

第 110 回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

眼と加齢

活性酸素・炎症：エイジング仮説

坪田 一男

慶應義塾大学医学部眼科学教室

共同研究者

今村 裕, 藤島 浩, 根岸 一乃, 井上 真, 榛村 重人, 石田 晋
 村戸ドール, 小沢 洋子, 木村 至, 出田 真二, 結城 賢弥, 橋爪 公平
 永井 紀博, 里深 信吾, 平沢 学, 小川由佳子, 栗原 俊英, 厚東 隆志
 深川 和己, 樋口 明弘, 海道美奈子, 石田 玲子, 篠田 啓, 加藤 直子
 小川 葉子, 佐伯めぐみ (慶應義塾大学医学部眼科学教室)

齋藤 一郎, 美島 健二, 井上 裕子, 後藤 英樹 (鶴見大学歯学部)

野田 節子 (東海大学健康科学部)

水島 裕 (東京慈恵会医科大学 DDS 研究所)

白澤 卓二, 清水 孝彦, 山口美峰子, 内山 智 (東京都老人総合研究所)

吉田 悟, 比嘉 一成, 川北 哲也, 佐竹 良之, 田 聖花

富田真智子, 島崎 潤 (東京歯科大学眼科学教室)

戸田 郁子, 堀 好子, 酒井 誓子 (南青山アイクリニック)

河上 裕 (慶應義塾大学医学部先端医学研究所)

竹内 勤 (埼玉医科大学総合医療センター)

中村 滋, 渋谷 倫子, 中嶋 英雄, 久村 隆二, 増田 望 (株式会社オフテクス)

佐々木恭平 (参天製薬株式会社)

要 約

フリーラジカルに起因する酸化ストレスは癌, 炎症, 神経疾患など多くの慢性疾患の発症に深く関与している。また, 加齢黄斑変性, 白内障などのいくつかの眼疾患においても加齢や日光の過剰曝露による酸化ストレスが関与している。眼表面は, 紫外線, 大気中の酸素, 瞬きによる酸素分圧変動の酸化ストレス発生原因に常にさらされている。ブランコモデルを使ったドライアイモデルを用いて, 本モデルでは角膜上皮障害の発症とともに酸化ストレスの亢進が認められることを示した。瞬き減少型ドライアイにおける角膜上皮障害の発症に酸化ストレスが深く関与している可能性が示唆された。

次にレーザー破壊による実験的脈絡膜新生血管モデル

を用いて, アンジオテンシン受容体拮抗薬が, 脈絡膜新生血管抑制効果があること, また網膜内での代表的なフリーラジカルスカベンジャーである superoxide dismutase (SOD) の欠損マウスが, 加齢黄斑変性の典型的な臨床所見を呈することを示した。現在, 再生医療において幹細胞の維持が注目されているが, 幹細胞の維持は, 幹細胞自身の加齢 (ステムセルエイジング) の制御に他ならないという最近の概念についても我々の見解を示した。(日眼会誌 111: 193-206, 2007)

キーワード: エイジング, ドライアイ, 加齢黄斑変性, ステムセルエイジング

別刷請求先: 160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 坪田 一男

(平成 18 年 11 月 10 日受付, 平成 18 年 12 月 7 日改訂受理) E-mail: tsubota@eyebank.or.jp

Reprint requests to: Kazuo Tsubota, M.D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received November 10, 2006 and accepted in revised form December 7, 2006)

A Review

Oxidative Stress and Inflammation : Hypothesis for the Mechanism of Aging

Kazuo Tsubota

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

Abstract

Oxidative stress due to free radicals is related to the pathogenesis of many chronic disorders including cancer, inflammation, and neurological diseases. Oxidative stress such as aging and light exposure is also considered to be associated with age-related macular degeneration and cataract. The ocular surface is chronically exposed to oxidative stress including ultraviolet light, the oxygen in air, and changes in oxygen pressure due to blinking. We demonstrated that a rat dry eye model with a jogging board showed corneal epithelial disorders and elevated levels of oxidative stress, suggesting that the pathogenesis of epithelial disorders in dry eye with low frequency of blinking is related to oxidative stress. Next, using a model of laser-

induced choroidal neovascularization (CNV), we showed that angiotensin receptor-mediated inflammation is required for the development of CNV. We also demonstrated that mice deficient in superoxide dismutase (SOD) showed typical clinical features of AMD. Finally, we proposed our thoughts about regenerative medicine, that is, to maintain quiescent stem cells, we have to regulate the aging of stem cells.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 111 : 193–206, 2007)

Key words : Aging, Dry eye, Age-related macular degeneration, Stem cell aging

I はじめに

我が国は未曾有の高齢化社会を迎える。厚生労働省の推計によれば、2025年には全人口の25%が65歳以上になると考えられている。したがって国民の高齢化に伴い、疾病構造も当然変化を伴い、国民が天寿を全うするまでの期間、いかに人生の質を低下させずに余生を送るかが大きな課題となっている。従来我々の先達が築き上げた伝統的な診断学、治療学が医療の中で重要な存在であり続けることに変わりはないが、これからの医療従事者が目指すべき方向としては、正確に患者の遺伝的素因、年齢、生活習慣から生命および生活に重篤な影響を与える疾病のリスクを適切に評価し、できるだけ疾病に罹患させないようにする予防医療であることは間違いないと思われる。

このような現状のなかで、生活の質に大きな影響をもつ感覚器医学、特に眼科学のもつ意味は大きいと思われる。したがって、何が加齢性疾患の危険因子なのか、そもそも加齢性疾患の原因は何なのかという基本的な問題が予防医学には重要な意味をもつと思われる。

加齢性疾患の原因は、加齢を生物学的にどのように定義するかという問題に帰着する。加齢を生物学的に規定することは多くの研究者によってなされてきたが、現時点で多くの学者によって支持されている学説に“free radical theory of aging”がある。本学説は1956年にネブラスカ大学のDenham Harmanによって提唱され

た¹⁾、“酸化ストレスによる持続的な細胞、分子の障害の蓄積が加齢および加齢性疾患の原因である”という説である。本学説には支持する研究と反証に近い研究がある。支持する説としては、マウスのミトコンドリアにヒトの過酸化水素を分解するcatalaseを強制導入したところ、マウスの寿命が延長したという研究がある²⁾。逆に反証としては加齢促進マウスで、酸化ストレスの各種マーカーを測定したところ、対照群と加齢促進群で差がなかったというものもある³⁾。

今回我々は、眼科で代表的な疾患、ドライアイと加齢黄斑変性に焦点を絞り、これらの発症機序に活性酸素とそれに続発すると考えられる炎症反応が関与するかどうか、動物モデルおよび臨床研究を題材に行ったので報告する。さらに近年、生活習慣病の主要経路と考えられているレニン・アンジオテンシン系の経路が眼疾患モデルで果たす役割を実験的に調べた。また最後に現時点で我々の加齢と再生に対する基本的な立場、考え方を紹介したい。

II ドライアイモデルの作製と酸化ストレス障害の評価

著者は長年の間、ドライアイの発症機序、および治療に携わってきた。今回、我々は新しいドライアイモデルを作製した。これはジョギングボードにラットを乗せ、そのときに瞬目が減少することに注目したモデルである。本モデル(以下ブランコモデル)において有意に瞬目

が減ることを定量的に確認した。次に本モデルでは角膜上皮障害が増えることを示した。さらに本モデルの角膜上皮で酸化障害がどの程度かわるかみるため、各種酸化マーカー、および酸化ストレス・炎症関連遺伝子の変動をみた。また本モデルを使い、D-beta-hydroxybutyrate(HBA)の角膜上皮保護機能の有無のスクリーニングを行ったので報告する。

フリーラジカルや過酸化水素に起因する酸化ストレスは癌、炎症、神経疾患など多くの慢性疾患の発症に深く関与している⁴⁾⁵⁾。また、加齢黄斑変性、白内障などのいくつかの眼疾患においても加齢や日光の過剰曝露による酸化ストレスが関与している。角結膜より構成される眼表面の上皮細胞層は、病原菌、ゴミや化学物質による外的侵襲、乾燥環境から眼組織を保護する、視覚を維持するための最初のバリアとして重要な役割を担っている。眼表面は、紫外線、大気中の酸素、瞬きによる酸素分圧変動の酸化ストレス発生原因に常にさらされている⁶⁾。しかし、これまでにヒトの角膜疾患と酸化ストレスとのかわりについて詳細に検討した報告はない⁷⁾。

