

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10889

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性発症に関与する前房水中自己抗体の同定と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of autoantibodies and novel therapies of age-related macular degeneration

研究代表者

諸星 計 (MOROHOSHI, Kei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60598415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)は脈絡膜新生血管(CNV)からの滲出液や出血により、黄斑部網膜が不可逆的障害を受け視力低下をきたす疾患であり、その病態には自己抗体による局所炎症の関与が示唆されている。我々は、AMD患者由来IgG中にはpyruvate kinase M2(PKM2)に対する中和抗体が存在することを報告しているが、本研究ではその阻害剤であるshikoninが、網膜色素上皮細胞からのVEGF産生を抑制し、レーザー誘発CNVラットモデルにおいてCNV増悪を抑制することを確認した。以上より、PKM2はAMD治療の新たな治療標的分子になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性症は本邦での失明原因の第4位であり、さらなる高齢化により今後その患者数の増加が見込まれる重要な疾患である。現在は、その病態の中心である脈絡膜新生血管(CNV)を抑制するための抗VEGF療法が主体であるが、薬価が非常に高額であり複数回投与が必要であるため、患者の経済的負担が問題になっている。本研究で同定したshikoninは、ごく微量かつ安価に現行の抗VEGF薬以上のCNV抑制効果をもたらすことができ、臨床応用されれば経済的患者負担のみならず、失明率を減らすことができると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is currently the leading cause of blindness and recent studies have indicated that local inflammation, in particular, autoimmune reaction affects the development of AMD.

We have identified several novel autoantibodies to metabolic enzymes, including pyruvate kinase M2 (PKM2), in the sera of AMD patients. Moreover, shikonin, a potent inhibitor of PKM2, suppressed the production of VEGF from ARPE-19 cells and the development of laser-induced CNV in rats. Hence, our data suggested that PKM2 could be a potential molecular target for novel therapeutic strategies of the disease.

研究分野：加齢黄斑変性

キーワード：自己抗体 脈絡膜新生血管

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AMD は欧米諸国での中途失明原因疾患の第1位であり、さらなる高齢化社会を迎える日本でも今後大幅な患者数増加が危惧されている重要な疾患である。その病態は、最も視機能が鋭敏である黄斑部に障害をきたす進行性・非可逆性疾患であり、RPE 下の沈着物である drusen を特徴とする dry 型と、脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization; CNV) を伴う wet 型に分類される。本国では、CNV からの滲出液や出血が直接網膜に障害を与えることにより急速な進行を呈する wet 型 AMD が多く、治療としては主に CNV に対する VEGF 阻害剤の硝子体内投与や光線力学的療法 (PDT) が行われているが、いずれも視力維持を目的とした消極的治療法であり再発も多い。このように現在のところ根治を目標とした有効な治療法はなく、早期診断治療が重要であるにもかかわらず、その予後診断に有用な臨床的バイオマーカーも同定されていない。

AMD は環境的因子と遺伝的因子の両方が関与している多因子性・多遺伝子性疾患と認識されているが、2003 年に補体系の制御因子のひとつである complement factor H (CFH) の一塩基変異多型と AMD 発症リスクとの関連が数多く報告され、その発症・進行には炎症反応、なかでも自己免疫の関与が示唆され始めている。実際に、AMD 患者血清には drusen の構成物質である carboxyethylpyrrole (CEP) に対する抗体が有意に認められ、抗 CEP 抗体を産生するマウスは、dry 型 AMD に類似した眼病変を発症することが報告されている (Hollyfield et al. *Nat Med.* 2008)。しかしその病態は未だ不明な点が多く、これまで自己抗体を包括的に探索した報告はない。

