

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11496

研究課題名(和文) マルチキナーゼ阻害薬の緑内障手術モデル眼における効果

研究課題名(英文) Effect of a multikinase inhibitor on glaucoma surgery model

研究代表者

小島 祥太 (Kojima, Shota)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10388259

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)：この研究の目的はレゴラフェニブの緑内障手術モデル眼における眼圧・濾過胞変化におよぼす影響を調べることである。ビーグル犬を用いて緑内障濾過手術モデル眼を24眼作成し、実験1では術後レゴラフェニブまたは基剤を1日2回4週間点眼し、実験2では術後12週間レゴラフェニブ点眼した群と通常の緑内障手術時に行うマイトマイシンC(MMC)術中使用群とを作成しそれぞれ比較検討した。実験1ではレゴラフェニブ群が優位に眼圧下降と濾過胞が維持され、実験2ではレゴラフェニブ群ではMMC群と眼圧下降および濾過胞形成は同等で濾過胞壁がより厚く血管・コラーゲン密度の高い濾過胞が形成され、MMCの代替と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

緑内障の治療は眼圧下降が最も効果的であり、代表的な眼圧下降手術である線維柱帯切除術は眼圧下降維持のために結膜濾過胞を形成する必要があり、術後結膜癒着抑制を目的として手術時にマイトマイシンC(MMC)などの線維芽細胞増殖抑制薬を用いている。しかし濾過胞感染など重篤な術後副作用が問題となっており、これに代わる薬剤が必要とされている。今回、イヌ緑内障手術モデル眼においてレゴラフェニブ点眼によってMMCと同等の眼圧下降・濾過胞維持効果が示され、より壁が厚く、血管やコラーゲンに富む濾過胞が形成される事が示された。すなわちMMC使用と同等の効果とより安全な結果が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the effects of regorafenib on intraocular pressure (IOP), bleb formation, and conjunctival changes in experimental glaucoma filtration surgery models. Glaucoma filtration surgery models were created in 24 eyes of 24 beagles. In experiment 1 (Ex 1), regorafenib eye drops or vehicle were instilled twice daily for 4 weeks postoperatively. In experiment 2 (Ex 2), regorafenib eye drops were instilled as in Ex 1 for 12 weeks while conventional intraoperative mitomycin-C (MMC) was utilized. In Ex 1, only the regorafenib group showed significant IOP reduction with a significantly higher bleb score. In Ex 2, no significant difference was found in IOP reduction and bleb formation between the regorafenib and MMC groups; bleb walls were significantly thicker and collagen density and vessels were higher in the regorafenib group. Thus, regorafenib might be a better alternative to MMC for creating thicker and less ischemic blebs in glaucoma filtration surgery.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 濾過手術 眼圧 癒着 レゴラフェニブ マルチキナーゼ阻害薬

1. 研究開始当初の背景

緑内障の治療は眼圧下降が最も効果的¹⁾であり、代表的な眼圧下降手術である線維柱帯切除術は濾過胞を形成させるが、時に濾過不全を生じる。この原因としてテノン嚢組織における創傷治療により結膜下での線維化を生じる機序²⁾が考えられている。強力な線維芽細胞増殖抑制薬であるマイトマイシン C(MMC)などの使用により緑内障手術成績は向上しているが、**無血管濾過胞形成、濾過胞からの房水漏出、感染性眼内炎のような随伴する副作用の危険性が問題³⁾となり、より安全な線維芽細胞増殖抑制の方法が求められている。**

これまで我々は、イヌを用いて緑内障濾過手術モデル眼を作成し、肥満細胞に存在し炎症細胞の集積を誘導⁴⁾するキマーゼの阻害薬(CI)⁵⁾や0.04%MMC⁶⁾、transforming growth factor (TGF)-⁷⁾を徐放させて長期間におよぶ眼圧下降作用と癒着抑制作用を見出したり、細胞骨格形成や細胞接着、細胞接着などに重要な働きを持つ GTPase である Rho-associated protein kinase (ROCK)の阻害薬リパスジル術後点眼によっても線維芽細胞増殖抑制作用と眼圧下降維持効果があることを示した⁸⁾。

2. 研究の目的

レゴラフェニブは腫瘍の血管新生にかかわる Vascular endothelial growth factor 受容体 (VEGFR)1~3、Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains (TIE)-2、腫瘍の増殖にかかわる c-KIT、REarranged during Transfection (RET)、RAF-1,B-RAF、間質組織性 platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)、fibroblast growth factor receptor (FGFR)などの受容体に阻害作用をもつとされる**経口マルチキナーゼ阻害薬**である⁹⁾。大腸癌で初めて有効性を示した低分子化合物で分子標的治療薬のひとつで¹⁰⁾、**より強力な線維芽細胞増殖抑制作用**を期待できる。そこで、今回この薬剤を点眼やGH 包含により作用させ、その**眼圧下降維持 効果・細胞増殖抑制作用**を検討することにした。

3. 研究の方法

イヌ緑内障濾過手術モデル眼を既報⁵⁾⁻⁸⁾の様に 24 匹 24 眼に作成した。

(1)実験 1 では、術後 2%レゴラフェニブ点眼薬を一日 2 回 1 滴 50 μ l 点眼した群 (レゴラフェニブ点眼群 n=6) と基剤を同様に点眼した群 (対照群 n=6) を作成し 2 週毎 4 週間後まで眼圧と濾過胞スコアを測定したのちに眼球を摘出し組織学的検討を行なった。

(2)実験 2 では、レゴラフェニブ点眼群 (n=6) においては実験 1 と同様の方法でレゴラフェニブ術後点眼を行なった。MMC 群においては術中に通常の線維柱帯切除術と同様に強膜開窓前に 0.04%MMC 浸透させたスポンジを 5 分間結膜下に留置した。眼圧と濾過胞スコアを 4 週ごと 12 週まで測定し、12 週後には超音波生体顕微鏡 (UBM) にて濾過胞壁の厚みを測定してから眼球を摘出し組織学的検討を行なった。

4. 研究成果

(1)実験 1 レゴラフェニブ点眼群では術 2 週後から有意に眼圧が低下したものの、基剤点眼群では有意な変化がなく (図 1 左)、bleb スコアも両群間で有意に差が出ておりレゴラフェニブ点眼薬によってより濾過胞が維持される結果 (図 1 右) となった。またレゴラフェニブ点眼群の結膜下組織は対照群と比較して薄くなっており、組織断面における結膜/強膜 面積比はレゴラフェニブ点眼群で有意に小さくなっていった (図 2 上)。

また、色抽出システムによるコラーゲン面積を比較したところレゴラフェニブ点眼群の方が対照と比較して有意に結膜下組織のコラーゲン密度が低くなっていった (図 2 下)。

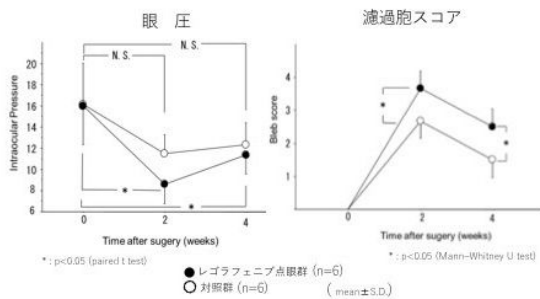


図1 レゴラフェニブ点眼による術後眼圧および濾過胞におよぼす影響

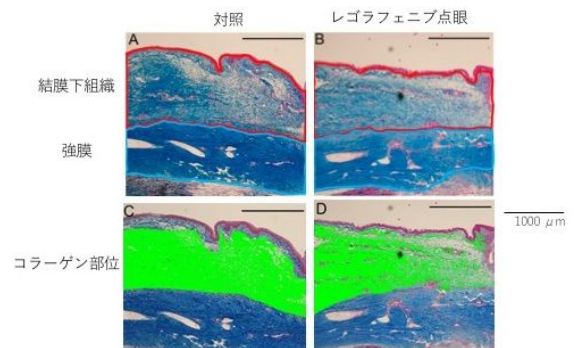


図2 レゴラフェニブ点眼の結膜組織におよぼす影響

免疫組織学的検討において、抗 von Willebrand 因子抗体で染色して検討した結膜下組織の毛細血管密度は対照群と比較しレゴラフェニブ点眼群で有意に低くなっていた。またビメンチン、TGF、DNA 合成期のマーカーである PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)、SMA(smooth muscle actin)陽性細胞数はすべてレゴラフェニブ点眼群が対照より有意に低値となっていた(図3)。

