

## 第 109 回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

## 新しい眼薬物療法

## 分子基盤に基づいた眼疾患の理解と新しい眼薬物療法

谷原 秀信

熊本大学大学院医学薬学研究部視機能病態学分野

## 共同研究者

稲谷 大, 川路 隆博, 猪俣 泰也, 高野 晃臣, 相良 仁奈, 高橋 枝里, 平田 憲, 安東えい子  
古賀 貴久, 栗井麻衣子, 古賀 朋代, 筒井順一郎, 犬丸 淳子, 馬渡 祐記, 井上 俊洋, 福島美紀子

(熊本大学大学院医学薬学研究部視機能病態学分野)

本庄 恵(北野病院), 木戸 啓文(島田市民病院)

佐谷 秀行, 永野 修(熊本大学大学院医学薬学研究部腫瘍医学分野)

竹屋 元裕(熊本大学大学院医学薬学研究部細胞病理学分野)

安東由喜雄(熊本大学大学院医学薬学研究部病態情報学)

森 正敬(熊本大学大学院医学薬学研究部分子遺伝学分野)

田賀 哲也(熊本大学発生医学研究センター転写制御分野)

成宮 周(京都大学大学院医学研究科神経・細胞薬理学)

沢村 達也(国立循環器病センター脈管生理部)

Yue BYJT(イリノイ大学眼科視覚科学分野)

本田 孔士(大阪赤十字病院), 永田 誠(永田眼科)

## 要 約

ゲノム解析が一段落ついて、生命現象を規定している遺伝子の全体像が把握できるようになった。網羅的解析手法と単一遺伝子を制御する研究手法が開発されたことで、眼疾患に対しても、詳細な分子基盤に基づいて病態を把握し、新しい薬物療法を開発することが可能になった。我々は、緑内障、加齢黄斑変性、増殖硝子体網膜症の3つの眼疾患を取り上げ、さらに新しい治療概念として、網膜再生医療の可能性と問題点についても論じた。緑内障については、房水と房水流出路の相互関係に着目し、Rho-Rho 関連コイルドコイル形成プロテインキナーゼ(Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase, ROCK)シグナル伝達系の役割について解明し、ROCK 阻害薬を含めて一群のプロテインキナーゼ阻害薬がシャープな眼圧下降効果を有することを認めた。単

一遺伝子変異による続発緑内障の一つとして、家族性アミロイドポリニューロパシーを研究して、眼合併症の臨床像と病態の分子基盤について論じ、薬物療法開発の方向性を述べた。緑内障に対する新しい治療概念として、神経保護の可能性を論じて、複数の薬物療法候補薬に到達した。加齢黄斑変性に対しては、動脈硬化病変との類似性に着目して、スカベンジャー受容体や白血球-血管内皮相互関係を解析し、病態の分子基盤について解明を進めた。増殖硝子体網膜症に対しては、網膜色素上皮細胞の役割について論じ、細胞形質転換の病的意義や酵素処理を用いた硝子体手術の有用性を認めた。網膜再生医療については、現在の限界点を指摘した上で、多分化能を維持したままでの高効率培養手法、移植後の細胞系譜の分化誘導、細胞外基質による軸索誘導制御などの可能

別刷請求先：860-8556 熊本市本荘 1-1-1 熊本大学大学院医学薬学研究部視機能病態学分野 谷原 秀信  
(平成 17 年 8 月 17 日受付, 平成 17 年 9 月 30 日改訂受理)

Reprint requests to: Hidenobu Tanihara, M.D. Department of Ophthalmology & Visual Science, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences. 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan  
(Received August 17, 2005 and accepted in revised form September 30, 2005)

性について研究を展開した。(日眼会誌 109 : 917-961, 2005)

キーワード : 薬物療法, 緑内障, 房水流出路, 線維柱帯, ROCK 阻害薬, 家族性アミロイドポ

リニューロパシー, 神経保護, ストレス応答, 加齢黄斑変性, スカベンジャー受容体, 細胞接着分子, 増殖硝子体網膜症, 網膜色素上皮細胞, 網膜再生医療, 神経幹細胞

## A Review

### New Understanding and Development of Medical Treatments for Ocular Diseases Based upon Molecular Mechanisms

**Hide Nobu Tanihara**

*Department of Ophthalmology & Visual Science,  
Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences*

#### Abstract

A number of genes associated with life phenomena have been identified by the achievement of genome projects. As both comprehensive analysis and methods for investigation of specific genes have been developed, we can understand the pathogenesis of ocular diseases and develop novel medical treatments based upon detailed information on molecular mechanisms. In our review article, we focused on three vision-threatening ocular diseases ; glaucoma, age-related macular degeneration (AMD) and proliferative vitreoretinopathy (PVR), and discussed the potential and problems related to retinal regenerative therapy.

Regarding glaucoma, we investigated the relationships between aqueous humor and cell components in the aqueous outflow route. We have revealed that the Rho-Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase (ROCK) signal transduction pathway participates in regulation of the aqueous outflow route, and that ROCK inhibitors and several protein kinase inhibitors exert intraocular pressure-lowering effects. Also, we conducted a series of investigations on familial amyloidotic polyneuropathy (FAP), as a representative secondary glaucoma caused by genetic mutations in a single gene. We reviewed the clinical features of ocular complications derived from FAP, their molecular mechanisms and possibilities for the development of novel medical treatments. In addition, we discussed a novel therapeutic concept, "neuroprotection", and showed the potential of some drugs as candidates for the neuroprotective treatment of glaucoma.

Against AMD, we have performed a series of

experiments from the viewpoint of similarity with atherosclerotic lesions. We have shown the molecular mechanisms of AMD associated with up-regulated expression of scavenger receptors and the interaction between leukocytes and vascular endothelial cells. Furthermore, in the pathogenesis of PVR, we described the role of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells and demonstrated the usefulness of enzymatic vitrectomy.

Although retinal regenerative therapy has attracted much attention from global investigators, we pointed out its limitation for clinical application, and developed researches on efficient culture method using physiologically active factors for proliferating retinal stem cells with multi-potentiality, differentiation of the transplanted progenitor cells, and axon guidance of neurons by extracellular matrices.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 109 : 917-961, 2005)

**Key words :** Medical treatment, Glaucoma, Aqueous outflow route, Trabecular meshwork, Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase (ROCK) inhibitor, Familial amyloidotic polyneuropathy, Neuroprotection, Stress response, Age-related macular degeneration, Scavenger receptor, Cell adhesion molecule, Proliferative vitreoretinopathy, Retinal pigment epithelial cells, Retinal regenerative therapy, Neural stem cells.

## I 緒 言

### 1. ポストゲノムの研究潮流

ヒトゲノム計画が一応の完遂をみたことで、ヒトの生命現象は、20,000~25,000 程度の蛋白を規定する遺伝子で構成されているという驚くべき生命の効率性が実証された<sup>1)</sup>。我々は複雑な生命現象に関して、現時点ではまだ漠然とした形にすぎないとはいえ、その全体像を把握することが可能になった。ヒトを含めて、複数の生物種におけるゲノム解析が一応の完成をみて、ライフサイエンスの研究戦略は、新たなフェーズに移行されることになった。単一の分子は、進化の過程で、全く異なる機能や役割を果たすようになることが証明されつつある。あるいは、同一のゲノムから出発しながらも、複雑なメッセンジャーリボ核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)の修飾や蛋白質のプロセッシングなどの現象を利用しながら、多様な生命現象に関与していく。「生命」あるいは「ヒト」という総体を、単純なデオキシリボ核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)レベルでの唯物論的解釈に転換したのが、近年の分子生物学的研究の発展である。しかし、我々は、その情報をさらに昇華して、今一度、生命現象そのものの本質に迫らなくてはならない。その大きな観点から、ポストゲノム時代に突入した我々の世代は、DNA から RNA 医学あるいは蛋白質研究に、新たな視点を持ち込んで取り組むことになる。生命現象から DNA という物質への転換は、DNA から mRNA を経て蛋白質に至る転写と翻訳の経路に従って、研究を浮揚させることになる。その将来像は、蛋白質から個々の生命現象の有り様を解明して、最終的に生命そのものの全体像を正確に認識することを目指すことになる。

### 2. 眼科領域における分子細胞生物学的研究の進展

眼科領域における分子生物学的研究の応用の嚆矢としては、メンデル遺伝法則に従う単一遺伝子変異に起因する遺伝性眼疾患に対するアプローチを指摘できる。分子遺伝学的研究の発展は、先天性覚異常<sup>2)</sup>、常染色体優性網膜色素変性症<sup>3)</sup>、角膜変性疾患<sup>4)</sup>、緑内障<sup>5)</sup>など主要な眼疾患における原因遺伝子を次々に解明していった。特に、1980~1990 年代にかけては、分子遺伝学による発見が眼科学を席卷し、眼疾患における病態理解が劇的に転換された。それでは、21 世紀の眼科学をリードする研究思想を推測すれば、ポストゲノム時代の研究潮流の中、間違いなく、mRNA から蛋白質、そして生命現象へという回帰になるであろう。実際に、ヒトゲノム計画の成果は、マイクロアレイ法などの網羅的解析手法へと結実しつつある。さらに、ノーベル賞受賞に至った質量分析計の開発に伴うプロテオーム解析手法の発展は、蛋白質の網羅的解析をきわめて現実的で有効な研究戦略とすることに成功した。さらに、分子遺伝学的研究技術の

進歩は、遺伝子改変動物・細胞の作製へと移行し、我々は単一遺伝子から出発して、遂に生命現象そのものを総体として評価することが可能になったのである。したがって、網羅的解析手法と単一遺伝子解析手法を組み合わせることで、生命現象の本質に両面からアプローチすることが可能になった。我々は、これらの研究潮流を積極的に眼科領域に応用することで、分子基盤に基づいた眼疾患の理解と新しい眼薬物療法の開発が可能になると考えた。本総説において、我々の研究戦略に基づいた成果として、緑内障、加齢黄斑変性、増殖硝子体網膜症の 3 つの代表的な失明性眼疾患を取り上げ、最後に、新しい治療概念である網膜再生医療に対する補完的薬物療法の意義について論じた。

## II 緑 内 障

### 1. 房水流出機構の分子基盤に基づいた眼薬物療法の開発

#### 1) 房水流出路の生理と病態の古典的理解

房水流出路の近代的理解については、1950~1960 年代に行われた一連の生理学的研究によって、主たる概念が一旦の完成をみた。眼圧は、房水の産生と流出抵抗のバランスで規定されるが、臨床的に遭遇する緑内障のほとんどは、流出異常に伴う眼圧上昇である。生理的房水流出路の仕組みは、主経路(経シュレム管経路)と副経路(ぶどう膜強膜経路)に大別される<sup>6)</sup>。主経路は、ヒトにおいては全体の 80% 以上を占めるとされ、房水は線維柱帯、内皮網、シュレム管によって形成されている複合体から集合管へと至る房水流出路を経て、上強膜静脈へと排出される。線維柱帯は前房とシュレム管を隔てている特殊な構造で、線維柱帯からシュレム管に至る複合体を通過する房水の流出抵抗に、さらに、上強膜静脈圧(約 10 mmHg)が加わって正常眼圧が形成されると考えられている。線維柱帯組織はコラーゲンを中心とした細胞外マトリックスで形成され、シート状の層状構造をなし、その周囲は線維柱帯細胞で覆われている。この線維柱帯細胞は形態的には内皮細胞に類似し、貪食能や酵素活性、細胞外マトリックスの産生に関与するとされている。緑内障眼では線維柱帯細胞の病的な減少とそれに伴う線維柱帯細胞間隙の狭小化、房水流出抵抗の増大が指摘されている。また、副経路は、眼圧非依存的な房水の流出経路であると考えられている。

#### 2) 房水流出路の修飾による眼圧制御治療の現状

緑内障に対する眼薬物療法の開発は、房水流出路の薬理学的特徴の解明の歴史につながる。既に臨床応用されている緑内障治療薬(眼圧下降薬)の奏功機序を分類すると、(1)副交感神経作動薬による毛様体筋の収縮を利用した主経路の流出改善、(2)交感神経作動薬による房水流出変化と房水産生への影響(経時的に流出率は改善と悪化の両面性を有する)、(3)プロスタグランジン関連薬

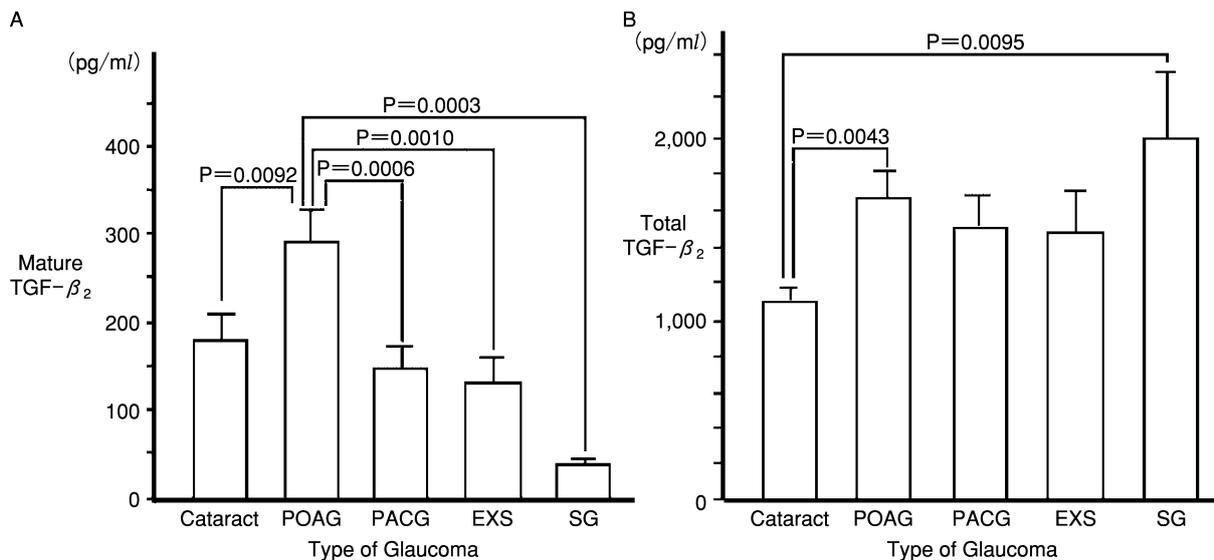


図1 緑内障眼房水における形質転換成長因子-β<sub>2</sub>(TGF-β<sub>2</sub>)濃度。(文献22より許可を得て転載)

原発開放隅角緑内障(狭義)(POAG)眼の房水中には、活性型 TGF-β<sub>2</sub>濃度が上昇しており、他の緑内障病型と異なる様相を呈していた。しかし、他の緑内障病型における房水標本では、活性型 TGF-β<sub>2</sub>濃度は低下していたが、総 TGF-β<sub>2</sub>濃度は正常かむしろ上昇しており、活性化過程が抑制されているか、もしくは活性型 TGF-β<sub>2</sub>に対する結合蛋白質が房水中に存在することを示唆する。これらの緑内障病型で、血液房水関門が障害されていることから、血中蛋白質が房水中に流入することで生じる非特異的結合による遊離濃度が抑制されている可能性が高いと考えられる。

(A)緑内障病型と活性型 TGF-β<sub>2</sub>濃度。原発開放隅角緑内障(狭義)(POAG)眼の房水中活性型 TGF-β<sub>2</sub>濃度は、原発閉塞隅角緑内障(PACG)眼(p=0.0006)、落屑緑内障(EXS)眼(p=0.0010)、ぶどう膜炎の関連した続発緑内障(SG)眼(p=0.0003)よりも、それぞれ有意に高かった。活性型 TGF-β<sub>2</sub>濃度は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で計測された。

(B)緑内障病型と総 TGF-β<sub>2</sub>濃度(活性型と非活性型を合わせた TGF-β<sub>2</sub>濃度)。原発開放隅角緑内障(狭義)(POAG)眼の総 TGF-β<sub>2</sub>濃度は、他の緑内障病型〔原発閉塞隅角緑内障(PACG)、落屑緑内障(EXS)、ぶどう膜炎の関連した続発緑内障(SG)〕を有する眼と有意差を認めなかった。ただし、POAG眼とSG眼の房水標本中の総 TGF-β<sub>2</sub>濃度は、対照群として測定した非緑内障眼(白内障眼)よりも有意に高かった。総 TGF-β<sub>2</sub>濃度は、房水標本を酸処理によって非活性型 TGF-β<sub>2</sub>を活性化した上で、総量を ELISA 法で計測された。

や α-アドレナリン受容体作動薬のぶどう膜強膜流出改善、(4) β-アドレナリン受容体遮断薬による房水産生抑制などである。しかし、従来の緑内障治療薬(眼圧下降薬)には、直接的に線維柱帯細胞を標的とした薬物はなかった。

### 3) 房水流出路に関する我々の研究戦略

我々が房水流出路に深い関心を寄せるきっかけとなったのは、著者が永田に師事して、一連の房水流出路手術の臨床研究に取り組んだことに由来する。1960年代に進歩を遂げた房水流出路の生理学的研究を背景にして開発された線維柱帯切開術は、欧米諸国において、発達緑内障に対する選択肢であり、成人緑内障眼には奏功しないものとしてきわめて低く評価されていた。永田は線維柱帯切開術の手技を改良して、成人においても有効な手術選択肢であることを証明した。我々が解析した線維柱帯切開術の手術成績は、原発開放隅角緑内障(狭義)や落屑緑内障において、臨床的に有用な選択肢であることを証明し<sup>7)</sup>、欧米においても、その見解を認知された。

我々は欧米の見解と合致して、発達緑内障についても10~20年以上の極長期においても有効であり続けること<sup>8)9)</sup>、白内障手術との同時手術により眼圧下降効果が増強されることを報告<sup>10)~12)</sup>した。さらに、原発閉塞隅角緑内障についても、線維柱帯切開術や隅角癒着解離術が有効であることを発表した<sup>13)~15)</sup>。

我々は一連の房水流出路再建手術に関する経験を経て、流出路の制御が安定した眼圧下降につながることを確認できたとともに、房水流出路という眼特異的な組織に深い興味を持つようになった。そして房水流出路の分子基盤を解明することで、緑内障の病態理解と新しい薬物療法の開発が可能になると考えるに至った。特に着目してきたのが、房水組成と房水流出路の構成細胞との相互関係による流出抵抗の制御であった。研究戦略を考えるに当たって、既知ではあるが病態の全体像の何処に位置づけるべきか不明な断片的知見が散見されていた。これらを列挙すると、緑内障眼においては、健常眼と比較して、(1)房水中組成に異常な偏り(形質転換成長因子-

$\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )や soluble CD 44 の異常高値など)がある<sup>16)17)</sup>, (2)線維柱帯細胞密度が低い<sup>18)</sup>, (3)細胞外基質の質的量的異常と線維柱帯間隙の減少<sup>19)</sup>, (4)隅角を構成するシュレム管上皮細胞の形態変化(巨大空胞や ballooning の偏り)<sup>20)</sup>, (5)房水中酸化ストレスマーカーの上昇<sup>21)</sup>などである。房水流出に関する古典的理解では、緑内障における健常状態からの逸脱を一元的に説明することは難しい。我々は房水流出路に関する分子基盤を解明することで、これらの断片的な既知情報を一元的に解説できる新しい視点を獲得することができるという仮説の上で研究戦略を展開した。

#### 4) 房水と房水流出路の相互関係

房水中には、多彩な生理活性因子が含まれており、生理的状态や病的状態の房水中には、TGF- $\beta_2$ や線維芽細胞成長因子(fibroblast growth factor, FGF), 血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor, PDGF), インターロイキン-1(interleukin-1, IL-1), IL-6 などが含まれる。特に、緑内障の病態との関連が推測されたのが TGF- $\beta_2$ であった<sup>16)</sup>。我々は細胞外基質との深い関連を有するサイトカインの代表として、TGF- $\beta_2$ に注目して、房水中濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で計測したが、確かに、原発開放隅角緑内障(狭義)では、活性型 TGF- $\beta_2$ 濃度が有意に高値を示していた(図 1 A)。しかし一方で、血液房水関門がより重篤に障害されていることが推測される落屑緑内障や続発緑内障では、むしろ活性型 TGF- $\beta_2$ 濃度が低下しているにもかかわらず、非活性型を含めると対照眼と比較しても同等かむしろ上昇していた(図 1 B)<sup>22)</sup>。したがって、これらの緑内障病型において、房水中の TGF- $\beta_2$ は、血液中の結合蛋白質との相互関係により遊離濃度が影響されていることが考えられた。また、線維柱帯細胞や虹彩・毛様体、網膜色素上皮なども TGF- $\beta_2$ とその受容体を産生しており<sup>23)</sup>、房水中濃度のみで論じる単純化した議論にはなじまない可能性もある。しかし TGF- $\beta_2$ を代表として、房水中には、多彩な生理活性因子が含まれており、緑内障における眼圧上昇機序に深く関わっている可能性は高い。実際に、緑内障眼および健常(非緑内障)眼から(患者本人の同意を得て)採取した房水標本を解析すると、多彩な蛋白質群が検出され、特に緑内障眼では高濃度に検出された(図 2)。房水組成(生理活性因子群)異常の原因としては、(1)緑内障の病態や治療に関連した血液房水関門の障害、(2)眼組織からの異常な局所産生、(3)炎症細胞浸潤や活性化された眼内細胞からの炎症応答としてのデリバリーが挙げられる。それらの生理活性因子の中には、Rho-Rho 関連コイルドコイル形成プロテインキナーゼ(Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase, ROCK)シグ

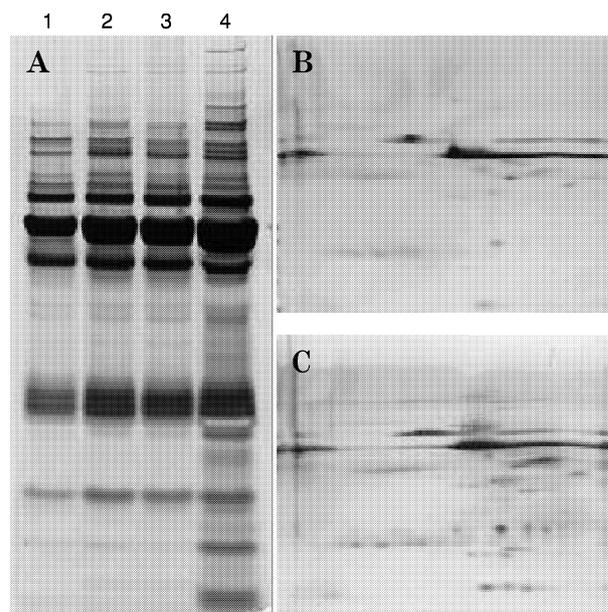


図 2 緑内障房水標本における蛋白質の電気泳動像。

緑内障においては、緑内障病型に依存する形で、房水中の蛋白質濃度が上昇している。病標本を二次元電気泳動した上で、プロテオーム解析すると、個々のプロットを同定することが可能である。房水中には多数の生理活性因子が含まれており、緑内障においては、複数の生理活性因子の濃度が上昇していた。

(A)SDS-PAGE(sodium dodecyl sulphatase-polyacrylamide gel electrophoresis)を用いた電気泳動法;対照として、非緑内障(白内障)の手術時に採取した房水標本(lane 1), 原発開放隅角緑内障(狭義)(POAG)(lane 2), 落屑緑内障(EXS)(lane 3), 血管新生緑内障(lane 4)を有する眼の房水標本をそれぞれ同量ずつ(5  $\mu$ l)を電気泳動した上で染色した。非緑内障(白内障)眼房水標本の二次元電気泳動(B)および POAG 眼房水標本の二次元電気泳動(C)。

ナル伝達系のリガンドとして作用する増殖因子やサイトカイン、他の生理活性因子が含まれる<sup>24)</sup>。

#### 5) Rho-ROCK シグナル伝達の一般的な役割

Rho は、従来の報告によって、細胞内シグナル伝達系において細胞の増殖制御、形態変化、細胞運動などを制御する small G 蛋白の一つと考えられている<sup>25)</sup>。Rho の標的分子群の中でも、ROCK は、特に重要なものであると考えられている。ROCK は Rho によって直接活性化され、ミオシンフォスファターゼおよびミオシン軽鎖をリン酸化する。ミオシンホスファターゼは、リン酸化されるとミオシンを脱リン酸化する活性が抑制される。つまり、ROCK の活性化は、ミオシン軽鎖にリン酸化を 2 つの経路で亢進させミオシンを活性化する。また、ROCK は、LIM キナーゼをリン酸化により活性化し、アクチン脱重合因子であるコフィリンを不活化することによってアクチン重合を促進する(図 3)<sup>25)</sup>。このように、蛋白レベルでのリン酸化状態を制御することで、

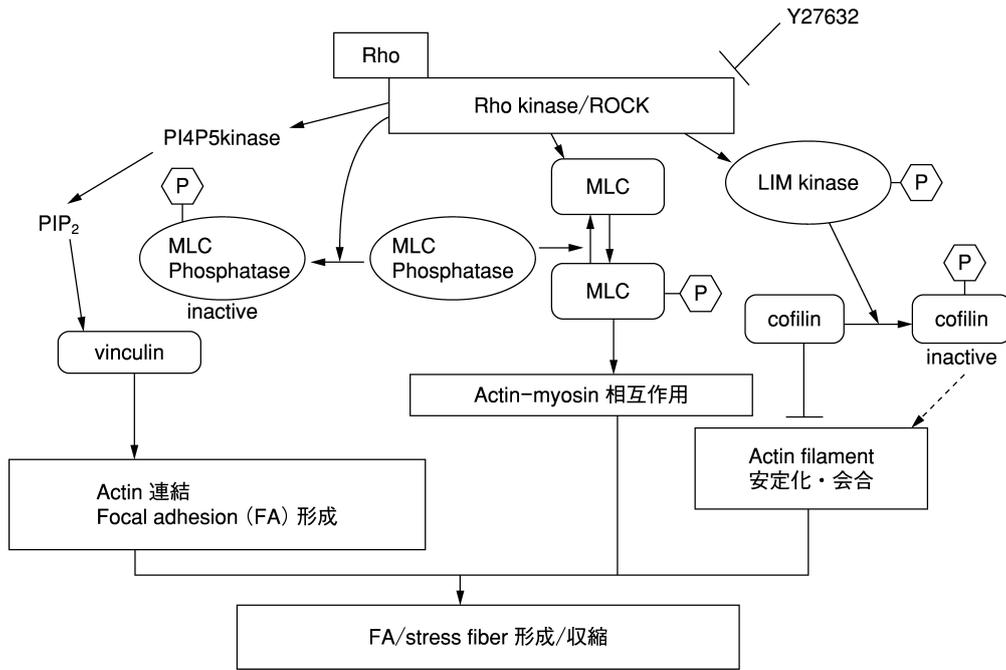


図 3 Rho-ROCK (Rho 関連キナーゼ) シグナル伝達系と細胞応答の制御機構。

Rho の標的分子群中、Rho 関連キナーゼ (ROCK) は最も重要な役割を有している。ROCK は、Rho により直接的に活性化され、ミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) およびミオシン軽鎖 (MLC) をリン酸化する。リン酸化された MLCP は、非活性型であり、ミオシンの脱リン酸化機能が抑制されることでアクチン-ミオシン系に影響を与える。ROCK は、さらに LIM キナーゼをリン酸化することで活性化し、コフィリンをリン酸化することで非活性化して、アクチン重合を促進する。またビンクリンを介して、接着斑形成にもかかわる。選択的 ROCK 阻害薬 Y-27632 は、図中に示されているように、ROCK を選択的に抑制する。

細胞内骨格再分布や接着斑形成を急速に変化させ、細胞の増殖性、形態、運動性、収縮性などの基本的な性状を制御することが可能である。

6) 房水流出路における Rho-ROCK シグナル伝達の役割

前述したように、房水中には、多彩な生理活性因子が含まれており、そのいくつかは、Rho-ROCK シグナル伝達を起動させる。つまり、房水流出路を構成する細胞成分は、恒常的に Rho-ROCK シグナル伝達が刺激された状態に置かれていることで、房水流出抵抗の制御機構に関与していることが可能性として考えられた。生理的房水流出に対する Rho-ROCK シグナル伝達の役割は、薬理的にこれを阻害することで解明することができる。成宮らの研究グループ<sup>26)</sup>は選択的 ROCK 阻害薬として Y-27632 を開発し、選択的 ROCK 阻害薬 (Y-27632) は、劇的に平滑筋を弛緩させ、細胞遊走や細胞形態の維持を制御することを解明した。そこで、我々は成宮との共同研究において、房水組成と房水流出路の相互関係を規定する重要な分子基盤の一つとして Rho-ROCK シグナル伝達系の房水流出に対する役割を解明することにした。我々は家兎眼を用いた動物実験を行ったが、結果は劇的な眼圧下降効果を示した (図 4)<sup>27)</sup>。この研究によって、選択的 ROCK 阻害薬の緑内障治療薬としての可能性を深く認識するに至った。その後、選択

