

第 110 回 日本眼科学会総会 宿題報告III

眼と加齢

加齢黄斑変性に対する新規治療法の開発

—抗血管新生療法および網膜再生—

玉置 泰裕

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座眼科学

共同研究者

柳 靖雄, 出田 隆一, 井上 裕治, 入山 彩, 高橋 秀徳, 小畑 亮, 村中 公正

上 順子, 新家 眞(東京大学大学院医学系研究科眼科学教室)

西山 伸宏(東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター)

Zhang GD, Jang WD, 片岡 一則(東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻)

原田 敦史(大阪府立大学大学院工学研究科)

相田 卓三(東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻)

近藤 峰生, 伊藤 逸毅, 上野 真治, 宮田健太郎, 子安 俊行, 寺崎 浩子

(名古屋大学大学院医学系研究科眼科学教室)

井上 達也, 古川 貴久(大阪バイオサイエンス研究所)

大石 高生(京都大学霊長類研究所器官調節分野)

田坂 文孝(参天製薬奈良眼科研究所)

石井 康雄(ニュービジョン眼科研究所)

研究協力：株式会社トプコン医用機器技術部

要 約

加齢に伴う変化がその発症および進展にかかわる眼疾患のひとつに加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)がある。本疾患は、欧米では成人失明原因の第一位であり、特に脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)により惹起される滲出型 AMD は、視力予後が不良で、その治療法の開発は急務である。そこで、AMD に対する新規治療法の開発を目的として、CNV に対する抗血管新生療法、および障害された網膜再生医療の両面から、新しいアプローチを試みた。

Polyion complex (PIC) ミセルは静電相互作用により形成される直径数十 nm のナノ粒子であり、enhanced permeability and retention (EPR) 効果により固形腫瘍に高い集積性を示す。Fluorescein isothiocyanate で標識した poly-L-lysine[FITC-P(Lys)] を内包した PIC ミセルをラット CNV モデルに静脈内投与した検討では、CNV における集積は投与 168 時間後まで持続

し、ラット CNV 部に高い集積性を示した。PIC ミセルは CNV に対するドラッグデリバリーシステムとして有用である可能性が示された。光線力学療法(PDT)は AMD に対する現在の標準的治療法であるが、問題点として施行後の CNV 再発がある。AMD に対する PDT の効果を高めるためには、光増感剤を CNV 領域へ選択的に送達することと、CNV 領域での効果的な光力学反応を惹起することの双方が必要である。 dendrimer 型光増感剤は内核に位置する光増感剤が高濃度においても凝集しないという性質により、高効率の光力学反応を惹起することが期待できる。Dendrimer porphyrin (DP) をミセル化した DP ミセルにより、CNV への DP の高い集積性が得られ、より低いエネルギー照射の PDT により CNV 閉塞が可能となった。DP ミセルを用いた PDT は、CNV 閉塞効率が低いのみならず、正常な網脈絡膜血管や皮膚に対する障害も少ないことが示された。 dendrimer 型光増感剤とそのミセル化は CNV に

別刷請求先：113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座眼科学
玉置 泰裕 E-mail: tamaki-tky@umin.ac.jp

(平成 18 年 11 月 1 日受付, 平成 18 年 12 月 28 日改訂受理)

Reprint requests to: Yasuhiro Tamaki, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, The University of Tokyo
Graduate School of Medicine. 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

(Received November 1, 2006 and accepted in revised form December 28, 2006)

対する PDT において非常に有用であることが強く示唆された。

生体内において遺伝子の導入部位の制御が可能となれば AMD を含む眼局所の疾患に対する遺伝子治療にとって非常に有用である。光応答性遺伝子導入は DNA/ペプチド複合体とともに光増感剤を作用させ、エンドソーム膜を障害することにより導入効率を上げる遺伝子導入法であるが、その細胞毒性のため *in vivo* には応用されていない。そこで、DNA/ペプチド複合体が dendrimer 型光増感剤 (dendrimer-furochalcone) の外殻に覆われた新規三元系コンプレックスを調製し、ラット結膜下へ注入した後に PDT 用レーザーを照射したところ、光線照射部位に特異的なレポーター遺伝子の発現上昇を認め、光線照射により眼組織への遺伝子導入を制御可能な遺伝子キャリアとなり得ることが示唆された。

網膜色素上皮 (RPE) へのリポフスチンの沈着は滲出型 AMD の前駆病変と考えられている。リポフスチンの構成成分である A2E (N-retinyleidin-N-retinylethanolamin) は、レチノイン酸受容体を活性化し、RPE の表現型の変化を来し、血管新生因子を活性化することにより CNV の発生に関与していることが示唆され、CNV 治療の新しいターゲットとなり得る可能性が示された。

AMD により損なわれた視機能の回復には、障害網膜

の再生が必須である。マウス骨髄間葉系幹細胞を網膜変性モデルラット網膜下に移植し、網膜変性に対する網膜変性抑制効果を組織学的および電気生理学的に検討した。骨髄間葉系幹細胞移植眼では、形態的および機能的に網膜変性抑制効果が認められ、細胞移植療法の細胞ソースとなり得ることが示唆された。

AMD で障害される黄斑形成にかかわる遺伝子やその形成の分子機構について検討するため、発生期のアカゲザル網膜を黄斑部と周辺部に分けて採取し、サルゲノムマイクロアレイを用いて黄斑部と網膜周辺部での遺伝子発現比較を行った。さらに、黄斑部に高い発現がみられるもの、あるいは黄斑部の形成時期に特異的に発現する遺伝子群を選び、これらの発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって検討した。本研究は、黄斑形成の分子機構の解明、さらには錐体の再生医療を可能にする基盤研究になり得ると期待される。(日眼会誌 111: 232-269, 2007)

キーワード：加齢黄斑変性、脈絡膜新生血管、Polyion complex (PIC) ミセル、ドラッグデリバリーシステム、光線力学療法、dendrimer 型光増感剤、光応答性遺伝子導入、N-retinyleidin-N-retinylethanolamin (A2E)、レチノイン酸受容体、骨髄間葉系幹細胞、サルゲノムマイクロアレイ

A Review

Novel Approach for Management of Age-related Macular Degeneration —Antiangiogenic Therapy and Retinal Regenerative Therapy—

Yasuhiro Tamaki

Department of Ophthalmology, The University of Tokyo Graduate School of Medicine

Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of legal blindness in developed countries. Even with the recent advent of several treatment options, treatment of exudative AMD, characterized by choroidal neovascularization (CNV), remains difficult. Thus, in this review article, we report on the investigation of novel approaches for the management of AMD, antiangiogenic therapy for CNV, and retinal regenerative therapy.

Polyion complex (PIC) micelles have a range in size of several tens of nanometers formed through an electrostatic interaction, and accumulate in solid tumors through an enhanced permeability and retention (EPR) effect. In this study, we examined the distribution of the PIC micelles which encapsulate fluorescein isothiocyanate-labeled poly-L-lysine {FITC-P(Lys)} in experimental CNV in rats, to investigate whether PIC micelles can be used for

the treatment of CNV. We demonstrated that PIC micelles accumulate in the CNV lesions and are retained in the lesions for as long as 168 hours after intravenous administration. These results raise the possibility that PIC micelles can be used for achieving an effective drug delivery system against CNV. Although photodynamic therapy (PDT) is a very promising treatment for AMD, most patients require repeated treatments. For effective PDT against AMD, the selective delivery of a photosensitizer to the CNV lesions and an effective photochemical reaction at the CNV site are necessary. The characteristic dendritic structure of the photosensitizer prevents aggregation of its core sensitizer, thereby inducing a highly effective photochemical reaction. We present an effective PDT for AMD employing a supramolecular nanomedical device, i. e., a novel dendritic photosensitizer encapsulated in

a polymeric micelle formulation. With its highly selective accumulation in CNV lesions, this treatment resulted in a remarkably efficacious CNV occlusion with minimal unfavorable phototoxicity. Our results will provide a basis for an effective approach to PDT for AMD.

Spatial control of gene transfection in the body is a core issue in the gene therapy for ocular diseases including AMD. Photochemical internalization (PCI) is a technology that effects light-induced delivery of DNA directly inside cells. PCI usually requires that a photosensitizer be added to the drug-delivery system to photochemically destabilize the endosomal membrane. We have developed a ternary complex composed of a core containing DNA packaged with cationic peptides and enveloped in the anionic dendrimer, phthalocyanine, which provides the photosensitizing action. Subconjunctival injection of the ternary complex followed by laser irradiation resulted in transgene expression only in the laser-irradiated site in rats. This PCI-mediated gene delivery system is potentially useful in gene therapy for ophthalmic diseases.

Accumulation of lipofuscin is related to an increased risk of AMD. We report that a major lipofuscin component, A2E (N-retinyleidin-N-retinylethanolamin), activates the retinoic acid receptor (RAR). *In vivo* experiments suggest that A2E accumulation results in the pro-angiogenic conversion of retinal pigment epithelial (RPE) cell phenotype. This physiological consequence of A2E accumulation may be related to a novel potential therapeutic target for CNV.

To recover visual function damaged by AMD, retinal regenerative therapy is essential. We investigated whether subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) promotes

photoreceptor survival in a rat model of retinal degeneration. Morphological and functional studies *in vivo*, including histological analysis and electrophysiological studies, indicate that the subretinal transplantation of MSCs delays retinal degeneration and preserves retinal function. These results suggest that MSC is a useful cell source for cell-transplantation therapy for retinal degeneration.

In order to elucidate the molecular mechanisms of development of the fovea, which is composed mainly of cone photoreceptors and is susceptible to injury from AMD, we performed a comparative gene expression analysis between the central and peripheral regions of the monkey retina using monkey (rhesus macaque) genome microarray chips. We then selected the clones which were expressed at significantly higher levels in the central region and confirmed their expression in the monkey retina by section *in situ* hybridization. This study sheds light on the mechanisms of foveal development and may lead to the development of regenerative medicine for cone photoreceptors.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 111 : 232-269, 2007).

Key words : Age-related macular degeneration (AMD), Choroidal neovascularization (CNV), Polyion complex (PIC) micelle, Drug delivery system, Photodynamic therapy (PDT), Dendritic photosensitizer, Photochemical internalization (PCI)-mediated gene delivery, N-retinyleidin-N-retinylethanolamin (A2E), Retinoic acid receptor (RAR), Bone marrow mesenchymal stem cell (MSC), Monkey genome microarray chip

I 緒 言

加齢に伴う変化がその発症および進展にかかわる眼疾患のひとつに加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration, AMD) がある。本疾患は、欧米では成人失明原因の第一位であり¹⁾²⁾、本邦でも患者数の増加が指摘されている。久山町研究では、50歳以上における発症頻度は初期加齢黄斑症で13.6%、晩期加齢黄斑症すなわちAMDで0.87%であり³⁾⁴⁾、2001年度の日本人口に換算するとそれぞれ648万人、43万人にのぼると推定される。AMDは萎縮型と滲出型に分類され、特に脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) により惹起される滲出型AMDは、視力予後が不良で、AMD

による社会的失明症例の8~9割を占めており¹⁾、その治療法の開発は急務であると考えられる。今日臨床で行われている、あるいは開発中である滲出型AMDの治療法は、レーザー光凝固術⁵⁾、経瞳孔温熱療法 (transpupillary thermotherapy ; TTT)⁶⁾、光線力学療法 (photodynamic therapy ; PDT)^{7)~10)}などのレーザー治療、薬物療法^{11)~13)} (遺伝子治療¹⁴⁾を含む)、およびCNV抜去術¹⁵⁾、黄斑移動術¹⁶⁾や網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 移植¹⁷⁾、虹彩色素上皮 (iris pigment epithelium, IPE) 移植¹⁸⁾などの手術療法に大別される。これらの治療法のうち、レーザー治療、薬物療法、および手術療法のうちCNV抜去術は、すべてCNVをターゲットとした抗血管新生療法といえる。こ

れに対して、黄斑移動術や RPE および IPE 移植は障害された網膜をターゲットとした治療法であるが、いずれも、その効果は限定的なものとなっている。そこで、AMD に対する新規治療法の開発を目的として、CNV に対する抗血管新生療法、および障害された網膜再生の両面から、新しいアプローチを試みた。まず、CNV に対する新規の抗血管新生療法の開発を目的として、滲出型 AMD に対する現在の第一選択である PDT を改良した高分子ミセルによる新しい PDT、CNV 選択的遺伝子導入法の開発を目的とした新規三元型コンプレックスによる光応答性遺伝子導入、および滲出型 AMD の発症予防を目的としてリポスチン構成成分 A2E (N-retinyleidin-N-retinylethanolamin) と CNV 発生の関連について検討した。さらに、障害された網膜の新規治療法の開発を目的として、網膜幹細胞および骨髄間葉系幹細胞の Royal College of Surgeons (RCS) ラット網膜下移植の効果を検討し、また AMD で障害される黄斑再生を目的として、サル黄斑に高発現する遺伝子群の同定を試みた。

II 高分子ミセルによる新しい PDT

光線力学療法 (PDT)^{7)~9)} は、中心窩下 CNV を伴う AMD に対して現時点における最も標準的な治療法となっている。PDT では、静脈内投与された光増感剤 verteporfin (Visudyne[®]) が血液中の低比重リポ蛋白質 (LDL) と結合して、LDL 受容体の豊富な CNV に集積し、レーザー照射により惹起された光化学反応によって血管内皮細胞が障害され、CNV を選択的に閉塞するとされている。PDT の問題点として、施行後の再発がある。欧米での臨床試験である Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) study⁷⁾ では 2 年間の平均治療回数は 5.6 回、本邦における多施設オープン試験である The Japanese age-related macular degeneration trial (JAT) study¹⁰⁾ でも 12 か月の平均治療回数は 2.8 回であった。PDT の治療成績をさらに向上させるためには、この高い再治療率すなわち CNV の再発率を低下させるような、効果の高い方法が必要と考えられる。そのために、再治療の間隔を 3 か月から 2 か月に短縮する early retreatment の効果が検討されたが、有効性の改善はみられなかったことが報告されている¹⁹⁾。また、PDT と副腎皮質ステロイド薬など抗血管新生薬の併用療法が試みられているが、眼圧上昇、眼内炎、白内障進行などのリスクがあり、またその治療成績も満足すべきものではない²⁰⁾。そこで、より効率的な新規の光増感剤を用いた PDT を開発することを目的として、光増感剤の CNV への送達を強化する方法を検討した。

1. 高分子ミセルを用いたドラッグデリバリーシステム

PDT や血管新生阻害薬などによる CNV に対する薬物治療を、その全身副作用を最小限にしながら開発するためには、病変部位への薬物の高い集積性が必須である。PDT における verteporfin のごとく全身投与された薬物の病変部位に対する送達は、薬物キャリアが毛細血管から滲出して病変部局所に到達することで達成されるが、そのためには、血中での薬物キャリアの滞留性を維持することが重要である。薬物を静脈注射した際の血中からの主な消失経路としては、腎糸球体からの濾過と、肝臓のクッパー細胞などの細網内皮系による処理がある。糸球体からの濾過については、サイズ認識すなわち 4 nm が閾値であるといわれており、キャリアを 4 nm 以上の大きさに設計することで回避できる²¹⁾。一方、細網内皮系による処理については、異物認識を回避するために、キャリアの表面を生体適合性高分子で修飾し、血漿蛋白質との相互作用 (オプソニン作用) を抑制することにより低減可能で、血液中に長期に滞留することが可能となると考えられる²²⁾。さらに、標的組織が腫瘍である場合には、固形腫瘍の新生血管では正常組織と比較して高い血管透過性を有することと、リンパ系が未発達であることより、高分子物質が集積し長期滞留することが知られており²³⁾²⁴⁾、この現象は enhanced permeability and retention (EPR) 効果と呼ばれる²⁵⁾。高分子集合体である高分子ミセルは直径数十ナノメートルの粒子であり、その大きさはウイルスやリポ蛋白質と同等であり²³⁾、EPR 効果により固形腫瘍に集積しやすい性質を有する²⁶⁾²⁷⁾。さらに、高分子ミセルは高分子複合体を利用した他のドラッグデリバリーシステムと比較して薬物を高効率に安定してカプセル化することができるため²³⁾、新しいドラッグデリバリーシステムとしての有効性が期待されており、doxorubicin, pacritaxel および cisplatin を内包した高分子ミセルについては固形腫瘍の治療のための臨床試験が既に実施されている²⁸⁾²⁹⁾。他方、CNV は高い血管透過性をもっており、高分子物質が EPR 効果により実験的 CNV に集積することが報告されている³⁰⁾。Polyion complex (PIC) ミセルは、水中において静電相互作用を駆動力にして親水性連鎖を外殻、疎水性連鎖を内核に配した直径数十 nm のコアシェル型ナノ粒子であり、薬物内包時の安定性および新生血管部位への集積性に優れ、悪性腫瘍に対するドラッグデリバリーシステムとしての有用性が示唆されている²³⁾³¹⁾。本項では、蛍光標識した PIC ミセルを用いて静脈内投与後の CNV への集積性を定性的および定量的に評価することにより、PIC ミセルの CNV に対するドラッグデリバリーシステムとしての有用性について検討した。

1) ポリイオンコンプレックスミセルの調製

蛍光物質である fluorescein isothiocyanate で標識し

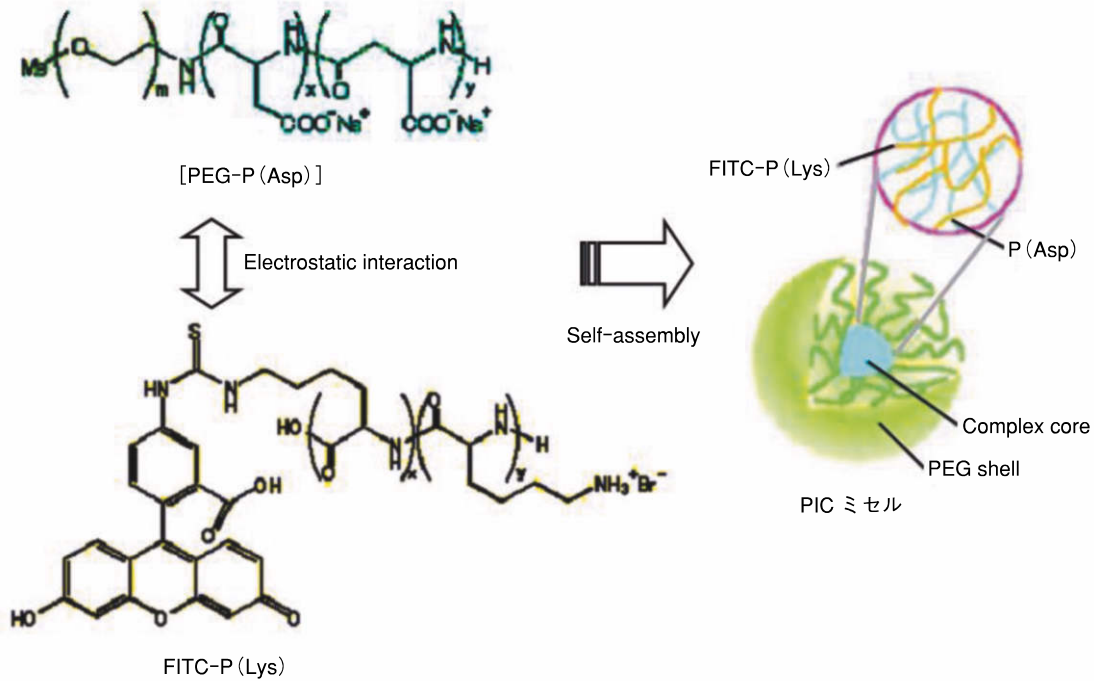


図 1 Fluorescein isothiocyanate で標識した poly-L-lysine [FITC-P(Lys)] を内包した polyion complex (PIC) ミセルの調製。

PIC ミセルは poly- α,β -aspartic acid [P(Asp)] と FITC-P(Lys) から成る疎水性内核が, poly(ethylene glycol) (PEG) から成る親水性外殻に覆われた二層構造をなす。(文献 34 より許可を得て転載)

た poly-L-lysine [FITC-P(Lys)] 100.0 mg と poly(ethylene glycol)-*block*-poly- α,β -aspartic acid [PEG-P(Asp)] 48.6 mg をそれぞれ 10.0 ml と 5.0 ml の phosphate buffered saline (PBS) に溶解した。同量 (5.0 ml) の FITC-P(Lys) 溶液と PEG-P(Asp) 溶液を混和して PIC ミセル溶液, 同量 (5.0 ml) の FITC-P(Lys) 溶液を PBS で溶解して対照溶液とし, 各溶液が同濃度 (5.0 mg/ml) の FITC-P(Lys) を含有するよう調製した (図 1)。PIC ミセルの平均直径と多分散インデックスは, dynamic light scattering (DLS) 測定法 (DLS-7000, 大塚 Electronics 社) を用い, 25°C で He/Ne レーザー (波長 632.8 nm) により測定した。調製された PIC ミセルが単峰形のサイズ分布をしており, その平均直径と多分散インデックスは 50.7 nm と 0.046 で, PIC ミセルの直径の分散は非常に小さいことが分かった (図 2)。

2) 実験的 CNV

以下のすべての実験における動物の取り扱い, Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で決められたガイドラインおよび東京大学の動物実験施設のガイドラインを遵守して行った。

体重 100~120 g の雄の Brown Norway (BN) ラット (埼玉実験動物) を用い, 塩酸ケタミン (ケタラル®、三共エール薬品) と塩酸キシラジン (セラクター®, Bayer Health Care 社) の混合液 (7:1) の腹腔内注射 (1,000 μ l/kg), または, ジエチルエーテルの吸入によって全身麻酔を行った。0.5% トロピカミド (ミドリ

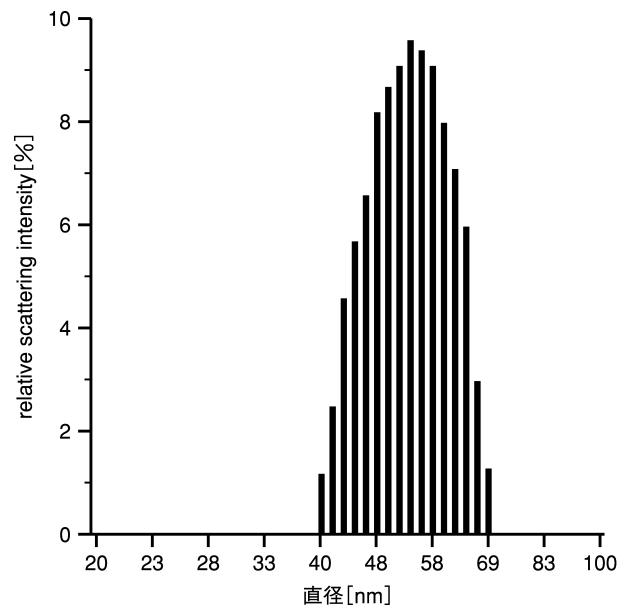


図 2 Dynamic light scattering (DLS) 測定法による PIC ミセルの直径分布。

調製された PIC ミセルが単峰形のサイズ分布をしており, その平均直径は 50.7 nm であり, PIC ミセルの直径の分散は非常に小さいことが分かる。(文献 34 より許可を得て転載)

ン®M, 参天製薬) 点眼により散瞳し, ダイオードレーザー光凝固装置 (DC 3000, ニデック社) および細隙灯照射システム (SL 150, トプコン社) を用いて, スポット

サイズ $75 \mu\text{m}$, 凝固時間 0.05 秒, レーザー出力 200 mW の条件で, 視神経乳頭周囲に主要網膜血管を避け各眼にレーザー光凝固を行い, 既報³²⁾³³⁾のごとく実験的 CNV を作製した。

3) CNV モデルへの PIC ミセル投与

CNV への PIC ミセルの集積を検討するために, BN ラットを用いて, 上述の条件で右眼に 50 発の光凝固を行い, 実験的 CNV を作製した。尾静脈より, FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル溶液 (5.0 mg/ml) $400 \mu\text{l}$, または FITC-P (Lys) 溶液 (5.0 mg/ml) $400 \mu\text{l}$ を光凝固 7 日後に投与し高分子ミセルの CNV への集積性について検討した。過量のペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®, ダイナボット社) でラットを屠殺した後, 眼球を摘出し, ProLong Antifade キット (Molecular Probes, Eugene 社) を用いて凍結切片を作製し, FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル投与群では投与 1, 4, 8, 24, 168 時間後に, FITC-P (Lys) 投与群では投与 1 時間後に, 蛍光顕微鏡 (model IX, オリンパス社) を用いて観察した。FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル投与群では, CNV 領域を含む網脈絡膜組織における蛍光染色は最大 4 時間まで観察された (図 3 A, B)。薬物投与 24 時間後には, 網脈絡膜血管を含む光凝固外の領域での蛍光は消退して CNV 領域への FITC-P (Lys) の集積はより明らかとなり (図 3 C), この蛍光は投与 168 時間後まで (図 3 D) 観察された。Free FITC-P (Lys) 投与群では, 投与 1 時間後には蛍光は CNV と脈絡膜毛細血管板で観察された (図 3 E) が, すべてのラットは free FITC-P (Lys) 投与 1~2 時間後に死亡した。レーザー未施行の対照群では, 蛍光は脈絡膜血管に最高 1 時間まで観察され, 4 時間後以降には消失して観察されなくなった (図 3 F, G)。光学顕微鏡所見では, 他の網膜構造に明らかな異常を認めなかった³⁴⁾。

