

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号： 34419  
 研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2008～2010  
 課題番号： 20592041  
 研究課題名（和文） 未熟児網膜症の病態研究とその治療薬剤の検討  
 研究課題名（英文） Studies on the pathogenesis and development of pharmacological treatment of retinopathy of prematurity  
 研究代表者  
 日下俊次（KUSAKA SHUNJI）  
 近畿大学・医学部附属病院・教授  
 研究者番号： 60260387

## 研究成果の概要（和文）：

未熟児網膜症モデルマウスとコントロールマウスの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法によって包括的に検討した結果、炎症性サイトカインの発現上昇は網膜新生血管の発現前から消退後に至るまで上昇しており、一方、新生血管に関連する血管内皮細胞増殖因子、アンジオポイエチン-2 に代表されるサイトカインは新生血管の発現の直前に上昇し、新生血管の消退とともに発現が低下していることが判明した。

## 研究成果の概要（英文）：

Gene expression profiles of oxygen-induced retinopathy and control mice were investigated using real-time PCR. Upregulation of genes associated with inflammation were observed 2 days before the development of neovascularization (NV), and continued until a few days after disappearance of NV. On the other hand, upregulation of genes associated with NV, such as vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2, were observed from one day before the development of NV until the disappearance of NV.

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・眼科学

キーワード： 未熟児網膜症、新生血管、DNA アレイ、薬物療法、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

未熟児網膜症は小児失明原因の第二位を占める重要な疾患である。本疾患は低出生体重児に伴う網膜血管発達の未熟性とそれに

基づく虚血が根底にあり、そこに酸素投与等の要因が加わることで網膜新生血管が発生、重症例では牽引性網膜剥離を来たして失明に至ることが知られているが、その病態や発

症に関する詳細なメカニズムについては十分に解明されたとは言えない。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれらの背景を踏まえ、未熟児網膜症モデルマウスおよび未熟児網膜症の患児から採取した硝子体液を用いて未熟児網膜症の病態の分子レベルでの理解を深めること、そして未熟児網膜症に対する新しい低侵襲な治療法（薬物療法）の開発に関して未熟児網膜症モデルマウスを用いて検討する。

## 3. 研究の方法

未熟児網膜症発症に関連する因子の包括的検討 C57BL/6N マウスを用いて既報に従い、未熟児網膜症モデルマウス（OIR マウス）を作成する。P12～P21 の OIR マウスおよびコントロールとして高濃度酸素投与を行わなかった生後同日のマウス各々2匹（計40匹）の眼球から網膜を分離し、個体毎のばらつきを補正する意味から OIR マウスおよびコントロールマウス各々2個体からの網膜を混ぜたサンプルから total RNA を抽出し、cDNA Synthesis System for Quantitative RT-PCR (Marligen Bioscience) を用いて cDNA を合成する。その後、TaqMan low-density array (Applied Biosystems) によるリアルタイム PCR 法を用いて種々のサイトカインの経時的な発現変化を検討する。

## 4. 研究成果

これまで DNA マイクロアレイ法で OIR マウスを用いて検討し、コントロールマウスに比し2倍以上の遺伝子発現の上昇が得られた遺伝子のうち新生血管発現に関与する遺伝子約90個を解析できるようにカスタムメイドのカードを TaqMan Low-Density Array (TLDA) で作成した。サンプル解析に先立ち内在性のコントロール遺伝子として最も適したものを検索するために Ct 法を用いて  $\beta$  アクチン、18S rRNA, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), TATA box binding protein (TBP) などを候補として検討した結果、 $\beta$  アクチンが最も安定して発現しており内在性のコントロール遺伝子に適していることが判明した。

未熟児網膜症モデルマウスとコントロールマウスの遺伝子発現を TLDA によって包括的に検討した結果、炎症性サイトカインの発現上昇は網膜新生血管の発現前から消退後に至るまで上昇しており、一方、新生血管に関連する血管内皮細胞増殖因子、アンギオポイエチン-2 に代表されるサイトカインは新生血管の発現の直前に上昇し、新生血管の消退とともに発現が低下していることが判明した。

治療薬としてステロイド薬2剤（トリアムシノロン、ジフルブレナード）の血管新生抑制効果を OIR マウスを用いて検討したが、全身（腹腔内）投与

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計14件）

① Murakami Y, Kusaka S, Hayashi N, Soga K, Fujikado T. Wavefront analysis and ultrastructural findings in an eye with posterior lentiglobus. J AAPOS 2010; 14:530-1. 査読有

② Kusaka S, Futamura H. New Sutureless Contact Lens Ring System for Vitrectomy using Cannula System. Retina 2010; 30: 1318-1319. 査読有

③ Wakabayashi T, Fujiwara M, Sakaguchi H, Kusaka S, Oshima Y: Foveal microstructure and visual acuity in surgically closed macular holes: Spectral-domain optical coherence tomographic analysis. Ophthalmology 2010; 117: 1815-1824. 査読有

④ Kandori M, Saishin Y, Kusaka S, Shimojo H, Otori Y, Tano Y. Pupilloplasty for congenital pupillary-iris-lens membrane with 25-gauge vitreous cutter. Acta Ophthalmol. 2010; 88:e289-90. 査読有

⑤ Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T. Simultaneous Analyses of Vitreous Levels of 27 Cytokines in Eyes with Retinopathy of Prematurity. Ophthalmology 2009; 116: 2165-9. 査読有

⑥ Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T. Vitreous Levels of Erythropoietin and Vascular Endothelial Growth Factor in Eyes with Retinopathy of Prematurity. Ophthalmology 2009; 116: 1599-603. 査読有

⑦ Kitaguchi Y, Fujikado T, Kusaka S, Mihashi T. Imaging of Titanium:sapphire Laser Retinal Injury by Adaptive Optics Fundus Imaging and Fourier-domain Optical Coherence Tomography. Am J Ophthalmol 2009; 148: 97-104.e2. 査読有

⑧ Oshima Y, Shima C, Wakabayashi T, Kusaka S, Shiraga F, Ohji M, Tano Y. Microincision Vitrectomy Surgery and

Intravitreal Bevacizumab as a Surgical Adjunct to Treat Diabetic Traction Retinal Detachment. Ophthalmology 2009;116: 927-38. 査読有

- ⑨Shima C, Kusaka S, Kondo H, Hasebe H, Fujikado T, Tano Y. Lens-sparing vitrectomy effective for reattachment of newly developed falciform retinal detachment in a patient with Norrie disease. Arch Ophthalmol 2009;127: 579-80. 査読有
- ⑩Wakabayashi T, Oshima Y, Fujimoto H, Murakami Y, Sakaguchi H, Kusaka S, Tano Y. Foveal Microstructure and Visual Acuity after Retinal Detachment Repair Imaging Analysis by Fourier-Domain Optical Coherence Tomography. Ophthalmology. 2009; 116: 519-28. 査読有
- ⑪Sato T, Kusaka S, Hashida N, Saishin Y, Fujikado T, Tano Y. Comprehensive Gene Expression Profile in Murine Oxygen-induced Retinopathy. Br J Ophthalmol 2009; 93:96-103. 査読有
- ⑫Sato T, Kusaka S, Hashida N, Saishin Y, Fujikado T, Tano Y. Comprehensive Gene Expression Profile in Murine Oxygen-induced Retinopathy. Br J Ophthalmol 2009; 93:96-103. 査読有
- ⑬Sato T, Kusaka S, Oshima Y, Fujikado T. Analyses of Cutting and Aspirating Properties of Vitreous Cutters with High-speed Camera. Retina 2008; 28: 749-754. 査読有
- ⑭Kusaka S, Shima C, Shimojo H, Sato T, Fujikado T. Efficacy of Intravitreal Injection of Bevacizumab for Severe Retinopathy of Prematurity: A Pilot Study. Br J Ophthalmol 2008; 92: 1450-5. 査読有

[学会発表] (計 52 件)

- ①第 51 回 中華民国眼科医学会 学術演講会 (2010 年 12 月 4~5 日、台北、中華民国)  
国際シンポジウム Kusaka S. Current Concept and Management of Severe Retinopathy of Prematurity
- ②第 49 回 日本網膜硝子体学会総会、第 16 回 日本糖尿病眼学会総会 合同総会 (2010 年 11 月 26 日~28 日、大阪市)  
目下俊次、荒堀仁美、和田和子、岩橋千春、佐藤達彦: Stage 3 未熟児網膜症に対する bevacizumab 硝子体内投与の短期

