P=0.056 (AIF))、NT-4 付加で免疫陽性率は有意に減少した (4.4±1.1% vs. 25.3±4.4%; P<0.0001、4.9±2.7% vs. 28.3±3.6%; P=0.0005、7.5±3.1% vs. 27.3±6.5%; P<0.0001 (caspase-9)、21.0±7.3% vs. 44.7±17.5%; P=0.026、17.0±6.1% vs. 45.0±4.9%; P=0.026、18.3±5.3% vs. 37.9±14.8%; P=0.016 (AIF))。再生突起数は 3 種類の AGE 投与群 (Glu、Glycol、Glycer) では有意に減少し (68.6±4.7/mm² vs. 30.8±4.5/mm²; P=0.0033、68.6±4.7/mm² vs. 31.3±5.7/mm²; P=0.0044、68.6±4.7/mm² vs. 31.3±5.7/mm²; P=0.0238)、NT-4 付加により再生突起数は有意に増加した (210.0±26.3/mm² vs. 30.8±4.5/mm²、193.8±24.1/mm² vs. 31.3±5.7/mm²、168.8±10.6/mm² vs. 31.8±3.7/mm²; 各々 P<0.0001)。

D. 考察

過去の研究では 100mg/ml ~ 250mg/ml の AGE が神経毒性を発揮することが報告されていたが、今回の研究では 10mg/ml の低濃度であっても網膜神経細胞死・再生抑制効果があることが判明した。これはほとんどすべての糖尿病患者で全身を還流している濃度であることから、臨床上重要な知見と思われる。AGE が神経毒性を発揮するメカニズムは不明な点が多いが、AGE 付加により AIF 免疫活性が核に検出され、

免疫陽性細胞も増加していたこと、活性型の caspase-9 の免疫活性も増加していたことからカススペース依存性経路・非依存性経路両方が活性化されたことにより細胞死が増加したことが考えられる。ただし、3 種類の AGE (Glu、Glycol、Glycer)の間では神経毒性に差が見られなかったことから receptor を介した RAGE 依存性経路よりは活性酸素増加やグリア活性化など RAGE 非依存性経路による神経毒性がより重要である可能性が示唆された。

また、NT-4 は AIF 免疫活性及び活性型 caspase-9 免疫活性両者を抑制することで神経保護作用・再生促進作用を発揮したと考えられる。NT-4 の神経保護作用の正確なメカニズムについては不明な点が多いが、NT-4 が作用する trkB レセプターが NT-4 とともにミトコンドリアの膜に共局在していてミトコンドリア機能に密接に関与しうることが報告されている。AIF や caspase-9 前駆体はミトコンドリア内に保存されていることから、NT-4 はミトコンドリア膜透過性を調節することで両者の活性化を抑制し神経保護作用を発揮したのではないかと推察される。更なる NT-4 の神経保護・再生促進のメカニズム解明が必要である。

E. 結論

低濃度 AGE 付加により、ラット網膜に神経細胞死が誘導され、突起再生は有意に抑制された。AGE 付加群では AIF、活性型 caspase-9 の免疫活性が有意に増加しており、そのほとんどは核に発現していた。NT-4 は AGE 誘導神経細胞死を抑制し再生促進作用を発揮した。また、NT-4 は AIF・活性型 caspase-9 の免疫活性を抑制することで神経保護・再生促進作用を発揮したと思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Bikbova G, et al: Neurite regeneration in adult rat retinas exposed to advanced glycation end-products and regenerative effects of neurotrophin-4. *Brain Res* 1534, 33-45, 2013.
2. Oshitari T, et al: Increased expression of c-Fos, c-Jun and c-Jun N-terminal kinase associated with neuronal cell death in retinas of diabetic patients. *Curr Eye Res* 2013 (in press).
3. Oshitari T, et al: Increased expression of phosphorylated c-Jun and phosphorylated c-Jun N-terminal kinase associated with neuronal cell death in diabetic and high glucose exposed rat retinas. *Brain Res Bull* 101, 18-25, 2014.