実験的ラット CNV モデルの網脈絡膜組織および血液中の FITC-P (Lys) 濃度を調べるために, FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル (5.0 mg/ml) $400 \mu\text{l}$ または free FITC-P (Lys) (5.0 mg/ml) $400 \mu\text{l}$ を, それぞれ実験的 CNV 作製のための光凝固 7 日後に静脈内投与した。FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル投与後 1, 4, 8, 24 および 168 時間と free FITC-P (Lys) 投与後 1 時間にペントバルビタールナトリウムの過量投与により屠殺し, 直後に採血および眼球摘出を行った。血液サンプルは 12,000 rpm, 5 分間の遠心処理後, 上清を採集し分光測光法により分析を行った。前眼部および硝子体を除去した後, 網膜および脈絡膜を採取し, 網脈絡膜組織は, 0.1 ml の PBS でホモジネートし, この懸濁液の遠心処理 (12,000 rpm, 5 分間) を行い, 上清を分光測光法にて分析した。蛍光強度は 495 nm の励起波長を用いて, 520 nm の蛍光で, 蛍光分光光度計 (FP-6500, JASCO 社) により計測し, FITC-P (Lys) 濃度は, 校正曲線を用い

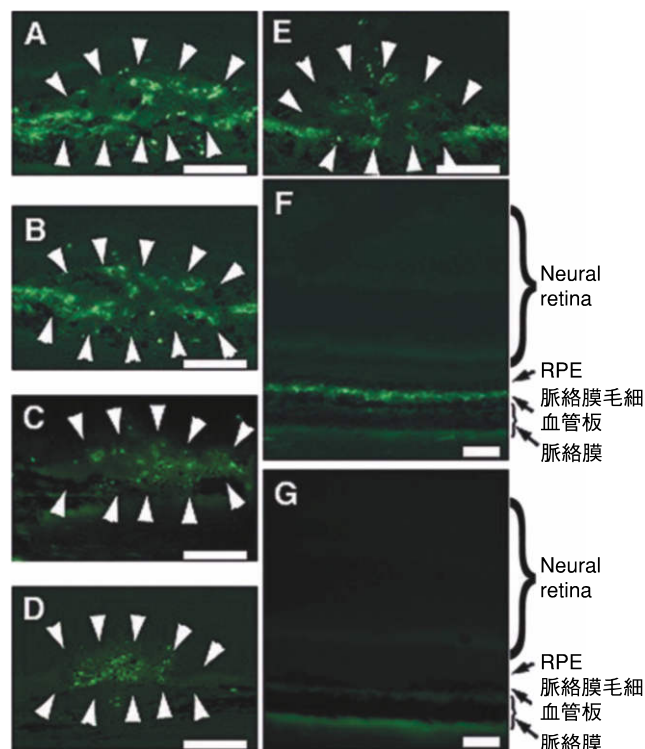


図 3 脈絡膜新生血管 (CNV) への PIC ミセルの集積。

CNV 領域の凍結切片を作製し, 蛍光顕微鏡を用いて観察した。A~E の白矢頭は CNV 領域を示す。FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル投与群での静脈内投与 1 時間 (A), 4 時間 (B), 24 時間 (C), および 168 時間 (D) の凍結切片。CNV 領域および網脈絡膜組織における蛍光染色は最大 4 時間まで観察され (A, B), 投与 24 時間後には, 網脈絡膜血管を含む光凝固外の領域での蛍光は消退して CNV 領域への FITC-P (Lys) の集積はより明らかとなり (C), この蛍光は投与 168 時間後まで観察された (D)。Free FITC-P (Lys) 投与群では, 投与 1 時間後には蛍光は CNV と脈絡膜毛細血管板で観察された (E) が, すべてのラットは free FITC-P (Lys) 投与 1~2 時間後に死亡した。レーザー未施行の対照群では, 蛍光は脈絡膜血管に 1 時間後 (F) までは観察されたが, 4 時間後 (G) 以降には消失して観察されなくなった。光学顕微鏡所見では, 他の網膜構造に明らかな異常を認めなかった。バーは $25 \mu\text{m}$ 。RPE: 網膜色素上皮。(文献 34 より許可を得て転載)

て算出した。FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル投与群では, 投与 4 時間後でピークに達し, 168 時間後においても FITC-P (Lys) は存在した (図 4)。なお, レーザー未処置眼においては FITC-P (Lys) の網脈絡膜組織内濃度は測定限界以下であった。静脈内投与 1 時間後において free FITC-P (Lys) 投与群の FITC-P (Lys) の網脈絡膜組織内濃度は FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル投与群と比較して有意に低値であった。図 5 は free FITC-P (Lys) と FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル投与後の血中 FITC-P (Lys) 濃度を示す。FITC-P (Lys) 内包 PIC ミセル投与後の血中の FITC-P (Lys) 量は静脈内投与の後, 1, 4, 8 および 24 時間においてそれぞれ投与量に対して

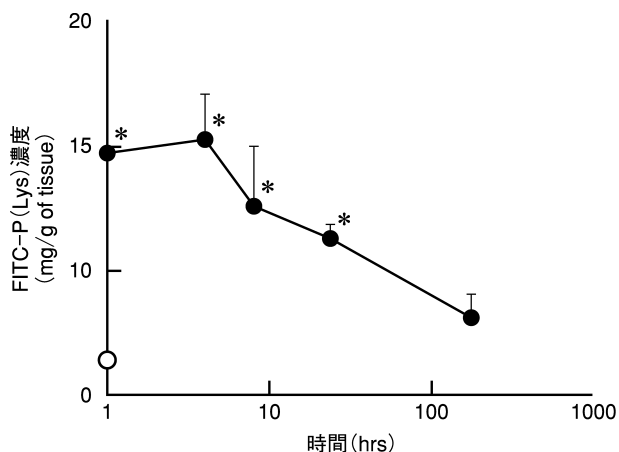


図 4 FITC-P(Lys)内包 PIC ミセルまたは free FITC-P(Lys)投与後の実験的ラット CNV モデル網脈絡膜組織内の FITC-P(Lys)濃度。

FITC-P(Lys)内包 PIC ミセル投与群(●, 各 n=4)では, 投与 4 時間後でピークに達し, 168 時間後においても FITC-P(Lys)は存在した。静脈内投与 1, 4, 8, および 24 時間後における FITC-P(Lys)内包 PIC ミセル投与群の FITC-P(Lys)網脈絡膜組織内濃度は, free FITC-P(Lys)投与群(○, 各 n=3)の投与 1 時間後の FITC-P(Lys)網脈絡膜組織内濃度と比較して有意に高値であった。図中の表示は平均値±標準偏差を示す。*: p<0.05。(文献 34 より許可を得て転載)

5.0%, 7.8%, 3.8% および 0.5% であった³⁴⁾。

以上のように, PIC ミセルに内包した FITC-P(Lys)は, 静脈内投与 168 時間後まで実験的 CNV モデル網脈絡膜組織内に残存していた。Free FITC-P(Lys)と PIC ミセルに内包されている FITC-P(Lys)を区別することはできないため, ここで示した FITC-P(Lys)がどちらの状態が存在していたかは明らかではない。Free FITC-P(Lys)が示す高い毒性のため, PIC ミセルへの内包が CNV への FITC-P(Lys)の集積を増強することを本研究で直接証明することはできない。しかし, CNV 眼における静脈内投与 1 時間後では, FITC-P(Lys)内包 PIC ミセル投与群では, free FITC-P(Lys)投与群に比して有意に高い集積を示し, レーザー未処置群においては, FITC-P(Lys)濃度が測定限界以下であった。さらに, 固形腫瘍における新生血管と同様に CNV では血管透過性が亢進していることより, PIC ミセルは主として EPR 効果により集積したと推測することができる。このことは高分子物質の CNV への集積を家兎眼において検討した報告³⁵⁾とも矛盾しない。本研究において FITC-P(Lys)内包 PIC ミセルは投与後 24 時間においても, 投与量の 0.5% が血中に存在した。一般的にはフルオレセインのような低分子物質を静脈内に投与した場合, その濃度は数時間以内に投与量の 0.1% 以下まで急速に減弱する。実際にフルオレセインナトリウムを静脈内投与した際の血中濃度は測定限界値以下で

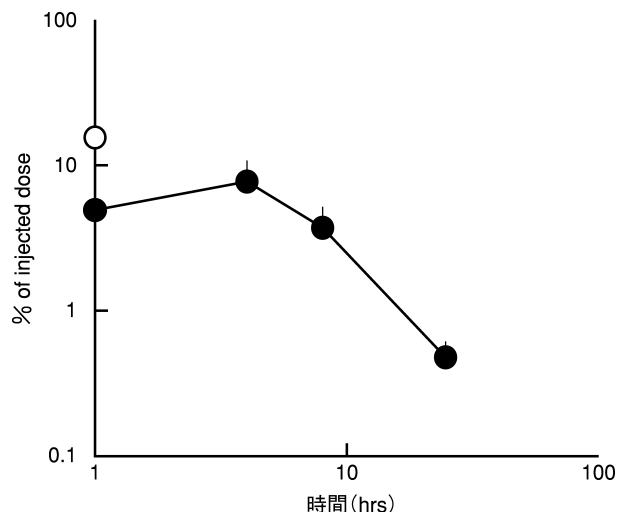


図 5 FITC-P(Lys)内包 PIC ミセル(●, 各 n=4)または free FITC-P(Lys)(○, 各 n=3)投与後の実験的ラット CNV モデルの FITC-P(Lys)血液中濃度。

FITC-P(Lys)内包 PIC ミセル投与後の血中の FITC-P(Lys)量は静脈内投与の後, 1, 4, 8 および 24 時間においてそれぞれ投与量に対して 5.0%, 7.8%, 3.8% および 0.5% であった。図中の表示は平均値±標準偏差を示す。(文献 34 より許可を得て転載)

あった。以上より, FITC-P(Lys)内包 PIC ミセルは EPR 効果において非常に有利な長期滞留性を保持すると考えられる。血液中においては, PIC ミセルは投与 1 時間後に投与量の 5%, 24 時間後に 0.5% が存在し, FITC-P(Lys)の血液中对網脈絡膜組織内濃度比は 1 時間後に 340:1 であり, 24 時間後には 45:1 であった。このことは PIC ミセルが血液中の低濃度にもかかわらず, EPR 効果によって効率的に網脈絡膜組織に集積し得ることを示唆する。さらに, free FITC-P(Lys)投与群では, 投与 1~2 時間後に poly-L-lysine の毒性によりすべてのラットが死亡したのに対し, FITC-P(Lys)内包 PIC ミセル投与群では死亡例はみられなかった。このような PIC ミセルの特徴は, 全身的副作用を有する薬物の効果的投与を実現する際に非常に有利であると考えられる。

以上, ラット CNV モデルに対し FITC-P(Lys)内包 PIC ミセルを静脈内投与した検討では, CNV における集積は投与 7 日後まで持続し, 網脈絡膜組織内濃度は free FITC-P(Lys)投与 1 時間後と比較して 1~24 時間後で有意に高値となっていた。薬物内包高分子ミセルは, 全身投与によりラット CNV 部に高い集積性を示し, CNV に対するドラッグデリバリーシステムとして有用である可能性が示された。PIC ミセルの体内分布は主にその大きさと表面特性によって決定され, 薬物はミセルの中心部に内包されている限り影響を及ぼさない。PIC ミセルは種々の薬物, 酵素³⁶⁾を内包可能であること, DNA を内包することで非ウイルス性の遺伝子ベ

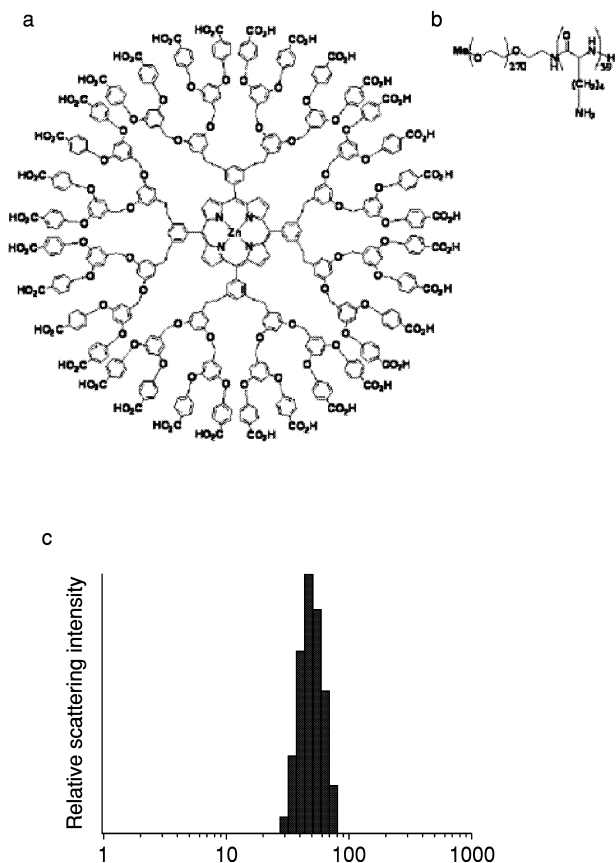


図 6 Dendrimer porphyrin (a) と poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine) (b) の構造および DLS 測定法による dendrimer porphyrin 内包ミセルの直径分布 (c).
(文献 47 より許可を得て転載)

クターとして機能すること²⁴⁾³⁷⁾³⁸⁾などが示されており、CNV への効果的薬物送達を実現する大きな可能性をもつと考えられる。次項では、薬物として光増感剤を内包する高分子ミセルを調製し、PDT への応用を試みた。

2. 高分子ミセルを用いた PDT

PDT は、光増感剤を投与後に標的組織である CNV や悪性腫瘍に到達させ、適切な波長のレーザー照射により、一重項酸素のような活性酸素を生じ標的組織の酸化破壊をもたらすことを利用した治療法である³⁹⁾。PDT に用いられる最も標準的な光増感剤は、吸収断面積を拡大する大きな π 結合領域をもち、基本的には疎水性である。そのため光増感剤は水溶液中でその π - π 相互作用と疎水性の性質のため容易に凝集し励起状態から自己消光する。PDT の効果をより増強するためには、光増感剤の効果的な標的組織への送達と、一重項酸素の高濃度の生成の両方が非常に重要である。すなわち、AMD に対する PDT の効果を高めるためには、光増感剤を CNV 領域へ選択的に送達することと、CNV 領域での効果的な光力学反応を惹起することの両方が必要であり、両条件を満たす新規光増感剤の開発が強く望まれ

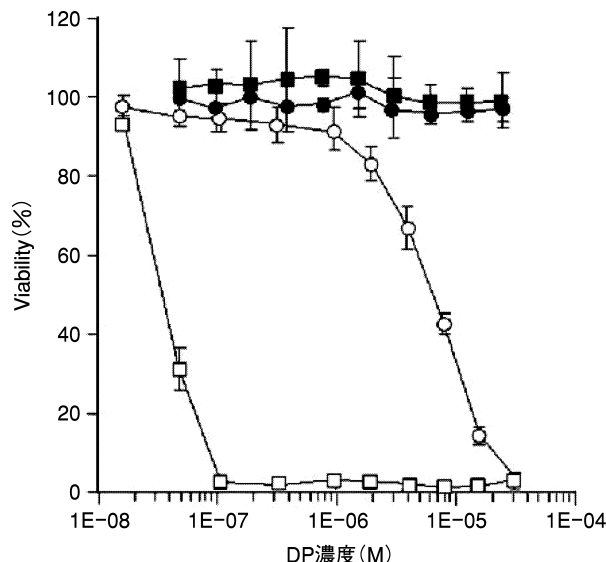


図 7 Dendrimer porphyrin (DP) および DP 内包ミセルの培養 Lewis lung carcinoma 細胞に対する光線照射時および非照射時の細胞毒性。
暗所では DP (●) も DP 内包ミセル (■) も細胞毒性を示さなかった。光線照射下では DP (○) および DP 内包ミセル (□) の両方が強い細胞毒性を示したが、高分子ミセルに内包することによって DP の光毒性は 280 倍に増加した。図中の表示は平均値 ± 標準偏差 (n = 4) を示す。(文献 47 より許可を得て転載)

る。樹状光増感剤である dendrimer porphyrin (DP)^{40)~42)} はポルフィリンが第三世代の poly(benzyl ether) デンドリマーで周囲を囲まれたものである⁴³⁾(図 6 a)。従来の光増感剤と異なり、DP は樹状の側鎖部分(dendron)がカプセル効果により中心分子(core)であるポルフィリンの凝集を妨げるので、非常に高濃度の状態でも一重項酸素の生成を可能とする⁴⁴⁾。また、DP の 32 の負電荷はブロック共重合体 poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine) [PEG-b-P(Lys)]³¹⁾⁴⁵⁾(図 6 b) の正電荷との静電相互作用により、前項で述べた高分子キャリア PIC ミセル⁴⁶⁾への安定した内包が可能である。この DP を内包した高分子ミセルは、EPR 効果により CNV への選択的送達が可能であると考えられる。本項においては、この DP 内包ミセルの CNV に対する選択的集積および光力学効果について検討した。

1) DP 内包ミセルの調製および *in vitro* における光毒性

32 個のカルボキシレート(カルボン酸塩)末端基を有する負に帯電した第三世代のイオン性 DP、および PEG-b-P(Lys) は、既報³¹⁾のごとく調製した。PEG-b-P(Lys) は、 NaH_2PO_4 水溶液 (10 mM, pH = 4.95) に溶解させ、DP 含有ミセルを含む溶液 (10 mM, pH = 7.30) を得るために $\text{NaH}_2\text{PO}_4/0.1 \text{ N NaOH}$ (10 mM Na_2HPO_4 , pH = 11.54) DP 水溶液に加え。ここで、カルボキシレート(カルボン酸塩)末端基とリシン残基の

モル比は、一致するよう調製した。この DP 内包ミセルは、単峰形のサイズ分布を示した(図 6 c)。まず、DP と DP 内包ミセルの光線照射により誘導される細胞毒性を Lewis lung carcinoma 細胞を用いて *in vitro* で評価した。暗所では DP も DP 内包ミセルも細胞毒性を示さなかった。光線照射下では DP および DP 内包ミセルの両方が強い細胞毒性を示したが、高分子ミセルに内包することによって DP の光毒性は 280 倍に増加した⁴⁷⁾(図 7)。

2) DP 内包ミセルの CNV への集積

DP 内包ミセルの CNV への集積を検討するために、先に述べた方法³²⁾³³⁾で、BN ラット 16 匹の 1 眼につき 4 箇所レーザー光凝固を施行し CNV を作製した。尾静脈より、1.5 mg/ml の DP を含有する DP 内包ミセル 400 μ l、および 1.5 mg/ml の DP 400 μ l をレーザー光凝固 7 日後に投与した。ペントバルビタールナトリウム過量投与により屠殺し、直後に眼球摘出し、15 分、1、4、24 時間後に optimal cutting temperature(OCT) compound に凍結した。凍結切片は ProLong Antifade Kit (Molecular Probes, Eugene 社)を用いてマウントし、蛍光顕微鏡(model IX, オリパス社)を用いて観察した。DP 内包ミセル投与群では、CNV への集積は 15 分後には既にみられ、4 時間後にピークとなり、24 時間後でも明らかな集積がみられた(図 8 a~c)。さらに、凍結切片を FITC-conjugated 抗第 VIII 因子抗体(Dako Cytomation 社)で染色したところ、DP 内包ミセル投与群では DP は抗第 VIII 因子抗体陽性の血管内皮細胞に局在していた(図 8 f)。これに対し、freeDP 投与群では、DP の CNV への集積は 4 時間後までみられたが(図 8 d, e)、24 時間以内に消失し、DP 内包ミセル投与群に比して、抗第 VIII 因子抗体陽性の血管内皮細胞内のみならず、内皮細胞外にもみられた⁴⁷⁾(図 8 g)。よって、DP のミセル化は抗第 VIII 因子抗体陽性の CNV 血管内皮細胞への送達に非常に有用であり、これにより効率的な PDT が可能となり得ると考えられる。

3) DP 内包ミセルによる PDT の CNV 閉塞効果

次に、DP 内包ミセルによる PDT の CNV 閉塞効果について検討した。前項と同様に CNV モデルラットを作製し、対照群は無処置、freeDP 投与群および DP 内包ミセル投与群では、それぞれミセル化していない freeDP および DP 内包ミセルを静注し、15 分後に試作レーザー装置を用いて PDT(波長 438 nm, 出力密度 600 mW/cm², 照射径 1,120 μ m, 照射量 0, 5, 10, 25, 50, 100 J/cm²)を行った。CNV 閉塞率は PDT 施行 1 日および 7 日後にフルオレセイン蛍光眼底造影を行い評価した。対照群と同様に freeDP 投与群では CNV に一致した過蛍光を認めるが、DP 内包ミセル投与群では PDT により CNV の過蛍光が消失していた(図 9 a)。PDT 1 日後には、DP 内包ミセル投与群では対照群および freeDP 投与群に比べ、5~100 J/cm²のいずれの

照射条件においても CNV 閉塞率が有意に高くなっていた(図 10 a)。PDT 7 日後においてもこの傾向は持続しており、やはり DP ミセル投与群では 5~100 J/cm²のいずれの照射条件においても CNV 閉塞率が有意に高くなっていた⁴⁷⁾(図 10 b)。今回の実験は、verteporfin によるラット CNV 閉塞率を検討した Zacks らの報告⁴⁸⁾とほぼ同一条件で行ったので、両者を比較したところ、臨床での PDT のレーザー照射量 50 J/cm²では、DP 内包ミセルによる CNV 閉塞率は、verteporfin よりも高く、PDT 7 日後には、verteporfin 投与では 36% と 1 日後よりも低下していたのに対し、DP 内包ミセル投与では 83% と維持されていた。他の照射量でも同様に、DP 内包ミセル投与では臨床の 10 分の 1 の照射量である 5 J/cm²においても、7 日後まで 81% と高い閉塞率が維持されていた。これらの結果より、DP 内包ミセルは、verteporfin よりも、PDT 後に高効率かつ持続的な CNV 閉塞が得られる可能性があることが示唆された。

さらに、免疫組織化学的検討により、DP 内包ミセル投与群では、無処置の対照と比較して、PDT により抗第 VIII 因子抗体陽性の CNV 血管内皮細胞の欠落が認められた(図 9 b, c)。透過電子顕微鏡による観察では、CNV の血管は、一部は血管内皮細胞が消失した collagen tubes となっており、また一部は赤血球により閉塞していた⁴⁷⁾(図 9 d)。すなわち、DP 内包ミセル投与後 PDT により CNV が閉塞した結果、CNV 内皮の欠落が生じたと考えられた。また、DP 内包ミセル投与後 PDT を行ったにもかかわらず、正常脈絡膜および網膜血管内皮の欠落は認められなかった。このことは、DP 内包ミセルおよび freeDP のいずれも正常な網脈絡膜血管の血管内皮細胞には取り込まれないことによると推測される。このように、DP 内包ミセルを用いた PDT は、CNV 閉塞効率は高いのみならず、正常な網脈絡膜血管に対する障害が少ないことが示された。

4) DP 内包ミセルによる PDT の正常網脈絡膜および皮膚に及ぼす影響

PDT の治療後には、一過性の視力低下が起こり得ることが知られており、海外の臨床試験では、PDT 後に視覚障害(視力低下、視野欠損、中心部の暗黒感)を生じた割合が約 18%⁷⁾、JAT Study においても 22%¹⁰⁾と報告されている。また、PDT 後早期には、一過性に黄斑部局所網膜電図(electroretinogram, ERG)の振幅が低下することも報告されている^{49)~51)}。Lai 等⁵¹⁾は、PDT 後 4 日、2 週、1 か月に多局所 ERG を記録し、PDT 後 2 週目までは一過性に PDT 照射部位の N 1, P 1 応答振幅が低下し、1 か月後には回復することを報告し、その原因の一つとして PDT そのものによる正常な網膜機能への影響を挙げている。このように、verteporfin による PDT 後早期には一過性の網脈絡膜障害が生じることより、正常網脈絡膜に対する障害の少ない PDT が可

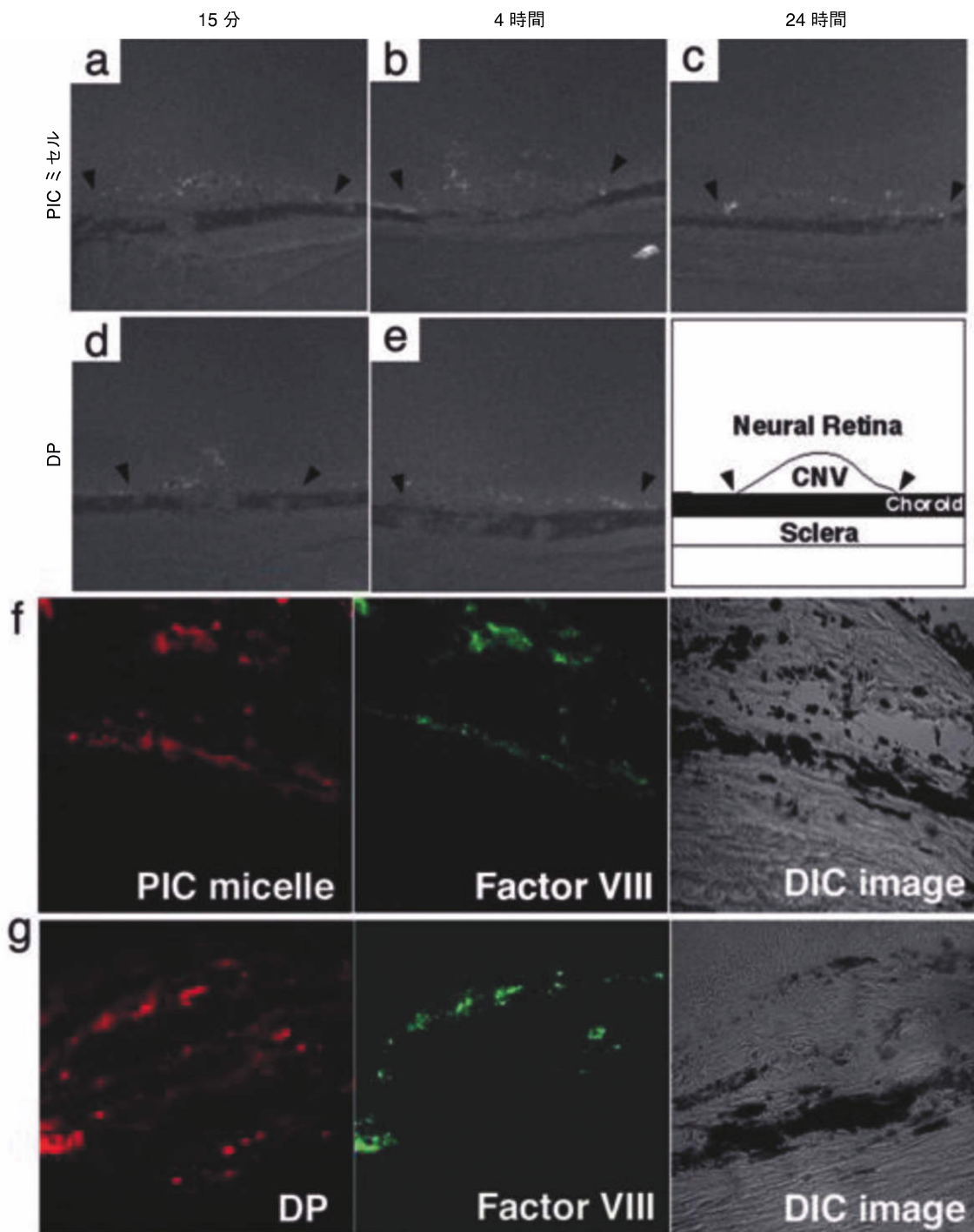


図 8 DP および DP 内包 PIC ミセル投与時の DP の CNV への集積.

