

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11454

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性による線維瘢痕化の病態および治療研究

研究課題名(英文) Investigation for fibrovascular scar formation of age-related macular degeneration

研究代表者

大島 裕司 (Oshima, Yuji)

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：00536237

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)：マウスモデルを用いて滲出型加齢黄斑変性の基本病態となる脈絡膜新生血管の発症進展と制御性T細胞の関与を検討した。制御性T細胞を眼内に注入することにより有意にCNV形成を抑制し、制御性T細胞から産生されたIL-10がIL-17の発現を抑制しVEGF非依存的に血管新生を抑制していることが示された。AMDに対して抗VEGF療法を行った295眼を後向きに行った線維瘢痕化の検討では、5年間の長期経過で、有意に視力低下が認められた。5年後の萎縮瘢痕化には、治療前視力とclassic CNVの関連が示唆され、神経網膜内への滲出が長期経過における瘢痕化に関連していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滲出型加齢黄斑変性は抗VEGF療法により治療可能の疾患となったが、長期的なマネジメントとして瘢痕萎縮病巣をできるだけ小さくする必要がある。今回、VEGFと独立した血管新生に関連する因子としてIL-17が考えられ、今後の治療に結びつく可能性が示唆された。また臨床的には、神経網膜内への滲出が長期の瘢痕萎縮に関連していることが明らかとなり、早期治療の有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：Participation of regulatory T cell for progression of choroidal neovascularization were investigated using mouse CNV model. IL-10 regressed CNV significantly produced from regulatory T cell by suppressed IL-17 production. This inhibition pathway is an independent of VEGF. Two hundred ninety-five AMD patients treated with anti-VEGF agent for five years were investigated retrospectively. Best corrected visual acuity was significantly deteriorated for five years. Macular atrophy, fibrovascular proliferation after 5-year treatment was suggested to be associated with basement visual acuity and FA classification, indicating that exudation into neural retina was associated with scarring in long term.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 脈絡膜新生血管 線維性瘢痕 網膜萎縮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)は眼科疾患の中で視力予後が不良の難治性疾患の1つである。AMDは欧米において中途失明原因第1位の疾患であり、わが国でも高齢化に伴いこの十数年で罹患者数は倍増しており増加の一途を辿っている。AMDにおける視力低下の約9割は視機能に重要な黄斑部に脈絡膜血管新生(choroidal neovascularization: CNV)とそれに伴う出血・滲出性変化による組織障害が生じるために起こる。

CNVの発症には血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)が重要な役割を果たしていることが明らかとなっており、現在臨床ではVEGFを標的とした薬剤が臨床応用されている。現在の抗VEGF療法では最初の3ヶ月を導入期と呼び、月に1度、毎月連続3回直接眼内への注射投与を行っている。その後は維持期と呼ばれ、毎月経過観察を行い、必要時に治療追加を行う。抗VEGF療法により、CNVの退縮がみられ視力向上・維持に一定の効果をあげているが、維持期に病変の再燃・再発によって再治療を余儀なくされる症例も少なくなく、患者の経済的・精神的負担及び、眼内炎をはじめとする合併症のリスクも高くなっている。症例によって同じ病変タイプでも抗VEGF療法が著効する症例と多数回治療を施行しても効果が現れない症例があり、これらの治療抵抗性の症例ではCNVの再発やそれに伴う出血、滲出性変化が止まらず社会的に失明しているのが現状である。また、VEGFは神経細胞等の恒常性維持に重要であり、抗VEGF抗体の頻回・長期投与が眼組織に悪影響を及ぼすことも懸念される。実際、マウス眼に抗VEGF中和抗体を投与すると眼組織障害及び機能障害が生じたとする報告もなされている(Takeda *A Nature* 2009)。AMD増悪期に見られるCNVに伴う出血や滲出性変化は、網脈絡膜組織を障害し、障害された組織はやがて線維化・瘢痕化を起こす瘢痕期と呼ばれる病態へと移行していく。一旦黄斑が線維瘢痕化すると抗VEGF療法も適応とならず、現時点では視力を改善させる有効な治療法がない。そのため増悪期に対するVEGF以外の分子を標的とする治療法の開発、さらには瘢痕期への移行を防ぐ治療法の開発は临床上重要な課題である。

## 2. 研究の目的

CNVの発症機序として、網膜・脈絡膜の慢性炎症の関与が明らかにされている。炎症反応はマクロファージを始めとする自然免疫系細胞とT細胞を中心とする獲得免疫系細胞が産生する種々のサイトカインによって調節されているが、これまでにCNVの形成にはインターロイキン(IL)-1やIL-6といった炎症性サイトカインが関与していることが報告されている(Lavalette *S Am J Pathol.* 2011)(Nagai *K Am J Pathol.* 2007)。現在様々な炎症性疾患において、炎症抑制作用を有する制御性T細胞(Treg)の関与が注目されている。制御性T細胞の分化誘導機構については未だ未解明の部分も多いが、IL-27が制御性T細胞を誘導することが報告されており、炎症制御機構については制御性T細胞の産生するIL-10が抑制作用の一端を担うことが明らかとなっている。以前我々はCNV形成モデルを使いIL-27がCNVの形成を抑制すること(Hasegawa *E J Leukoc Biol.* 2012)、さらには線維瘢痕化モデルを使いIL-10がCNV形成後の線維瘢痕化を抑制することを報告している(Yang *Y PLoS One* 2013)。これらの結果からAMDのいずれの病期においても制御性T細胞の関与が示唆される。そこで本研究ではAMDの各病期での制御性T細胞の役割を検討し、眼内における炎症抑制作用機序の解明と治療応用への可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

#### I) 制御性 T 細胞の CNV 形成への影響

本研究には実験的マウスレーザーCNVモデルを使用する。マウスの脈絡膜にレーザーを照射し組織障害を起こすと、炎症に伴いCNVを誘導することが出来る。フローサイトメトリー(FACS)を用いて、レーザー照射後に眼内に浸潤してくる炎症細胞、特に制御性T細胞の割合を検討する。CNVの評価方法はレーザー照射後1週間で脈絡膜組織を摘出し、病理組織学的に形成されたCNVを染色してその面積を計測して行う。制御性T細胞のCNV形成への作用を確認するため、*in vitro*でリンパ節と脾臓から採取した制御性T細胞をレーザー照射後に眼内へ移入し、その際のCNV形成変化について比較検討する。

#### II) CNV 形成における制御性 T 細胞の炎症制御機構の検討

種々の炎症性サイトカインの眼内発現量は、眼球よりRNAを抽出しreal-time PCRを用いて計測する。制御性T細胞の炎症抑制作用は炎症抑制性サイトカインIL-10に依存すると言われているが、CNV形成における機序は不明である。そこでレーザー照射後のIL-10の眼内発現量を経時的に計測する。また制御性T細胞眼内移入時のIL-10の眼内発現量について非移入時と比較し、その血管新生抑制作用の可能性について検討する。また同時に血管新生促進因子であるVEGFやその他のサイトカインの眼内発現量の変化も計測し、CNV形成への影響を検討する。さらにFACSを用いて、制御性T細胞眼内移入によるマクロファージやその他のT細胞の眼内浸潤割合の変化を比較検討する。

#### III) 線維瘢痕化症例の臨床的特徴の検討

当院におけるAMD再来で、抗VEGF治療開始後3ヶ月後、12ヶ月後、24ヶ月後における線維化、および萎縮の発症率を検討し、線維化における治療前の臨床所見、視力、中心窩網膜厚、CNVの臨床的タイプ、年齢、QOL、罹患期間、網膜病変領域等の患者背景因子により層別解析を行う。それにより明らかになる所見、因子などを包括的に検討し、線維化を抑制する治療方法を検討する。

### 4. 研究成果

#### I) 制御性 T 細胞の CNV 形成への影響

レーザー照射にて眼内に炎症を惹起すると翌日から、マクロファージなどの炎症細胞とともに制御性T細胞が眼内に浸潤してきていることが確認された。制御性T細胞のCNV形成に対する作用を検討するために、リンパ節と脾臓から採取した制御性T細胞をレーザー照射直後の眼内に移入し、1週間後にCNV形成を評価した。コントロール群と比較して制御性T細胞を移入した群では有意にCNV形成が抑制されており、制御性T細胞がCNV形成に抑制的に作用していることが考えられた。

#### II) CNV 形成モデルにおける制御性 T 細胞の炎症制御機構の検討

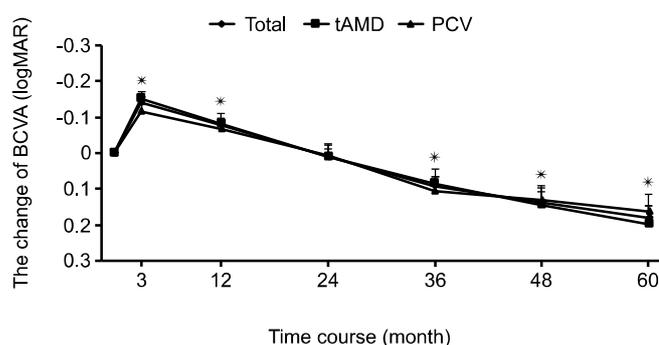
続いて、炎症抑制性サイトカインIL-10の眼内発現量について検討を行った。レーザー照射後の眼内IL-10の発現量を解析したところ、レーザー照射後2日目からIL-10の発現上昇が見られた。制御性T細胞眼内移入時のIL-10の眼内発現量は非移入時と比較して上昇しており、IL-10は制御性T細胞から産生されている可能性が示唆された。FACSを用いた検討ではCD11b陽性細胞からもIL-10が産生されており、制御性T細胞が間接的にIL-10産生を促進していることも示唆された。一方で血管新生促進因子(VEGF)の発現量に変化はなかった。その他の主要

