

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10875

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性における炎症とアポトーシスの関与解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of the role of inflammation and apoptosis and development of a new target in age-related macular degeneration

研究代表者

平野 佳男 (Hirano, Yoshio)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40405163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性は失明原因の上位の疾患で、近年増加傾向にある。その滲出型である脈絡膜新生血管(CNV)に対しては、血管内皮細胞増殖因子阻害薬の硝子体内注射が一定の効果をあげている。しかしながら、無効例、複数回の注射が必要であるなど、課題は多い。今回、マウスで実験的にCNVを作成し、CNVの病態解明を行った。CNVの形成には炎症とアポトーシスが関与しており、それらの制御が必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is a vision-threatening disease and the number of patients continues to grow. Recently developed anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) therapy for choroidal neovascularization (CNV) has revolutionized the treatment in visual improvement. However, there are still ineffective cases or most of the patients need multiple injections of anti-VEGF agents. We aimed to elucidate the pathophysiology of CNV using mouse laser CNV model to investigate a new target for CNV. Inflammation and apoptosis were associated with the CNV formation. Therefore, to control inflammation and apoptosis should be an alternative therapy to suppress vision loss associated with CNV in AMD.

研究分野：網膜硝子体

キーワード：脈絡膜新生血管 炎症 アポトーシス 網膜色素上皮

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) は欧米先進国における成人の失明原因の首位である。我が国では現在は失明原因の第4位に位置するが、近年の生活様式の欧米化に伴い、増加傾向にある。

加齢黄斑変性は脈絡膜新生血管 (CNV) が発生する滲出型と網膜視細胞、網膜色素上皮 (RPE)、脈絡膜が萎縮する萎縮型がある。萎縮型に対する有効な治療法は、現在まで確立されていないが、滲出型に対してはこれまで様々な治療法が行われてきた。その中でも、2008 年末に登場した血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 阻害薬の硝子体内注射がこれまでの治療を上回る効果をあげている。しかし、薬剤が高価であるうえ、薬効が約1ヶ月と短いため、複数回の注射が必要となることが多く、医療費の高騰、患者負担の増大などは社会的な問題である。さらに、VEGF 阻害薬投与後の RPE 萎縮による視力低下が指摘 (Grunwald JE, et al. *Ophthalmology* 2014) されている。AMD のような慢性疾患では、VEGF 阻害薬が長期的に複数回投与されることが多いが、その影響でさらに RPE 萎縮と不可逆的な視力低下をきたす症例が増加する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、VEGF とは異なる新たなターゲットを見つけ、新規治療法開発の足がかりとすることを目的とした。

我々はこれまで、AMD の滲出型、萎縮型の病態解明に関する基礎実験を行ってきた。その成果として、萎縮型 AMD の発症に、DICER1 酵素の発現低下とそれに伴う *Alu* RNA の過剰な蓄積が関与すること (Kaneko H, Hirano Y, et al. *Nature* 2011)、さらには、*Alu* RNA による RPE の細胞死に Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) (Valeria T, Hirano Y, et al. *Cell* 2012)、ERK1/2 (Dridi S, Hirano Y, et al. *PNAS* 2012)、P2X7 (Kerur N, Hirano Y, et al. *IOVS* 2003)、Caspase-8 (Kim Y, Hirano Y, et al. *PNAS* 2014) などが関与することを報告した (細胞死はアポトーシスによることも報告)。滲出型の CNV の発症には、マクロファージ (Sakurai E, et al. *IOVS* 2003)、補体 (Nozaki M, et al. *PNAS* 2006)、ケモカインレセプター (CCR3) (Takeda A, Nozaki M, et al. *Nature* 2009) が関与することを解明し、CNV における炎症の関与を報告してきた。

今回我々は、CNV の病態における MyD88 の関与に注目した。MyD88 は一般に免疫細胞のアダプター分子であると考えられている (O'Neil LA, et al. *Nat Rev Immunol* 2007) が、Toll-like Receptors (TLRs) 等のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることも指摘されている (Warner N, et al. *J Immunol* 2013)。また MyD88 は

Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase (IRAK) や nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を活性化し、炎症を誘導することも知られている (Kumar H, et al. *Int Rev Immunol* 2011)。