ドライアイは、さまざまな原因により涙液の生理学的異常を来すことにより、眼表面に多様な異常を引き起こす疾患である⁸⁾⁹⁾。近年、ドライアイの発症要因に涙腺組織の異常だけでなく、乾燥した環境や瞬き回数の減少を伴う VDT (visual display terminals) 作業などの現代人の生活様式の関与が明らかとなってきた^{10)~13)}。我々は、ラットをブランコに乗せることにより瞬き回数が約 1/4 に減少することを見出し、乾燥環境とブランコに乗せる処置を組み合わせることにより、表層点状角膜症を主徴とする瞬き減少型ドライアイのモデル系を確立した¹⁴⁾。本モデルはオフィスにおける VDT 作業従事者の状態を模していると考えられる。

本研究では、我々のラットドライアイモデルにおける角膜の酸化ストレスの状態を上皮障害、酸化ストレスマーカーの局在、抗酸化関連遺伝子発現、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) 生成量の変化を指標に検討した (図 1)。

まず、ブランコモデル実験は以下のように行った。ラットを午前 9 時から午後 5 時の間、7.5 時間/日、高さ 60 cm に固定されたプラスチックパイプ製のブランコに乗せた。ラットがブランコから滑り落ちるのを防ぐため、椅子は金網で覆った。ブランコに乗せるとともに、正面に固定した卓上型扇風機 (森田電工) により風速 2~4 m/秒の風をラット顔面に常時吹きつけた。

餌と水の補給のため、4 時間ブランコに乗せた後、一時的 (30 分間) にケージ内に戻した。残りの 16 時間はケージ内で餌と水は自由摂取とした。ラットは、ほとんどブランコから離れることはないが、少なくとも 1 時間に 1 回は乗っているか否かの確認を行った¹⁴⁾。

我々は、乾燥環境飼育+ブランコに乗せる (Jogging

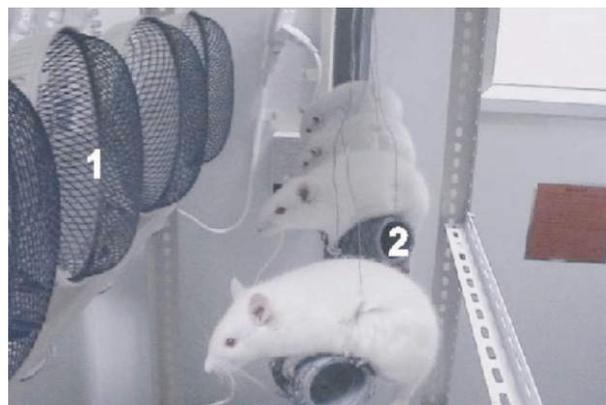


図 1 ラットドライアイモデル。

扇風機 (1)、ブランコの椅子 (2)。一連の実験は温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $25 \pm 5\%$ 、風速 $2 \sim 4 \text{ m/秒}$ の乾燥環境施設内で実施した。ラットは 7.5 時間/日ブランコに乗せ、餌と水を補給させるため開始 4 時間後に 30 分間一時的にケージ内に戻し、餌と水を自由摂取させた。それ以外の 16 時間/日はケージ内で餌と水は自由摂取とした。この処置を最長 30 日間繰り返した。(Nakamura S, et al : Invest Ophthalmol Vis Sci 2007 (in press) より許可を得て転載)

board with dry condition ; JBDC), 乾燥環境のみ、通常環境下でブランコに乗せる処置の 3 群をそれぞれ 10 日間繰り返す、角膜フルオレセイン染色性への影響を比較した。その結果、JBDC 特異的にフルオレセイン染色性が亢進し、この処置が慢性的な角膜フルオレセイン染色発症の必須条件であることを確認した。本研究では、30 日間連続して JBDC 繰り返すことによる、角膜染色性への影響を検討した¹⁴⁾。

JBDC では 1 日目より 30 日目まですべての測定点において、初期値および無処置群に比較し有意にフルオレセインスコアが上昇し、角膜表面の約 1/2 の領域を占める点状の染色班が慢性的に出現した (図 2)。

次に JBDC 下での角膜上皮に対する酸化ストレス負荷状態を確認するため、10 日、30 日後の酸化ストレスマーカーの出現を検討した。それぞれのマーカーの免疫組織染色の出現パターンの典型例を図 3 A に示す。3 種のマーカーとも、角膜表層細胞と翼細胞の核およびその周囲に陽性部位が局在しており、JBDC では、同期間通常環境にて飼育した無処置群に比較し、明らかにその陽性領域が増加していた。また、8-OHdG, 4-hydroxynonenal (4-HNE) の染色特性は Tanito ら¹⁵⁾¹⁶⁾ の角膜および網膜での報告例と一致した。

各マーカーの角膜切片あたりの陽性細胞を算定した結果、3 種のマーカーとも、JBDC 群では無処置角膜に対し 10 日、30 日後において有意な増加を認めた (図 3)。

抗酸化、炎症関連遺伝子の発現変動は 1, 5, 10, 20, 30 日目に測定した。

抗酸化関連遺伝子は、酸化ストレスに対する防御因子として重要な superoxide dismutase (SOD), catalase

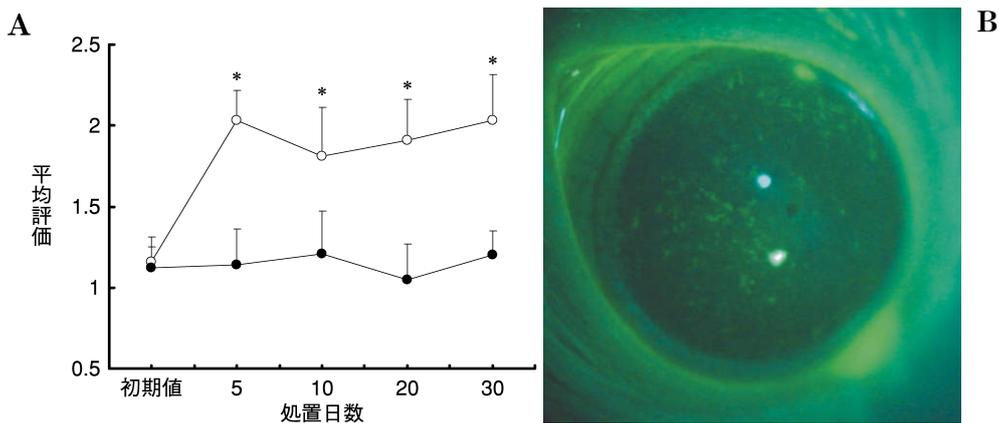


図 2 ラットドライアイモデルでの角膜フルオレセイン染色性の変化。

A: 30日間繰り返し処置期間中のスコアの変動。○—: JBDC, ●—: 無処置。B: 30日間処置後の典型例。ドライアイ処置(Jogging board with dry condition; JBDC)群の平均スコアは無処置群に比較し、全測定点において有意に上昇した。平均値±標準誤差, n=16角膜, *: p<0.05(Mann-Whitney testによる無処置群との比較)。(Nakamura S, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 2007(in press)より許可を得て転載)