的 ROCK 阻害薬の房水流出路に対する影響は、他の研究グループによっても指摘された<sup>28)</sup>。選択的 ROCK 阻害薬 (Y-27632) は、点眼、前房内投与、硝子体投与のすべての投与形態において、濃度依存的に有意な眼圧下降効果を生じた。その房水流出に対する影響を生理学的に解析してみると、主経路 (経シュレム管流出経路) を強く反映する房水流出率の増加を認め、副経路 (ぶどう膜強膜流出経路) を反映するぶどう膜強膜流量は、若干の増加をみたものの統計的に有意ではなかった (表 1)<sup>27)</sup>。すなわち、Rho-ROCK シグナル伝達系は、主として主経路に奏功することで眼圧を維持しており、その障害は有意な眼圧下降効果を生じることが証明された。

7) Rho-ROCK シグナル伝達の細胞レベルでの影響

我々は培養線維柱帯細胞のシグナル伝達機構について研究して、線維柱帯細胞には多様なシグナル伝達機構が内在されていることを解析していた<sup>29)30)</sup>。そこで、線維柱帯細胞研究の経験を活かして、ROCK 阻害効果が線維柱帯細胞に対する影響を解析した。我々は、まず培養ヒト線維柱帯細胞において、Rho の標的分子である ROCK が存在することをウエスタンブロット法で確認した (図 5)。培養ヒト線維柱帯細胞は、血清存在下では Rho-ROCK シグナル伝達系が恒常的に刺激された状態に置かれるが、選択的 ROCK 阻害薬を投与すると、劇的に細胞形態が変化する (図 6)。そこで、細胞形態変化

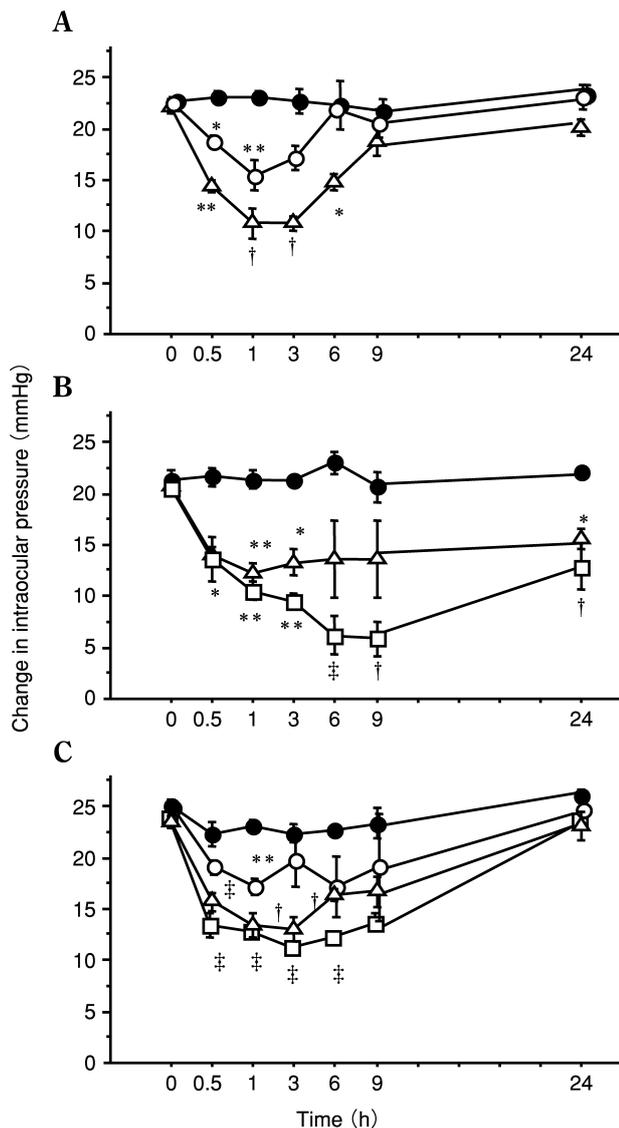


図 4 選択的 ROCK 阻害薬(Y-27632)による眼圧の変化。  
(文献 27 より許可を得て転載)

選択的 ROCK 阻害薬の投与により、投与形態がいずれであってもしっかり眼圧下降効果の家兎眼に認めた。眼圧下降効果は濃度依存的であり、点眼後 1~3 時間でピークを迎える。眼圧下降は、点眼投与では 6 時間まで有意差を維持しているが、その後、ベースライン眼圧に回復する。前房内投与や硝子体内投与などでは、さらに長時間まで奏功している。いずれの投与形態であっても、細隙灯顕微鏡検査において、前房、水晶体や眼底には異常所見は認めなかった。

選択的 ROCK 阻害薬は家兎眼に、点眼(A)、硝子体内注入(B)、前房内注入(C)により、それぞれ投与された。反対眼は、同量の溶媒(PBS)で同じ処置を受けた。選択的 ROCK 阻害薬の濃度条件は、点眼投与では、溶媒のみ(●), 10 mM (○), 100 mM(△)であり、他の二条件では、溶媒のみ(●), 1 mM (○), 10 mM (△), 100 mM (□)であった。図中の表示は、平均値±標準誤差(各条件下で実験数=6)。有意差は、対応のない Student t 検定で計算され、溶媒を用いた対照実験と比較して、\*は p<0.05, \*\*は p<0.01, †は p<0.005, ‡は p<0.001 を示す。

表 1 選択的 ROCK 阻害薬(Y-27632)による房水流出率の変化(文献 27 より許可を得て転載)

	Outflow Facility ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$ )	Uveoscleral Outflow ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )
Y-27632	$0.24 \pm 0.02$	$0.60 \pm 0.05$
Vehicle	$0.12 \pm 0.01$	$0.46 \pm 0.04$
Significance*	P<0.001	NS

平均房水流出率は、反対眼における溶媒を用いた対照眼のそれと比較すると 2 倍になっていた。ぶどう膜強膜流出は、実験眼において、対照眼と比較して 30%の増加を認めたが、統計的有意差は認めなかった。したがって、眼圧下降効果の主たる原因としては、副経路ではなく主経路の流出改善に由来するものと判断した。

房水流出率は、選択的 ROCK 阻害薬の点眼後、(最大の眼圧下降効果が得られる)3 時間の時点で測定された。選択的 ROCK 阻害薬 100 mM 溶液(対照眼では溶媒)を  $12 \mu\text{l}$  点眼した。総房水流出率は、two-level constant-pressure perfusion 法で計算され、ぶどう膜強膜流出は、FITC デキストラン(fluorescein isothiocyanate-dextran)灌流法により計測された。数値データは、平均値±標準誤差を示す(実験数, n=6)。NS(not significant)は、「有意差なし」を意味する。p 値は、Mann-Whitney 検定にて算出された。

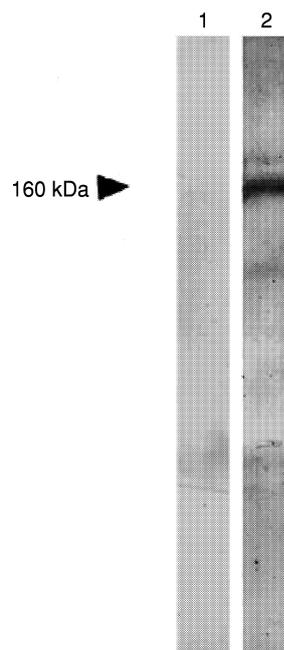


図 5 線維柱帯細胞における ROCK の発現。(文献 27 より許可を得て転載)

培養ヒト線維柱帯細胞において、ROCK 蛋白質の発現が確認された。他の実験で観察されるように、培養液中に血清が存在する状況の中で恒常的に Rho-ROCK シグナル伝達が刺激されている線維柱帯細胞が、選択的 ROCK 阻害薬の負荷に応答することを支持する。

SDS-PAGE(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)を用いたウェスタンブロット法、培養線維柱帯細胞より whole cell lysates を抽出、ウェスタンブロット法により、160 kDa の大きさのバンドを確認した。1、対照実験(抗ウサギ IgG)；2、抗 p 160 ROCK 抗体を用いた実験を示す。同定された分子量は、報告されている p 160 ROCK に合致した。

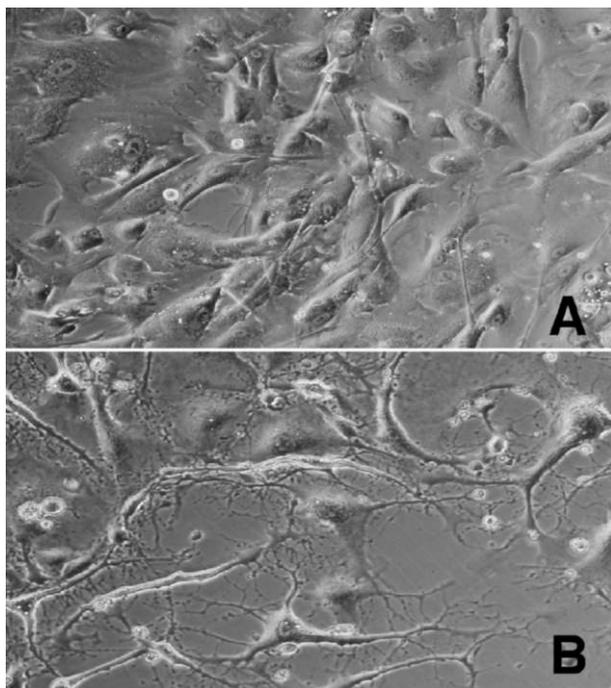


図 6 選択的 ROCK 阻害薬(Y-27632)による線維柱帯細胞の形態変化。

比較的粗(semi-confluent)に培養されたヒト線維柱帯細胞は、選択的 ROCK 阻害薬の負荷により、劇的に細胞形態が変化する。細胞質は、細胞核周囲に集まってくる、周辺部はむしろ狭小化して、最周辺部でかえって扇状に広がった形態をとる。

写真の線維柱帯細胞は、血清(10% fetal bovine serum, FBS)存在下で培養された状態(A)で、選択的 ROCK 阻害薬(100  $\mu$ M)を 30 分間負荷し(B)、位相差顕微鏡で撮影した。

を誘導する分子基盤を解析するために、細胞骨格や接着斑を免疫染色により解析した。免疫染色研究は、選択的 ROCK 阻害薬(Y-27632)の添加により、アクチンファイバーの再構成と細胞接着斑の分布変化が劇的な形で認められることを明瞭に描出しており、これらの変化は薬物除去により可逆的なものであった(図7)。また、アクチンファイバーの重合に関連する分子群を調べたところ、培養ヒト線維柱帯細胞において、LIM キナーゼや cofilin のリン酸化状態が ROCK 阻害薬により変化することで活性化されていた。一方、選択的 ROCK 阻害薬が細胞応答の制御に関わっていることは、培養ヒト線維柱帯細胞の細胞接着能や遊走能、ゲル収縮能などに濃度依存的に有意な影響を与えていることで判明した。しかしながら、これらの細胞レベルでの現象は、直接的な細胞死や増殖抑制効果は観察されないことから、不可逆的な細胞障害性によってもたらされたものではないといえる<sup>27)31)</sup>。つまり、ROCK シグナル伝達系の阻害は、恒常的な Rho 刺激による ROCK 以降の下流側に位置する関連分子群の活性化を抑制することで、細胞骨格再分布と接着斑の分布を変化させる一方で、細胞外基質との相互

関係を総和として強める方向に働く。これらが亢進した接着能や運動能といった基本的細胞性状の変化を誘導することで眼圧下降効果につながると考えられる。これらの変化は、あくまでも蛋白質リン酸化レベルでの変化であり、一時的かつ可逆的なものと考えられた。

#### 8) プロテインキナーゼ阻害薬の眼圧下降効果

一連の実験は、明瞭に選択的 ROCK 阻害薬の眼圧下降効果(房水流出抵抗軽減効果)を示していた。そこで、線維柱帯細胞の形態的变化・細胞骨格の変化が多面的に及ぶことから、他のプロテインキナーゼ阻害薬の眼圧に対する影響を解析してみた。特に、線維柱帯細胞におけるミオシン軽鎖リン酸化が眼圧制御に関連する可能性を考え、非選択的 ROCK 阻害薬でもあるプロテインキナーゼ阻害薬(HA 1077)と選択的ミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬(ML-9)について、選択的 ROCK 阻害薬(Y-27632)と同様の実験を行った。その結果、HA 1077 と ML-9 の両者とも、局所投与で家兔眼において有意な眼圧下降効果と房水流出抵抗軽減効果を認めた。培養線維柱帯細胞においても細胞形態の変化、細胞骨格の変化を認めており、ML-9 により培養線維柱帯細胞におけるミオシン軽鎖のリン酸化は阻害されるのがウエスタンブロット法により解明されている<sup>32)33)</sup>。つまり、我々は選択的 ROCK 阻害薬に限定することなく、線維柱帯細胞の細胞骨格再分布や接着斑形成などの基本的性状を薬理的に制御することは、可逆的な眼圧下降効果を得ることが可能であると認識するに至った。

#### 9) ROCK 阻害薬の眼組織に対する副次的影響

Rho-ROCK シグナル伝達系は、基本的には、多くの細胞タイプに普遍的に存在するシグナル伝達系であり、当然のことながら線維柱帯細胞以外の組織にも副次的な影響を及ぼすことが考えられる。眼圧に及ぼす影響については、毛様体筋の弛緩効果が挙げられる。毛様体筋組織を分離して、筋収縮能を計測できる系に載せた上で、前処置であらかじめ収縮しておいた実験系に、選択的 ROCK 阻害薬を負荷すると、濃度依存的に弛緩していく<sup>27)</sup>。さらに、虚血・再灌流網膜障害モデル眼においては、硝子体中に選択的 ROCK 阻害薬を投与すると、神経保護効果を認めた。ROCK 阻害薬の薬物動態を解析したところ、濃度的には低いのが、点眼投与された薬剤の一部は、(おそらくは経眼周囲組織的に)網膜視神経に到達しており、視神経循環を改善する副次的効果を認めたので<sup>34)</sup>、これらは上記の神経保護効果と関連している可能性はある。このように、Rho-ROCK シグナル伝達系の阻害は、神経保護効果とも関連している。これらは、網膜視神経に限局的な現象ではなく、中枢神経系である脳組織においても指摘される現象である。しかしながら、これらの副次的効果が、臨床的にどのような意義を有すると解釈すべきかについては、さらに霊長類眼や臨床研究によって検証されるべきであり、培養系や動物実

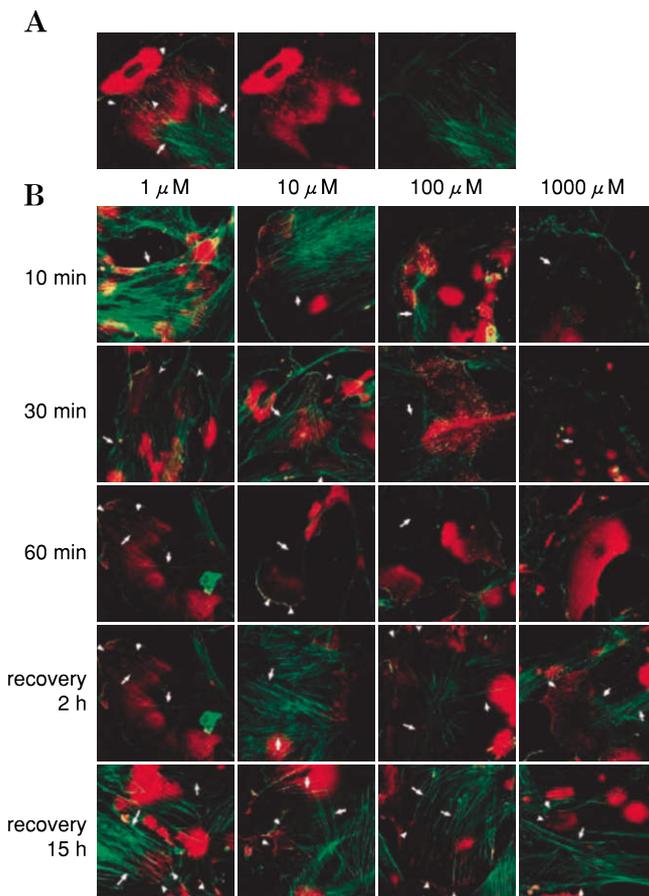


図 7 選択的 ROCK 阻害薬(Y-27632)による線維柱帯細胞の細胞骨格変化。(文献 27 より許可を得て転載) 線維柱帯細胞における細胞骨格の免疫染色は、血清刺激存在下では、F-アクチンのストレスファイバーを形成しているが、選択的 ROCK 阻害薬の負荷によって消失する。このアクチン再分布は可逆的なものであり、培養液から選択的 ROCK 阻害薬を除くと、元に戻る。一方、ビンクリンの局在で示される接着斑も、その分布パターンが変化するが、これも可逆的であった。

F-アクチンとビンクリンの免疫染色実験。

(A) 正常なヒト線維柱帯細胞における F-アクチン(緑)とビンクリン(赤)の分布。矢印は F-アクチン束、矢頭はビンクリンを含む接着斑を示す。なおビンクリン染色性で描出される接着斑は、赤色に点状染色を示している箇所に局在しており、べったりと染色される領域は非特異的染色とみなされる。

(B) 選択的 ROCK 阻害薬は、濃度条件を 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$  のそれぞれで負荷し、10, 30, 60 分間の経過時間後に線維柱帯細胞の免疫染色を行った。選択的 ROCK 阻害薬の負荷は、その後除かれて、通常の培養液(10% FBS を含む)に置き換えられ、さらに、2, 15 時間後に同様の免疫染色実験を行った。(A)と同様に、矢印は F-アクチン束、矢頭はビンクリンを含む接着斑を示す。

験での神経保護効果を拡大解釈して臨床的意義を論じるには、若干時期尚早であろう。実験動物眼に対して高濃度頻回点眼を行うと、結膜充血・出血が一部の実験動物眼に観察されており<sup>34)</sup>、高濃度での投与は、血管系への潜在的风险が考えられる。この観点からも、きわめて低濃度で直接的に点眼というドラッグデリバリー手法を有する眼科領域でこそ、安全な臨床評価に踏みきることができると思う。

#### 10) 眼圧下降の新しい薬物療法に関する可能性

我々の緑内障に対する新しい薬物療法の可能性を追求した研究戦略は、選択的 ROCK 阻害薬に到達した。現在、選択性と ROCK 阻害効果が増強された新しい RO-

CK 阻害薬(Y-39983)を用いた実験を行っているが、これらは有意な眼圧下降効果をサル眼において認めており、少なくとも臨床的に有効な眼圧下降効果を得られる濃度範囲では、細隙灯顕微鏡検査や光学的顕微鏡レベルでは、強い不可逆的な組織障害性は認めなかった<sup>34)</sup>。現在、厚生労働省に申請して、第一相の臨床試験が開始されている。その臨床的評価と安全性については、厳密な臨床試験により正しい評価が定まて行くであろうと考えられ、現時点で臨床的意義を過大に論じることは控えたい。

我々は房水流出路手術により、臨床医として緑内障に対する興味を持つようになった。その後、房水と流出路

の相互関係を制御することを願って、線維柱帯細胞の細胞外基質産生を解析し<sup>35)</sup>、遺伝子操作技術により制御することを考えた<sup>36)</sup>。しかしながら、房水流出路が霊長類眼と下等動物で大きく異なることが障壁となって、臨床に近づける研究展開を遂行できなかった。その後、ROCK 阻害薬という点眼で奏功し効果が可逆的である薬物療法へと到達した。我々の研究は、少なくとも一つの大きな臨床応用可能な眼圧下降薬物療法の開発につながったものと考えられる。我々は従来の臨床応用された眼圧下降治療薬の奏功機序とは異なり、直接的に線維柱帯細胞に作用することで有意な眼圧下降を得られることを証明できた。今後、線維柱帯細胞を直接的に薬剤で処理することで、ROCK 阻害薬以外の眼圧下降薬物療法が新しく開発されていくことを期待したい。我々の研究も含めてこれらの研究戦略は、歴史的に俯瞰すれば、1960年代に Grant を中心として展開された生理学的研究<sup>37)</sup>を揺籃として、1980年代以後に研究されていたキレート剤や細胞骨格修飾薬が細胞骨格、細胞形態に変化を及ぼし、房水流出を増大させることが解明された研究<sup>38)</sup>の潮流を引き継ぐ位置にあると考えるのが妥当であろう。当時、前房洗浄で房水流出抵抗を減少させることが可能であることが解明されて<sup>39)</sup>、臨床への応用が真剣に議論されていた。今回の研究が突破口となって、直接的な房水流出抵抗を薬理的に制御できる治療概念が始めて臨床的に有意な形で結実するかもしれない。

#### 11) 原発開放隅角緑内障(狭義)の病態を考察する

我々が取り組んできた房水流出路に関連した一連の臨床研究と基礎研究により得られた知見を含めて、原発開放隅角緑内障(狭義)の病態を今一度、検証してみたい。現在における緑内障の定義は、特徴的な視神経障害の機能と形態で規定されている。その上で、原発開放隅角緑内障(広義)を構成する2つの疾患概念(原発開放隅角緑内障(狭義)と正常眼圧緑内障)を識別するものは眼圧上昇であり、それは房水流出路異常に起因する。冒頭で述べたように、原発開放隅角緑内障(狭義)眼においては、房水中 TGF- $\beta$  濃度や soluble CD 44 の異常高値、線維柱帯細胞密度の減少、細胞外基質異常、シュレム管内皮細胞の形態変化、房水中酸化状態変化などの断片的知見が指摘されている。これらの異常所見は、それぞれが互いに別のグループに属しており、最終的に眼圧上昇という共通項を有する症候群が原発開放隅角緑内障(狭義)とみなすことが可能かもしれない。しかし、我々は Rho-ROCK 伝達系研究の知見を併せることで、原発開放隅角緑内障(狭義)の異常所見についての断片的知識は、一つの病態を異なる視点で観察しているにすぎない可能性についても言及しておきたい。

緑内障における血液房水関門の障害は、血液中の生理活性因子の房水への流入を惹起し、軽度の炎症応答を誘導する。我々は生理活性因子刺激や炎症応答に伴う酸

化ストレスの発生が、線維柱帯細胞に対して、CD 44 の自己切断を誘導し、細胞-基質間の接着を解離することを認めたが、CD 44 は細胞の遊走能を規定する重要な分子である。緑内障の房水中に観察される soluble CD 44<sup>17)</sup>は、したがって、緑内障の原因であるよりも、ストレス下に置かれた線維柱帯細胞の応答で生じる自らの CD 44 の切断による結果であるとみなせる。上記したように、房水中の生理活性因子、特に Rho-ROCK 伝達系を起動させる因子群は、線維柱帯細胞の細胞-基質間の接着能を低下させ、遊走性に従って容易に脱落していく。この仮説により、房水組成の異常(生理活性因子と CD 44)、線維柱帯細胞密度の低下、房水中酸化ストレスマーカーは、ある特定の異常状態を異なる複数の視点で観察しているということになる。さらに、血液房水関門障害で生じる生理活性因子の濃度上昇や酸化ストレスは、細胞外基質産生の異常を誘導し、ストレスに伴う細胞外基質のリモデリングは、創傷治癒や炎症機転できわめて普遍的に観察される現象である。このようなストレス状態における多面的な異常の相互関係は、生体においてきわめて普遍的な現象であると考えられる。実際に、我々は後述するように、網膜色素上皮細胞の研究を通じて、酸化ストレス/生理活性因子刺激-細胞形質転換-CD 44 自己切断-細胞脱落・遊走という全く同一の病態の連鎖が、眼内増殖病変の病態を説明できることを知った。したがって、今後の我々の研究戦略は、これらの断片的知識の統合を実際の研究データで実証していくことになる。

#### 12) 我々に残された重要な研究課題

房水流出抵抗は、主にシュレム管内皮と線維柱帯管内皮網に存在することが Grant<sup>37)</sup>により証明されてから、既に半世紀近い年月が過ぎた。個人的推論を許されるのであれば、Tripathi が唱えた巨大空胞(giant vacuole)仮説<sup>20)</sup>は、水の輸送に伴う圧差の発生が密着結合(tight junction)を有する単層上皮(シュレム管内皮)という隔壁に負荷されることで生じる受動的な現象である可能性が高いと考えている。いずれにせよ、古典的形態学で提唱された巨大空胞仮説は、現在の分子細胞生物学的手法を用いて、分子基盤のレベルで再検証される必要がある。近年の生理学的研究における進歩は、アクアポリン分子による水輸送という分子基盤を解明し、古典的形態学に基づいた仮説は既に大幅に訂正されている。眼圧調整機構については、多くの未解決の問題が残されているが、シュレム管内皮と線維柱帯細胞の相互関係、および細胞外基質も含めての房水流出路全体の制御機構について、その全体像の分子基盤を解明しなければならない。我々はシュレム管内皮細胞の培養に着手し、今後は分子レベルでの水輸送の解明に取り組んでいくことになる。

## 2. 単一遺伝子変異による続発緑内障

1) 分子遺伝学研究により解明された緑内障分子基盤  
 緑内障の分子基盤を考える上で、大きな研究潮流の転換点は、分子遺伝学的研究によって、緑内障原因遺伝子が解明されたことであろう。連鎖解析の手法で、染色体上の局在が同定された緑内障原因遺伝子のいくつかは単一遺伝子に到達しえた。その最初は、原発開放隅角緑内障(広義)の原因遺伝子として、ミオシリン/線維柱帯誘導性グルココルチコイド反応蛋白(trabecular meshwork-induced glucocorticoid response protein, TIGR)<sup>5)</sup>、オプチニューリン(optineurin)<sup>40)</sup>があり、発達緑内障についてはチトクロム P4501B1(CYP1B1)が報告<sup>41)</sup>された。これらの遺伝子変異による緑内障は、日本人患者においても発見されており、我々が共同研究者として係わった真島らの分子遺伝学的研究においても、遺伝子変異による緑内障患者の存在が確認された<sup>42)~45)</sup>。今後は臨床所見に加えて、遺伝子診断による緑内障診療が普及していくと考えられる。遺伝子変異により惹起される緑内障の中で、我々が特に研究対象として認識し、積極的に取り組んだのが家族性アミロイドポリニューロパシー(familial amyloidotic polyneuropathy, FAP)である。

### 2) 家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)の分子基盤

FAP は、トランスサイレチン(TTR)の遺伝子変異が原因の常染色体優性遺伝性疾患であり、末梢神経および種々の臓器に異型 TTR から形成されたアミロイドが沈着し、多様な病態を示す<sup>46)</sup>。世界的にはスウェーデン、ポルトガル、日本が代表的な集積地であり、我が国においては熊本と長野が大きな集積地となっている。しかし、近年集積地と関連のない患者が各地に散在性に存在することが明らかになってきている。TTR は、プレアルブミンという別名を有しており、ビタミン A 輸送などにかかわる。TTR は、正常であると、四量体を形成して、安定な高次構造を維持することができる。一方、FAP の原因遺伝子となる変異 TTR においては、この高次構造が不安定化することで解離されていき、二量体、一量体へと分解され、この一量体が異常重合することで、アミロイド形成に至る。TTR は、全身代謝では、主に肝臓で生成されることから、重篤な FAP 患者に対しては、積極的に肝臓移植が施行されており、劇的に全身管理が改善しつつある<sup>47)</sup>。実際に、生体肝移植後の患者血清を解析すると、血中異常 TTR レベルは、劇的に解消される。異常アミロイド沈着が進行すると、多臓器不全に至り、最終的には死を迎える。

### 3) 家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)の眼合併症

FAP 患者において、多彩な眼合併症が生じることが知られている。我々の臨床調査<sup>48)49)</sup>によると、FAP 眼

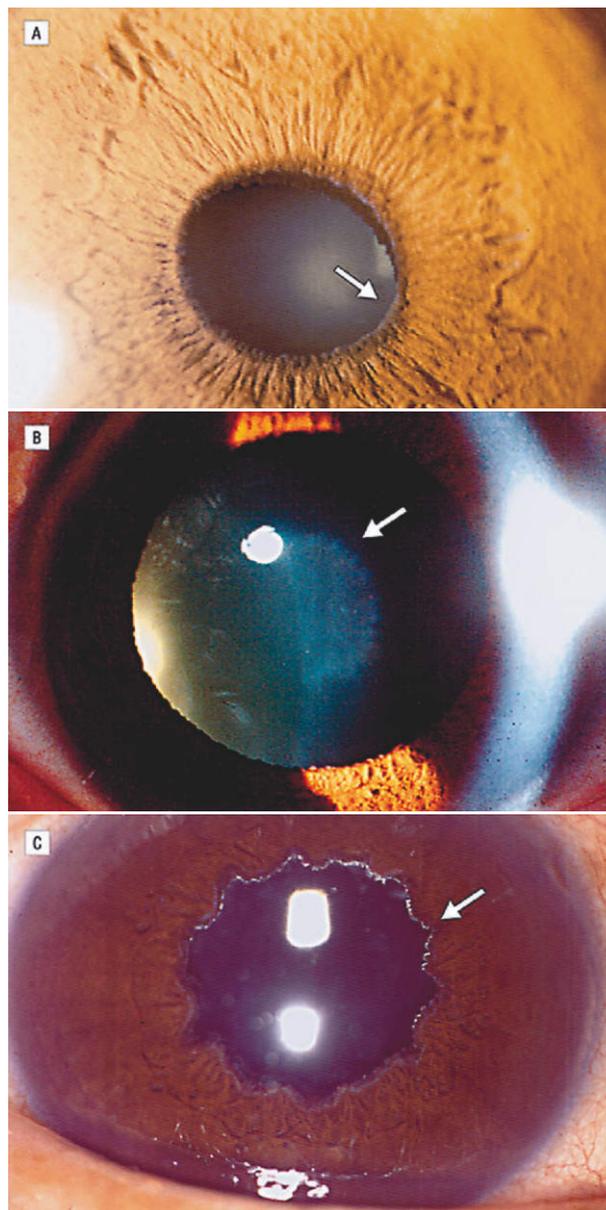


図 8 アミロイドーシスに関連した眼合併症所見。(文献 48 から許可を得て転載)