DP 内包ミセル投与群では、CNV への集積は 15 分後には既にみられ、4 時間後にピークとなり、24 時間後でも明らかな集積がみられた(a~c)。DP 内包ミセル投与群では DP は抗第VIII因子抗体陽性の血管内皮細胞に局在していた(f)。これに対し、freeDP 投与群では、DP の CNV への集積は 4 時間後までみられたが(d, e)、24 時間以内に消失し、DP 内包ミセル投与群に比して、抗第VIII因子抗体陽性の血管内皮細胞内のみならず、内皮細胞外にもみられた(g)。(文献 47 より許可を得て転載)

能となれば、臨床的により有用と考えられる。そこで、サルを用い verteporfin および DP 内包ミセルを用いた PDT を行い、正常網脈絡膜に及ぼす影響について比較検討した。

正常なアカゲザル(体重 5.5~6.0 kg)を用いて、ver-

teporfin 群では verteporfin を体表面積(m²)あたり 6 mg を 10 分かけて経静脈的に投与し、15 分後に PDT を臨床と同一条件(波長 689 nm, スポットサイズ 5,000 μm, 照射量 50 J/cm²)で行った。DP 内包ミセル群でも、DP 内包ミセル 6.0 mg/m²を投与し、波長 437 nm

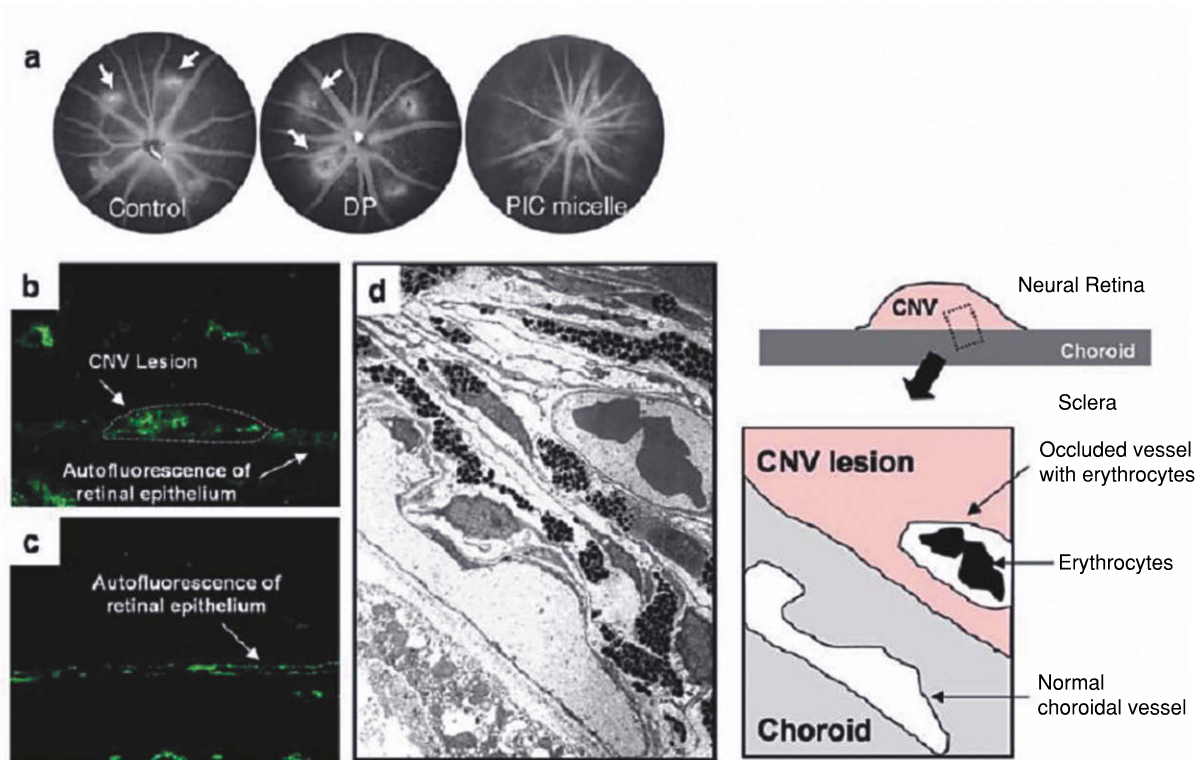


図 9 DP 内包ミセルによる光線力学療法(PDT)の CNV 閉塞効果。

フルオレセイン蛍光眼底造影において、対照群と同様に freeDP 投与群では CNV に一致した過蛍光(矢印)を認めるが、DP 内包ミセル投与群では PDT により CNV の過蛍光が消失していた(a)。DP ミセル投与群では、無処置の対照(b)と比較して、PDT により抗第Ⅷ因子抗体陽性の CNV 血管内皮細胞は欠落が認められた(c)。透過電子顕微鏡による観察では、CNV の血管は、一部は血管内皮細胞が消失した collagen tubes となっており、また一部は赤血球により閉塞していた(d)。 (文献 47 より許可を得て転載)

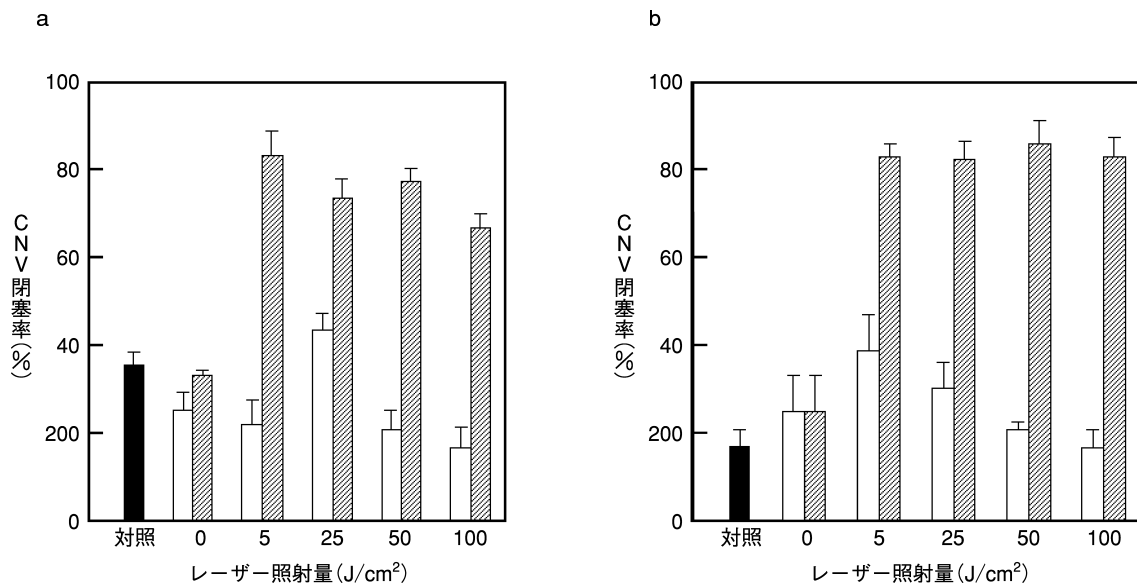


図 10 DP 内包ミセルによる PDT 1 日(a)および 7 日後(b)の CNV 閉塞率。

PDT 1 日後には、DP 内包ミセル投与群では対照群および freeDP 投与群に比べ、5~100 J/cm²のいずれの照射条件においても CNV 閉塞率が有意に高くなっていった(a)。PDT 7 日後においてもこの傾向は持続しており、やはり DP 内包ミセル投与群では CNV 閉塞率が有意に高くなっていった(b)。図中の表示は平均値±標準偏差を示す。□: freeDP 投与群, ▨: DP 内包ミセル投与群。

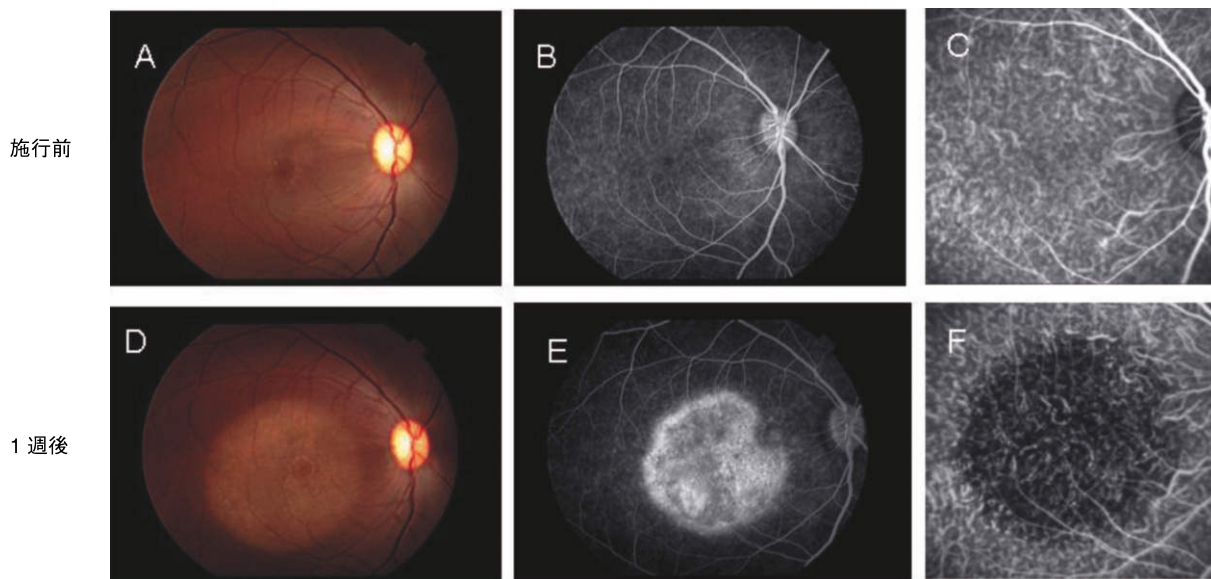


図 11 Verteporfin による PDT 施行前(A, B, C)および1週間後(D, E, F)のサル眼底, フルオレセイン蛍光眼底造影およびインドシアニングリーン蛍光眼底造影。
 PDT 1 週間後には, PDT 照射部位に一致して網膜深層に白濁変化がみられる(D)。さらにフルオレセイン蛍光眼底造影(造影3分)では, レーザー照射部位に一致して window defect による過蛍光がみられ(E), インドシアニングリーン蛍光眼底造影(造影5分)では, 照射部位に一致して, filling defect による低蛍光がみられ, 照射部位の脈絡膜毛細血管板は多くの部位で閉塞していた(F)。

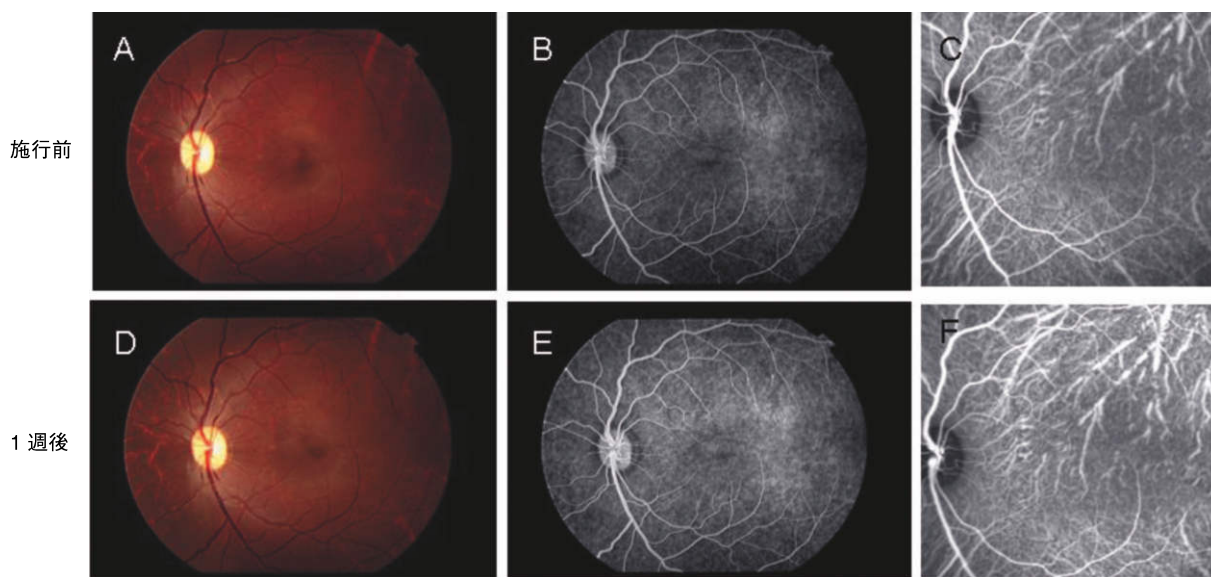


図 12 DP 内包ミセルによる PDT 施行前(A, B, C)および施行1週間後(D, E, F)のサル眼底, フルオレセイン蛍光眼底造影およびインドシアニンググリーン蛍光眼底造影。
 DP 内包ミセルによる PDT 施行1週間後の眼底(D), フルオレセイン蛍光眼底造影(E)およびインドシアニンググリーン蛍光眼底造影(F)は, 施行前(A, B, C)とそれぞれ変化がみられなかった。

のレーザーを用いた以外は verteporfin 群と同一条件で PDT を行った。両群ともに PDT 施行前および1週間後に, 眼底検査, フルオレセイン蛍光眼底造影およびインドシアニンググリーン蛍光眼底造影を行った。図 11 に PDT 前および1週間後における眼底写真を示す。過去のサルを用いた動物実験の結果^{52)~54)}と同様, PDT 照射部位に一致して網膜深層に白濁変化がみられている(図 11

D)。さらにフルオレセイン蛍光眼底造影(造影3分)では, レーザー照射部位に一致して window defect による過蛍光がみられ, RPE の障害が起こっていると考えられる(図 11 E)。インドシアニンググリーン蛍光眼底造影(造影5分)では, 照射部位に一致して, filling defect による低蛍光がみられ照射部位の脈絡膜毛細血管板は多くの部位で閉塞していた(図 11 F)。これらの所見より,

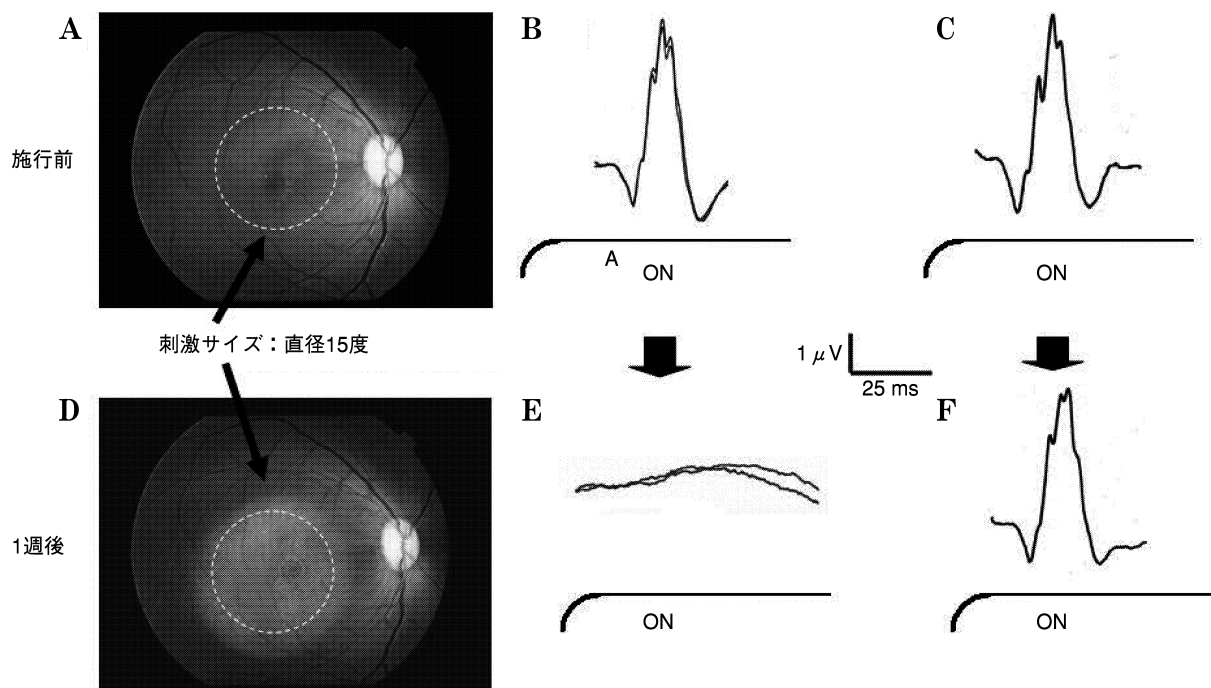


図 13 Verteporfin または DP 内包ミセルによる PDT 前, 1 週後の黄斑部局所網膜電図(ERG).

黄斑部局所 ERG は刺激サイズ直径 15 度とし, PDT 施行前(A)および 1 週後(D)に行った。PDT 前のサル黄斑部からは正常な黄斑部局所 ERG が記録されており, a 波, b 波, 律動様小波が明瞭に記録された(B, C)。Verteporfin 群投与では, PDT 1 週後の b 波振幅は施行前の 7% と, 大幅に減弱していた(E)。一方, DP 内包ミセル投与群では, 黄斑部局所 ERG の波形は PDT 前後で変化がみられなかった(F)。

PDT が正常な脈絡膜毛細血管板の閉塞を来し, その結果として RPE の障害を惹起したものと考えられる。これに対し, DP 内包ミセルによる PDT 施行 1 週後の眼底, フルオレセイン蛍光眼底造影およびインドシアニンググリーン蛍光眼底造影所見は, いずれも施行前と変化がみられなかった(図 12 A~F)。DP 内包ミセルによる PDT は verteporfin による PDT と比較して, サルの正常 RPE や脈絡膜血管にほとんど影響を与えないことが分かった。さらに, verteporfin および DP 内包ミセルによる PDT 前, 1 週後の黄斑部機能に及ぼす影響について, 黄斑部局所 ERG による検討を行った。黄斑部局所 ERG は刺激サイズ直径 15 度とし, PDT 施行前および 1 週後に行った。PDT 前のサル黄斑部からは正常な黄斑部局所 ERG が記録されており, a 波, b 波, 律動様小波が明瞭に記録された(図 13 B, C)。Verteporfin 投与群では, PDT 1 週後の b 波振幅は施行前の 7% と, 大幅に減弱していた(図 13 E)。この結果は Tzekov ら⁵⁴⁾のカニクイザルでの同様の検討結果と類似している。一方, DP 内包ミセル投与群では, 黄斑部局所 ERG の波形は PDT 前後で変化がみられなかった(図 13 F)。

以上より, verteporfin による PDT は正常な脈絡膜毛細血管板の閉塞を来すことにより同部位の網膜機能を低下させ, これが臨床でみられる PDT 後の一過性視機能障害の原因となっていることが示唆されるが, DP 内

包ミセルを用いた PDT では, verteporfin による PDT と比べて CNV 閉塞効果が高いのみならず, 正常な脈絡膜循環および黄斑部網膜機能に及ぼす影響も少ないことが示された。

さらに, DP 内包ミセルの皮膚に対する光毒性について検討するため, DP 内包ミセルおよび市販の光増感剤である polyhematoporphyrin(Photofrin[®])を各 1.5 mg/ml 溶液 400 μ l 静注し, 4 時間後に Xenon lamp(波長 377~700 nm, 30 mW/cm²)を背部を剃毛したラットに 10 分間照射したところ, DP 内包ミセル投与群では肉眼的に炎症反応など皮膚障害がみられなかった(図 14 A)のに対し, polyhematoporphyrin 投与群では, 全例において光照射 1 日後には既に炎症反応が認められ, 照射 10 日後においても強い皮膚障害が観察された⁴⁷⁾(図 14 B)。

以上, デンドリマー型光増感剤およびミセルを用いた CNV に対する PDT について述べた。DP 内包ミセルにより CNV への DP の高い集積性が得られ, より低いエネルギー照射による CNV 閉塞が可能となった。これは, デンドリマー化によって core に位置するポルフィリンが高濃度においても凝集しないという性質によると推察される。DP 内包ミセルを用いた PDT は, CNV 閉塞効率が高く, 正常な網脈絡膜血管や皮膚に対する障害も少ないことが示された。デンドリマー型光増感剤とそのミセル化は CNV に対する PDT において非常に有

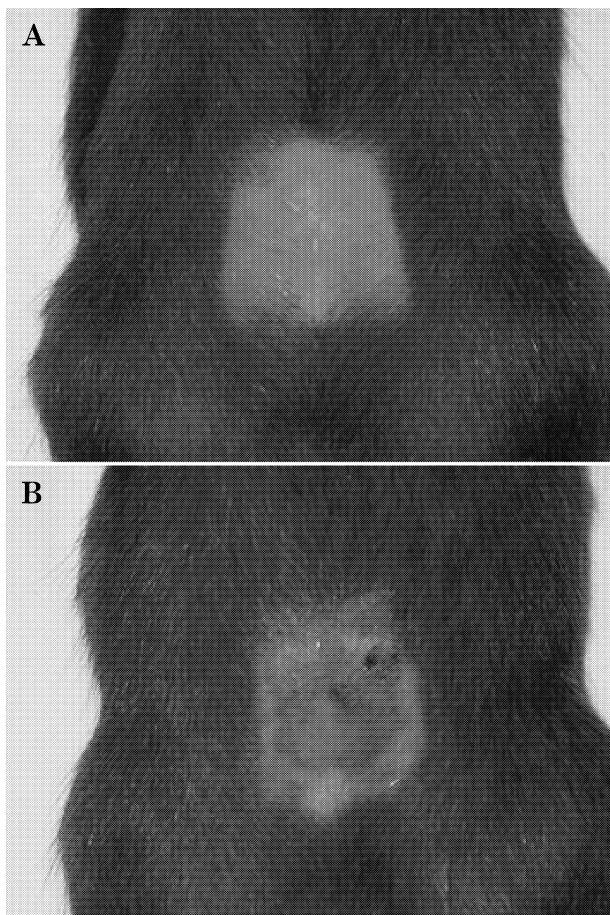


図 14 DP 内包ミセルの皮膚に対する光毒性。

DP 内包ミセルおよび polyhematoporphyrin を各 1.5 mg/ml 溶液 400 μ l 静注し、4 時間後に Xenon lamp (波長 377~700 nm, 30 mW/cm²) を背部を剃毛したラットに 10 分間照射したところ、DP 内包ミセル投与群では肉眼的に炎症反応など皮膚障害がみられなかった(A)のに対し、polyhematoporphyrin 投与群では、全例において光照射 1 日後には既に炎症反応が認められ、照射 10 日後においても強い皮膚障害が観察された(B)。(文献 47 より許可を得て転載)

用であることが強く示唆された。

III 新規三元型コンプレックスによる 光応答性遺伝子導入法の開発

AMD に対する現在臨床試験段階(一部は既に承認済み)にある新規の抗血管新生療法として、pegaptanib (Macugen[®])¹¹⁾, ranibizumab (Lucentis[®])¹²⁾, anecortave acetate (Retaane[®])¹³⁾ などの薬物療法および遺伝子治療がある。AMD の遺伝子治療としては、米国で AdPEDF program が開始され、滲出型 AMD 患者 28 名を対象とし、pigment epithelium-derived factor (PEDF) を発現するアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療で、phase I study では重篤な合併症はみられず、CNV を抑制する可能性あることが報告されている¹⁴⁾。遺伝子治療における遺伝子導入法は、体外(ex vivo)法

