

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 05 月 09 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592230

研究課題名（和文）眼内血管新生疾患における血管成熟の制御と造血系幹細胞との関連

研究課題名（英文）Vascular maturation and its association with hematopoietic stem cells in intraocular neovascularization

研究代表者

大島 佑介 (OSHIMA YUSUKE)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20362717

研究成果の概要（和文）：増殖糖尿病網膜症や血管新生緑内障など眼内血管新生にかかわる疾患において、これまで報告されてきた血管内皮増殖因子のみならず、血管の分化と成熟化にかかわる因子(stromal cell-derived factor 1α ：以下 SDF- 1α)やこれに誘導され・分化する造血系幹細胞 (hematopoietic stem cell：HSC) や血管内皮に分化する前駆細胞 (endothelial progenitor cell:以下 EPC) が血管新生と成熟に深く関わっており、腱組織に存在する血管新生抑制因子であるテノモデュリンがこれらの因子を抑制することで眼内の血管新生抑制に関わる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In addition to the previously reported vascular endothelial growth factor, Stromal cell-derived factor 1α (SDF- 1α) and its inducing endothelial progenitor cells can play important roles in neovascularization and vascular maturation in a variety of intraocular neovascular diseases such as proliferative diabetic retinopathy and neovascular glaucoma. The tendon-derived anti-angiogenic factor, tenomodulin, can suppress the intraocular neovascular activities via the interaction with these factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：血管内皮増殖因子、造血系幹細胞、テノモデュリン、眼内血管新生、増殖糖尿病網膜症、血管新生緑内障、未熟児網膜症

1. 研究開始当初の背景

眼内血管新生は増殖糖尿病網膜症 (PDR)、血管新生緑内障 (NVG)、加齢黄斑変性 (AMD) 等の重篤な眼科疾患の主要病態になっている。最近の低侵襲手術の確立や様々な薬物治療の開発にもかかわらず、これら疾患の治療成績は決して芳しくなく、とりわけ黄斑部網膜が

障害されると不可逆な中心視力障害をもたらし、先進諸国で大きな社会問題となっている「社会的失明」に陥る。発展途上国においては、眼科疾患に対する理解と治療法の普及が未だ十分でないため、眼内新生血管の進行を阻止できずに完全失明に至る場合も少なくない。本邦では、生活様式の欧米化によって糖

尿病の罹病人口は国内では増加の一途にあり、これに伴って PDR も年々増加傾向にある。とりわけ壮年者における急速進行例は手術治療を行っても、NVG によって失明に至る危険性が極めて高いことが知られており、罹病患者の若年化が新たな問題となっている。また、脈絡膜新生血管にかかわる疾患群において、アジアでは本邦を含め、狭義 AMD のみならず、近視性脈絡膜新生血管やポリープ状脈絡膜血管症に起因する脈絡膜新生血管が欧米に比べて極めて多く、アジア地域におけるこれらの発病のメカニズムの解明と治療法の開発にはわが国主導の研究開発が重要と思われる。これまで眼内血管新生の中心的な標的分子として血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: 以下 VEGF) が知られており、現在の眼内血管新生疾患に対する薬物療法のいずれも VEGF や VEGF 受容体を標的とする抗 VEGF 薬剤がその中心的役割を担っている。しかし、最近の臨床研究結果から、これらの薬剤の局所投与による効果はいずれも一過性であり、反復投与による副作用惹起の懸念が示唆され、新たなメカニズムに基づく治療法の確立が必要とされている。これには、VEGF と血管内皮細胞のみならず、血管の分化と成熟化にかかわる因子 (stromal cell-derived factor 1 α : 以下 SDF-1 α) やこれに誘導され・分化する造血系幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) や血管内皮に分化する前駆細胞 (endothelial progenitor cell: 以下 EPC) との関わりを理解することが必要不可欠と考えており、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、効果的な根治療法が完全に確立されていない眼内血管新生疾患における新生血管の進展・成熟化の分子メカニズムの解明とこれに基づく新規薬物療法の確立にある。具体的には本研究では眼内血管新生を病態の主因とする重症 PDR に対する抗 VEGF 抗体 (bevacizumab) 投与量別の眼内 VEGF 濃度変化ならびに VEGF と相互的に作用する SDF1 α の濃度変動、これに誘導される EPC ならびに HSC の局在と活性化の有無を明らかにする。さらに虚血 (未熟児網膜症) マウスモデルを用いて rsTeM による血管新生抑制のメカニズムを解明し、眼科領域での血管新生抑制における新規創薬の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 重症 PDR における眼内 SDF1 α 濃度、誘導される EPC ならびに HSC の線維血管増殖組織における局在、SDF1 α による血管内皮細胞への生理活性を検討する。

具体的にはすでに大阪大学医学部付属病院の先進医療として申請し許可を得られた「牽引性網膜剥離を合併する増殖糖尿病網膜症患者に対する抗 VEGF 抗体併用硝子体手術の治療 (承認番号 06100)」および「血管新生緑内障患者に対する抗 VEGF 抗体の硝子体内投与