2. 学会発表

1. Oshitari T, et al: Upregulation of activator protein 1 (c-Fos/c-Jun) and c-Jun N-terminal kinase associated with neuronal cell death in retinas of diabetic patients. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (ARVO). Fort Lauderdale, Florida, 2013.
2. Bikbova G, et al: Both caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways are involved in neuronal death in rat retinas exposed to AGEs. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (ARVO). Fort Lauderdale, Florida, 2013.

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. 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.

5. 進行期網膜変性モデルマウスにおける

VCP の ATPase 阻害剤の神経保護効果の検討

長谷川智子、池田華子、村岡勇貴、垣塚 彰、辻川明孝、吉村長久
(京都大)

研究要旨 網膜色素変性は日本でも主要な視覚障害原因の一つだが、現在のところ確立された有効な治療法がない。ATPase の 1 種である Valosin-containing protein(VCP)の新規 ATPase 阻害剤(Kyoto University Substance [KUS] 121)が網膜変性モデル rd12 マウスの進行期において変性保護効果をもつかどうか検討を行い、限定的ではあるが視細胞変性抑制効果を認めた。

A. 研究目的

ATPase の 1 種である Valosin-containing protein(VCP)の新規 ATPase 阻害剤(Kyoto University Substance [KUS] 121)が網膜変性モデル rd12 マウスの進行期において変性保護効果をもつかどうか検討する。

B. 研究方法

対象:13 ヶ月齢の rd12 マウス。生食群 17 匹、ATPase 阻害剤群 16 匹。

方法:ATPase 阻害剤群マウスには ATPase 阻害剤(KUS121)を含む水を自由飲水にて摂取させた。

13 か月齢および 19 か月齢において光干渉断層計(OCT)を撮影し、全層網膜厚を視神経乳頭周囲 366 μm の範囲で計測した。また 19 か月齢において明順応網膜電位図(ERG)(刺激光強度 10 $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$)撮影を行い、視神経乳頭中央を通る垂直断のパラフィン切片を用いて、視神経乳頭縁から 300-400 μm の範囲に含まれる外顆粒層の細胞数を計測した。

(倫理面への配慮)

使用動物の数は必要最小限になるように配慮し、また、眼球摘出の際には動物にできるだけ苦痛を与えないよう麻酔の過量投与を行った。

C. 研究結果

OCT 検査での全層網膜厚は 13 か月齢で生食群および ATPase 阻害剤群でそれぞれ 202.4 ± 9.0 、 $202.0 \pm 7.8 \mu\text{m}$ と有意差を認めず、19 か月齢でそれぞれ 185.0 ± 10.2 、 $195.9 \pm 8.2 \mu\text{m}$ と ATPase 阻害剤群で有意に網膜厚が保たれていた($P < 0.001$)。

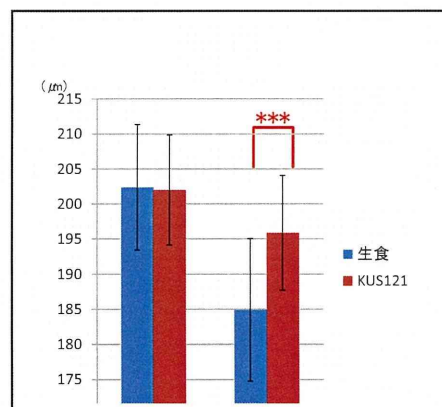
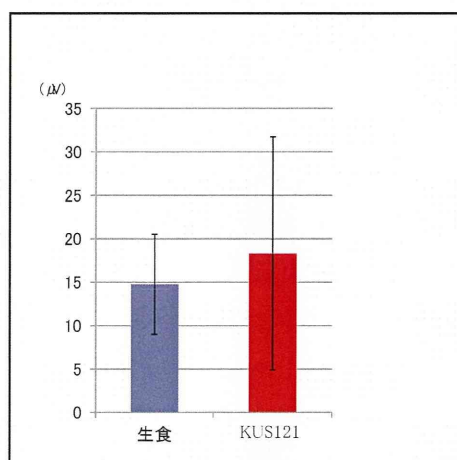


図 1: 全層網膜厚

明順応 ERG での b 波の振幅は生食群、ATPase 阻害剤群それぞれで 12.2 ± 5.0 、 $16.3 \pm 8.1 \mu\text{V}$ と有意に ATPase 阻害剤群で波形が大きかった($P = 0.03$)。