と体内(in vivo)法に大別されるが、前者は標的細胞を体外に取り出すことができる場合に限定されるのに対し、後者は対象疾患が広範であり、これを可能にする体内直接投与型のベクターの開発が強く望まれている。In vivo における遺伝子導入法は AdPEDF program のようにウイルスベクターを用いる方法と、非ウイルスベクターを用いる方法に大別される。ウイルスベクターは、遺伝子導入効率は高く、これまで汎用されてきたが、近年のウイルスベクターによる事故にみられるように安全性の問題や、免疫反応の惹起や取り扱いが困難であるなど、その実用化には未だ解決すべき問題も多い。一方、カチオン性高分子などを構成要素とする非ウイルスベクターは、安全性や製剤性には優れるが、遺伝子導入効率が低く、かつ遺伝子導入に伴い細胞毒性が惹起されるなど in vivo での遺伝子導入に使用することは困難である。また、ウイルスベクター、非ウイルスベクターいずれの場合においても、遺伝子の導入部位(例えば CNV に限局的に導入すること)と発現時期を厳密に制御することは困難である。したがって、遺伝子治療を行うには、生体内で標的細胞に、導入効率が高く、かつ選択的に治療遺伝子を導入できる人工的非ウイルスベクターが開発できれば理想的と考えられる。前項では滲出型 AMD の治療法のうちで、現在の治療の中心である PDT について新規の dendriamer 型光増感剤内包ミセルを用いた方法について述べたが、本項では、この dendriamer 型光増感剤を用いた遺伝子導入法について検討した。

非ウイルスベクターとして、カチオン性ポリソームを用いたリポフェクション法が、in vitro における遺伝子導入法として汎用されているが、in vivo 法には適していない。一方、カチオン性高分子と DNA から形成されるポリイオンコンプレックスを基盤とした非ウイルスベクターであるポリプレックスは、比較的高い安定性を有しており、in vivo 法に適用可能なキャリアシステムとして期待されているが、遺伝子発現効率が低く、実用化にはその向上が必要である。ポリプレックスは、遺伝子発現に至るまでに、① エンドサイトーシスを介した標的細胞による取り込み、② エンドソームから細胞質への移行、③ 細胞質から核への移行、を経由すると考えられる。これらすべての過程は、効率的な遺伝子導入を達成するために重要であるが、とりわけ、② の過程を促進することでポリプレックスの遺伝子導入効率は大幅に向上する。例えば、カチオン性高分子として知られる polyethylenimine (PEI) から形成されたポリプレックスは、エンドソーム内の pH 低下を抑制するとともに、高分子自身のプロトン化に伴うエンドソーム内のイオン浸透圧の上昇によりエンドソーム膜を脆弱化もしくは破壊することが示唆されており(プロトンスポンジ効果)、効率的に細胞質内に移行することで、比較的高い遺伝子

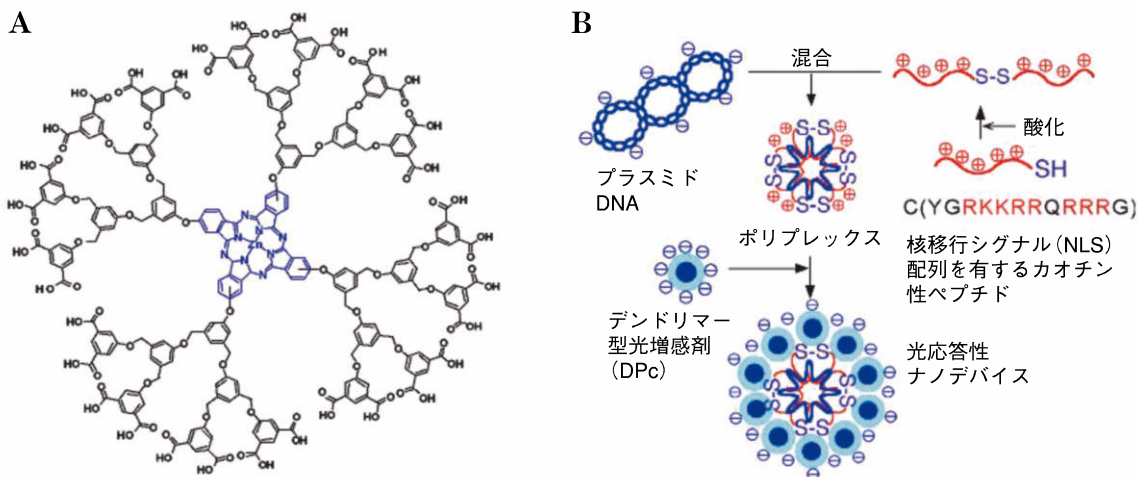


図 15 光応答性ナノデバイス調製。

プラスミド DNA が核移行シグナル配列(NLS)を有するカチオン性ペプチドにより凝縮されたポリプレックス内核が、 dendrimer の外殻に覆われた構造を有する光応答性ナノデバイスを開発した。(文献 59 より許可を得て改変転載)

発現活性を示すことが報告されている⁵⁵⁾。Högsetらは上述の②の過程を光照射により促進する技術として、photochemical internalization (PCI)を開発した⁵⁶⁾⁵⁷⁾。PCIは、ポリプレックスと同時にエンドソーム膜集積性の光増感剤を細胞に作用させ、光照射下で光増感剤より産生される一重項酸素の酸化反応によって、エンドソーム膜を障害することにより達成される。実際に、*in vitro*において、PCIを利用することで、ポリプレックスの遺伝子発現活性が光照射により顕著に向上することが報告されている⁵⁶⁾⁵⁷⁾。しかし、この方法では、光照射によりポリプレックスの遺伝子発現が上昇するとともに、光増感剤から産生された一重項酸素による細胞毒性が高く⁵⁶⁾⁵⁷⁾、*in vivo*法への応用は困難であった。このPCIを*in vivo*法に應用するには、光増感剤による細胞毒性を回避することが必要である。一般に、エンドソーム/リソソーム膜に対する光障害は細胞にとって致命的なダメージとなりにくいことから⁵⁸⁾、光障害のエンドソーム膜に対する選択性を高めることで細胞毒性は回避できるものと考えられる。今回、プラスミドDNA (pDNA)が核移行シグナル配列(nuclear localization sequence; NLS)を有するカチオン性ペプチド(cationic peptide; CP)により凝縮されたポリプレックス内核 pDNA/CP₄が、 dendrimer の外殻に覆われた構造を有する光応答性ナノデバイスを開発した⁵⁹⁾(図 15)。ここで使用した dendrimer (dendrimer phthalocyanine; DPc)は、その中心にフタロシアニン色素を有しており、680 nmの可視光励起により、一重項酸素を産生する。この光応答性ナノデバイス pDNA/CP₄/DPcは、分布の狭い、約100 nmの粒径をもったナノ粒子を形成することが確認された。この光応答性ナノデバイス pDNA/CP₄/DPcは、遺伝子発現に至るまでに以下の過程を経るものと考え

えられる(図 16)。①細胞外環境では、DPcはDNA/ペプチド複合体(pDNA/CP₄)の表面に静電的に結合し、三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPcがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。②エンドソーム内の低pH環境下(pH 5.5)で、DPcが疎水化し、DNA/ペプチド複合体から解離する一方で、エンドソーム膜と相互作用する。③光照射によって、DPcは、エンドソーム膜特異的に光障害を惹起し、DNA/ペプチド複合体が細胞質内に移行する。④カチオン性ペプチドに導入したジスルフィド結合が細胞質内の還元的环境下で開裂することによりDNA/ペプチド複合体が遺伝子発現しやすい脱凝縮状態となり、ペプチド配列中のNLSによってDNA/ペプチド複合体が核内に能動輸送される。このように、三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPcはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソーム内でコンプレックスが解離し、DPcは光照射下でエンドソーム選択的な光障害を与えることにより、コンプレックスがエンドソームを脱出する。DPcはエンドソーム膜のみに分布しているため、エンドソーム脱出に必要なエンドソーム膜への光障害は起こるが、従来の方法でみられたような他の部位での細胞障害は起こらず、効率的な遺伝子導入が可能となると考えられる。

まず、*in vitro*における三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPcの遺伝子発現効率および光毒性について検討した。培養 HeLa 細胞(10,000 cells)に、luciferase 発現 pDNA 1 μg を内包する三元系コンプレックスを添加し、6時間培養後に、400~700 nmの band-pass フィルターを装着した 300 W ハロゲンランプを光源として光照射(照射量 3.6 J/cm²)を行って、48時間後に luciferase assay により遺伝子発現量を、3-(4,5-dimethyl

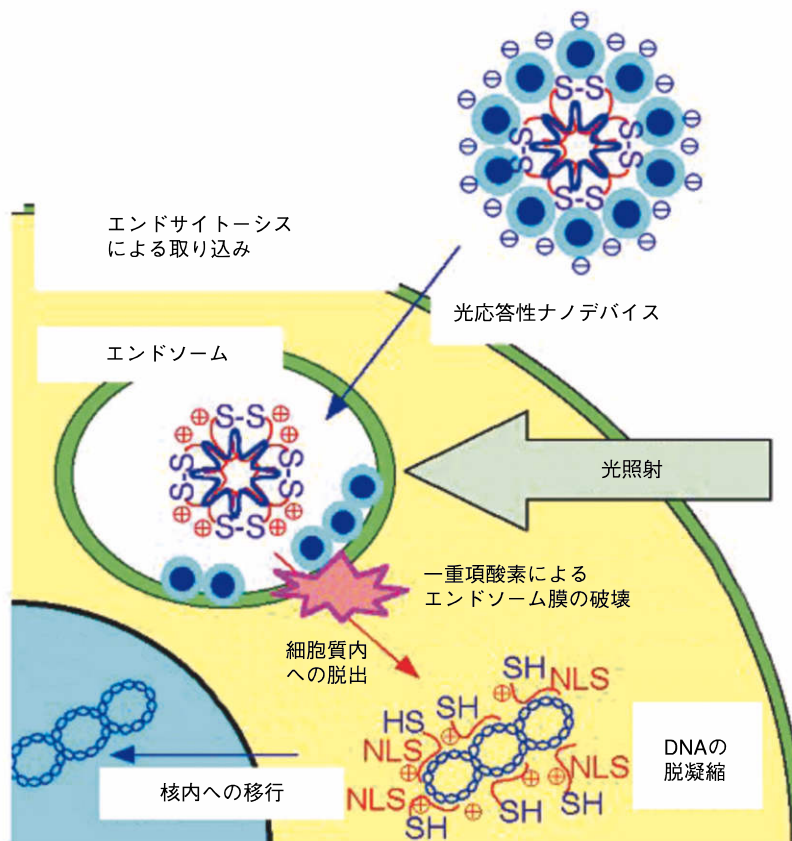


図 16 新規三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc の光照射による遺伝子発現のメカニズム。
三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソーム内でコンプレックスが解離し、DPc は光照射下でエンドソーム選択的な光障害を与えることにより、コンプレックス pDNA/CP₄ がエンドソームを脱出する。DPc はエンドソーム膜のみに分布しているため、エンドソーム脱出に必要なエンドソーム膜への光障害は起こるが、他の部位での細胞障害は起こらず、効率的な遺伝子導入が可能となる。(文献 59 より許可を得て改変転載)

thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay により細胞生存率をそれぞれ測定した。三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc の遺伝子発現量は光照射時には、光非照射時の 200 倍以上となった。細胞生存率は pDNA/PEI の約 5 倍と高く、また光照射により低下はみられなかった⁵⁹⁾(図 17)。新規三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc は光照射により非照射時の 200 倍以上の高い遺伝子発現が得られ、かつ細胞毒性の低い、非常に有用な遺伝子導入法であることが示された。

次に、ラットを用いて結膜への光応答性遺伝子導入を試みた(図 18)。結膜下に蛍光物質である yellow fluorescent protein (YFP) 発現 pDNA 15 μg を含有する三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc を注入し、2 時間後に PDT 用レーザー(波長 689 nm, レーザー出力 2.0 mW, 照射径 4 mm, 照射時間 60 秒, レーザー照射量 1 J/cm²)を照射した。レーザー照射 2 日後に実体顕微鏡で蛍光を観察したところ、レーザー照射部位のみに遺伝子導入した蛍光蛋白質の発現が認められ、新規三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc により、レーザー照射部位選択的に遺伝子導入が可能であることが分かっ

た。経時的に観察すると、2 日後には 12 眼中 8 眼に強い蛍光が認められたが、その後減衰して 5 日後には 12 眼中 4 眼に弱い蛍光が認められるにとどまり、7 日後には 12 眼中 1 眼も蛍光は認められなかった。さらに、PDT 2 日後の結膜組織の凍結切片を作製し、Hoechst 33342 で核染色したうえで、蛍光顕微鏡で観察したところ、結膜上皮細胞に YFP 遺伝子が導入されていることが組織学的にも確認された⁵⁹⁾(図 18)。このように、三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc を用いて、*in vivo* で光線照射部位特異的に遺伝子導入が可能であることが分かった。これは、動物実験で光による部位選択的遺伝子導入に成功した世界で初めての研究例である。

以上、デンドリマー型光増感剤を用いた新規三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc による光応答性遺伝子導入について検討した結果、培養 HeLa 細胞において、低光毒性かつ高導入効率の光応答性遺伝子導入が得られた。ラット結膜組織においても、PDT レーザー照射部位特異的に遺伝子導入が認められた。以上より、新規三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc は、光線照射により眼組織への遺伝子導入を制御可能な遺伝子キャリア

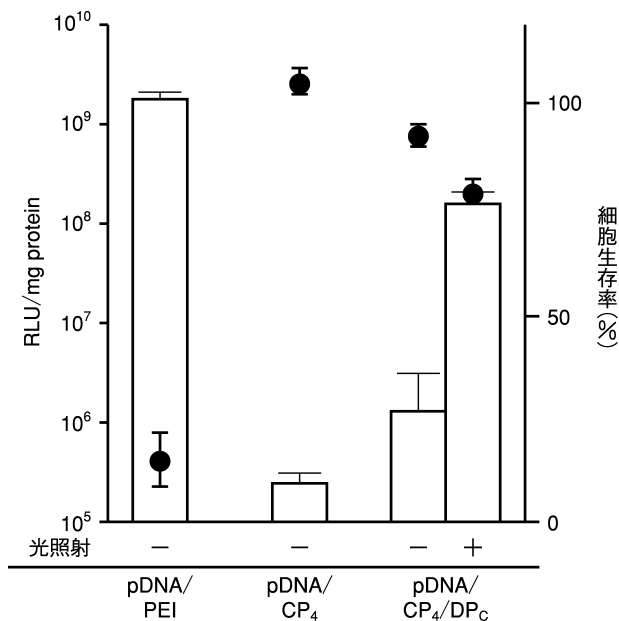


図 17 *In vitro* における三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DP_c の遺伝子発現効率および光毒性。

培養 HeLa 細胞(10,000 cells)に, luciferase 発現 plasmid DNA 1 μg を内包する三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DP_c を添加し, 6 時間培養後に 3.6 J/cm² の照射を行って, 48 時間後に luciferase assay により遺伝子発現量(棒グラフ)を, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay により細胞生存率(丸印)をそれぞれ測定した. 三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DP_c の遺伝子発現量は照射時には, 非照射時および pDNA/CP₄ 投与時の 200 倍以上となった. 細胞生存率は pDNA/PEI の約 5 倍と高く, また照射により低下はみられなかった. 図中の表示は平均値±標準偏差(n=4)を示す.

となり得ることが分かった. このシステムは, 新規三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DP_c を投与後に, PDT と同様にレーザーを CNV 領域に照射することによって, CNV への選択的遺伝子導入法として AMD 治療に応用できる可能性があり, 現在ベクターを改良し検討中である.

IV リポスチン構成成分 A2E と CNV 発生

AMD の病因は未だ明らかではない. 加齢に伴う網脈絡膜の interface の変化⁶⁰⁾に, 何らかの因子, すなわち血管新生調節因子^{61)~63)}や細胞外基質の異常⁶⁴⁾⁶⁵⁾, 慢性炎症⁶⁶⁾, 酸化ストレス⁶⁷⁾に加え, 喫煙などの環境因子⁶⁸⁾や遺伝的因子^{69)~72)}が関与して CNV の発生を惹起して発症すると考えられている. 現在の滲出型 AMD に対する標準的治療法である PDT^{7)~9)}や, 現在開発中および欧米で認可されつつある抗血管新生薬^{11)~13)}は, 既に発生した CNV に対する治療法である. 米国で行われた臨床試験(Age-Related Eye Disease Study; AREDS)

では, 平均 6.3 年後にビタミン C, E, βカロチンの酸化ビタミン剤および亜鉛を平均 6.3 年大量内服した非喫煙者群において CNV の発症が抑制されたことが報告された⁷³⁾. この事実は AMD の発症には, 酸化ストレスがかかっていることを裏付けるとともに, CNV の発生要因が明らかとなれば, その要因をターゲットとして CNV の発生すなわち滲出型 AMD の発症を効率的に予防し, 視機能の維持が期待できることを臨床的に示したものである.

RPE へのリポスチンの沈着は滲出型 AMD の前駆病変と考えられている⁷⁴⁾が, その機序は明らかではない. 本項ではリポスチンの構成成分である A2E(N-retinyleidin-N-retinylethanolamin, 図 19)に着目し, A2E の CNV 発生への関与, およびそのメカニズムについて検討し, A2E が滲出型 AMD 発症予防のターゲットになり得るか否かについて検討した. リポスチンの構成成分の一つである A2E は, detergent としてライソゾームの機能を阻害し, また光感受性物質として作用して RPE 細胞毒性をもたらすことが報告されている^{67)75)~80)}. しかし, A2E が, 滲出型 AMD における CNV の発生にどのように関与しているか否かについては明らかではない. そこで, A2E が CNV 発生に関与するか否かを検討するために, まず, A2E の生理活性について, 核内受容体の転写活性に及ぼす影響について検討した. 次に, ヒト RPE 培養細胞である ARPE-19 細胞を用いて A2E が血管新生促進因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) および hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) に及ぼす影響について *in vitro* で検討した. さらに, ラット網膜下に A2E を注入し, その CNV 発生に及ぼす影響を *in vivo* で検討した.

A2E の各種核内受容体の転写活性に及ぼす影響について, ヒト腎細胞である Hec293 細胞を用い luciferase assay により検討した. A2E は核内受容体 RARα (retinoic acid receptor α), RXRα (retinoid X receptor α), PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), FXR (farnesoid X receptor), PNR (photoreceptor cell-specific nuclear receptor) のうち, RARα のみを活性化した. この結果は, A2E が RARα の新規のリガンドである可能性を示唆する. そこで, A2E が RARα の新規のリガンドであるか否かについて以下の検討を行った. まず, GST-RAR 蛋白質を合成し, チミジンで標識した RARα の既知のリガンドである all-trans retinoic acid (atRA) の一定濃度存在下で, A2E を添加し, RAR と結合した atRA の放射線量を計測して atRA の結合割合を測定する competition assay により, RARα に A2E が直接結合するか否かについて検討した. A2E の添加濃度上昇とともに atRA の結合割合は sigmoid curve 状に下降することにより, A2E が atRA と拮抗し, RARα に直接結合することが示され

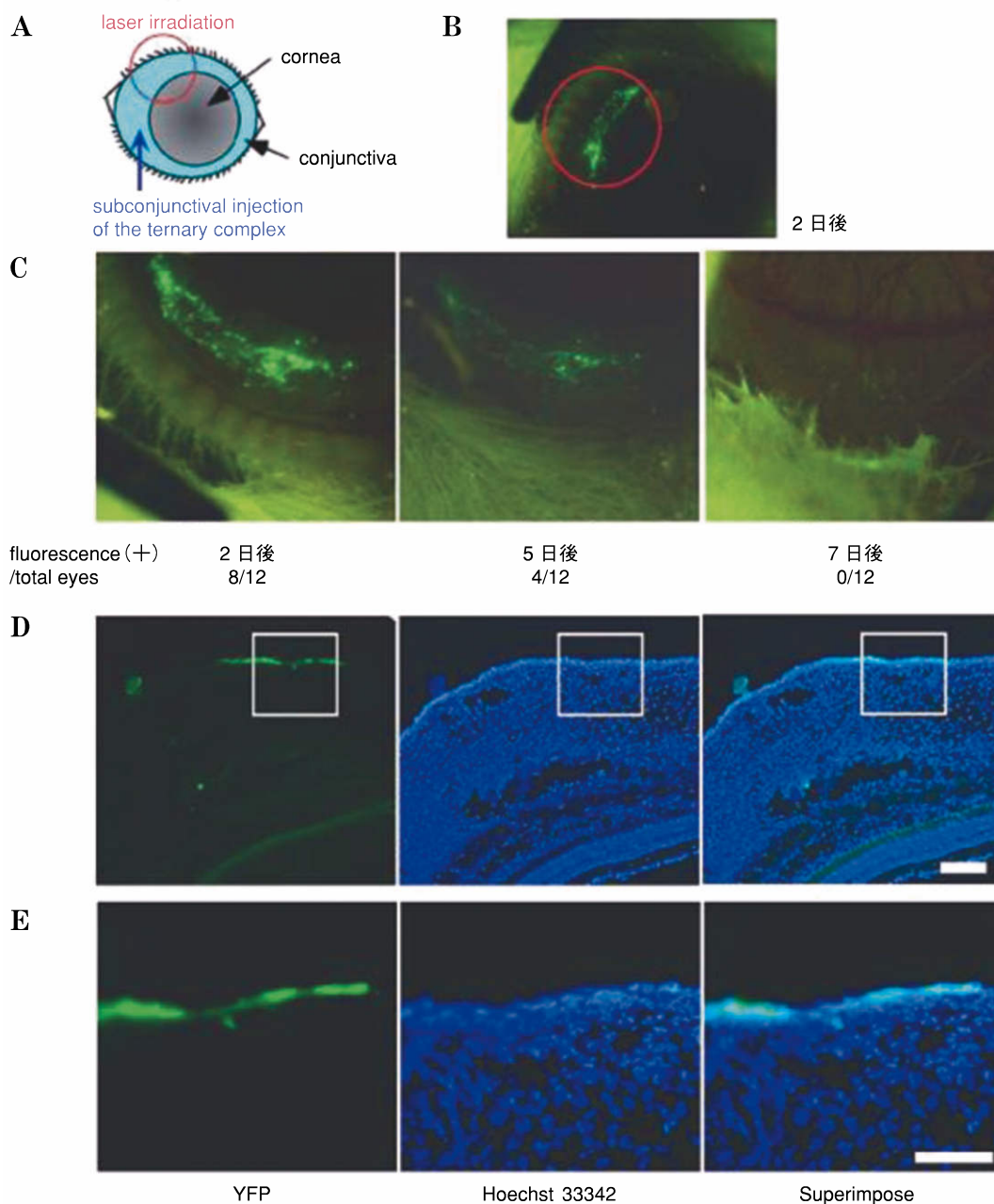


図 18 三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc によるラット生体眼結膜への遺伝子導入。

A: 結膜下に蛍光物質である yellow fluorescein protein (YFP) 発現プラスミド DNA 15 μg を含有する三元系コンプレックス pDNA/CP₄/DPc を注入し、2 時間後に波長 689 nm のレーザーを照射した(赤丸部)。B: PDT 2 日後に実体顕微鏡で蛍光を観察したところ、レーザー光照射部位(赤丸部)のみに遺伝子導入した蛍光蛋白質の発現が認められた。C: 2 日後には 12 眼中 8 眼に強い蛍光が認められたが、その後減衰して 5 日後には 12 眼中 4 眼に弱い蛍光が認められるにとどまり、7 日後には 12 眼中 1 眼も蛍光は認められなかった。D, E: PDT 2 日後の結膜組織の凍結切片を作製し、Hoechst 33342 で核染色したうえで、蛍光顕微鏡で観察したところ、結膜上皮細胞に YFP 遺伝子が導入されていることが組織学的にも確認された。(文献 59 より許可を得て転載)

た。一般に、核内受容体と転写共役因子との相互作用は、リガンド結合時にのみ誘導される。A2E が、RARα と転写共役因子との相互作用を誘導するか否かについて、Hec293 細胞を用いて two-hybrid assay により検討した。RARα リガンドである atRA は、steroid receptor coactivator (SRC) あるいは cre-binding protein (CBP) をトランスフェクションしたときには、atRA の

みを添加したものに比べて luciferase 活性が上昇し、RARα と転写共役因子との相互作用を誘導することが確認された(図 20)。これと同様に A2E も SRC あるいは CBP のトランスフェクションによって luciferase 活性が上昇したことにより、A2E は atRA と同様に、RARα と転写共役因子との相互作用を誘導することが分かった(図 20)。次に A2E が RARα の標的遺伝子を

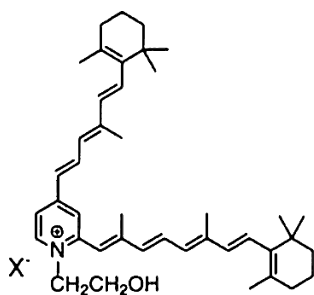


図 19 A2E(N-retinylethanolamine)の構造。

活性化するか否かについて検討した。ARPE-19細胞に atRA または A2E, および対照として PBS を添加し, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて RAR α 標的の遺伝子である stearoyl-CoA desaturase (SCD) および novel retinal pigment epithelial cell gene (NORPEG) の mRNA 発現レベルを検討した。その結果, A2E は atRA と同様に, RAR α 標的の遺伝子の発現を誘導することが分かった (図 21)。これらの結果より, A2E は, RAR α のリガンドである atRA と同様に核内受容体 RAR α を活性化すること, atRA と拮抗し, RAR α に直接結合すること, atRA と同様に RAR α と転写共役因子との相互作用を誘導し, また RAR α 標的の遺伝子の発現を誘導することが示され, A2E が RAR α の新規リガンドであることが示された。

眼の血管新生と atRA の関連については, atRA は retinoblastoma Y 79 細胞において血管新生促進因子である VEGF を誘導すること⁸¹⁾, および ARPE-19 細胞においても VEGF を誘導すること⁸²⁾が報告されている。そこで, この atRA と同様に RAR α のリガンドであることが今回判明した A2E が, CNV 発生に関与するか否かについて *in vitro* および *in vivo* で検討した。A2E の血管新生促進因子に及ぼす影響について, ARPE-19 細胞に A2E または atRA を添加し, RT-PCR 法および enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により VEGF および HIF-1 の発現を検討した。RT-PCR 法により, atRA 添加と同様, A2E 添加によって, 血管新生促進因子である VEGF および HIF-1 の mRNA の発現が亢進することが分かった。さらに, ELISA 法により, A2E 添加によって蛋白質レベルでも VEGF および HIF-1 の発現量は増加することが確認された。さらに, ARPE-19 細胞における atRA, A2E 添加後の mRNA 発現の経時変化について RT-PCR 法により検討した。標的の遺伝子である SCD の活性化は, atRA 添加時には 72 時間後には消失していたが, A2E 添加時には 96 時間後においても活性化が認められた。NORPEG の活性化についても同様であった。また, 血管新生促進因子であ

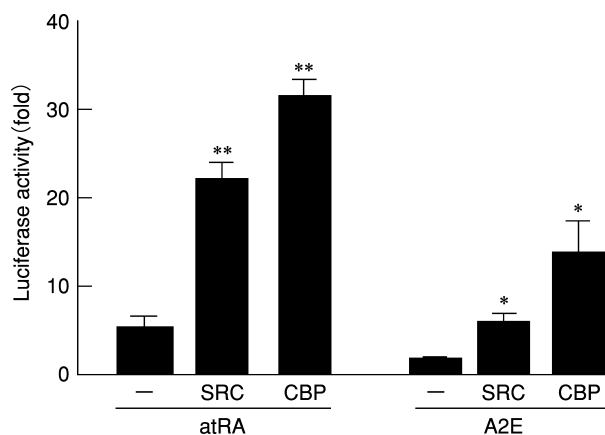


図 20 A2E による, retinoic acid receptor α (RAR α) と転写共役因子との相互作用の誘導。

A2E が, RAR α と転写共役因子との相互作用を誘導するか否かについて, Hec293 細胞を用いて two-hybrid assay により検討した。RAR α リガンドである all-trans retinoic acid (atRA) は, steroid receptor coactivator (SRC) あるいは cre-binding protein (CBP) をトランスフェクションしたときには, atRA のみを添加したものに比べて luciferase 活性が上昇し, RAR α と転写共役因子との相互作用を誘導することが確認された。同様に A2E も SRC あるいは CBP のトランスフェクションによって luciferase 活性が上昇したことにより, A2E は atRA と同様に, RAR α と転写共役因子との相互作用を誘導することが分かった。図中の表示は 3 回実験の平均値 \pm 標準誤差を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

る VEGF および HIF-1 の活性化についても, atRA 添加時にはいずれも 72 時間後には消失していたが, A2E 添加時には 96 時間後においても活性化が認められた。以上より, A2E は, atRA と同じく RAR α のリガンドであり, ARPE-19 細胞において atRA と同様に血管新生促進因子 HIF-1 および VEGF の発現を亢進させるが, 標的の遺伝子や血管新生促進因子の発現亢進を atRA よりも長時間にわたり持続することが分かった。

次に, A2E が CNV 発生に及ぼす影響についてラットを用いて *in vivo* で検討した。BN ラット網膜下に A2E を注入し, RPE に対する障害を RPE-脈絡膜伸展標本で, 血管新生促進因子 (VEGF, HIF-1) の発現レベルへの影響を免疫染色および RT-PCR で, レーザー誘発 CNV の発生への影響および RAR antagonist (Ro 415253) 硝子体内注射の効果フルオレセイン蛍光眼底造影で, それぞれ検討した。まず, A2E (2.5×10^{-6} M, $0.5 \mu\text{l}$), または対照として同量の PBS を, それぞれ BN ラット網膜下に注入し, 2 週後に RPE-脈絡膜伸展標本作製したところ, 対照群に比して A2E 注入群では RPE の細胞数が減少し, その形態が不整となっていた (図 22)。BN ラット網膜下に A2E (2.5×10^{-6} M, $0.5 \mu\text{l}$) または対照である PBS $0.5 \mu\text{l}$ を注入し, 2 週後に抗

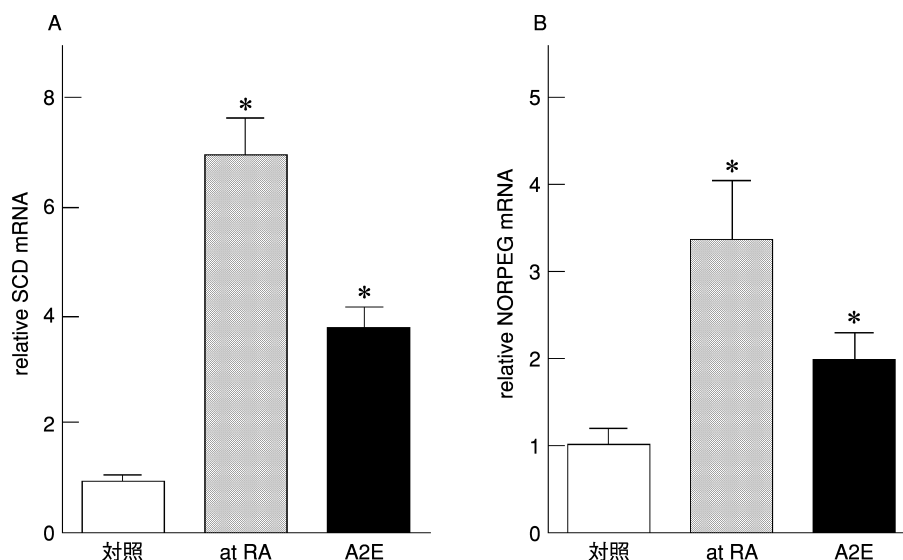


図 21 A2E による RAR α 標的遺伝子の活性化。

ARPE-19 細胞に atRA または A2E, および対照として phosphate buffered saline (PBS) を添加し, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて RAR α 標的遺伝子である stearoyl-CoA desaturase (SCD) および novel retinal pigment epithelial cell gene (NORPEG) の mRNA 発現レベルを検討した。A2E は atRA と同様に, RAR α 標的遺伝子の発現を誘導することが分かった。図中の表示は 3 回実験の平均値 \pm 標準誤差を示す。*: $p < 0.05$ 。

VEGF 抗体を用いた免疫染色において, A2E 注入群においては RPE と視細胞内節において VEGF 発現がみられた(図 23)。次に, ラット網膜下に A2E (2.5×10^{-6} M, $0.5 \mu\text{l}$) 注入のみ行った群と, 直後に RAR antagonist (1.0×10^{-5} M, $4 \mu\text{l}$) の硝子体内注射を併用した群において, 2 週後の脈絡膜, RPE における VEGF の mRNA 発現を RT-PCR で検討したところ, 網膜下 A2E 注入群では, 脈絡膜, RPE における VEGF の発現亢進がみられたが, RAR antagonist 硝子体内注射併用群では抑制されていた。HIF-1 の発現についても同様に, 網膜下 A2E 注入群では, 発現亢進がみられたが, RAR antagonist 硝子体内注射併用群では抑制されていた。さらに, RAR antagonist 硝子体内注射による A2E 網膜下注射後のレーザー誘発性 CNV 抑制効果について検討した。対照群では PBS を網膜下 ($0.5 \mu\text{l}$) および硝子体内注射 ($4 \mu\text{l}$) し, A2E 群では A2E (2.5×10^{-6} M, $0.5 \mu\text{l}$) を網膜下に, PBS $4 \mu\text{l}$ を硝子体内注射し, A2E + RAR antagonist 群では A2E を網膜下に, RAR antagonist (1.0×10^{-5} M, $4 \mu\text{l}$) を硝子体内注射した。2 週後に通常のラット CNV モデル作製時よりも低出力(出力 100 mW, 照射時間 2 msec, スポットサイズ $200 \mu\text{m}$) でレーザーを照射し, その 5 日後にフルオレセイン蛍光眼底造影を行い CNV 発生の有無について検討した(図 24)。対照群では CNV の発生は 10 眼すべてにみられなかった。A2E 群では 10 眼中 9 眼で CNV の発生がみられたが, RAR antagonist を併用した群では CNV 発生は 5 眼中 1 眼のみにみられた。以上のように, ラット網

膜下に A2E を注入することにより, RPE の細胞数が減少し, 形態が不整となった。脈絡膜, RPE における VEGF, HIF-1 の発現が亢進したが, RAR antagonist 硝子体内注射により抑制された。低出力レーザー照射により CNV が発生したが, RAR antagonist 硝子体内注射により抑制された。

以上の検討により, RPE の加齢変化として増加するリポフスチンの構成成分である A2E は, 核内受容体 RAR α を介して血管新生促進因子を恒常的に活性化することによって CNV の発生に関与する可能性があり, この CNV 発生は RAR antagonist 投与により抑制されることが分かった。すなわち, A2E は RAR α を介して滲出型 AMD の発症に関連した RPE 表現型の変化を来す原因物質のひとつである可能性があり, 滲出型 AMD 発症予防のターゲットになり得ることが示唆された。

V 組織幹細胞(網膜幹細胞, 骨髄間葉系幹細胞)の RCS ラット網膜下移植

AMD の治療のうち, PDT を含むレーザー治療, 薬物による抗血管新生療法, および手術療法のうちの新生血管除去術はすべて CNV をターゲットとした治療法である。これに対して, 黄斑移動術や RPE 移植は障害された網膜をターゲットとした治療法であるが, その効果は限定的なものとなっている。本項では障害された網膜の新しい治療法として, 幹細胞を用いたアプローチについて検討した。

幹細胞は自己複製能を有し, 多分化能がある細胞と定

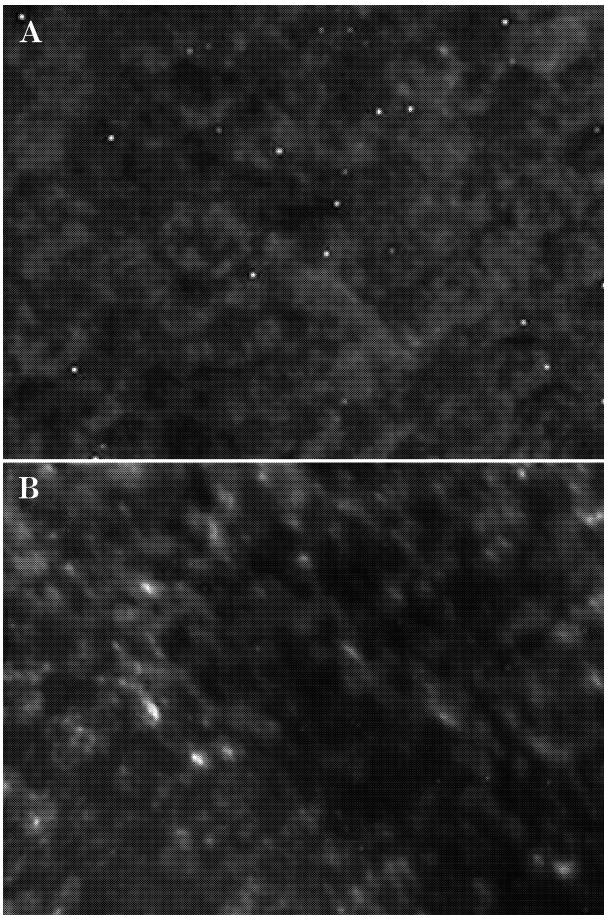


図 22 ラット網膜下 A2E 注入後の網膜色素上皮 (RPE). A2E または対照として同量の PBS を、それぞれラット網膜下に注入し、2 週後に RPE-脈絡膜伸展標本を作製したところ、対照群 (A) に比して A2E 注入群 (B) では RPE の細胞数が減少し、その形態が不整となっていた。

義されるが⁸³⁾、胚性幹細胞と組織幹細胞の 2 種類に大別される。胚性幹細胞は、動物初期胚の内盤胞の内部細胞塊より樹立された細胞株で、形質転換することなく培養系で安定的に未分化状態を維持し、自己複製し増殖することが可能であり、すべての細胞に分化可能な全能性をもつ細胞である。その旺盛な増殖能と全能性より再生医療への応用を期待されているが、未分化性が高く、奇形腫の発生などのリスクがあること、発生初期胚より細胞塊を取得するので倫理的な問題があること、他人由来のアロの細胞になるため免疫学的反応を惹起し得ることなどが問題とされている。組織幹細胞は、少なくともその組織由来の細胞系譜に分化できる多分化能をもつ細胞であり、成体組織において多くの組織に存在するので、臨床応用に際して、自分自身の幹細胞を取得でき得ることや、ある程度分化している細胞なので奇形腫が発生する可能性が低いなどの利点がある。網膜においても、成体マウス⁸⁴⁾およびラット⁸⁵⁾の毛様体上皮細胞より各種網膜細胞に分化可能であり自己複製能をもつ網膜幹細胞の存在が報告されている。一般に、組織幹細胞は胚性幹細胞

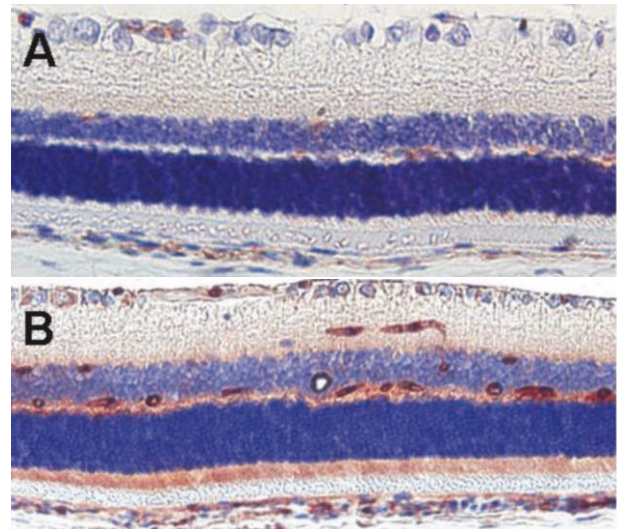


図 23 ラット網膜下 A2E 注入後の血管内皮成長因子 (VEGF) の発現。

ラット網膜下に A2E または対照 (A) として PBS を注入し、2 週後に抗 VEGF 抗体を用いた免疫染色を施行した。A2E 注入群 (B) では RPE と視細胞内節において VEGF 発現がみられた。

に比べて増殖能が低く、分化能も限定的であるが、増殖能、分化能も高く、他の胚葉系にも分化可能である多能性幹細胞と呼ばれる特殊な組織幹細胞が存在することが知られており、骨髄⁸⁶⁾、皮膚⁸⁷⁾、膵臓⁸⁸⁾、内耳⁸⁹⁾由来のものが報告されている。例えば、骨髄から容易に取得できる骨髄間質細胞には、三胚葉系に分化可能で増殖能の高い骨髄間葉系幹細胞が存在し⁸⁶⁾、神経系細胞へ分化能があり⁹⁰⁾、細胞移植後に神経保護作用を有する^{91)~93)}ことが報告されており、細胞移植療法の細胞供給源として注目されている。

本項では比較的大きな眼球をもち、解析が容易である家兎より網膜幹細胞の取得を試み、その単一クローンレベルでの性状を解析したうえで、得られた網膜幹細胞を網膜変性症モデルラット網膜下に移植し、網膜変性に対する変性抑制効果を検討した。さらに、マウス骨髄間質細胞より得られる骨髄間葉系幹細胞を用いて同様の移植実験を行い、両者の変性抑制効果を比較検討した。

1. 家兎網膜幹細胞の分離およびスフェア法による培養

まず、家兎網膜幹細胞の分離およびスフェア法⁹⁴⁾による培養を試みた。日本白色家兎 (2~2.4 kg, 埼玉実験動物) を、塩酸ケタミンおよび塩酸キシラジンの過剰投与により屠殺し、直後に眼球を摘出した。摘出眼球は、PBS に浸潤した状態で角膜輪部より 3~4 mm 後極側を輪状に切開し、前眼部と後眼部を分離し、前眼部を実験に使用した。水晶体と硝子体は前眼部より鈍的に剝離した (図 25) 後に、前眼部を、Hanks' balanced salt solution (HBSS, GIBCO BRL 社) で 0.25% に希釈したトリプシン (GIBCO BRL 社) に浸潤し、虹彩組織、毛様

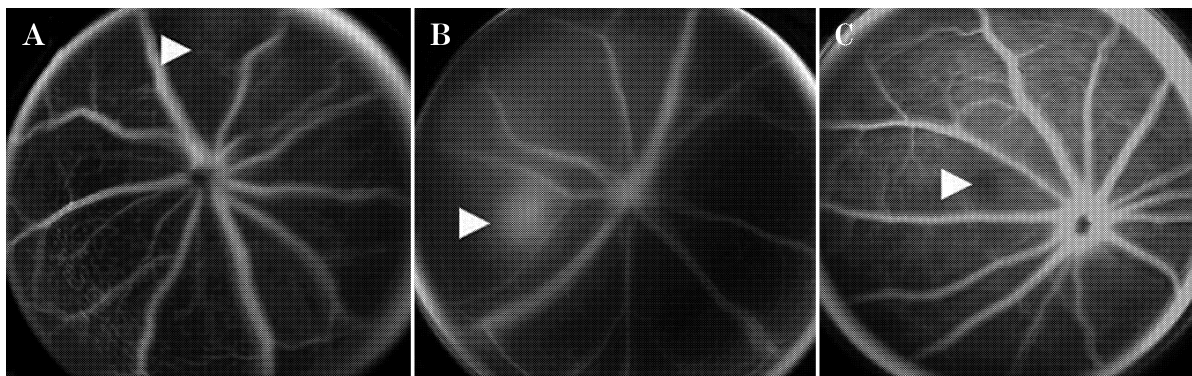


図 24 RAR antagonist 硝子体内注射による A2E 網膜下注射後のレーザー誘発性 CNV 抑制効果。
 対照群では PBS を網膜下および硝子体内注射し、A2E 群では A2E を網膜下に、PBS を硝子体内注射し、A2E+RAR antagonist 群では A2E を網膜下に、RAR antagonist を硝子体内注射した。2 週後に通常のラット CNV モデル作製時よりも低出力でレーザーを照射し、その 5 日後にフルオレセイン蛍光眼底造影を行い CNV 発生の有無について検討した。対照群(A)では CNV の発生は 10 眼すべてにみられず、A2E 群(B)では 10 眼中 9 眼で CNV の発生がみられたが、RAR antagonist を併用した群(C)では CNV 発生は 5 眼中 1 眼のみにみられた(A~C は蛍光眼底造影の各群の代表例を、矢頭はレーザー照射部位を示す)。

Sagittal section of rabbit's eye

Back view of the anterior segment

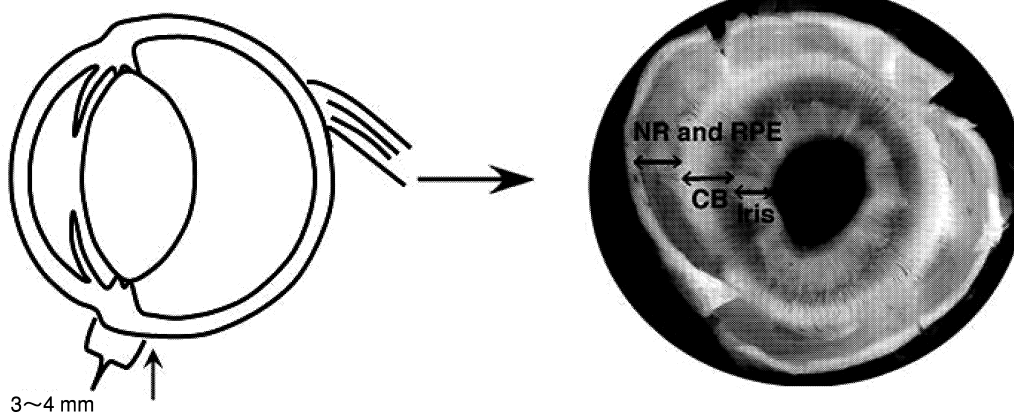


図 25 成体ウサギ前眼部からの細胞取得。

眼球摘出後、角膜輪部から 3~4 mm 後極の部位より環状に切開し、後眼部を除去した。次に前眼部より、水晶体および硝子体ゲルを除去し、切り分けた。虹彩上皮、毛様体上皮、周辺部網膜色素上皮は Hanks' balanced salt solution(HBSS)で 0.25% に希釈したトリプシンで 37°C 10 分培養後、実質を分離し、周辺部網膜は切り分けた後、分離した組織はそれぞれ DNase、トリプシン中和液を添加し、ピペットで器械的に単離した。遠心後、細胞は D-MEM/F-12 に懸濁し、40 μm のナイロン膜で、フィルターした。CB：毛様体、NR：感覚網膜、RPE：網膜色素上皮。(文献 97 より許可を得て転載)

体組織、周辺部網膜色素上皮および網膜組織を分離した。さらに虹彩組織、毛様体組織、周辺部網膜色素上皮組織を 0.25% トリプシン溶液中で、37°C 10 分培養した後、上皮細胞を鈍的に分離した。分離した上皮細胞に DNase(Takara 社)10 U/μl、トリプシン中和液(TNS, Cell Applications 社)を添加した後に、ピペッティングにより器械的に単一細胞に単離した。網膜組織は分離直後に DNase、トリプシン中和液を添加した後に、ピペッティングにより器械的に単一細胞に単離した。単離した細胞は遠心により回収し、D-MEM/F-12 (mixture 1 : 1, GIBCO BRL 社)に懸濁し、40 μm の

ナイロン膜(Becton Dickinson Labware 社)で濾過した。10 細胞/μl の細胞密度で、コーティングをしていない 24 well dish に細胞を播種し、浮遊細胞系で培養した。培養には N 2 supplement(GIBCO BRL 社)を添加した無血清の D-MEM/F-12 培地を用い、basic fibroblast growth factor(bFGF, Peprotech EC LD 社)、epidermal growth factor(EGF, Antugenix America 社)をそれぞれ最終濃度 10, 20 ng/ml となるように週 3 回投与した。以上のように、虹彩上皮細胞、感覚網膜細胞、網膜色素上皮細胞、毛様体上皮細胞をスフェア法で培養した結果、毛様体上皮細胞からのみスフェアが形成

された(図 26 A)が、虹彩上皮細胞、感覚網膜細胞、網膜色素上皮細胞からはスフェアは形成されなかった。細胞増殖因子を添加しない条件でも 10,000 細胞あたり 2~5 個のスフェアは形成されたが、EGF および bFGF を添加するとスフェアの数は増加した。しかし、通常の浮遊細胞培養では、スフェアを形成する段階で細胞凝集が起こる可能性があることが報告されている⁹⁵⁾⁹⁶⁾。本研究においてもスフェア形成時の細胞凝集の可能性を除外するため、メチルセルロースを培地に添加し、ゲル状にした培地を用いて、細胞の移動を制限し、単一細胞由来スフェアを形成し解析を行った。メチルセルロース含有培地で実際にスフェアが細胞凝集によらず、単一の細胞由来であることを確認するために 3 つの実験を行った。まず、スフェア形成時の経時変化を観察した。同一視野において、スフェアは培養開始後 3 日目に確認できる程度の大きさになった(図 27 C)。その後スフェアの移動はほとんど認められなかった(図 27 D~F)。次に、トリプシン処理により単離した毛様体上皮細胞を Hoechst 33342(Molecular probes 社, 5 mg/ml in PBS ; 15 分, 37°C)で核染色した後、メチルセルロース含有培地に播種した。そして播種直後および 48 時間後に細胞を観察した。播種直後の細胞は 90.7% の細胞が単一細胞で、6.4% が 2 細胞塊, 2.9% の細胞が 3 細胞塊であった。また、48 時間後では 89.8% の細胞が単一細胞で、6.8% が 2 細胞塊, 3.4% の細胞が 3 細胞塊であり、比率に変化はほとんど認められなかった(表 1)。よって、播種時に 9 割の細胞が単一細胞に単離されており、播種後 48 時間では、細胞の凝集がほとんど起こっていないと考えられた。そして、毛様体上皮細胞を播種する際に蛍光マーカーである carboxyfluorescein diacetate (CFDA, Molecular probes 社)によりマーキングした細胞とマーキングしていない細胞を 1:1 で混和してから、培養皿に播種して培養を行い 24 時間後に 2 細胞塊の CFDA による蛍光を観察した。その結果 2 細胞塊は両細胞とも蛍光を発しているか、両細胞とも発していないことが分かった(図 27 G)。これより播種後 24 時間では播種した細胞には細胞凝集が起こっていないと考えられた。これらの実験結果より、本研究で用いるメチルセルロース含有培地を用いた浮遊培養においては、細胞凝集が起らないと考えられた。次に形成されたスフェアが、実際に増殖して形成したことを確認するために、固定 24 時間前に bromodeoxyuridine(BrdU, Sigma 社)を添加したスフェアを抗 BrdU 抗体(Roche Diagnostics 社, 1:200)で免疫染色を行った。スフェアには BrdU の取り込みが認められた(図 26 B)。また、網膜前駆細胞に発現が認められる Chx 10 の抗体(Exalpa Biologicals 社, 1:100)で、免疫染色をすると、スフェアには Chx 10 の発現も認められた(図 26 C)。神経細胞のマーカーの一つである microtubule-associated pro-

