

令和 2 年 7 月 2 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：17K11456

研究課題名（和文）Beyond VEGFのアンメットニーズ：線維化と虚血へのマクロファージ教育療法

研究課題名（英文）Unmet Needs in the Beyond VEGF Era: Macrophage Educational Therapy for Retinal Fibrosis and Ischemia

研究代表者

中尾 新太郎（Nakao, Shintaro）

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：50583027

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）：マウス高酸素負荷虚血モデルにおいて、M1M2マクロファージの浸潤、M1M2マーカー mRNAレベルでの発現上昇を観察し、虚血領域にはM1マクロファージが有意に存在することを観察した。M1マクロファージを主に消去する塩化ガドリニウムにより虚血の改善を認め、M1マクロファージが網膜虚血の治療ターゲットとなることが示唆された。

網膜下線維化マウスモデルにおいて、Fate mapping解析を行い、線維化の主要構成成分であるmyofibroblastはRPE由来であることを確認した。この過程にROCKを介した上皮間葉移行EMTの関与を認め、ROCKは網膜下線維化の分子標的薬剤候補であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などの網膜疾患は近年抗VEGF療法の汎用により失明を免れる症例も増えてきた。しかし、抗VEGF療法においても治癒しない網膜虚血、網膜下線維化は現在のUnmet needsと言える。本研究はこれらの細胞レベルでのメカニズムを一部明らかにした。また今後の治療開発への一助となると考える。

研究成果の概要（英文）：In a retinal ischemia mouse model, we observed infiltration of M1and M2 macrophages and increased expression of M1and M2 marker at mRNA level. We also observed that M1 macrophages were significantly present in the ischemic area. Gadolinium chloride, which mainly deletes M1 macrophages, was found to improve ischemia, suggesting that M1 macrophages could be a therapeutic target for retinal ischemia.

Fate mapping analysis in a subretinal fibrosis mouse model revealed that myofibroblast, which is a major component of fibrosis, is derived from RPE. The process involves epithelial-mesenchymal transition via ROCK suggesting that ROCK is a candidate drug for molecular target of subretinal fibrosis.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 加齢黄斑変性 マクロファージ

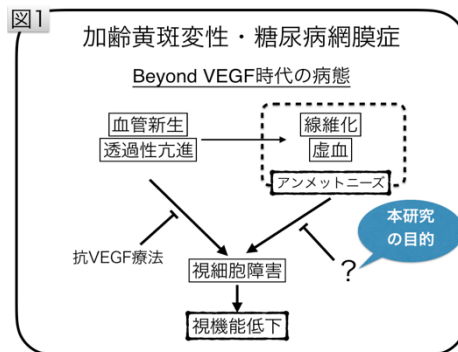
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網脈絡膜血管病である加齢黄斑変性(AMD)・糖尿病網膜症(黄斑浮腫)(DR)に対する抗VEGF療法の有用性は周知の事実である。しかし、その幅広い使用とともに疾患ごとの問題点が浮き彫りになっており、Beyond VEGFの新しい観点からの治療法が望まれている(図1)。

(AMDにおける抗VEGF療法の問題点) 加齢黄斑変性において抗VEGF療法後に滲出性変化が改善しても線維化が生じ、視機能障害を残る。同様の線維化がレーザー誘導脈絡膜新生血管モデルにて再現できることが確認され、その分子メカニズム解明と治療法開発が期待されている。

(DRにおける抗VEGF療法の問題点) 糖尿病網膜症における虚血に対してはレーザー光凝固がゴールドスタンダードであるが、侵襲を伴う治療であり、患者は夜盲・周辺視野狭窄を伴う。また、抗VEGF療法により虚血進行の報告もある。網膜虚血はそれに引き続く血管新生のみならず、虚血に伴う低酸素誘導の網膜神経障害が予想され、視機能障害に陥る。そのため網膜虚血の分子メカニズム解明は、「レーザー治療に頼らない新たな治療」探索は重要な課題である。



