

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11321

研究課題名（和文）次世代補償光学眼底イメージングを用いた萎縮型加齢黄斑変性の病態解明と治療開発

研究課題名（英文）High-resolution Imaging using next generation adaptive optics imaging in dry age-related macular degeneration

研究代表者

大音 壮太郎（OOTO, SOTARO）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：10511850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：次世代補償光学適用走査型レーザー検眼鏡を用いて、萎縮型加齢黄斑変性における視細胞異常を示した。萎縮型加齢黄斑変性症例では、正常眼に比べ、視細胞密度が低下していた。また脈絡膜血球動態異常が観察された。次に視細胞異常と視機能異常の関連について検討を行ったところ、網膜色素上皮異常の範囲を越えて視細胞異常が広く存在し、視機能障害と最も関連することが明らかとなった。更なる研究でパキコロイドの特徴を有し、ドルーゼンを認めない症例をpachychoroid geographic atrophyと命名し、萎縮型加齢黄斑変性との比較を行ったところ、両者は遺伝型、表現型とも異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

補償光学を利用した、次世代の眼底イメージング機器を用いて、現在まで病態が不明のままである萎縮型加齢黄斑変性の視細胞異常をはじめて示した。脈絡膜血流のイメージングも世界初であった。また視細胞異常が網膜色素上皮異常の周囲にまで拡大しているという結果は、萎縮型加齢黄斑変性の治療戦略に大きな影響を与えるものである。新しく提唱したpachychoroid geographic atrophyという疾患概念は、従来からの萎縮型加齢黄斑変性と異なるものであり、今後の研究では区別して考えるべきである。

研究成果の概要（英文）：We showed photoreceptor abnormalities in dry age-related macular degeneration using next generation adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. Photoreceptor density was decreased in dry age-related macular degeneration, compared with normal eyes. Abnormalities were also seen in choroidal circulation. Photoreceptor abnormalities were seen in widespread areas surrounding retinal pigment epithelial abnormalities, and mostly correlated with retinal sensitivity. We called "pachychoroid geographic atrophy" as eyes with pachychoroid phenotype and no drusen. Pachychoroid geographic atrophy was different from dry age-related macular degeneration genetically and phenotypically.

研究分野：眼科学

キーワード：補償光学 加齢黄斑変性 脈絡膜 視細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

萎縮型加齢黄斑変性(AMD)は地図状萎縮が形成される加齢黄斑変性であり、後期 AMD の一型として分類される。脈絡膜新生血管が形成される滲出型 AMD は病態の解明が進み、抗 VEGF 治療により視力の維持・改善が可能となったが、萎縮型 AMD は過去の病理組織学的検討も乏しく、病態は未解明のままに現在に至るまで有効な治療法はない。

近年、天文学の分野で開発されてきた補償光学(adaptive optics: AO)を眼底イメージングに応用することにより、高解像度のイメージングを実現できるようになった。AO を走査型レーザ検眼鏡(SLO)に適用した AO-SLO では、非侵襲的に錐体細胞をイメージングすることができる。我々は次世代の AO イメージングとして、split detector AO-SLO を開発してきた。次世代 AO-SLO により、錐体細胞のみならず、桿体細胞までイメージングが可能で、内節領域を明瞭に描出することが可能となった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代 AO-SLO を用いて萎縮型 AMD の視細胞錐体・桿体の内節を可視化し、詳細な病態解析を行うことにある。錐体・桿体細胞変性と網膜色素上皮(RPE)細胞変性との関係、脈絡膜毛細血管との関係、complement factor H (CFH) 遺伝子や age-related maculopathy susceptibility 2 (ARMS2) 遺伝子などの遺伝子多型との関係を多角的に検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 次世代 AO-SLO で得られる黄斑部視細胞の正常データの蓄積

健常眼における黄斑部視細胞密度、細胞形態に関するデータを蓄積した。対象者は 50-80 歳の健常者(眼科疾患の既往歴をもたないもの)とする。各年代 10 名程度のボランティア募集を行い、のべ 30 名撮影した。中心窩から 0.2mm, 0.5mm, 1mm の視細胞像を上・下・鼻・耳側で取得する。一般的眼科検査(視力、眼圧、視野、細隙灯、眼底)のほか眼底写真・OCT 撮影を行い、病理眼を除外した。