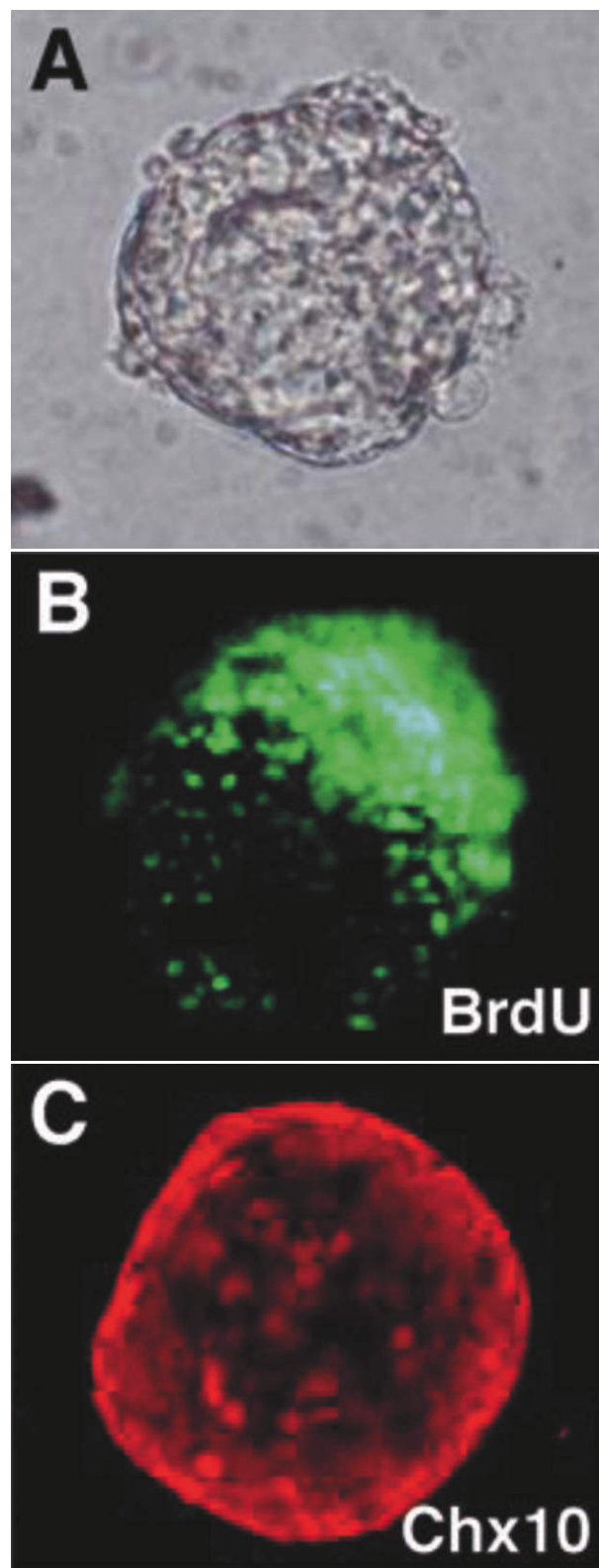


図 26 成体家兎毛様体上皮由来スフェア。

A: メチルセルロースゲル含有培地で形成されたスフェア。B: 免疫染色により、スフェア形成細胞への bromodeoxyuridine(BrdU)の取り込みが確認され、スフェア形成細胞が実際に増殖していると考えられる。C: 網膜前駆細胞のマーカーである Chx 10 を発現している。また、神経細胞のマーカーである microtubule-associated protein 2(MAP 2), およびグリア細胞のマーカーである glial fibrillary acidic protein(GFAP)の発現は、スフェアには認められなかった。(文献 97 より許可を得て転載)

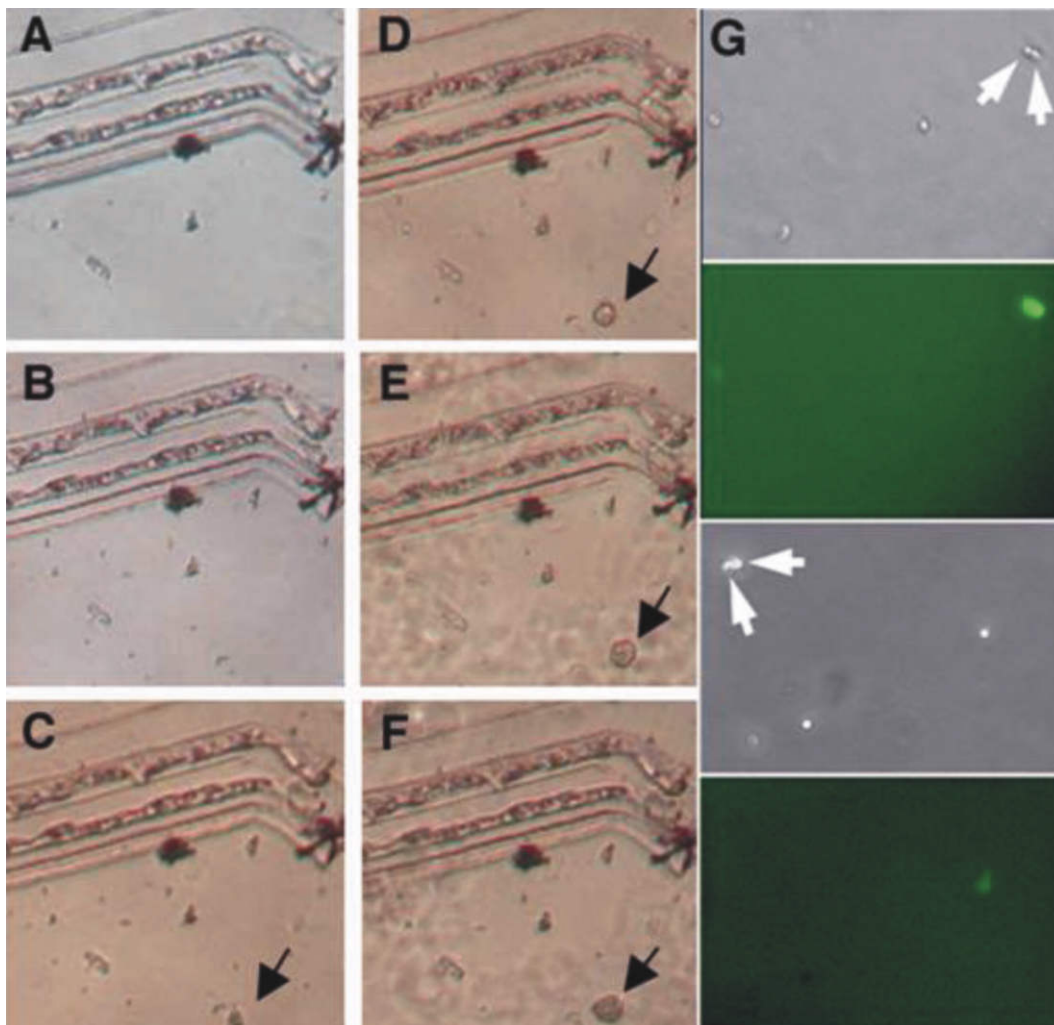


図 27 スフェア形成時の経時的観察.

A~F: メチルセルロース含有培地におけるスフェア形成の経時的観察. メチルセルロース含有培地に播種した毛様体上皮細胞を, 播種後, 24 時間から 48 時間間隔で, 8 日間同じ部分を観察した. 写真はそれぞれ播種 24 時間後(A), 48 時間後(B), 3 日後(C), 4 日後(D), 6 日後(E), 8 日後(F)に記録した. 3 日後(C)にスフェア(矢印)が認識できるようになり, 観察期間中スフェアの移動はほとんど認められなかった(D, E, F). G: 毛様体上皮細胞を播種する際に蛍光マーカである carboxyfluorescein diacetate(CFDA)でマーキングした細胞を用いて, スフェア形成時の細胞凝集を 24 時間後に評価した. CFDA によりマーキングした細胞とマーキングしていない細胞を 1:1 で混和してから, 培養皿に播種した. そして 24 時間後に 2 細胞塊の CFDA による蛍光を蛍光顕微鏡を用いて観察した. 第 1 番目と 3 番目の写真は, 位相差顕微鏡写真で, 第 2 番目と 4 番目の写真は, それぞれ第 1 番目と 3 番目と同時に撮影した蛍光写真である. 2 細胞塊(第 1 番目と 3 番目の写真での矢印)は両細胞とも CFDA(+)(第 2 番目の写真)か両細胞とも CFDA(-)(第 4 番目の写真)であった. 100 以上の 2 細胞塊を観察したが, CFDA(+)と CFDA(-)の混ざった 2 細胞塊は存在しなかった. (文献 97 より許可を得て転載)

表 1 メチルセルロース含有培地に播種した直後および 48 時間後の細胞凝集(%)

	単一細胞	2 細胞塊	3 細胞塊
播種直後	90.7±2.6	6.4±1.9	2.9±0.9
48 時間後	89.8±2.8	6.8±1.9	3.4±1.1

平均値±標準誤差(n=6)(文献 97 より許可を得て転載)

tein 2(MAP2), およびグリア細胞のマーカーの一つである glial fibrillary acidic protein(GFAP)の抗体でも免疫染色を施行したが, スフェアにはこれらの発現は認

められなかった. これらの結果からスフェアに未分化な細胞が存在し, 増殖していることが確認された⁹⁷⁾.

得られたスフェアの分化能を調べるために, 取得した

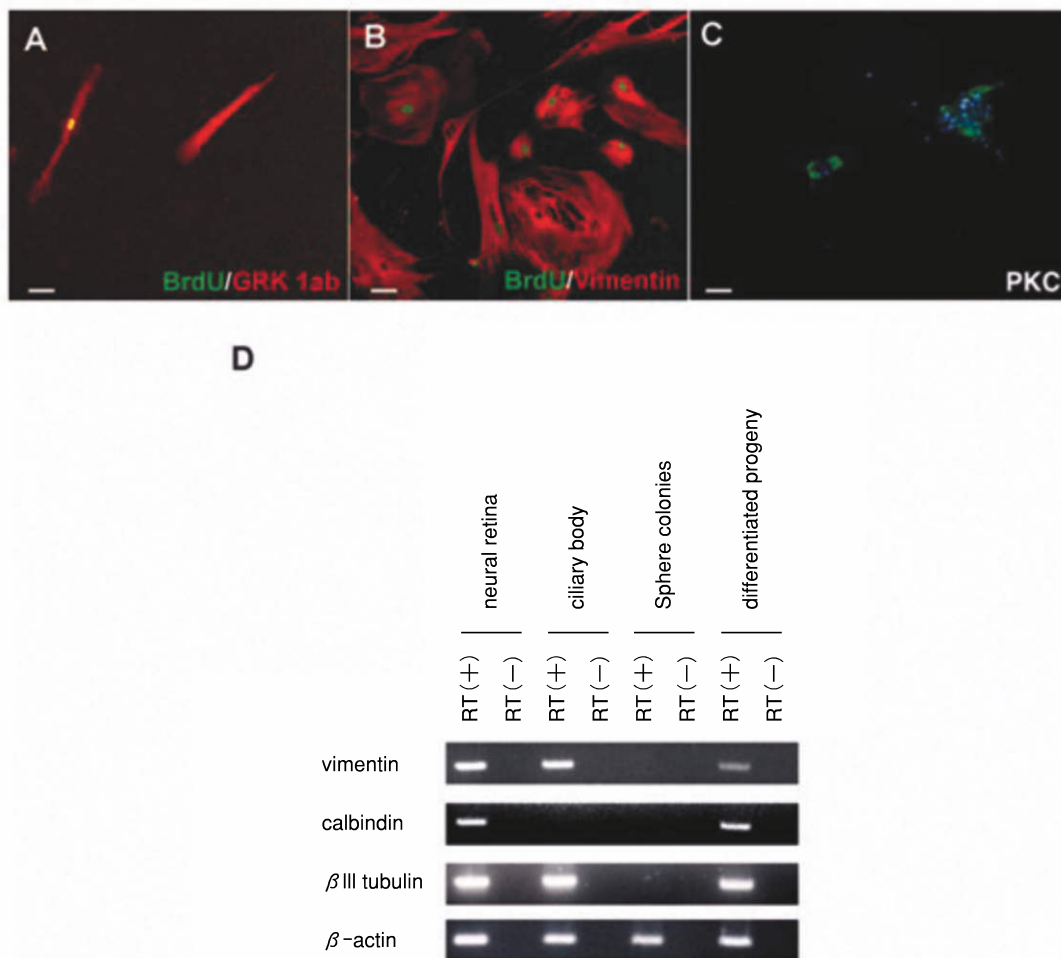


図 28 スフェア形成細胞の分化能(免疫染色および RT-PCR).

A～C：一次スフェアを poly-L-lysine と laminin でコーティングした培養皿に播種し，1% ウシ胎仔血清 (FBS) 含有培地で 14 日間培養した。また，スフェア播種後すぐに BrdU を添加した (A, B)。 (C) では，培養開始 24 時間後に，培養液を wash し，basic fibroblast growth factor (bFGF) を添加した無血清培地で，14 日間培養した。スフェアより分化した細胞は，BrdU (A および B, 緑) の取り込みおよび GRK 1 a/b (A, 赤)，vimentin (B, 赤)，protein kinase C α (C, 緑) の発現が認められた。 (C) では，細胞核を Hoechst 33342 (青) で染色した。バーは，A, B；20 μ m，C；30 μ m。

D：成熟網膜細胞で発現している遺伝子で，家兔の cDNA の配列が得ることのできた遺伝子 (β III tubulin, vimentin, calbindin) のスフェアおよびスフェアから分化した細胞での発現を RT-PCR により解析した。検討したすべての遺伝子は，スフェアから分化した細胞では発現が認められたが，スフェアでは発現が認められなかった。(文献 97 より許可を得て転載)

一次スフェアを分化誘導条件下で 14 日間培養した後，各種網膜細胞に特異的なマーカーで免疫染色を行った。細胞分裂が起こっているか否かの解析のため，分化誘導開始後すぐに，培養液中に BrdU を添加した。14 日間培養後，BrdU を取り込んだ細胞と各種網膜細胞特異的マーカーの二重染色を行った。その結果，BrdU を取り込んでいる細胞において，視細胞のマーカーである GRK 1 a/b，双極細胞のマーカーである protein kinase C α (PKC α) およびミュラー細胞のマーカーである vimentin を発現している細胞が存在することが明らかとなった (図 28 A～C)。また，単一細胞由来のスフェアを分化させ，免疫染色を行った。BrdU を取り込んでいる細胞中に未分化な神経系のマーカーである β III

tubulin，神経系のマーカーである MAP2 およびグリア系のマーカーである GFAP を発現する細胞が存在した。(図 29 A～C)。また同様に，二次スフェアでもこれらのマーカーの発現が認められた。さらに，網膜，毛様体上皮細胞，一次スフェア，一次スフェアを分化させた細胞の RNA を採取して，RT-PCR 法により， β III tubulin, vimentin, 水平細胞のマーカーである calbindin の発現を調べた結果，網膜においてはすべての遺伝子が発現しているが，一次スフェアにはすべての遺伝子の発現が認められず，一次スフェアの分化誘導後にすべての遺伝子の発現が認められることが判明した (図 28 D)。次に，単一スフェアの神経系，グリア系の細胞系譜への分化能を検討するために，単一クローンをクローンごとに 1

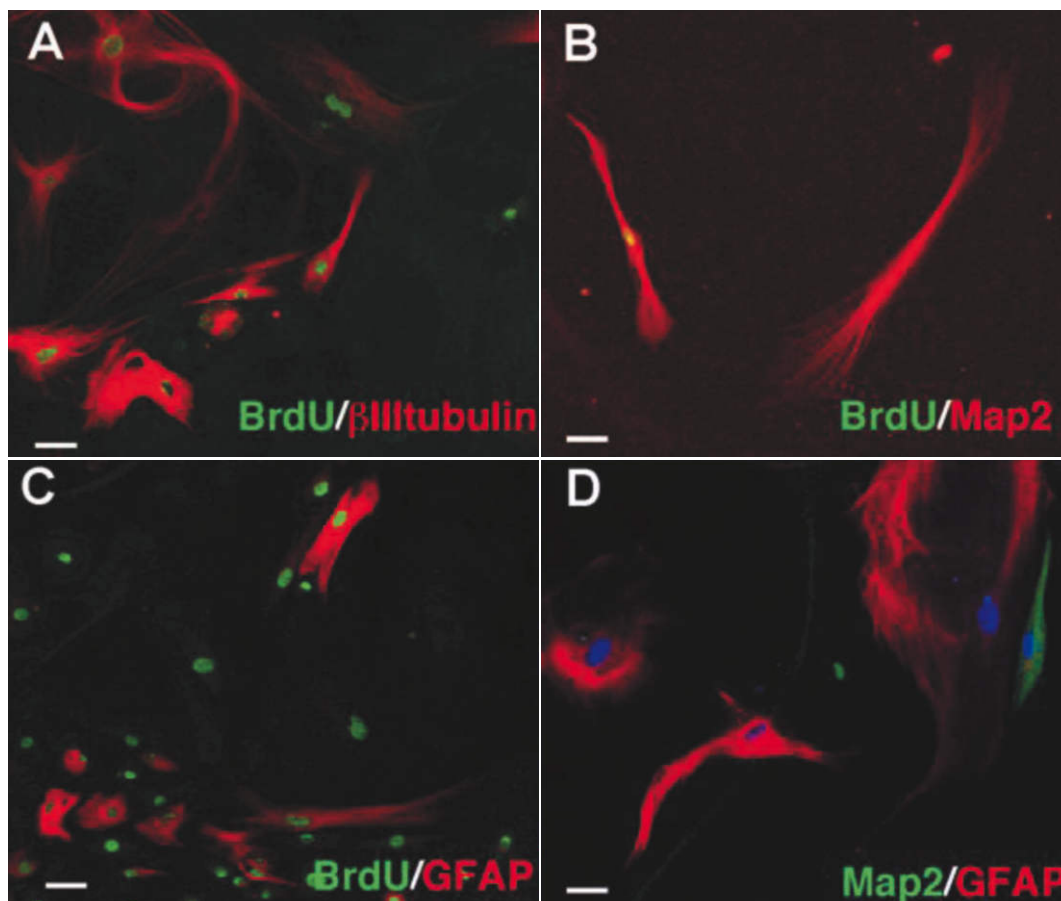


図 29 単一クローンの分化能(免疫染色).

それぞれのスフェアを poly-L-lysine と laminin でコーティングした一つ一つの培養皿に播種し、1% FBS 含有培地で 14 日間培養した。

A～C：スフェアを播種した後すぐに、BrdU を添加した。スフェアから分化した細胞は、BrdU(緑)の取り込みが認められ、同時に未熟な神経細胞のマーカである β III tubulin(A)、成熟した神経細胞のマーカである MAP2(B)、アストロサイトのマーカである GFAP(C) (赤) を発現した。

D：抗 MAP2 抗体と抗 GFAP 抗体で二重染色を行った結果を示す。一つのスフェアより分化した細胞群で、MAP2(緑)あるいは GFAP(赤)をそれぞれ発現した細胞が存在した。一つのスフェアより分化した細胞群のうち、MAP2 あるいは GFAP を発現する細胞が両方存在した割合は、23%であった。また、両蛋白質ともに発現している細胞は存在しなかった。細胞核を Hoechst 33342(青)で染色した。バーは、A, B, C：20 μ m, D：15 μ m。(文献 97 より許可を得て転載)

well に播種し、分化条件下で 14 日間培養したのちに、細胞を二重免疫染色することで検討した。MAP2 および GFAP の抗体で二重染色を行った。MAP2 のみを発現したクローンは、5.56%、GFAP のみを発現したクローンは 68.7% であった。また、両方を発現したクローンは 23.0% であった⁹⁷⁾(図 29 D)。

2. 骨髄間質細胞の取得および培養上清の培養網膜前駆細胞に対する作用

骨髄間質細胞は、骨髄中の造血幹細胞を除いた成分で、接着培養によっても生存、増殖することが可能であり、中胚葉系の細胞への分化能をもつ。また、一部の細胞は多分化能をもつと考えられており、単一細胞の全能性を示した報告も存在する⁸⁶⁾。さらに、増殖能は旺盛で、*in vitro* で容易に増殖させることが可能である。ま

た、各種神経栄養因子を分泌することも知られている⁹²⁾⁹³⁾⁹⁸⁾。そこでまず、マウス骨髄間質細胞を Dexter 法⁹⁹⁾で取得した。視細胞の発生初期に発現する転写因子 cone rod homeobox (Crx) のプロモーター領域の配列の下流に β -galactosidase (*lacZ*) が組み込まれているトランスジェニックマウス (Crx-*lacZ* マウス)¹⁰⁰⁾ 6～10 週齢を頸椎脱臼により屠殺し、大腿骨、脛骨を分離した。剪刀で骨頭を切断し、骨幹に 27 G 針を刺入し、培養液を髄腔内に注入し、骨髄を採取した。1,500 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去し、ウシ胎仔血清 (FBS) 10% を添加した minimum essential medium- α (MEM- α , GIBCO BRL 社) 培地に懸濁し、細胞培養用の 6 well plate (Becton Dickinson Labware 社) に 10⁷ cell/well の密度で播種した。翌日、well より血球などを含んだ浮遊細

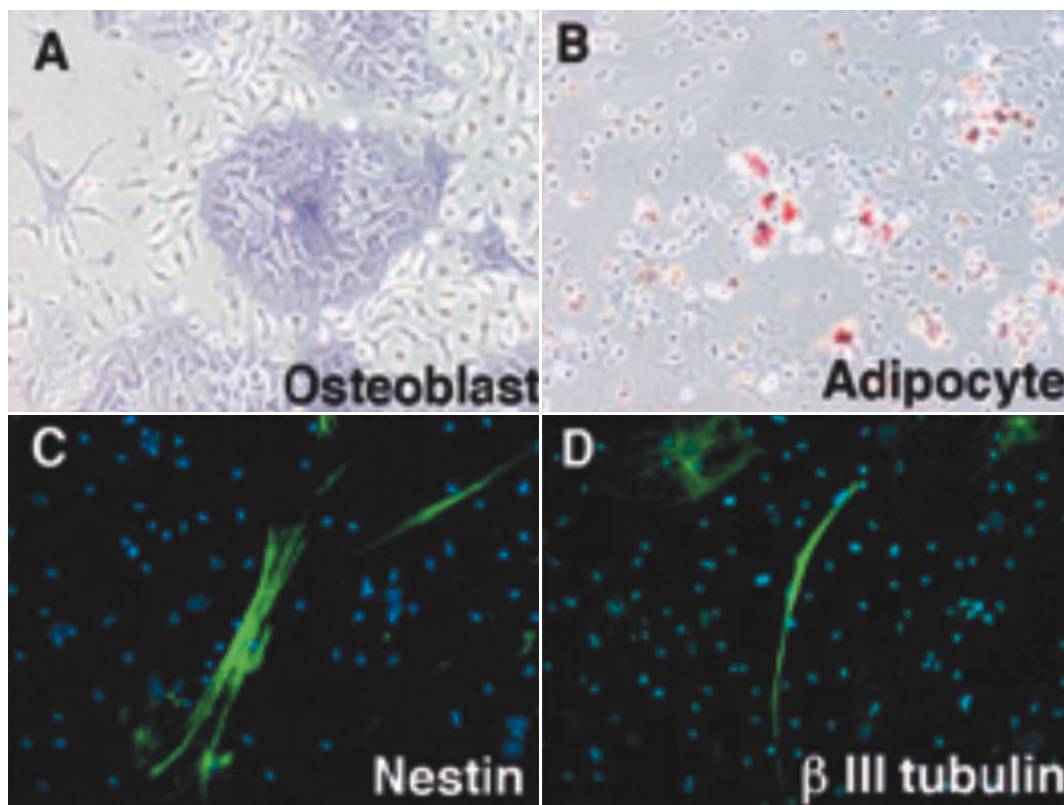


図 30 骨髄間質細胞から分化した細胞の免疫染色。

- A, B: 骨髄間質細胞を継代後, それぞれの分化誘導培地で培養した. A: アルカリフォスファターゼで染色すると, 青染する osteoblast(骨芽細胞)に分化した細胞が認められた. B: Oil red O で染色すると, 赤染する adipocyte(脂肪細胞)に分化した細胞が認められた.
- C, D: 神経系細胞への分化誘導するために, 24 時間 FBS 10% 含有培地で培養した後, FBS 1% 含有培地に epidermal growth factor(EGF)を 100 ng/ml 添加し 14 日間培養を行った. 未分化細胞のマーカである nestin(C)および未成熟な神経細胞のマーカである β III tubulin(D)陽性細胞が認められた. 細胞核を Hoechst 33342(青)で染色した.

胞を除去した. インキュベーターで培養後, コンフルエントになる前に, 継代を行った. 継代は PBS で洗浄後, 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, GIBCO BRL 社)により, 細胞を剥離し, 再度 MEM- α に懸濁し播種した. さらに, 分化条件下で培養した骨髄間質細胞をアルカリフォスファターゼおよび oil red O 染色を行い, これまでの報告どおり骨髄間質細胞の取得が可能であることを確認した. それぞれ青染, 赤染した骨芽細胞, 脂肪細胞への分化が認められた(図 30 A, B). また, 分化の際に EGF を添加し, 神経系に誘導した細胞では, 未分化な細胞マーカである nestin, 未分化神経細胞のマーカである β III tubulin の発現が認められた(図 30 C, D). これらのことから, Dexter 法によってこれまでの報告にあるように未分化な骨髄間質細胞が取得されることが確認された.