(承認番号 08023)」の加療開始前に、対象患者にインフォームド・コンセントを行い、本臨床治療研究への参加を承諾された患者のみをエントリーする。増殖糖尿病網膜症患者では、抗 VEGF 抗体 (bevacizumab) 投与群 (n=10; 1.0mg, n=10; 0.1mg) と非投与群 (n=10) に無作為的に分け、投与群は投与前の前房水採取、白内障・硝子体同時手術の手術開始時に前房水および硝子体サンプル採取、さらには線維性血管増殖膜を摘出する。非投与群では同様に手術時に前房水、硝子体サンプル、および線維性血管増殖膜の摘出を行う。血管新生緑内障患者 (n=10; 1.0mg, n=10; 0.1mg) では、抗 VEGF 抗体 (bevacizumab) 投与前ならびに 1 週間後の再投与時の前房水採取を行い、閉塞隅角期にある症例では、初回投与後 1 週間以内に硝子体手術を行う際には手術開始時に硝子体サンプル採取を行う。前房水サンプルならびに硝子体サンプルを対象タンパク

(VEGF と SDF1 α) の定量的測定に用い、さらに硝子体サンプルはタンパク定量のうえ、血管内皮細胞の増殖ならびに接着・遊走に関するアッセイに用いる。抗 VEGF 抗体

(bevacizumab) 投与群と非投与群から摘出した線維性血管増殖膜は EPC と HSC の局在、DNA 合成の活性化の有無、VEGF ならびに SDF1 α 産生細胞の同定、さらには受容体である VEGF-R2 ならびに CXCR4 の局在の免疫組織化学的検討を行った。

(2) 虚血モデルマウスにおける EPC と HSC の局在、rsTeM の硝子体内投与による VEGF、SDF1 α 、Insulin-like growth factor binding protein-3 (以下 IGFBP3) の産生変化ならびに EPC ならびに HSC の局在変化に関する検討する。具体的には血管新生 (未熟児網膜症) マウスモデルの作成し、眼内血管新生因子の濃度ならびに EPC と HSC の局在と分布頻度の検討を網膜凍結切片で免疫組織学的に行い、さらに、rsTeM の硝子体内投与にした場合の血管新生抑制ならびに無灌流領域面積の減少の確認、VEGF、SDF1 α 、IGFBP3 の産生変化 (ウェスタンブロット法と ELISA 法) を検討した。EPC と HSC の局在変化の検討には、フラットマウントにて CD34 陽性、Flk 陽性、c-Kit 陽性細胞の局在と分布数の違いを評価し、網膜凍結切片でも rsTeM 投与眼と非投与眼におけるその局在の違いを検討した。また、SDF1 α 受容体である CXCR4 の発現の違いを rsTeM 投与眼と非投与眼において網膜凍結切片にて免疫組織学的に検討を行なった。

4. 研究成果

虹彩血管新生を伴う重症増殖糖尿病網膜症 (PDR) 患者に対する抗 VEGF 抗体投与前・後に採取した前房水における VEGF および SDF1 α の濃度測定を行った結果、投与後の VEGF 濃度は有意に (P<0.001) 減少したのに対し、SDF1 α は虹彩新生血管を含めた病期進行の重症度に比例して、前房水内の SDF1 α 濃度が増加し、抗 VEGF 抗体の投与前後で SDF1 α 濃度に有意な変化はなかった。全患者の手術