2. 研究の目的

本研究の目的は、網脈絡膜疾患の(1) 網膜下線維化 (2) 網膜虚血病態におけるマクロファージ関与解明と分画同定を行い、新たな治療標的を探索することである。

3. 研究の方法

(1) レーザー誘導脈絡膜新生血管モデルにおいて、線維化の観察される day21, 28 においてにて線維化におけるマクロファージを検討する。

(2) 糖尿病網膜症に近いと考えられる Kimba マウスを用いる。虚血の観察される 8 週齢において検討を行う。細胞分画プロファイリングにおいて個体間差が大きい場合は虚血モデルとして高酸素負荷網膜新生血管モデルを用いて検討する。

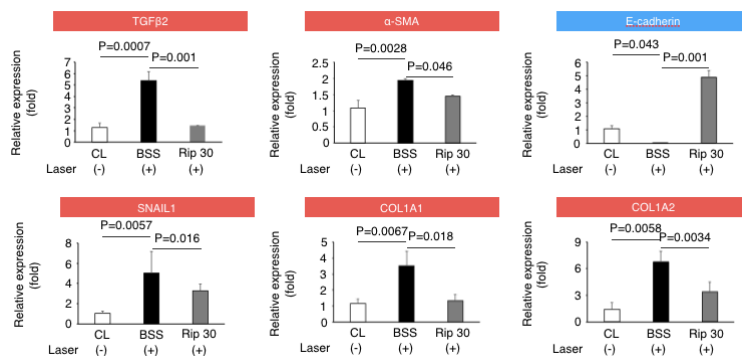
(1)(2)それぞれにおいて、whole mount 免疫染色法、フローサイトメトリー、PCR にて検討を行う。

4. 研究成果

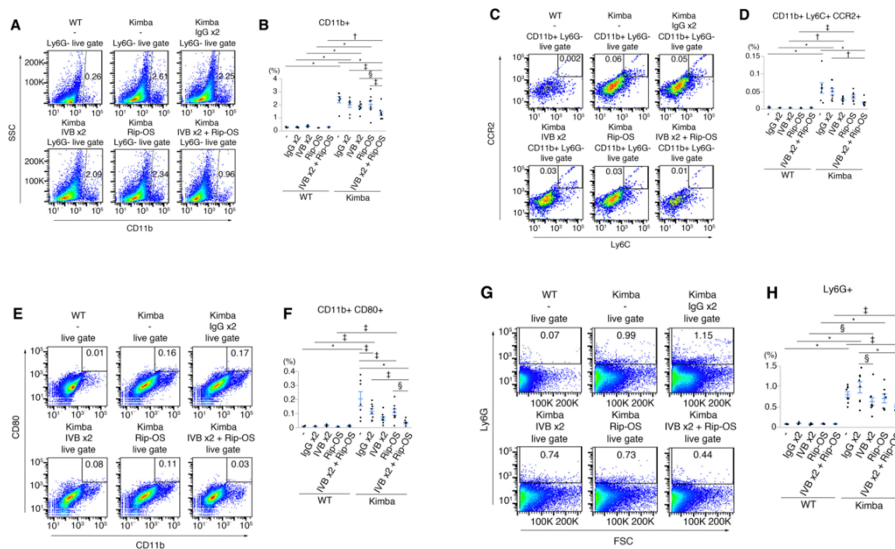
(1) われわれは当初、網膜下線維化にマクロファージ関与という仮説を立てた。線維化の主要な細胞群である myofibroblasts のオリジン検索のため Fate mapping 解析を行った。上皮間葉移行(EMT)として網膜色素上皮、内皮間葉移行(EndoMT)として血管内皮細胞がその候補となる。そこで網膜色素上皮 Best1-Cre マウスまたは内皮細胞 VE-cadherin-Cre マウスと ROSA261s1-Td Tomato mice を交配して行った。Fate mapping 解析より myofibroblast の多くは網膜色素上皮由来の EMT が重要であることを観察した。現在定量的観察を行っている。

(2)線維化部位での遺伝子発現を検討し、TGFβ2, Collagen1 の上昇を認め、EMT 関連遺伝子であるαSMA, Snail1 発現上昇を認めた。一方上皮系マーカーである E-cadherin の低下を認めた。またこれらの発現変化は TGFβ2 の下流に存在する Rho-kinase(ROCK)の阻害剤