骨髄間質細胞から分泌される因子による網膜細胞に対する作用を調べるために, 骨髄間質細胞の培養上清をならし培地として網膜細胞を培養し [CM(+)]群, その生存率を培養上清非添加の対照群 [CM(-)]群と比較

し検討した. その結果, CM(+)]群では CM(-)]群と比べ網膜細胞の生存率が有意に高く, 骨髄間質細胞培養の培養上清には増殖促進作用あるいは細胞死抑制作用があると考えられた. また, 同様にして培養 7 日目の網膜細胞の β -gal 発現量を比較した. この実験に用いたマウス由来の細胞は視細胞あるいは視細胞前駆細胞特異的に β -gal が発現するので, その発現量を比較することで, 視細胞あるいは視細胞前駆細胞が定量できる. その結果, CM(+)]群の方が, CM(-)]群に比べて有意に β -gal の発現量が高く, CM(+)]群において視細胞あるいは視細胞前駆細胞がより多く生存していることが分かった. これらより, 骨髄間質細胞培養の培養上清には視細胞前駆細胞あるいは視細胞に対して増殖促進作用あるいは細胞死抑制作用があると考えられた.

3. 網膜色素変性モデルラットに対する網膜幹細胞および骨髄間葉系幹細胞の網膜下移植

幹細胞は, 正常網膜には生着しないことが報告されている¹⁰¹⁾¹⁰²⁾. そこで, 本研究では細胞移植のレシピエントとして網膜変性症モデルラットである Royal College

of Surgeons(RCS)ラットを用いた。RCSラットはチロシンキナーゼ受容体遺伝子に異常があるラットで、網膜色素上皮細胞の貪食能が障害され、加齢とともに視細胞が産生する老廃物が蓄積されて、視細胞に変性が起こる¹⁰³⁾。変性は生後2週から始まり、12週でほぼ完成するので、細胞移植は眼瞼が開き移植可能となる生後4週目とした。4週齢RCSラットをジエチルエーテルで吸入麻酔した後、経強膜的に30G針を刺入し、網膜下への針先の侵入を手術顕微鏡(OMS-600, トプコン社)下で確認し、細胞懸濁液またはPBSを2 μ l網膜下に注入した。RCSラットにおいては、sham手術により視細胞の変性が抑制される¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾ため、右眼はsham手術眼としてPBSを2 μ l網膜下注入し、対照とした。左眼は、家兎網膜幹細胞 2.0×10^3 個/ μ lまたは骨髄間質細胞 $1.0 \sim 2.0 \times 10^4$ 個/ μ lを2 μ l網膜下に注入した。大量の硝子体出血や網膜下出血、あるいは眼内炎を起こした眼球は除外した。免疫抑制のため、シクロスポリン5mg/kgを移植したラット腹腔内に連日投与した。

網膜下への細胞移植の4, 8週後にケタラールおよびキシラジンを過剰投与しRCSラットを屠殺した。直後に眼球を摘出し、移植部位にマーキングした後、カルノア液(組成:クロロホルム:エタノール:酢酸=6:3:1)で4時間固定した。固定後エタノールで脱水し、キシレンに透徹した後、パラフィンに包埋し、厚さ4 μ mで、連続切片を作製した。視神経を含む切片で評価を行い、移植側はマーキングにより確認し、周辺部、中間部、中心部合計6か所の部位で、視細胞の核と考えられる外顆粒層の核の数を100 μ mに渡り計測した。網膜幹細胞移植眼では、移植後4週(図31A, B)と8週(図31C, D)のいずれも外顆粒層の細胞数は、sham手術眼とは有意差が認められず、効果は限定的であった。移植細胞による奇形腫などの腫瘍の発生は認められなかった。一方、骨髄間質細胞移植眼では、移植4週(図31E, F)および8週後(図31G, H)の移植側網膜の周辺部外顆粒層の細胞数が、sham手術眼の網膜に比べて有意に残存しており、移植した細胞が視細胞の変性を抑制したことが考えられた。骨髄間質細胞を移植した眼においても、奇形腫などの腫瘍形成は認められなかった。実際に移植された細胞は、4週後に組織切片にて網膜下に確認された。また正常な組織の修復は認められるが、手術操作あるいは免疫拒絶反応による炎症所見は認められなかった。さらに、幹細胞移植後5週と移植後8週の移植眼とsham手術眼の網膜機能を比較検討するため、網膜電図(ERG)を施行した。ここでは、RCSラットにおける網膜機能を電気生理学的に評価するため、RCSラットERGのstage分類を行った。Stage 0では、a波、b波、律動様小波が正常にみられる。その後、まずa波の振幅が減弱するstage 1、b波の振幅の減弱が認められるstage 2、a波とb波は消失し oscillatory potential

(OP)波だけが残るstage 3となる。その後、scotopic threshold response(STR)と呼ばれる陰性波が残るstage 4、その陰性波の振幅も減弱したstage 5、最後には平坦型stage 6となる(表2)。移植後5週(図32A, B)および8週(図32C, D)のERGの代表例を示す。図32はA, Cがsham手術眼、B, Dが骨髄間質細胞移植眼のERGである。移植後5週(9週齢)では、sham手術眼では、陽性b波は1眼も認められず、6眼中1眼がstage 3、残りの5眼ではOP波も認められず、すべてSTRが認められたstage 4であった(図32A)。移植眼においては、6眼中3眼で陽性b波が認められたstage 2、6眼中3眼では、さらに進行し、見かけ上陽性波、陰性波ともに認めず、OP波だけが記録されたstage 3であった(図32B)。移植後8週(12週齢)では、sham手術眼ではOP波は認められず、5眼中3眼でSTRが認められ(stage 4)、他の2眼ではさらに機能の減弱が認められたstage 5であった(図32C)。移植眼においては、5眼中1眼でstage 2、3眼は陽性b波が消失したstage 3、残りの1眼ではSTRが認められたstage 4であった(図32D)。このように、ERGのstageは、移植後5週、および8週においても、移植眼がsham手術眼より有意に良好であった。

本研究においては、家兎毛様体上皮細胞由来網膜幹/前駆細胞をRCSラットに網膜下に移植し、組織学的に検討した。その結果、視細胞のマーカーを発現している細胞は確認できず、また、移植細胞からの網膜色素上皮細胞への分化も確認できなかった。さらに、移植眼における網膜視細胞数はsham手術眼と有意な差を認めなかった。Chackoら¹⁰⁶⁾は、網膜変性症モデルラット(RCSラット)へラット毛様体上皮細胞由来網膜幹/前駆細胞を移植し、移植された細胞は網膜内に生着し、視細胞特異的な蛋白質であるopsinの発現は認めるが、形態学的に成熟な網膜細胞への分化は確認できず、総じて球形で形態分化が不十分であると報告しており、移植眼における機能的な回復は報告していない。同様に、中枢神経幹細胞の網膜への移植においては、移植された細胞は網膜組織において生着はするが、網膜細胞に特異的な蛋白質の発現には至らず、網膜細胞への分化は不十分であると報告されている¹⁰¹⁾¹⁰²⁾。さらに、胚性幹細胞¹⁰⁷⁾¹⁰⁸⁾や胎仔マウス脊髄細胞¹⁰⁹⁾を網膜に移植した報告も存在するが、いずれの細胞を移植した報告においても視細胞への分化は認められていない。唯一、視細胞への分化およびシナプスの形成の報告があるのは、骨髄間質細胞を視細胞に分化誘導して移植した報告¹¹⁰⁾であり、今後の追試の結果、および研究の発展が期待される。毛様体由来の網膜幹/前駆細胞は、*in vitro*でも網膜細胞のマーカーは発現するものの、神経細胞分化誘導に通常用いられるような条件では形態学的には分化が十分とはいえず、成熟した網膜細胞へと分化するためには内因性の因

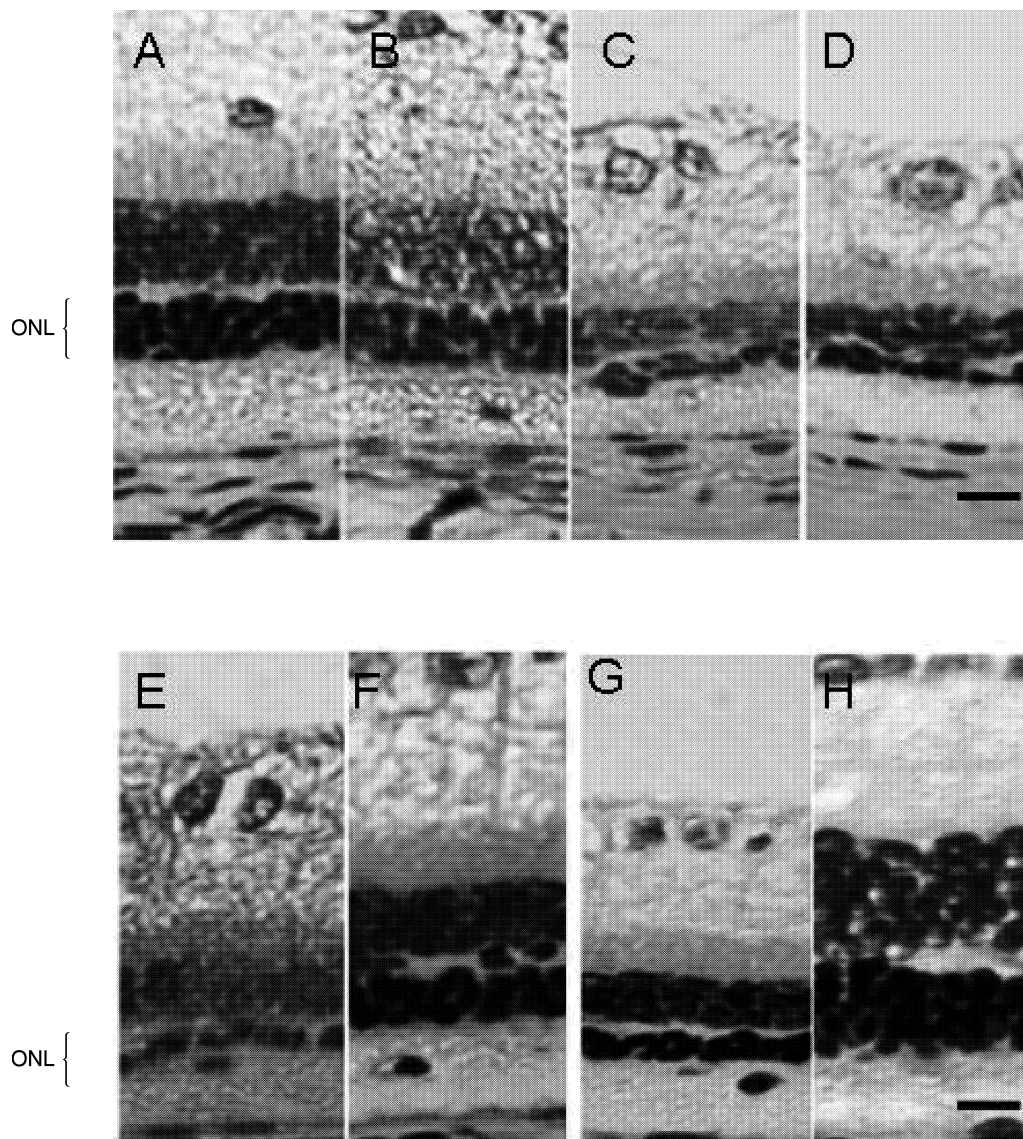


図 31 網膜幹/前駆細胞または骨髄間質細胞の Royal College of Surgeons (RCS) ラット網膜下移植。
 A～D：成体家兎網膜幹/前駆細胞移植後の RCS ラットの移植側周辺部網膜の組織切片。移植後 4 週の sham 手術眼 (A)，移植眼 (B)，8 週の sham 手術眼 (C)，移植眼 (D) の組織切片である。週齢が増加するに従い，網膜変性の進行が認められる。移植後 4 週 (8 週齢) では，外顆粒層 (ONL) の細胞は 4 列，移植後 8 週 (12 週齢) では，2 列程度と減少が認められた。移植眼と sham 手術眼における著明な違いは認められなかった。
 E～H：マウス骨髄間質細胞移植後の RCS ラットの移植側周辺部網膜の組織切片。移植後 4 週の sham 手術眼 (E)，移植眼 (F)，8 週の sham 手術眼 (G)，移植眼 (H) の組織切片である。移植眼と sham 手術眼では，ONL の残存している核の列の数に差が存在し，移植眼の外顆粒層がより厚くなっているのが分かる。週齢が増加するに従い，網膜変性は進行が認められる。染色はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。バーは $10\ \mu\text{m}$ 。

表 2 RCS ラットの ERG stage 分類

stage	基準
0	a 波 $200\ \mu\text{V}$ 以上，b 波 $500\ \mu\text{V}$ 以上
1	a 波 $200\ \mu\text{V}$ 未満，b 波 $250\ \mu\text{V}$ 以上
2	b 波 $50\ \mu\text{V}$ 以上 $250\ \mu\text{V}$ 未満
3	b 波 $50\ \mu\text{V}$ 未満で律動様小波が認められる
4	律動様小波が認められず STR が $30\ \mu\text{V}$ 以上
5	律動様小波が認められず STR が $30\ \mu\text{V}$ 未満だがわずかでも認められる
6	波形が全く認められない

STR : scotopic threshold response

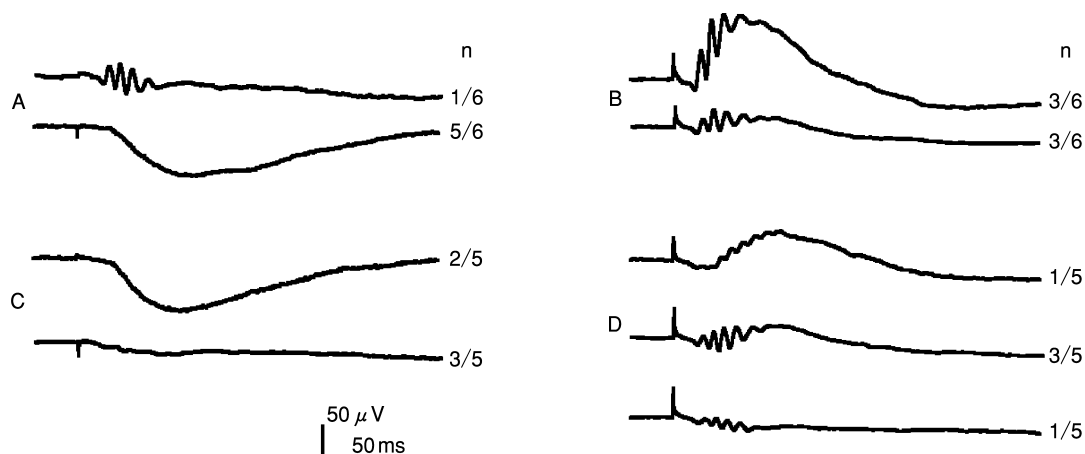


図 32 骨髄間質細胞移植後の RCS ラット ERG.

移植後 5 週(A, B)および 8 週(C, D)の RCS ラット網膜機能を網膜電図(ERG)で評価した。A, C が sham 手術眼, B, D が骨髄間質細胞移植眼の ERG である。移植後 5 週(9 週齢)では, sham 手術眼では, 陽性 b 波は 1 眼も認められず, 6 眼中 1 眼が stage 3, 残りの 5 眼では OP 波も認められず, すべて STR が認められた stage 4 であった(A)。移植眼においては, 6 眼中 3 眼で陽性 b 波が認められた stage 2, 6 眼中 3 眼では, さらに進行し, 見かけ上陽性波, 陰性波ともに認めず, OP 波だけが記録された stage 3 であった(B)。移植後 8 週(12 週齢)では, sham 手術眼では OP 波は認められず, 5 眼中 3 眼で STR が認められ (stage 4), 他の 2 眼ではさらに機能の減弱が認められた stage 5 であった(C)。移植眼においては, 5 眼中 1 眼で stage 2, 3 眼は陽性 b 波が消失した stage 3, 残りの 1 眼では STR が認められた stage 4 であった(D)。

子が不足している可能性が指摘されている¹⁰⁶⁾。この報告と今回の結果を考えあわせると, 毛様体上皮由来網膜幹/前駆細胞を網膜下に移植するだけでは網膜視細胞への形態学および機能的な最終分化は困難であり, 遺伝子操作や外因性の分化誘導因子による視細胞分化への検討が今後の課題であると考えられた。一方, 骨髄間質細胞を用いた本研究の結果では, *in vitro* で網膜視細胞に対する増殖促進効果もしくは細胞生存維持効果が認められたのみならず, RCS ラット網膜下移植により組織学および電気生理学的に, 移植眼において視細胞の変性が抑制されることが示された。幹細胞の細胞移植療法によって RCS ラットの視細胞変性を抑制したという報告はなく, 本研究における報告が最初の報告である。これまでに, 免疫細胞化学的方法および RT-PCR を用いた検討によって骨髄間質細胞が視細胞へ分化するという報告¹¹⁰⁾が存在する。しかしながら Crx-*lacZ* マウス骨髄より取得した細胞を用いた我々の検討結果からは, β -gal 陽性の視細胞は通常の培養系では得ることができなかった。また, 今回取得した骨髄由来の細胞は脂肪細胞, 骨芽細胞, 神経細胞への分化能力が存在することから, これまでに報告されている骨髄間質細胞の性質を満たしていると考えられた。これらの結果から, 我々の実験系においては骨髄間質細胞が *in vitro* および *in vivo* で網膜細胞へと分化する可能性は低いと考えられた。我々の検討では, *in vitro* で培養上清を添加するのみで視細胞数の増加が認められ, 移植眼においては移植部位のみならずその周辺部まで視細胞保護効果を認めることなどか

ら, *in vivo* での網膜変性抑制作用は, 移植細胞から放出される因子の残存している視細胞に対する変性抑制作用によるものではないかと推察された。幹細胞の移植においては移植した細胞が未分化であるほど, 移植細胞による奇形腫など腫瘍の形成の危険が高まる。胚性幹細胞をマウス皮下に注入すると奇形腫が形成されることが知られている。本研究では, 家兔毛様体上皮由来網膜幹/前駆細胞およびマウス骨髄間質細胞を網膜下に移植を行ったが, 奇形腫などの腫瘍形成は認められなかった。また, シクロスポリンを使用し免疫抑制を行った結果, 免疫拒絶を疑わせる炎症反応も認められなかった。移植眼においても視細胞の変性は経時的な進行が認められ, 細胞移植の効果は現時点では未だに限定的であると思われる。今後は, 骨髄間質細胞の放出する変性抑制作用を有する因子の同定, および変性抑制の機序の解明が必要である。さらに, 他の網膜変性モデル動物においても, 骨髄間葉系細胞の移植によって網膜変性の進行抑制効果が認められるか, そして本研究ではマウス骨髄間質細胞を使用したか, 今後はヒト骨髄間質細胞にも視細胞に対する保護作用があるか否かの検討が必要であると考えられた。

以上, マウス骨髄間葉系幹細胞の網膜変性抑制効果について検討した。まず, Crx-*lacZ* マウス培養網膜細胞に対して, 培養上清を添加することにより, 網膜細胞および視細胞の生存率は, 有意に高値となっていた。さらに, RCS ラットに対して, 網膜下移植により, 組織学的, および電気生理学的に網膜変性は抑制されていた。

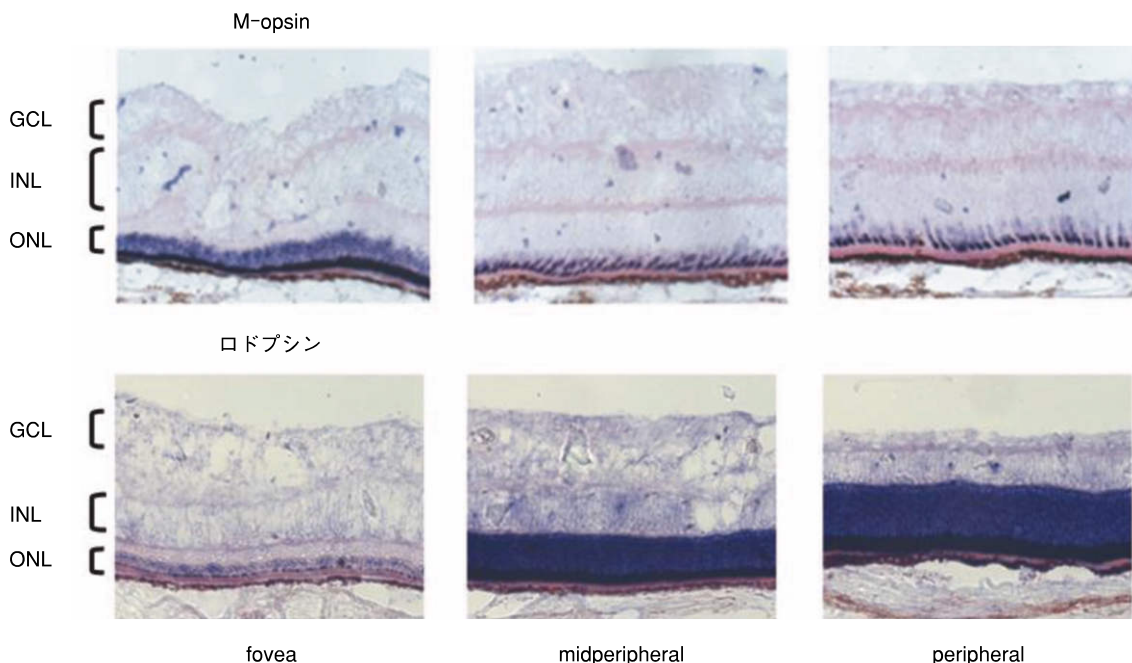


図 33 対照として用いた遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション。

錐体特異的に発現することが既知の遺伝子である錐体オプシン(M-opsin, 上段)では, 末梢ではまばらで, 黄斑部では強い発現が認められ, 杆体特異的に発現することが既知であるロドプシン(下段)では, 錐体オプシンとは逆に黄斑部ではまばらで, 周辺部では強い発現が認められた。これらを対照として用い, 特に網膜視細胞における発現パターンが錐体細胞と一致する遺伝子をスクリーニングした。ONL; outer nuclear layer, INL; inner nuclear layer, GCL; ganglion cell layer

このように, 骨髄間葉系幹細胞は網膜変性疾患に対する細胞移植療法の細胞ソースとなり得ることが示唆されたが, AMDにおける網膜障害に対する治療にも応用できる可能性があり, 現在, その網膜変性抑制機序を解析中である。

VI サル黄斑に高発現する遺伝子群の同定

網膜視細胞の発生にかかわる分子機能はこれまで数多くの報告がある。例えば, ホメオボックス遺伝子である *Crx* は視細胞の発生に必須であり¹¹⁰⁾¹¹²⁾, 常染色体優性網膜色素変性症, II型錐体杆体ジストロフィー, レーベル先天盲の原因遺伝子になることが知られている^{113)~116)}。また, 網膜の発生過程で *Crx* の上流因子として働く *Otx 2* が, 網膜視細胞の発生, 分化に必要かつ十分であることが明らかになった¹¹⁷⁾。さらに, *Crx*, *Otx 2* などの分子を利用して, 未分化な状態である胚性幹細胞や網膜前駆細胞から視細胞へと分化を誘導する試みがなされており¹¹⁸⁾, 将来的に網膜の再生医療へとつながる研究として注目されている。しかし, ヒトをはじめとする霊長類の視力に決定的な影響を与えるのは黄斑部網膜の機能である。我々は, AMDなどの黄斑疾患に対する視機能の回復を考えるうえで, 黄斑構造の発生の分子機構を理解することが必要であると考えている。これまで, *Pax 6* の splicing variant である *Pax 6(5a)* が黄斑形成に関与するという報告がある¹¹⁹⁾ものの, 黄斑形成の分

子機構の詳細は未だ明らかになっていない。その理由のひとつとして, 黄斑構造をもつモデル動物が限られていることが挙げられる。そこで我々は, 生理学的な実験に汎用されるアカゲザルの網膜を使用し, 発生期のサルの黄斑部に発現する遺伝子群の同定を試みた。

胎生後期あるいは出生直後のアカゲザルの網膜を, 黄斑部とそれ以外の周辺部に分けて採取し, 全 RNA を単離し, サルの遺伝子を網羅したジーンチップ(Gene-Chip® Rhesus Macaque Genome Array, Affymetrix社, 52,024 probe sets)を用いマイクロアレイ解析を行った。また, 周辺部と比較して黄斑部に強く発現する遺伝子を選び, 次にこれらの遺伝子群について網膜のどの部位に発現がみられるかを検討するために *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。成体アカゲザルの眼球を4%パラホルムアルデヒドで固定した後, OCT compoundで包埋し, 14 μm の厚さで網膜凍結切片を作製した。プローブは, それぞれの遺伝子について約500 bpの長さに設計し, アカゲザルの網膜の全 RNA から RT-PCRにより得られたものを使用した。この際, ロドプシンあるいは錐体オプシンを対照に使用して, 特に網膜視細胞における発現パターンが錐体細胞と一致する遺伝子をスクリーニングした(図33)。その結果, いくつかの遺伝子がサル黄斑部で高発現していることが確認された。また, さらに, スクリーニングした遺伝子の中から実際にマウスにも保存されている遺伝子について

は、マウスの網膜を使用した実験により、遺伝子の機能を解析中である。

本研究によって、黄斑形成にかかわる遺伝子、あるいは錐体細胞特異的に発現する遺伝子群を同定することができると考えている。また、これらの遺伝子が黄斑構造、錐体細胞の発生のメカニズムの解明、さらには視機能の向上を目指す再生医療の分野で役立つのではないかと期待される。