時に採取した硝子体サンプルにおける SDF1 α 濃度平均は 1940.6pg/mL であり、このうち、抗 VEGF 抗体投与後に VEGF 濃度が検出感度 (15.6pg/ml) 未満の硝子体サンプル (200ul) を用いて、ヒト網膜血管内皮細胞 (HRE) の遊走、管腔形成、増殖アッセイを行いましたところ、SDF1 α 濃度に比例して血管新生促進する生理作用がみられた。また SDF1 α の中和抗体の同時投与によって、すべての血管新生の生理活性が抑制されることが確認されたことから、虹彩血管新生を伴う PDR 患者において、VEGF とは独立した SDF1 α による血管新生促進作用が存在することが示され、VEGF 抑制下での新生血管の増殖や抗 VEGF 抗体投与後の血管新生の再発に SDF1 α が関与していることが示唆された。対象患者における新生血管増殖膜組織が採取できた症例において、術前の抗 VEGF 抗体の投与有無によって術中に採取した血管線維増殖膜における VEGF ならびに SDF1 α 受容体である VEGF-R1, R2, CXCR4 の発現を免疫組織染色法にて観察した。抗 VEGF 抗体 6 眼ならびに非投与例 6 眼とも受容体 VEGF-R1, R2, CXCR4 の発現が観察され、抗 VEGF 抗体の投与有無による受容体発現の抑制効果は無いことが確認された。また、CD34 陽性、VEGF-R2 陽性、c-Kit 陽性細胞も全 12 眼で観察され、造血系幹細胞 (HSC) や前駆細胞 (EPC) は抗 VEGF 抗体の投与有無に関係なく存在することが示唆された。また術中に採取した硝子体サンプルでの VEGF 濃度と SDF1 α 濃度の測定を糖尿病網膜症に対する硝子体手術を行なった 30 眼で行い、抗 VEGF 抗体を投与して 1 週間以内に手術を行なった 18 眼における VEGF 濃度は全例とも検出感度 (15.6pg/ml) 未満であり、投与しなかった 12 眼では平均 871.3pg/mL と既報に同じく投与群で有意に ($P < 0.0001$) 眼内の VEGF 濃度が抑制されたが、SDF1 α 濃度は投与群と非投与群で有意差がなかった。上記の免疫組織染色の結果と合わせると、抗 VEGF 抗体による眼内新生血管は既存新生血管の萎縮・消退させる効果を有するが、抗 VEGF 抗体による VEGF 抑制に関係なく高値である SDF1 α により誘導される HSC と EPC が新生血管組織に存在し、その後の新たな新生血管の誘導を引き起こすことが推察された。また、高圧酸素負荷にて誘導されるマウスの血管新生モデルにおいて、非酸素負荷マウスに比べて、VEGF、SDF1 α の発現量とも有意に上昇したが、IGFBP は両群で有意差はなかった。フラットマウントでは CD34 陽性、VEGF-R2 陽性、c-Kit 陽性細胞は血管新生モデルで有意に多く観察された。P7 の時点で抗 SDF1 α 抗体を投与し、P12 における網膜切片における硝子体腔内への新生血管の発芽を切片単位でカウントし半定量的に評価すると、抗 VEGF 中和抗体の抑制効果より弱

いものの、新生血管の発芽を抑制する傾向が見出されたが、統計学的な有意差はなかった。また、いずれの抗体を投与した新生血管マウスモデルの網膜切片とも、CD34 陽性、VEGF-R2 陽性、c-Kit 陽性細胞が観察されたことから、抗 SDF1 α 抗体による HSC と EPC の誘導抑制効果が有意ではないと結論づけた。

最後に虚血モデルマウスでの rsTeM 投与眼と非投与眼における網膜フラットマウントでは rsTeM の硝子体内投与にした場合の血管新生抑制ならびに無灌流領域面積の減少は rsTeM 投与眼で有意に認められたが、眼球組織の VEGF, SDF1 α , IGFBP3 の産生変化に差がなく、EPC と HSC の局在変化、CD34 陽性、Flk 陽性、c-Kit 陽性細胞の局在とも網膜組織と発芽血管において有意差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Sasamoto Y, Oshima Y, Miki A, Wakabayashi T, Song D, Matsushita K, Hamasaki T, Nishida K. Clinical outcomes and changes in aqueous vascular endothelial growth factor levels after intravitreal bevacizumab for iris neovascularization and neovascular glaucoma: a retrospective two-dose comparative study. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2012;28(1):41-8. 査読有
2. Oshima Y, Shima C, Wakabayashi T, Kusaka S, Shiraga F, Ohji M, Tano Y. Microincision vitrectomy surgery and intravitreal bevacizumab as a surgical adjunct to treat diabetic traction retinal detachment. *Ophthalmology.* 2009;116(5):927-38. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. Oshima Y. Vitreoretinal surgery and pharmacotherapy for diabetic retinopathy and macular edema. The 25th Congress of Asia-Pacific Academy of Ophthalmology, AOI-Symposium. 2010/9/17-20. Beijing, China.
2. Sasamoto Y, Oshima Y. Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor before and after intravitreal bevacizumab in eyes with neovascular glaucoma. World Ophthalmology Congress 2010. 2010/6/4-9, Berlin, Germany.

3. 大島佑介. 重症増殖糖尿病網膜症の治療戦略: bevacizumab の功罪. 東京医科歯科大学眼科フォーラム. 2010/1/31、東京

4. Oshima Y. Vitreoretinal surgery and pharmacotherapy for diabetic retinopathy and macular edema. Academia Ophthalmologica Internationalis Symposium, American Academy of Ophthalmology Annual Meeting. 2009/10/24-27, San Francisco, USA.

5. 佐々本弦、大島佑介. 血管新生緑内障に対する bevacizumab 硝子体内投与前後の前房内 VEGF 濃度変化. 第 113 回日本眼科学会総会、2009/4/17、東京

[図書] (計 1 件)

1. Oshima Y, Tano Y. Principales and instrumentations. Vitreo-retinal Surgery Progress III. Series: Essentials in Ophthalmology. Springer Inc. 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 佑介 (OSHIMA YUSUKE)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 20362717

(2) 研究分担者

五味 文 (GOMI FUMI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 80335364

生野 恭司 (IKUNO YASUSHI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 50294096

瓶井 資弘 (KAMEI MOTOHIRO)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 40281125

(3) 連携研究者

()

研究者番号: