

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18899

研究課題名（和文）マトリセルラー蛋白を標的とした抗VEGF療法誘導性眼内線維増殖の治療戦略構築

研究課題名（英文）The role of matricellular proteins in intraocular fibrovascular proliferation induced by anti-VEGF therapy

研究代表者

中間 崇仁（Nakama, Takahito）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30827556

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）：抗VEGF療法前後での眼内環境の変化を、前房水と硝子体を用いてマトリセルラー蛋白を中心に解析した。糖尿病網膜症症例では、抗VEGF療法前から前房水内のペリオスチン濃度はコントロール群と比較して有意に高値であった。また、抗VEGF療法に抵抗性で抗VEGF療法後に線維化が進行した症例の多くは、抗VEGF療法後の前房水内ペリオスチン濃度が上昇傾向である一方、前房水内VEGF濃度は上昇傾向には無かった。また、*in vitro*、*in vivo*実験ともにペリオスチンの線維血管増殖促進力はテネイシンCよりも強かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗VEGF療法誘導性の眼内線維増殖の発症進展にペリオスチンを主としたマトリセルラー蛋白が関与していると考えられた。今回得られた成果から、ペリオスチンを標的とした治療が、抗VEGF療法誘導性の眼内線維増殖に対する新規治療となり得ると考えられた。マトリセルラー蛋白は、正常網膜での発現レベルは低く、線維血管増殖組織に特徴的に発現していると考えられるため、マトリセルラー蛋白を標的とした新規治療を創製できれば、正常網膜にほとんど障害を与えることなく、線維血管増殖組織のみを抑制する病態特異的な治療法となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To determine whether matricellular proteins are involved in intraocular fibrovascular proliferation, the protein concentration of matricellular proteins in aqueous humor and vitreous was investigated before and after anti-VEGF therapy. We found that the level of periostin protein in the diabetic retinopathy group was significantly higher than that in the control group. Although the level of periostin protein increased after anti-VEGF therapy in case with increased fibrovascular proliferation, the level of VEGF protein was not increased. The effect of periostin on fibrovascular proliferation was stronger than that of tenascin C.

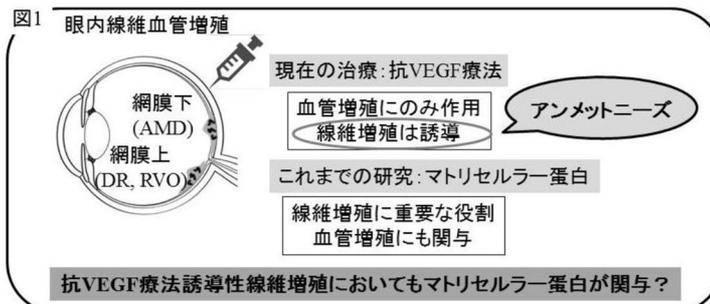
研究分野：線維血管増殖

キーワード：マトリセルラー蛋白 線維血管増殖 抗VEGF療法 ペリオスチン テネイシンC

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症(DR)、加齢黄斑変性(AMD)、網膜静脈閉塞症(RVO)に共通して認められる眼内線維血管増殖は、重篤な視覚障害の原因となる主要病態の一つであり、過剰な創傷治癒の結果として病的な血管増殖と異常な線維増殖を伴って形成される。現在臨床応用されている抗 VEGF 療法により、眼内血管増殖の治療は新時代を迎えたが、眼内線維増殖は未だに確立された治療法は無く、抗 VEGF 療法により眼内線維増殖が誘導されることも分かってきた。そのため眼内線維増殖は、臨床現場でのアンメットニーズとなっている(図 1)。

申請者は、これまで眼内線維血管増殖組織の包括的遺伝子解析を基盤とした病態解明と治療法開発を行ってきており、眼内線維血管増殖組織において血管増殖・線維増殖双方にマトリセルラー蛋白が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。



2. 研究の目的

本研究の目的は、抗 VEGF 療法前後での眼内環境の変化をマトリセルラー蛋白を中心に解析することにより、臨床現場のアンメットニーズである抗 VEGF 療法誘導性の眼内線維増殖においてもマトリセルラー蛋白が重要な役割を果たしているかを検討し、抗 VEGF 療法との併用で相加効果が期待出来る治療戦略の構築を試みることである。

3. 研究の方法

3-(1). 抗 VEGF 療法誘導性眼内線維増殖に関与するマトリセルラー蛋白の同定

DR, AMD, RVO の患者各 50 例に対し抗 VEGF 療法時に眼圧下降目的で前房水 50 μ l を採取する。Multiplex beads array と ELISA 法を用いて、ペリオスチンやテネイシン C などのマトリセルラー蛋白、VEGF を含む炎症性サイトカインの濃度を定量し、抗 VEGF 療法前後でこれらの因子が変化するか否かについて検討する。変化した因子や抗 VEGF 療法後も発現が高いままの因子と、眼内線維増殖の状態との相関を統計学的に解析する。対照コントロールとしては、網膜疾患の合併が無い白内障患者に対する白内障手術の際に採取した前房水を使用する。