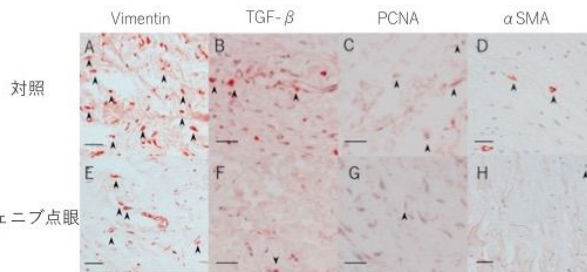


図3 レゴラフェニブ点眼による増殖関連因子への影響(免疫組織学的検討)

(2)実験2 レゴラフェニブ点眼群と、通常のMMC術中使用群を12週間経過観察を行なった結果、眼圧(図4左)および濾過胞スコア(図4右)にどの測定点でも両群間で有意差はでなかった。またUBMにて12週後の濾過胞壁(図5上矢印)を観察したところ、レゴラフェニブ点眼群はMMC群と比較して有意に厚かった(図5中)。また組織学的検討でもコラーゲン密度はレゴラフェニブの方が高くなっていた(図5下)。

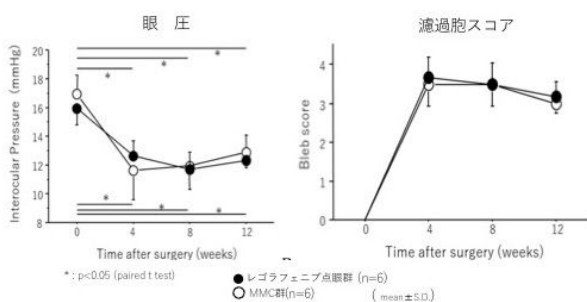


図4 レゴラフェニブ点眼による術後眼圧および濾過胞に及ぼす影響 MMCとの比較

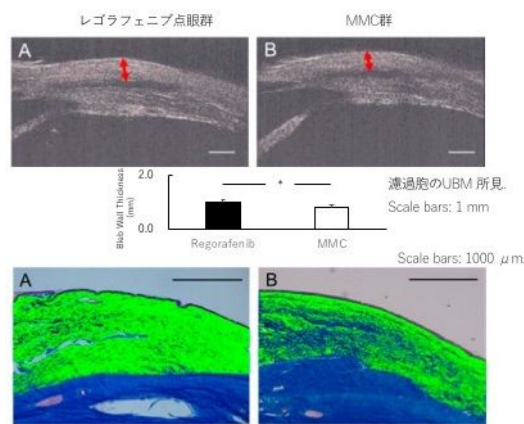


図5 レゴラフェニブ点眼による濾過胞壁および結膜下組織に及ぼす影響 MMCとの比較

組織学的検討をまとめると、結膜下組織の断面積、細胞増殖や形質転換のマーカーとなる因子の発現に有意差はなかったものの、コラーゲン密度や結膜下血管密度はMMC群がレゴラフェニブ点眼群より有意に低くなっており、より堅牢な濾過胞が形成される可能性が示唆された。

これらのことより、**レゴラフェニブを緑内障濾過手術の術後に点眼することによって、現在行われている MMC 術中使用と同等の眼圧下降および濾過胞維持効果が得られ、より堅牢で安全性の高い濾過胞が形成される可能性が示唆された。**