外顆粒層の細胞数は生食群、ATPase 阻害剤投与群それぞれで 81.8 ± 20.5 、 94.0 ± 23.7 個 ($P = 0.36$)であった。

D. 考察

VCP は、ユビキチン依存性蛋白分解、ストレス応答、プログラムされた細胞死などの 様々な細胞プロセスに関与するとの報告があり、家族性の筋委縮性側索硬化症の一部などで原因遺伝子として同定されており、病気をおこす変異 VCP では、ATPase 活性が上昇している事が明らかになっている。別の網膜変性モデルマウス(rd10)では VCP の ATPase 阻害剤 KUS121 を投与することによって ER ストレスが抑制されていた。今後、今回の rd12 マウスを用いた実験での視細胞変性抑制効果の機序の検討が必要である。

E. 結論

VCP の ATPase 阻害剤 KUS121 は rd12 マウスの変性が進行した晩期において、限定的ではあるが視細胞変性抑制効果を認めた。

6. 治療後に網膜色素上皮裂孔を生じた加齢黄斑変性罹患眼の特徴

松原 央、宮田良平、小林真希、松井良論、近藤峰生

(三重大)

研究要旨 網膜色素上皮裂孔(RPE tear)は、加齢黄斑変性(AMD)の合併症の一つであり、長期的には視力低下に至る。高い網膜色素上皮剥離(PED)や大きい PED では発生のリスクあることが報告されている。AMD に対して光線力学的療法(PDT)あるいは抗血管内皮増殖因子(VEGF)薬硝子体内注射を施行し、経過中に RPE tear を生じた症例の特徴を検討することを目的とした。治療眼 433 眼中 8 眼(1.8%)に治療後 RPE tear を生じ、脈絡膜新生血管(CNV)の収縮に伴う RPE tear は 7 眼であった(RPE tear 群)。高い PED を有し RPE tear を生じなかった群(非 RPE tear 群)を対象として、CNV が PED に接する部位の長さ(a)と PED の境界までの長さ(b)の比(b/a)を比較したところ RPE tear 群では有意に b/a は低値であった。高い PED を有する AMD 眼において b/a は RPE tear 発生予測の一要素となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

網膜色素上皮裂孔(RPE tear)は、滲出型加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)に伴う合併症であり、自然経過においても発生するが、光線力学的療法(PDT)や抗血管内皮増殖因子(VEGF)薬硝子体内注射後に発症することが報告されている¹⁾。また、RPE tear 発生を予測する因子が報告されており、高い網膜色素上皮剥離(PED)や大きい PED を伴う AMD 眼では発生リスクが高い²⁾。今回、RPE tear 発生の予測因子として、AMD 眼の治療前の PED と脈絡膜新生血管(CNV)の関係を RPE tear 発生眼と非発生眼で比較検討した。

B. 研究方法

対象症例は、2009 年 8 月から 2013 年 6 月までに三重大学附属病院において AMD と診断し、PDT あるいは抗 VEGF 薬硝子体内注射

(ranibizumab、aflibercept)の単独もしくは併用療法を行った 414 例(男性 309 例、女性 105 例)433 眼のうち、RPE tear を生じた症例を抽出した。8 例 8 眼に治療に関連した RPE tear を発生した。うち 1 眼は、治療後出血の急激な増加に伴う RPE tear であり、7 眼は CNV の収縮に伴う RPE tear であった(RPE tear 群)。上記治療眼のうち(1)400 μ m 以上の高さかつ 1 乳頭径以上の大きさの PED を有する、(2)治療前に造影眼底検査(フルオレセイン、インドシアニングリーン)を施行し治療後 3 か月以上追跡可能、(3)治療効果が認められた、(4)ポリープ状脈絡膜血管症確実例ではない、(5)網膜色素上皮や眼底の詳細確認が可能、(6)治療前に RPE tear もしくは microrip が認められない、の条件に合致する 14 例 14 眼(男 12 例、女 2 例)を非 RPE tear 群とした。上記 2 群に対して造影眼底検査(フルオレセイン、インドシアニングリーン)と光干渉断層計(OCT)ポ