#### 2) 次世代 AO-SLO による萎縮型 AMD の黄斑部視細胞の形態評価

萎縮型 AMD 患者眼における黄斑部視細胞密度、細胞形態に関するデータを蓄積した。のべ 20 名撮影した。経時的变化を観察するため、6ヶ月に一度検査を行う。中心窩から 0.2mm, 0.5mm, 1mm の視細胞像を上・下・鼻・耳側の視細胞像を取得し、2 回目以降の撮影では初回と同部位を測定する。従来の confocal AO-SLO モードでも画像化し、split detector AO-SLO と比較することにより異常領域が外節・内節のいずれに相当するかを検討した。一般的眼科検査(視力、眼圧、視野、細隙灯、眼底)のほか眼底写真・Swept-source OCT・眼底自発蛍光検査を施行した。

#### 3) RPE・脈絡膜毛細血管の形態・機能評価

眼底自発蛍光のシグナルで示される RPE の機能評価を行った。RPE 萎縮部位は低自発を示し、ImageJ を用いて RPE 萎縮部位を定量化した。またマイクロペリメトリーを用いて、黄斑部における網膜感度の測定を行った。

#### 4) 萎縮型 AMD 患者・正常対照者の遺伝子解析

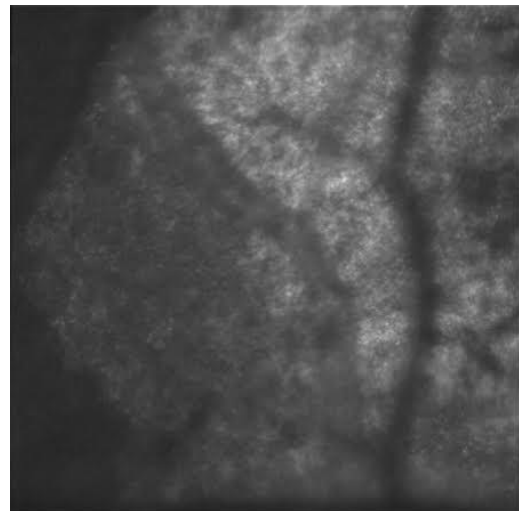
萎縮型 AMD 患者・正常対照者から採血を行い、DNA サンプルを保存した。DNA サンプルを用いて CFH, ARMS2, C3, C2, CFB, ApoE 遺伝子等の様々なターゲット部位を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンス法または Taqman SNP assay で遺伝子多型を検出した。更に高速エクソームシーケンスを行い、レア多型・未発見多型を含め、遺伝子多型が視細胞異常にどのように関わっているか網羅的に解析するための基盤を構築した。

### 4. 研究成果

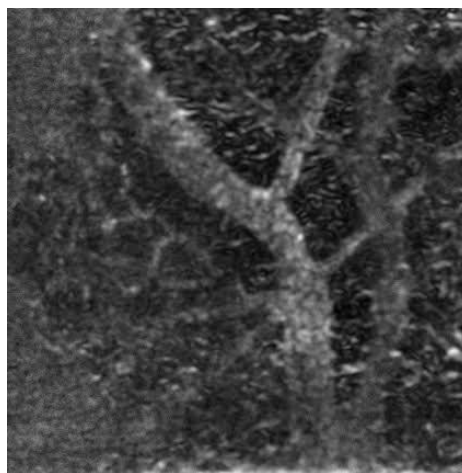
Split-detector AO-SLO を用いて視細胞密度を定量したところ、中心窩から 0.2mm, 0.5mm, 1mm の視細胞密度は、正常眼でそれぞれ平均 67900, 33320, 14450 個/mm<sup>2</sup> であった。これに対し、萎縮型黄斑変性症例では、それぞれ平均 11360, 8430, 6860 個/mm<sup>2</sup> であり、優位に低下していた(全て P<0.001)。地図状萎縮部以内で視細胞密度の低下は著明であったが、完全に消失はしていなかった。また、地図状萎縮の範囲をこえた部位でも視細胞密度の低下が認められた(図 1)。

更に AO-SLO の改良を行って、off-set AOSLO を開発した。この off-set AO-SLO により、網膜毛細血管の血流が直接可視化される。

Off-set AOSLO を萎縮型加齢黄斑変性症例に用いることにより、地図上萎縮部位内で脈絡膜血球動態が観察された(図 2)。この脈絡膜血球動態の観察は正常眼では見ることのできない所見であった。