臨床では CNV による滲出性変化 (炎症) 後に RPE 萎縮 (アポトーシス) をきたす症例が散見され、炎症とアポトーシスが密接に関係している可能性がある。我々はそこに MyD88 が中心的な役割をしているのではないかと考えて本研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) マウスレーザー CNV モデルでの CNV の体積比較: 野生型 C57BL/6 マウスの両眼に散瞳剤を点眼後、麻酔下で両眼の眼底に 4 発レーザーを施行し、CNV を作成する。レーザー施行後 7 日目に眼球を摘出し、4% PFA で固定後、RPE-脈絡膜 (Choroid) フラットマウントを作成し、FITC で標識されたレクチンを用いて CNV の染色を行い、共焦点顕微鏡で CNV の画像を撮影し、ImageJ ソフトウェアで CNV の体積を測定する。このモデルを用いて、レーザー施行直後に MyD88 inhibitor をマウス硝子体内注射し、CNV が抑制されるかを Control inhibitor を対照として比較する。

(2) 蛍光眼底造影検査による CNV の活動性評価: 同様にレーザー施行後、7 日目に両眼に散瞳剤点眼後、フルオレセインナトリウムを腹腔内注射し、1、5、10 分後にフルオレセインフィルターを装備した眼底カメラで蛍光眼底造影検査 (FA) を行う。CNV からの蛍光漏出をグレード評価し、CNV の活動性を比較する。

(3) マウスレーザー CNV モデルでの MyD88 の過剰発現と炎症性サイトカインの濃度測定: レーザー CNV 作成後、眼球摘出し、CNV を抗 CD31 抗体で染色、また抗 MyD88 抗体も使用し、CNV 周囲に MyD88 が過剰発現しているかを免疫染色法で確認する。

また、同様にレーザー CNV 作成後、経時的に眼球を摘出し、網膜と RPE-Choroid 複合体を抽出し、ELISA 法で、VEGF、IL-6、MCP-1 のタンパク濃度を測定する。対照としては、レーザー未施行眼を用いる。また、レーザー施行直後に、マウス硝子体内に MyD88 inhibitor を注射し、それらのタンパクの過剰発現が抑制されるかを検証する。

(4) MyD88 inhibitor と抗 VEGF 抗体 (アフリベルセプト) の RPE 細胞死への影響の検証: 同様にマウス眼底にレーザー施行、その後 MyD88 inhibitor を硝子体内注射し、7、14 日後に眼球摘出し、RPE 細胞の形態を ZO-1 染色法で評価する。さらには TUNEL 染色法で死細胞数をカウントし、比較する。

4. 研究成果

(1) レーザーCNVの体積が、MyD88 inhibitor 投与したものは、Control inhibitor と比較して有意に抑制されることが確認できた。

(2)FAでも、MyD88 inhibitor を投与したものは、CNVの活動性の低下が確認できた。さらには、アクリジンオレンジを用いた白血球染色法で、CNV周囲に集積した白血球数が有意に抑制されていた。

(3)免疫染色法では、レーザーCNVの周囲にMyD88が過剰に発現していることが確認できた。また、レーザー施行後、VEGF、IL-6、MCP-1ともに、Day1とDay3で過剰に発現することが確認できた。MyD88 inhibitor を硝子体内に注射したものはControl inhibitor と比較し、有意にそれら炎症性サイトカインの過剰発現が抑制されることが確認できた。

(4)MyD88 inhibitor を投与したものは、抗VEGF抗体を投与したものと比較して、ZO-1染色法で、RPEの死細胞数が抑制され、TUNEL染色法による死細胞数も抑制されていることが確認できた。

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19件)

Kawamura M, Hirano Y (corresponding author), Yoshida M, Mizutani T, Sugitani K, Yasukawa T, Ogura Y. Six-Month Results of Intravitreal Ranibizumab for Macular Edema after Branch Retinal Vein Occlusion in a Single-Center Prospective Study: Visual Outcomes and Microaneurysm Formation. Clin Ophthalmol. In Press. 査読有

Yasuda Y, Hirano Y (corresponding author), Esaki Y, Tomiyasu T, Suzuki N, Yasukawa T, Yoshida M, Ogura Y. Peripheral Microvascular Abnormalities Detected by Wide-Field Fluorescein Angiography in Eyes with Branch Retinal Vein Occlusion. Ophthalmic Res. 2018,22:1-8. 査読有 Doi. 10.1159/000488496.

Morikawa S, Japan-Clinical Research of Study (J-CREST) group, Okamoto Y, Okamoto F, Inomoto N, Ishikawa H, Harimoto K, Ueda T, Sakamoto T, Oshika T, Mitamura Y, Gomi F, Takeuchi M, Ogata N, Yamashita T, Otsuka H, Sameshima S, Shiihara H, Sugitani K, Hirano Y,

Yasukawa T, Sawada O, Ohji M, Mori J, Kinoshita T, Takamura Y. Clinical characteristics and outcomes of fall-related open globe injuries in Japan. In Press. 査読有 Doi. 10.1007/s00417-018-3959-z.