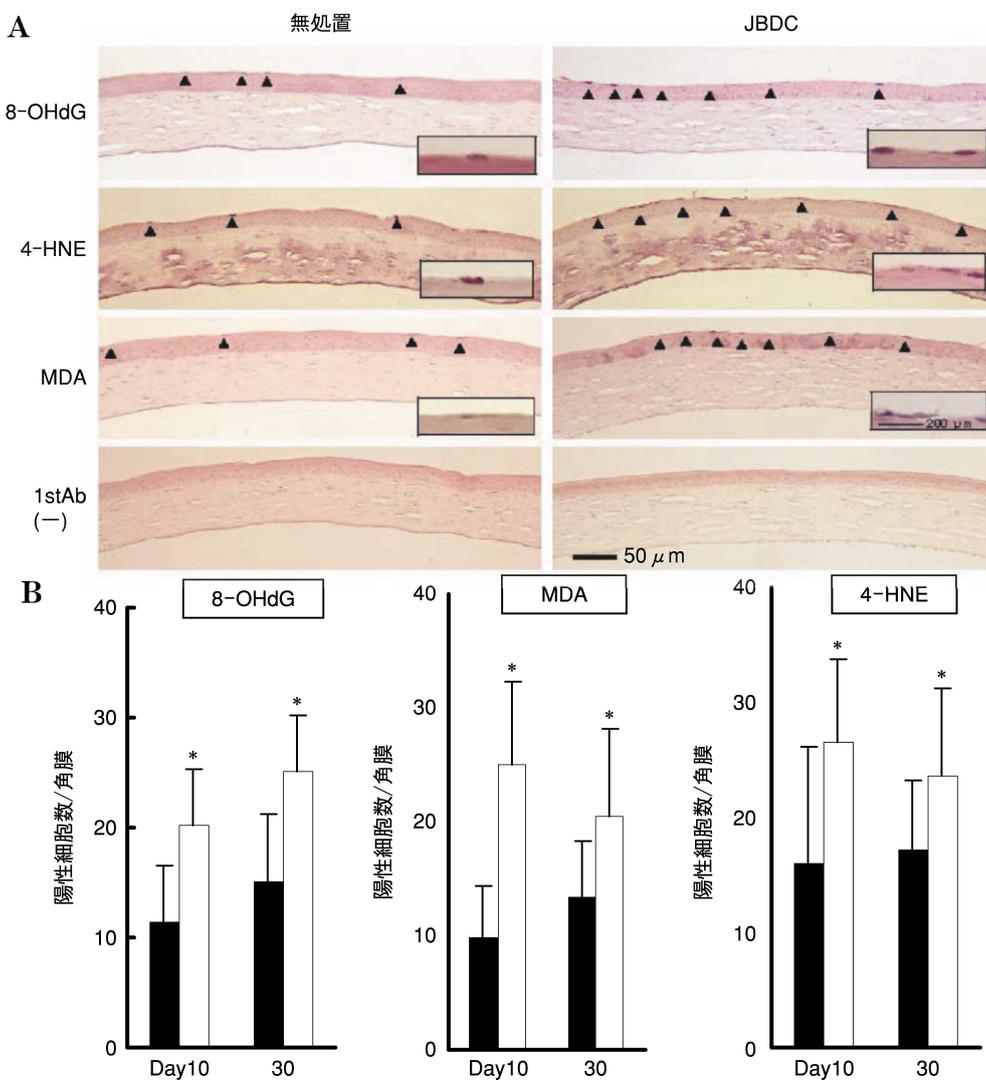


図 3 ラットドライアイモデルの角膜における酸化ストレスマーカーの局在変化。

A: 10日間処置後の典型例。無処置群(左), ドライアイ処置(JBDC)群(右)。矢頭は陽性細胞を示す。B: 陽性細胞数の算定結果 8-OHdG(左), malondialdehyde(MDA)(中央), 4-hydroxynonenal(4-HNE)(右)。■: 無処置, □: JBDC。平均値±標準誤差, n=16角膜, *: p<0.05(t-testによる無処置群との比較)。(Nakamura S, et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 2007(in press)より許可を得て転載)

(Cat), glutathione peroxidase(GPX 1)について発現解析を実施した。SOD に関しては、ヒト角膜で多く認められている細胞質に存在する銅亜鉛 SOD(SOD 1)を選定した¹⁷⁾。JBDC 群では SOD, Cat, GPX 1 の相対発現比は 10 日目までは、無処置群と同レベルであった。20 日, 30 日目にすべての遺伝子で約 2 倍の発現上昇が認められ, 30 日目では無処置群に比較し統計学的有意であった。

ドライアイ患者およびマウスドライアイモデルで涙液中の tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), matrix metalloproteinase 9(MMP-9)濃度が上昇することが報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。JBDC 群では MMP-9 では 1 日, 5 日目では無処置群と同レベルであった。10 日目には約 3 倍の発現上昇が認められ, その上昇は 30 日目まで続いた。20 日目には無処置群に比較し有意であった。TNF- α は 20 日目まで無処置群と同レベルであった。30 日目に無処置群に対し 2 倍の上昇が認められたが, 統計学的に有意差は検出されなかった。角膜上皮 ROS 産生量への影響は, 10 日目において測定した。JBDC 群では無処置群に対し有意な蛍光強度の増加が認められた。

その結果, 角膜上皮障害の発症とともに酸化ストレスの亢進が認められ, 瞬き減少型ドライアイにおける角膜上皮障害の発症に酸化ストレスが深く関与している可能性が示唆された。

III 実験的脈絡膜新生血管に対するアンジオテンシンレセプター阻害剤の効果

加齢黄斑変性は, 先進国における失明原因の首座を占める²⁰⁾。黄斑は網膜の中心に位置し, 外部からの光線が角膜・水晶体により屈折し集中する部分であり, 視細胞のうち錐体の密度が高く, 視力は同部位の機能に依存する。加齢黄斑変性は黄斑部に新生血管などの病変を生じ, 急激な視力低下, 中心暗点から高度の視機能障害の原因となる。加齢黄斑変性は滲出型と萎縮型に分けられる。萎縮型では網膜下に白色斑状を呈するドルーゼンと網膜色素上皮の萎縮を生じる。ドルーゼンは過酸化物質を多く含む視細胞外節を処理しきれなくなった網膜色素上皮細胞が崩壊したものと考えられており, ドルーゼンの形成過程そのものが局所的な酸化ストレスの存在を示唆している。滲出型は黄斑部に脈絡膜新生血管が生じる。脈絡膜新生血管は血管に富み網膜外層の栄養と酸素供給, 温度調節などを司る脈絡膜由来の新生血管が Bruch 膜を貫通して網膜下に侵入したものである。未熟な血管網からの出血や脂肪成分を含んだ血漿成分が神経網膜の機能を低下させる原因となる。組織学的には脈絡膜新生血管は脈絡膜由来の血管内皮細胞とともに網膜色素上皮細胞, myofibroblast, pericytes を含み, 網膜下で choroidal neovascular membrane(CNVM)という膜を形成する²¹⁾。

脈絡膜新生血管が生じる分子メカニズムについては詳細は解明されていない。加齢黄斑変性における choroidal neovascularization(CNV)は網膜最外層の網膜色素上皮, Bruch 膜, 脈絡膜血管の加齢性変化を基盤として慢性炎症, 酸化ストレスなどに伴うさまざまな分子の相互作用に加え, 遺伝的因子, 環境的因子などが関与して発症すると考えられている。血管新生はその促進因子と抑制因子のバランスで規定される。脈絡膜新生血管においても vascular endothelial growth factor(VEGF) (3~6)や pigment epithelium-derived factor(PEDF)²²⁾²³⁾などの血管新生を促進または抑制するさまざまな因子が作用すると報告されている。脈絡膜新生血管モデル²⁴⁾やヒト摘出脈絡膜新生血管膜²⁵⁾²⁶⁾の網膜色素細胞や新生血管に浸潤したマクロファージなどの炎症細胞に VEGF が発現しており, VEGF シグナルの阻害によって実験的脈絡膜新生血管が抑制されたことが報告されている²⁷⁾。また, 脈絡膜新生血管にはマクロファージなどの炎症細胞浸潤^{28)~32)}やサイトカインネットワーク³³⁾³⁴⁾などの炎症機序が関与し, 腫瘍や慢性関節リウマチにみられる病理的な新生血管と同様に炎症性血管新生であると報告されている。Sakuraiらは mouse laser-induced CNV model の CNV において intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), CD-18 を発現していること, そして ICAM-1 と CD-18 のそれぞれの欠損マウスでは CNV への白血球浸潤を抑制することで, CNV 体積が抑制されることを示している³⁵⁾。