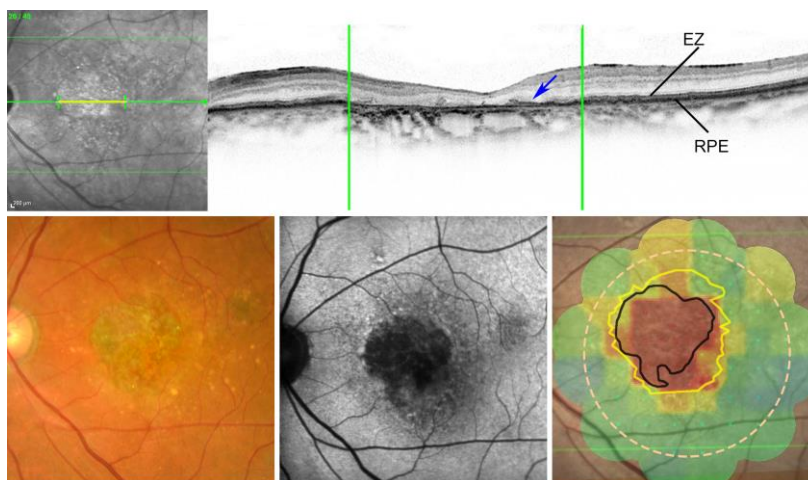


Off-set AO-SLO を用いて脈絡膜血球動態を観察したところ、脈絡膜中大血管において血球動態の異常（乱流・局所的な速度低下）が認められた。この所見は pseudodrusen を認める症例でより顕著であった。Pseudodrusen 症例では脈絡膜厚が低下していることが報告されており、血球動態異常との関連が示唆される。



次に萎縮型加齢黄斑変性症例の、視細胞異常と視機能の関連について研究を行った。対象は萎縮型 AMD 患者 25 名 25 眼、前向きに眼底写真、眼底自発蛍光、光干渉断層計 (OCT)、微小視野計を撮影した。眼底自発蛍光の低蛍光領域から RPE 障害範囲を算出し、OCT の網膜エリプソイド領域の障害部位から視細胞障害範囲を算出した。微小視野計を用いて中心窩を中心とした 20 度の 57 測定点の網膜感度を測定した。これらの画像を重ね合わせ、微小視野計の各測定点における RPE 障害の有無および視細胞障害の有無を調べ、網膜感度との相関を解析した。また、加齢黄斑変性の危険因子とされる pseudodrusen を伴う症例と伴わない症例の比較を行った。

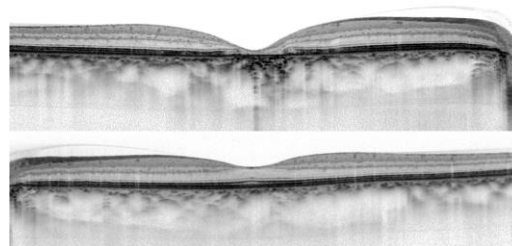
地図状萎縮における視細胞障害領域は平均  $7.69 \pm 5.36 \text{ mm}^2$  であり、RPE 障害領域 (平均  $4.57 \pm 4.07 \text{ mm}^2$ ) より広く存在した ( $P < 0.001$ )。RPE 障害領域の平均網膜感度は、RPE 障害のない領域の平均網膜感度に比べて低く ( $P < 0.001$ )、視細胞障害領域の平均網膜感度は、視細胞障害のない領域の平均網膜感度に比べて低かった ( $P < 0.001$ )。また RPE 障害領域の周囲の視細胞障害領域の平均網膜感度は、視細胞障害のない領域の平均網膜感度に比べて低かった。 ( $6.57 \pm 4.13 \text{ dB}$  vs  $11.27 \pm 3.78 \text{ dB}$ ,  $P < 0.001$ )。重回帰分析では、視細胞障害領域が、網膜感度低下に最も相関する因子であった。Pseudodrusen を伴う症例 10 眼と伴わない症例 15 眼の比較では、pseudodrusen を伴う症例の方が視細胞障害をより広く認めた ( $10.82 \pm 6.69 \text{ mm}^2$  vs  $5.61 \pm 2.99 \text{ mm}^2$ ,  $P = 0.031$ )。



本研究で、萎縮型 AMD では RPE 障害より視細胞障害が広範囲に存在し、視機能と関連することが示された。また pseudodrusen は視細胞障害と関連があった。従来、萎縮型 AMD は RPE 障害による地図状萎縮と捉えられ、眼底自発蛍光でモニタリングされてきた。しかし、萎縮型 AMD の視機能評価には、そのような眼底自発蛍光による RPE 障害の評価のみではなく、OCT による視細胞障害の評価と組み合わせることが必要であると考えられる。また萎縮型 AMD の治療は世界中で研究開発中であるが、RPE の生存のみをターゲットにした戦略では、視細胞障害が広範な症例には不十分である可能性が示唆される。