Morikawa S, Okamoto F, Okamoto Y, Inomoto N, Ishikawa H, Ueda T, Sakamoto T, Hirano Y, Sawada O, Mori J, Takamura Y, Oshika T. Clinical characteristics and visual outcomes of sport-related open globe injuries. Acta Ophthalmologica. 2018, in Press. 査読有 Doi. 10.1111/aos.13704.

Kerur N, Fukuda S, Banerjee D, Kim Y, Fu D, Apicella I, Varshney A, Yasuma R, Fowler BJ, Baghdasaryan E, Marion KM, Huang X, Yasuma T, Hirano Y, Serbulea V, Ambati M, Ambati VL, Kajiwarra Y, Ambati K, Hirahara S, Bastos-Carvalho A, Ogura Y, Terasaki H, Oshika T, Kim KB, Hinton DR, Leitinger N, Cambier JC, Buxbaum JD, Kenney MC, Jazwinski SM, Nagai H, Hara I, West AP, Fitzgerald KA, Sadda SR, Gelfand BD, Ambati J. cGAS drives noncanonical-inflammasome activation in age-related macular degeneration. Nat Med. 2018,24:50-61. 査読有 Doi. 10.1038/nm.4450.

Kurobe R, Hirano Y (corresponding author), Niwa N, Sugitani K, Yasukawa T, Yoshida M, Ogura Y. Wide-field fluorescein and indocyanine green angiography findings in the eyes with Vogt-Koyanagi-Harada disease. J Ophthalmic Inflamm Infect. 2017,7:16. 査読有 Doi. 10.1186/s12348-017-0134-3.

Suzuki N, Hirano Y (corresponding author), Ichida M, Tomiyasu T, Esaki Y, Yasukawa T, Ogura Y. Preoperative optical coherence tomography visualization of epiretinal membranes enhances surgical strategies. Clin Ophthalmol. 2016,10:2297-2302. 査読有 PMID: 27895460.

Suzuki N, Hirano Y (corresponding author), Tomiyasu T, Esaki Y, Uemura A, Yasukawa T, Yoshida M, Ogura Y. Retinal Hemodynamics Seen on Optical Coherence Tomography Angiography Before and After Treatment of Retinal Vein Occlusion. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016,57:5681-5687. 査読有 Doi: 10.1167/iovs-16-20648.

Tomiyasu T, Hirano Y (corresponding author), Yoshida M, Suzuki N, Nishiyama

T, Uemura A, Yasukawa T, Ogura Y. Microaneurysms cause refractory macular edema in branch retinal vein occlusion. *Sci Rep*. 2016;6:29445. 査読有 Doi: 10.1038/srep29445.

Yasuma R, Cicatiello V, Mizutani T, Tudisco L, Kim Y, Tarallo V, Bogdanovich S, Hirano Y, Kerur N, Yasuma T, Fowler BJ, Wright CB, Apicella I, Greco A, Brunetti A, Ambati BK, Helmers SB, Lundberg IE, Viklicky O, Leusen JH, Verbeek JS, Gelfand BD, Bastos-Carvalho A, De Falco S, Ambati J. Intravenous Immune globulin suppresses angiogenesis in mice and humans. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1. Pii:15002. 査読有 PMID: 26925256.

Kachi I, Yasukawa T, Kato A, Takase N, Morita H, Kubota A, Hirano Y, Uemura A, Ogura Y. Combination therapy with intravitreal tissue plasminogen activator and ranibizumab for subfoveal type 2 choroidal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol*. 2016;60:179-186. 査読有 Doi: 10.1007/s10384-016-0434-4.

Bogdanovich S, Kim Y, Mizutani T, Yasuma R, Tudisco L, Cicatiello V, Bastos-Carvalho A, Kerur N, Hirano Y, Baffi JZ, Tarallo V, Li S, Yasuma T, Arpitha P, Fowler BJ, Wright CB, Apicella I, Greco A, Brunetti A, Ruvo M, Sandomenico A, Nozaki M, Ijima R, Kaneko H, Ogura Y, Terasaki H, Ambati BK, Leusen JH, Langdon WY, Clark MR, Armour KL, Bruhns P, Verbeek JS, Gelfand BD, De Falco S, Ambati J. Human IgG1 antibodies suppress angiogenesis in a target-independent manner. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1. pii: 15001. 査読有 PMID: 26918197.