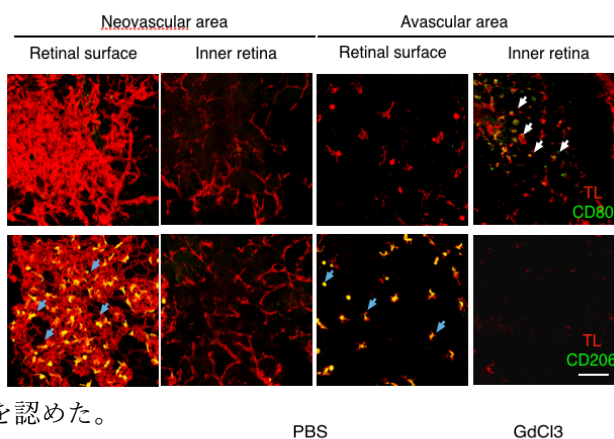
であるリパスジル (右図 Rip 30μM) により抑制された。現在、マイクロアレイによりマクロファージ関連遺伝子を含めた網羅的な解析を行っている。



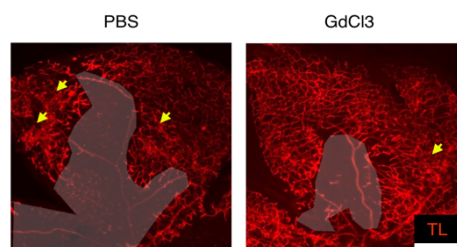
(3) われわれは Kimba マウスでのマクロファージ分画を検討した。CD11b+, CD11b+Ly6C+CCR2+, CD11b+CD80+, Ly6G+全てのマクロファージ分画がコントロールマウスに比べ増加を認めた。さらにそれらは抗 VEGF 療法単独では有意には抑制されないが、(以前高酸素負荷モデルで虚血改善を報告した) ROCK 阻害剤リパスジルでは抑制を認めた。これらの結果は血管透過性亢進への関与として論文発表を行なった (下図: Arima M, Nakao S et al, Diabetes 69:981-999, 2020)(1)。しかし、虚血の判定には Kimba マウスでは個体差が大きく困難であった。



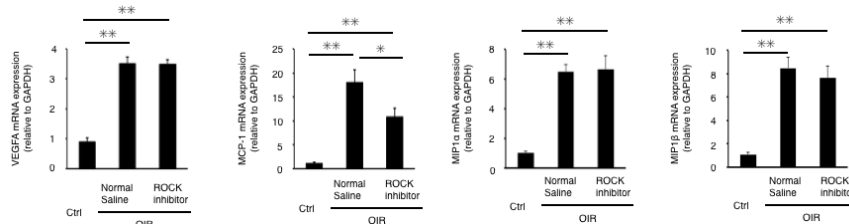
(4) そこでわれわれは以前リパスジルによる虚血改善を報告した高酸素負荷網膜虚血モデルを用いて検討を行なった。まずM1M2 マクロファージの代表的なマーカーについて mRNA レベルでの発現を検討したところ、虚血網膜では M1(CD80, CD68, NOS2), M2(CD206, CD163, CD204)全てにおいて上昇を認めた。また興味深いことに、免疫染色にて M2-like 分画は新生血管周囲と網膜表面に存在していたが、虚血網膜内には M1-like 分画の存在を認めた。



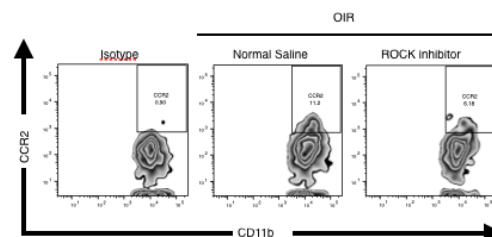
(5)M1-like, M2-like マクロファージの虚血への関与検討のため、塩化ガドリニウム(GdCl3), クロドロネートリポソーム(CI2MDP-Lip)の投与を行なった(2)。M1 優位に消去する GdCl3 では網膜虚血が有意に改善した。



