

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

期間番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592236

研究課題名（和文） 異常眼底自発蛍光の病理学的意義と加齢黄斑変性症との関連性の解明

研究課題名（英文） Pathogenesis of abnormal fundus autofluorescence and its relevance to age-related macular degeneration

研究代表者

安川 力 (YASUKAWA TSUTOMU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00324632

研究成果の概要(和文):加齢黄斑変性は成人失明の主要原因である。加齢現象を理解することは病態解明や疾患予防につながるものである。最初に加齢変化は網膜色素上皮細胞内へのリポフスチンと呼ばれる難溶性顆粒の蓄積であるが、本研究では、リポフスチン模擬微粒子を家兔の網膜下に移植することにより、リポフスチン蓄積モデルを作製したところ、ヒトの加齢眼でも認める異常眼底自発蛍光を観察できた。本モデルは加齢黄斑変性の病態を再現しており加齢黄斑変性の病態解明に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文):Age-related macular degeneration (AMD) is a major cause of legal blindness in the adult. Understanding of aging changes in eyes may be required to elucidate the pathogenesis of AMD and develop new prophylactic modalities. The first senescent change in the eye is the accumulation of lipofuscin, granules refractory to lysosomal degradation into retinal pigment epithelial cells. In this study, the rabbit AMD model was developed by injecting imitation lipofuscin into the subretinal space. This model revealed abnormal fundus autofluorescence similar to the findings observed in human aging eyes with or without AMD. This model mimicked the pathology of AMD and might be useful to elucidate the biogenesis of abnormal fundus autofluorescence and the pathogenesis of AMD.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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:眼細胞生物学・加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は高齢者の失明の主要原因であり、予防法や新しい治療法の開発につながる病態理解のためには加齢現象を理解する必要がある。疫学上、加齢黄斑変性のリスクとなる前駆病変としてドルーゼンの沈着、網膜色素上皮の色素異常と並んで、異常眼底自発蛍光が最近の眼底観察機器の進歩で観察可能となり、注目されているが発生機序はわかっていない。

2. 研究の目的

眼内で起こる最初に加齢現象として、網膜色素上皮細胞内にリポフスチンと呼ばれる自発蛍光を有する難溶性顆粒が蓄積するが、我々はリポフスチン模擬微粒子の網膜下注入による家兔加齢黄斑変性を開発した。このモデルを用いて、異常眼底自発蛍光の観察と発生機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 最終糖化産物(リポフスチン模擬)微粒子の作製:アルブミン水溶液にグリコールアルデヒド水溶液を添加後、エチルセルロース添加トルエン溶液に混合し、超音波プローブで water in oil エマルジョンを形成させ、そのまま4日間攪拌し続け、最終糖化産物形成反応によるアルブミンの架橋微粒子を得た。

(2) 培養網膜色素上皮細胞へのリポフスチン模擬微粒子の影響の検討:ドイツアイバンク協会より得たヒト眼球から単離した網膜色素上皮細胞を培養し、微粒子を培養液に混和して細胞に貪食させた後、細胞活性、接着能、増殖能等を検討した。

(3) 家兔加齢黄斑変性モデルの作製:麻酔によ

る鎮静下で有色家兔の網膜下にリポフスチン模擬微粒子を注入した後、検眼鏡、生体顕微鏡検査、蛍光眼底造影、眼底自発蛍光測定などを行った。また、安楽死後に組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) リポフスチンと同サイズの直径約 $1\mu\text{m}$ の最終糖化産物微粒子を得た。

(2) 培養網膜色素上皮への影響を確認したところ、細胞数の100倍数の微粒子を培養液に混和した場合、全ての生存細胞が1個以上の微粒子を貪食していることが確認できた。この条件で、細胞の生存率は微粒子を与えていない対照群と有為差はなく、また細胞の接着能、増殖能にも影響は認めなかった。微粒子の一部は細胞外に排出されたが、一方で、難溶性で1ヶ月にわたって培養細胞内に留まっていることが確認できた。

(3) 家兔の網膜下に注入したリポフスチン模擬微粒子は網膜色素上皮細胞によって速やかに貪食されることにより、術後1週目には微粒子が網膜色素上皮細胞内に蓄積しており、ヒトの加齢眼におけるリポフスチン蓄積を模倣することができた。この家兔眼において、術後1ヶ月目にはドルーゼンと呼ばれる網膜色素上皮下の沈着物やヒトの加齢眼で観察されるような特徴的な lace-like, linear, patchy, speckled パターンの異常眼底自発蛍光を認めた。また、術後3ヶ月には、脈絡膜新生血管を時に認める他、リポフスチン模擬微粒子が過剰蓄積している部分には地図状萎縮を認めた。ヒトと同様、lace-like パターンの部位に地図状萎縮が発生するなどの所見が得られた。組織学的検討により、異常自発

蛍光の発生源は網膜色素上皮下であり、注入したリポフスチン模擬微粒子とは違う物質であることが示唆された。このように、家兎加齢黄斑変性モデルにおいて、加齢黄斑変性の病態に近似した所見が得られ、今後病態解明に向けた研究を進める予定である。

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 9 件)

- ① Yasukawa T, Tabata Y, Kimura H, Ogura Y. Recent advances in intraocular drug delivery systems. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 5: 1-10, 2011, 査読有
- ② Yasukawa T, Tabata Y, Kimura H, Ogura Y. Ocular drug delivery for bioactive protein. *Expert Rev Ophthalmol.* 6: 657-667, 2011, 査読有
- ③ Mizutani T, Yasukawa T, Ito Y, Takase A, Hirano Y, Yoshida M, Ogura Y. Pneumatic displacement of submacular hemorrhage with or without tissue plasminogen activator. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 249: 1153-1157, 2011, 査読有
- ④ Yafai Y, Yang XM, Niemeyer M, Nishiwaki A, Lange J, Wiedemann P, King AG, Yasukawa T, Eichler W. Anti-angiogenic effects of the receptor tyrosine kinase inhibitor, pazopanib, on choroidal neovascularization in rats. *Eur J Pharmacol.* 666: 12-18, 2011, 査読有
- ⑤ Yasukawa T, Ogura Y. Medical devices for the treatment of eye diseases. *Handb Exp Pharmacol.* 197: 469-489, 2010, 査読有
- ⑥ Hirano Y, Yasukawa T, Usui Y, Nozaki M, Ogura Y. Indocyanine green angiography-guided laser photocoagulation

combined with sub-tenon's capsule injection of triamcinolone acetonide for idiopathic macular telangiectasia. *Br J Ophthalmol.* 94: 600-605, 2010, 査読有

- ⑦ Yasukawa T. Inflammation in age-related macular degeneration: pathological or physiological? Editorial. *Expert Rev Ophthalmol.* 4: 107-112, 2009, 査読有
- ⑧ Hirata M, Yasukawa T, Wiedemann P, Kimura E, Kunou N, Eichler W, Takase A, Sato R, Ogura Y. Fundus autofluorescence and fate of glycoxidized particles injected into subretinal space in rabbit age-related macular degeneration model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 247: 929-937, 2009, 査読有
- ⑨ Hirano Y, Ito T, Nozaki M, Yasukawa T, Sakurai E, Yoshida M, Ogura Y. Intraocular pressure elevation following triamcinolone acetonide administration as related to administration routes. *Jpn J Ophthalmol.* 53: 519-522, 2009, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 安川 力、JFAM スタディグループ: 加齢黄斑変性初期病態に関する臨床研究報告(2)-眼底異常所見と網膜感度の関連-(加齢黄斑変性初期病態調査(2)). 第64回日本臨床眼科学会. 2010, 11月11-14日, 神戸
- ② Yasukawa T, Wiedemann P, Ogura Y. In vitro drusen model: 3D-spheroid culture of retinal pigment epithelial cells. 27th meeting of the Club Jules Gonin, 2010, Nov. 3-6, Kyoto, Japan
- ③ Yasukawa T. Drug delivery systems for treatment of macular diseases. Symposium. Advances in molecular biology of macular diseases. The 25th Congress of APAO, 2010, Sep. 16-20, Beijing, China

④ Yasukawa T, Wiedemann P, Wolfram E, Yafai Y, Nishiwaki A, Bringmann A, Ogura Y. Multicellular spheroid culture of retinal pigment epithelial cells enhancing differentiation as an epithelium and formation of Bruch's membrane. 107th DOG Congress, 2009, Sep. 24-27, Leipzig

⑤ Yasukawa T, Wiedemann P, Nishiwaki A, Takase A, Sato R, Ogura Y. Three-dimensional spheroid culture visualizing membranogenesis of Bruch's membrane and basal functions of retinal pigment epithelium. The 24th Congress of APAO, 2009, May 16-19, Bali, Indonesia

6. 研究組織

(1)研究代表者

安川 力(YASUKAWA TSUTOMU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号:00324632

(2)研究分担者

小椋 祐一郎(OGURA YUICHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号:70191963

野崎 実穂(NOZAKI MIHO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号:00295601