

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09449

研究課題名(和文) 血液網膜バリアに着目したVEGFを標的としない加齢黄斑変性の治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for age related macular degeneration focused on blood retinal barrier independent with VEGF

研究代表者

柳井 亮二 (Yanai, Ryoji)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10346554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血液網膜関門の調節因子であるADAM12(A disintegrin and metalloproteinase 12), ADAM17, basiginと慢性炎症性眼疾患における病態への関与を解析することを目的として研究を進め、ADAM12, ADAM17およびbasiginのノックダウンモデルの作成を確立した。さらに、網膜への細胞浸潤の観点から、オメガ3脂肪酸のチトクロームP450代謝産物により主導的な役割を担う免疫細胞の同定を行った。その結果マウス加齢黄斑変性モデルではCX3CR1+/ Ly-6C+マクロファージが抗炎症作用のメカニズムに関わっていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は血液網膜バリアを標的としてオメガ3脂肪酸を用いた加齢黄斑変性に対する治療法の開発につながる。今後の臨床応用に向けた検討を追加することで、現在主流となっている血管内皮増殖因子(VEGF)療法に替わる新しい治療法となることが期待される。臨床研究を経て、オメガ脂肪酸のCYP代謝産物による治療が可能となれば、加齢黄斑変性患者の視機能維持に貢献できる。現在、加齢黄斑変性や糖尿病黄斑症に行われている抗VEGF療法は医療費を高騰化させる一因となっており、医療費削減の観点からもオメガ3脂肪酸を用いた治療法は社会的に大きな意義を有する。

研究成果の概要(英文)：We investigated role of regulator in blood-retinal barrier: ADAM12(A disintegrin and metalloproteinase 12), ADAM17, basigin in chronic inflammatory ocular disease. We established knock out mouse of ADAM12, ADAM17, basigin to examined those functions in the regulation of blood-retinal barrier. Furthermore, we detect the immune cells, which play a important role in the anti-inflamaroty function by the cytochrome P450 (CYP)8211;epoxygenase derived from -3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs). We also show that CX3CR1+/ Ly-6C+ macrophages suppress the inflammation in the mouse model of age-related macular disease.

研究分野：眼炎症

キーワード：加齢黄斑変性 慢性眼炎症 血液網膜バリア オメガ3脂肪酸 ADAM

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 (AMD) は、網脈絡膜に新生血管を生じる黄斑疾患で、中心視野を失うため社会的失明の主要原因として大きな社会問題となっている。現在の抗 VEGF 療法は末期の AMD に生じた脈絡膜血管新生に対して行われるが、再発例が多く無反応例もある。このため、VEGF に依存しない新たな治療法の開発が社会的に要求されており、現在でも急務となっている。

私たちは、(1) オメガ 3 脂肪酸とそのチトクローム P450 代謝産物 (CYP) が脈絡膜血管新生、接着分子、眼内炎症を抑制 (2) これらの共通のメカニズムに免疫細胞の網脈絡膜浸潤が必須 (3) 血液網膜バリアの破綻に ADAM12、ADAM17、basigin が関与 (4) 血液網膜バリアの破綻に ADAM12、ADAM17、basigin が関与することを明らかにしてきた。一連の研究成果から AMD の病態に血液網膜バリアの破綻が関与していると推察して本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は VEGF に依存しない加齢黄斑変性の治療法を開発することである。加齢黄斑変性 (AMD) は、脈絡膜血管由来の新生血管が網膜内に侵入することが特徴である。血管新生の発生には網膜内への免疫細胞浸潤が先行する。この点を血液網膜バリアの観点から解明した研究はなく、AMD の病態を新たな視点で捉えて治療開発に結びつけようとした。本研究期間では、血液網膜バリアを制御している ADAM12、ADAM17、basigin のノックアウトマウスを用いて、脈絡膜新生血管に対する機能を調べ、オメガ 3 脂肪酸による治療効果を判定した。

3. 研究の方法

(1) 疾患モデルにおける血液網膜バリアの調節因子の同定

①動物モデル作成方法：動物は C57/BL6 マウスを用いた。

CNV: 散瞳後に 532nm のレーザーを網膜に照射して CNV 誘導した。

EAU: 足底部・鼠径部に網膜抗原 (IRBP) を免疫して作成した。

②血液網膜バリアの調節因子の同定

網膜バリア調節因子である ADAM12 siRNA (ID: s61951, S61952 Thermo Fisher Scientific.)、ADAM17 siRNA (ID: s61958, s61959), basigin siRNA (ID: s63099, s63100) を 32-gauge needle+Hamilton syringe を用いて硝子体注射を行ってこれらの因子をノックダウンした。

EAU モデルにおける網膜炎、網膜血管新生の程度、網膜内への細胞浸潤の程度は慢性炎症期 (28 日目) に摘出した眼球をパラフィン包埋し、アセトン固定後に HE 染色を行って単位面積あたりの細胞浸潤数を算出して評価した。

CNV モデルでは、摘出眼球を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、F4/80 抗体 (Anti-F4/80, ab6640 abcam) およびレクチン (Isolectin GS-IB4 From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor® 488 Conjugate, I21411 Thermo Fisher Scientific) で免疫染色を行い CNV 領域に浸潤細胞数を比較した。

(2) CYP 代謝産物による血液網膜バリアの制御機構の解析

・オメガ 3 脂肪酸および対照試料、オメガ 3 脂肪酸由来の CYP 代

謝産物 (17,18-epoxyeicosatetraenoic acid [EEQ], 19,20-epoxydocosapentaenoic acid [EDP])、対照群としてオメガ 6 脂肪酸由来の CYP 代謝産物 (14,15-epoxyeicosatrienoic acid [EET])

(Cayman Chemical Co.) を投与し、血液網膜バリアの調節因子に対する影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 疾患モデルにおける血液網膜バリアの調節因子の同定

網膜バリア調節因子である ADAM12 siRNA (ID: s61951, S61952 Thermo Fisher Scientific.)、ADAM17 siRNA (ID: s61958, s61959), basigin siRNA (ID: s63099, s63100) を 32-gauge needle+Hamilton syringe を用いて硝子体注射を行ってこれらの因子をノックダウンし、網膜内での発現の変化を RNA およびタンパク質レベルで確認した。硝子体注射の時期と核タンパク質の発現量の時間的、容量的な変化を観察し、マウス加齢黄斑変性モデル (CNV) および自己免疫性実験的ぶどう膜炎 (EAU) モデルに最適な実験条件の確立を行った。

(2) CYP 代謝産物による血液網膜バリアの制御機構の解析

次に硝子体注射の時期と核タンパク質の発現量の時間的、容量的な変化を観察し、マウス加齢黄斑変性モデル (CNV) および自己免疫性実験的ぶどう膜炎 (EAU) モデルに最適な実験条件の確立を行った。さらに、オメガ 3 脂肪酸および対照試料、オメガ 3 脂肪酸由来の CYP 代謝産物 (17,18-epoxyeicosatetraenoic acid [EEQ], 19,20-epoxydocosapentaenoic acid [EDP])、対照群としてオメガ 6 脂肪酸由来の CYP 代謝産物 (14,15-epoxyeicosatrienoic acid [EET]) (Cayman Chemical Co.) を投与し、血液網膜バリアの調節因子に対する影響を評価した。血液網膜バリアの調節因子として炎症/酸化ストレス関連因子をタンパク質レベルおよび遺伝子レベルで検討

した。その結果、オメガ3脂肪酸によりサイトカイン(IL-1)、ケモカイン(MCP-1, G-CSF)、酸化ストレス(Nox4)が抑制されていた。これらの知見は、血液脳バリアにも応用可能で、全身の自己免疫疾患領域や炎症性疾患領域に貢献できるため本研究成果の意義は大きい。実際、血液網膜バリアと同様な機構を有する脳血管系では共通したメカニズムが作動している可能性が高く、脳血管障害やアルツハイマー病などへの治療応用にも貢献できることが期待されている。

(3)中枢神経系の血管には血液脳バリアが存在し、免疫細胞や高分子の侵入を制限しているが、近年、免疫細胞の特異的な侵入口(免疫細胞ゲート)が証明された。その形成機構であるゲートウェイ反射では、血管内皮細胞のケモカイン大量発現が分子基盤となっている。この炎症回路の誘導は重力、神経や電気からの刺激がトリガーとなる。本研究をすすめる中で、血液網膜バリアの制御機構に、ゲートウェイ反射が関わっていることを示唆する以下の知見を得た。三叉神経切除による眼内サブスタンス P 欠如モデルでは眼内の免疫細胞が増加しゲートウェイ反射が抑制されていることが示唆された。さらに、ぶどう膜炎モデルの臨床スコアが抑制されること、つまり血液脳バリアが破綻していることを確認した。今後、ゲートウェイ反射の観点から眼局所におけるゲートウェイ反射機構を解明し、血液網膜バリアの破綻のメカニズムの理解につながる研究を行う予定である。

<引用文献>

1. Kim J, Kim JH, **Yanai R (5 番目)**, et al. (合計 8 人); Key Role of Microglial Matrix Metalloproteinases in Choroidal Neovascularization. *Front Cell Neurosci.* 15:638098. doi: 10.3389/fncel.2021 (2021).
2. Do JY, Kim J, **Yanai R (6 番目)**, et al. (合計 9 人); Fursultiamine Alleviates Choroidal Neovascularization by Suppressing Inflammation and Metabolic Reprogramming. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 61(12):24. doi: 10.1167/iovs.61.12.24 (2020).
3. Yin S, Liu X, **Yanai R (6 番目)**, et al. (合計 8 人); A needle-type biofuel cell using enzyme/mediator/carbon nanotube composite fibers for wearable electronics. *Biosensors & bioelectronics.* 165:112287-112287 (2020).
4. Takase H, Goto H, **Yanai R (15 番目)**, et al. (合計 16 人); Clinical Characteristics, Management, and Factors Associated with Poor Visual Prognosis of Acute Retinal Necrosis. *Ocul Immunol Inflamm.* 1 - 6 (2020).
5. Takeda A, **Yanai R (2 番目)**, Murakami Y, et al. (合計 5 人); New Insights Into Immunological Therapy for Retinal Disorders. *Frontiers in immunology.* 11 1431-1431 (2020).
6. Uchi SH, **Yanai R (2 番目)**, Kobayashi M, et al. (合計 11 人); Dendritic cells mediate the anti-inflammatory action of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in experimental autoimmune uveitis. *PLOS One.* 14, e0219405 (2019).
7. Uchi SH, **Yanai R (2 番目)**, Tsuneoka H, et al. (合計 6 人); A case of cat scratch disease diagnosed by indirect fluorescent antibody assay of IgM specific for a Japanese strain of Bartonella henselae. *Retin Cases Brief Rep.* 00 1-4 (2019).
8. Takeda A, Yamada H, **Yanai R (10 番目)**, et al. (合計 13 人); Crucial role of P2X7 receptor for effector T cell activation in experimental autoimmune uveitis. *Jpn J Ophthalmol.* 62 398-406 (2018).
9. **Yanai R (1 番目)**, Chen S, Uchi SH, et al. (合計 6 人); Attenuation of choroidal neovascularization by dietary intake of ω -3 long-chain polyunsaturated fatty acids and lutein in mice. *PLOS One* 13 e0196037 (2018).

10. Nomi N, Ota M, **Yanai R (7 番目)**, et al. (合計 8 人); Indocyanine green angiography findings of cystoid macular edema secondary to paclitaxel therapy. *Jpn J Ophthalmol* **62** 163-167 (2018).
11. Sato K, Takeda A, **Yanai R (8 番目)**, et al. (合計 15 人); Interleukin-6 plays a crucial role in the development of subretinal fibrosis in a mouse model. *Immunol Med* **41** 23-29 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 柳井 亮二 | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 眼炎症疾患の基礎と臨床 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 眼薬理 | 6. 最初と最後の頁 38～41 |
| 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 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Uchi SH, Yanai R, Kobayashi M, Hatano M, Kobayashi Y, Yamashiro C, Nagai T, Tokuda K, Connor KM, Sonoda KH, Kimura K | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Dendritic cells mediate the anti-inflammatory action of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in experimental autoimmune uveitis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 e0219405 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0219405 | 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14件（うち招待講演 3件／うち国際学会 2件）

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 柳井 亮二 |
| 2. 発表標題 続発緑内障に対するリバスジル点眼薬による眼圧下降効果 |
| 3. 学会等名 山口県眼科連携講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐久間 彩乃, 湧田 真紀子, 富永 和花, 波多野 誠, 柳井 亮二, 徳田 和央, 木村 和博 |
| 2. 発表標題 経口避妊薬内服後にacute macular neuroretinopathyを発症した若年女性の1例 |
| 3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 長谷川 実茄, 柳井 亮二, 内 翔平, 木村 和博 |
| 2. 発表標題 Purtscher様網膜症の網膜毛細血管閉塞をOCT angiographyにて評価した1例 |
| 3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yanai R, Uchi SH, Tominaga W, Ogata T, Kimura K |
| 2. 発表標題 Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-infectious uveitis: a retrospective observational study of 14 patients |
| 3. 学会等名 GOIW 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柳井 亮二, 砂田 潤希, 緒方 惟彦, 波多野 誠, 田中 俊朗, 木村 和博 |
| 2. 発表標題 原発性および再発性の翼状片に対するHead Inversion Technique |
| 3. 学会等名 第68回山口眼科手術懇話会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 柳井 亮二 |
| 2. 発表標題 知って得する！眼科医に必要な瞼の皮膚診療の最前線 |
| 3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 湧田 真紀子, 佐久間 綾乃, 能美 なな実, 緒方 惟彦, 太田 真実, 富永 和花, 東島 史明, 山城 知恵美, 波多野 誠, 柳井 亮二, 徳田 和央, 木村 和博 |
| 2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性の再発と脈絡膜血管透過性亢進の関連性 |
| 3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 東島 史明, 西本 彩奈, 緒方 惟彦, 波多野 誠, 柳井 亮二, 木村 和博, 吉村 佳子, 榎 美穂 |
| 2. 発表標題 ランゲルハンス細胞組織球症による虹彩毛体炎, 脈絡膜炎で視力不良を呈した1例 |
| 3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yanai R, Kimura K |
| 2. 発表標題 Optical coherence tomography angiography findings in Purtscher like Retinopathy in SLE |
| 3. 学会等名 The 52th Annual Retina Society Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 内 翔平, 平野 晋司, 柳井 亮二, 園田 康平, 木村 和博 |
| 2. 発表標題 HLA-A26, DR4陽性で鑑別に苦慮した小児ぶどう膜炎の1例 |
| 3. 学会等名 第53回日本眼炎症学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柳井 亮二, 内 翔平, 杉山 克哉, 木村 和博 |
| 2. 発表標題 フォークト-小柳-原田病の再燃に対する全身ステロイド治療の有効性および安全性評価 |
| 3. 学会等名 第53回日本眼炎症学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 波多野 誠, 緒方 惟彦, 柳井 亮二, 高橋 真紀子, 高島 隆, 木村 和博 |
| 2. 発表標題 ERMの有無で見た, naive DMEに対するVitrectomyの有効性 |
| 3. 学会等名 第67回山口眼科手術懇話会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 柳井 亮二 |
| 2. 発表標題 ぶどう膜炎続発緑内障に対するリバスジル点眼薬による眼圧下降効果 |
| 3. 学会等名 第17回倉敷実践セミナー(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 柳井 亮二, 内 翔平, 緒方 惟彦, 木村 和博 |
| 2. 発表標題 ぶどう膜炎の疫学と診断基準について |
| 3. 学会等名 第133回山口県眼科医会春季総会並びに集談会 |
| 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 | 徳田 和央 (Tokuda Kazuhiro) (50266863) | 山口大学・医学部附属病院・助教 (15501) | |
| 研究分担者 | 寺西 慎一郎 (Teranishi Shinichiro) (90649360) | 山口大学・医学部附属病院・助教 (15501) | |
| 研究分担者 | 木村 和博 (Kimura Kazuhiro) (60335255) | 山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501) | |
| 研究分担者 | 池田 栄二 (Ikeda Eiji) (30232177) | 山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501) | |
| 研究分担者 | 原田 陽介 (Harada Yosuke) (10464314) | 広島大学・病院(医)・講師 (15401) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|