VII 結 語

以上、CNV に対する抗血管新生療法および障害された網膜の再生という観点から、AMD の新規治療法の開発を目的とした研究結果について述べた。まず、CNV に対する抗血管新生療法として、高分子ミセルは CNV へのドラッグデリバリーシステムとして有用であり、デンドリマー型光増感剤を内包した高分子ミセルを用いることにより高効率かつ安全性の高い PDT が可能となり得ることが示された。次に、DNA/ペプチド複合体がデンドリマー型光増感剤の外殻に覆われた新規三元系コンプレックスを調製し、ラット生体眼において光線照射部位に特異的なレポーター遺伝子の発現上昇を認め、光線照射により眼組織への遺伝子導入を制御可能な遺伝子キャリアとなり得ることが示された。本システム(光応答性遺伝子導入法)は、今後 AMD 眼に対する遺伝子治療への応用が期待し得る。さらに、リポフスチン構成成分 A2E が RAR α を介して滲出型 AMD の発症に関連した RPE 表現型の変化を来す原因物質のひとつであり、CNV 発生を予防する新しいターゲットになり得ることが明らかとなった。AMD 眼において障害された網膜の再生医療に関する基礎的検討として、骨髄間葉系幹細胞を RCS ラット網膜下に移植することにより、組織学および電気生理学的に網膜変性を抑制し得ることが示され、細胞移植療法の細胞ソースとなり得ることが示唆された。さらに、サル黄斑に高い発現をする遺伝子群をスクリーニングすることにより、黄斑形成にかかわる遺伝子あるいは錐体細胞特異的に発現する遺伝子群を同定し得る可能性があることについて述べた。以上、CNV に対する抗血管新生および障害された黄斑網膜の再生という両面からのアプローチは、未だ失明原因の上位疾患である AMD 患者の視機能回復に必須であると考えられる。今回得られた研究結果を AMD の治療に臨床応用するためには未だ多くのステップを要するが、AMD による失明の減少の一助となるよう、今後さらに検討を重ねていきたいと考えている。

稿を終えるにあたって、宿題報告の機会を賜りました日本眼科学会評議員各位、日本眼科学会会員各位、ならびに第 110 回日本眼科学会総会長の太西克尚教授(和歌山県立医科大学)、座長の労をお取りいただいた吉村長久教授(京都大

学)に心より深謝申し上げます。

本研究は、文部科学省科学研究費補助金および厚生労働省科学研究費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 18 年 4 月に開催された第 110 回日本眼科学会総会の宿題報告講演において発表した内容に基づいて執筆した。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中のため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) Ferris FL 3rd, Fine SL, Hyman L : Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. Arch Ophthalmol 102 : 1640—1642, 1984.
- 2) Bressler NM, Bressler SB, Fine SL : Age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 32 : 375—413, 1988.
- 3) Oshima Y, Ishibashi T, Murata T, Tahara Y, Kiyohara Y, Kubota T : Prevalence of age related maculopathy in a representative Japanese population ; the Hisayama study. Br J Ophthalmol 85 : 1153—1157, 2001.
- 4) Miyazaki M, Nakamura H, Kubo M, Kiyohara Y, Oshima Y, Ishibashi T, et al : Risk factors for age related maculopathy in a Japanese population : the Hisayama study. Br J Ophthalmol 87 : 469—472, 2003.
- 5) Macular Photocoagulation Study Group : Subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Guidelines for evaluation and treatment in the macular photocoagulation study. Arch Ophthalmol 109 : 1242—1257, 1991.
- 6) Myint K, Armbrecht AM, Mon S, Dhillon B : Transpupillary thermotherapy for the treatment of occult CNV in age-related macular degeneration : a prospective randomized controlled pilot study. Acta Ophthalmol Scand 84 : 328—332, 2006.
- 7) Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group : Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin : one-year results of 2 randomized clinical trials-TAP report 1. Arch Ophthalmol 117 : 1329—1345, 1999.
- 8) Verteporfin in Photodynamic Therapy Study Group : Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia with verteporfin. 1-year results of a randomized clinical trial-VIP report no. 1. Ophthalmology 108 : 841—852, 2001.

- 9) **Verteporfin Roundtable Participants** : Guidelines for using verteporfin (Visudyne) in photodynamic therapy for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration and other causes : update. *Retina* 25 : 119—134, 2005.
- 10) **Japanese Age-Related Macular Degeneration Trial (JAT) Study Group** : Japanese age-related macular degeneration trial : 1-year results of photodynamic therapy with verteporfin in Japanese patients with subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 136 : 1049—1061, 2003.
- 11) **The Eyetech study group** : Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Phase II study results. *Ophthalmology* 110 : 979—986, 2003.
- 12) **Heier JS, Antoszyk AN, Pavan PR, Leff SR, Rosenfeld PJ, Ciulla TA, et al** : Ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration : a phase I/II multicenter, controlled, multidose study. *Ophthalmology* 113 : 642.e1—4, 2006.
- 13) **D'Amico DJ, Goldberg MF, Hudson H, Jerdan JA, Krueger S, Luna S, et al** : Anecortave acetate as monotherapy for the treatment of subfoveal lesions in patients with exudative age-related macular degeneration (AMD) : interim (month 6) analysis of clinical safety and efficacy. *Retina* 23 : 14—23, 2003.
- 14) **Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, Klein ML, Holz E, Frank RN, et al** : Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration : results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 17 : 167—176, 2006.
- 15) **Thomas MA, Grand MG, Williams DF, Lee CM, Pesin SR, Lowe MA** : Surgical management of subfoveal choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 99 : 952—968, 1992.
- 16) **Au Eong KG, Pieramici DJ, Fujii GY, Ng EW, Humayun MS, Maia M, et al** : Macular translocation : unifying concepts, terminology, and classification. *Am J Ophthalmol*. 131 : 244—253, 2001.
- 17) **Binder S, Stolba U, Krebs I, Kellner L, Jahn C, Feichtinger H, et al** : Transplantation of autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration : a pilot study. *Am J Ophthalmol* 133 : 215—225, 2002.
- 18) **Thumann G, Aisenbrey S, Schraermeyer U, Lafaut B, Esser P, Walter P, et al** : Transplantation of autologous iris pigment epithelium after removal of choroidal neovascular membranes. *Arch Ophthalmol* 118 : 1350—1355, 2000.
- 19) **Michels S, Wachtlin J, Gamulescu MA, Heimann H, Prunte C, Inhoffen W, et al** : Comparison of early retreatment with the standard regimen in verteporfin therapy of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 112 : 2070—2075, 2005.
- 20) **Kaiser PK** : Verteporfin therapy in combination with triamcinolone : published studies investigating a potential synergistic effect. *Curr Med Res Opin* 21 : 705—713, 2005.
- 21) **Hashida M, Sezaki H** : Pharmaceutical, immunological and medical aspects. In : Davis SS, et al (Eds) : *Microspheres and Drug Therapy*. Elsevier, Amsterdam, 281—293, 1984.
- 22) **Sezaki H, Hashida M** : Macromolecule-drug conjugates in targeted cancer chemotherapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1 : 1—38, 1984.
- 23) **Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y** : Block copolymer micelles for drug delivery : design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev* 47 : 113—131, 2001.
- 24) **Kakizawa Y, Kataoka K** : Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv Drug Deliv Rev* 54 : 203—222, 2002.
- 25) **Matsumura Y, Maeda H** : A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy : mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46 : 6387—6392, 1986.
- 26) **Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, Suzuki M, Matsumura Y, Yokoyama M, et al** : Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J Control Release* 74 : 295—302, 2001.
- 27) **Nishiyama N, Kato Y, Sugiyama Y, Kataoka K** : Cisplatin-loaded polymer-metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery system. *Pharm Res* 18 : 1035—1041, 2001.
- 28) **Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Fukushima S, et al** : Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(beta-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles : their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J Control Release* 64 : 143—153, 2000.
- 29) **Nishiyama N, Kataoka K** : Polymeric micelle drug carrier systems : PEG-PAsp(Dox) and second generation of micellar drugs. *Adv Exp Med Biol* 519 : 155—177, 2003.
- 30) **Kimura H, Yasukawa T, Tabata Y, Ogura Y** : Drug targeting to choroidal neovascularization. *Adv Drug Deliv Rev* 52 : 79—91, 2001.
- 31) **Harada A, Kataoka K** : Formation of Polyion Complex Micelles in an Aqueous Milieu from a Pair of Oppositely-Charged Block Copolymers

- with Poly(ethylene glycol) Segments. *Macromolecules* 28 : 5294—5299, 1995.
- 32) **Yanagi Y, Tamaki Y, Obata R, Muranaka K, Homma N, Matsuoka H**, et al : Subconjunctival administration of buccillamine suppresses choroidal neovascularization in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 3495—3499, 2002.
 - 33) **Yanagi Y, Tamaki Y, Inoue Y, Obata R, Muranaka K, Homma N** : Subconjunctival doxifluridine administration suppresses rat choroidal neovascularization through activated thymidine phosphorylase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 751—754, 2003.
 - 34) **Ideta R, Yanagi Y, Tamaki Y, Tasaka F, Harada A, Kataoka K** : Effective accumulation of polyion complex micelle to experimental choroidal neovascularization in rats. *FEBS Lett* 557 : 21—25, 2004.
 - 35) **Yasukawa T, Kimura H, Tabata Y, Miyamoto H, Honda Y, Ikada Y**, et al : Targeted delivery of anti-angiogenic agent TNP-470 using water-soluble polymer in the treatment of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2690—2696, 1999.
 - 36) **Harada A, Kataoka K** : Pronounced activity of enzymes through the incorporation into the core of polyion complex micelles made from charged block copolymers. *J Control Release* 72 : 85—91, 2001.
 - 37) **Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A, Takamisawa I, Shimokado K, Kataoka K** : Polyion complex micelles as vectors in gene therapy--pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther* 9 : 407—414, 2002.
 - 38) **Harada A, Togawa H, Kataoka K** : Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligodeoxynucleotides entrapped in the core of polyion complex micelles composed of poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymers. *Eur J Pharm Sci* 13 : 35—42, 2001.
 - 39) **MacDonald IJ, Dougherty TJ** : Basic principles of photodynamic therapy. Review. *J Porphyrins Phthalocyanines* 5 : 105—129, 2001.
 - 40) **Tomioaka N, Takasu D, Takahashi T, Aida T** : Electrostatic assembly of dendrimer electrolytes : negatively and positively charged dendrimer porphyrins *Angew Chem Int Ed Engl* 37 : 1531—1534, 1998.
 - 41) **Jang WD, Nishiyama N, Zhang GD, Harada A, Jiang DL, Kawachi S**, et al : Supramolecular nanocarrier of anionic dendrimer porphyrins with cationic block copolymers modified with polyethylene glycol to enhance intracellular photodynamic efficacy. *Angew Chem Int Ed* 44 : 419—423, 2005.
 - 42) **Nishiyama N, Stapert HR, Zhang GD, Takasu D, Jiang DL, Nagano T**, et al : Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioconjug Chem* 14 : 58—66, 2003.
 - 43) **Hawker CJ, Frechet JMJ** : Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J Am Chem Soc* 112 : 7638—7647, 1990.
 - 44) **Sato T, Jiang DL, Aida T** : A blue-luminescent dendritic rod : poly(phenyleneethynylene) within a light-harvesting dendritic envelope. *J Am Chem Soc* 121 : 10658—10659, 1999.
 - 45) **Stapert HR, Nishiyama N, Jiang DL, Aida T, Kataoka K** : Polyion complex micelles encapsulating light-harvesting ionic dendrimer zinc porphyrins. *Langmuir* 16 : 8182—8188, 2000.
 - 46) **Harada A, Kataoka K** : Chain length recognition : core-shell supramolecular assembly from oppositely charged block copolymers. *Science* 283 : 65—67, 1999.
 - 47) **Ideta R, Tasaka F, Jang WD, Nishiyama N, Zhang GD, Harada A**, et al : Nanotechnology-based photodynamic therapy for neovascular disease using a supramolecular nanocarrier loaded with a dendritic photosensitizer. *Nano Lett* 5 : 2426—2431, 2005.
 - 48) **Zacks DN, Ezra E, Terada Y, Michaud N, Connolly E, Gragoudas ES**, et al : Verteporfin photodynamic therapy in the rat model of choroidal neovascularization : angiographic and histologic characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2384—2391, 2002.
 - 49) **Palmowski AM, Allgayer R, Heinemann-Vernaleken B, Ruprecht KW** : Influence of photodynamic therapy in choroidal neovascularization on focal retinal function assessed with the multifocal electroretinogram and perimetry. *Ophthalmology* 109 : 1788—1792, 2002.
 - 50) **Moschos MN, Panayotidis D, Moschos MM, Bouros C, Theodossiadis PG, Theodossiadis GP** : A preliminary assessment of macular function by MF-ERG in myopic eyes with CNV with complete response to photodynamic therapy. *Eur J Ophthalmol* 13 : 461—467, 2003.
 - 51) **Lai TY, Chan WM, Lam DS** : Transient reduction in retinal function revealed by multifocal electroretinogram after photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol* 137 : 826—833, 2004.
 - 52) **Reinke MH, Canakis C, Husain D, Michaud N, Flotte TJ, Gragoudas ES**, et al : Verteporfin photodynamic therapy retreatment of normal retina and choroid in the cynomolgus monkey. *Ophthalmology* 106 : 1915—1923, 1999.
 - 53) **Husain D, Kramer M, Kenny AG, Michaud N, Flotte TJ, Gragoudas ES**, et al : Effects of photodynamic therapy using verteporfin on experimental choroidal neovascularization and

- normal retina and choroid up to 7 weeks after treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2322—2331, 1999.
- 54) **Tzekov R, Lin T, Zhang KM, Jackson B, Oyejide A, Orilla W, et al** : Ocular changes after photodynamic therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 377—385, 2006.
 - 55) **Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al** : A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo* : polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 7297—7301, 1995.
 - 56) **Høggset A, Prasmickaite L, Tjelle TE, Berg K** : Photochemical transfection : a new technology for light-induced, site-directed gene delivery. *Hum Gene Ther* 11 : 869—880, 2000.
 - 57) **Høggset A, Prasmickaite L, Selbo PK, Hellum M, Engesaeter BO, Bonsted A, et al** : Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56 : 95—115, 2004.
 - 58) **Macdonald IJ, Dougherty TJ** : Basic principle of photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines* 5 : 105—129, 2001.
 - 59) **Nishiyama N, Iriyama A, Jang WD, Miyata K, Itaka K, Inoue Y, et al** : Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer *Nat Mater* 4 : 934—941, 2005.
 - 60) **Curcio CA, Millican CL** : Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 117 : 329—339, 1999.
 - 61) **Lip PL, Blann AD, Hope-Ross M, Gibson JM, Lip GY** : Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmology* 108 : 705—710, 2001.
 - 62) **Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Matsumura M, Honda Y** : Expressions of angiopoietins and Tie 2 in human choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1912—1920, 1999.
 - 63) **Holekamp NM, Bouck N, Volpert O** : Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 134 : 220—227, 2002.
 - 64) **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.
 - 65) **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.
 - 66) **Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, et al** : An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2-or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 9 : 1390—1397, 2003.
 - 67) **Sparrow JR, Zhou J, Ben-Shabat S, Vollmer H, Itagaki Y, Nakanishi K** : Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1222—1227, 2002.
 - 68) **Klein R, Klein BE, Tomany SC, Moss SE** : Ten-year incidence of age-related maculopathy and smoking and drinking : the Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol* 156 : 589—598, 2002.
 - 69) **Stone EM, Sheffield VC, Hageman GS** : Molecular genetics of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 10 : 2285—2292, 2001.
 - 70) **Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, et al** : Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 227 : 1805—1807, 1997.
 - 71) **Abecasis GR, Yashar BM, Zhao Y, Ghasvand NM, Zareparsari S, Branham KE** : Age-related macular degeneration : a high-resolution genome scan for susceptibility loci in a population enriched for late-stage disease. *Am J Hum Genet* 74 : 482—494, 2004.
 - 72) **Stone EM, Braun TA, Russell SR, Kuehn MH, Lotery AJ, Moore PA** : Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 351 : 346—353, 2004.
 - 73) **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. *Arch Ophthalmol* 119 : 1417—1436, 2001.
 - 74) **Fine SL, Berger JW, Maguire MG, Ho AC** : Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 342 : 483—492, 2000.
 - 75) **Holz FG, Schutt F, Kopitz J, Eldred GE, Kruse FE, Volcker HE, et al** : Inhibition of lysosomal degradative functions in RPE cells by a retinoid component of lipofuscin. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 40 : 737—743, 1999.
 - 76) **Eldred GE, Lasky MR** : Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. *Nature* 361 : 724—726, 1993.
 - 77) **Eldred GE, Miller GV, Stark WS, Feeney-Burns L** : Lipofuscin : resolution of discrepant fluorescence data. *Science* 216 : 757—759, 1982.
 - 78) **Sparrow JR, Parish CA, Hashimoto M, Nakanishi K** : A2E, a lipofuscin fluorophore, in

- human retinal pigmented epithelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2998—2995, 1999.
- 79) **Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA** : The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1981—1989, 2000.
- 80) **Sparrow JR, Boulton M** : RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res* 80 : 595—606, 2005.
- 81) **Akiyama H, Tanaka T, Maeno T, Kanai H, Kimura Y, Kishi S, et al** : Induction of VEGF gene expression by retinoic acid through Sp 1-binding sites in retinoblastoma Y 79 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1367—1374, 2002.
- 82) **Chen JT, Liang JB, Chou CL, Shyu RC, Lu DW** : Retinoic acid induces VEGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19). *J Ocul Pharmacol Ther* 21 : 413—419, 2005.
- 83) **Temple S** : The development of neural stem cells. *Nature* 414 : 112—117, 2001.
- 84) **Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ** : Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287 : 2032—2036, 2000.
- 85) **Ahmad I, Tang L, Pham H** : Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 270 : 517—521, 2000.
- 86) **Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al** : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 : 41—49, 2002.
- 87) **Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al** : Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3 : 778—784, 2001.
- 88) **Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, et al** : Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 22 : 1115—1124, 2004.
- 89) **Li H, Liu H, Heller S** : Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9 : 1293—1299, 2003.
- 90) **Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, et al** : Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 164 : 247—256, 2000.
- 91) **Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al** : Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat : Neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59 : 514—523, 2002.
- 92) **Chen X, Katakowski M, Li Y, Chen X, Wang L, Lu D, et al** : Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts : Growth factor production. *J Neurosci Res* 69 : 687—691, 2002.
- 93) **Chen Q, Long Y, Yuan X, Zou L, Sun J, Chen S, et al** : Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain : Synthesis of neurotrophic factors. *J Neurosci Res* 80 : 611—619, 2005.
- 94) **Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S** : A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12 : 4565—4574, 1992.
- 95) **Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF, et al** : Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* 19 : 3287—3297, 1999.
- 96) **Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, Okochi H** : Characterization of multipotent adult stem cells from the skin : Transforming growth factor-beta (TGF-beta) facilitates cell growth. *Exp Cell Res* 295 : 194—203, 2004.
- 97) **Inoue Y, Yanagi Y, Tamaki Y, Uchida S, Kawase Y, Araie M, et al** : Clonogenic analysis of ciliary epithelial derived retinal progenitor cells in rabbits. *Exp Eye Res* 81 : 437—445, 2005.
- 98) **Takai K, Hara J, Matsumoto K, Hosoi G, Osugi Y, Tawa A, et al** : Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis. *Blood* 89 : 1560—1565, 1997.
- 99) **Dexter TM** : Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl* 1 : 87—94, 1982.
- 100) **Furukawa A, Koike C, Lippincott P, Cepko CL, Furukawa T** : The mouse Crx 5'-upstream transgene sequence directs cell-specific and developmentally regulated expression in retinal photoreceptor cells. *J Neurosci* 22 : 1640—1647, 2002.
- 101) **Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FH** : Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci* 12 : 340—348, 1998.
- 102) **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.
- 103) **D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, et al** : Mutation of the receptor tyrosine kinase gene MERTK in the

- retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* 9 : 645—651, 2000.
- 104) **Silverman MS, Hughes SE** : Photoreceptor rescue in the RCS rat without pigment epithelium transplantation. *Curr Eye Res* 9 : 183—191, 1990.
- 105) **Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM** : Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347 : 83—86, 1990.
- 106) **Chacko DM, Das AV, Zhao X, James J, Bhattacharya S, Ahmad I** : Transplantation of ocular stem cells : The role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. *Vision Res* 43 : 937—946, 2003.
- 107) **Hara A, Niwa M, Kunisada T, Yoshimura N, Katayama M, Kozawa O, et al** : Embryonic stem cells are capable of generating a neuronal network in the adult mouse retina. *Brain Res* 999 : 216—221, 2004.
- 108) **Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, Kirk MD** : Neural differentiation of mouse embryonic stem cells *in vitro* and after transplantation into eyes of mutant mice with rapid retinal degeneration. *Brain Res* 1014 : 131—144, 2004.
- 109) **Pressmar S, Ader M, Richard G, Schachner M, Bartsch U** : The fate of heterotopically grafted neural precursor cells in the normal and dystrophic adult mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 3311—3319, 2001.
- 110) **Kicic A, Shen WY, Wilson AS, Constable IJ, Robertson T, Rakoczy PE** : Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci* 23 : 7742—7749, 2003.
- 111) **Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL** : Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91 : 531—541, 1997.
- 112) **Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC, Cepko CL** : Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat Genet* 23 : 466—470, 1999.
- 113) **Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, Ploder L, et al** : Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* 91 : 543—553, 1997.
- 114) **Sohocki MM, Sullivan LS, Mintz-Hittner HA, Birch D, Heckenlively JR, Freund CL, et al** : A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene. *Am J Hum Genet* 63 : 1307—1315, 1998.
- 115) **Sohocki MM, Daiger SP, Bowne SJ, Rodriguez JA, Northrup H, Heckenlively JR, et al** : Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies. *Hum Mutat* 17 : 42—51, 2001.
- 116) **Swaroop A, Wang QL, Wu W, Cook J, Coats C, Xu S, et al** : Leber congenital amaurosis caused by a homozygous mutation (R 90 W) in the homeodomain of the retinal transcription factor CRX : direct evidence for the involvement of CRX in the development of photoreceptor function. *Hum Mol Genet* 8 : 299—305, 1999.
- 117) **Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, et al** : Otx 2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6 : 1255—1263, 2003.
- 118) **Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, Mizuseki K, Haraguchi T, Miyoshi H, et al** : Generation of Rx⁺/Pax 6⁺ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 11331—11336, 2005.
- 119) **Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, et al** : The Pax 6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Human Mol Genet* 14 : 735—745, 2005.
-

Comment : 本田 孔士

前半は、いくつかのミセル体(ミセル体というと、我々は角膜透明性に関する David Maurice の名前を思い出すが、また、詳しい構造名を書くと、それだけで嫌われそうなので、ここでは書かない)の加齢黄斑変性(AMD)の光線力学療法(PDT)の効率アップに関する研究で、アイデア、実験計画、その結果、考察、すべてにきわめて優れており、著者はこれを高く評価する。網膜がリンパ系の未発達な組織であることは古くから知られており、これらの物質が有効だという腫瘍の場合と AMD 治療の条件が類似していることに著者は注目したい。ここに示されたミセル体の脈絡膜新生血管(CNV)集積はみごとであり、ポルフィリンを包み込んで凝集を防ぐことによる効率化もアイデアに優れている。現に、ここに示された新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)による CNV 治療に関する実験成績には驚嘆させられる。これらのミセル体の安全性に関する検証も周りを十分納得させるものがあると思った。次の、カチオン性ペプチドで凝縮した、 dendritary-type 光増感薬のエンドゾーム取り込みに関する実験も、大変に目の付け所がよい。 *In vitro* の実験には十分な説得力があり、結膜とはいえ、 *in vivo* のレベルまで実験が進んでいるのがよく分かった。システムの網膜への適用拡大に期待する。次は、加齢による網膜色素上皮(RPE)へのリポフスチン沈着に着目した、リポフスチン構成物質の CNV 発生制御に関する研究である。残念なのは、実験データの一部が十分に示されていないことで、これはオリジナル論文の投稿誌の著作権問題によるものと理解する。著者はこの部分を最も興味深く読み、その発展に AMD 研究の主流を感じるだけに、その点、不満が残った。続いて、網膜幹細胞と骨髄由来の間葉系幹細胞の網膜下移植による網膜機能回復に関する一連の実験が述べられているが、過去のこの分野の成果に付け加えるほどのものはほとんどないと考える。移植細胞から分泌される増殖因子の話になってしまうところに、この実験系の限界がある。ただ、網膜電図(ERG)で網膜機能を検索していることは、ラットを扱っているだけに、その苦労を察し評価する。機能評価に関するデータは綺麗で明確である。最後の、サル黄斑形成に関する仕事は、文脈から錐体などの細胞由来でなく、黄斑形態形成を追求した仕事と理解したが、著者はこの部分を評価しない。網膜を平面的に二分し、既製のマイクロアレイを用い、胎生後期と出生直後の時点で遺伝子発現を比較しているが、こんな方法で、この問題が解決できると本気で思っているのなら、あまりに安易に過ぎる。辛口の批評をすれば、後半の二つの章は蛇足に近く、全体としてみたときに、せつかくの前半の素晴らしい研究の輝きを曇らせている。実験したことすべてを宿題として報告するのではなく、成果のなかから、これぞと思われるものに絞って報告した方が周囲へのインパクトが大きい。限られた発表時間に何を詰め込むのか、それが研究者のセンスである。このコメントは、この論文に限ったことではなく、次世代を担う研究者一般へのメッセージでもある。将来を大いに囑望される研究者であるだけに、苦言を呈しておきたい。