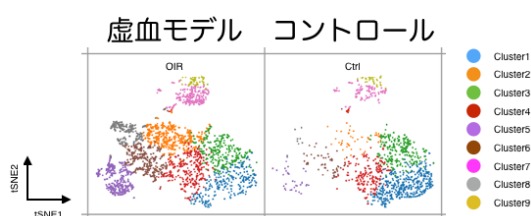
(6)我々は以前 ROCK 阻害剤であるリパスジルにより網膜虚血改善を観察している(3)。そこでリパスジル投与によりマクロファージ分画に変化が生じるかを検討したところ、M1 マクロファージを有意に減少させた。またマクロファージ遊走浸潤に関与する VEGFA, MCP-1, MIP1 α , MIP1 β について検討したところ、MCP-1 を有意に抑制した。



(7)MCP-1 のレセプターである CCR2+マクロファージに着目したところ、リパスジルで有意に抑制を認め、これらは血中の単球由来であった。さらに MCP-1 中和抗体投与により有意に網膜虚血の改善を認めた。



(8)そこでこれら虚血に関連する CCR2+マクロファージの機能解析を行うためにシングルセル RNA シークエンスを行い、現在解析中である。



<引用文献>

1. Arima M, Nakao S, Yamaguchi M, Feng H, Fujii Y, Shibata K, et al. Claudin-5 Redistribution Induced by Inflammation Leads to Anti-VEGF-Resistant Diabetic Macular Edema. *Diabetes*. 2020;69(5):981-99.
2. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci*. 2013;16(9):1211-8.
3. Yamaguchi M, Nakao S, Arita R, Kaizu Y, Arima M, Zhou Y, et al. Vascular Normalization by ROCK Inhibitor: Therapeutic Potential of Ripasudil (K-115) Eye Drop in Retinal Angiogenesis and Hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(4):2264-76.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kaizu Y, Nakao S*, Arima M, Wada I, Yamaguchi M, Sekiryu H, Hayami T, Ishikawa K, Ikeda Y, Sonoda KH.	4. 巻 97
2. 論文標題 Capillary Dropout is Dominant in Deep Capillary Plexus in Early Diabetic Retinopathy in Optical Coherence Tomography Angiography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 e811-e812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aos.14041.	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 Kaizu Y, Nakao S*, Sekiryu H, Wada I, Yamaguchi M, Hisatomi T, Ikeda Y, Kishimoto J, Sonoda KH.	4. 巻 256
2. 論文標題 Retinal flow density by optical coherence tomography angiography is useful for detection of nonperfused areas in diabetic retinopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 2275-2282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-018-4122-6.	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 Nakao S*, Yoshida S, Kaizu Y, Yamaguchi M, Wada I, Ishibashi T, Sonoda KH.	4. 巻 2
2. 論文標題 Microaneurysm Detection in Diabetic Retinopathy using OCT Angiography May Depend on Intra-microaneurysm Turbulence.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ophthalmology Retina	6. 最初と最後の頁 1171-1173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-018-4122-6.	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 Nakao Shintaro, Zandi Souska, Sun Dawei, Hafezi-Moghadam Ali	4. 巻 32
2. 論文標題 Cathepsin B-mediated CD18 shedding regulates leukocyte recruitment from angiogenic vessels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 143 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201601229R	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 該当する

