

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16977

研究課題名（和文）加齢黄斑変性における自然免疫の関与解明と臨床への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the role of innate immunity and application to the clinical use in age-related macular degeneration

研究代表者

富安 胤太 (Tomiyasu, Taneto)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：70770436

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：加齢黄斑変性に伴う脈絡膜新生血管（choroidal neovascularization: CNV）に対する治療法としてVEGF阻害療法は一定の効果をもたらしているが、無効例、再発例なども多い。VEGF以外の治療ターゲットとして、high-mobility group protein B1: HMGB1に着目した。HMGB1はマウス実験的CNVにおいて、過剰に発現していることが確認された。また抗HMGB1抗体の硝子体内投与によりCNVからの蛍光漏出が抑制され、体積も縮小し、炎症性サイトカイン（VEGF, IL6, MCP-1）の抑制を認めた。それらを介してCNVが抑制されていることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性は失明の危険性のある疾患で、年々増加傾向にある。加齢黄斑変性の滲出型である脈絡膜新生血管（choroidal neovascularization: CNV）に対しては、血管内皮増殖因子阻害療法が一定の効果をもたらしているが、充分とは言えない。今回我々は、新たな治療ターゲットとしてhigh-mobility group protein B1: HMGB1に着目した。HMGB1阻害はマウスで実験的に作成したCNV周囲に過剰に発現しており、その阻害によりCNVが縮小した。また、CNV形成に関与する炎症性サイトカインの過剰な発現を抑制することができ、CNV形成に関与することが示された。

研究成果の概要（英文）：Intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) has been beneficial in improving the visual outcomes in patients with a choroidal neovascularization associated with age-related macular degeneration. However, there are still refractory cases or most patients need multiple injections of anti-VEGF agents. We focused on high-mobility group protein B1 (HMGB1) as a new target in the treatment of CNV. HMGB1 was upregulated around the laser-induced CNV in the RPE-Choroid of the mice. Intravitreal injections of anti-HMGB1 antibody suppressed the laser-induced CNV volume and the leakage from the CNV. In addition, intravitreal injection of anti-HMGB1 antibody suppressed the expression of inflammatory cytokines such as VEGF, interleukin-6, monocyte chemotactic protein-1. Thus, blockade of HMGB1 reduced the expression of such inflammatory cytokines, resulting in suppressing CNV.

研究分野：眼科

キーワード：脈絡膜新生血管

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(choroidal neovascularization: CNV)に対しては、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一定の効果をあげている。しかしながら、無効例、複数回投与とそれに伴う眼合併症、全身への副作用、医療費の高騰などの懸念があり、新規治療法の開発は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

今回、我々は CNV の病態を分子生物学的な手法を用いて解明し、VEGF とは異なる新たなターゲットとを見つけ、新規治療法開発の足がかりとすることを目的とした。High-mobility group protein B1: HMGB1 は、正常組織では細胞核内で DNA と結合することによりクロマチン構造を制御して遺伝子発現を調節するシャペロンタンパク質として機能する一方、壊死組織では細胞外に放出されると自然免疫を活性化して好中球およびマクロファージの壊死組織への集積を誘導し、壊死組織除去を促進させることが知られている。CNV における、HMGB1 の関与解明を目的とした。

3. 研究の方法

1. マウス実験的 CNV における HMGB1 の過剰発現の確認

C57BL6J マウスの眼底にレーザーを施行し、CNV を作成した。レーザー施行 7 日後に眼球摘出し、網膜と網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) -Choroid 複合体を分離した。RPE-Choroid 複合体でフラットマウントを作成後、抗 CD31 抗体で血管内皮を染色し、抗 HMGB1 抗体も使用し免疫染色を行い、CNV 周囲の HMGB1 の過剰発現を確認した。さらには、レーザー施行後、Day 1, 3, 5, 7 に眼球摘出し、網膜と RPE-Choroid 複合体を分離し、それぞれにおける可溶性 HMGB1 の発現を、レーザーを施行していないコントロールと比較した。

2. 抗 HMGB1 抗体によるマウス実験的 CNV の抑制効果の検証

C57BL6J マウスの眼底にレーザーを行い、CNV を作成した。レーザー施行直後に硝子体内に抗 HMGB1 抗体を投与した。反対眼にはアイソタイプの IgG 抗体を同様に投与した。レーザーと硝子体注射 6 日後にフルオレセイン蛍光眼底造影検査(FA)を行い、CNV を染色し、CNV の活動性を比較した。また 7 日後に眼球摘出した後フラットマウントを作成し、レクチンで標識した FITC で CNV を染色し共焦点顕微鏡で撮影し、ImageJ ソフトウェアを用いて CNV の体積を測定し比較した。

3. 抗 HMGB1 抗体投与による炎症性サイトカインの抑制

C57BL6J マウス眼底にレーザーを施行し、CNV を作成後、12h, Day 1, Day 3, Day 7 で眼球摘出し、網膜と RPE-Choroid 複合体を分離し、ELISA kit で MCP-1, IL-6, VEGF のタンパク量を測定した。

4. 研究成果

1. マウス実験的 CNV 周囲に HMGB1 が過剰に発現していることをフラットマウントを用いた免疫染色法で確認した。また、可溶性 HMGB1 が Day 3 の RPE-Choroid 複合体においてコントロールと比較して、過剰に発現していることが確認できた。

2. 抗 HMGB1 抗体を投与したものでは、対照と比較して有意に CNV が抑制されていることが確認できた。また FA でも CNV の活動性が抑制されていた。

3. 12h、Day 1、Day 3、Day 7 で、それぞれのタンパク量が過剰に発現していることが確認できた。次に、同様にマウス眼底にレーザーを行った後に抗 HMGB1 抗体あるいはアイソタイプ IgG を硝子体中に注射し、過剰に発現したサイトカインが抗 HMGB1 抗体を投与したものでは抑制されることが確認できた。

以上より、HMGB1 阻害は、細胞外炎症性サイトカインの発現を抑制し、CNV を縮小することが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Tomiyasu Taneto, Hirano Yoshio, Suzuki Norihiro, Esaki Yuya, Yasuda Yusuke, Uemura Akiyoshi, Yasukawa Tsutomu, Yoshida Munenori, Ogura Yuichiro	4. 巻 61
2. 論文標題 Structural and Functional Analyses of Retinal Ischemia in Eyes with Retinal Vein Occlusion: Relationship with Macular Edema or Microaneurysm Formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ophthalmic Research	6. 最初と最後の頁 218 ~ 225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000493489	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 Esaki Yuya, Hirano Yoshio, Yasuda Yusuke, Tomiyasu Taneto, Suzuki Norihiro, Yasukawa Tsutomu, Ogura Yuichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Multimodal Imaging in a Case of Idiopathic Neuroretinitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 487 ~ 492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000495286	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 Suzuki Norihiro, Hirano Yoshio, Tomiyasu Taneto, Kurobe Ryo, Yasuda Yusuke, Esaki Yuya, Yasukawa Tsutomu, Yoshida Munenori, Ogura Yuichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Collateral vessels on optical coherence tomography angiography in eyes with branch retinal vein occlusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bjophthalmol-2018-313322	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 Yasuda Yusuke, Hirano Yoshio, Esaki Yuya, Tomiyasu Taneto, Suzuki Norihiro, Yasukawa Tsutomu, Yoshida Munenori, Ogura Yuichiro	4. 巻 61
2. 論文標題 Peripheral Microvascular Abnormalities Detected by Wide-Field Fluorescein Angiography in Eyes with Branch Retinal Vein Occlusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ophthalmic Research	6. 最初と最後の頁 107 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000488496	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 富安胤太	4. 巻 35
2. 論文標題 血管新生緑内障に対するバルベルト緑内障インプラントの手術成績	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 140と143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 富安胤太
2. 発表標題 網膜静脈分枝閉塞症と特発性黄斑部毛細血管拡張症1型の毛細血管異常の分布
3. 学会等名 第35回日本眼循環学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富安胤太
2. 発表標題 網膜静脈閉塞症の網膜無灌流領域における黄斑浮腫の発生、毛細血管瘤の形成と網膜感度との関連
3. 学会等名 第42回日本微小循環学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富安胤太
2. 発表標題 網膜静脈閉塞症における網膜無灌流領域内の網膜感度と黄斑浮腫の関係
3. 学会等名 第71回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----