な炎症性サイトカインの発現も検討した結果、血管新生促進作用を有すると考えられている IL-17 の産生が制御性 T 細胞の移入により抑制されていた。このことから制御性 T 細胞は IL-10 の産生を促進し、IL-17 の発現を抑制することで眼内の血管新生を抑制している可能性が示唆された。臨床応用を考えた際に VEGF 非依存的に血管新生を抑制することが出来れば、現在行われている抗 VEGF 療法の代替療法になる可能性がある。

### III) 線維癬痕化症例の臨床的特徴の検討

平成 21 年 4 月から平成 28 年 3 月までに当院で抗 VEGF 療法を行い、初回投与後 5 年以上経過した無治療滲出型 AMD およびその特殊型 295 眼（男性 186 例、女性 102 例）を対象とし、後ろ

図 1



向きに検討した。病型の内訳は典型 AMD は 167 眼、ポリープ状脈絡膜血管症 (PCV) は 119 眼、網膜内血管腫状増殖 (RAP) は 9 眼であった。治療後の視力経過を経時的に検討したところ、治療開始後 1 年までは有意に改善が見られたが、2 年後には治療前とほぼ同等まで低下、それ以降は 3 年、4 年、5 年後と徐々に視力低下がみられ、治療前より有意に悪化していた。(図 1)

AMD 治療長期経過において、治療を行っているにもかかわらず視力低下する大きな要因のひとつが線維癬痕化、萎縮である。今回の症例で地図状萎縮 (GA) の検討を行った。5 年間経過観察ができた 177 例中、GA の有無が判定できたのは 150 例、GA は 65 例、43% に認められた (表 1)。

表 1

	GA (+) (n=65, 43%)	GA (-) (n=85, 57%)	P value
年齢	74.0	72.6	0.28 †
性別 (男性)	58%	59%	1.0 †
FA 分類	Predominantly	23 (35%) / 14 (16%)	0.01 † *
	Minimally classic	26 (40%) / 41 (49%)	0.37 †
	Occult	16 (25%) / 29 (35%)	0.26 †
治療前視力 (logMAR)	0.63	0.38	0.0004 † *
5 年後視力 (logMAR)	0.75	0.37	0.0002 † *
治療回数	14.8	15.5	0.72 †
IVA 切替え症例数	18 (28%)	28 (33%)	0.609 †

GA+群と GA-群間で背景因子の単変量解析を行ったところ、年齢、性別および治療回数には両群間で有意差はなく、薬剤による萎縮の影響は少ないと考えられた。治療前視力、および 5 年後の視力不良が GA+群に有意に多く、FA 分類の間で有意差が認められ、Predominantly classic CNV である症例が有意に 5 年後 GA+群に多く認められた (表 1)。これらのことより、癬痕・萎縮病巣は長期の視力予後に大きく関わっており、治療前因子として、classic CNV のが癬痕萎縮に関連していることがわかる。長期の癬痕萎縮をできるだけ少なくするために、classic CNV の