レニン・アンジオテンシン系(RAS)は主要な血圧調節に重要な役割を果たす。この系の final product であるアンジオテンシン II (AII)は血管収縮物質であり, AII は 2 つの主要なレセプター, Angiotensin II type 1 receptor(AT 1-R), AT 2-R を有する³⁶⁾³⁷⁾。AII の主要なシグナルは AT 1-R signaling を介し, AT 1-R blocker (ARB)は高血圧, 心血管疾患の治療に広く用いられている。最近 RAS は血管新生, 心血管システムのリモデリング, 炎症など多様な作用を有することが注目されている^{38)~43)}。また, 腫瘍学の分野では ARB が炎症性血管新生である腫瘍血管新生を抑制して, 腫瘍の成長を抑制したと報告されている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。我々は ARB が ICAM-1 を介した網膜血管白血球接着を抑制して網膜病理的な血管新生を抑制すること⁴⁶⁾, また endotoxin-uveitis model という眼炎症の動物モデルにおける炎症を抑制することを示した⁴⁷⁾。CNV については以前 ARB(losartan)が laser-induced CNV を抑制すると報告されている⁴⁸⁾が機序は検索されていない。今回我々は RAS の脈絡膜新生血管の発生への関与についてその分子・細胞メカニズムを CNV の動物モデルであるマウス laser-induced CNV model を用いて検討した。

AT 1-R および AT 2-R signaling の CNV の形成への関与を検討するために ARB の telmisartan, valsar-

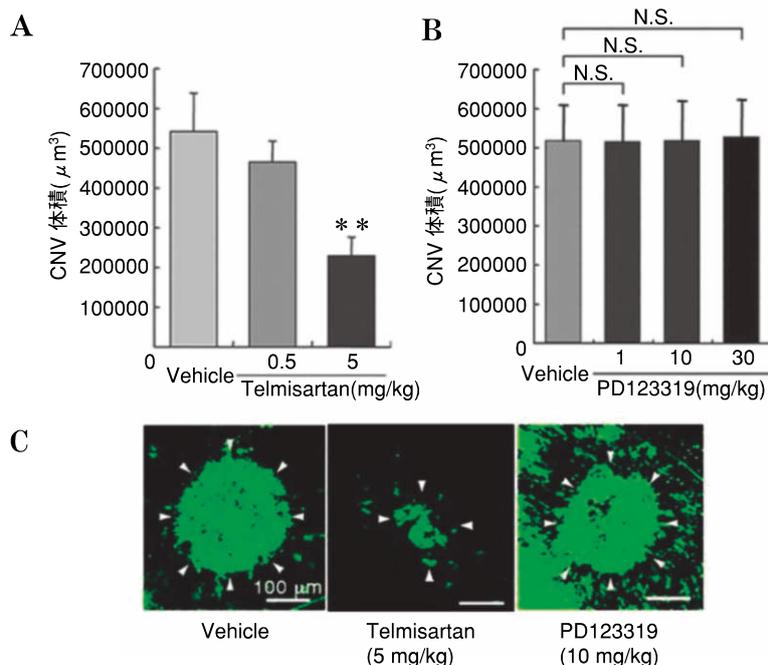


図 4

A, B: 実験的脈絡膜新生血管に対する Angiotensin II type 1 receptor (AT 1-R) 阻害剤の効果. 縦軸は choroidal neovascularization (CNV) の体積を示す. C: vehicle, telmisartan, PD123319 投与したマウスの脈絡膜のフラットマウント標本. 矢頭は lectin 染色した CNV を示す. *: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$. N.S.: 有意差なし.

(図表は, Nagai N, et al: Angiotensin II type 1 receptor-mediated inflammation is required for choroidal neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2252–2259, 2006 より許可を得て転載)

tan, または AT2-R blocker の PD123319 を毎日 laser-induced CNV マウスに投与し, laser 施行 7 日後の CNV 体積を比較検討した. Telmisartan の投与によって CNV 体積は濃度依存的に抑制された. CNV 体積は vehicle 群の $335,963 \pm 65,618$ (平均値 \pm 標準偏差, 以下同) μm^3 に対し, telmisartan 0.5 mg/kg 投与群で $276,703 \pm 46,527 \mu\text{m}^3$, 5 mg/kg 投与群で $129,518 \pm 44,069 \mu\text{m}^3$ ($p < 0.001$) に抑制された. Valsartan では 1 mg/kg 投与群で $296,819 \pm 52,716 \mu\text{m}^3$, 10 mg/kg 投与群で $153,323 \pm 41,700 \mu\text{m}^3$ ($p < 0.001$) に抑制された (図 4). 一方, AT 2-R の選択的なアンタゴニストである PD123319 の投与によっては CNV 体積は抑制されなかった ($p > 0.05$). PD123319 1 mg/kg 投与群では $324,263 \pm 150,283 \mu\text{m}^3$, 10 mg/kg 投与群では $336,890 \pm 87,600 \mu\text{m}^3$ であった (図 4). このように ARB による AT 1-R signaling の阻害によって CNV の形成が抑制された.

Telmisartan は抗炎症や抗血管新生に働くステロイド型核内受容体の peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) の partial agonist と報告されている⁴⁹⁾⁵⁰⁾. そして PPAR- γ の刺激は炎症, 血管新生を抑制することが報告されている. そこで telmisartan による CNV の抑制作用が PPAR- γ を介するかを検討した. CNV を有意に抑制した telmisartan 5 mg/kg と

同時に PPAR- γ アンタゴニストである GW9662 を投与した. GW9662 0.1 mg/kg の同時投与による CNV 体積は $144,830 \pm 29,096 \mu\text{m}^3$ であり, telmisartan 5 mg/kg 単独投与時の CNV 体積 ($129,518 \pm 44,069 \mu\text{m}^3$) と有意差はなかったが, GW9662 1 mg/kg の投与によって telmisartan の CNV 抑制作用は reverse された ($221,357 \pm 75,008 \mu\text{m}^3$, $p < 0.001$). ただし, GW9662 の投与によって完全には reverse できなかった. 一方, valsartan 10 mg/kg と GW9662 1 mg/kg の同時投与したときの CNV 体積は $157,492 \pm 28,308 \mu\text{m}^3$ であり, valsartan 10 mg/kg 単独投与時の CNV 体積 ($153,323 \pm 41,700 \mu\text{m}^3$) と有意差はなかった (図 5).

IV 加齢黄斑変性モデルの病因論： 酸化ストレス説の検証

加齢黄斑変性 (AMD) において酸化ストレスが原因として関与するのかがそれとも変性過程に伴い酸化ストレスが随伴するにすぎないのかがこれまで未知であった. 加齢黄斑変性の予防を考えるうえで, 本疾患がなぜ発生するのかという病因論の理解が不可欠である. 我々は AMD を “網膜の加齢が加速した状態 (accelerated aging)” と認識することによって, 病態生理が理解しやすくなると考えている. 我々は網膜内での代表的なフリーラジカルスカベンジャーである Cu, Zn-superoxide dis-

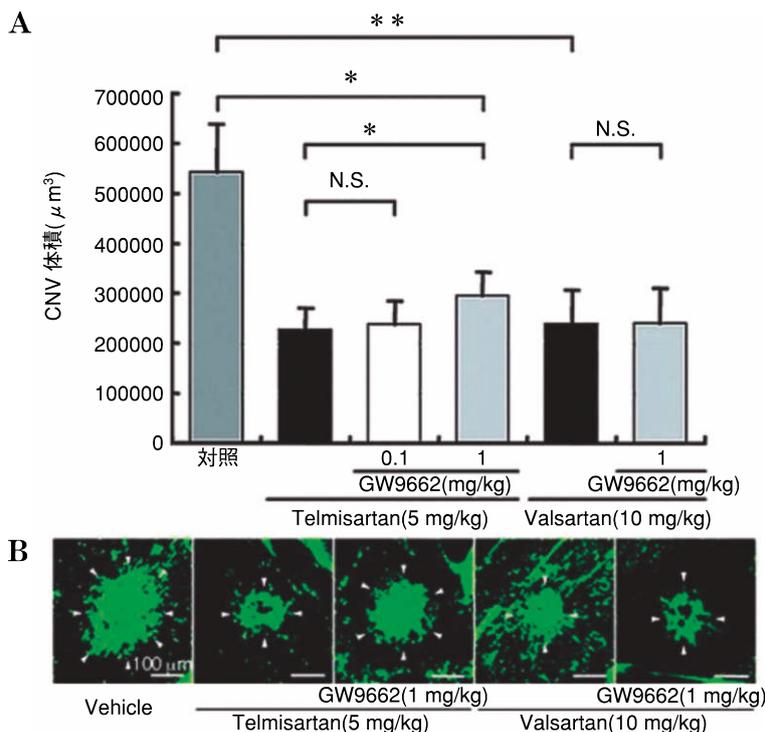


図 5 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) のシグナル阻害は部分的に telmisartan による CNV 抑制効果を阻害する。