典型的な前眼部でのアミロイド沈着とそれに伴う異常としては、瞳孔縁や水晶体表面上における白色のアミロイド沈着が観察される。また落屑緑内障との鑑別点の一つとして、瞳孔異常があり、fringed pupil と呼称される脱円して金平糖様の瞳孔変形を認める。

A: 瞳孔縁アミロイドの沈着(矢印) B: 水晶体表面のアミロイド沈着(矢印) C: 瞳孔異常(frined pupil)(矢印)

合併症は、結膜血管異常(61%)、乾性角結膜炎(60%)、硝子体混濁(35%)、瞳孔縁アミロイド沈着(31%)、緑内障(20%)、瞳孔異常(frined pupil)(8%)であった(図 8, 9)<sup>49)</sup>。眼合併症の出現(表現型)は、遺伝子型による影響を受けており、アミロイド原性トランスサイレチン(amyloidogenic TTR, ATTR) Thy114Cys 型患者は、ATTR Val30Met 型患者よりも高頻度に重篤な眼合併

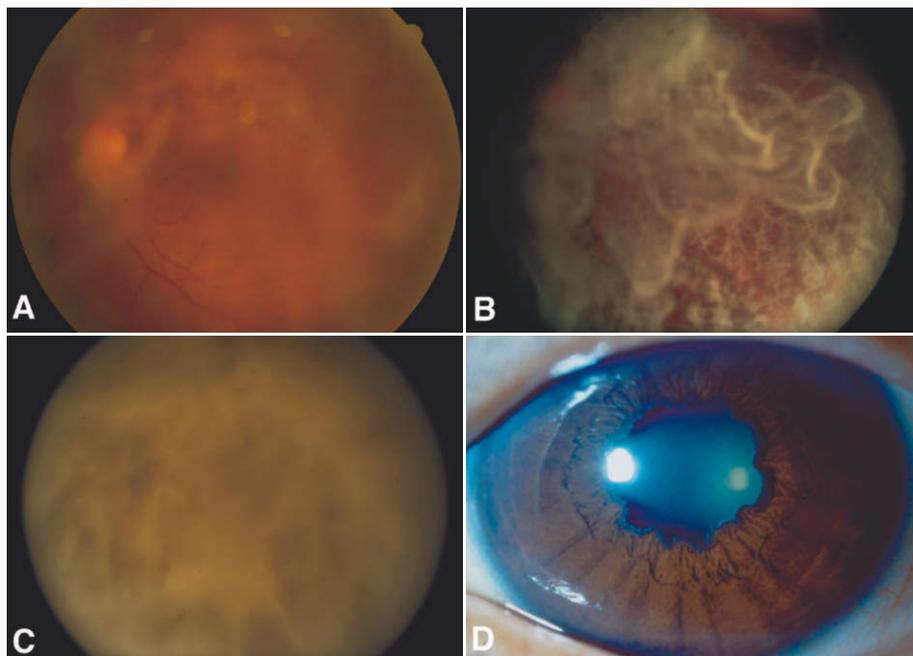


図 9 アミロイドーシスに関連した硝子体混濁。(文献 49 から許可を得て転載)

硝子体混濁は、アミロイドの異常沈着により惹起される所見であり、軽度であれば飛蚊症が出現する程度であるが、増悪するにつれて、重篤な視力低下を惹起する。

A：軽度の硝子体混濁 B：“綿花様”あるいは“ガラスウール様”と表現されるような中等度の硝子体混濁 C：眼底が透見できなくなる程の重度の硝子体混濁 D：白色のアミロイド沈着を伴う不規則な瞳孔縁

症を認めることが多い。硝子体混濁の出現時期も、AT-TR Val30Met 型患者より ATTR Thy114Cys 型患者では、有意に若年で重篤な眼合併症を発症する。全身症状と眼合併症の出現時期も ATTR Val30Met 型患者においては数年の期間が存在するが、ATTR Thy114Cys 型患者では全身症状が出現した時点では全例に眼合併症を認めた<sup>49)</sup>。視力低下に最も影響を与える合併症は、硝子体混濁と緑内障であり、重篤な患者においては手術治療の対象となる。硝子体混濁に対しては、初期は飛蚊症が出現し、その後霧視を伴う視力低下に至る。硝子体混濁は、硝子体切除術を施行することで除去することが可能であり、網膜疾患を併存していなければ、我々の臨床統計では患者の 93% に視力改善を得ることができた<sup>49)</sup>。

手術的に切除・採取した硝子体標本を解析してみると、混濁の本質は、眼内での異常アミロイド沈着であることがわかる。しかしながら、生体肝移植を代表とする全身管理の劇的な向上により、寿命延長が可能になったことで、今後は、アミロイドの再沈着が大きな臨床上の課題となることが推測される。実際に、我々は硝子体手術後に再発する硝子体混濁を経験した(表 2)<sup>49)</sup>。生体肝移植後の血液中 TTR の改善と眼内環境における恒常的な異常 TTR 産生という解離現象は、眼内局所での異常 TTR 産生の存在を意味する。実際に、我々は肝移植後、血清中の TTR が正常化された時点でも、房水標本を解析すると、異常 TTR が存在することを確認し

た<sup>50)51)</sup>。肝臓以外にも網膜色素上皮や脳脈絡叢は TTR を産生し、眼合併症や中枢神経系の症状を悪化させることがある<sup>52)53)</sup>。我々が経験した肝移植後に進行した硝子体混濁の本態は、やはり異常アミロイド沈着であった<sup>53)</sup>。他方、硝子体混濁は軽度であるのに、前眼部のアミロイド沈着が著明な緑内障発症例を経験しており、これらは、前眼部に局在するアミロイドが必ずしも経硝子体的に由来するものだけではないということを示唆するものと考えた。そこで、さらに詳細に房水中 TTR の由来を解析することにした。我々は動物眼における *in situ* ハイブリダイゼーションおよび reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)実験による mRNA 発現状況の解析によって、眼内では網膜色素上皮と毛様体上皮において発現されていることを解明した<sup>54)</sup>。他方、硝子体混濁などの眼内アミロイド沈着は、全身症状に先行する例もあることから、詳細な眼科診療は重要である<sup>55)</sup>。FAP 患者においては、肝移植によって全身症状の進行は抑制できるが、眼内局所での異常 TTR が産生され続けるために、硝子体混濁や緑内障などの眼症状は進行を継続して、患者の quality of life を低下させることは、より重大な臨床的問題となってきた。

#### 4) FAP の続発緑内障の分子基盤

FAP 患者における続発緑内障の発症は、瞳孔縁のアミロイド沈着や硝子体混濁と有意に関連することから、

表 2 肝移植後の眼合併症の変化(文献 53 から許可を得て転載)

No.	Age	Sex	Point of mutation	Before				After			
				P	K	G	V	P	K	G	V
1	35	M	Val 30 Met	-	-	-	-	-	-	-	-
2	38	M	Val 30 Met	-	+	-	-	+	+	-	-
3	46	F	Val 30 Met	-	-	-	-	+	-	+	+
5	52	F	Val 30 Mett	-	+	-	-	+	-	+	+
8	49	M	Val 30 Met	-	+	-	-	-	+	-	-
10	33	F	Val 30 Met	-	+	-	-	-	+	-	-
12	33	M	Val 30 Mett	-	-	-	-	-	-	-	-
13	31	F	Val 30 Met	-	-	-	-	-	-	+	-
15	38	F	Val 30 Met	-	+	-	-	-	+	-	-
16	61	M	Val 30 Met	+	+	-	-	++	+	-	-
17	50	F	Tyr 114 Cys	+	-	+	+	+	-	++	+
18	35	F	Try 114 Cys	-	-	-	+	-	-	-	++
25	31	F	Val 30 Met	-	+	-	-	-	+	-	-

家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)に伴う眼合併症は、肝移植後であっても悪化し得る。緑内障や硝子体混濁が肝移植後に発症した患者も認めた。  
 P, 瞳孔異常(pupillary disorders); K, 乾性角結膜炎(keratoconjunctivitis sicca); G, 緑内障(glaucoma); V, 硝子体混濁(vitreous opacity)  
 Age; 年齢, Sex; 性別, Point of mutation; 原因遺伝子であるトランスサイレチンの遺伝子変異, Before; 肝移植前の眼合併症, After, 肝移植後の眼合併症, M; 男性, F; 女性。

眼内アミロイドによって惹起されると推定できる。FAP 患者では、瞳孔縁アミロイド沈着を認める患者では 57% が緑内障を発症するのに対して、瞳孔縁アミロイド沈着を認めない患者ではわずか 3% にすぎない。同様に、硝子体混濁の存在もきわめて有意に緑内障発症に相関する(表 3)<sup>48)</sup>。また、遺伝子型によっても緑内障の出現頻度は異なる(表 4)<sup>48)</sup>。FAP に関連した続発緑内障眼の病理解析を行うと、眼血管系にアミロイド沈着による血管病変が出現している。また、網脈絡膜血管を臨床的に観察していく過程で、アミロイド沈着による閉塞性血管病変が劇的な形で進行していくことを確認することがあり、我々は「眼アミロイド血管症」の概念を提唱した<sup>50)</sup>。したがって、眼圧上昇(房水流出抵抗亢進)は、上強膜静脈系へのアミロイド沈着による静脈圧亢進と、線維柱帯細胞内外へのアミロイド沈着による流出異常の二つの可能性が考えられる<sup>50)</sup>。緑内障に対して、通常の緑内障薬物療法はある程度の奏功を見せるが、残念なことに、すべての患者において眼圧をコントロールすることはできない。手術施行した FAP 関連の続発緑内障患者数は限定的ではあるが、線維柱帯切開術や非穿孔性線維柱帯切除術は、ごく短期間の一時的な眼圧下効果にもかかわらず、穿孔性にマイトマイシン C(MMC)併用線維柱帯切除術を行うことが最も妥当であると判断した<sup>48)</sup>。しかし、その長期成績を解析すると、一旦形成された濾過胞は、数年後には被胞化された濾過胞(encapsulated bleb)の形態を伴う眼圧再上昇を生じることが多く、複数回の手術治療を必要とすることがあると判明した。FAP 患者の緑内障手術後の病理標本では、結膜内

表 3 アミロイドーシスに関連した眼合併症と緑内障の出現頻度(文献 48 から許可を得て転載)

Ocular Symptom	Eyes, No. (%)	Glaucoma in Each Ocular Manifestation, No. (%)
ACV	60 (61)	12 (20)
KGS	59 (60)	15 (25)
Vitreous opacity	35 (35)	17 (49)*
Amyloid deposition on the pupil	30 (31)	17 (57)*
Fringed pupil	8 (8)	8 (100)*
Glaucoma	20 (20)	

FAP に伴う眼合併症としては、出現頻度の高い順で言うと、結膜血管異常(61%)、乾性結角結膜炎(60%)、硝子体混濁(35%)、瞳孔縁アミロイド沈着(31%)、緑内障(20%)、瞳孔異常(fringed pupil)(8%)であった。このうち、緑内障の出現と統計的に有意な相関を認めたのは、硝子体混濁、瞳孔縁アミロイド沈着、瞳孔異常(fringed pupil)の三所見であり、いずれもアミロイドの眼内沈着と直接的に関連する。ACV; 異常結膜血管(abnormal conjunctival vessel), KCS; 乾性角結膜炎(keratoconjunctivitis sicca), Vitreous opacity; 硝子体混濁, Amyloid deposition on the pupil; 瞳孔縁に観察されたアミロイド沈着, Fringed pupil; 脱円した瞳孔異常, Glaucoma; 緑内障, FAP; 家族性アミロイドポリニューロパシー(familial amyloidotic polyneuropathy), Glaucoma in Each Ocular Manifestation; それぞれの眼合併症における緑内障の出現頻度。  
 \*p<0.001

に異常アミロイド沈着が観察され、アミロイド沈着に伴う異常な創傷治癒機転の亢進が、このような長期合併症を惹起すると推測される。上記のように、たとえ生体肝移植後であっても、房水中には毛様体(または網膜色素

表 4 家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)の遺伝子型と緑内障の出現頻度。(文献 48 から許可を得て転載)

Mutation	No. of Patients	Incidence, %	Mean Age at Onset of Systemic Disease, y	No. of Patients with Glaucoma	Incidence of Glaucoma in Each Type of FAP, %
Val 30 Met	41	84	38.4	7	17
Tyr 114 Gys	6	13	37.0	3	50
Ser 50 lle	1	2	50	1	100
Val 30 Met+ Arg 104 His	1	2	54	1	100
Total	49		38.8	12	24

FAP の原因遺伝子であるトランスサイレチン遺伝子変異によって、緑内障の出現頻度は異なっており、Val 30 Met 型(トランスサイレチンにおける 30 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに置換された変異)では緑内障が患者の 17% にしか認めなかったのに対して、他の遺伝子型では高頻度に緑内障を認めた。

Mutation; 原因となるトランスサイレチンの遺伝子変異, No. of Patients; 患者数(例), Mean Age at Onset of Systemic Disease; 全身症状の発症年齢, No. of Patients with Glaucoma; 緑内障を合併した患者数(例), Incidence of Glaucoma in Each Type of FAP; FAP のそれぞれの遺伝子型における緑内障発症率

上皮)由来の異常 TTR が含有されており、肝移植未施行であれば、これに加えて血清由来の異常 TTR が病態に関与してくる。これらが、結膜へのアミロイド沈着を進行させ、異常な創傷治癒機転が遷延することになると推測される。

#### 5) FAP の続発緑内障に対する分子基盤に基づいた薬物療法の可能性

現在の FAP に対する治療法の主流は肝移植であり、その導入により FAP 患者の生命予後は飛躍的に向上している。これは TTR の 90% 以上が肝臓で産生されているためであるが、肝移植のドナー不足や患者の精神的・身体的・経済的負担、手術に関連する合併症などいくつかの問題があり、新たな治療法の開発が望まれている。さらに上記したように、眼合併症の進行を抑制させるためには、毛様体や網膜色素上皮における局所産生を制御しなければならない。そこで我々が取り組んでいるのが、遺伝子操作技術を用いて、変異 TTR を *in vivo* で健常 TTR 遺伝子に組み換える治療の開発である。遺伝子操作技術については、FAP が常染色体優性遺伝形式の遺伝子病であることから、健常遺伝子を遺伝子導入するだけでは治療効果が期待できず、変異遺伝子を健常遺伝子で組み換えることが必要となる。我々は、新たな治療法の一つとして、single-strand oligonucleotides (SSOs) による遺伝子組み換え治療に取り組んでいる。アテロコラーゲンに包埋した SSOs を培養細胞に添加し、常染色体遺伝子組み換えを生じて、mutant allele specific amplification (MASA) 法を用いて遺伝子組み換え率を算定したところ、約 27% の TTR 遺伝子組み換えを認めた。また、FAP トランスジェニックマウスの肝臓に注入したところ、組み換え率は約 10% であった<sup>57)</sup>。しかし同じ手法を家兎眼に用いて、アテロコラーゲンに包埋した SSOs を硝子体内に注入し、1 週間後に眼球摘出し、網膜色素上皮における TTR 遺伝子組み換え率を評価したが、硝子体手術後に 1% アテロコラーゲン+SSOs を注入した系で、約 1% の遺伝子変換を認

めるにとどまっていた。これらの結果から、眼組織に対しては、肝臓細胞に対するよりも遺伝子組み換え効率が低く、なお手法の改善が必要となる。

### 3. 緑内障に対する神経保護薬物療法の開発

#### 1) 「緑内障」という疾患概念の変遷

日本緑内障学会から緑内障診療ガイドラインが発表され、緑内障は「視神経乳頭、視野の特徴的変化の少なくとも一つを有し、通常、眼圧を十分に下降させることにより視神経障害の改善あるいは進行を阻止し得る眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患である」と定義された<sup>58)</sup>。つまり「緑内障」という眼疾患は、特徴的な視神経障害により規定される。これは、国際的な緑内障の疾患概念に関するコンセンサスを受けたものである。多治見スタディを代表とする日本における緑内障疫学調査によって、視神経障害を生じている時点での(推定される)眼圧レベルが統計学的に正常範囲内にある、いわゆる正常眼圧緑内障が圧倒的に多いという事実によって支持される<sup>59)</sup>。すなわち、旧来の「眼圧上昇(異常)によってもたらされる視神経障害」という単純な解釈は、「特徴的な視神経障害の形態と機能を有する症候群」と変貌した。さらに、正常眼圧緑内障は、「眼圧が低いにもかかわらず緑内障に至る特殊なケース」ではなく、むしろ「日本における最も頻度が高く代表的な緑内障病型」とみなすことが自然となった。これを受けて、緑内障診療ガイドラインでは、正常眼圧緑内障と原発開放隅角緑内障(狭義)を区別する明確な臨床検査がないことを指摘した上で両者の疾患概念を統合する原発開放隅角緑内障(広義)という疾患カテゴリーを新しく設けた。しかし緑内障学を堅固な基盤で構築するためには、特徴的な視神経障害の有無で、緑内障という疾患概念を規定する場合、我々は偽緑内障と明確に鑑別し得る「緑内障視神経症」の本質を詳細に論じなければならないであろう。

#### 2) 緑内障視神経障害に関連した最近の知見と概念

緑内障視神経障害については、成因論として、眼圧上昇による視神経への直接的な機械的圧迫に伴い視神経障

害が生じるという機械障害説 (mechanical theory) と、視神経乳頭部での循環障害に起因しているという血管障害説 (vascular theory) が対立的に議論されてきたという歴史がある<sup>60)</sup>。しかし、前者は、軸索輸送を含む神経科学的研究手法や病理学的研究により、また、後者は一連の臨床研究を含む多彩な研究手法により、その妥当性が証明されている。二者択一的論争によって論じられた歴史を尊重しながらも、上記のような「緑内障」という疾患概念を機能的・形態的な特徴を共通する症候群であるという考え方を受け入れるならば、軸索障害であれ血管障害であれ、どちらが契機となったとしても、結果として類似の視神経障害の特徴を生じたのであれば、現時点では緑内障と認定せざるをえない。また両者は互いに関連して、複合的に病態を増悪させていくために、個人的には、両者の障害メカニズムを複合的に有する折衷的な視神経障害の可能性が最も高いと考えている。緑内障視神経障害は、現時点の定義に従う限り、一元的な病因論で語るよりは、特徴的な視神経障害の機能と構造を共通項として論じる他はない。近年の神経科学の進歩により、機械障害説と血管障害説の論争で始まった病因論は、それらを統合する形で、眼圧非依存的因子群の関与を含めて、網膜神経節細胞死の病態への位置づけを論じるようになった。

### 3) 緑内障視神経障害に関連する眼圧非依存的因子群あるいは副次的視神経障害機序

眼圧非依存的因子群として緑内障に関連すると推測されているのが、特に虚血性要因に関連して生じるグルタミン酸代謝、免疫、一酸化窒素 (NO)、フリーラジカル、神経栄養因子の供給途絶などである<sup>61)</sup>。さらに、眼圧上昇に惹起される形で、軸索輸送障害に加えて、視神経細胞外マトリックス変化、視神経グリア細胞 (アストロサイトなど) の応答、神経栄養因子 (とその受容体) の逆行性輸送の停滞、ストレス応答蛋白誘導、グルタミン酸神経毒性などが視神経障害を修飾する<sup>62)</sup>。最近の緑内障視神経障害においては、眼圧依存的因子が初発病変となることで、篩状板近傍での局在性を反映する形で、網膜神経節細胞のストレスが遷延し、これに加えて眼圧非依存的因子群が、(多くの場合は必ずしも局在性を反映しないながらも) ストレス状況を増悪させて、最終的にはアポトーシスによる細胞死に至ると考えることができる<sup>63)</sup>。近年、緑内障性視神経障害に自己免疫が関与することを示唆する知見が報告されている。最近の免疫学的研究において、緑内障眼、特に正常眼圧緑内障において、眼内自己抗原に対する認識抗体の血中抗体価上昇が認められ<sup>64)</sup>、視神経障害と関与している可能性が指摘される一方で、免疫応答による神経保護効果も示唆されている<sup>65)</sup>。このような免疫学的偏りが神経障害に対する功罪については慎重に議論される必要がある。いずれにせよ、緑内障への免疫応答の関与は、病態面のみでなく治

療への応用面からも関心がもたれている。

### 4) 緑内障視神経障害に対する我々の研究戦略

緑内障視神経障害の分子基盤を考える場合、前述の「緑内障」という疾患概念の変遷を受け止めた上で検証することが必要となる。今後の緑内障視神経障害および神経保護薬物の開発研究に関する方向性は、眼圧依存的因子と眼圧非依存的因子群を明確に区別して検証することが重要になると考えた。また、現在知られている緑内障モデルの作製手法は、比較的急激に眼圧上昇をレーザーや血管凝固などで促す急性期モデルが多く、炎症応答などの眼圧上昇以外の要因を含む。さらに霊長類眼以外では、房水流出路や視神経構築が異なるために、実験データの解釈には慎重な態度が必要である。我々は、特に眼圧非依存的因子による網膜神経節細胞のアポトーシス細胞死に着目した。そこで、複数の眼圧非依存的障害モデル眼を用いた動物実験によって、緑内障視神経障害の一面を検証することに踏み込んだ。主として用いた実験モデル眼としては、再現性が高く、緑内障視神経障害に関連し得る眼圧非依存的因子に直接的に関係するグルタミン酸受容体のアゴニストとなる N-methyl-D-aspartate (NMDA) (あるいはカイニン酸 (kainic acid, KA)) 注入モデル眼と虚血・再灌流モデル眼であった。これらのモデル眼において、網膜神経細胞死の病態にある分子基盤を解明することで、新しい薬物療法の概念である神経保護治療薬の開発を目指した。

### 5) 緑内障眼における網膜のストレス応答

我々が「神経保護」という概念に着目したきっかけは、実験的緑内障モデル眼で行った一連の研究であった。高眼圧を惹起することで作製する実験的緑内障モデル眼にはいくつかの種類が報告されているが、現時点で最もヒトの緑内障を反映していると考えられるのは、サル眼隅角に対してレーザー光凝固を施行して作製する高眼圧モデル眼である。我々は、このモデル眼において、網膜視神経におけるストレス応答を免疫染色実験および網膜の RT-PCR (逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応) 実験で解析したところ、グリア細胞活性化マーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) が mRNA レベルと蛋白レベルの両方で発現上昇していることを認めた (図 10)<sup>66)</sup>。すなわち、網膜神経節細胞が選択的に細胞死に陥るはずの実験的緑内障モデル眼において、網膜全体のグリア細胞系 (特にミュラ細胞) が波及的に活性化されていることを示していた。この発見は、その後、ヒト緑内障眼においても、同様の知見が報告<sup>67)</sup>された。さらに、我々の実験的緑内障モデル眼における予備的解析では、いくつかの神経栄養因子やサイトカインなどの発現上昇が示唆された。これらの緑内障モデル眼における研究が、我々が緑内障に対するストレス応答に関心を寄せるきっかけとなった。

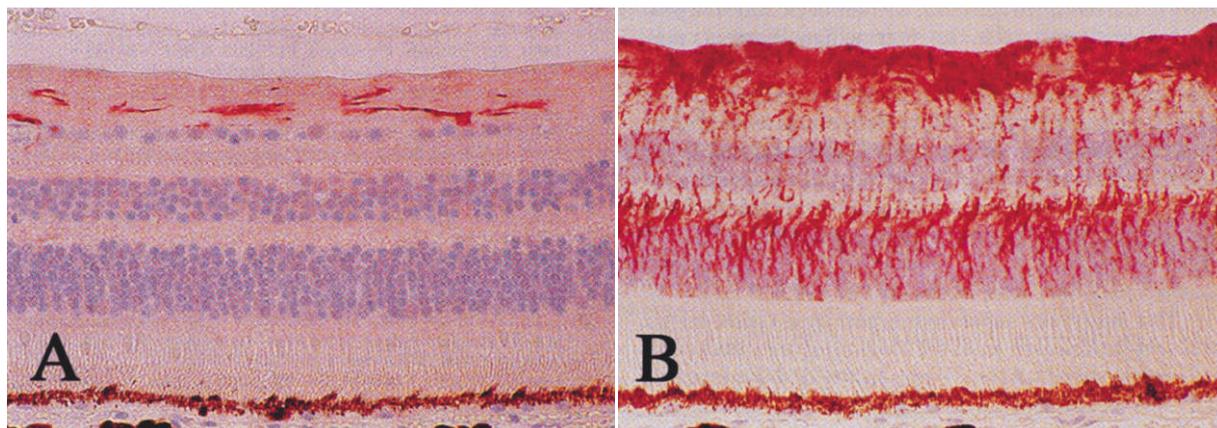


図 10 実験的緑内障モデル眼におけるグリア細胞マーカー分子の発現上昇。(文献 66 より許可を得て転載) 免疫染色は、実験的緑内障モデル眼における GFAP (glial fibrillary acidic protein) の発現上昇を示している。網膜神経節細胞が選択的に障害されると考えられている実験的緑内障モデル眼であるにもかかわらず、網膜グリア細胞系は、ミュラ細胞を含めて網膜全体で活性化が波及している (B)。対照眼では、軽度の GFAP 染色性がわずかに神経線維層に観察される程度である (A)。

#### 6) 網膜障害時のグリア細胞におけるストレス応答と「神経保護」

眼圧非依存的因子による緑内障モデル眼として、グルタミン酸受容体を介した網膜障害モデル眼において、グリア細胞におけるストレス応答を解析したところ、実験的緑内障モデル眼と同様に、ミュラ細胞を中心とした網膜グリア細胞系において GFAP の発現上昇を認めた<sup>68)</sup>。これは、緑内障や NMDA 注入モデル眼に限定的な現象ではなく、虚血や網膜変性などの多彩な網膜障害において同様のグリア細胞活性化が観察できる<sup>69)70)</sup>。すなわち、グリア細胞系の活性化は、網膜障害に対して、非特異的に生じるストレス応答であるといえる。それでは、その病態に対する影響はどのようなものか。我々が解析した中で、顕著な変化を生じたものは、毛様体由来神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) であった (図 11)。免疫染色で描出される CNTF の発現上昇のパターンは、GFAP のそれと一致するものであった (図 12)<sup>68)</sup>。活性化されたグリア細胞は、一部の神経栄養因子を同時に発現誘導されることがわかる。CNTF の蛋白レベルでの発現上昇は、免疫染色とウエスタンブロットの 2 つの実験により証明された (図 13)。次に、CNTF の網膜障害に対する影響を形態計測の手法を用いて解析したところ、NMDA およびカイニン酸の硝子体内注入モデル眼のそれぞれに対して、網膜神経節細胞と内顆粒層の網膜細胞数において、有意な神経保護効果がみられた (図 14)<sup>68)</sup>。このように、神経栄養因子の一部は、逆行性軸索輸送により運ばれてくる以外にも、網膜局所での産生により、オートクラインやパラクラインの機序で神経保護効果を発揮する可能性が示唆された。また、このような実験結果は、ストレス応答で誘導される神経保護性因子を外的 (経硝子体) に投与することで、神経保護薬物療法の候補薬をスクリーニングすることに

もなり得ると考えた。

#### 7) 生理活性因子の網膜障害に対する神経保護作用

我々が神経保護効果の研究に取り組んだ生理活性因子を列挙すると、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)<sup>71)~73)</sup>、IL-1 $\beta$  とそのアンタゴニスト (IL-1 $\beta$  and IL-1 antagonist)<sup>74)75)</sup>、IL-6<sup>76)</sup>、水晶体上皮由来成長因子 (lens epithelium-derived growth factor, LEDGF)<sup>77)</sup>、エリスロポイエチン<sup>78)</sup> などであった。これらは、いずれもがある動物実験の条件下では、網膜神経節細胞 (および内顆粒層の網膜細胞) に対して神経保護効果を示した。しかし、それぞれが異なる特徴と分子機構を経て、その保護効果を生じていた。CNTF は、前述のように、グルタミン酸網膜障害におけるストレス応答時のグリア細胞活性化に伴った網膜内で局所産生された (図 11)<sup>68)</sup>。これ以外では、例えば、BDNF は、緑内障視神経障害の病態においては、逆行性軸索輸送で供給される神経栄養因子であるが、これは硝子体内投与によって、化学的虚血、虚血・再灌流網膜障害、NMDA 誘導性 (グルタミン酸受容体の介した) 網膜障害などに対して、神経保護的に奏功する<sup>71)~73)</sup>。IL-1 $\beta$  は、時間経過に従って複雑に、網膜に対する障害効果と保護効果の両面性を有しており、IL-1 $\beta$  刺激によるサイトカインネットワークの刺激に伴う間接的な神経保護効果が示唆された<sup>74)</sup>。IL-6 については、虚血網膜障害に対する神経保護効果は、単独投与では効果が弱く、その受容体とのコンビネーション投与によって、有意な神経保護効果を生じた (図 15)<sup>76)</sup>。LEDGF は、前処置として 2~7 日前に投与しておくことで神経保護効果を示しアポトーシス細胞の出現を抑制する<sup>77)</sup>。LEDGF の投与は、熱ショック蛋白質 (HSP 25) や  $\alpha$ B-クリスタリンなどの分子シャペロンを誘導し、アポトーシスに関連する酵素群に影響を与えることが、神経保護効果に関係す