成績

- ③第 2 回 糖尿病講演会 (2010 年 11 月 23 日、柏原市)  
目下俊次: 糖尿病網膜症
- ④2010 American Academy of Ophthalmology Meeting (2010 年 11 月 17~20 日、Chicago)  
Shima C, Kusaka S, Sato T. Anatomical and Functional Outcomes of Vitrectomy for Stage 4A ROP
- ⑤2010 American Academy of Ophthalmology Meeting (2010 年 11 月 17~20 日、Chicago)  
Sato T, Shima C, Kusaka S. Vitreous Levels of Angiopoietin-1 and -2 in Eyes With ROP
- ⑥第 64 回 日本臨床眼科学会 (2010 年 11 月 11~14 日、神戸)  
近藤寛之、目下俊次、吉永亜紀、内尾英一、田原昭彦、林 健志、田平知子: TSPAN12 遺伝子異常による家族性滲出性硝子体網膜症
- ⑦第 64 回 日本臨床眼科学会 (2010 年 11 月 11~14 日、神戸)  
シンポジウム 9 若年者の白内障・IOL 手術のポイント 目下俊次: 小児白内障手術成功のポイント
- ⑧第 64 回 日本臨床眼科学会 (2010 年 11 月 11~14 日、神戸)  
平岡美依奈、目下俊次、東 範行: インストラクションコース、重症未熟児網膜症の管理—いかに光凝固し、いかに次の治療を考えるか—
- ⑨第 64 回 日本臨床眼科学会 (2010 年 11 月 11~14 日、神戸)  
喜多美穂里、栗山晶治、目下俊次、塚原康友、木村英也、斉藤喜博、池田恒彦: インストラクションコース、網膜剥離フアイトクラブ—難治症例の克服—
- ⑩第 55 回 日本未熟児新生児学会・学術集会 教育セミナー (2010 年 11 月 5~7 日、神戸市)  
目下俊次: レットカムによる ROP に対する抗 VEGF 治療の評価
- ⑪第 12 回 Japan Macula Club 総会 (2010 年 8 月 21~22 日、蒲郡市)  
目下俊次 stage 3 ROP に対する硝子体内アバスタチン投与。
- ⑫第 66 回 日本弱視斜視学会総会・第 35 回 日本小児眼科学会合同総会 (2010 年 7 月 2~3 日、東京)  
島 千春、目下俊次、下條裕史、森本荘、不二門尚: Stage 4A 未熟児網膜症に対する硝子体手術後の視機能
- ⑬第 66 回 日本弱視斜視学会総会・第 35 回 日本小児眼科学会合同総会 (2010 年 7 月 2~3 日、東京)

遠藤高生、日下俊次、荒堀仁美、和田和子、國吉一樹、黒田 聡、森本荘、不二門尚 : Bevacizumab 硝子体内投与のみで寛解した AP-ROP の一例

⑭28回 International Congress of Ophthalmology (Berlin, Germany, June 5-9, 2010) T Endo, S Kusaka, H Shimojyo, T Morimoto, T Fujikado: Vitreoretinal complications of regressed retinopathy of prematurity

⑮2010 ARVO meeting (Fort Lauderdale, Florida, USA, May1-5, 2010) H Kondo, T Tahira, S Kusaka, AYoshinaga, E Uchio, A Tawara, K Hayashi. TSPAN12 Gene Mutations In Patients With Autosomal Dominant Familial Exudative Vitreoretinopathy.

⑯Bali International Ophthalmology Retreat 2010 (Bali, Indonesia, April 30 - May 2, 2010) Invited Lecture, Kusaka S : Vitrectomy and/or anti-VEGF therapy for severe retinopathy of prematurity

⑰第114回 日本眼科学会総会 (2010年4月15日~18日、名古屋)  
遠藤高生、日下俊次、下條裕史、森本荘、不二門尚 : 癥痕期未熟児網膜症における網膜硝子体合併症の検討

⑱The 15th Congress of Chinese Ocular Fundus Disease Society (2010年3月14~15日、Shanghai, China)  
Shunji Kusaka : Vitrectomy and/or bevacizumab for severe ROP

⑲2010 Frankfurt Retina Meeting (2010年2月27、28日、フランクフルト、ドイツ)  
Shunji Kusaka: Vitrectomy and/or anti-VEGF treatment for stage 3 / 4 ROP

⑳第33回日本眼科手術学会総会 (2010年1月22~24日、東京)  
インストラクションコース : 大島佑介、井上 真、門之園一明、北岡 隆、日下俊次 : 網膜硝子体一経結膜硝子体手術

㉑第33回日本眼科手術学会総会 (2010年1月22~24日、東京)  
ランチョンセミナー 日下俊次 : 新しい wide-viewing system Resight

㉒第19回 大阪市眼科研究会 (2010年1月16日、大阪市)  
特別講演 日下俊次 : 小児網膜硝子体疾患に対する治療法

㉓第10回三重県眼科手術懇話会 (2009年12月13日、津市)  
特別講演 日下俊次 : 小児網膜硝子体疾患治療の最前線

㉔第48回日本網膜硝子体学会総会、第26回日本眼循環学会、第15回日本糖尿

病眼学会総会 合同総会 (2009年12月4日~6日、名古屋市)