3-(2). in vivo マウスモデル, in vitro 細胞培養系における抗 VEGF 療法誘導性因子の同定

in vivo では AMD モデルであるマウスレーザー誘導網膜下線維血管増殖組織モデルと、DR, RVO モデルであるマウス酸素負荷網膜上線維血管増殖組織モデルを用いる。それぞれのモデルに対して抗 VEGF 抗体を硝子体内投与し、抗 VEGF 療法前後での線維血管増殖組織を含む組織(AMD モデルでは網膜色素上皮-脈絡膜複合体、DR, RVO モデルでは網膜)におけるマトリセルラー蛋白、VEGF を含む炎症性サイトカインの発現を real-time PCR、ELISA 法を用いて定量し、抗 VEGF 療法前後でこれらの因子が変化するか否かについて検討する。また治療対照群としてコントロール IgG を硝子体内投与した群を用いて、抗 VEGF 療法の有無による各因子の変化も解析する。in vitro では線維血管増殖組織の重要な構成細胞であるヒト網膜色素上皮細胞、ヒト網膜血管内皮細胞の培養細胞を用いて、in vivo と同様に抗 VEGF 抗体を添加し、各因子の変化を解析する。抗 VEGF 療法前後で変化した因子、抗 VEGF 療法後も発現が高いままの因子、治療対照群と比較して発現に差がある因子、それぞれと表現型との相関を統計学的に解析する。

3-(3). 抽出された因子の抗 VEGF 療法誘導性眼内線維増殖における機能解析

(3)-(1), (3)-(2)で共通して抽出された抗 VEGF 療法誘導性の眼内線維増殖と関与が考えられる因子の役割を in vitro, in vivo で検討する。in vitro では、抽出された因子の培養ヒト網膜色素上皮細胞/ヒト網膜血管内皮細胞に対する増殖・遊走・管腔形成や細胞外マトリックス・サイトカイン産生に対する作用を、in vivo では、マウスレーザー誘導網膜下線維血管増殖組織モデルとマウス酸素負荷網膜上線維血管増殖組織モデルを用いて、抽出因子のリコンビナント蛋白や抗体の硝子体内投与を抗 VEGF 療法と同時にを行い、治療対照群と比較することで表現型の比較を行う。

4. 研究成果

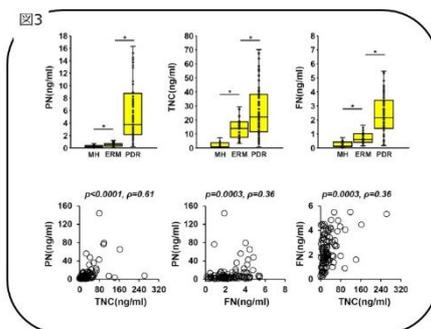
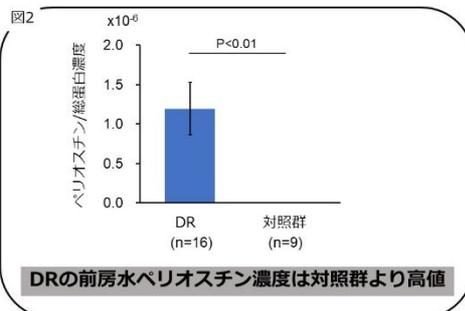
抗 VEGF 療法前後での眼内環境の変化を、マトリセルラー蛋白を中心に解析するために、抗 VEGF 療法時に眼圧下降目的で採取した前房水 50 μ l と抗 VEGF 療法後の硝子体手術時に採取した硝子体をサンプルとして集めた。Multiplex beads array と ELISA 法を用いて、その前房水中のペリオスチンやテネイシン C などのマトリセルラー蛋白や VEGF を含む炎症性サイトカインの蛋白濃度を定量した。

DR 症例では、抗 VEGF 療法前から前房水内のペリオスチン濃度はコントロール群に比較して有意に高値であることを見いだした(図 2)。また、抗 VEGF 療法に抵抗性で抗 VEGF 療法後に線維化が進行した症例の多くは、抗 VEGF 療法後の前房水内ペリオスチン濃度が上昇傾向にあることを見いだした。同症例における前房水内 VEGF 濃度は上昇傾向には無いため、VEGF とペリオスチンの相関は低く、ペリオスチンが抗 VEGF 療法誘導性眼内線維増殖に関与するマトリセルラー蛋白の一つと考えられた。

また DR 症例の硝子体中のペリオスチン、テネイシン C、フィブロネクチン濃度はコントロール群に比較して有意に高値であり、それらは全て相関していた(図 3)。この結果から、抗 VEGF 療法誘導性の眼内線維増殖の発症進展に、ペリオスチンだけでなく複数のマトリセルラー蛋白が関与していると考えられた。

さらに *in vivo* ではマウス酸素負荷網膜上線維血管増殖組織モデル、*in vitro* ではヒト網膜血管内皮細胞を用いて、ペリオスチンとテネイシン C がともに線維血管増殖を促進し、その促進効果はペリオスチンが大きいことを見いだした。

これらの結果とこれまでの我々の研究結果から、抗 VEGF 療法誘導性の眼内線維増殖の発症進展にペリオスチンを主としたマトリセルラー蛋白が関与していると考えられた。今回得られた成果から、ペリオスチンを標的とした治療が、抗 VEGF 療法誘導性の眼内線維増殖に対する新規治療となり得ると考えられた。マトリセルラー蛋白は、正常網膜での発現レベルは低く、線維血管増殖組織に特徴的に発現していると考えられるため、マトリセルラー蛋白を標的とした新規治療を創製できれば、正常網膜にほとんど障害を与えることなく、線維血管増殖組織のみを抑制する病態特異的な治療法となることが期待される。



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 Kubo Yuki, Ishikawa Keijiro, Mori Kenichiro, Kobayashi Yoshiyuki, Nakama Takahito, Arima Mitsuru, Nakao Shintaro, Hisatomi Toshio, Haruta Masatoshi, Sonoda Koh-Hei, Yoshida Shigeo	4. 巻 10
2. 論文標題 Periostin and tenascin-C interaction promotes angiogenesis in ischemic proliferative retinopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66278-1	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林義行, 石川桂二郎, 森賢一郎, 久保夕樹, 中間崇仁, 久富智朗, 吉田茂生, 園田康平
2. 発表標題 糖尿病黄斑浮腫の前房水中ペリオスチン濃度と抗VEGF治療効果
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年～2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------