因子	レゴラフェニブ	MMC	p 値
結膜組織 / 強膜組織 面積比	1.5 ± 0.4	n.s. 1.4 ± 0.3	0.45
コラーゲン密度 %	82.5 ± 8.1	> 62.3 ± 17.6	0.01
毛細血管 数/mm ²	11.5 ± 2.0	> 6.5 ± 1.9	0.01
ビメンチン陽性細胞数 数/mm ²	5.5 ± 0.7	n.s. 5.0 ± 0.2	0.63
TGFβ陽性細胞数 数/mm ²	3.8 ± 0.9	n.s. 3.5 ± 1.2	0.63
PCNA陽性細胞数 数/mm ²	6.3 ± 1.3	n.s. 5.3 ± 1.2	0.2
αSMA陽性細胞数 数/mm ²	1.1 ± 0.9	n.s. 1.0 ± 0.8	0.87

n.s.: not significant (Mann-Whitney U test)

表1 レゴラフェニブ点眼による各因子の変化 MMCとの比較

<引用文献>

- 1) Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Am J Ophthalmol 126: 487-497,1988.
- 2) Skuta GL, Parrish, RK. Wound healing in glaucoma filtering surgery. Surv. Ophthalmol. 32: 149-170,1987.
- 3) Greenfield DS, Suner IJ, Miller MP, Kangas TA, Palmberg PF, Flynn Jr HW: Endophthalmitis after filtering surgery with mitomycin. Arch Ophthalmol 114: 943-949, 1996.
- 4) HeS, WallsAF. Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo. Br J Pharmacol 125: 1491-1500, 1998.
- 5) Kojima S, Sugiyama T, Takai S, Jin D, et al. Effects of gelatin hydrogel containing chymase inhibitor on scarring in a canine filtration surgery model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 52: 7672-7680, 2011.
- 6) Kojima S, Sugiyama T, Takai S, Jin D, et al. Effects of Gelatin Hydrogel Loading Mitomycin C on Conjunctival Scarring in a Canine Filtration Surgery Model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56: 2601-2605, 2015.

- 7) Maeda M, Kojima S, Sugiyama T, Takai S, Jin D, et al. Effects of Gelatin Hydrogel Containing Anti-Transforming Growth Factor- β Antibody in a Canine Filtration Surgery Model. *Int J Mol Sci*. 2017 May 5;18(5):985. doi: 10.3390/ijms18050985.
- 8) Kojima S, Sugiyama T, Takai S, Jin D, et al. Effects of Ripasudil, A Rho-associated Protein Kinase Inhibitor, on Conjunctival Scarring in a Canine Filtration surgery model. *Curr Top Pharmacol* 19: 67-73, 2015.
- 9) Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, et al. Thierauch KH, Zopf D. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer* 129: 245-255, 2011.
- 10) Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 381: 303-312, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nemoto Emika, Kojima Shota, Sugiyama Tetsuya, Jin Denan, Takai Shinji, Maeda Michiko, Kohmoto Ryohsuke, Ueki Mari, Oku Hidehiro, Ikeda Tsunehiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of Regorafenib, a Multi-Kinase Inhibitor, on Conjunctival Scarring in a Canine Filtration Surgery Model in Comparison with Mitomycin-C	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 63 ~ 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21010063	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Emika Nemoto, Shota Kojima, Tetsuya Sugiyama, Denan Jin, Shinji Takai, Michiko Maeda, Ryohsuke Kohmoto, Mari Ueki, Hidehiro Oku, Tsunehiko Ikeda
2. 発表標題 Effects of a multi-kinase inhibitor compared with mitomycin-C on conjunctival scarring in a canine filtration surgery model.
3. 学会等名 ARVO 2019 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小嶋祥太、杉山哲也、高井真司、金 徳男、前田美智子、根元栄美佳、植木麻里、河本良輔、奥 英弘、池田恒彦
2. 発表標題 マルチキナーゼ阻害薬点眼のイヌ緑内障濾過手術モデル眼における眼圧および濾過胞形成に対する効果
3. 学会等名 第29回日本緑内障学会
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	杉山 哲也 (Sugiyama Tetsuya) (20298764)	大阪医科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	