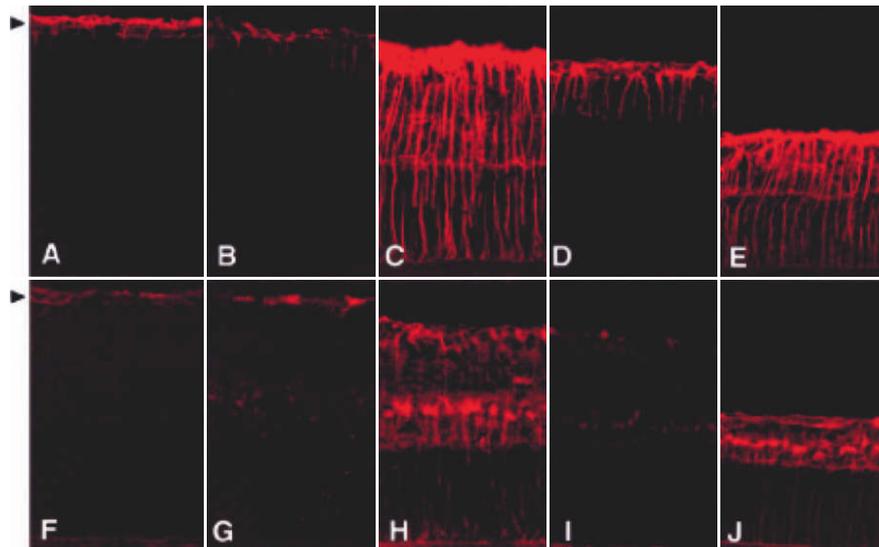


図 11 グルタミン酸受容体を介した網膜障害モデル眼における神経栄養因子の発現上昇。(文献 68 より許可を得て転載)

N-methyl-D-aspartate(NMDA)誘導性およびカイニン酸(kainic acid, KA)誘導性の網膜障害モデル眼において、ミュラ細胞を中心とした網膜グリア細胞系において GFAP(glial fibrillary acidic protein)の発現上昇を認めた。

矢頭は、神経線維層(nerve fiber layer, NFL)を示す。

A~E, 光学顕微鏡写真は、GFAP の免疫染色性を示す。A, 溶媒(phosphate buffered saline, PBS)-注入された対照眼; B, NMDA(200 nmol)注入後 3 日目; C, NMDA(200 nmol)注入後 7 日目; D, KA(5 nmol)注入後 3 日目; E, KA(5 nmol)注入後 7 日目

F~J は、CNTF の免疫染色性を示す。F, 溶媒(PBS)-注入された対照眼; G, NMDA(200 nmol)注入後 3 日目; H, NMDA(200 nmol)注入後 7 日目; I, KA(5 nmol)注入後 3 日目; J, KA(5 nmol)注入後 7 日目

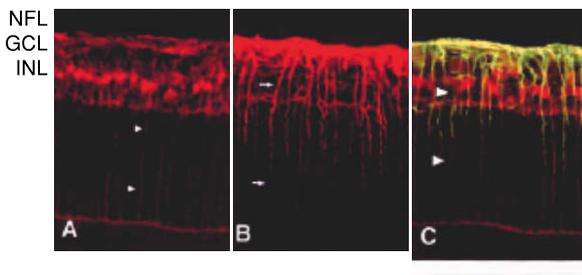


図 12 グリア細胞マーカー分子と神経栄養因子の発現局在の合致。(文献 68 より許可を得て転載)

カイニン酸(KA)注入眼において作製した連続切片の免疫染色は、毛様体神経栄養因子(CNTF)免疫染色性と GFAP 免疫染色性が合致する事を示しており、ミュラ細胞を中心とした網膜グリア細胞が活性化されて、神経栄養因子を応答性に発現していることを示す。

(A)矢頭は、網膜全般に波及している CNTF-陽性の縦走する免疫染色性; (B)矢印は、GFAP-陽性のミュラ細胞と縦走する免疫染色性; (C)CNTF 免疫染色性(赤, Cy 3)と GFAP 免疫染色性(緑, FITC)を共焦点イメージで重ね合わせており、矢頭は、縦走する CNTF と GFAP の共染色性(黄); バーは、50 μm

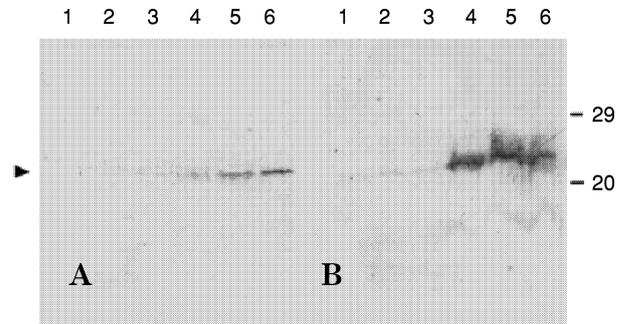


図 13 グルタミン酸受容体による網膜障害モデル眼における毛様体神経栄養因子(CNTF)の発現解析。(文献 68 より許可を得て転載)

グルタミン酸受容体を介した網膜障害において、CNTF は発現上昇を誘導されることがウエスタンブロット法で観察された。

ラット N-methyl-D-aspartate(NMDA)-/カイニン酸(KA)-網膜障害モデルにおいて、SDS-PAGE(sodium dodecyl sulphatase-polyacrylamide gel electrophoresis)ウエスタンブロット法による CNTF の発現解析を行った。約 23 kDa の大きさのバンドが確認された。A, NMDA(200 nmol)注入眼 B, KA(5 nmol)注入眼

Lane 1~3, 対照(PBS 注入); lane 4~6, NMDA-(または KA-)注入眼

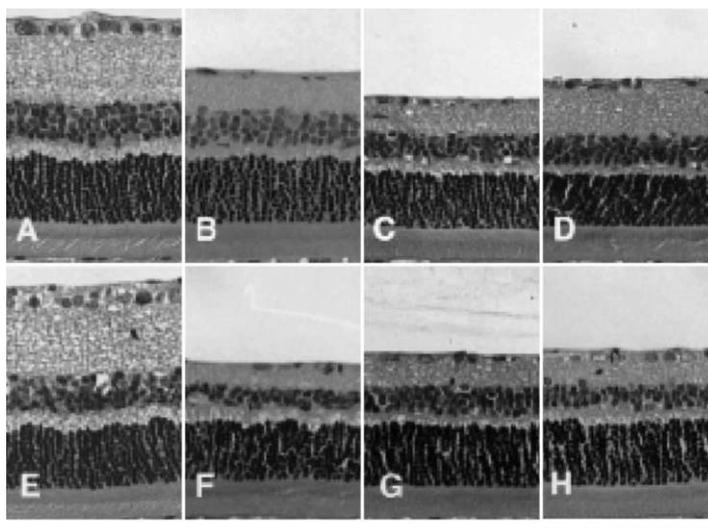


図 14 グルタミン酸受容体による網膜障害モデル眼に対する毛様体神経栄養因子(CNTF)の神経保護効果。(文献 68 より許可を得て転載)  
 CNTF を経硝子体的に投与することで、N-methyl-D-aspartate(NMDA) (またはカイニン酸(KA))誘導性網膜障害は、形態計測による定量的解析で有意な神経保護効果を示した。  
 A, 対照実験(溶媒である PBS のみ)；B, NMDA 注入眼, 全処置(-)；C, NMDA 注入眼に CNTF(0.1 μg)を投与；D, NMDA 注入眼に CNTF(1 μg)を投与；E, 対照実験(溶媒である PBS のみ)；F, KA 注入眼；G, KA 注入眼に CNTF(0.1 μg)を投与；H, KA 注入眼に CNTF(1 μg)を投与。  
 バーは 50 μm

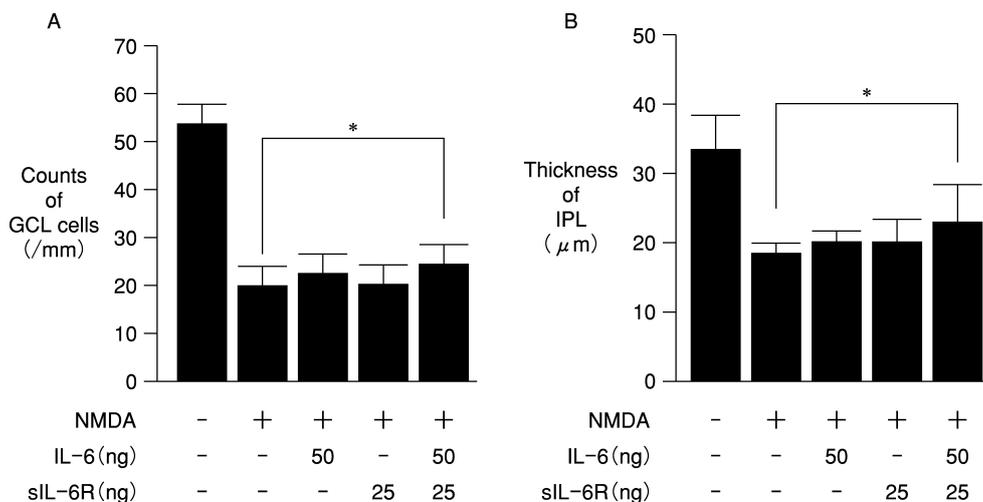


図 15 インターロイキン-6(IL-6)の N-methyl-D-aspartate(NMDA)誘導性網膜障害に対する神経保護効果。(文献 76 より許可を得て転載)  
 IL-6 単独もしくは可溶性 IL-6 受容体(sIL-6 R)の単独投与では、NMDA による網膜神経節細胞層(GCL)の細胞数減少(A)および内網状層(IPL)厚の減少(B)は抑制されないが、IL-6 と sIL-6 R の同時投与によって、両者ともに有意に抑制されている。  
 \* : p<0.05 対応のない t-検定

と考えられた。エリスロポイエチンについては、我々は網膜硝子体疾患眼の硝子体中に濃度上昇を認めたが(図 16)、他の研究グループによって網膜に対する神経保護効果を報告<sup>78)</sup>された。

このように、炎症反応やストレス応答で誘導されるこれらの多彩な生理活性因子群は、共通して神経保護効果を惹起することが可能である。しかし、これらは異なる

機構に依存するものであり、同一に論じるべきものではない。むしろ、多様なストレスが累積されることで、最終的な共通経路として「細胞死」という現象に至る反面、神経保護効果も多様なストレス要因のそれぞれに対応した形態で存在し得るとみなすべきであろう。我々は、これらの一連の生理活性因子に対する実験を遂行することで、網膜障害のメカニズムを熟知することができた。同

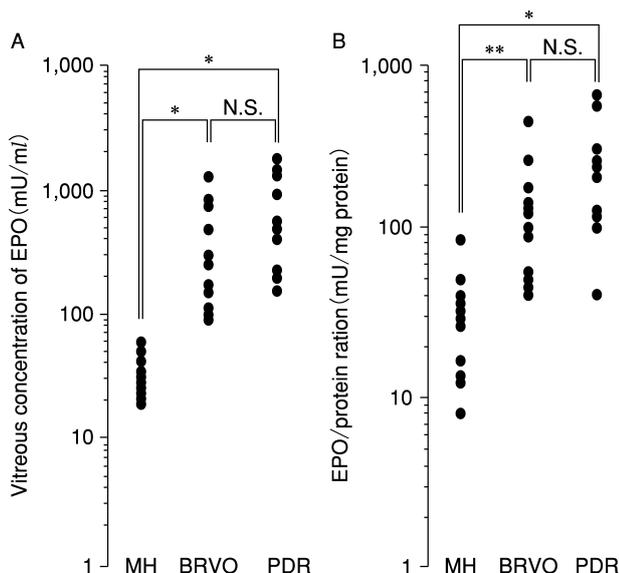


図 16 エリスロポイエチンの硝子体濃度。(文献 78 より許可を得て転載)

虚血性網膜疾患において、硝子体内ではエリスロポイエチン(erythropoietin, EPO)の濃度上昇が観察された。

網膜静脈分岐閉塞症(BRVO)、増殖糖尿病網膜症(PDR)のEPO硝子体濃度は、(対照とみなした非虚血性網膜疾患である)黄斑円孔(MH)より有意に高値であり(A)、蛋白濃度で補正しても同様な結果であった(B)。

\* :  $p < 0.01$ , \*\* :  $p < 0.05$  (Dunnett 補正による Kruskal-Wallis 検定で計算した)。

時に、血液眼関門で制限されたコンパートメントに位置する網膜視神経の保護には、一定以上の分子量を有する生理活性因子群の臨床応用では、ワンショットもしくは複数回の硝子体注入による短期間の奏功を期待するプロトコルに限定されることが明らかであった。血液眼関門を回避しての長期的な投与形態としては、遺伝子操作技術の応用が一つの選択肢となる<sup>79)80)</sup>。遺伝子治療は、長期間に眼内局所産生を誘導するための有効な解決策となり得るが、非致死性であり中心視野および視力が最後まで残る緑内障にとっては、遺伝子治療の臨床応用における対象疾患と考えるには、現時点では、安全面での検証を含めて時期尚早といわざるを得ない。

#### 8) 細胞死誘導とストレスセンサー分子機構

我々は緑内障という慢性的な進行過程を有する眼疾患において、眼圧非依存的因子として虚血やグルタミン酸といったストレス要因が加わることを臨床的に容認できたとしても、これらの実験的モデル眼は、いずれも急性期変化を観察するものである。これらのモデル眼で観察するような日単位で急激に進行する網膜障害(網膜神経細胞死)を惹起する病態は、我々が臨床的に遭遇する病態とは異なるものであることは考慮すべき点である。慢性的なストレス要因の累積がもたらす細胞死機構につい

ては、最近、急速に解明されつつある。最近特に注目されているのが、ストレスセンサー分子機構としての小胞体ストレスである。グルタミン酸神経毒性、虚血、低酸素、栄養飢餓、遺伝子変異などにおける組織障害では、小胞体の機能不全により蛋白の正常な折り畳み(folding)が阻害され、異常な折り畳み構造を持つ蛋白(unfolded protein)が蓄積する。このような状態を小胞体ストレスと呼ぶ。細胞は通常、小胞体ストレスに対して、(1)小胞体に局在する分子シャペロン誘導、(2)小胞体内の異常蛋白分解系の誘導、(3)蛋白合成を翻訳レベルで抑制、と3つの危機管理機構を働かせる。これらの分子機構で対応できないストレスが負荷された場合、最終的にはCCAAT/エンハンサー結合蛋白(C/EBP)-相同蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein, CHOP)などの転写因子が誘導されアポトーシスに至るということが知られている。CHOPは転写因子CEBPファミリーの一つで、分子量は29 kDaであり小胞体ストレスを介するアポトーシスにおいて重要な役割を果たす転写因子である<sup>81)</sup>。

我々はストレスセンサー機構としてのCHOPに着目したが、そのノックアウトマウスでは、眼球発生は、正常外観を呈していた。そこで、グルタミン酸受容体を介した網膜障害として、NMDA誘導性網膜障害モデル眼を用いて解析したところ、網膜神経節細胞に強いCHOP免疫応答性が誘導されており、実際に低濃度NMDAの注入条件下でノックアウトマウスとワイルドタイプマウスの間に有意差が観察された<sup>82)</sup>。したがって、マウスNMDA網膜障害モデルにおける網膜神経細胞死に、小胞体ストレスを介するアポトーシスにおいて重要な役割を果たす転写因子であるCHOPが関与していることがわかった。したがって、眼圧非依存的因子による緑内障神経障害において、小胞体ストレスの形態によるストレス要因の累積が関与している可能性は高いと考えられた。将来的には、ストレスセンサー機構の解明は、臨床的な緑内障の解析によって、さらに具体的に検証されるべき興味深い仮説を我々は提唱したものと考える。

#### 9) 臨床応用を考えた神経保護治療薬の可能性

我々は一連の眼圧非依存的網膜障害モデル眼の研究を通じて、「神経保護」という新しい薬物療法の可能性に注目してきた。神経栄養因子や成長因子などは、明瞭な神経保護効果を有していたが、臨床応用を考えると、複数回長期にわたって、硝子体注射を施行することは、感染症や網膜剝離などの潜在的リスクを無視できない。したがって、臨床応用に対する利点を考えた場合、内服もしくは経静脈的に投与できる薬物療法の開発が不可欠である。我々はスタチン類の組織保護作用に着目した。高脂血症治療薬であるスタチンは、コレステロール代謝の律速段階を規定する酵素(HMG-CoAリダクターゼ)阻害薬であり、動脈硬化病変の進行を抑制する。HMG-

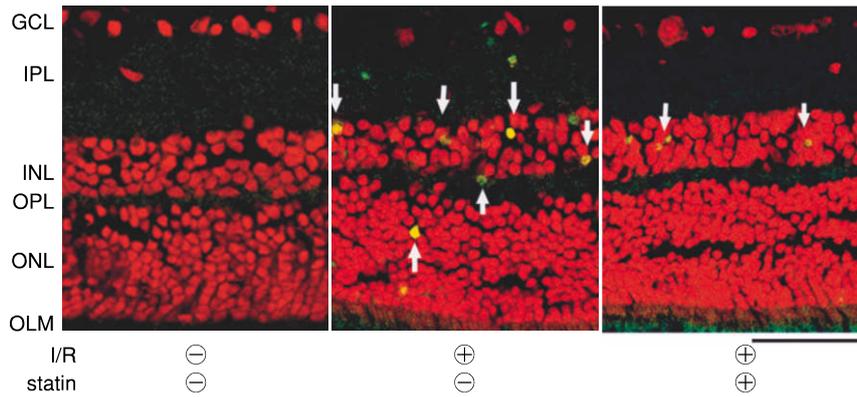


図 17 虚血・再灌流モデル眼における TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) 陽性細胞とスタチンの神経保護効果。(文献 83 より許可を得て転載)

スタチン投与により、TUNEL 陽性細胞(一般的にはアポトーシスに陥った細胞)が減少していた。定量的に解析すると、統計学的に有意に抑制されており、スタチンの神経保護効果を示された。これらのデータは、網膜組織の形態計測によって証明されたスタチンの神経保護効果と対応していた。TUNEL 陽性細胞は、網膜の虚血・再灌流障害後 24 時間の時点で増加している。左端は、虚血・再灌流のない対照実験；中央は、スタチン投与のない虚血・再灌流モデル眼。右端は、スタチン(cerivastatin)投与を受けた実験眼。写真は、propidium iodide (PI) で標識された細胞核(赤)と TUNEL(緑)をデジタルで重ね合わせたイメージを示す。矢印は、PI と TUNEL 陽性で決定された異常細胞を示す。バーは 50  $\mu\text{m}$ 。

CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンは、そのコレステロール低下作用のみならず、心血管保護作用を有することが多くの大規模臨床試験において明らかにされてきた。そしてその作用の一部はコレステロール低下作用に依存せず、細胞内シグナルに直接作用し、血管内皮機能の改善、平滑筋増殖抑制作用、血栓形成抑制作用、抗炎症作用、血管形成促進作用といったいわゆる多面的作用 (pleiotropic effects) を示すことが多くの生物学的実験により明らかになってきている。

我々は組織保護作用に着目して、眼圧非依存的網膜障害モデル眼における神経保護効果について検証した。網膜虚血再灌流障害モデル眼において、スタチンの前投与は、有意な神経保護効果を示して、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) 陽性で描出されるアポトーシスが有意に減少していた(図 17)。しかも、この神経保護効果は、nitric oxide synthase (NOS) 阻害薬 (L-NAME) により抑制されるので、nitric oxide (NO) 代謝が関与した作用であることが判明した<sup>83)</sup>。さらに、スタチン投与後の網膜における細胞接着分子の mRNA 発現は抑制されており(図 18)、小椋らが開発した白血球動態の定量的解析手法<sup>84)</sup>を用いると、網膜障害モデル眼における白血球の血管内皮に対する回転現象(ローリング)や接着が抑制され、結果的に白血球の網膜内浸潤が減少していることが判明した(図 19)<sup>83)</sup>。また、スタチンには、Rho-ROCK 阻害作用があることが解明されつつあるが<sup>85)</sup>、我々は、既に Rho-ROCK シグナル伝達

系を抑制することで、線維柱帯細胞の細胞内骨格の再分布を誘導して、点眼でも有意に眼圧を下げるができることを証明していた<sup>27)</sup>。今後は、疫学的研究が示唆するスタチンによる緑内障への抑制効果の詳細な機序の解明が必要である。他方、2004 年、眼科領域における疫学的研究において、スタチンの長期投与が、緑内障の発症および進行を抑制することが報告<sup>86)</sup>されており、本薬物の眼疾患への影響については、さらに詳細に解析されるべき興味深い点がある。後述するように、スタチン類は、同時に加齢黄斑変性に対しても、発症を抑制する可能性が報告<sup>87)</sup>されていた。網膜最内層に位置する網膜神経節細胞とその軸索障害が主体である緑内障と、網膜最外層における血管新生病変を主体とする加齢黄斑変性という 2 つの眼疾患に共通する病態について関心を寄せるきっかけとなった。特に、神経(組織)保護作用と関連した白血球の接着現象は、一つの研究視点を提供することになった。

### III 加齢黄斑変性

#### 1. 加齢黄斑変性の疫学と血管新生の病態

加齢黄斑変性は、萎縮型と滲出型とに分類されている。特に、滲出型加齢黄斑変性は、重篤な視力障害を呈する。滲出型加齢黄斑変性は、加齢、高血圧、動脈硬化、高脂血症、喫煙などが有意な危険因子として指摘されている<sup>88)89)</sup>。病態の本質は、脈絡膜側から網膜色素上皮を貫通して網膜下へと伸展する血管新生病変である。脈絡膜血管新生を誘導する病変として、網膜ドレーゼン

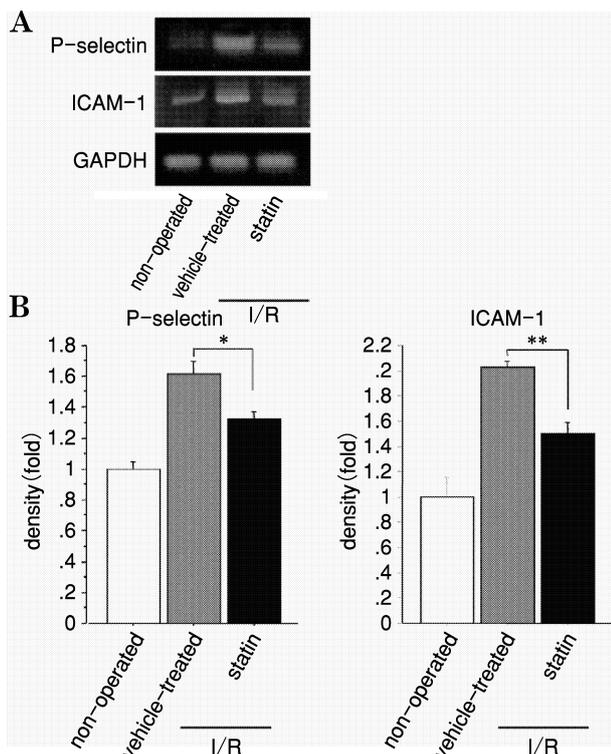


図 18 スタチンによる網膜における細胞接着分子の発現変化。(文献 83 より許可を得て転載)

P-セレクトリンと ICAM-1 の遺伝子発現における相対比は、再灌流後の網膜で RT-PCR 法により計測された。

A: P-セレクトリンと ICAM-1 および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (内部補正としてのハウスキーピング遺伝子) における虚血・再灌流障害後 12 時間でのラット眼網膜での遺伝子発現を示す電気泳動写真

B: P-セレクトリンと ICAM-1 の遺伝子発現の RT-PCR 法による半定量的解析。データは、対照実験眼との相対比で示される。数値は、平均値±標準誤差を意味する。\*は、対照実験と比較して、 $p < 0.05$  を意味する。\*\*は、 $p < 0.005$  を意味する。それぞれの群は、実験数  $n = 5$ 。

や軟性白斑があり、これらの加齢変化が関与する。加齢黄斑変性の病態は、一般的に動脈硬化病変と類似性を有することが指摘されている<sup>90)</sup>。動脈硬化病変の発症機序には、血管内皮細胞の機能障害により単球由来のマクロファージが血管内皮へ接着し、内皮下へ浸潤することが重要であると考えられている。血管内皮下へ遊走したマクロファージは、スカベンジャー受容体を介して、酸化 LDL (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) などの修飾マクロ分子を取り込み、泡沫化し中膜平滑筋細胞の形質変換および細胞外マトリックス産生により主要病変を形成する。加齢黄斑変性患者において、動脈硬化病変が有意な危険因子であるとともに<sup>88)</sup>、酸化 LDL 濃度が有意に高値を認める<sup>91)</sup>。酸化 LDL を取り込むスカベンジャー受容体ファミリーとしては、クラス A 受容体

(SR-A)、クラス B 受容体 (CD 36, SR-BI など)、lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) などが同定され、その動脈硬化病変における役割が解明されつつある<sup>92)</sup>。

## 2. 加齢黄斑変性に対する我々の研究戦略

日本を含む先進諸国において、中途失明原因の主要原因となっているのが加齢黄斑変性である。我々は本疾患の分子基盤を解明することで、新しい薬物療法の開発につながる眼疾患の理解が可能になると考えた。我々は分子基盤解明が進んでいる動脈硬化病変の病態を手がかりに、加齢黄斑変性の病態を解析してみた。特に、初発病変の病態解析を目的と考えて、動脈硬化初期像に重要な役割を果たすスカベンジャー受容体の研究を手がけた。さらに、スカベンジャー受容体を含めて、薬理的に修飾することが臨床応用しやすい血管内皮細胞-白血球間の相互関係を解析して、新しい薬物療法の可能性を検証してみることにした。

## 3. スカベンジャー受容体の解析

我々は加齢黄斑変性を含む脈絡膜血管新生に対して、スカベンジャー受容体の発現を解析した。脈絡膜新生血管除去術を施行して手術的に採取した脈絡膜新生血管標本に対して、免疫染色実験を行ったところ、マクロファージの細胞タイプマーカーである KP-1 陽性細胞が多数観察されたが、これらの一部は SR-A 陽性であった<sup>93)</sup>。つまり、脈絡膜新生血管膜には、活性化されてスカベンジャー受容体を発現したマクロファージが多数局在する。さらに、動脈硬化病変初期に血管内皮に発現されるスカベンジャー受容体である LOX-1 は、同様に脈絡膜新生血管膜において発現を観察した(図 20)<sup>94)</sup>。これらの大部分は、von Willbrand 因子と共染色しており、主として血管内皮に発現されていることが判明した。つまり、加齢黄斑変性を含めて脈絡膜血管新生において、スカベンジャー受容体は、その病態に関与していると考えられることができる。

LOX-1 は、スカベンジャー受容体とみなされてきたが、それ以上の細胞認識機構としての機能を有することが考えられる。例えば、LOX-1 を強制発現させた細胞に対して、白血球は接着能を示しており、白血球-血管内皮間の細胞接着分子として機能していることが示された(図 21)。実験的ぶどう膜炎モデル眼を作製して、白血球動態を解析すると、抗-LOX-1 抗体により機能阻害すると、白血球のローリングや接着現象が有意に抑制され(図 22)、炎症反応に伴い発生する血液中白血球数変化も抑制された<sup>95)</sup>。実際に、炎症反応とそれに伴う組織障害は、LOX-1 機能阻害により抑制されていた。実際に、実験的脈絡膜血管新生モデル眼を作製して、遺伝子発現を定量的に解析すると、レーザー光凝固後、数時間でピークを迎える LOX-1 mRNA 発現誘導が観察された。その分子基盤を明確に評価するために、LOX-1

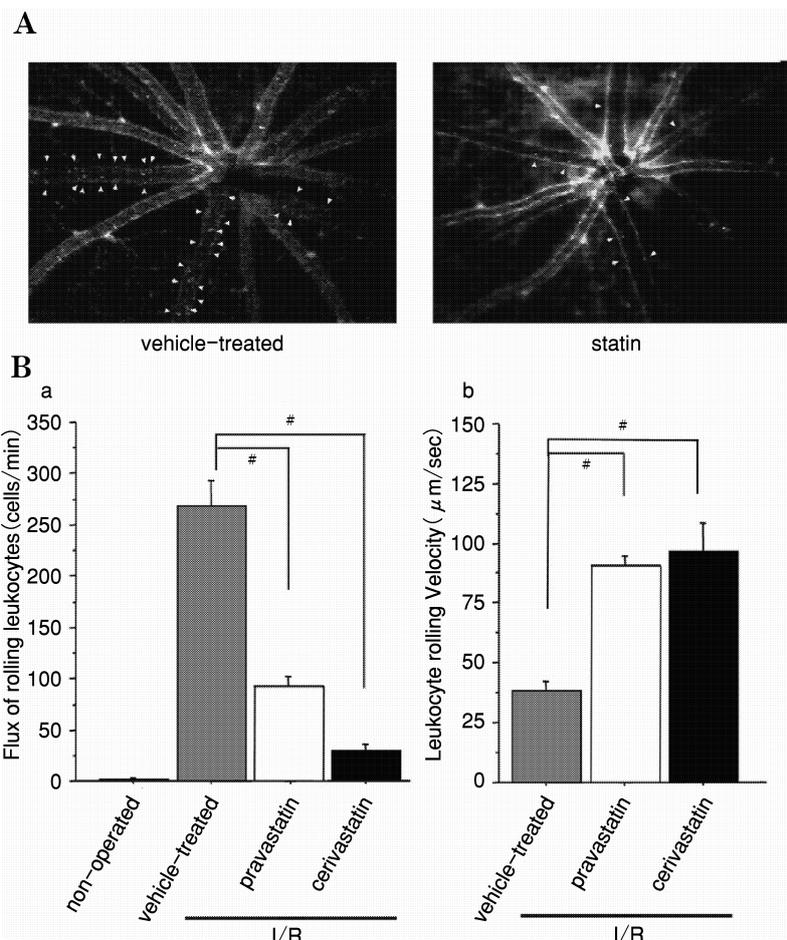


図 19 スタチンによる白血球の網膜動態変化。(文献 83 より許可を得て転載)

(A)再灌流後 12 時間の蛍光眼底イメージ

矢頭は、主要な網膜静脈に沿ったローリングする白血球を示す。

(B)計測されたローリングする白血球の数(左)と速度(右)は、再灌流後の主要網膜静脈に沿って計測された。数値は、平均値±標準誤差で示された。#は、対照実験と比較して、 $p < 0.001$  を意味する。それぞれの群は、実験数、 $n = 6$  による。

ノックアウトマウスを用いた同様の実験を施行したが、有意に脈絡膜血管新生は抑制されていた。このように、スカベンジャー受容体は、重要な役割を加齢黄斑変性に及ぼしているものと考えられる。

#### 4. 新しい加齢黄斑変性の病態理解と薬物療法の可能性

我々は緑内障に対する神経保護薬物療法の開発に伴って、スタチン類の組織保護作用に着目した。前述したように、我々のスタチンに関する神経保護作用の研究は、白血球-血管内皮間の接着現象が、組織障害において重要な役割を果たしていることを示すものであった<sup>83</sup>。同時に、LOX-1 研究により解明された知見は、この仮説を十分に支持するものであった<sup>94</sup>。そこで、両者の整合性をさらに詳細に解析するために、レーザー光凝固による脈絡膜血管新生モデル眼を作製して、スタチン投与による影響を解析した。スタチン投与は、実験的脈絡膜血管新生を有意に抑制することが可能であった。これらの知見を総合して、我々が考えた加齢黄斑変性の病態仮説

は、初発病変として、高密度に存在する錐体細胞の集積と視機能に関連する外節の劇的なリニューアルは、黄斑部における激しい代謝活動を強いることになる。加齢に伴って、黄斑部に局所的に沈着する代謝産物は、酸化 LDL などの多彩な修飾マクロ分子を発生する<sup>96</sup>。実際に、病理学的研究は、酸化ストレス産物を多量に含むことが形態学的に指摘されている<sup>97</sup>。このような局所的な酸化ストレスは、網膜脈絡膜血管において、NO 代謝を介した経路で、P-セレクチンや ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) などの細胞接着分子の発現を誘導して、白血球の接着浸潤を惹起する。最近、加齢黄斑変性の発症リスクに補体成分 H (complement factor H, CFH) 遺伝子多型が関わっていることが発表された<sup>98</sup>。CFH は、免疫系の補体反応を抑制する因子で、CFH 欠損症のヒトでは、異常な補体反応が惹起され、局所的に炎症応答を惹起することが知られている。網膜におけるドルーゼンには補体複合体の沈着が指摘されており、このような異常免疫応答を介した白血球浸潤の経路も存

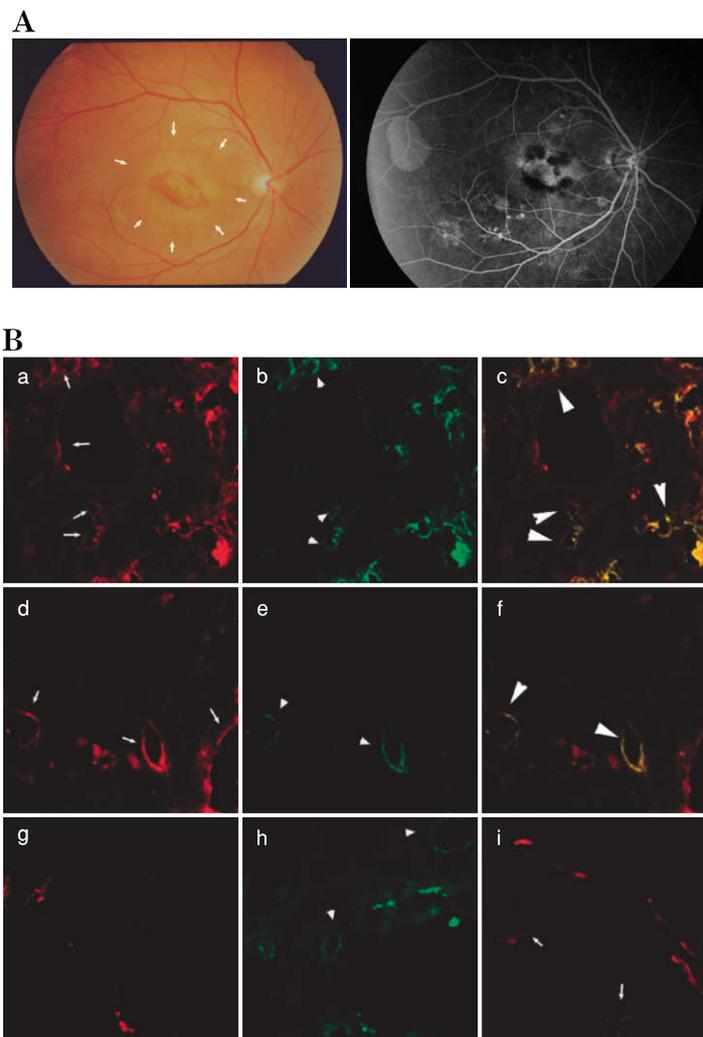


図 20 加齢黄斑変性眼から摘出した脈絡膜新生血管膜の lectin-like oxidized LDL receptor-1(LOX-1)免疫染色。(文献 94 より許可を得て転載)

A: 55 歳男性の加齢黄斑変性患者の眼底写真(左)と蛍光眼底造影像(右)。矢は、漿液性網膜剥離の領域を示す。B: a~f は、同患者の摘出された脈絡膜血管新生(CNV)標本の免疫染色

a と d は、LOX-1 免疫染色性を赤色で観察でき、その一部は矢で示した。

b と e は、血管内皮マーカーである von Willebrand 因子(vWF)が緑色で観察でき、その一部は、矢頭で示した。

c と f は、LOX-1 免疫染色性と vWF 免疫染色性の二重染色を示し、両者の局在は合致していた。両者を発現している細胞の一部は、大きな矢頭で示した。

g は、同患者 CNV における対照染色。

h は、g の標本を LOX-1 と vWF の二重染色であり、血管内皮細胞が緑で染色されている。

i は、37 歳女性の特発性脈絡膜血管新生患者から摘出した CNV 標本において、LOX-1 免疫染色性は赤色で示され、陽性細胞の一部は、矢印で示される。

在するのであろう。いずれにせよ(広い意味での)炎症応答と関連する酸化ストレスは、網膜色素上皮細胞の形質転換など劇的な変化を生じうる(これについては増殖硝子体網膜症の項を参照)。修飾マクロ分子は、白血球(特に単球-マクロファージ系)や血管内皮を活性化させ、スカベンジャー受容体の発現を誘導するとともに、ケモカイン発現により炎症反応をさらにエスカレートさせていく。結果として、マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase, MMP)や VEGF などの生

理活性因子が関わって、血管新生病変を完成していく。我々の仮説に従って、加齢黄斑変性に対して抑制効果を認めうるものは、スタチン類のような生活習慣病の治療薬であり、循環器内科で既に臨床的に広く処方されている本薬剤は、我々眼科医が認識していないうちに、眼疾患の病像と頻度に大きな影響を与えている可能性がある。

##### 5. ステロイド療法の再評価

我々の仮説に従うと、酸化ストレスや炎症反応による白血球浸潤を抑制することは、病態の発症と進行を抑制

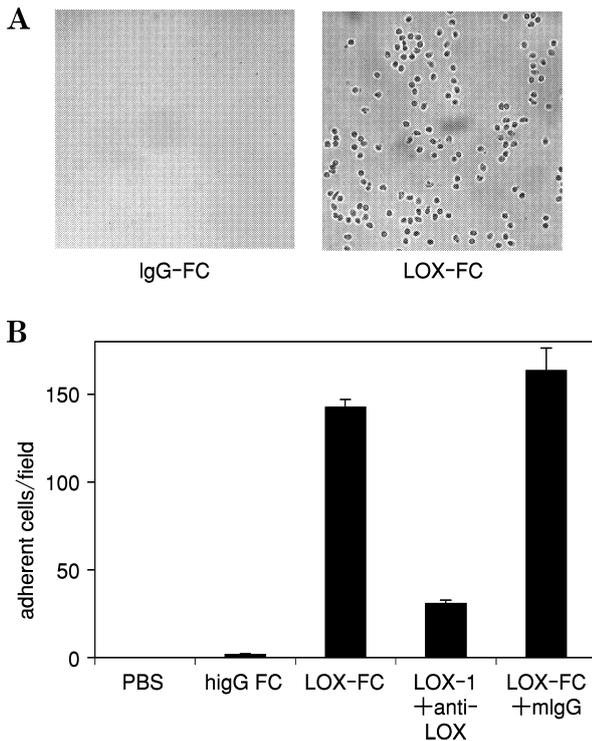


図 21 多核白血球の細胞表面への接着現象。(文献 95 より許可を得て転載)

LOX-1 は、白血球に対して細胞接着分子として機能することが観察された。多核白血球は、LOX-1 を発現する細胞表面には接着でき、機能阻害抗体で LOX-1 機能を阻害すると接着能は抑制される。

(A)多核白血球は、生理的シアストレス(2 dynes/cm<sup>2</sup>)下、リコンビナント LOX-1(LOX-Fc)で表面をコートしたスライドチャンバーには接着できるが、対照タンパク質(IgG-Fc)に対しては接着を示さなかった。

(B)多核白血球接着の定量的解析は、抗 LOX-1 抗体で多核白血球の LOX-1 でコートされた表面への接着を阻害できるが、対照ヒト IgG ではできなかった。白血球接着の定量的解析。抗 LOX-1 抗体は LOX-Fc コートチャンバーへの細胞接着を阻害した。

し得る可能性が考えられる。加齢黄斑変性に対しては、抗酸化物質が抑制的に働くことが大規模臨床試験により証明された<sup>99</sup>。我々が行った実験においても、N-acetylcysteine(NAC)などの還元剤、ステロイドによる炎症反応の抑制は、脈絡膜血管新生に関連する病態を抑制していた(図 23)。ステロイドによる脈絡膜血管新生抑制効果については、従来から指摘されており、臨床的にもその有効性が報告<sup>100</sup>された。加齢黄斑変性における慢性的な病態の進行を考えると、長期的にステロイドを臨床的に投与することは難しかったが、ステロイド剤の投与手法は、近年のテノン嚢下注入や硝子体内注入などの導入により再評価されつつある。我々は、黄斑疾患に対して積極的にトリアムシロンのテノン嚢下注入の臨床応用を導入してきたが、網膜静脈閉塞症黄斑浮腫、

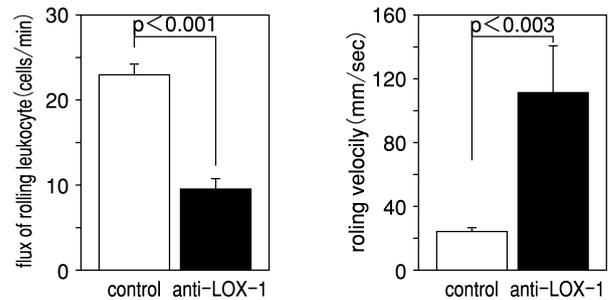


図 22 Lectin-like oxidized LDL receptor-1(LOX-1)と網膜における白血球動態。(文献 95 より許可を得て転載)

実験的内眼炎モデル眼において、LOX-1 の機能阻害抗体は、網膜血管における白血球-血管内皮相互関係に有意な影響を与え、炎症状態における白血球のローリング、接着、浸潤を抑制した。

LOX-1 は、エンドトキシン誘導性実験的ぶどう膜炎モデル眼において、*in vivo* で白血球-血管内皮相互関係に関連する。抗 LOX-1 抗体(または対照 IgG)は、解析の 30 分前に投与された。LPS 投与後 12 時間の眼底像。血管内皮と関連する多数の白血球は、主要な網膜静脈壁に沿って観察された。一方、抗 LOX-1 抗体で処置された場合、ごくわずかな白血球を観察するのみであった。主要な網膜静脈壁におけるローリングする白血球数は、対照 IgG で処置した場合と比較して、抗 LOX-1 抗体処置群において有意に抑制された( $p < 0.001$ )。同様に、抗 LOX-1 抗体処置によって、ローリングする白血球の平均速度は有意に抑制された( $p < 0.003$ )。

糖尿病網膜症黄斑浮腫、黄斑部脈絡膜新生血管などに有効な治療成績を認めた<sup>101)102)</sup>。これらは、微小網脈絡膜血管からの透過性亢進を抑制することで、浮腫や血管新生を改善するものと考えられることができる(図 24)。我々は簡便な脈絡膜血流の解析手法を開発して<sup>103)</sup>、トリアムシロン投与眼を解析したところ、一時的な脈絡膜血流変化を認めた<sup>104)</sup>。また、トリアムシロンの普及は、ステロイドによる眼圧上昇などの副次的作用を高頻度に惹起することも確認された<sup>101)102)</sup>。網膜血管には有意な影響は認めず、脈絡膜血管の血流変化はあくまでも一時的なものであり、恒久的な視機能障害をもたらすものではないと考えている<sup>104)</sup>。しかし、トリアムシロンによる眼圧上昇は、不可逆的な視野異常の進行を生じる可能性がある。ステロイド緑内障に対しては、線維柱帯切開術などの房水流出路再建手術が有効であった<sup>105)</sup>。しかしながら、緑内障の観血的手術を必要とする例がしばしば出現するという事は、トリアムシロンの網膜硝子体疾患への臨床応用には、リスクとベネフィットのバランスを冷静に検証する必要があることを意味する。しかし、加齢黄斑変性における活動期病変を抑制することに、ステロイド局所投与の有効性は十分に期待できるものと考えられ、ステロイドおよび非ステロイド系消炎薬

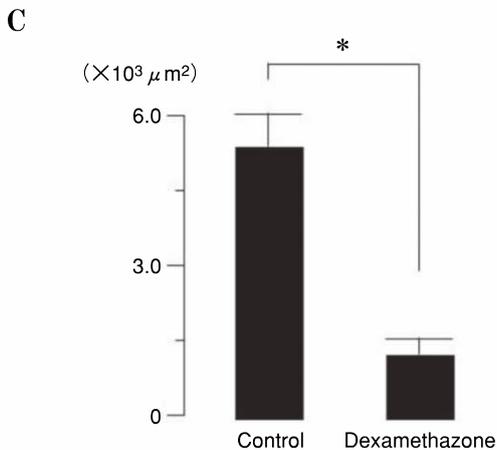
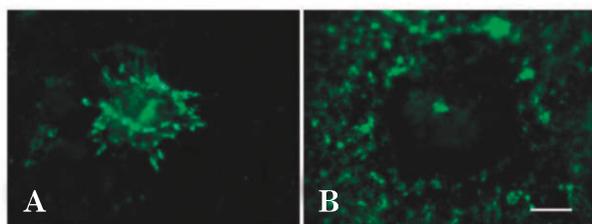


図 23 ステロイド投与による実験的脈絡膜血管新生の抑制。

ステロイド(デキサメサゾン)投与により, 実験的脈絡膜血管新生(CNV)は, 有意に抑制されており, 計測された CNV 面積は縮小していた。

ラット眼に対してレーザー光凝固による実験的 CNV モデルを作製した。FITC-デキストランによって, CNV は緑色蛍光で描出される。対照群(A)と比較して, デキサメサゾン投与群(B)においては, 実験的 CNV モデルの定量的解析は, 対照群と比較して, デキサメサゾン投与群において, 有意に縮小していた ( $p < 0.05$ ) (C)。CNV の面積は, 光凝固部における FITC-デキストラン (fluorescein isothiocyanate-dextran) の蛍光領域で算出した。数値データは, 平均値±標準誤差で示した。

物療法の可能性は, さらなる研究の対象として重要であると認識している。

## IV 増殖硝子体網膜症

### 1. 増殖硝子体網膜症の臨床像と病態

増殖硝子体網膜症は, 網膜剥離の発症後に生じる難治性眼内増殖病変であり, 臨床的に有意な危険因子として知られているのは, 硝子体手術の既往, 術前からの増殖反応, 多発網膜裂孔, 硝子体出血, 網膜冷凍凝固などである<sup>106</sup>。増殖病変の細胞成分の由来は, 主に網膜色素上皮細胞であると考えられており, 古典的な病態生理学は, 網膜剥離および附随する手術治療によって障害された血液網膜関門の破綻が硝子体中の成長因子群が高濃度になることで, 網膜色素上皮細胞の遊走を誘導されると考えられている<sup>107</sup>。特に, 血液由来で病的状態におい

て眼内に流入する成長因子としては, PDGF<sup>108</sup>)と TGF- $\beta$ <sup>109</sup>)が注目された。

### 2. 網膜色素上皮細胞の増殖硝子体網膜症における役割

網膜色素上皮細胞は, 増殖病変の主たる細胞成分として機能するが, 実際に臨床的に採取された増殖組織を病理学的に解析すると, 正常な網膜色素上皮細胞の形態を維持していることはほとんどない。むしろ上皮系細胞の特徴を喪失して, 筋線維芽細胞(myofibroblast)と表現されるような間葉系細胞の特徴を発現している。筋線維芽細胞は, さらに, TGF- $\beta$ などの発現とも関連している<sup>110</sup>。網膜色素上皮細胞自身も, 多彩な生理活性因子を局所産生することで積極的に増殖病変の形成と修飾に関与している。網膜色素上皮細胞の生理活性因子発現については, 複数の研究グループが1990年代前半に解析を行っており, 当時, 吉村を中心とした我々の研究グループは, TGF- $\beta$ <sup>111</sup>), PDGF<sup>112</sup>), 腫瘍壊死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )<sup>113</sup>), インスリン様成長因子(insulin-like growth factor, IGF)<sup>114</sup>)の網膜色素上皮細胞における発現を解明した。さらに, 複数の研究グループの報告を併せると, 網膜色素上皮細胞は, PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IGF, IL-1, IL-6, IL-8, FGF, 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), VEGF, 網膜色素上皮由来因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)など, 実に多彩な種類の因子群が発現されていることが判明した<sup>115</sup>。これらの生理活性因子群は, 病的状態において, 増殖過程におかれた網膜色素上皮から産生されると, オートクラインあるいはパラクラインに作用して, 増殖組織の修飾にかかわっていくことが推定されている。つまり, 網膜色素上皮細胞は, 増殖硝子体網膜症の病態において, 細胞構成成分として参画するだけでなく, 細胞増殖や形質転換にかかわる生理活性因子の局所産生の由来であり, 増殖組織の収縮現象の原因となる。

### 3. 増殖硝子体網膜症に対する我々の研究戦略

前述のように, 網膜色素上皮細胞が積極的にかかわる代表的な眼疾患として, 我々は家族性アミロイドポリニューロパシーや加齢黄斑変性の研究に取り組んできた。我々が生理活性因子の観点から注目していた増殖硝子体網膜症の病態については, 漠然とした仮説が提唱されながらも, 眼内増殖病変を構築する上で最も重要な過程である上皮系細胞からの遊走と形質転換についての分子基盤が十分に解明されておらず, 病態解釈にあいまいな部分が残されていると感じた。そこで, 我々は分子細胞生物学的研究手法を用いて, 増殖硝子体網膜症の初期病態における分子基盤を解明することを目指した。

### 4. 網膜色素上皮細胞と細胞接着装置

網膜色素上皮細胞を含めて, 単層上皮細胞は, 通常互

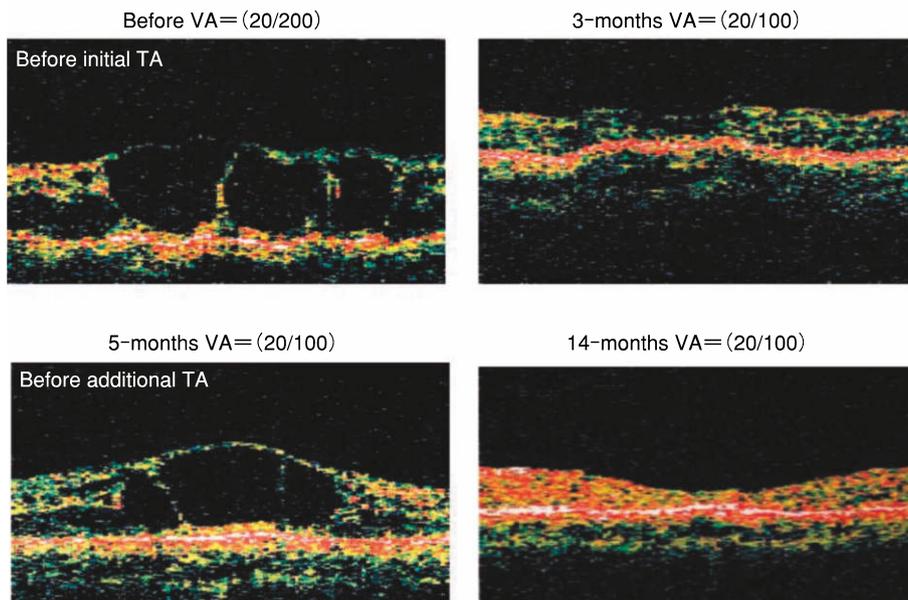


図 24 トリアムシノロンのテノン嚢下注入による糖尿病網膜症黄斑浮腫の治療効果。(文献 102 より許可を得て転載)

トリアムシノロンのテノン嚢下注入により，糖尿病黄斑浮腫は軽減するが，一部の症例では，黄斑浮腫の再発が観察される。

トリアムシノロン(TA) (40 mg) のテノン嚢下注入により，中心窩網膜厚( $\mu\text{m}$ )は，統計学的に有意な黄斑浮腫が軽減した。左上，TA 治療前の光干渉断層図(OCT)所見；右上，TA 治療後 3 か月の時点で黄斑浮腫軽減；左下，黄斑浮腫の再発；右下，TA 治療後 14 か月後の時点で黄斑浮腫が軽減した状態で安定している。経過観察期間は，TA 注入後の月数で表す。p 値は，Wilcoxon signed-rank 検定により計算された。

いに細胞接着装置で結合されており，細胞-細胞間接着現象によって制限されている。特に網膜色素上皮は，外側血液網膜関門(outer blood-retinal barrier)の主体を形成しており，タイトジャンクションで相互が結合されることで，イオンや分子の輸送を選択的に制限している。したがって，増殖硝子体網膜症の初期病態において，網膜色素上皮細胞が硝子体中へと遊走するためには，隣接する網膜色素上皮細胞との間に形成されている細胞-細胞間接着を断ち切るという過程が必要となる。細胞-細胞間接着の構築を中心的に司る分子は，細胞接着分子カドヘリンである。このカルシウムイオン依存的細胞接着分子は，同種選択的に互いを認識し合うことで結合し，複合的な細胞間結合装置の構築へとつながる。カドヘリンを介した同種選択的細胞間接着は，単純な接着現象のみならず，ある種の細胞認識機構として機能して，細胞の分化，増殖，遊走にも関わってくる<sup>116)</sup>。我々は 1990 年代前半に，神経網膜から多数の新規カドヘリン分子群を発見し，遺伝子クローニングおよび分子機能解析を行ったが，十数種類の古典的カドヘリン分子構造モチーフを有する分子群と数十に及ぶと思われる膨大な数の新規分子群を同定した<sup>117)</sup>。網膜視神経や脳などの中枢神経系においては，多数のカドヘリン分子群が発見されており，神経組織の組織形成(histogenesis)や軸索誘導に深く関わっている。我々は当時，前者を II 型カド

ヘリン<sup>118)</sup>，後者をプロトカドヘリン<sup>119)</sup>と命名したが，これらの名称と概念は現在も当該研究領域において普及している。カドヘリン群は，このように分子進化によって生じたと推測できる多数の遺伝子スーパーファミリーのメンバーと遺伝子のスプライシングや組み換えなどで，その多様性を増している<sup>118)~120)</sup>。本来カドヘリンを有していない培養細胞に対して，遺伝子導入によって強制発現してやると細胞境界に局在して，同種選択的に細胞接着を制御するようになる(図 25)<sup>121)</sup>。カドヘリン分子群は，細胞凝集反応を制御する分子機構であり，網膜発生の時期に，時間的空間的に発現が厳密に制御され，複雑な視覚神経回路網を構成するものと考えられた(図 26)<sup>122)</sup>。網膜色素上皮細胞は，カドヘリンを発現しており，タイトジャンクション，アドヘレンスジャンクションなどを有し，隣接細胞同士が互いに強固な結合装置で結びつけられており，硝子体中へと遊走するためには，この隣接細胞との細胞-細胞間の連鎖を断ち切る必要がある。

##### 5. 網膜色素上皮細胞における接着分子の自己切断現象，上皮-間葉系形質転換現象

我々は網膜色素上皮細胞の培養細胞ライン(ARPE-19)におけるカドヘリン発現パターンを解析したところ，神経型カドヘリン(N-cadherin)が発現されていた(図 27)。そこで，増殖性病変時に眼内で生じるストレス形

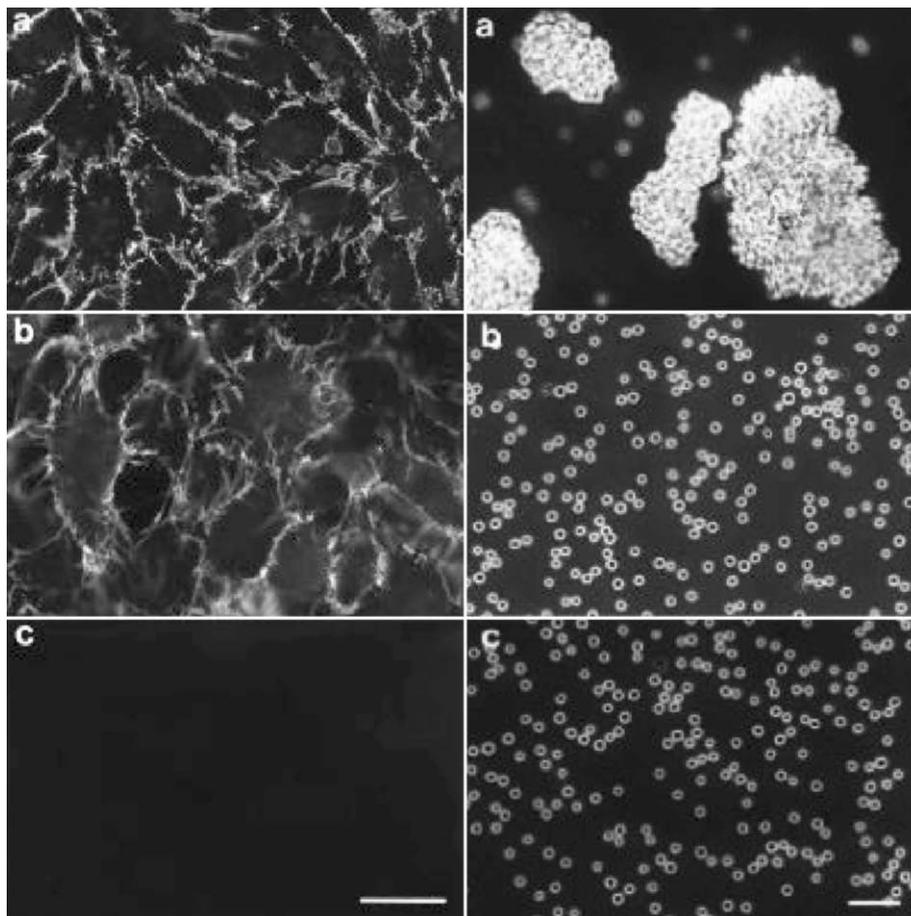


図 25 カドヘリン-4 とカドヘリン-5 の培養細胞における発現局在。(文献 121 より許可を得て転載)

カドヘリンは、(カドヘリン-4 が属する) I 型と(カドヘリン-5 が属する) II 型で共通して、細胞-細胞間境界に発現され、同種選択的に細胞接着を制御する。カドヘリンを発現させた培養細胞を用いた実験系では、同種選択的な細胞凝集が観察できるようになるが、カドヘリン分子間で若干の相違はある。

左段：カドヘリンを本来発現しない培養細胞(L 細胞)にカドヘリン遺伝子を発現させると、高密度で培養された場合、細胞同士が密に接触するようになる。免疫染色は、抗カドヘリン-4 抗体(a)と抗カドヘリン-5 抗体(b)で施行された。抗体で認識されるカドヘリンは、それぞれカドヘリン-4(a)とカドヘリン-5(b)のトランスフェクタントにおいて、主として細胞周囲または細胞-細胞間境界に局在する。しかし、対照血清では、これらの局在を認識する染色性は観察されない(c)。バーは 20  $\mu\text{m}$ 。