CNV 体積が A, フラットマウント標本が B である。PPAR- γ の特異的阻害剤 (GW9662) は、部分的であるが、有意に telmisartan による CNV 抑制効果を逆転させた。この現象は valsartan による CNV 抑制効果にはみられなかった。

(図表は、Nagai N, et al : Angiotensin II type 1 receptor-mediated inflammation is required for chorioidal neovascularization. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26 : 2252—2259, 2006 より許可を得て転載)

mutase (SOD 1) の遺伝子欠損マウスに注目し、本マウスが、AMD の主病変 (ドルーゼン, 脈絡膜新生血管, 肥厚した Bruch 膜, 色素上皮細胞の接着障害など) を呈することを報告した⁵⁾。これまで AMD に関しては優れた大規模疫学調査が行われている。加齢は最も確実な危険因子である。喫煙は各種疫学調査でほぼ共通したリスクである。その他、高血圧, 肥満, 高脂血症がある。また血液中の c-reactive protein (CRP) が高値である。したがって、AMD を網膜のみに原因があると考えるのは正確ではなく、むしろ生活習慣病一般の背景がある高齢者が本疾患に罹患しやすいと考えるべきである。

SOD 1 ノックアウトマウスは、1996 年に Reaume らによって作製された⁵¹⁾。当時は SOD 1 が難病である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子であることが分かり、SOD 1 欠損は脊髄の障害が起こると期待された。ところが、結果は運動ニューロンは正常に発達するというものであった。これまでに報告された SOD 1 ノックアウトマウスの表現型は短命, 女性不妊, 皮膚炎, 血球減少, 肝臓腫瘍などである。

また ALS 患者で、SOD 1 活性そのものは影響を受けていないことが分かり、近年の研究では ALS は SOD 1 の点突然変異による異常凝集という説が有力である。

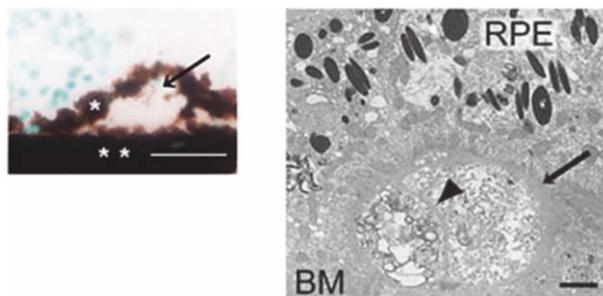


図 6 Superoxide dismutase (SOD) ノックアウトマウスにみられたドルーゼン様沈着物。

RPE : 網膜色素上皮, BM : Bruch 膜
(Imamura Y, et al : Proc Natl Acad Sci USA 103 : 11282—11287, 2006 より許可を得て転載)

一方、眼科領域では AMD の病態に活性酸素が関与していることはこの数年で多くの状況証拠が得られていた。このなかで最もインパクトがあったのが、2001 年に報告された AREDS (Age-related eye disease study) であった。本臨床試験は、米国で施行された無作為、前向き試験であり、約 4 千人を 6 年追跡し、ビタミン C, E, ベータカロテン, および銅, 亜鉛の大量内服が進行型 AMD への進展を 25% 抑制するという結果が出

た⁵²⁾。この他、AMD 患者の剖検眼の病理検査では網膜色素上皮および Bruch 膜に活性酸素産生源である鉄の沈着が多いことも示された⁵³⁾。

我々は AREDS において銅と亜鉛の内服が AMD の進行予防に不可欠であることに注目した。その作用機序として第一に候補にあがったのが銅、亜鉛依存型 superoxide dismutase(SOD 1)であった。高齢 SOD 1 ノックアウトマウスは多くの AMD に典型的な所見を模倣し

ており、現時点で優れた AMD のモデルになり得ると考えられる。本マウスは、ドルーゼン様変化(図 6)、Bruch 膜の肥厚と視細胞の萎縮(図 7)、さらに脈絡膜新生血管(図 8)を呈する。しかし、発症までに時間がかかること、CNV の発生頻度がそれほど高くないこと(高齢マウスの 10% 程度)と問題もあり、今後より優れた動物モデルの出現も期待される。

現時点で、AMD の予防に重要なのは、①酸化ストレス・炎症の管理(例：AREDS サプリメント、魚油)、②喫煙の中止、③肥満の予防、④高血圧などの動脈硬化促進因子の治療、⑤補体 H 因子(CFH)など疾患感受性遺伝子多型保持者の発症リスクの評価、などがあげられる。この他、光被曝の管理や鉄などの金属沈着の評価も今後網膜の加齢を予防するために重要な視点になると思われる。我々の研究が AMD の病態解明だけでなく、生物の加齢現象そのもののメカニズムを解明する糸口になればと思っている。

V エイジングと再生医療：ステムセル エイジングという新しい概念

今後、失われた眼球の各部分を再建させるためには、眼球の各部分の幹細胞(ステムセル)を同定し、組織を再生させ移植するという医療は間違いなく重要である。そのためにはステムセルを同定、維持していくという基礎研究が不可欠である。

ステムセル研究は骨髄で最も進んでおり、骨髄ステムセルを用いたエイジングの研究が最近盛んに行われるようになった。しかし、残念ながら眼科領域におけるステムセルとエイジングの研究はまだ皆無といってよい。角膜、網膜などでステムセル研究が進まないのは、まだステムセルそのものがはっきりと同定されていないためである。したがって、ステムセルのエイジングの定義が曖

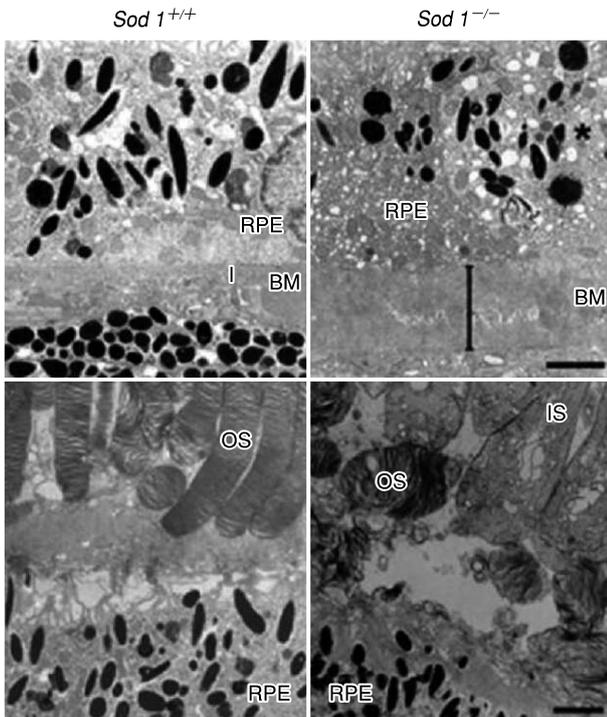


図 7 SOD ノックアウトマウスにみられた肥厚した Bruch 膜と視細胞の萎縮像。
OS : Outer Segment, IS : Inner Segment
(Imamura Y, et al : Proc Natl Acad Sci USA 103 : 11282—11287, 2006 より許可を得て転載)