このような背景のもと、申請者らは antigen microarray 法を用いて網羅的に自己抗体をスクリーニングすることにより、AMD 患者血清中にはアポトーシス関連分子であるホスファチジルセリンに対する抗体が病期に相関して認められ (オッズ比 44.3)、直接的に新生血管誘導に関与していることを明らかにした (Morohoshi et al. *Exp Mol Path.* Feb, 2012)。次に眼組織特異度を高めるために網膜組織由来抗原を加えたアレイチップを用いて、自己免疫網膜炎患者血清における自己抗体プロファイルを明らかにし、その手法の有用性を報告した (Morohoshi et al. *J Autoimm.* 2009)。さらに AMD 関連網膜蛋白・drusen 構成分子約 80 種をプリントした AMD 特異的カスタムチップを作成することにより、患者血清中の glutamine synthetase (GS) に対する抗体を同定し、その酵素活性阻害作用により網膜毒性を有するグルタミン酸の蓄積増加が促されることを報告した (図 1A, Morohoshi et al. *Med Res Arch.* 2015)。また、新規抗網膜抗体同定のため、マウス網膜蛋白と AMD 患者由来 IgG を用いた 2 次元 western blotting・マススペクトル解析を行い、pyruvate kinase M2 (PKM2) や aldolase C (ALDOC) に対する自己抗体を同定し、老齢マウスモデルにてそれら酵素の発現低下を報告した (図 1B, Morohoshi et al. *Exp Mol Path.* Oct, 2012)。

このように AMD 患者血清中には特異的な抗網膜抗体が認められるが、本来 CNV は脈絡膜血管由来であり、網膜内へ伸展するためにはブルッフ膜や RPE といったバリアの破綻が不可欠である。また、老齢マウスにおける IgG 沈着は網膜よりも RPE・脈絡膜に著明に増強していたことより (図 1B, Morohoshi et al. *Med Res Arch.* 2015)、それらの部位に CNV の網膜内伸展のトリガーとなる局所炎症を誘発する抗原が存在する可能性が示唆された。そこで本研究では、RPE・ブルッフ膜・脈絡膜に対する前房水中自己抗体プロファイルを明らかにすることにより、より直接的に病変部に関与する自己抗体・抗原を同定し、AMD 発症の病態解明と新規治療法の探索を目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果をもとに、AMD 患者前房水中の自己抗体プロファイルを明らかにし、疾患の発症・増悪に関与している因子を探索する。また、動物モデルを用いることにより自己免疫反応の病態への関与を解明し、自己抗原・抗体特異的な新しい治療法の開発につながるトランスレーショナルな知見を明らかにすることを最終目標とした。具体的には研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) AMD 患者前房水中の自己抗原・抗体の同定
- (2) 同定された自己抗体・抗原の VEGF 産生への関与の検討
- (3) 動物モデルを用いた、AMD の発症増悪機序・治療反応性における自己抗体・抗原の関与の解明と新規治療法の開発

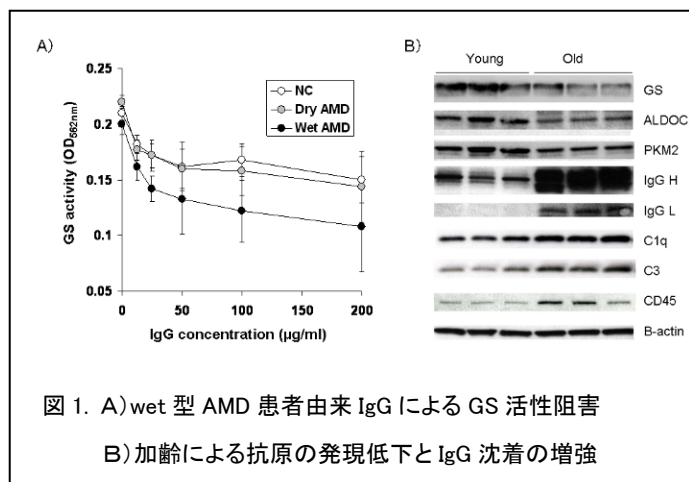


図 1. A) wet 型 AMD 患者由来 IgG による GS 活性阻害
B) 加齢による抗原の発現低下と IgG 沈着の増強

3. 研究の方法

(1) AMD 患者前房水中の自己抗原・抗体の同定

インフォームドコンセント取得後、白内障手術時に AMD 患者と正常コントロール患者より前房水を採取し、血清中に同定された GS,PKM2,ALDOC に対する自己抗体を ELISA にて測定した。

(2) 上記にて同定された自己抗体・抗原の VEGF 産生への関与の検討

AMD 患者中に認められた PKM2 IgG 抗体は、その病態を促進するのか抑制するのかを検討するため、PKM2 の阻害剤である shikonin を用いて、酸化ストレス(tBH) 下での網膜色素上皮細胞 (ARPE19) の VEGF 産生量を測定した。

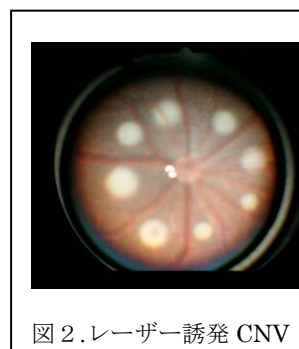


図 2. レーザー誘発 CNV

(3) ラットレーザー誘発 CNV ラット抑制試験

現在 AMD の治療薬として臨床使用されている抗 VEGF 薬 aflibercept と、PKM2 阻害剤である shikonin をラットに硝子体内注射し、レーザー誘発 CNV の面積を比較検討し、OCT にて CNV を確認した。

4. 研究成果

(1) AMD 患者前房水中の自己抗原・抗体の同定

前房水中の GS・PKM2・ALDOC に対する IgG 抗体価はいずれも検出感度以下であり、その存在は確認できなかった。測定に利用したサンプルが微量であったことも原因のひとつと考えられるため、なるべくサンプルを希釈せずに測定できる実験系の確立が課題と思われた。

(2) PKM2 阻害剤による網膜色素上皮細胞の VEGF 産生抑制

患者中に認められた抗 PKM2 IgG 抗体が中和抗体として、PKM2 活性を阻害したことにより、PKM2 阻害剤が AMD における CNV 増悪にどのように関与するのか検討した。tBH による酸化ストレス下において、ヒト網膜色素上皮細胞である ARPE19 からの VEGF 産生は shikonin の濃度依存性に抑制されることが確認された。

(3) レーザー誘発 CNV ラットモデルを用いた CNV 抑制試験

in vitro にて shikonin の VEGF 抑制効果が確認されたため、in vivo でも CNV 抑制効果があるかどうか、ラットに shikonin を硝子体内注射しレーザー誘発 CNV の面積を定量した。Shikonin は投与量依存性に CNV を抑制し、わずか 7.2ng の shikonin は、200µg の aflibercept と同等の CNV 抑制効果を示した。

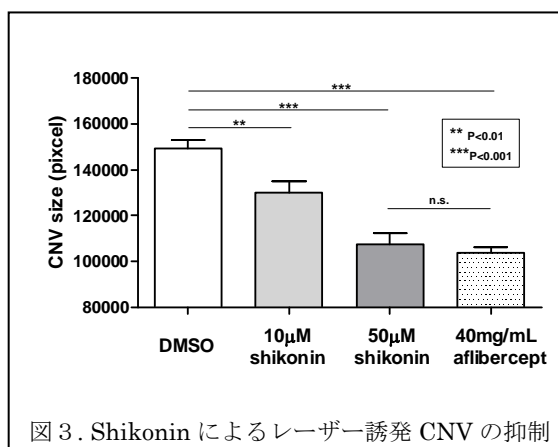
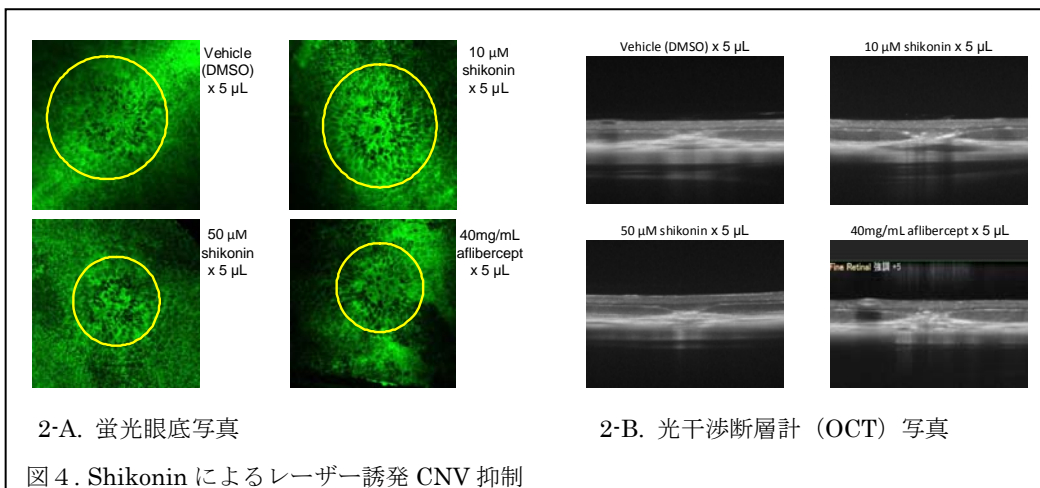