右段：細胞凝集試験。トランスフェクタントは、0.01%トリプシンと 1 mM EGTA で処理されて解離され、遠心操作にて回収された。細胞は、洗浄後、2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1% BSA, 20  $\mu\text{g/ml}$  deoxynucleotidase を含んだ緩衝液(HBS)で 1 時間の静置された。カドヘリン-4 トランスフェクタント(a)は、約 30 分後に凝集し始めるが、カドヘリン-5 トランスフェクタント(b)と本来の L 細胞(c)は 1 時間後でも凝集できない。バーは 200  $\mu\text{m}$

態として、サイトカイン刺激や酸化ストレスを加えたところ、急速に細胞境界に局在していたカドヘリン染色性が低下していった。この現象は、ウエスタンブロット法によって、全長カドヘリン分子の減少と蛋白分解産物の出現によっても確認することができた。すなわち、酸化ストレスは、細胞接着分子の発現抑制と自己切断の二つのメカニズムで細胞接着能を低下させることで、網膜色素上皮細胞の隣接細胞との連結を解除することが可能になる。さらに酸化ストレスは、網膜色素上皮由来細胞ラインに対して細胞-基質間接着分子群が発現低下することが報告<sup>123)</sup>されており、隣接細胞との結合装置による

連結の解除は、同時に基底膜側の細胞外基質との解離を伴うことから、自由に遊走することが可能になることが推測された。

他方、TGF- $\beta$  や炎症性サイトカインの刺激は、培養網膜色素上皮細胞の間葉系細胞への形質転換を惹起し、大量の細胞外基質産生と細胞-基質間接着分子の切断を誘導した。これは、増殖硝子体網膜症における網膜色素上皮細胞の形質転換に類似した現象と考えられた。このような現象は、一般的に上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)と呼ばれる。EMT は、組織発生や器官構築に寄与するのみならず、組織の線維

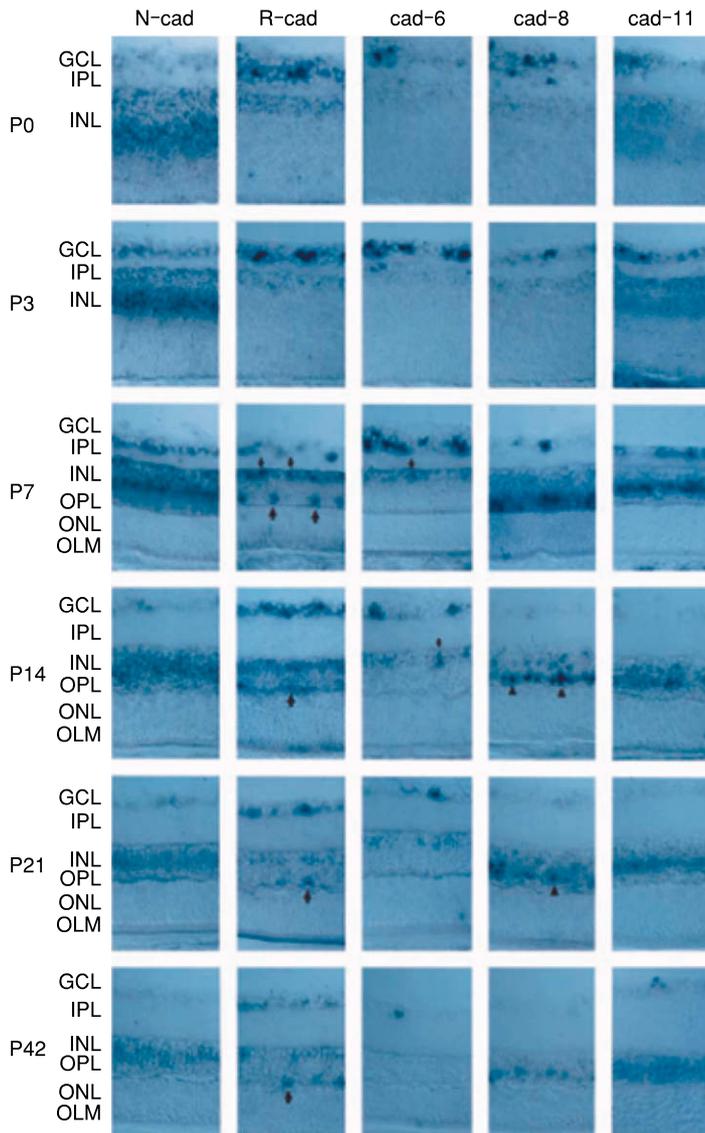


図 26 視覚神経回路網の発生と細胞接着分子カドヘリン mRNA の発現局在. (文献 122 より許可を得て転載)

カドヘリン分子群は、細胞凝集反応を制御する分子機構であり、網膜発生の時期に、時間的空間的に発現が厳密に制御され、複雑な視覚神経回路網を構成するものと考えられた。

網膜発生におけるカドヘリン mRNA 発現の局在が in situ ハイブリダイゼーションで示されている。P0～P42 は、生後日齢 0 日～42 日を意味する。N-cad, R-cad, cad-6, cad-8, cad-11 は、それぞれ神経型カドヘリン(neural cadherin, N-cadherin), 網膜型カドヘリン(retinal cadherin, R-cadherin), カドヘリン-6, -8, -11 を意味する。N-cad と R-cad は、I 型カドヘリンであり、cad-6, -8, -11 は、II 型カドヘリンに属する。小さな矢はアマクリン細胞, 大きな矢は水平細胞, 矢頭は(推定では)双極細胞を示す。ただし、切片間の染色強度の相違は、染色効率が実験間で異なるために、mRNA 発現強度の相違を反映しているとは限らない。

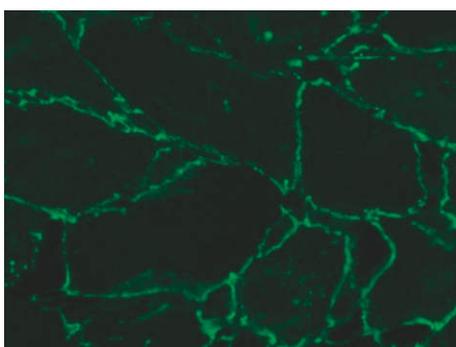


図 27 網膜色素上皮細胞ラインにおけるカドヘリン発現の局在.

網膜色素上皮細胞由来の細胞ライン(ARPE-19)において、抗カドヘリン抗体を用いて免疫染色を行うと、細胞-細胞間境界面に局在する。一連の実験により、網膜色素上皮細胞ラインで発現されているカドヘリンタイプは、神経型カドヘリン(N-カドヘリン)であることが解明されている。

化や腫瘍の浸潤転移などの病態を形成する原因になる<sup>124)</sup>。EMT は、炎症性疾患において TGF- $\beta$  が誘導する組織線維化にも関連しており、増殖硝子体網膜症の病態を類推することも可能であった。我々は炎症などによって誘導される酸化ストレスが EMT の引き金になるのではないかという仮説の下で研究を推進してきたが、現時点で我々が得たデータは、その仮説を支持するものであった(図 28)。

#### 6. 増殖硝子体網膜症の病態理解と新しい薬物療法の可能性

増殖硝子体網膜症の分子基盤として、我々は、細胞接着分子の切断と発現抑制に着目した。さらに、増殖病変の形成に当たっては、酸化ストレスや生理活性因子に誘導される EMT が重要な役割を果たすと考えている。上記の研究成果を得て、我々が考えた増殖硝子体網膜症における病態の分子基盤としては、次のようなものになる。網膜色素上皮細胞は、正常状態では、カドヘリンを中心とした細胞間結合装置で連結されており、遊走性が

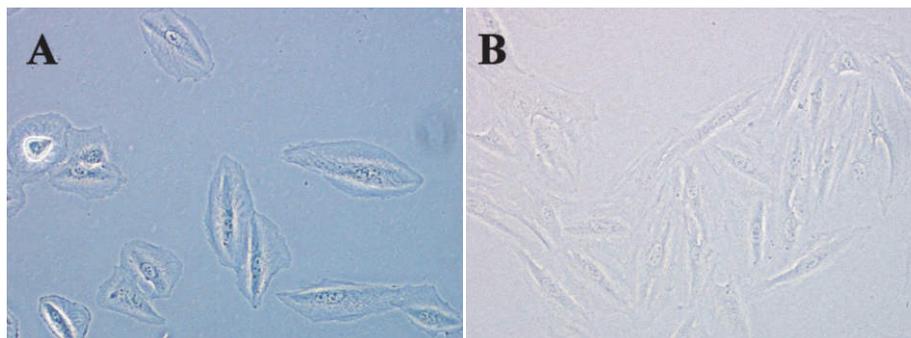


図 28 網膜色素上皮細胞ラインに対する TGF-β<sub>2</sub> の刺激前後での位相差顕微鏡写真。

サイトカイン刺激や酸化ストレスは、網膜色素上皮細胞由来の培養細胞ラインにおいて、上皮-間葉形質転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) を生じる。形質転換は、カドヘリンタンパク質の自己切断、CD 44 の自己切断、細胞外基質産生の亢進などに加えて細胞タイプに特異的な遺伝子発現により確認された。

TGF-β<sub>2</sub> (10 ng/ml) で 1 日間刺激すると、ARPE-19 の培養細胞は、上皮系細胞から間葉系細胞への形質転換を生じる。

(A) 処置していない対照実験

(B) TGF-β<sub>2</sub> (10 ng/ml) で 1 日間負荷した培養細胞 (ARPE-19)

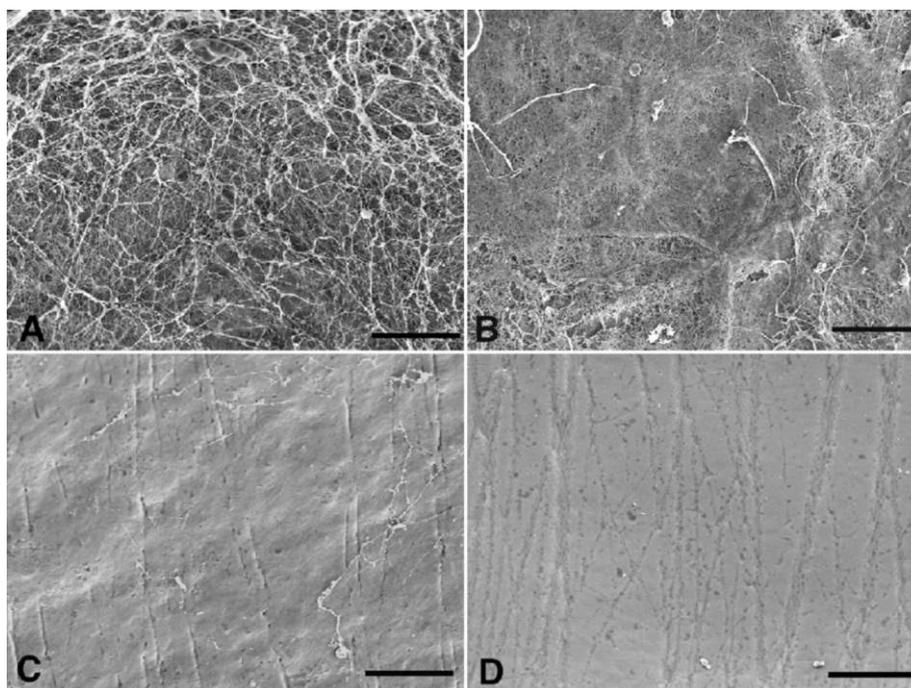


図 29 プラスミンによる網膜内層表面の変化。(文献 127 より許可を得て転載)

走査電子顕微鏡により、プラスミンまたは溶媒 (BSS) を負荷してから、30 分後に家兎眼網膜表面を観察した写真。(A) BSS 注入 (対照群)、(B) 0.05 IU プラスミン注入、(C) 0.25 IU プラスミン注入、(D) 0.5 IU プラスミン注入。プラスミン処置を受けた眼は、濃度依存的に平滑な網膜表面を観察することができた。BSS, balanced salt solution. バーは 50 μm

抑制されている。しかし、(1)酸化ストレスやサイトカイン刺激が加わることで、既存のカドヘリン蛋白質は、自己酵素(メタロプロテアーゼ)処理によって自己切断され、同時に新規カドヘリン合成は抑制される。(2)侵襲性の強い網膜復位手術後では、血液眼関門の障害や炎症細胞の浸潤によって、眼内での TGF-β や炎症性サイトカインの濃度が著明に上昇する。(3)サイトカインのコンビネーション刺激は、p 38 MAP キナーゼ系を介し

て、網膜色素上皮細胞に形質転換 (EMT) を惹起する。(4)さらに続発する CD 44 の自己切断により、ヒアルロン酸などとの相互関係を経て、運動性を獲得した形質転換後の網膜色素上皮細胞は、硝子体中の生理活性因子に誘導される。(5)硝子体ゲル上で接着して線維芽細胞様となった網膜色素上皮細胞は、大量の細胞外基質を産生しながら、その中に埋もれて、間葉系細胞としての特性を強調した形で増殖反応を進行させていく。その後は、

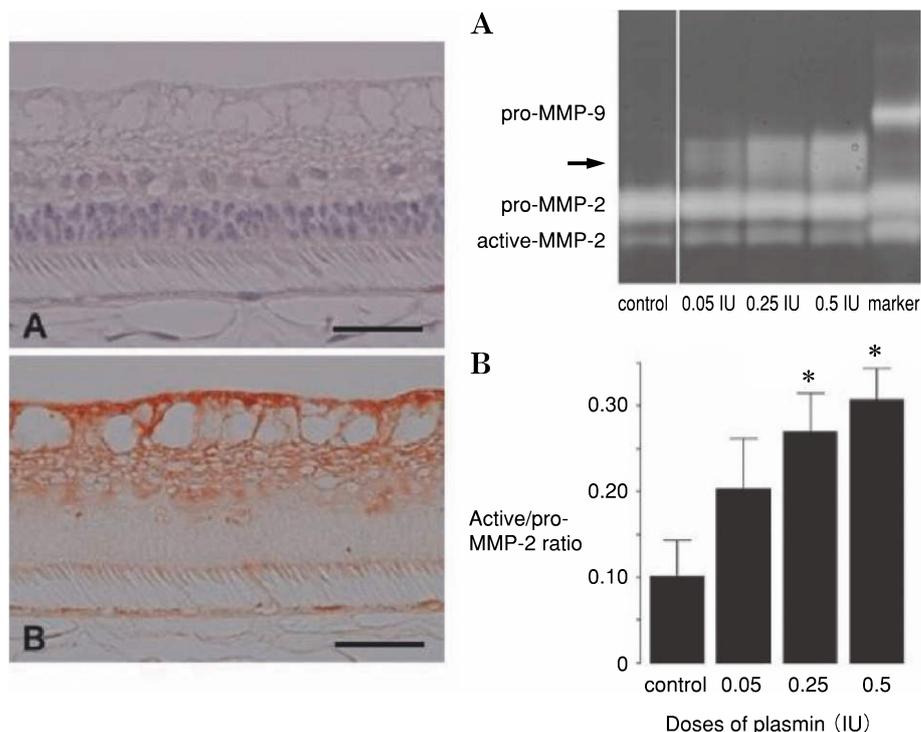


図 30 膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼの局在。(文献 127 より許可を得て転載)

MMP-2 の活性化は、MT 1-MMP (membrane type-1 matrix metalloproteinase) により惹起されることが知られているが、MT 1-MMP は網膜内層に局在していた。実際に、硝子体標本に対しては直接的にプラスミンを投与しても MMP-2 活性化は生じないのに対して、家兎眼硝子体内にプラスミン注入することで、濃度依存的に硝子体内の MMP-2 が活性化されていた。

左段；免疫染色によって、網膜内層には、膜貫通型の細胞外基質分解酵素である MT 1-MMP 免疫染色性が局在することが観察された。

右段；ザイモグラフィ(A)によって、活性型 MMP と pro-MMP の比率を算出した。プラスミン濃度依存的に、活性型 MMP-2 の比率が上昇していた(B)。

これらの過程が悪循環を成立させると考えた。

このような病態理解は、いくつかの新しい薬物療法の可能性を示唆する。すなわち、初期病態を増悪させ上記の分子基盤を推進する酸化ストレスや炎症反応を抑制するために、(1)ステロイド剤や非ステロイド系消炎剤、(2)抗サイトカイン療法、(3)還元剤、(4) p 38 MAP キナーゼ阻害薬などが候補薬として挙げられ、形質転換を生じて細胞外基質を大量に産生して、その中に埋もれることで間葉系細胞として増殖を遂げる状態においては、その増殖の足場となる細胞外基質を分解する酵素処理によるゲル廓清である。特に酵素処理によるゲル廓清は、単純に増殖の足場となる硝子体ゲルや細胞外基質を分解するだけでなく、現在の硝子体手術の効率を改善して手術の侵襲性を軽減することで、前述の酸化ストレスや炎症反応そのものを当初から抑制することができると考えられた。

#### 7. 酵素処理による化学的硝子体手術の可能性

硝子体網膜疾患において治療困難な病態のほとんどは、網膜硝子体境界面に生じる増殖病変がきっかけとなる。したがって、近年の硝子体手術では、安全確実に硝子体を網膜表面から解離することが重要な過程であると

考えられている。しかし機械的な後部硝子体剝離は、増殖硝子体網膜症などの増殖病変においては、しばしば術中・術後合併症を惹き起こす。さらに、遺残硝子体は、増殖病変の足場となるために、完全な硝子体ゲル廓清が望ましい。我々は、自家血液からプラスミンを精製して、硝子体手術に用いた。プラスミン精製および臨床応用に関しては、既に臨床応用に踏み込んでいた Trese らの手法<sup>125)</sup>を参考にした。同様の手法を用いた寺崎らの臨床研究は、網膜内境界面における細胞外基質の分解を示していた<sup>126)</sup>。我々は熊本大学倫理委員会の承認の下、臨床応用に踏みきった。我々は既に百例以上の臨床経験を蓄積したが、硝子体の液化ならびに後部硝子体剝離の誘導を認め、また、病的組織である網膜硝子体界面の増殖膜剝離を容易にするなど、硝子体手術での有用性を確認することができた。

我々はプラスミンの後部硝子体剝離の誘導作用に着目して、その分子基盤を解明することを目指した。我々の形態学的解析は、プラスミン処理により、濃度依存的に硝子体ゲルは分解され、網膜表面が平滑になることを確認した(図 29)。さらに、網膜内層には、膜貫通型の細胞外基質分解酵素である membrane type-1 matrix me-

tallopoteinase (MT 1-MMP) が局在しており、プラスミン処理により、マトリックスメタロプロテアーゼ-2 (MMP-2) が活性化されることが判明した (図 30)。我々は、この MT 1-MMP がプラスミンによる MMP-2 活性化に重要な役割を果たすと考えており、実際に、硝子体標本に *in vitro* でプラスミンを加えても、MMP-2 活性化は認めなかった。一方、臨床的にプラスミン処理を用いた硝子体手術を施行した患者から、同意を得て採取した硝子体標本では、明瞭に MMP-2 活性が亢進していた (図 31)<sup>127</sup>。我々は臨床的に後部硝子体剝離を作製する酵素処理としてのプラスミンの有効性を確認するとともに、その分子基盤を解明したと考える。我々はプラスミンに続く次世代の酵素処理手術の開発も手がけており、その一つの可能性として、微生物培養により大量かつ安価に生産が可能であるナットウキナーゼにおいても、同様の後部硝子体剝離誘導能を認めており<sup>128</sup>、その臨床応用に向けてのトランスレーショナルリサーチに取り組んでいる。このような酵素処理を含めて、硝子体手術の改良は、術後炎症反応を劇的に抑制するとともに、増殖の場となる遺残硝子体ゲルを徹底的に除去することで、増殖硝子体網膜症の発症リスクを最小限にすることは可能であると考えられる。

## V 網膜再生医療の補完的薬物療法

### 1. 再生医学・医療の現状と眼科領域における応用

再生医学・医療は、疾患によって喪失された機能を再建する新しい治療概念として、一般社会からも大きな期待を寄せられている。眼科領域においては、眼表面の再生医療が既に臨床応用されており成果を挙げているが、網膜視神経の再生医療については未だ十分な臨床的成績を得ることができていない。主要な中途失明原因は、糖尿病網膜症、緑内障、加齢黄斑変性症、網膜色素変性症などであるが、これらはいずれもが網膜神経細胞の細胞死を共通経路としており、視覚神経回路網の破綻が本態である。一旦喪失した視機能の再建にとって、網膜視神経の再生医療は期待されながらも、臨床的試みは限定的にしか行われていない。ヒトにおける網膜移植再生医療の試みとしては、複数の研究グループによる臨床的な試みがなされてきた<sup>129)130)</sup>。しかし、これらの先進的な取り組みは、十分な視機能改善に成功したとはいえない。移植された視細胞は生着は可能であるが、機能的な神経回路網に組み込まれたという根拠は十分に得られていない。

基礎研究レベルで移植網膜の細胞源として試みられているものとしては、成体脳由来神経幹細胞、胎仔脳由来神経幹細胞、胚性幹細胞、虹彩色素上皮細胞、毛様体由来網膜幹細胞、骨髄間質細胞などがある。幹細胞や前駆細胞は自己複製能と分化能を有し、成体で組織や臓器の恒常性の維持や損傷時の再生を可能にする細胞群であ

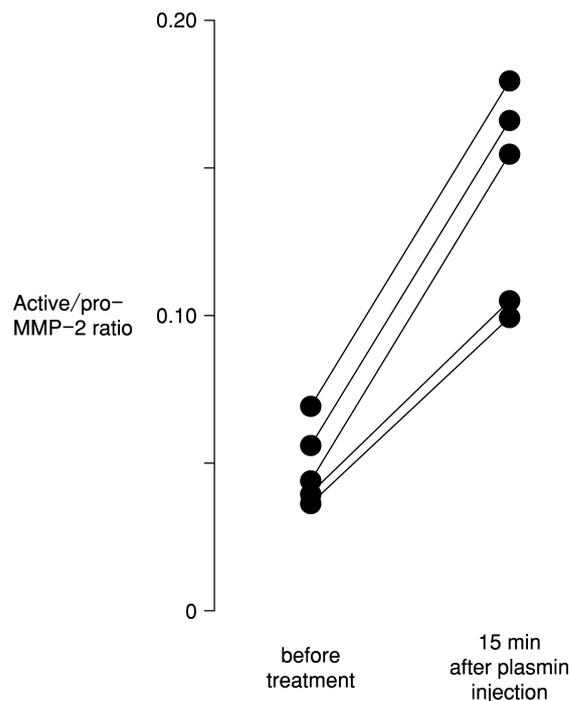


図 31 臨床的にプラスミンを用いた硝子体手術における硝子体標本中の MMP-2 活性。(文献 127 より許可を得て転載)

プラスミン注入後、15 分後に採取した硝子体標本では、活性化 MMP-2 の比率が上昇しており、プラスミンを介して MMP-2 活性化が生じていることが臨床的にも確認された。

る。成体幹細胞を移植細胞源とする最大の利点は免疫反応を回避する自己細胞が利用できる点であり、すでに、角膜上皮など一部臓器では、臨床応用が開始されている。2000 年に Tropepe ら<sup>131)</sup>が成熟マウス個体の眼組織(毛様体縁部)に網膜幹(前駆)細胞を発見したことで大きな転換点を迎えた。毛様体は臨床において視機能を障害することなく外科的に入手可能であり、網膜-細胞移植治療における細胞源として、現在、最も有力な候補の一つである。幹細胞は、通常、生体組織全体の細胞の数%にすぎないため、これらの幹細胞を組織再生に利用するには、*ex vivo* で増幅させることが必要である。高橋らは、成体海馬由来神経幹細胞を硝子体腔に移植すると傷害された宿主成体網膜内に層構造を破壊することなく生着することを報告<sup>132)</sup>した。

### 2. 網膜再生医療に向けての我々の研究戦略

我々は前述した一連の細胞接着分子や生理活性因子研究、あるいは後述する細胞外マトリックス研究を通じて、視覚神経回路網の発生・再生に深い関心を寄せていたが、上記の高橋らの神経幹細胞の網膜内移植研究<sup>132)</sup>に共同研究者として参加することで、それ以降、神経幹細胞の細胞系譜誘導の場としての網膜の作用に着目するようになった。このような研究潮流の中で、我々が考えた研究戦略は、現在の網膜再生医療が抱える諸問題を解

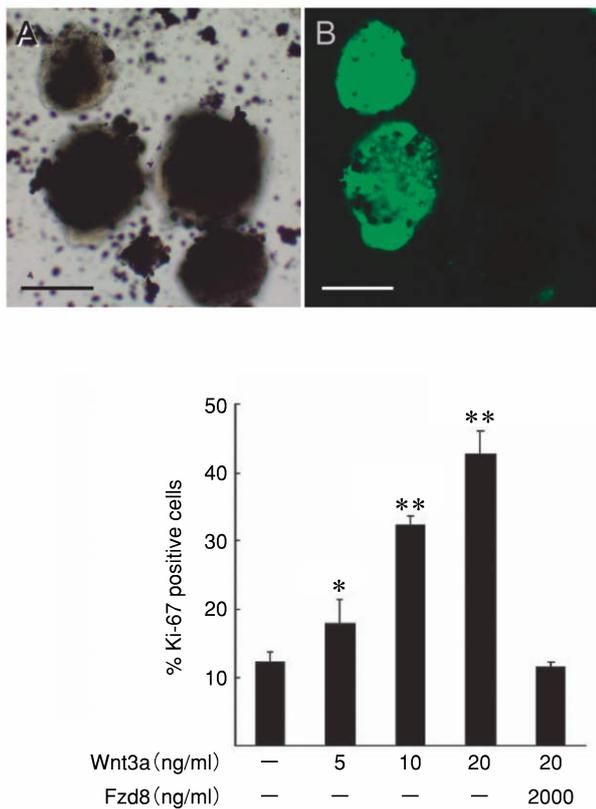


図 32 生理活性因子による網膜幹細胞の高効率な培養刺激。(文献 134 より許可を得て転載)

上段；毛様体由来網膜幹細胞のクローナルなスフィア形成。明視野(A)および蛍光(B)顕微鏡像を示す。GFP(green fluorescence protein)発現マウスおよび野生型マウスから得られた成体毛様体細胞をバラバラに分解して混合し、5日間浮遊培養を行った。混合した細胞はそれぞれ別々のスフィアを形成した。バーは100 μm。

下段；細胞増殖能をKi-67陽性で評価して、Ki-67陽性細胞数を定量したところ、Wnt3aの濃度依存的にKi-67陽性細胞数は増加していた。Fzd-8-CRD(Wntアンタゴニスト)によりその効果は阻害されており、この効果がWnt活性によるものであることが確認された。またWnt3aの存在下にてBrdU取り込み細胞数が増加した。全データは3回実験の平均値±標準偏差。

決していくことであった。現時点で、網膜再生医療の臨床応用に踏み込むために必要な研究は、(1)高効率な細胞資源の獲得、(2)安全で確実な移植法の樹立、(3)神経細胞系譜誘導の制御技術の開発、(4)神経細胞の軸索誘導の制御と考えた。

3. 網膜幹細胞の培養と増殖刺激

現時点で網膜再生医療の臨床応用を考えた場合、自家細胞であることによって移植細胞に対する宿主側の免疫応答が回避でき、毛様体(あるいは虹彩)は手術的に採取可能な領域であることから、自家毛様体由来の網膜幹細胞が最も可能性が高いと考えた。ES細胞は、細胞分化・増殖の制御がまだ十分ではなく、臨床応用では奇形

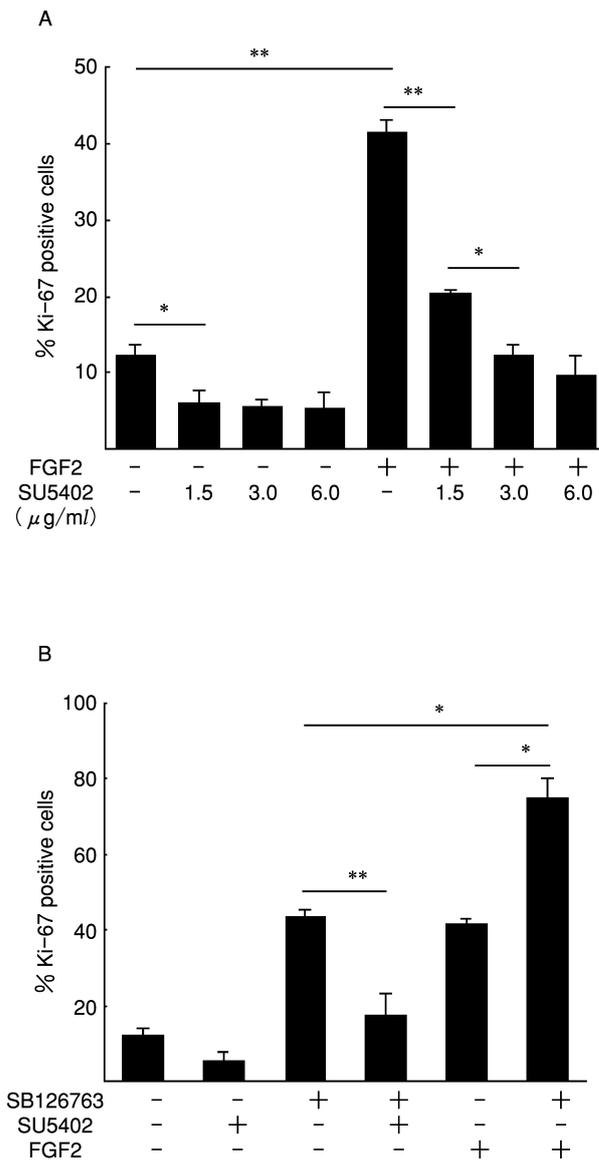


図 33 網膜幹細胞の増殖刺激に対するWnt刺激とFGFシグナルの関連。(文献 134 より許可を得て転載)

我々はSB126763(GSK3阻害剤)がβ-カテニンへの影響を介して、Wntシグナル刺激の代用となることを解明した。SB126763(GSK3阻害剤)とSU5402(FGFレセプター阻害剤)の網膜幹細胞増殖刺激を解析したところ、Wnt刺激はFGFシグナルと相加的な効果を認めた。

Ki-67陽性細胞数にて網膜幹細胞の増殖性を評価した。バラバラにしたスフィア細胞を各条件下に48時間接着培養した。外因性FGF2の存在下で、SU5402はKi-67陽性細胞数を濃度依存的に低下させた。外因性FGF2の非存在下でもSU5402はKi-67陽性細胞数を減少させた。このことからスフィア由来細胞の培養に内因性FGF2が存在していることが示唆された。SB126763の細胞増殖に対する影響はSU5402によって減弱し、FGF2によって増強した。数値データは、平均値±標準誤差で示された。\*: p<0.05, \*\*: p<0.01。

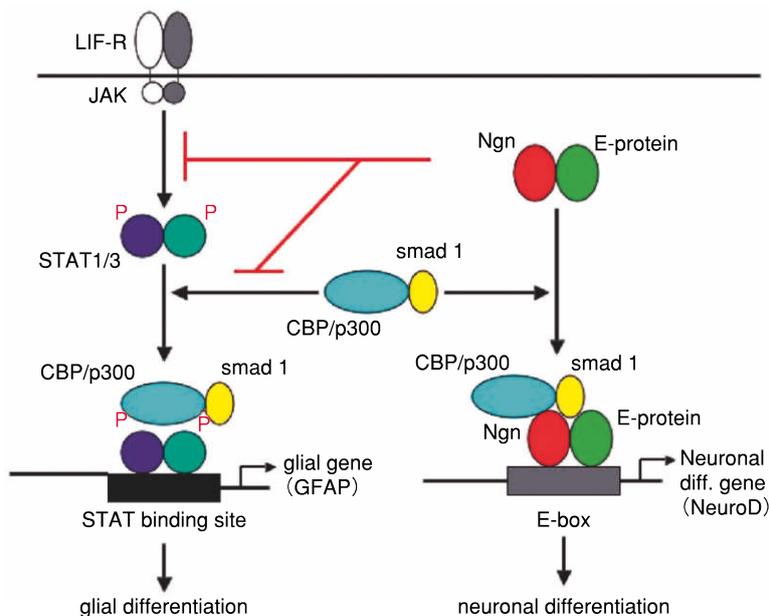


図 34 神経幹細胞における細胞系譜決定の分子メカニズム。

インターロイキン-6(IL-6)スーパーファミリーの刺激は、受容体と glycoprotein 130(gp 130)のコンビネーションにより、gp 130 が活性化され、下流の JAK(janus kinase)/STAT(signal transducers and activators of transcription)系を介して GFAP のプロモーターを活性化され、グリア細胞系譜へと誘導される。ニューロジェニン(Ngn)は、この経路を抑制することで、神経細胞系譜へと誘導する。

種などの腫瘍形成のリスクを現時点では否定できない。胎児由来細胞は、日本においては倫理的問題に抵触する上に、入手がきわめて制限される現状の中で、臨床応用にまで踏みきるには難しいと考えた。骨髄間質細胞は、細胞分化と細胞融合の識別が議論されている段階であり、現時点で網膜再生医療の臨床応用を考える段階に至っていない。いずれにせよ、細胞系譜の分化誘導を考えた場合、組織由来領域の支配は強力であり、脳を含めて他臓器由来の神経幹細胞は、神経細胞には分化しうるものの、網膜特異的の神経細胞に分化誘導することがきわめて困難である。毛様体由来の網膜幹細胞は、移植目的に使用する場合に採取できる細胞量は限られる。したがって、移植に十分な量の網膜幹細胞を得るためには多分化能を維持したまま *ex vivo* における効率的かつ安定した細胞増殖を可能とする手技を確立し、移植細胞資源として樹立する必要がある。

我々は、毛様体由来の網膜幹細胞を単離培養した。特に、臨床応用を考えた場合、高効率な増殖培養技術の確立は重要と考えたが、増殖促進手段の候補として、網膜発生に関連する分泌性の生理活性因子である Wnt<sup>133</sup>を応用することを考えた。Wnt 3a を添加することで、毛様体由来網膜幹細胞は増殖刺激され、一次ニューロスフェア直径も増加した(図 32)。Wnt 刺激により増殖された網膜幹細胞は、網膜特異的の神経細胞タイプに分化しうる多分化能を有しており、FGF シグナルと相加的な効果を認めた(図 33)<sup>134</sup>。

#### 4. 移植された神経幹細胞の細胞系譜分化誘導の制御

移植された神経幹細胞にとって、適切な神経細胞系譜に分化誘導されることは必須となる。経硝子体移植は残存視機能を損傷することなく臨床の手術手技で網膜移植が可能で、臨床応用に適する手技と考えられる。神経(網膜)幹細胞の分化に関わる因子としては発生学的知見を基盤に様々な内的、外的因子が報告されている。我々は神経保護研究を通じて、多彩な生理活性因子群を解析していたが、それらの一部、例えば CNTF や IL-6、は細胞系譜に影響を与える代表的生理活性因子でもある。したがって、生理条件下の網膜とは異なり、病的状態に陥った網膜とそのストレス応答は、幹細胞移植後の細胞系譜誘導に大きな影響を与えることが考えられた。そこで我々は、「分化誘導の場」としての網膜の役割に着目して研究を展開した。眼圧非依存的網膜障害のモデルとして、グルタミン酸受容体を介した網膜障害モデル眼(NMDA 注入眼)を作製した。次に、enhanced green fluorescence protein(EGFP)トランスジェニックマウス胎生 14 日終脳より神経上皮細胞を分離し、これより神経前駆細胞を精製し、経硝子体的に移植した。移植細胞は、網膜内に侵入生着し、少なくとも移植後 4 週間は宿主網膜内で生存することが示された。免疫染色によって、移植後の神経幹細胞の細胞系譜を解析したところ、8 割前後の移植細胞が GFAP 陽性のグリア細胞系譜へと誘導されていた。CNTF ファミリーの発現との関連を解析すると、NMDA 注入後 1 週をピークに宿主網膜グリア細胞の GFAP 発現上昇で示される活性化

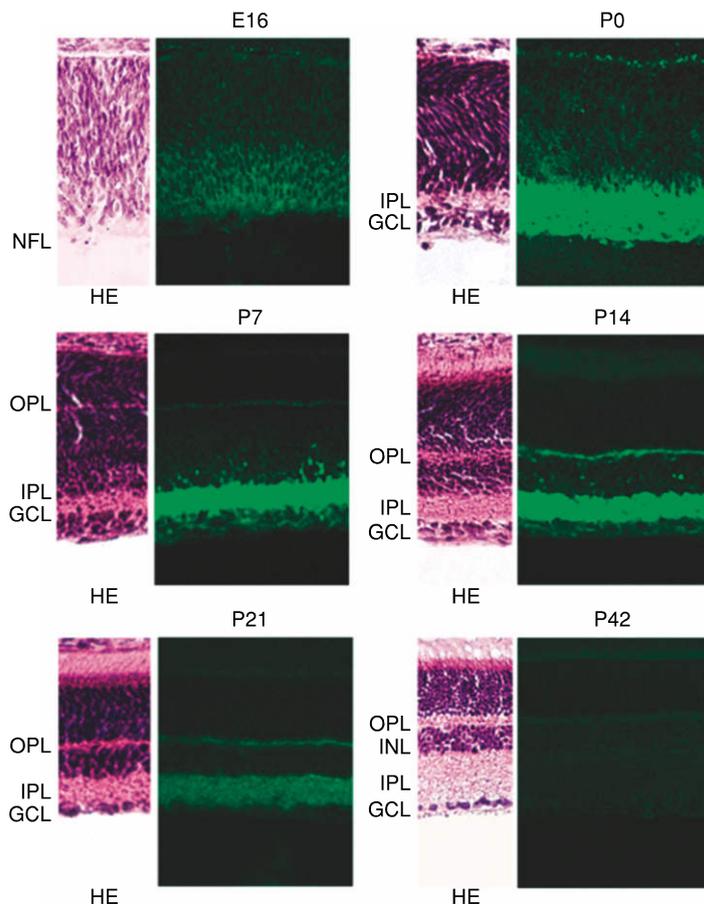


図 35 網膜発生における神経特異的プロテオグリカンの発現。(文献 141 より許可を得て転載)

神経特異的プロテオグリカンの発現は、網膜発生の段階で、網膜細胞分化の進行と神経細胞間シナプス形成が行われている時間的空間的な局在と一致していた。

図は、神経特異的プロテオグリカンの代表として、ニューロカンの免疫染色による局在解析を示す。発生網膜のニューロカン免疫染色。胎生期 16 日目 (E 16) では、神経線維層 (NFL) を含む網膜内層にニューロカンの局在を認めた。生後 0 日 (P 0) では、NFL や神経節細胞層 (GCL) および内網状層 (IPL) に強い免疫染色性をみられた。生後 14 日 (P 14) では外網状層 (OPL) にも発現を認めたが、成熟した生後 42 日 (P 42) のラットでは染色性はほとんどみられなかった。

と CNTF 発現上昇が観察された。IL-6 スーパーファミリーに属する leukemia inhibitory factor (LIF) や CNTF はアストロサイト (グリア細胞) の分化誘導因子であり、gp (glycoprotein) 130 のシグナルを活性化し、下流の JAK (janus kinase) / STAT (signal transducers and activators of transcription) 系を介して GFAP のプロモーターを活性化することが知られている (図 34)<sup>135)</sup>。さらに、グリア細胞系の活性化は、軸索誘導に大きな影響を与える<sup>136)</sup>。グリア細胞の移植後の宿主網膜からのサイトカインなどの液性因子 (CNTF) の発現持続が神経前駆細胞のグリア優位への分化に影響している可能性が示唆された。そこで gp 130 ノックアウトマウス由来の神経前駆細胞を用いた同様の移植実験では、GFAP 陽性移植細胞の割合は対照と比較すると有意に減少し、未熟なニューロンのマーカーである MAP 2 陽性移植細胞の割合が増加した<sup>137)</sup>。これらのことから移植された神経前駆細胞の分化に gp 130 シグナルを介し

た制御機構の関与が示唆された。

さらに、我々は神経前駆細胞移植における網膜再生において、移植細胞が効率的にニューロンへ分化することが必要である。そこで、神経特異的な basic region helix loop helix (bHLH) 型の転写制御因子<sup>138)</sup>の遺伝子導入を行い、神経前駆細胞のニューロンへの分化誘導を試みた。ニューロン分化誘導を促すニューロジェニン遺伝子をレトロウイルスベクターにより神経前駆細胞に強制発現させると、*in vitro* では有意にニューロンへの分化誘導が認められたものの、強制発現後に移植細胞の障害網膜への生着は抑制された。原因としてニューロジェニン遺伝子を導入した細胞はニューロン分化とともに増殖能を失うこと、さらに強制的にニューロンへ分化した細胞は網膜への侵入生着および生存能が低いことが考えられた。他方、非ステロイド系消炎剤であるインドメタシンを投与したところ、NMDA 網膜障害後であっても網膜内の gp 130, CNTF の発現が減少するとともに神

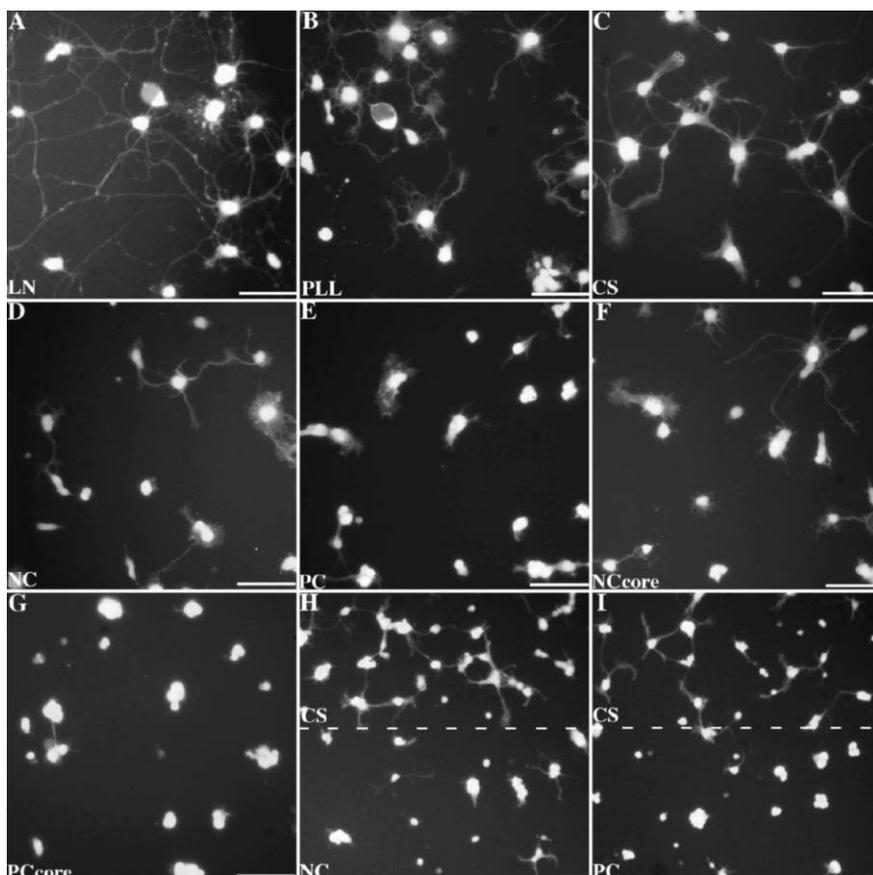


図 36 神経特異的プロテオグリカンによる培養網膜神経節細胞における軸索伸張の制御。(文献 146 より許可を得て転載)

ニューロカンは、網膜神経節細胞の神経突起伸長を統計学的に有意に抑制することが可能である。ニューロカンやホスファカンをコートした培養プレート上では、ラット網膜神経節細胞の神経突起の伸長は、著しく抑制された。

生存している網膜神経節細胞の軸索を観察するために、calcein-AM が用いられた。poly-L-lysine (50  $\mu\text{g/ml}$ ) (PLL) プレート上に 10  $\mu\text{g/ml}$  laminin (LN) でコートして 48 時間培養した網膜神経節細胞は長い軸索を伸ばす (A)。PLL プレートのみ (B)、chondrosarcoma プロテオグリカン (CS) でコートした PLL プレート (C) でも軸索は伸びる。一方、10  $\mu\text{g/ml}$  ニューロカン (NC) (D) やホスファカン (PC) (E) でコートした PLL プレートは、軸索伸張が抑制されていた。コンドロイチナーゼ ABC で処理してコア蛋白質だけにしたニューロカン (NCcore) (F) やホスファカン (PCcore) (G) でコートした PLL プレートでも、この抑制効果は観察された。特にホスファカンのコア蛋白質の抑制効果は増強されていた。同一培養プレートを二種類のプロテオグリカンでコートすると、ニューロカンとホスファカンの抑制効果は、さらに明瞭であった。バーは 50  $\mu\text{m}$

経前駆細胞のグリア細胞系譜への誘導が抑制された。

##### 5. 神経軸索の投射制御技術の開発

網膜再生医療による視機能再建を考えた場合、最大の難関は、機能的神経回路網を再構築するシステムの開発になると思われる。現時点では、かろうじて移植された一部の細胞がシナプスを形成することが期待されているにとどまり、大部分の移植細胞群が確実に目的とする細胞系譜に誘導された上で、効率よく神経回路網を再形成していることを示す報告はない。特に視覚神経回路網においては、網膜神経節細胞のきわめて長く特有の脳に至る経路を辿る軸索誘導は、現状の技術では至難の業といわざるを得ない。神経幹細胞を特定の神経細胞へ分化誘導し、神経回路を再構築するためには、その幹細胞が本

来持つ性質のみならず、細胞周辺を取り巻く微小環境が大きな比重を占めることが認識されてきている。我々は神経細胞の分化誘導を規定する因子として、細胞外基質の一つであるプロテオグリカンに注目し、一連の研究を展開してきた<sup>139)</sup>。

プロテオグリカンはそのグリコサミノグリカン糖鎖を有する糖蛋白質で、その糖鎖や蛋白に様々な生理活性因子や他の細胞外基質、または細胞表面の接着因子を結合させる作用を有する。発生段階にある網膜に対してグリコサミノグリカン糖鎖の一つであるコンドロイチン硫酸を認識する抗体で免疫染色を行うと、視神経や網膜内層に強い免疫染色性がみられ、その染色性は網膜の成熟に従い、次第に消退していくことを観察できる<sup>140)</sup>。網膜

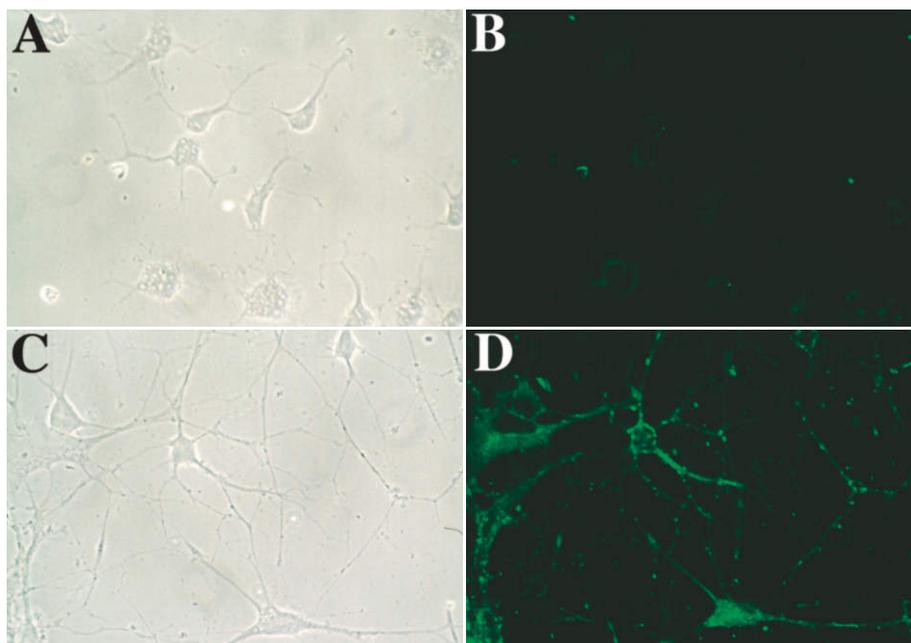


図 37 神経幹細胞の分化誘導と神経特異的プロテオグリカンの発現変化。(文献 148 より許可を得て転載) ヘパラン硫酸プロテオグリカンである N-シンデカン<sup>148</sup>は、神経幹細胞(A, B)の分化誘導における神経特異的プロテオグリカンの発現変化を解析したところ、神経細胞系譜の分化誘導に伴う神経突起伸長に対応して、N-シンデカンの発現上昇が認められた(C, D)。

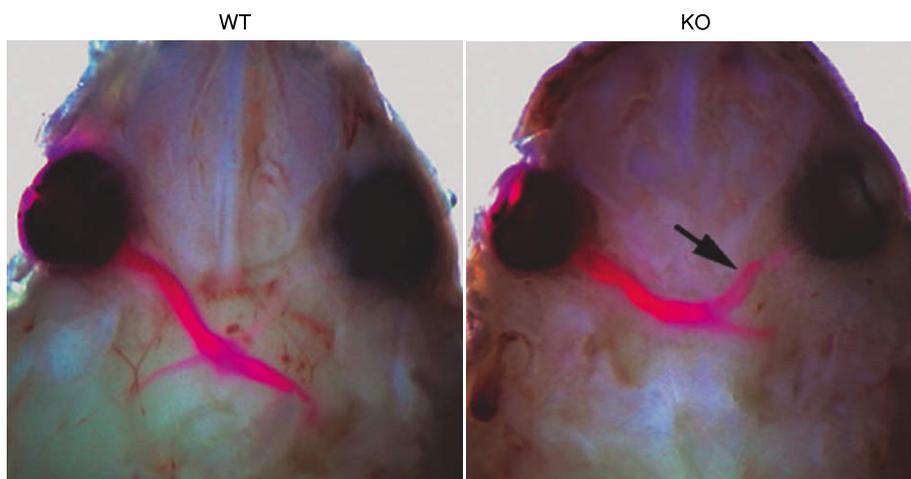


図 38 神経幹細胞の分化誘導と神経特異的プロテオグリカンの発現変化。(文献 149 より許可を得て転載) 稲谷らは、ヘパラン硫酸合成酵素である EXT 1 遺伝子を神経特異的にノックアウトした変異マウス(KO)を作製したところ、視神経軸索は視交叉を通過したのち、僚眼の視神経に沿って逆行性に異常な投射を示したことを報告した。

ヘパラン硫酸合成酵素 EXT 1 変異マウス(KO)における視神経投射異常。WT は、対照としての野生型を示す。変異マウスの大半の視神経は視交叉を通過後、僚眼の視神経を逆行性に投射した(矢印)。

視細胞間基質(interphotoreceptor matrix, IPM)に存在するコンドロイチン硫酸は、視細胞の機能維持もしくは他の細胞外基質や細胞接着因子と架橋構造を作ることによって神経網膜と網膜色素上皮細胞との機械的接着を促していると推測されている。我々は、発生段階で発現するコンドロイチン硫酸は、軸索の伸長過程もしくはシナプス形成過程に関わっている可能性を考えた。

我々は、研究当時、脳特異的と考えられていたコンド

ロイチン硫酸プロテオグリカンであるニューロカン、ホスファカン、ニューログリカン C の発現を評価したところ、網膜の発生段階において、特定の層に一過性に発現していることが解明された(図 35)<sup>141)~143)</sup>。すなわち、これらは脳特異的ではなく、神経特異的なプロテオグリカンであるといえる。興味深いことに網膜に対して、眼圧非依存的網膜障害(虚血再灌流障害)を生じると、成熟網膜ではほとんど発現がみられないニューロカンがグリ

ア細胞から産生される現象がみられた<sup>144)</sup>。これらの神経特異的プロテオグリカンの時間的空間的に制御された発現パターンは、多彩な組織で発現されることの多い神経組織非特異的なプロテオグリカンドコリンと比較すると明瞭な相違であった<sup>145)</sup>。網膜神経節細胞をニューロカン、ホスファカンの存在下で培養を行うと、神経突起の伸長が著しく阻害されることから、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが神経軸索伸長を制御している可能性が示唆された(図 36)<sup>146)</sup>。このように、神経特異的プロテオグリカンは、視覚神経回路網の発生と再生に深くかかわる環境中の軸索制御因子として作用する。

我々はヘパラン硫酸プロテオグリカンがそのグリコサミノグリカン糖鎖を介して、Wnt や FGF などの神経幹細胞の分化誘導に関与する生理活性物質と結合する作用に着目し、その発現分布を解析したところ、N-シンデカンと呼ばれるヘパラン硫酸プロテオグリカンが、網膜の発生段階において視神経軸索に局在発現していることが判明した<sup>147)</sup>。我々はさらに、神経幹細胞の分化誘導における神経特異的プロテオグリカンの発現変化を解析したところ、神経細胞系譜の分化誘導に伴う神経突起伸長に対応して、N-シンデカンの発現上昇が認められた(図 37)<sup>148)</sup>。さらに、共同研究者である稲谷(現 熊本大眼科)は、留学中の研究において、ヘパラン硫酸合成のキー酵素である EXT 1 をコードする遺伝子を神経組織特異的にノックアウトした変異マウスを作製したところ、その変異マウスでは、視神経は視交叉を通過したのち、僚眼の視神経に沿って逆行性に異常な投射を示した(図 38)<sup>149)</sup>。他方、成熟した中枢神経組織ではグリコサミノグリカンの発現が抑制されているため、生理活性因子に対する応答が低下している可能性が考えられ、今後、生理活性因子の生体内での作用を評価する上で、糖鎖による影響を加味する必要があるといえる。網膜発生医学と再生医療を考えた場合、神経軸索の制御技術の開発は不可欠であり、細胞外マトリックス研究の重要性は強調しておきたい。

## VI 結 語

我々は宿題報告「新しい眼薬物療法」を担当するに当たって、最新の基礎医学研究手法の進歩を積極的に導入することで、眼疾患の詳細な分子基盤を解析することが可能になったと考えた。我々はこのような研究戦略を活用することで、「分子基盤に基づいた眼疾患の理解と新しい眼薬物療法」を目指した。本総説においては、我々が展開してきた研究について、「緑内障」、「加齢黄斑変性」、「増殖硝子体網膜症」という三つの眼疾患を取り上げ、さらに、新しい治療概念として網膜再生医療については、補完的薬物療法の重要性を指摘し、今後の研究展開の方向性を述べた。我々が得られた研究成果は、これらの眼疾患の分子基盤すべてを解明したものではない。

しかし、我々の得た知見は、少なくともいくつかの新しい視点を眼疾患の理解に提供し、新しい薬物療法の臨床応用を可能にした。我々は、臨床医としての関心から研究目標を設定し、基礎研究者として問題の解決を図ることを意識して研究を展開してきた。「狭い専門性からの脱却」と「基礎研究と臨床医学の融合」という二つの命題を掲げたが、新しい病態解釈と治療法の開発には、このような考え方はきわめて重要であり、そして有効であると考えている。

稿を終えるに当たって、宿題報告の機会を賜りました日本眼科学会評議員の諸先生、座長の労をお取り下さいました増田寛次郎先生、本研究をご支援いただきました熊本大学眼科同窓会、京都大学眼科同窓会、製薬会社、共同研究者の諸先生に深く感謝申し上げます。特に、私の眼科医としての生涯にわたって常に温かく見守り励まして下さった我が恩師 永田 誠先生、本田孔士先生のご指導とご支援に深謝申し上げます。

本研究は、文部科学省科学研究補助金、文部科学省高度先進医療開発経費、熊本大学医学部附属病院先端医療支援経費、厚生労働省科学研究補助金などにより行われたことを付記して、謝意を表します。

(本総説は、平成 17 年 3 月に開催された第 109 回日本眼科学会総会の宿題報告講演にて発表された内容に基づいて執筆された。ただし、図表およびそれに類する詳細な数値データについては、既に論文発表された中から転載許可が得られたもの限定して記載した。講演内容の一部は論文投稿(準備)中、印刷中あるいは掲載直後のため適切な転載許可が得られず、本総説においては割愛したことをお断りする。)

## 文 献

- 1) **International Human Genome Sequencing Consortium** : Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 : 931—945, 2004.
- 2) **Nathans J, Piantanida TP, Eddy RL, Shows TB, Hogness DS** : Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science* 232 : 203—210, 1986.
- 3) **Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, et al** : A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 343 : 364—366, 1990.
- 4) **Gorevic PD, Munoz PC, Gorgone G, Purcell JJ Jr, Rodrigues M, Ghiso J, et al** : Amyloidosis due to a mutation of the gelsolin gene in an American family with lattice corneal dystrophy type II. *N Engl J Med* 325 : 1780—1785, 1991.
- 5) **Stone EM, Fingert JH, Alward WL, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SL, et al** : Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275 : 668—670, 1997.

- 6) **Shields MB** : Aqueous humoe dynamics I. Anatomy and physiology. In : "Textbook of Glaucoma", Williams & Wilkins, Baltimore, 5—36, 1992.
- 7) **Tanihara H, Negi A, Akimoto M, Terauchi H, Okudaira A, Kozaki J**, et al : Surgical effects of trabeculotomy ab externo on adult eyes with primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation syndrome. *Arch Ophthalmol* 111 : 1653—1661, 1993.
- 8) **Akimoto M, Tanihara H, Negi A, Nagata M** : Surgical results of trabeculotomy ab externo for developmental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 112 : 1540—1544, 1994.
- 9) **Ikeda H, Ishigooka H, Muto T, Tanihara H, Nagata M** : Long-term outcome of trabeculotomy for the treatment of developmental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 122 : 1122—1128, 2004.
- 10) **Tanihara H, Negi A, Akimoto M, Nagata M** : Long-term surgical results of combined trabeculotomy ab externo and cataract extraction. *Ophthalmic Surg* 26 : 316—324, 1995.
- 11) **Tanihara H, Honjo M, Inatani M, Honda Y, Ogino N, Ueno S**, et al : Trabeculotomy combined with phacoemulsification and implantation of an intraocular lens for the treatment of primary open-angle glaucoma and coexisting cataract. *Ophthalmic Surg Lasers* 28 : 810—817, 1997.
- 12) **Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Honda Y, Ogino N, Ueno S**, et al : Phacoemulsification, intraocular lens implantation, and trabeculotomy to treat pseudoexfoliation syndrome. *J Cataract Refract Surg* 24 : 781—786, 1998.
- 13) **Tanihara H, Negi A, Akimoto M, Nagata M** : Long-term results of non-filtering surgery for the treatment of primary angle closure glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233 : 563—567, 1995.
- 14) **Tanihara H, Nagata M** : Argon-laser gonioplasty following goniosynechialysis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 229 : 505—507, 1991.
- 15) **Tanihara H, Nishiwaki K, Nagata M** : Surgical results and complications of goniosynechialysis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 230 : 309—313, 1992.
- 16) **Tripathi RC, Li J, Chan WF, Tripathi BJ** : Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF-beta 2. *Exp Eye Res* 59 : 723—727, 1994.
- 17) **Knepper PA, Mayanil CS, Goossens W, Wertz RD, Holgren C, Ritch R**, et al : Aqueous humor in primary open-angle glaucoma contains an increased level of CD 44 S. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 133—139, 2002.
- 18) **Alvarado J, Murphy C, Juster R** : Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 91 : 564—579, 1984.
- 19) **Finkelstein I, Trope GE, Basu PK, Hasany SM, Hunter WS** : Quantitative analysis of collagen content and amino acids in trabecular meshwork. *Br J Ophthalmol* 74 : 280—282, 1990.
- 20) **Tripathi RC** : The functional morphology of the outflow systems of ocular and cerebrospinal fluids. *Exp Eye Res* 25 (Suppl) : 65—116, 1977.
- 21) **Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA, Llesuy SF** : Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol* 137 : 62—69, 2004.
- 22) **Inatani M, Tanihara H, Katsuta H, Honjo M, Kido N, Honda Y** : Transforming growth factor- $\beta_2$  levels in aqueous humor of glaucomatous eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239 : 109—113, 2001.
- 23) **Tripathi RC, Borisuth NS, Kolli SP, Tripathi BJ** : Trabecular cells express receptors that bind TGF-beta 1 and TGF-beta 2 : A qualitative and quantitative characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 260—263, 1993.
- 24) **Mettu PS, Deng PF, Misra UK, Gawdi G, Epstein DL, Rao PV** : Role of lysophospholipid growth factors in the modulation of aqueous humor outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2263—2271, 2004.
- 25) **Hall A** : Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279 : 509—514, 1998.
- 26) **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T**, et al : Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389 : 990—994, 1997.
- 27) **Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Yue BYJT, Narumiya S**, et al : Effects of Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 137—44, 2001.
- 28) **Rao PV, Deng PF, Kumar J, Epstein DL** : Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1029—1037, 2001.
- 29) **Tanihara H, Ohuchi T, Yoshimura N, Negishi M, Ito S** : Heterogenous response in calcium signaling by adrenergic and cholinergic stimulation in cultured bovine trabecular cells. *Exp Eye Res* 52 : 393—396, 1991.
- 30) **Ohuchi T, Tanihara H, Yoshimura N, Kuriyama S, Ito S, Honda Y** : Neuropeptide-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients in cultured bovine trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : 1676—1684, 1992.
- 31) **Koga T, Koga T, Awai M, Tsutsui J, Yue BYJT, Tanihara H** : Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion,

- contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cell. *Exp Eye Res*, in press.
- 32) **Honjo M, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, Honda Y, et al** : Effects of protein kinase inhibitor, HA 1077, on intraocular pressure and outflow facility in rabbit eyes. *Arch Ophthalmol* 119 : 1171—1178, 2001.
- 33) **Honjo M, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BYJT, Honda Y, et al** : A myosin light chain kinase inhibitor, ML-9, lowers the intraocular pressure in rabbit eyes. *Exp Eye Res* 75 : 135—142, 2002.
- 34) **Inatani M, Tokushige H, Nemoto S, Tajika T, Uehata M, Tanihara H** : Intraocular pressure-lowering effects of topical administration of Y-39983, a novel selective Rho-ssociated protein kinase inhibitor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 46 : (ARVO E-Abstract) 3787, 2005.
- 35) **Tanihara H, Ohira A, Takahashi M, Honda Y, Suzuki S** : Localization and possible gene expression of proteoglycan decorin in the trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 14 : 727—730, 1995.
- 36) **Hangai M, Tanihara H, Honda Y, Kaneda Y** : Introduction of DNA into the rat and primate trabecular meshwork by fusogenic liposomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 509—516, 1998.
- 37) **Grant WM** : Further studies on facility of flow through the trabecular meshwork. *Arch Ophthalmol* 60 : 523—533, 1958.
- 38) **Tian B, Geiger B, Epstein DL, Kaufman PL** : Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 619—623, 2000.
- 39) **Bill A, Lutjen-Drecoll E, Svedbergh B** : Effects of intracameral Na<sub>2</sub>EDTA and EGTA on aqueous outflow routes in the monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 : 492—504, 1980.
- 40) **Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, et al** : Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 295 : 1077—1079, 2002.
- 41) **Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M** : Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet* 6 : 641—647, 1997.
- 42) **Kubota R, Mashima Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura T, Hotta Y, et al** : Novel mutations in the myocilin gene in Japanese glaucoma patients. *Human Mutation* 16 : 270, 2000.
- 43) **Mashima Y, Suzuki Y, Sergeev Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura I, et al** : Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 2211—2216, 2001.
- 44) **Ohtake Y, Tanino T, Suzuki Y, Miyata H, Taomoto M, Azuma N, et al** : Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (CYP1B1) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Br J Ophthalmol* 87 : 302—304, 2003.
- 45) **Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, et al** : Variants in optineurin gene and their association with tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms in Japanese patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 4359—4367, 2004.
- 46) **Saraiva MJ, Birken S, Costa PP, Goodman DS** : Family studies of the genetic abnormality in transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 435 : 86—100, 1984.
- 47) **Holmgren G, Ericzon BG, Groth CG, Steen L, Suhr O, Andersen O, et al** : Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* 341 : 1113—1116, 1993.
- 48) **Kimura A, Ando E, Fukushima M, Koga T, Hirata A, Arimura K, et al** : Secondary glaucoma in patients with amyloidotic polyneuropathy. *Arch Ophthalmol* 121 : 351—356, 2003.
- 49) **Koga T, Ando E, Fukushima M, Kimura A, Hirata A, Ando Y, et al** : Vitreous opacities and outcome of vitreous surgery in patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Am J Ophthalmol* 135 : 188—193, 2003.
- 50) **Haraoka K, Ando Y, Ando E, Sangren O, Hirata A, Nakamura M, et al** : Amyloid deposition in ocular tissues of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Amyloid* 9 : 183—189, 2002.
- 51) **Haraoka K, Ando Y, Ando E, Sun X, Nakamura M, Terazaki H, et al** : Presence of variant transthyretin in aqueous humor of a patient with familial amyloidotic polyneuropathy after liver transplantation. *Amyloid* 9 : 247—251, 2002.
- 52) **Cavallaro T, Martone RL, Dwork AJ, Schon EA, Herbert J** : The retinal pigment epithelium is the unique site of transthyretin synthesis in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 497—501, 1990.
- 53) **Ando Y, Terazaki H, Nakamura M, Ando E, Haraoka K, Yamashita T, et al** : A different amyloid formation mechanism. De novo oculoleptomeningeal amyloid deposits after liver transplantation. *Transplantation* 77 : 345—349, 2004.
- 54) **Kawaji T, Ando Y, Nakamura M, Yamamoto K, Ando E, Takano A, et al** : Transthyretin synthesis in rabbit ciliary pigment epithelium. *Exp Eye Res* 81 : 306—312, 2005.

- 55) **Kawaji T, Ando Y, Ando E, Nakamura M, Hirata A, Tanihara H** : A case of vitreous amyloidosis without systemic symptoms in familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid* 11 : 257—259, 2004.
- 56) **Kawaji T, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Wakita M, Ando E, et al** : Ocular amyloid angiopathy associated with familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Y114C. *Ophthalmology*, in press.
- 57) **Nakamura M, Ando Y, Nagahara S, Sano A, Ochiya T, Maeda S, et al** : Targeted conversion of the transthyretin gene *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 11 : 838—846, 2004.
- 58) 日本緑内障学会 : 緑内障診療ガイドライン, 2003.
- 59) **Iwase A, Suzuki Y, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S, et al** : Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society : The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese : The Tajimi Study. *Ophthalmology* 111 : 1641—1648, 2004.
- 60) **Flammer J, Orgul S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein GK, Serra LM, et al** : The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 21 : 359—393, 2002.
- 61) **Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP, et al** : Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 43(Suppl.) : 102—128, 1999.
- 62) **Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, Jia L** : Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog Retin Eye Res* 24 : 217—240, 2005.
- 63) **Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME** : TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115 : 1031—1035, 1997.
- 64) **Wax MB, Barrett DA, Pestronk A** : Increased incidence of paraproteinemia and autoantibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol* 117 : 561—568, 1994.
- 65) **Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, et al** : Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension : Implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 3398—3403, 2001.
- 66) **Tanihara H, Hangai M, Sawaguchi S, Abe H, Kageyama M, Nakazawa F, et al** : Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of eyes with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115 : 752—756, 1997.
- 67) **Wang L, Cioffi GA, Cull G, Dong J, Fortune B** : Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1088—1094, 2002.
- 68) **Honjo M, Tanihara H, Kido N, Inatani M, Okazaki K, Honda Y** : Expression of ciliary neurotrophic factor by activated retinal Müller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 552—560, 2000.
- 69) **Bignami A, Dahl D** : The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic(GFA) protein. *Exp Eye Res* 28 : 63—69, 1979.
- 70) **Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV** : Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 1321—1328, 1984.
- 71) **Ikeda K, Tanihara H, Honda Y, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C** : BDNF attenuates retinal cell death caused by chemically induced hypoxia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2130—2140, 1999.
- 72) **Ikeda K, Tanihara H, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C** : Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. *J Neurochem* 87 : 290—296, 2003.
- 73) **Kido N, Tanihara H, Honjo M, Inatani M, Tatsuno T, Nakayama C, et al** : Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Res* 884 : 59—67, 2000.
- 74) **Kido N, Tanihara H, Honjo M, Inatani M, Honda Y** : Dual effects of interleukin-1 $\beta$  on NMDA-induced retinal neuronal death in rat eyes. *Brain Res* 910 : 153—162, 2001.
- 75) **Yoneda S, Tanihara H, Kido N, Honda Y, Goto W, Hara H, et al** : Interleukin-1 beta mediates ischemic injury in the rat retina. *Exp Eye Res* 73 : 661—667, 2001.
- 76) **Inomata Y, Hirata A, Yonemura N, Koga T, Kido N, Tanihara H** : Neuroprotective effects of interleukin-6 on NMDA-induced rat retinal damage. *Biochem Biophys Res Commun* 302 : 226—232, 2003.
- 77) **Inomata Y, Koga T, Kimura A, Singh DP, Shinohara T, Tanihara H** : Lens epithelium-derived growth factor(LEDGF). Neuroprotection on rat retinal damage induced by N-methyl-D-aspartate. *Brain Res* 991 : 163—170, 2003.
- 78) **Inomata Y, Hirata A, Takahashi E, Kawaji T, Fukushima M, Tanihara H** : Elevated erythropoietin in vitreous with ischemic retinal diseases. *Neuroreport* 15 : 877—879, 2004.
- 79) **Hangai M, Kaneda Y, Tanihara H, Honda Y** : *In vivo* gene transfer into retina mediated by a novel liposome system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 2678—2685, 1996.
- 80) **Hangai M, Tanihara H, Honda Y, Kaneda Y** :

- In vivo* delivery of phosphorothioate oligonucleotides into murine retina. Arch Ophthalmol 116 : 342–348, 1998.
- 81) **Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al** : CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes Dev 12 : 982–995, 1998.
- 82) **Awai M, Koga T, Inomata Y, Oyadomari S, Gotoh T, Mori M, et al** : NMDA-induced Retinal injury is mediated by an endoplasmic reticulum stress-related protein, CHOP/GADD 153. J Neurochem, in press.
- 83) **Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, Kiryu J, Honda Y, Sawamura T** : Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion in the rat retina. Arch Ophthalmol 120 : 1707–1713, 2002.
- 84) **Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Honda Y** : Quantitative evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation. Invest Ophthalmol Vis Sci 36 : 123–130, 1995.
- 85) **Song J, Deng PF, Stinnett SS, Epstein DL, Rao PV** : Effects of cholesterol-lowering statins on the aqueous humor outflow pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci 46 : 2424–2432, 2005.
- 86) **McGwin G Jr, McNeal S, Owsley C, Girkin C, Epstein D, Lee PP** : Statins and other cholesterol-lowering medications and the presence of glaucoma. Arch Ophthalmol 122 : 822–826, 2004.
- 87) **Klein R, Klein BE, Tomany SC, Danforth LG, Cruickshanks KJ** : Relation of statin use to the 5-year incidence and progression of age-related maculopathy. Arch Ophthalmol 121 : 1151–1155, 2003.
- 88) **van Leeuwen R, Ikram MK, Vingerling JR, Witteman JC, Hofman A, de Jong PT** : Blood pressure, atherosclerosis, and the incidence of age-related maculopathy : The Rotterdam Study. Invest Ophthalmol Vis Sci 44 : 3771–3777, 2003.
- 89) **Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR, et al** : Risk factors for incident age-related macular degeneration : Pooled findings from 3 continents. Ophthalmology 111 : 1280–1287, 2004.
- 90) **Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS** : Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. FASEB J 14 : 835–846, 2000.
- 91) **Ikeda T, Obayashi H, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Imamura Y, et al** : Paraoxonase gene polymorphisms and plasma oxidized low-density lipoprotein level as possible risk factors for exudative age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 132 : 191–195, 2001.
- 92) **Boullier A, Bird DA, Chang MK, Dennis EA, Friedman P, Gillotre-Taylor K, et al** : Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. Ann N Y Acad Sci 947 : 214–222, 2001.
- 93) **Takahashi E, Inomata Y, Hirata A, Hirahara A, Sato, H, Takeya M, et al** : Expression of class a macrophage scavenger receptor in surgically excised choroidal neovascular membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 46 : (ARVO E-Abstract)5298, 2005.
- 94) **Honjo M, Sawamura T, Hinagata J, Nakamura K, Sanada N, Tanihara H, et al** : Expression of LOX-1, an oxidized low density lipoprotein receptor, in choroidal neovascularization. Arch Ophthalmol 122 : 1873–1876, 2004.
- 95) **Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, Kiryu J, Tanihara H, McEvoy LM, et al** : LOX-1 is a novel cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. Proc Natl Acad Sci USA 100 : 1274–1279, 2003.
- 96) **Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, et al** : Drusen proteome analysis : An approach to the etiology of age-related macular degeneration. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 14682–14687, 2002.
- 97) **Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg P Jr, Jones DP** : Oxidative damage and protection of the RPE. Prog Retin Eye Res 19 : 205–221, 2000.
- 98) **Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al** : Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. Science 308 : 385–389, 2005.
- 99) **Age-Related Eye Disease Study Research Group** : A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss : AREDS Report No. 8. Arch Ophthalmol 119 : 1417–1436, 2001.
- 100) **Jonas JB, Spandau UH, Harder B, Vossmerbaeumer U, Kampeter BA** : Intereye difference in exudative age-related macular degeneration with minimally classic or occult subfoveal neovascularization after unilateral intravitreal injection of triamcinolone acetonide. Am J Ophthalmol 139 : 1073–1079, 2005.
- 101) **Kawaji T, Hirata A, Awai N, Takano A, Inomata Y, Fukushima M, et al** : Trans-Tenon's retrobulbar triamcinolone injection for macular edema associated with branch retinal vein occlusion remaining after vitrectomy. Am J Ophthalmol 140 : 540–542, 2005.
- 102) **Koga T, Mawatari Y, Inumaru J, Fukushima M, Tanihara H** : Trans-Tenon's retrobulbar

- triamcinolone acetonide infusion for refractory diabetic macular edema after vitrectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, in press.
- 103) **Mawatari Y, Hirata A, Kawaji T, Yamada K, Fukushima M, Tanihara H** : Choroidal dye filling velocity in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, in press.
- 104) **Mawatari Y, Koga T, Inumaru J, Hirata A, Fukushima M, Tanihara H** : The effect of sub-Tenon triamcinolone acetonide injection for diabetic macular edema on retinal and choroidal circulation. *Am J Ophthalmol*, in press.
- 105) **Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Honda Y** : External trabeculectomy for the treatment of steroid-induced glaucoma. *J Glaucoma* 9 : 483—485, 2000.
- 106) **Cowley M, Conway BP, Campochiaro PA, Kaiser D, Gaskin H** : Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 107 : 1147—1151, 1989.
- 107) **Glaser BM, Cardin A, Biscoe B** : Proliferative vitreoretinopathy. The mechanism of development of vitreoretinal traction. *Ophthalmology* 94 : 327—332, 1987.
- 108) **Campochiaro PA, Glaser BM** : Platelet-derived growth factor is chemotactic for human retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 103 : 576—579, 1985.
- 109) **Connor TB Jr, Roberts AB, Sporn MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG, et al** : Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *J Clin Invest* 83 : 1661—1666, 1989.
- 110) **Bochaton-Piallat ML, Kapetanios AD, Donati G, Redard M, Gabbiani G, Pournaras CJ** : TGF-beta1, TGF-beta receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2336—2342, 2000.
- 111) **Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N** : Identification of transforming growth factor- $\beta$  expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 413—419, 1993.
- 112) **Yoshida M, Tanihara H, Yoshimura N** : Platelet-derived growth factor gene expression in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 189 : 66—71, 1992.
- 113) **Tanihara H, Yoshida M, Yoshimura N** : Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene is expressed in stimulated retinal pigment epithelial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 187 : 1029—1034, 1992.
- 114) **Takagi H, Yoshimura N, Tanihara H, Honda Y** : Insulin-like growth factor-related genes, receptors, and binding proteins in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 916—923, 1994.
- 115) **Tanihara H, Inatani M, Honda Y** : Growth factors and their receptors in the retina and pigment epithelium. *Prog Retina Eye Res* 16 : 271—301, 1997.
- 116) **Takeichi M** : Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251 : 1451—1455, 1991.
- 117) **Suzuki S, Sano K, Tanihara H** : Diversity of the cadherin family. Evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regulation* 2 : 261—270, 1991.
- 118) **Tanihara H, Sano K, Heimark RL, St John T, Suzuki S** : Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adh Commun* 2 : 15—26, 1994.
- 119) **Sano K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, et al** : Protocadherins a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J* 12 : 2249—2256, 1993.
- 120) **Kido M, Obata S, Tanihara H, Rochelle JM, Seldin MF, Taketani S, et al** : Molecular properties and chromosomal location of cadherin-8. *Genomics* 48 : 186—194, 1998.
- 121) **Tanihara H, Kido M, Obata S, Heimark RL, Davidson M, St John T, et al** : Characterization of cadherin-4 and cadherin-5 reveals new aspects of cadherins. *J Cell Sci* 107 : 1697—1704, 1994.
- 122) **Honjo M, Tanihara H, Suzuki S, Tanaka T, Honda Y, Takeichi M** : Differential expression of cadherin adhesion receptors in the neural retina of the postnatal mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 546—551, 2000.
- 123) **Weigel AL, Handa JT, Hjelmeland LM** : Microarray analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells. *Free Radic Biol Med* 33 : 1419—1432, 2002.
- 124) **Thiery JP** : Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression. *Nature Review Cancer* 2 : 442—454, 2002.
- 125) **Trease MT, Williams GA, Hartzer MK** : A new approach to stage 3 macular holes. *Ophthalmology* 107 : 1607—1611, 2000.
- 126) **Uemura A, Nakamura M, Kachi S, Nishizawa Y, Asami T, Miyake Y, et al** : Effect of plasmin on laminin and fibronectin during plasmin-assisted vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 123 : 209—213, 2005.
- 127) **Takano A, Hirata A, Inomata Y, Kawaji T, Nakagawa K, Nagata S, et al** : Intravitreal plasmin injection activates endogenous matrix metalloproteinase-2 in rabbit and human vitre-

- ous. *Am J Ophthalmol* 140 : 654—660, 2005.
- 128) **Takano A, Hirata A, Inomata Y, Kawaji T, Yonemura N, Sagara N**, et al : Effects and safety of subtilisin NAT (nattokinase) as a novel enzyme for pharmacological vitrectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : (ARVO E-Abstract) 5377, 2005.
- 129) **Kaplan HJ, Tezel TH, Berger AS, Wolf ML, Del Priore LV** : Human photoreceptor transplantation in retinitis pigmentosa. A safety study. *Arch Ophthalmol* 115 : 1168—1172, 1997.
- 130) **del Cerro M, Humayun MS, Sadda SR, Cao J, Hayashi N, Green WR**, et al : Histologic correlation of human neural retinal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3142—3148, 2000.
- 131) **Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR**, et al : Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287 : 2032—2036, 2000.
- 132) **Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguchi A**, et al : Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 4268—4274, 2000.
- 133) **Kubo F, Takeichi M, Nakagawa S** : Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development* 130 : 587—598, 2003.
- 134) **Inoue T, Kagawa T, Fukushima M, Shimizu T, Yoshinaga Y, Takada S**, et al : Activation of canonical Wnt pathway promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin. *Stem Cells*, in press.
- 135) **Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I**, et al : Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278 : 477—483, 1997.
- 136) **Kinouchi R, Takeda M, Yang L, Wilhelmsson U, Lundkvist A, Pekny M**, et al : Robust neural integration from retinal transplants in mice deficient in GFAP and vimentin. *Nat Neurosci* 6 : 863—868, 2003.
- 137) **Mawatari Y, Fukushima M, Inoue T, Setoguchi T, Taga T, Tanihara H** : Preferential differentiation of neural progenitor cells into the glial lineage through gp130 signaling in N-methyl-D-aspartate-treated retinas. *Brain Res* 1055 : 7—14, 2005.
- 138) **Fode C, Gradwohl G, Morin X, Dierich A, LeMeur M, Goridis C**, et al : The bHLH protein neurogenin 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20 : 483—494, 1998.
- 139) **Inatani M, Tanihara H** : Proteoglycans in retina. *Prog Retin Eye Res* 21 : 429—447, 2002.
- 140) **Koga T, Inatani M, Hirata A, Inomata A, Oohira A, Gotoh T**, et al : Expression of glycosaminoglycans during development of the rat retina. *Curr Eye Res* 27 : 75—83, 2003.
- 141) **Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Honda Y** : Identification of a nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, in developing rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2350—2359, 1999.
- 142) **Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Honda Y** : Spatiotemporal expression patterns of 6B4 proteoglycan/phosphacan in the developing rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1990—1997, 2000.
- 143) **Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Otori Y, Nishida A, Honjo M**, et al : Neuroglycan C, a neural tissue-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, in retinal neural network formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 4338—4346, 2000.
- 144) **Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Kido N, Honda Y** : Upregulated expression of neurocan, a nervous-tissue specific proteoglycan, in transient retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2748—2754, 2000.
- 145) **Inatani M, Tanihara H, Honjo M, Hangai M, Kresse H, Honda Y** : Expression of proteoglycan decorin in neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1783—1791, 1999.
- 146) **Inatani M, Honjo M, Otori Y, Oohira A, Kido N, Tano Y**, et al : Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1930—1938, 2001.
- 147) **Inatani M, Honjo M, Oohira A, Kido N, Honda Y, Tanihara H** : N-syndecan, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, is transiently expressed during retinal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1616—1621, 2002.
- 148) **Inatani M, Haruta M, Honjo M, Oohira A, Kido N, Takahashi M**, et al : Upregulated expression of N-syndecan, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in undifferentiated neural stem cells. *Brain Res* 920 : 217—221, 2001.
- 149) **Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y** : Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science* 302 : 1044—1046, 2003.

### Comment : 塚原 重雄

熊本大学眼科の開講 100 周年終えてその 1 年目に当たる、平成 17 年、新たなスタートを切る年に谷原秀信教授が日本眼科学会の宿題報告「新しい薬物療法」を担当されたことは大変意義深い。「分子基盤に基づいた眼疾患の理解と新しい眼薬物療法」が第 109 回日本眼科学会総会の宿題報告の担当課題名である。最近の分子生物学的手法の驚くべき進歩は、疾患理解の進歩や治療法の開発に大きく貢献しているが、本論文は教授が京都大学に籍を置いていた頃の業績を含めて、熊本大学に赴任された数年間の間に分子細胞学的手法を駆使し行った研究の総括である。実際の講演では膨大な量のデータを示されその内容を十分に理解することは困難であったが、本論文ではその研究内容の膨大さ、多岐にわたっていることを改めて確認できる。小生のような第一線を退いた者にとって中々難解な論文であるが、本研究の特徴は基礎的研究に終始するのではなく、臨床家としてこれらの成果を臨床応用することを目指している点である。

本論文では日本の超高齢化社会への突入する中で、後天性失明原因として近年注目されている緑内障、加齢黄斑変性症、増殖硝子体網膜症という非常に重要かつ広範なテーマを取り上げているが、本稿では特に緑内障に焦点を絞ってコメントしてみたい。

緑内障は須田経字先生以来の熊本大学の長年にわたる基礎、臨床を含めた伝統的な研究テーマの一つである。日本緑内障学会の主導で実施された多治見疫学調査の結果、日本人の緑内障有病率は 5.0% で、40 歳以上の 5 人に 1 人が罹患していることを示して、失明の原因疾患として日本では第 1 位を占め最重要な眼科疾患である。しかもその 90% 以上は未発見、未治療で放置されており、その早期発見、早期治療が期待されている。

多治見疫学調査では正常眼圧緑内障が本邦では全緑内障の 70% を超えることが報告されているが、緑内障の発症や進行さらに治療に関して明らかなエビデンスを有するのは眼圧のみである。この点から今後も眼圧は最も重要な緑内障関連因子であると考えられる。論文の緑内障前半部分では、特に線維柱帯経由の眼圧調整機構の分子レベルでの解析や眼圧下降薬の作用機序とその開発に関して述べている。線維柱帯路は主要な房水流出路であり眼圧上昇の主座であるにもかかわらず現在線維柱帯路への直接的作動薬がほとんどないが、教授は、線維柱帯細胞における Rho-ROCK シグナルを介した眼圧調整機構、眼圧下降薬に関して多くの研究成果を示している。房水中の様々な生理活性物質が、Rho-ROCK シグナルを誘導し、眼圧上昇機序に深く関わっていること、Rho-kinase が線維柱帯細胞へ影響を与えることを明らかにし、Rho-ROCK シグナル系の調整によって線維柱帯細胞の接着能、遊走能、収縮能が可逆的に影響を受け、これによって眼圧が下降する可能性を示した。選択的 ROCK 阻害剤は動物実験において点眼、前房内投与、硝子体投与のいずれでも有意な眼圧下降を示すことを示すと同時に、教授はこれらのデータを基に、単なる基礎研究に留まらず、数種の選択的 ROCK 阻害薬を用いた眼圧下降薬の臨床応用を進めている。さらに ROCK 阻害薬の副次的効果として、実験動物眼、培養系での実験から毛様体筋の弛緩効果、神経保護効果を観察している。これらに関しては臨床的意義を論ずるには時期尚早であるが、第一相の臨床試験が開始されていることは賞賛に値する。将来、evidence based medicine (EBM) に則った臨床評価と安全性についての臨床試験が遂行されて、房水流出抵抗を薬理的に制御できる初めての薬剤が登場し、緑内障患者の治療に大きな福音を与えることになることが期待される。

緑内障後半部分では緑内障性視神経障害発症機序の解明と眼圧下降によらない視神経保護治療に関して述べている。分子生物学的手法を駆使し障害機序を検討し緑内障眼におけるストレス応答機序、細胞死誘導機序を解明するとともに網膜神経節細胞周囲細胞の関与も観察している。眼圧下降によらない神経保護治療法の臨床応用も検討しており、特にすでに他の医学領域で広く用いられているスタチンは、緑内障治療への導入が比較的容易なため近い将来の治療薬の候補となり得る可能性を示したことは重要である。しかしながら、眼圧下降以外の治療法の有用性を証明することは非常に努力と長い期間を有するために、これら新しい治療法の迅速な評価法の確立が待たれる。

谷原教授は上述されたこれらの研究の端緒となったのは日々の臨床において経験した房水流出路手術の線維柱帯切開術の成績分析と作用機序の解明が動機づけとなったと述べている。臨床家として診断、治療に当たる際に、また患者さんと接する時に何か新しい診断法はないか、治療法はないか、一つ一つのステップに疑問を持ちながらその解決方法を絶えず模索しながら診察に当たること

が、いろいろな疾患の診断や治療に、新しい方法を導入するきっかけとなることを物語っている。

本論文では緑内障以外に黄斑変性症、増殖硝子体網膜症の分子基盤に基づいた研究成果も示されているが、分子生物学的手法の驚異的な発展はこれらの疾患の解析を早めるとともに、障害の共通部分を明らかされてきており、今後眼科疾患分類や治療方針決定が分子レベルの障害機序によってなされる可能性も考えられる報告となった。

緑内障を始めとして多くの未解決な問題が残されているが、本論文を端緒として、分子レベルでの眼疾患の発症機序、治療法の開発がさらに推進されることが望まれる。