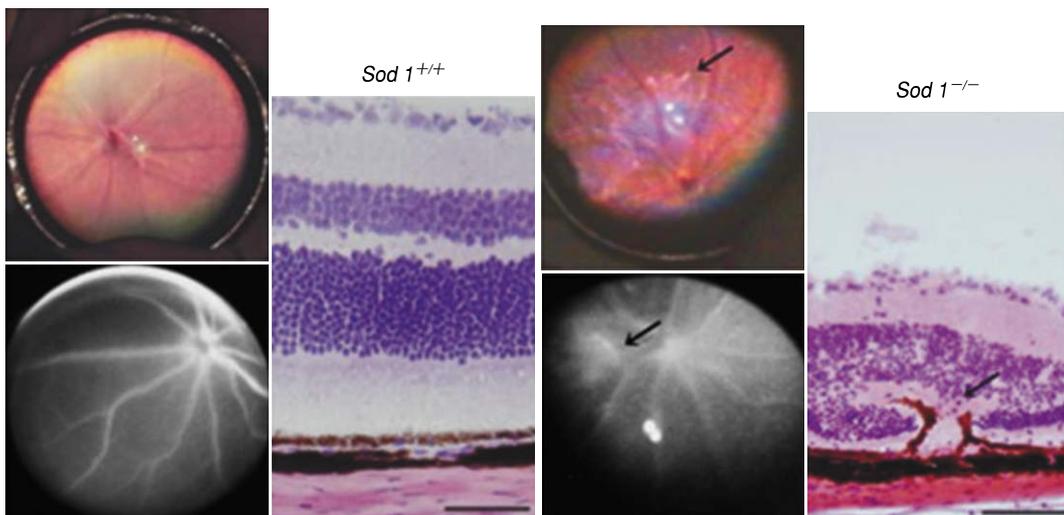


図 8 SOD ノックアウトマウスにみられた脈絡膜新生血管の眼底写真、蛍光眼底写真、および組織像(ヘマトキシリン・エオジン染色)。(Imamura Y, et al : Proc Natl Acad Sci USA 103 : 11282—11287, 2006 より許可を得て転載)

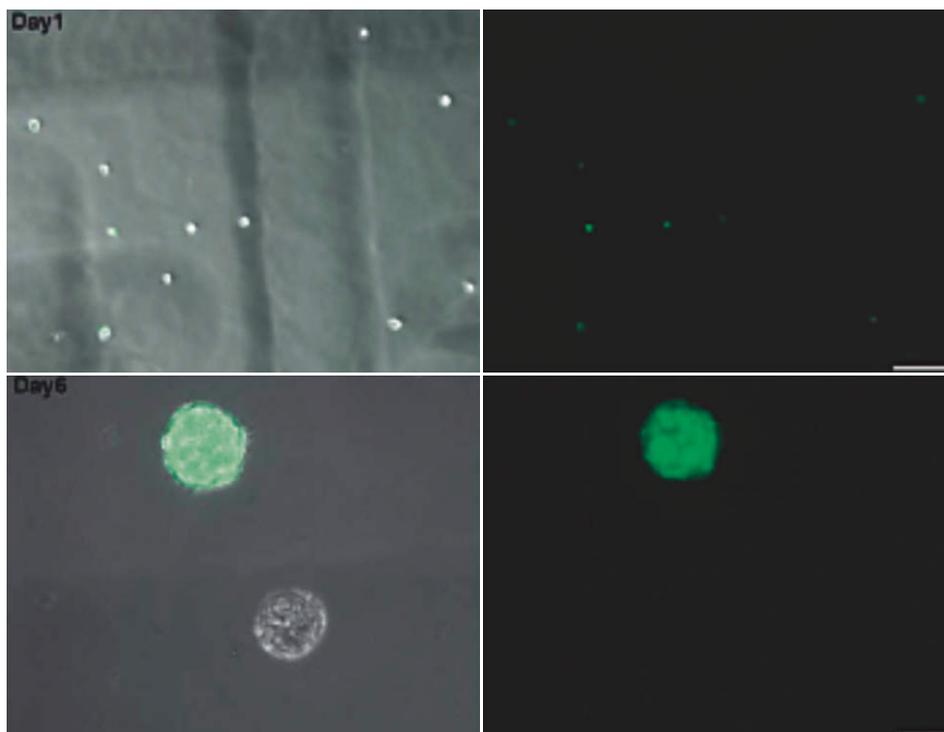


図 9 clonal sphere として単離された単一 cornea-derived progenitors (COPs) 細胞.

green fluorescent protein (GFP) 陽性および陰性細胞は混在しており, methylcellulose の入った培地で培養した. 右段: 蛍光画像, 左段: 位相差顕微鏡画像. 上段は培養 1 日目, 下段は培養 6 日目. スケールバー: 200 μm (上段), 100 μm (下段). (Yoshida S, et al: Stem Cells 24: 2714–2722, 2006 より許可を得て転載)

味であることと, 眼球組織での幹細胞の存在そのものもはっきりしていないため, 現状ではまだ推測することしかできない.

眼科領域で幹細胞の生物学的な特性がある程度分かっているのは, 角膜輪部に存在する角膜上皮幹細胞である. また, 我々は角膜実質に多分化能をもつ神経提由来の幹細胞が存在することをマウス角膜で報告した⁵⁴⁾. 実験方法は以下のとおりである. まず, C57BL6/J マウスより COPs (cornea-derived progenitors) を分離し, 浮遊培養した. フローサイトメトリーにて CD34, stem cell antigen-1 (Sca-1), c-kit, CD133 の発現を解析した. reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) にて神経幹細胞マーカーおよび神経提由来細胞マーカーの発現を調べた. 接着培養後 class III tubulin, neurofilament M (NF-M), glial fibrillary acidic protein (GFAP), collagen type II, aggrecan の免疫染色および脂肪染色 (Oil-Red O) を行った. Nestin 発現については, neural specific enhancer 制御下にある E/nestin-EGFP マウスにて神経特異性の確認をした. green fluorescent protein (GFP) 骨髄移植マウス, および神経提由来組織が GFP⁺ となる P0/Cre GFP マウスからも COPs の分離を行って, 由来の解析を行った. COPs は *twist*, *snail*, *slug*, *Sox9* および *CD34*, *Sca-1*, *musashi1* が陽性であった. E/nestin-

EGFP マウス由来の角膜実質細胞は, COPs として浮遊培養することで GFP 陽性となった. 分化誘導培地で接着培養した COPs は神経細胞, グリア細胞, 軟骨細胞および脂肪細胞の特徴を示した. 一方で, GFP 骨髄を移植したマウスより GFP⁺ の COPs は分離されなかった. また, P0/Cre GFP マウス由来の COPs は GFP⁺ であった. 成体マウス角膜より分離された組織幹細胞は, 多分化能をもつ神経提由来幹細胞であることが示唆された (図 9, 10).

その他にも, 網膜周辺部に神経網膜の幹細胞, あるいは, 線維柱帯付近に角膜内皮細胞の前駆細胞が存在することを示唆する報告もある. しかし, 同じ幹細胞であっても, 角膜上皮のように頻りにターンオーバーする細胞と, 基本的に細胞分裂はせずに一生にわたって生き続ける角膜内皮細胞や, 神経網膜細胞とでは生物学的な特性が違う. 細胞分裂しない組織にとっては, 個々の細胞の老化がそのまま組織の老化を反映する可能性がある. 一方で, ターンオーバーが活発な組織では, 個々の細胞は数日から数週間でアポトーシスによって排除されることから, 一つの細胞がエイジングすること, 個体のエイジングは関係ない.