Nagai H, Hirano Y (corresponding author), Yasukawa T, Morita H, Nozaki M, Wolf-Schnurrbusch U, Wolf S, Ogura Y. Prevention of increased abnormal fundus autofluorescence with blue light-filtering intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg*. 2015;41:1855-1859. 査読有 Doi: 10.1016/j.jcrs.2015.01.017.

Suzuki N, Hirano Y (corresponding author), Yoshida M, Tomiyasu T, Uemura A, Yasukawa T, Ogura Y. Microvascular Abnormalities on Optical Coherence Tomography Angiography in Macular Edema Associated with Branch Retinal Vein Occlusion. *Am J Ophthalmol*.

2016;161:126-132.e1. 査読有 Doi: 10.1016/j.ajo.2015.09.038.

Ogura S, Yasukawa T, Kato A, Kuwayama S, Hamada S, Hirano Y, Uemura A, Yoshida M, Ogura Y. Indocyanine Green Angiography-Guided Focal Laser Photocoagulation for Diabetic Macular Edema. *Ophthalmologica*. 2015;234:139-150. 査読有 Doi: 10.1159/000437360.

Hirano Y (corresponding author), Yasukawa T, Tsukada A, Yokoyama S, Ito Y, Nakazawa Y. Resolution of exudative changes refractory to ranibizumab after aflibercept injections at the margin of inferior staphyloma in tilted disc syndrome. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2015;46:384-386. 査読有 Doi: 10.3928/23258160-20150323-16.

Ito A, Hirano Y, Nozaki M, Ashikari M, Sugitani K, Ogura Y. Short pulse laser induces less inflammatory cytokines in the murine retina after laser photocoagulation. *Ophthalmic Res*. 2015;53:65-73. 査読有 Doi: 10.1159/000366520.

Orazbekov L, Yasukawa T, Hirano Y (corresponding author), Ogura S, Usui H, Nozaki M, Ogura Y. Vitrectomy without gas tamponade for macular retinoschisis associated with normal-tension glaucoma. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2015;46:107-110. 査読有 Doi: 10.3928/23258160-20150101-21.

Kato A, Yasukawa T, Suga K, Hirano Y, Nozaki M, Yoshida M, Ogura Y. Intravitreal ranibizumab for patients with neovascular age-related macular degeneration with good visual acuity. *Ophthalmologica*. 2015;233:27-34. 査読有 Doi: 10.1159/000368249.

〔学会発表〕(計16件)

安田優介、平野佳男、川村美穂子、高瀬範明、安川力、吉田宗徳、小椋祐一郎. 網膜静脈分枝閉塞症に伴う黄斑浮腫に対するラニビズマブ硝子体内投与の12ヶ月成績. 第122回日本眼科学会総会, 2018. 04.19-22, 大阪, 日本.

杉谷和彦、平野佳男、安川力、吉田宗徳、小椋祐一郎. 広角インドシアニングリーン蛍光眼底造影を用いた原田病の脈絡膜血管密度解析. 第56回日本網膜硝子体学会, 2017. 12.01-03, 東京, 日本.

富安胤太、平野佳男、鈴木識裕、江崎雄也、安田優介、植村明嘉、安川力、吉田宗徳、小椋祐一郎。網膜静脈閉塞症患者における網膜無灌流領域の網膜感度と黄斑浮腫の関係。第71回日本臨床眼科学会，2017。10.12-15，東京，日本。

江崎雄也、平野佳男、鈴木識裕、富安胤太、安田優介、小椋祐一郎。網膜静脈分枝閉塞症における毛細血管瘤の形態分類と網膜浮腫への関与。第71回日本臨床眼科学会，2017。10.12-15，東京，日本。

Tomiyasu T, Hirano Y, Yoshida M, Suzuki N, Uemura A, Yasukawa T, Ogura Y. Retinal Sensitivity in Nonperfused Areas is Correlated with Macular Edema and Microaneurysms Formation in Eyes with Retinal Vein Occlusion. 第42回日本微小循環学会。2017。03.25-26，富山，日本。

川村美穂子、平野佳男、吉田宗徳、水谷武史、杉谷和彦、小椋祐一郎。網膜静脈分枝閉塞症に伴う黄斑浮腫に対するラニビズマブ硝子体内投与の6ヶ月成績。第121回日本眼科学会総会。2017。04.06-09，東京，日本。

平野佳男。網膜静脈閉塞症における網脈絡膜循環障害評価（シンポジウム）。第121回日本眼科学会総会。第121回日本眼科学会総会。2017。04.06-09，東京，日本。

安田優介、平野佳男、鈴木識裕、富安胤太、江崎雄也、小椋祐一郎。広角蛍光眼底造影による網膜静脈分枝閉塞症の網膜周辺部病変の評価と視力予後の関係。第35回日本眼循環学会。2017。07.22-23，大阪，日本。

Kawamura M, Hirano Y, Yoshida M, Mizutani T, Sugitani K, Ogura Y. Six-Month Results of Ranibizumab for Macular Edema Following Branch Retinal Vein Occlusion - A Single-Center Prospective Study -. The 17th EURETINA Congress. 2017。09.07-10，Barcelona, Spain.

