

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 年度～2009 年度  
 課題番号：20791249  
 研究課題名 (和文) 温度感受性リポソーム法を用いた黄斑変性の病態解明と新治療法の開発

研究課題名 (英文) Investigation of Pathophysiology and Innovative Treatment for Macular Degeneration with Thermosensitive Liposome

研究代表者：  
 田村 寛 (Hiroshi TAMURA)  
 京都大学 医学研究科 助教  
 研究者番号：40418760

研究成果の概要 (和文) : 加齢黄斑変性やそれに類似した病態とも考えられている中心性漿液性脈絡網膜症や網膜色素線条に伴う脈絡膜新生血管などの病態に関する新たな知見が得られ、その病態への理解が深まった。進化の激しい加齢黄斑変性に対する治療のさらなる進化に向けて、既存の治療の問題点や組み合わせの優劣に関する知見も得られ、さらに新しい治療法開発に向けて基礎となる知見が得られた。

研究成果の概要 (英文) : New findings of age-related macular degeneration or its relative disease such as central serous chorioretinopathy and choroidal neovascularization secondary to angioid streaks are found to understand the pathophysiologies of these disease. For more improvement in treatment for age-related macular degeneration, problems and comparative merits among the current treatments are also revealed. These accomplishments would be helpful for development of innovative treatment for age-related macular degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
年度			
年度			
年度			
総計			

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：黄斑変性、リポソーム、脈絡膜新生血管

1. 研究開始当初の背景

欧米先進国での失明原因第1位、わが国での失明原因第3位である加齢黄斑変性症は、国民の高齢化や生活様式の欧米化に伴い増加の一途をたどっている。疾病発生のメカニズムに関してはいくつか分かっている

こともあり、一部責任遺伝子の同定がなされたり生活習慣との関連性が指摘されたりしているが、未だその全容は明らかでない。病理に関しても摘出組織が極めて少ないため、未だ不明なことも多い。また、2004年以降本邦でも光線力学療法が保険収載され実施

されるようになったり、抗血管新生薬の治験が行われたりするなど、それ以前に比較すれば治療の質は格段に向上したものの、これらは基本的には現状維持を目的としたもので、視機能回復という最終目的には至っていない。

こうした中、従来の脈絡膜循環を評価する方法である蛍光眼底撮影法（FAG）およびインドシアニングリーン蛍光眼底撮影（ICG）では観察できなかった脈絡膜循環の観察も、ナノ粒子温度感受性リポソームとレーザー細隙灯を併用する方法により可能になっており、本研究ではこうした手法を導入して病状の解明、ひいては新しい治療の開発を目指すものである。

## 2. 研究の目的

加齢黄斑変性における視力低下の主たる原因となり、治療の対象として立ちはだかる脈絡膜新生血管は脈絡膜毛細血管から生じるとすることが多いとされている。我々の研究チームではこの脈絡膜新生血管を選択的かつ繰り返し造影し評価するシステム（温度感受性リポソームとレーザー内蔵細隙灯顕微鏡を用いたもの）を確立できている。このシステムを用いて、動物モデルにおいてレーザーで脈絡膜新生血管誘発し、その病態観察を行うことを目的とする。また、この温度感受性リポソームにはポルフィリン誘導体やフラーレン誘導体などの治療物質を内包することが出来るため、これらを利用した次世代型光線力学療法の開発も検討している。さらに、我々の施設には新生代光干渉断層計が複数存在し、これらを用いて生体下に擬似病理画像が得られるようになってきている。加齢黄斑変性の病理像の詳細な検討により得られた知見と、動物実験で得られる知見との融合により、更なる病変の理解が進むと考えられる。

## 3. 研究の方法

### 1) 温度感受性リポソームの作製

蛍光色素であるカルボキシルフルオレセインを内包した温度感受性リポソームを freeze & thaw 法で作成する。リン脂質の主成分には相転移温度 41 度の DPPC を用いてリポソームを作成する。リポソームの粒径が 400nm を超えないようにエクストルーダーで粒径を揃え、ゲルろ過法を用いて内包されなかった蛍光色素を除去する。

### 2) 温度感受性リポソーム内への治療物質の内包

治療物質としてのポルフィリン誘導体やフラーレン誘導体を温度感受性リポソーム内に内包する。リポソームの粒径が 400nm を超えないようにエクストルーダーで粒径を揃

え、ゲルろ過法を用いて内包されなかったポルフィリン誘導体やフラーレン誘導体を除去する。

### 3) 脈絡膜新生血管の作製

アルゴンレーザーを用いて網膜色素上皮の過凝固を行うことにより、脈絡膜新生血管を作製する。

### 4) 温度感受性リポソーム法による観察

改良済みの細隙灯を用いて行う。前述したカルボキシルフルオレセインを内包した温度感受性リポソームを静注し、温熱用のダイオードレーザー（波長 810nm）でカルボキシルフルオレセインの誘発を行う。放出された蛍光色素であるカルボキシルフルオレセインを観察するために励起用アルゴンレーザー（492nm）を用いて励起された光線を 512nm のフィルターを通して集光する。レーザー発振装置とスリットシステムの間にリレー及びコンピューターを挿入し、レーザー発射の時期、時間、出力をコンピューター制御できるようになっている。さらに CCD カメラ及び画像エンハンサーを接続して、得られた画像をデジタル化して録画し、このデジタル画像をコンピューターで解析する。

### 5) 温度感受性リポソーム法の改良

新生血管は正常脈絡膜に比べて血行速度が遅く、血管からの漏出もあるため温度感受性リポソームの投与量や投与方法を改良する必要がある。

### 6) 治療物質の生体内での放出

脈絡膜新生血管を作製したラットやサルにポルフィリン誘導体やフラーレン誘導体を内包した温度感受性リポソームを静注する。脈絡膜新生血管の流入血管もしくは脈絡膜新生血管の上流血管に温熱用レーザーを照射しポルフィリン誘導体やフラーレン誘導体を放出させる。

## 4. 研究成果

この研究は、黄斑変性の病態解明及び新治療法の開発を目的として計画された研究であり、加齢黄斑変性やそれに類似した病態とも考えられている中心性漿液性脈絡網膜症や網膜色素線条に伴う脈絡膜新生血管などの病態観察を新開発の補償光学適応レーザー走査型顕微鏡や光干渉断層計も用い丹念に行い検討を加えた。具体的には、加齢黄斑変性の中でも定義が明確なポリープ状脈絡膜血管症を有する症例において、最新型の高解像度高速光干渉断層計による詳細な観察 (Ojima Y, Am J Retina. 2009) や、その発症における ARMS2 遺伝子の関与の程度 (Gotoh N, AM J Ophthalmol. 2009)、高解像度高速

光干渉断層計を用いた詳細の観察の結果 (Ojima Y, Retina. 2009) を報告した。網膜色素線条に伴う脈絡膜新生血管の全身合併症との相関も報告した (Utani A, J Dermatol. 20010)。加齢黄斑変性の硝子体出血の予測因子に関する報告 (Hasegawa T, Am J Ophthalmol. 2009) し、一方で複数例でのベバシズマブ硝子体注射による眼内炎の発症も (Yamashiro K, Retina. 2010) 報告した。また、中心性漿液性網脈絡膜症における中心窩領域の視細胞外節の消失 (Nakanishi H, Retina. 2008) や、中心性漿液性網脈絡膜症とポリープ状脈絡膜血管症の間での視細胞層の厚みの差違についても (Ooto S, Graefe's Archive. 2010) 報告した。

#### 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 15 件)

1. Ojima Y, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Tamura H, Yoshimura N. Restoration of outer segments of foveal photoreceptors after resolution of central serous chorioretinopathy. Jpn J Ophthalmol. 2010 Jan;54(1):55-60.
2. Ooto S, Tsujikawa A, Mori S, Tamura H, Yamashiro K, Yoshimura N. Thickness of photoreceptor layers in polypoidal choroida vasculopathy and central serous chorioretinopathy. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 2010 Mar 13.
3. Tsujikawa A, Ojima Y, Yamashiro K, Ooto S, Tamura H, Nakagawa S, Yoshimura N. Punctate Hyperfluorescent Spots Associated with Central Serous Chorioretinopathy as Seen on Indocyanine Green Angiography. Retina. 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]
4. Yamashiro K, Tsujikawa A, Oh H, Otani A, Tamura H, Ooto S, Iwama D, Yoshimura N. Sterile Endophthalmitis after Intravitreal Injection of Bevacizumab Obtained from a Single Batch. Retina 2010 Mar;30(3):485-90.
5. Hasegawa T, Otani A, Ooto S, Tamura H, Yamashiro K, Tsujikawa A, Yoshimura N. Prognostic Factors of Vitreous Hemorrhage Secondary to Exudative Age-related Macular Degeneration. Am J Ophthalmol. 2010 Feb;149(2):322-329. e1.
6. Utani A, Tanioka M, Yamamoto Y, Taki R, Araki E, Tamura H, Miyachi Y. Relationship between the distribution of pseudoxanthoma elasticum skin and mucous membrane lesions and cardiovascular involvement. J Dermatol, 2010 Feb;37(2):130-6
7. Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Yamada R, Otani A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Tamura H, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. ARMS2 (LOC387715) Variants in Japanese Patients with Exudative Age-related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy. Am J Ophthalmol. 147(6):1037-41, 1041. e1-2, 2009
8. Yodoi Y, Tsujikawa A, Nakanishi H, Otani A, Tamura H, Ojima Y, Hayashi H, Yoshimura N. Central Retinal Sensitivity After Intravitreal Injection of Bevacizumab for Myopic Choroidal Neovascularization. Am J Ophthalmol. 147(5):816-24, 824. e1, 2009
9. Ojima Y, Hangai M, Sakamoto A, Tsujikawa A, Otani A, Tamura H, Yoshimura N. Improved visualization of polypoidal choroidal vasculopathy lesions using spectral-domain optical coherence tomography. Retina. 29(1):52-9. 2009.
10. Tsujikawa A, Nakanishi H, Ojima Y, Iwama D, Tamura H, Otani A, Yoshimura N. Macular polypoidal choroidal vasculopathy with a remote lesion. Clin Experiment Ophthalmol. 36(9):817-23. 2008
11. Fujisato K, Otani A, Sasahara M, Yodoi Y, Aikawa H, Tamura H, Tsujikawa A, Yoshimura N. Two-Year Results of Photodynamic Therapy for Choroidal Neovascularization in Young Patients. J Jpn Ophthalmol Soc. 112:777-785, 2008
12. Kurashige Y, Otani A, Sasahara M,

Yodoi Y, Tamura H, Tsujikawa A, Yoshimura N. Two-Year Results of Photodynamic Therapy for Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Am J Ophthalmol.* 146(4):513-519, 2008  
査読有

13. Nakanishi H, Tsujikawa A, Gotoh N, Hayashi H, Iwama D, Tamura H, Otani A, Yoshimura N. Macular Complications On The Border of An Inferior Staphyloma Associated with Tilted Disc Syndrome. *Retina.* 28(10):1493-501. 2008. 査読有
14. Iwama D, Otani A, Sasahara M, Yodoi Y, Gotoh N, Tamura H, Tsujikawa A, Yoshimura N. Photodynamic Therapy Combined with Low-dose Intravitreal Triamcinolone Acetonide for Age-related Macular Degeneration Refractory to Photodynamic Therapy Alone. *Br J Ophthalmol.* 92(10):1352-1356, 2008 査読有
15. Iwama D, Tsujikawa A, Sasahara M, Hirami Y, Tamura H, Yoshimura N. Polypoidal choroidal vasculopathy with drusen. *Jpn J Ophthalmol.* 52(2):116-121, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 大音壮太郎、辻川明孝、後藤謙元、岩間大輔、田村寛、山城健児、大谷篤史、吉村長久：加齢黄斑変性に対するトリアムシノロン・bevacizumab 併用光線力学療法  
日本眼科手術学会総会 2009/01/23
2. 林寿子、山城健児、後藤謙元、中西秀雄、大谷篤史、辻川明孝、田村寛、斉藤昌晃（福島県立医科大学）、斉藤国治（福島県立医科大学）、飯田知弘（福島県立医科大学）、吉村長久：ポリブ状脈絡膜血管症における ARM32 遺伝子の遺伝子型と臨床所見の検討  
日本眼科学会総会 2009/04/16
3. 辻川明孝、尾島優美、中西秀雄、林寿子、中川聡子、後藤謙元、岩間大輔、山城健児、田村寛、大音壮太郎、大谷篤史、吉村

長久：中心性漿液性網脈絡膜症症例におけるインドシアニングリーン蛍光眼底造影上の点状過蛍光 日本眼科学会総会  
2009/04/16

4. 山城健児、中川聡子、辻川明孝、大谷篤史、田村寛、大音壮太郎、吉村長久：網膜色素線条に生じた脈絡膜新生血管の特徴  
日本眼科学会総会 2009/04/17
5. 大音壮太郎、板谷正紀、尾島優美子、田村寛、山城健児、大谷篤史、辻川明孝、大島進（ニデック）、井上卓（浜松ホトニクス）、吉村長久：補償光学適用走査レーザー検眼鏡による中心性漿液性網脈絡膜症の視細胞構造  
日本臨床眼科学会 2009/10/09
6. 山城健児、後藤謙元、中西秀雄、林寿子、仲田勇夫、辻川明孝、大谷篤史、大音壮太郎、田村寛、三谷康正（ダナフォーム）、吉村長久：ARMS2 遺伝子 A69S 多型の迅速検出キットの開発および加齢黄斑変性診療における臨床応用 日本臨床眼科学会  
2009/10/09
7. 岩間大輔、宮原晋介、田村寛、宮本和明、広瀬文隆、吉村長久：炎症時網膜での白血球動態における iNOS の役割 日本眼科学会総会 2008/04/17
8. Iwama D, Miyahara S, Tamura H, Miyamoto K, Hirose F, Yoshimura N. Lack of iNOS Attenuates Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in Retinal Microcirculation. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology.* 2008/04/28

9. 大音壮太郎、辻川明孝、森哲、中川聡子、  
林寿子、尾島優美子、中西秀雄、岩間大輔、  
後藤謙元、田村寛、大谷篤史、吉村長久：  
SD-OCT におけるポリープ状脈絡膜血管症と  
中心性漿液性網脈絡膜症の網膜構造 日本  
網膜硝子体学会 2008/11/27

〔図書〕（計 1 件）

1. 吉村長久・辻川明孝・大谷篤史・田村寛  
加齢黄斑変性：医学書院 2008 年 10 月 15 日  
第 1 版発行 1-264

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 寛 (TAMURA HIROSHI)  
京都大学 医学研究科 助教  
研究者番号：40418760