ランチョンセミナー6 知らなきゃいけない難治性網膜剥離の治療法 日下俊次 : Evolution of treatment for complex retinal detachment

㉕第48回日本網膜硝子体学会総会、第26回日本眼循環学会、第15回日本糖尿病眼学会総会 合同総会 (2009年12月4日~6日、名古屋市)

島千春、日下俊次、下條裕史、森本荘、不二門尚 : stage5 未熟児網膜症に対する硝子体手術成績

㉖栃木県小児眼科講習会 (2009年11月29日、宇都宮市)  
特別講演 日下俊次 : 小児網膜硝子体疾患治療の最前線

㉗The 4th Congress of Asia-Pacific Vitreoretinal Society (November 12 - 13, 2009, Taipei, Taiwan) Kusaka S. Comparison of Surgical Results for Rhegmatogenous Retinal Detachment between 23- and 20-gauge Systems.

㉘2009 American Academy of Ophthalmology Annual Meeting (2009年10月25-28, San Francisco, USA) Kusaka S, Ikuno Y, Oshima Y, Sakaguchi H, Kamei M. Long-term Results Following Implantation of Posterior Iris-Claw IOL in Eyes Lacking Capsular Support

㉙第63回日本臨床眼科学会 (2009年10月9~12日、福岡)  
平岡美依奈、日下俊次、東 範行 : インストラクションコース、重症未熟児網膜症の管理—いかに光凝固し、いかに次の治療を考えるか—

㉚第63回日本臨床眼科学会 (2009年10月9~12日、福岡)  
喜多美穂里、齊藤喜博、日下俊次、塚原康友、栗山晶治、木村英也、河野眞一郎 : インストラクションコース、網膜剥離フアイトクラブ—徹底的に症例検討—

㉛第63回日本臨床眼科学会 (2009年10月9~12日、福岡)  
藤原舞子、若林 卓、大島佑介、坂口裕和、生野恭司、瓶井資弘、日下俊次、田野保雄 : スペクトラルドメイン光干渉断層計による黄斑円孔術後の中心窩視細胞所見と視力

㉜第63回日本臨床眼科学会 (2009年10月9~12日、福岡)  
五味 文、二村英之、染谷健司、日下俊次、田野保雄 : 使い捨て PMMA 製開眼器の試作

㉝第63回日本臨床眼科学会 (2009年10月9~12日、福岡)

森本裕子、坂口裕和、五味 文、三木篤也、沢 美喜、辻川元一、松下賢治、西信良嗣、大島佑介、生野恭司、瓶井資弘、日下俊次：Bevacizumab 硝子体内投与の合併症

⑳第 63 回日本臨床眼科学会（2009 年 10 月 9～12 日、福岡）

村上陽子、日下俊次、生野恭司、大島佑介、松田 理、田野保雄：水晶体嚢を有しない無水晶体眼に対する Artisan レンズ挿入術の長期予後

㉑第 63 回日本臨床眼科学会（2009 年 10 月 9～12 日、福岡）

日下俊次、二村英之：新しい硝子体手術用スーチャーレス（VSL-K）リングの試作

㉒第 29 回 日本眼薬理学会。（2009 年 9 月 13 日、東京）

シンポジウム「未熟児網膜症と薬物療法」日下俊次：未熟児網膜症に対する硝子体手術と抗 VEGF 療法

㉓第 227 回 O.C.C.（2009 年 9 月 12 日、大阪市）

教育講演 日下俊次：未熟児網膜症に対する硝子体手術

㉔第 11 回総会 Japan Macula Club（2009 年 8 月 22、23 日、蒲郡市）

日下俊次：新しい sutureless ring system の開発

㉕第 9 回 青森県眼科フォーラム（2009 年 7 月 27 日、青森市）

特別講演 日下俊次：小児網膜硝子体疾患治療の最前線

㉖Tianjing Advanced Vitreoretinal Course (July 18 - 19, 2009, Tianjing, China) Kusaka S. Evolution of surgical treatment for retinopathy of prematurity.

㉗第 8 回 硝子体手術ビデオセミナー（2009 年 6 月 28 日、東京）

日下俊次：硝子体手術の基本

㉘第 65 回日本弱視斜視学会総会・第 34 回日本小児眼科学会総会 合同学会（2009 年 6 月 5 日～6 日 大阪市）

日本小児眼科学会シンポジウム『未熟児網膜症に対する抗 VEGF 治療を検証する』オーガナイザー 日下俊次

㉙第 65 回日本弱視斜視学会総会・第 34 回日本小児眼科学会総会 合同学会（2009 年 6 月 5 日～6 日 大阪市）

佐々本 弦、日下俊次、森本 壮、不二門 尚、近藤 寛之：広範な網膜分離を呈した先天 X 連鎖遺伝網膜分離症の 1 例

㉚第 65 回日本弱視斜視学会総会・第 34 回日本小児眼科学会総会 合同学会（2009 年 6 月 5 日～6 日 大阪市）

島 千春、日下俊次、大島 安正、三木 篤

也、松下 賢治、木内 良明、不二門 尚：未熟児網膜症に対する硝子体手術後の続発緑内障

㉛The 23rd Congress of Asia Pacific Academy of Ophthalmology (May 16 - 19, 2009, Bali, Indonesia)

Symposium: Shunji Kusaka：Efficacy of intravitreal bevacizumab injection for severe retinopathy of prematurity.

㉜第 113 回日本眼科学会総会（2009 年 4 月 16～19 日、東京）

教育セミナー 6 「小児眼底疾患の診断と治療、日下俊次：小児の後眼部外傷

㉝第 2 回 MIVS ワークショップ（2009 年 1 月 24 日、神戸）

特別講演 日下俊次：23G 硝子体手術アップデート

㉞第 32 回日本眼科手術学会総会（2009 年 1 月 23～25 日、神戸）

教育セミナー 2 網膜硝子体 黄斑手術の基本手技：日下俊次：小切開硝子体手術時代の黄斑上膜剥離術

㉟第 32 回日本眼科手術学会総会（2009 年 1 月 23～25 日、神戸）

インストラクションコース：大島佑介、井上 真、門之園一明、北岡 隆、日下俊次：網膜硝子体一経結膜硝子体手術：疾患別の手術手技の工夫—

㊱第 32 回日本眼科手術学会総会（2009 年 1 月 23～25 日、神戸）

ビデオ展示 小児・斜視分野 日下俊次：未熟児網膜症に対する早期硝子体手術

㊲第 32 回日本眼科手術学会総会（2009 年 1 月 23～25 日、神戸）

鄭 曉東、石川明邦、日下俊次、井出千鶴子、別所建一郎、児玉俊夫、島村一郎、金子明生、石川和郎：Schwartz 症候群が疑われた難治性網膜剥離に硝子体手術が有効であった 1 例

㊳第 32 回日本眼科手術学会総会（2009 年 1 月 23～25 日、神戸）

教育セミナー 21 未熟児網膜症の診断と管理：日下俊次：硝子体手術

[図書] (計 11 件)

①日下俊次：虹彩ルベオーシスに対する bevacizumab あたらしい眼科 Vol 27 1091-1092, 2010.

②佐藤達彦、日下俊次バックル手術後の再剥離症例の治療 新 ES NOW 網膜剥離 こうすれば治る 復位率 100% をめざして 2010; 4: 106-113.

③日下俊次：眼内新生血管に対する新しい薬物療法 臨眼 62: 9-14, 2008.

④日下俊次：ワイドビューイング硝子体

手術-非接触型 眼科手術 21: 68-69, 2008.

⑤日下俊次: 目のかすみや明るいところでまぶしさを感じるようになれば白内障の検査を Japan Medical Society 2: 92-95, 2008.

⑥佐藤達彦, 日下俊次: 眼科手術の説明→準備→介助→白内障 眼科ケア 10: 4-7, 2008.

⑦日下俊次: 小児の網膜硝子体手術(未熟児網膜症以外) 日本の眼科 79: 607-610, 2008.

⑧佐藤達彦, 日下俊次: 注目の疾患 未熟児網膜症: 重症未熟児網膜症に対する抗 VEGF 抗体併用硝子体手術 臨床眼科 2008: 62; 298-303.

⑨佐藤達彦, 日下俊次: 手術用薬の使い方 消毒薬 眼科プラクティス 2008: 23; 404-405.

⑩日下俊次: 良好な術後視機能を目指しての硝子体手術 硝子体研究会記録集第25回 2008: 10-15.

⑪佐藤達彦, 日下俊次 小児網膜剥離 眼科プラクティス 2008: 20; 226-229. 日下俊次: Focal Points 日本語版 No.26 「網膜上膜」(監修)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日下 俊次 (KUSAKA SHUNJI)  
近畿大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 60260387

### (2) 研究分担者

大島 佑介 (OSHIMA YUSKE)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 20362717

不二門 尚 (FUJIKADO TAKASHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 50243233

### (3) 連携研究者