1. 著者名 Kaizu Yoshihiro, Nakao Shintaro, Wada Iori, Yamaguchi Muneo, Fujiwara Kohta, Yoshida Shigeo, Hisatomi Toshio, Ikeda Yasuhiro, Hayami Takehito, Ishibashi Tatsuro, Sonoda Koh-hei	4. 巻 6
2. 論文標題 Imaging of Retinal Vascular Layers: Adaptive Optics Scanning Laser Ophthalmoscopy Versus Optical Coherence Tomography Angiography	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 2~2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.6.5.2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaizu Yoshihiro, Nakao Shintaro, Yoshida Shigeo, Hayami Takehito, Arima Mitsuru, Yamaguchi Muneo, Wada Iori, Hisatomi Toshio, Ikeda Yasuhiro, Ishibashi Tatsuro, Sonoda Koh-Hei	4. 巻 58
2. 論文標題 Optical Coherence Tomography Angiography Reveals Spatial Bias of Macular Capillary Dropout in Diabetic Retinopathy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 4889 ~ 4889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.17-22306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Muneo, Nakao Shintaro, Arima Mitsuru, Wada Iori, Kaizu Yoshihiro, Hao Feng, Yoshida Shigeo, Sonoda Koh-hei	4. 巻 2017
2. 論文標題 Rho-Kinase/ROCK as a Potential Drug Target for Vitreoretinal Diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/8543592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaizu Yoshihiro, Nakao Shintaro, Arima Mitsuru, Hayami Takehito, Wada Iori, Yamaguchi Muneo, Sekiryu Haruka, Ishikawa Keijiro, Ikeda Yasuhiro, Sonoda Koh-Hei	4. 巻 9
2. 論文標題 Flow Density in Optical Coherence Tomography Angiography is Useful for Retinopathy Diagnosis in Diabetic Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45194-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Y, Ishikawa K, Nakao S, Sonoda KH.	4. 巻 74
2. 論文標題 Innate immune response in retinal homeostasis and inflammatory disorders.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Prog Retin Eye Res	6. 最初と最後の頁 100778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.preteyeres.2019.100778.	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 Nakao S, Yoshimitsu M, Kaizu Y, Wada I, Yamaguchi M, Sonoda KH.	4. 巻 16
2. 論文標題 Branch retinal artery occlusion in the untreated contralateral eye following aflibercept injections during heparin treatment: Possible contribution of a heparin-induced thrombocytopenia-like condition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol Case Rep.	6. 最初と最後の頁 100549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2019.100549.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaizu Y, Nakao S, Wada I, Arima M, Yamaguchi M, Ishikawa K, Akiyama M, Kishimoto J, Hisatomi T, Sonoda KH.	4. 巻 4
2. 論文標題 Microaneurysm Imaging Using Multiple En Face OCT Angiography Image Averaging: Morphology and Visualization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmol Retina	6. 最初と最後の頁 175-186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oret.2019.09.010.	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 Arima M, Nakao S, Yamaguchi M, Feng H, Fujii Y, Shibata K, Wada I, Kaizu Y, Ahmadieh H, Ishibashi T, Stitt AW, Sonoda KH.	4. 巻 69
2. 論文標題 Claudin-5 Redistribution Induced by Inflammation Leads to Anti-VEGF-Resistant Diabetic Macular Edema.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 981-999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db19-1121.	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 該当する

1. 著者名 Shimokawa S, Nakao S, Murakami Y, Ikeda Y, Sonoda KH.	4. 巻 18
2. 論文標題 Serous retinal detachment accompanied by pachychoroid in hypotony maculopathy after trabeculectomy for diabetic neovascular glaucoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol Case Rep.	6. 最初と最後の頁 100682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2020.100682.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 山口宗男, 中尾新太郎, 和田伊織, 海津嘉弘, 有馬充, 石川桂二郎, 中間崇仁, 白石渉, 山崎亮, 吉良潤一, 石橋達朗, 園田康平
2. 発表標題 糖尿病網膜症におけるCD206+CX3CR1+ 硝子体界面マクロファージ局所増殖
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakao S, Yoshida S, Kaizu Y, Yamaguchi M, Wada I, Ishibashi T, Sonoda KH
2. 発表標題 Microaneurysm Detection in Diabetic Retinopathy using OCT Angiography May Depend on Intra-microaneurysm Turbulence
3. 学会等名 Retina Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura S, Nakao S, Shiose S, Kohno RI, Hasegawa E, Kano K, Kaizu Y, Seki E, Sonoda KH
2. 発表標題 OCT angiography detects re-dilation of choroidal neovasculatures before exudative recurrence in multifocal choroiditis with panuveitis: a case report
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 Kaizu Y, Nakao S, Arima M, Wada I, Yoshitomi K, Sugino M, Hashiguchi N, Hirashima Kota, Sonoda KH
2. 発表標題 Microaneurysms Imaging in Diabetic Retinopathy using Multiple en face Optical Coherence Tomography Angiography Image Averaging
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

〔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)	
研究分担者	吉田 茂生 (Yoshida Shigeo) (50363370)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	