症例、視力不良例はできるだけ早期に診断・加療を行い、治療を行っても長期的には視力悪化は免れないことをインフォームドコンセントしておく必要があると考えられた。

今回の結果より今後は早期から抗 VEGF 療法を積極的に行うのみならず、今後、IL-10 を含めた T 細胞制御を併用した治療を検討していく可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujiwara K, Yasuda M, Hata J, Oshima Y, Hashimoto S, Yoshitomi T, Kiyohara Y, Ishibashi T, Ninomiya T, Sonoda KH.	4. 巻 33
2. 論文標題 Prevalence and Risk Factors for Polypoidal Choroidal Vasculopathy in a General Japanese Population: The Hisayama Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Semin Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 813-819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08820538.2018.1506483.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akiyama M, Takahashi A, Momozawa Y, Arakawa S, Miya F, Tsunoda T, Ashikawa K, Oshima Y, Yasuda M, Yoshida S, Enaida H, Tan X, Yanagi Y, Yasukawa T, Ogura Y, Nagai Y, Takahashi K, Fujisawa K, Inoue M, Arakawa A, Tanaka K, Yuzawa M, Kadosono K, Sonoda KH, Ishibashi T, Kubo M.	4. 巻 63
2. 論文標題 Genome-wide association study suggests four variants influencing outcomes with ranibizumab therapy in exudative age-related macular degeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 1083-1091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0493-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasukawa T, Mori R, Sawa M, Shinjima A, Hara C, Sekiryu T, Oshima Y, Saito M, Sugano Y, Kato A, Ashikari M, Hirano Y, Asato H, Nakamura M, Matsuno K, Kuno N, Kimura E, Nishiyama T, Yuzawa M, Ishibashi T, Ogura Y, Iida T, Gomi F	4. 巻 14
2. 論文標題 Fundus autofluorescence and retinal sensitivity in fellow eyes of age-related macular degeneration in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0213161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0213161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wada Iori, Oshima Yuji, Shiose Satomi, Kano Kumiko, Nakao Shintaro, Kaizu Yoshihiro, Yoshida Shigeo, Ishibashi Tatsuro, Sonoda Koh-hei	4. 巻 257
2. 論文標題 Five-year treatment outcomes following intravitreal ranibizumab injections for neovascular age-related macular degeneration in Japanese patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1411 ~ 1418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-019-04361-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Joko Takeshi, Nagai Yoshimi, Mori Ryusaburo, Tanaka Koji, Oshima Yuji, Hikichi Yusuke, Komori Tetsushi, Carrasco Joao, Maculaitis Martine, Will Oliver, Beusterien Kathleen, Takahashi Kanji	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 <p>Patient Preferences for Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment for Wet Age-Related Macular Degeneration in Japan: A Discrete Choice Experiment</p>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Patient Preference and Adherence	6. 最初と最後の頁 553 ~ 567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/PPA.S228890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinojima A, Sawa M, Mori R, Sekiryu T, Oshima Y, Kato A, Hara C, Saito M, Sugano Y, Ashikari M, Hirano Y, Asato H, Nakamura M, Matsuno K, Kuno N, Kimura E, Nishiyama T, Yuzawa M, Ishibashi T, Ogura Y, Iida T, Gomi F, Yasukawa T	4. 巻 15
2. 論文標題 Five-year follow-up of fundus autofluorescence and retinal sensitivity in the fellow eye in exudative age-related macular degeneration in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hashiguchi N, Oshima Yuji, Shiose S, Kano K, Ishikawa K, Wada I, Funatsu H, Ishibashi T, Sonoda KH
2. 発表標題 Three-year Outcomes Following Treat-and-Extend Therapy Using Aflibercept for Neovascular Age-related Macular Degeneration in Japanese Patients
3. 学会等名 The 11th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wada I, Nakao S, Shiose S, Kaizu Y, Yamaguchi M, Arima M, Ishikawa K, Kano K, Oshima Yuji, Ishibashi T, Sonoda KH
2. 発表標題 The evaluation of disease activity in exudative age-related macular degeneration using en face hyperreflective foci
3. 学会等名 The 11th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大島裕司、梅野有美、梅田尚靖、永田竜朗、山川良治、内尾英一、近藤寛之、園田康平、石橋達朗
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性治療における視力およびQOL改善効果の関連性の検討：QUATRO study
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船津治彦、大島裕司、塩瀬聡美、狩野久美子、中尾新太郎、山口宗男、海津嘉弘、和田伊織、長谷川英一、徳永瑛子、吉田茂生、石橋達朗、園田康平
2. 発表標題 加齢黄斑変性に対するアフリベルセプトtreat and extend法の3年成績
3. 学会等名 第56回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Oshima Y, Joko T, Nagai Y, Mori R, Tanaka K, Hikichi Y, Komori T, Carrasco J, Maculaitis M, Will O, Beusterien K, Takahashi K
2. 発表標題 Patient Preferences for Anti-VEGF Treatment Regimens for Wet Age-Related Macular Degeneration in Japan
3. 学会等名 ARVO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大島裕司、塩瀬聡美、狩野久美子、石川桂二郎、中尾新太郎、和田伊織、海津嘉弘、長谷川英一、園田康平
2. 発表標題 加齢黄斑変性に対するアフリベルセプトtreat and extend法の5年成績
3. 学会等名 第36回日本眼循環学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Oshima, Satomi Shiose, Kumiko Kano, Iori Wada, Keijiro Ishikawa, Shintaro Nakao, Yoshihiro Kaitsu, Eiichi Hasegawa, Tatsuro Ishibashi, Koh-hei Sonoda
2. 発表標題 Five-year outcomes following treat-and-extend therapy using aflibercept for neovascular age-related macular degeneration in Japanese patients
3. 学会等名 The 12th Joint meeting of Chinese-Japanese-Korean Ophthalmologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	園田 康平  (Sonoda Koh-hei)  (10294943)	九州大学・医学研究院・教授    (17102)	