非常に興味深い研究が最近報告された. 2006 年, ROS により幹細胞が枯渇していき, それを抗酸化物質である N-acetylcysteine (NAC) によって防止することが

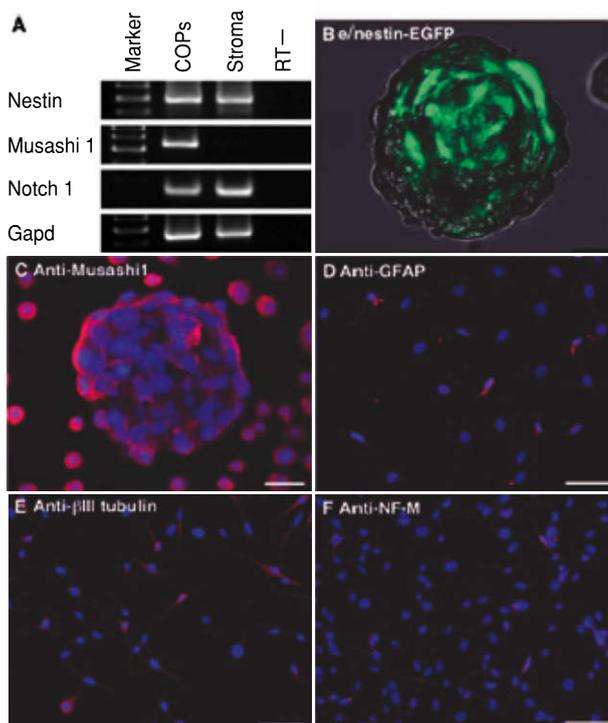


図 10 COPs は神経提細胞のマーカーを発現する。

A : Nocth 1, Musashi 1, nestin の reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). B : nestin promoter 下での GFP 陽性 COPs. COPs の免疫組織化学. C : Musashi-1. D : glial fibrillary acidic protein (GFAP). E : class III tubulin. F : neurofilament M (NF-M). (Yoshida S, et al : Stem Cells 24 : 2714–2722, 2006 より許可を得て転載)

可能であったことを, Ito らが Nature Medicine に報告している⁵⁵⁾. エイジングの大きな要因として酸化ストレスは注目されているので, ステムセルとエイジングを関連づけた論文としてインパクトのある報告であった. この報告によると, ROS がステムセルの増殖を制御するメカニズムにせまっている. Atm (ataxia telangiectasia mutated) 遺伝子の欠損モデル, あるいはエイジングモデルのマウスでは, 血液のステムセル中の活性酸素レベルが高かった. この高いレベルの活性酸素は p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) のシグナリングを活性化させ, 血液のステムセルを増殖させるサイクルに働かせる. このサイクルが過剰に働くと, 血液のステムセルが枯渇するという結論を招き, 臨床像としては骨髄不全を呈することとなる. もちろんこれがステムセルのエイジングのメカニズムとするには早急であるが, 活性酸素とステムセルのエイジングを関連づけた最初の論文としての意義は大きく, 今後のこの分野は大きく発展すると期待する.

すでに骨髄ステムセルの研究では, 酸化ストレスによってステムセルの quiescence が維持できないことが知られている. 酸化ストレスモデルマウスを用いた研究で, 骨髄移植を繰り返し行うことができる回数が制限されることが知られている. これらの現象に関与している細胞内シグナル伝達機構も徐々に明らかになっており,

quiescence の維持と, 加齢, さらに発癌のメカニズムが関連していることが分かってきた.

眼表面のステムセルはどのように quiescent に維持されているのかは興味深い. 角膜ほど紫外線や高酸素に曝露されている組織はない. そこで一生涯にわたって存在し続けなければならない角膜上皮ステムセルがいかに過酷な環境に存在しているかが分かる. 角膜上皮ステムセルの微小環境 (ニッチ) についてはまだそれほど知られていないが, メラノサイトの密度が多いことが光酸化に対する防御メカニズムのひとつであることが推測されている⁵⁶⁾. また, 大気中にある酸素の影響を最小限にとどめるメカニズムが存在することも予想される. 微小環境が何らかの要因によって破壊されると, ステムセルは quiescent でいられなくなるかもしれない. 角膜実質は上皮と異なり, 活発にターンオーバーしているとは考えられていない. ただ, 創傷治癒が働くと実質細胞 (keratocyte) のアポトーシスや線維芽細胞への活性化などがみられ, 非常事態としてステムセルの活性化が起こっている可能性はある. keratocyte のステムセルについてはまだまだ不明な点が多いので今後の発展が期待される.

VII おわりに

ドライアイと加齢黄斑変性という加齢性眼疾患のモデルに注目して, 当教室の仕事をレビューした. また最後

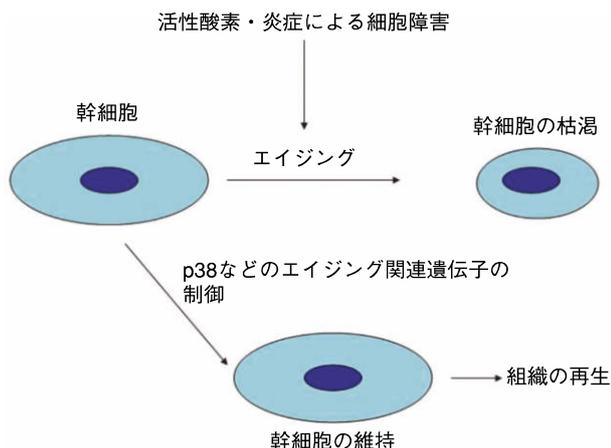


図 11 著者らの考えるエイジングと再生の関係の概念図

に近年台頭しているステムセルエイジングという新しい概念についても我々の立場、考え方を述べた。超高齢化社会を迎える我が国において、加齢のメカニズムの研究はきわめて重要であり、ドライアイや加齢黄斑変性といった代表的な眼科疾患の研究を通じて加齢の重要なメカニズムが明らかになる可能性が高い。本稿で紹介した RAS はメタボリックシンドロームの基本経路であることが判明しており、本経路の阻害剤が実験的脈絡膜新生血管を抑制することは、AMD を伊藤らの提唱するメタボリックドミノの下流に位置すると考えさせるにたる事実である⁵⁷⁾。また近年非常に脚光を浴びている再生医療の基礎研究は、ステムセルの維持がとりもなおさずステムセルの老化の制御機構の維持と同意義であることを強く示唆している(図 11)。これからの医学研究の基本は『加齢』と『再生』という 2 つの大きな流れの中に統合されていくと思われ、生物学的にみた場合、この両者は同じ現象を異なる見方でみているとも考えられる。

付記：宿題報告において、本稿以外に多数のオリジナルデータが発表されたが、本稿では宿題報告に関連する一連の研究のうち既に原著として発表されたデータを中心に総説形式でまとめた。

本研究を発表するにあたり、ご支援を頂戴しました慶應義塾大学医学部眼科学教室同窓会の先生方、また多くの助力をいただいた眼科外来視能訓練士のみなさま、各研究チームの技術員のかたがたに大変お世話になりました。ここに感謝の意を表します。またご指導賜りました小口芳久慶應義塾大学名誉教授に深謝いたします。最後に著者を宿題報告演者に選出していただいた日本眼科学会評議員のみなさまに厚く御礼申し上げます。

文 献

1) Harman D : Aging theory based on free radical

- and radiation chemistry. *J Gerontol* 11 : 298—300, 1956.
- 2) Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, et al : Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308 : 1909—1911, 2005.
- 3) Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgenuth SE, et al : Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309 : 481—484, 2005.
- 4) Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P : Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5 : 32, 1999.
- 5) Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, et al : Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice : a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 11282—11287, 2006.
- 6) Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, Wlaschek M, Peters T, Blaudschun R, et al : UV-induced oxidative stress and photoaging. *Curr Probl Dermatol* 29 : 83—94, 2001.
- 7) Atilano SR, Coskun P, Chwa M, Jordan N, Reddy V, Le K, et al : Accumulation of mitochondrial DNA damage in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1256—1263, 2005.
- 8) Holly FJ, Lemp MA : Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol* 22 : 69—87, 1977.
- 9) Tseng SC, Tsubota K : Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 124 : 825—835, 1997.
- 10) Tsubota K, Nakamori K : Dry eyes and video display terminals. *N Engl J Med* 328 : 584, 1993.
- 11) Tsubota K, Toda I, Nakamori K : Poor illumination, VDTs, and desiccated eyes. *Lancet* 347 : 768—769, 1996.
- 12) Schlote T, Kadner G, Freudenthaler N : Marked reduction and distinct patterns of eye blinking in patients with moderately dry eyes during video display terminal use. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242 : 306—312, 2004.
- 13) Wolkoff P, Nojgaard JK, Troiano P, Piccoli B : Eyecomplaints in the office environment : precorneal tear film integrity influenced by eye blinking efficiency. *Occup Environ Med* 62 : 4—12, 2005.
- 14) Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, Imagawa T, Uehara M, Tsubota K : D-beta-hydroxybutyrate protects against corneal epithelial disorders in a rat dry eye model with jogging board. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 2379—2387, 2005.
- 15) Tanito M, Takanashi T, Kaidzu S, Yoshida Y, Ohira A : Cytoprotective effects of rebamipide and carteolol hydrochloride against ultraviolet B-induced corneal damage in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2980—2985, 2003.

- 16) **Tanito M, Elliott MH, Kotake Y, Anderson RE** : Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3859—3868, 2005.
- 17) **Behndig A, Svensson B, Marklund SL, Karlsson K** : Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 471—475, 1998.
- 18) **Smith VA, Rishmawi H, Hussein H, Easty DL** : Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol* 85 : 147—153, 2001.
- 19) **Luo L, Li DQ, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC** : Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 4293—4301, 2004.
- 20) **Klein R, Wang Q, Klein BE, Moss SE, Meuer SM** : The relationship of age-related maculopathy, cataract, and glaucoma to visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 182—191, 1995.
- 21) **Lopez PF, Grossniklaus HE, Lambert HM, Aaberg TM, Capone A Jr, Sternberg P, et al** : Pathologic features of surgically excised subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 112 : 647—656, 1991.
- 22) **Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, et al** : Novel mechanism for age-related macular degeneration : an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 189 : 323—333, 2001.
- 23) **Ogata N, Wada M, Otsuji T, Jo N, Tombran-Tink J, Matsumura M** : Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1168—1175, 2002.
- 24) **Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, Nakagawa K, Sueishi K, Inomata H** : Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 159—167, 1997.
- 25) **Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR** : Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 855—868, 1996.
- 26) **Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, et al** : The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1891—1898, 1999.
- 27) **Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, Gaudreault J, Gragoudas ES, Michaud NA, et al** : Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol* 120 : 338—346, 2002.
- 28) **Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C, et al** : Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis* 8 : 119—126, 2002.
- 29) **Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J** : Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3578—3585, 2003.
- 30) **Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins, SW** : Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3586—3592, 2003.
- 31) **Tsutsumi C, Sonoda K, Egashira K, Qiao H, Hisatomi T, Nakao S, et al** : The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J Leukoc Biol* 74 : 25—32, 2003.
- 32) **Rakic JM, Lambert V, Devy L, Lutun A, Carmeliet P, Claes C, et al** : Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3186—3193, 2003.
- 33) **Amin R, Puklin JE, Frank RN** : Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 3178—3188, 1994.
- 34) **Lambooy AC, van Wely KH, Lindenberg-Kortleve DJ, Kuijpers RW, Kliffen M, Mooy CM** : Insulin-like growth factor- I and its receptor in neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2192—2198, 2003.
- 35) **Sakurai E, Taguchi H, Anand A, Ambati BK, Gragoudas ES, Miller JW, et al** : Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2743—2749, 2003.
- 36) **de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T** : International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52 : 415—472, 2000.
- 37) **Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE** : Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351 : 233—236, 1991.
- 38) **Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI** : Angiotensin II angiogenic effect *in vivo* involves vascular endothelial growth factor-and inflammation-related pathways. *Lab Invest* 82 : 747—756, 2002.
- 39) **Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME, Gilbert RE,**

- Bertram JF, Shahinfar S, et al** : Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 36 : 1099—1104, 2000.
- 40) **Chua CC, Hamdy RC, Chua BH** : Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1401 : 187—194, 1998.
- 41) **Candido R, Allen TJ, Lassila M, Cao Z, Thallas V, Cooper ME, et al** : Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis. *Circulation* 109 : 1536—1542, 2004.
- 42) **Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, et al** : Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release *in vivo*. *Circulation* 100 : 1646—1652, 1999.
- 43) **Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, et al** : Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens* 17 : 537—545, 1999.
- 44) **Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Fukamizu A, Itoman M, Majima M** : Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis* 26 : 271—279, 2005.
- 45) **Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, et al** : Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 112 : 67—75, 2003.
- 46) **Nagai N, Noda K, Urano T, Kubota Y, Shinoda H, Koto T, et al** : Selective suppression of pathological, but not physiological, retinal neovascularization by blocking angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1078—1084, 2005.
- 47) **Nagai N, Oike Y, Noda K, Urano T, Kubota Y, Ozawa Y, et al** : Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 2925—2931, 2005.
- 48) **Hikichi T, Mori F, Takamiya A, Sasaki M, Horikawa Y, Takeda M, et al** : Inhibitory effect of losartan on laser-induced choroidal neovascularization in rats. *Am J Ophthalmol* 132 : 587—589, 2001.
- 49) **Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, et al** : Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR gamma-modulating activity *Hypertension* 43 : 993—1002, 2004.
- 50) **Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U** : Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferators-activated receptor-gamma activity *Circulation* 109 : 2054—2057, 2004.
- 51) **Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, et al** : Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13 : 43—47, 1996.
- 52) **Hahn P, Milam AH, Dunaief JL** : Maculas affected by age-related macular degeneration contain increased chelatable iron in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 121 : 1099—1105, 2003.
- 53) **Age-Related Eye Disease Study Research Group** : A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss : AREDS report no.9. *Arch Ophthalmol* 119 : 1439—1452, 2001.
- 54) **Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, et al** : Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 24 : 2714—2722, 2006.
- 55) **Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, et al** : Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12 : 446—451, 2006.
- 56) **Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Shimazaki J, Tsubota K** : Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. *Exp Eye Res* 81 : 218—223, 2005.
- 57) **伊藤 裕** : メタボリックドミノとは。生活習慣病の新しいとらえ方。 *日本臨床* 61 : 1837—1843, 2006.
- 58) **Nakamura S, et al.** : Involvement of oxidative stress on corneal epithelial alterations in a blink suppresses dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 (in press).

Comment : 金井 淳

我が国は世界一の超長寿社会となったが、人類の不老長寿への願望は根強く、紀元前3世紀秦の始皇帝は権力の座に登りつめ最後の望みは不老長寿で、その薬を探すように命じた話は有名である。現実的な不老長寿の薬は老人性疾患の治療薬か quality of life を高める老人性疾患の予防薬であるのかもしれない。

坪田一男教授は長年ドライアイの発生機序や治療の研究に多くの素晴らしい業績を残し、最近ではアンチエイジングの研究に情熱を注がれている。加齢の原因の一つにフリーラジカルの関与が挙げられているが、ドライアイの起因の一つにフリーラジカルを結びつけたことは興味深い。涙液は加齢に伴い減少傾向がみられる。ラットをブランコに乗せ風を当てたドライアイモデルは瞬目の減少により涙液の安定性が低下し、涙液と角膜上皮の相互作用に慢性的な障害を生じる。フリーラジカルに起因する酸化ストレスマーカーの出現や抗酸化関連遺伝子の発現によって確認している。高齢ラットとの比較で本結果はさらに確証が得られることを期待している。

我が国の加齢黄斑変性(AMD)は中途失明の第4位までに上昇してきた。アンジオテンシン系薬剤としてアンジオテンシン変換酵素阻害薬とアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)があるが、最近では心不全治療薬としても用いられている。実験的レーザー破壊による脈絡膜新生血管(CNV)に対してテルミサルタンなどARBの投与が活性酸素生産量抑制や血管壁の形態変化をもたらす新生血管を阻害することが予測される。AMDも酸化ストレスの関与が指摘されており、そのモデルの一つである銅、亜鉛依存型遺伝子欠損マウスの病理組織学的検索でAMDの模倣を示したことから、2001年に報告された海外での臨床的研究であるAREDS(age-related eye disease study)の裏づけとして、他のAMDモデルとともにその治療効果判定の材料に寄与するのではないかとと思われる。

21世紀は予防医学の時代であり、加齢に対する研究は進歩解明されつつある。本論文では眼の加齢疾患の代表であるドライアイや血管新生を伴う加齢黄斑変性に対する機序や治療法を模索するとともに、加齢に対する対策の一つに再生医療の導入という新しいコンセプトを取り入れたことは興味深い。