更なる研究で、脈絡膜厚に注目して萎縮型加齢黄斑変性を考察した。われわれは pachychorid の特徴を有し、ドルーゼンを認めない地図状萎縮症例を pachychoroid geographic atrophy (GA) と命名した。Pachychoroid GA と加齢黄斑変性との関係を調べるため、萎縮型加齢黄斑変性もしくは pachychoroid GA と診断された連続 92 症例を対象として、臨床的・遺伝学的特徴について比較検討を行った (Takahashi A, Ooto S, et



al. Ophthalmology Retina 2018)。

全症例 92 例のうち、21 例(22.8%)が pachychoroid GA と診断され、71 例(77.2%)が萎縮型加齢黄斑変性と診断された。Pachychoroid GA 症例は萎縮型加齢黄斑変性症例に比べ、有意に年齢が若く(70.5 歳 vs 78.5 歳,  $P<0.001$ )、病変サイズが小さく( $0.9\text{mm}^2$  vs  $4.0\text{mm}^2$ , 年齢調整後  $P=0.001$ )、中心窩下脈絡膜厚が大きかった( $353\mu\text{m}$  vs  $175\mu\text{m}$ , 年齢調整後  $P=0.009$ )。インドシアニングリーン蛍光眼底造影での脈絡膜血管透過性亢進所見は 47.4%と pachychoroid GA で有意に高率に見られた。Pseudodrusen は萎縮型加齢黄斑変性の 56.3%に見られたが、pachychoroid GA 症例では全例において認めなかった。病変の拡大率は、pachychoroid GA と萎縮型加齢黄斑変性で差を認めず、経過観察中に全例拡大した。

加齢黄斑変性の疾患感受性遺伝子として重要な *ARMS2* A69 多型におけるアレル頻度は、pachychoroid GA と萎縮型加齢黄斑変性で有意な差が認められた。*ARMS2* A69S 多型の T アレル(リスクアレル)頻度は pachychoroid GA で 31.6%、萎縮型加齢黄斑変性で 68.8%であった( $P<0.001$ )。Pachychoroid GA でのリスクアレル頻度は、正常人における頻度(36.5%)程度である。更に欧米人・アジア人で共通して加齢黄斑変性疾患感受性遺伝子としてあげられている 11 の遺伝子を用いて genetic risk score を定めたところ、pachychoroid GA と萎縮型加齢黄斑変性の間に有意な差を認めた( $P=0.001$ )。これらの結果は、pachychoroid GA と萎縮型加齢黄斑変性が遺伝学的に異なった疾患群であることを示唆する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Takahashi A, Ooto S, Yamashiro K, et al. Pachychoroid geographic atrophy.-clinical and genetic characteristics- Ophthalmology Retina 2:295-305, 2018. doi: 10.1016/j.oret.2017.08.016. 査読有
- 2) Takahashi A, Ooto S, Yamashiro K, Oishi A, Tamura H, Nakanishi H, Ueda-Arakawa N, Tsujikawa A, Yoshimura N. Photoreceptor damage and reduction of retinal sensitivity surrounding geographic atrophy in age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol. 2016;168:260-8. doi: 10.1016/j.ajo.2016.06.006. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 大音壮太郎: シンポジウム「補償光学と OCT・SLO」 第 24 回糖尿病眼学会総会, 東京, 2018. 10. 19
- 2) 大音壮太郎: シンポジウム「補償光学の医科領域への応用: AO-SLO による眼底イメージング」第 11 回 NIBB バイオイメージングフォーラム, 岡崎, 2017. 2. 1
- 3) 大音壮太郎: サブスペシャリティサンデー (シンポジウム) 網脈絡膜画像診断のポイントとアップデート「最新の画像診断機器 (OCT・SLO) ~広角・高解像度・angio~, 第 120 回日本眼科学会総会, 仙台, 2016. 4. 10

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：池田華子

ローマ字氏名：HANAKO IKEDA

所属研究機関名：京都大学大学院医学研究科

部局名：臨床研究総合センター

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20372162

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：山城健児

ローマ字氏名：KENJI YAMASHIRO

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。