図 3. Shikonin によるレーザー誘発 CNV の抑制

(図 3, 4) これは aflibercept の 1/25,000 以下の投与量であり、PKM2 は AMD 治療の新たな分子ターゲットになる可能性と、その臨床応用の可能性が示唆された。



2-A. 蛍光眼底写真

2-B. 光干渉断層計 (OCT) 写真

図 4. Shikonin によるレーザー誘発 CNV 抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計7件）

- 1: Ishida T, Morohoshi K, Takeuchi Y, Soma R, Uchida M, Ohno-Matsui K. Swept-source optical coherence tomographic findings in eyes with metastatic choroidal tumor. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 査読有 2017 Oct 4;8:44-47. doi: 10.1016/j.ajoc.2017.10.005.
- 2: Ohno-Matsui K, Fang Y, Morohoshi K, Jonas JB. Optical Coherence Tomographic Imaging of Posterior Episclera and Tenon's Capsule. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有 2017 Jul 1;58(9):3389-3394. doi: 10.1167/iovs.16-21394.
- 3: Kasahara K, Moriyama M, Morohoshi K, Yoshida T, Simada N, Nagaoka N, Yokoi T, Shinohara K, Kaneko Y, Suga M, Ohno-Matsui K. SIX-YEAR OUTCOMES OF INTRAVITREAL BEVACIZUMAB FOR CHOROIDAL NEOVASCULARIZATION IN PATIENTS WITH PATHOLOGIC MYOPIA. *Retina*. 査読有 2017 Jun;37(6):1055-1064. doi: 10.1097/IAE.0000000000001313.
- 4: Nagaoka N, Jonas JB, Morohoshi K, Moriyama M, Shimada N, Yoshida T, Ohno-Matsui K. Glaucomatous-Type Optic Discs in High Myopia. *PLoS One*. 査読有 2015 Oct 1;10(10):e0138825. doi: 10.1371/journal.pone.0138825.
- 5: Ishida T, Shinohara K, Tanaka Y, Moriyama M, Morohoshi K, Shimada N, Yoshida T, Ohno-Matsui K. Chorioretinal folds in eyes with myopic staphyloma. *Am J Ophthalmol*. 査読有 2015 Sep;160(3):608-613.e1. doi: 10.1016/j.ajo.2015.05.028.
- 6: Morohoshi K, Kuo CH, Ohbayashi M, Patel N, Chong VN, Bird AC, Ono SJ. Anti-glutamine synthetase and other potential autoantibody biomarkers in the sera of patients with age-related macular degeneration. *Medical Research Archives*. 査読有 2015 Jul;(3) <https://journals.ke-i.org/index.php/mra/article/view/121>
- 7: Paulus YM, Kuo CH, Morohoshi K, Nugent A, Zheng LL, Nomoto H, Blumenkranz MS, Palanker D, Ono SJ. Serum inflammatory markers after rupture retinal laser injury in mice. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 査読有 2015 Mar;46(3):362-8. doi:10.3928/23258160-20150323-11.

〔学会発表〕（計0件）

〔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：大野 京子

ローマ字氏名：OHNO-MATSUI, kyoko

所属研究機関名：東京医科歯科大学,

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：30262174

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。