Kurobe R, Sugitani K, Hirano Y, Yasukawa T, Ogura Y. Densitometry of Choroidal Vessels in Eyes with Vogt-Koyanagi-Harada Disease by Wide-Field Indocyanine Green Angiography. The 17th EURETINA Congress. 2017。09.07-10，Barcelona, Spain.

Hirano Y, Yoshida M, Ogura Y. Retinal Sensitivity in Nonperfused Areas: Correlation with Macular Edema and Microaneurysm Formation in Retinal Vein

Occlusion. AAO2017. 2017。11.11-14，New Orleans, LA, USA.

Ichida M, Hirano Y, Suzuki N, Tomiyasu T, Yasukawa T, Ogura Y. Preoperative Optical Coherence Tomography Findings in Macular Epiretinal Membrane. ARVO2016. 2016。05.01-05，Seattle, WA, USA.

Suzuki N, Hirano Y, Yoshida M, Tomiyasu T, Uemura A, Yasukawa T, Ogura Y. Microvascular Abnormalities in Optical Coherence Tomography Angiography in Macular Edema Associated with Branch Retinal Vein Occlusion. ARVO2016. 2016。05.01-05，Seattle, WA, USA.

Tomiyasu T, Hirano Y, Suzuki N, Yoshida M, Uemura A, Yasukawa T, Ogura Y. Predictive Factors for Visual Outcomes and Risk Factors for Persistent Macular Edema in Patients with Branch Retinal Vein Occlusion. ARVO2016. 2016。05.01-05，Seattle, WA, USA.

Suzuki N, Hirano Y, Yoshida M, Tomiyasu T, Uemura A, Yasukawa T, Ogura Y. Retinal hemodynamics evaluated by optical coherence tomography angiography before and after anti-vascular endothelial growth factor therapy in retinal vein occlusion. The 10th APVRS. 2016。12.08-10，Bangkok, Thailand.

Tomiyasu T, Hirano Y, Suzuki N, Yasukawa T, Ogura Y. Earlier administration of anti-VEGF agents reduces microaneurysm formation in branch retinal vein occlusion. The 10th APVRS. 2016。12.08-10，Bangkok, Thailand.

〔図書〕(計8件)

平野佳男、小椋祐一郎。【網膜静脈閉塞症の最新のとらえ方】OCT angiographyによる虚血の評価。眼科。金原出版株式会社。7ページ。2017。

鈴木識裕、平野佳男。【OCTで血管を斬る！】網膜静脈閉塞症(RVO)。RETINA Medicine。先端医学社。6ページ。2017。

平野佳男。眼循環 わかりやすい臨床講座 網膜静脈閉塞症と網膜循環障害。日本の眼科。外為印刷。6ページ。2017。

平野佳男。【光干渉断層血管撮影(OCT angiography)のすべて】光干渉断層血管撮影の網膜静脈閉塞症への応用。あたらしい眼

科. メディカル出版. 5 ページ. 2017.

江崎雄也、平野佳男. 抗 VEGF 治療セミナー 抗 VEGF 療法後の眼内炎の 1 例. あたらしい眼科. メディカル出版. 2 ページ. 2017.

江崎雄也、平野佳男. 【新人スタッフのための めめ子と学ぶ! 眼科のキーワード 50 これだけ】処置・手術のためのキーワード 角膜移植術. 眼科ケア. メディカル出版. 2 ページ. 2017.

江崎雄也、平野佳男. 【新人スタッフのための めめ子と学ぶ! 眼科のキーワード 50 これだけ】処置・手術のためのキーワード 網膜硝子体手術. 眼科ケア. メディカル出版. 2 ページ. 2017.

平野佳男. 眼科医のための先端医療 (第 176 回) 萎縮型加齢黄斑変性の発症メカニズムと治療の可能性. あたらしい眼科. メディカル出版. 3 ページ. 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 佳男 (HIRANO, Yoshio)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 40405163

(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

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

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

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし