

201324038B

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業(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 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 小 椋 祐 一 郎

平成 26(2014)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業(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 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 小 椋 祐 一 郎

平成 26(2014)年 3 月

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
	大野 京子	東京医科歯科大学医学部眼科	准 教 授
	坂本 泰二	鹿児島大学医学部眼科	教 授
	白神 史雄	岡山大学医学部眼科	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	プロジェクトリーダー
	辻川 明孝	京都大学医学部眼科	講 師
	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
湯澤 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
	石田 晋	北海道大学医学部眼科	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		

目 次

I. 総合研究報告	1
II. 関連業績一覧	19
III. 関連業績別刷	63

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等対策研究事業(難治性疾患克服研究事業))
総合研究報告

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。

視覚障害者調査:我が国の視覚障害による身体障害者認定の原因疾患について、平成 19～21年の3年間で調査したところ、第1位は緑内障、2位は糖尿病網膜症、3位は網膜色素変性症、4位は加齢黄斑変性で前回の調査と変動はなく、本研究班における研究の重要性が示された。

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、現在、倫理審査委員会の承認を受けて、臨床試験が始まった。

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した。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、臨床試験のエントリーを開始した。

病的近視:高度近視眼に対する画像解析により形状変化と病態との関連調査が進み、病期分類の作成に着手した。

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。難治性の視神経脊髄炎の病態解明が進み、抗インターロイキン6受容体抗体による治療の有効性が示されつつある。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。

【研究分担者】

石橋達朗(九州大学・眼科・教授)	稲谷 大(福井大学・眼科・教授)
大鹿哲郎(筑波大学・眼科・教授)	大野京子(東京医歯科歯科大学・眼科・准教授)
坂本泰二(鹿児島大学・眼科・教授)	白神史雄(香川大学・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・眼科・プロジェクトリーダー)
辻川明孝(京都大学・眼科・講師)	寺崎浩子(名古屋大学・眼科・教授)
西田幸二(大阪大学・眼科・教授)	村上 晶(順天堂大学・眼科・教授)
安川 力(名古屋市立大学・眼科・准教授)	山本修一(千葉大学・眼科・教授)
湯沢美都子(日本大学・眼科・教授)	吉村長久(京都大学・眼科・教授)

【略語解説】

AMD (age-related macular degeneration):	加齢黄斑変性
CNV (choroidal neovascularization):	脈絡膜新生血管
GA (geographic atrophy):	地図状萎縮
IA (indocyanine green angiography):	インドシアニングリーン蛍光眼底造影
IL (interleukin):	インターロイキン
MS (multiple sclerosis):	多発性硬化症
NMO (neuromyelitis optica):	視神経脊髄炎
OCT (optical coherence tomography):	光干渉断層計
PCV (polypoidal choroidal vasculopathy):	ポリープ状脈絡膜血管症
PDT (photodynamic therapy):	光線力学的療法
RAP (retinal angiomatous proliferation):	網膜血管腫状増殖
RPE (retinal pigment epithelium):	網膜色素上皮
VEGF (vascular endothelial growth factor):	血管内皮増殖因子

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、視覚障害の対策を立てる。

2. 加齢黄斑変性の治療指針の策定

わが国における標準的な加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) の治療指針を考案・策定する。

3. 滲出型加齢黄斑変性治療臨床研究

滲出型 AMD 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、合併症について病型別に検討した。また、遺伝的要因との関連についても検討する。

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

滲出型 AMD の特殊型であるポリープ状脈絡膜血管症 (polypoidal choroidal vasculopathy: PCV) のインドシアニングリーン蛍光造影 (indocyanine green angiography: IA) 所見、光干渉断層計 (optical coherence tomography: OCT) 所見、病理組織所見から、PCV の病態を形態学的・病理学的に解明する。

5. 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。

6. 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。

7. 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する。

8. 網膜色素変性臨床試験

網膜色素変性症の進行抑制などの治療法を確立する。

9. 網膜色素変性基礎研究

増殖能・虚血改善能が高い Aldehyde dehydrogenase 活性の低い血管内皮前駆細胞を用いて、神経変性疾患であるとともに血管萎縮性疾患でもある網膜色素変性モデルマウスへ投与し、血管・神経保護作用について検討を行う。

10. 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多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) とは異なる慢性炎症性中枢神経疾患であり、自己抗体 (抗アクアポリン4抗体) が関与している。我々は NMO 末梢血中の未熟形質細胞 (プラズマブラスト) が主な自己抗体産生であり、インターロイキン 6 (IL-6) の促進に関与していることを報告した (PNAS, 2011)。今回、難治性 NMO 患者における抗 IL-6 受容体抗体 (トシリズマブ) 療法の効果を検討する。

11. 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。強度近視眼における眼球形態変化、網脈絡膜の変化を解析し、病的近視の病態を解明する。

12. 視神経軸索障害の機能的評価と軸索再生の研究

視神経の軸索輸送停滞が緑内障等で障害される網膜神経節細胞の細胞死を予測できると軸索再生に関わる分子を解明する。

13. 緑内障に対する繊維柱帯切除術の危険因子の探索

代表的な緑内障手術である繊維柱帯切除術の術後成績を悪化する因子を解明する。

14. 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 (iPS-RPE シート) の網膜下移植器具を開発する。

15. 網膜移植

永楽らの胚性幹細胞 (ES細胞) から網膜組織を立体的に分化誘導する方法により、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、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、移植片が末期の網膜変性眼においても生着し成熟するか、および、機能するかについて検討する。

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都市の自治体を無作為に抽出した。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4,852名について調査した。

2. 加齢黄斑変性の治療指針の策定

本研究班の研究代表者および分担者によって加齢黄斑変性治療指針作成ワーキンググループを構成し、2008年に本研究班で作成した「加齢黄斑変性の分類と診断基準」に基づいて治療指針の原案を作成し、2回にわたる検討会を持った上で班会議にて最終決定を行った。

3. 滲出型加齢黄斑変性治療臨床研究

典型AMDと、特殊型のPCVおよび網膜血管腫状増殖(retinal angiomatous proliferation: RAP)に、導入期として1か月に1回計3回のラニビズマブまたはアフリベルセプト硝子体内注射(0.5mg/0.05mL)を施行し、その後の維持期は1か月毎の診察で再投与基準に当てはまる滲出の再燃を認めれば再投与し、治療成績と視力予後を左右する因子を調査した。遺伝子多型との関連も検討した。

滲出型加齢黄斑変性に対し、ラニビズマブ硝子体内注射の反復により効果が減弱するタキフィラキシー症例や網膜色素上皮病変など治療への反応不良症例に対して、アフリベルセプトへの切り替えの効果を検討した。

治療眼で地図状萎縮(geographic atrophy: GA)の出現、拡大が問題視されてきているた

め、1年以上経過観察できたPCVとRAPを対象に、眼底所見とHRA2の眼底自発蛍光所見からGAを検出し、RegionFinderを用いてGA面積を測定した。またGAに対する0.15%ウノプロストンの抑制効果を検討した。

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のIA所見(流入血管と流出血管の有無、異常血管網の血管数、走向、ポリープの数)、IAの流入血管の部を含むOCT所見を検討した。PCVの臨床的な特徴7項目を抽出し、硝子体手術で摘出していた狭義PCVの病理組織を用いて、臨床的特徴を裏付ける病理学的所見を考察した。

5. 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。免疫染色にてCNV中のPlexinD1の局在を、RT-PCR法にてSemaphorin3E、PlexinD1発現の経時的変化を計測した。また、CNV抑制実験として、レーザー直後にSemaphorin3E 0.1 μ g、VEGFR Fc 2 μ g、Ccr2アンタゴニストであるINCB3344(1.8 μ M)を硝子体内注射し、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。CNV面積をRPE-choroidフラットマウントで評価した。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、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。

3000 lxの高照度環境下においたラットの光障害に対するアスタキサンチンの保護効果を網膜電図(ERG)と組織学的に検討した。

6. 網膜色素変性遺伝解析

患者血液からゲノム DNA を抽出し、Leber 先天盲原因遺伝子 16 種と常染色体劣性網膜色素変性原因遺伝子 17 種の計 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。

7. 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。

8. 網膜色素変性臨床試験

網膜色素変性患者を対象に、イソプロピルウノプロストン点眼薬を一日4滴、6か月間投与し、網膜中心部の網膜感度の変化を検討した。一日2滴群およびプラセボ群と二重遮蔽3群間比較試験を行った。ハンフリー静的視野計により中心2度以内の網膜感度を測定した。

網膜色素変性に対するサルレンチウイルスベクター(SIV)を用いた色素上皮由来因子(PEDF)の遺伝子治療の臨床試験を進める。

また、GMP 基準 SIV ベクター生産体制の確立を目指す。

9. 網膜色素変性基礎研究

臍帯血より採取した血管内皮前駆細胞を、Aldehyde dehydrogenase 酵素活性の高い群と低い群に分けて培養を行い、網膜色素変性症モデルマウスである C3H 系マウスの硝子体内および網膜下に注入し、マウス網膜視細胞数、網膜浅層・深層における血管評価を行った。マクロファージの機能を低下させる試薬を低活性群に注入し、フローサイトメーターを用いて回収し、網膜に存在する内在性のマイクログリアとの性質の違いについても検討した。

10. 視神経脊髄炎に対する分子標的治療

抗アクアポリン 4 抗体陽性で通常の治療に抵抗性の難治性 NMO 患者 1 名に、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を分離し、フローサイトメリーにより、末梢血中のプラズマブラストの割合、および血清中の抗アクアポリン 4 抗体価を測定した。

11. 強度近視眼球形状解析

強度近視患者に 3D-MRI、高深達光干涉断層計(Swept-source OCT: SS-OCT)、超広角眼底撮影装置による蛍光眼底造影検査を施行し、眼球形状、強膜、脈絡膜、周辺部網膜血管の変化を対象眼と比較解析した。

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輸送と生きたマウスの視神経軸索輸送をライブで観察した。また

ヘパラン硫酸のコンディショナルノックアウトマウスを作成して、視神経乳頭の形成を観察した。

13. 緑内障に対する繊維柱帯切除術の危険因子の探索

繊維柱帯切除術を施行した緑内障患者の後ろ向き研究と前向き研究の単施設と多施設研究を行った。

14. 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。家兎を用いて手術手技の検討を行った。

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、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・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日 文部科学省・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に行った。

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. 加齢黄斑変性の治療指針の策定

前駆病変、萎縮型加齢黄斑変性に対しては生活習慣の改善と抗酸化サプリメントによる予防的治療を、滲出型加齢黄斑変性に対しては、典型加齢黄斑変性、ポリープ状脈絡膜血管症、網膜血管腫状増殖の病型別に抗血管内皮増殖因子薬(抗VEGF薬)、光線力学的療法、両者の併用療法を用いた治療を推奨治療として組み込んだ治療指針のアルゴリズムを作成した。

3. 滲出型加齢黄斑変性治療臨床研究

病型別に治療前背景を比較すると平均年齢は、滲出型 AMD: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。治療前平均小数視力は、滲出型 AMD:0.35、PCV:0.46、RAP:0.23とPCV群が一番良好であった。1年後の視力変化は全症例で改善 23.7%、不変 63.5%、悪化 12.8%であった。導入期に改善した視力を維持できている症例は 42%、いったん改善するも維持できない症例は 24%、視力改善を認めない症例は 35%であった。治療前 GLD が 3500 μ m 以下の症例が有意に予後良好であった。視力良好な PCV に対するラニビズマブ硝子体内注射2年後の視力成績は、改善 2%、不変 87%、悪化 11%であった。69%の症例で維持期の再治療を要し、平均再治療回数は1年目が 1.6 回、2

年目が 1.2 回だった。最終的に中心窩下の漿液性網膜剥離の残存を 36%で認めた。遺伝子多型の ARMS2 A69S、CFH I62V は典型 AMD に対する治療効果を予測する因子にはなり得なかった。ARMS2 A69S 多型は PCV の治療前の視機能と関係したが、IVR 治療後の視力変化とは関係しなかった。polypoidal CNV 患者は C2、CFB 遺伝子の rs547154、rs541862、rs2072633 の SNP に関連があったが、狭義 PCV 患者では関連がなかった。

タキフィラキシー症例は全体の 4.2%にみられた。タキフィラキシー発症までのラニビズマブの投与回数は平均 6.5 回であった。ラニビズマブに反応不良を示す典型 AMD の 1 型 CNV と PCV に対してアフリベルセプトへの切り替えが有効であった。

地図状萎縮の発生率(2年間)、拡大率(/年)は、それぞれ、典型 AMD では 75%、1.4 mm²/年、PCV では、65%、1.2 mm²/年、RAP では、89%、1.5 mm²/年であった。0.15%ウノプロストン点眼による予防効果の検討では、54 週後の地図状萎縮面積の平均拡大率は、対照群 2.11 に対して実薬群は 1.21 と有意に低く、抑制効果が認められた。

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 は CNV の変形である polypoidal CNV と、脈絡膜の血管異常である狭義 PCV に分類できた。IA 上、Polypoidal CNV は、流入血管と流出血管があり、血管網は CNV の特徴を有し、異常血管網辺縁の血管の一部が拡張、蛇行して、ポリープ状に見えた。狭義 PCV は、流入および流出血管が認められず、異常血管網を

構成する血管は数が少なく、異常血管の変形がポリープ状に見えた。OCT 上、Polypoidal CNV では流入血管に一致して Bruch 膜を示すラインに断裂があり、RPE を示す高反射ラインは不規則に隆起し、隆起部は太い異常血管とポリープ状病巣に一致していた。狭義 PCV の異常血管網起始部付近で Bruch 膜の断裂はなく、脈絡膜側に屈曲し下面に高反射物質が付着したラインが見られた。起始部では直上の RPE を示すラインは陥凹していた。PCV の特徴的な臨床所見として、(1)pseudo classic CNV の蛍光造影所見、(2)ポリープ様の拡張、(3)脈絡膜の肥厚、(4)ポリープの破裂、(5)PDT でポリープは高率に閉塞する、(6)抗 VEGF 薬では閉塞しにくい、(7)OCT におけるポリープ、異常血管網の特徴の 7 項目が挙げられるが、病理学的に、それぞれ、(1)脈絡毛細血管板の消失、拡張血管に接する RPE の消失、RPE 上へのフィブリン析出、(2)血管平滑筋細胞の消失、(3)血管のヒアリン化と著明な血管外漏出、(4)血管壁内泡沫マクロファージの存在、(5)血流のうっ滞、血管内皮細胞障害、(6)血管内皮の VEGF 陰性所見、(7)RPE の減少、消失とブルッフ膜下にあるポリープ病巣と異常血管網の存在から説明可能であった。

5. 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 が発現し、レーザー照射後 5 日目から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 日目に有意に減少していた。CNV 形成は Semaphorin3E や VEGFR Fc の硝子体内注射によって有意に抑制された。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、VEGF の発現量とマクロファージ中の VEGF mRNA 発現量が有意に下がり、CNV 形成が抑制された。長期光照射誘導 CNV においても、INCB3344 投与群で CNV の有意な縮小が認められた。

ELISA 法と半定量 PCR により、極性 RPE は非極性 RPE 細胞に比べ約 3 倍の VEGF を分泌していた。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。TUNEL 染色と MTT assay により、TNF- α 10ng/ml による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。

光暴露による ERG の b 波振幅の低下、網膜の外顆粒層の菲薄化、アポトーシス細胞出現 (TUNEL 陽性率) に関して、アスタキサンチン投与は容量依存性に抑制効果を示した。

6. 網膜色素変性遺伝解析

Leber 先天盲および常染色体劣性網膜色素変性患者の遺伝子解析の結果、105 例中 12 例に病因となり得る変異を認めた。

7. 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、理化学研究所間で問題なく試料(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。理化学研究所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。

網膜色素変性臨床試験: イソプロピルウノプロストン点眼液 1 日 4 滴群において、ハンフリー静的視野の中心 2 度以内の網膜感度は有意

に改善したが、1日2滴群とプラセボ群では有意な変化は見られなかった。

SIVによるPEDF遺伝子治療の臨床試験を引き続き実施する。

8. 網膜色素変性臨床試験

インプロピルウノプロストン点眼液1日4滴群において、ハンフリー静的視野の中心2度以内の網膜感度は有意に改善したが、1日2滴群とプラセボ群では有意な変化は見られなかった。

SIVによるPEDF遺伝子治療の臨床試験を引き続き実施する。

9. 網膜色素変性基礎研究

Aldehyde dehydrogenase 酵素活性の低い血管内皮前駆細胞(Alde-Low EPC)を投与した群では、有意に血管萎縮及び神経変性に至る速さを抑制した。siRNAを用いてCCL2の発現を低下させたAlde-Low EPCを投与した群と、同siRNAを含むLiposomeおよびAlde-Low EPCを投与した群では血管・神経保護作用は低下した。CCL2を過剰発現させたAlde-High EPC投与では血管・神経保護作用が回復した。Alde-Low EPCにより遊走してきたマクロファージは、幼弱なマクロファージのマーカであるLy6cを発現しており、IGF-1やTGF- β などの神経保護因子の発現が内在性のマイクログリアと比べて高い事が明らかとなった。遊走してきたLy6c陽性の幼弱なマクロファージを再びC3H系マウスに投与したところ神経血管保護作用を持つことが明らかとなった。

10. 視神経脊髄炎に対する分子標的治療

NMO患者の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、末梢血中のプラズマブラストの割合と抗アクアポリン4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。

11. 強度近視眼球形状解析

対照眼の正視眼ではSS-OCTを用いて強膜の内面のみ観察可能であったが、強度近視患者では高率に強膜の全層を観察できた。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。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生機序としては、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、宿主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、これら移植後宿主網膜の多電極アレイ解析では、microERGにて変性末期宿主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宿主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。