

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 5 月 11 日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791643
 研究課題名（和文）血管内皮細胞増殖因子(VEGF)阻害による白血球接着分子 PSGL-1
 動態の解析
 研究課題名（英文）Analysis of leukocyte adhesion molecule PSGL-1 activation caused
 by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)
 研究代表者
 野田 航介 (NODA KOUSUKE)
 北海道大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：90296666

研究成果の概要（和文）：

加齢黄斑変性は先進国における高齢者の主要な失明原因の一つとなっている。近年、その治療には抗血管内皮増殖因子に対する抗体が用いられるが、その合併症として動脈血栓塞栓に関連する有害事象が報告されている。本研究では、その原因として白血球の活性化が生じているという仮説を立てて、検証をおこなった。結果としては、白血球の活性化は生じていないことが示されたが、血小板の活性化がその動脈血栓の形成に関与していることを示唆する現象が観察され、今後の更なる検討の手がかりを得る事ができた。

研究成果の概要（英文）：

Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of visual disturbance among people over age 50 in the developed country. Recently, anti-VEGF antibody or its fragment is used as therapeutic agent for AMD in the clinical setting, and growing evidence have indicated that anti-VEGF therapy may cause the systemic complications related to arterial thromboembolism. In the current study, we hypothesized that leukocyte activation participates in the process of arterial thromboembolism formation caused by anti-VEGF therapy and sought to elucidate the mechanism. Consequently, our data demonstrates that administration of anti-VEGF antibody causes no leukocyte activation; however, it also indicates the beneficial information to the further evaluation of the mechanism, possible relevance of platelet activation in arterial thromboembolism due to anti-VEGF therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：VEGF 阻害薬、白血球ローリング、加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢黄斑変性の病態

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)は、加齢に伴う網膜・網膜色素上皮の機能障害によって網膜の中心部である黄斑にドルーゼンと呼ばれる沈着物が蓄積し、進行にともなって脈絡膜下あるいは網膜下に脈絡膜新生血管(CNV)を生じる疾患である。滲出型AMDは、異常な血管漏出をきたすCNVによって黄斑部に出血や滲出性の変化が生じると進行性の重篤な視力障害を呈するため、本疾患は先進国における高齢者の主要な失明原因の一つとなっている。CNVの発症機序には、黄斑部網膜下に蓄積したドルーゼンを貪食するために浸潤したマクロファージなどの炎症細胞が産生する血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)などの関与が知られている。

(2) 加齢黄斑変性に対する抗 VEGF 療法

現在、中心窩下 CNV が生じた滲出型 AMD に対する治療法の選択肢は、大別して光線力学的療法と抗 VEGF 療法の2つである。厚生労働省認可の滲出型 AMD に対する抗 VEGF 治療薬の一つ、ラニズマブは遺伝子組換え型ヒト化抗 VEGF モノクローナル抗体(ベバシズマブ)の Fab 断片製剤である。ラニズマブは、生物活性を有する全 VEGF アイソフォームに幅広く結合することによって VEGF の受容体への結合を阻害し、CNV の抑制および退縮という治療効果を生む。ラニズマブは、海外および本邦の臨床治験でも優れた有効性と良好な忍容性が確認された滲出型 AMD に対する分子標的治療薬である。しかしながら、本剤は血中移行するため、その投与により VEGF 阻害に起因する動脈血栓塞栓に関連する有害事象(血管死、心筋梗塞、虚血性脳卒中、出血性卒中等)が発現する可能性があると考えられている。

(3) 抗 VEGF 療法による白血球遊走と動脈血栓塞栓関連有害事象

近年、VEGF 阻害薬による副作用として血栓性微小血管症が生じるという報告が散見される。一方、動物実験レベルでは VEGF 阻害によって白血球ローリングが増加するという報告がある[Walsh et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1185-1192.]。同報告では、VEGF 阻害によって内皮細胞の恒常性が変化して白血球接着分子 P-selectin の発現亢進が生じること、そしてその結果、

白血球ローリングの増加が生じることが示されている。この白血球ローリングの亢進は血小板や白血球による血栓形成に寄与するため、上記血栓性微小血管症の原因となっている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究計画では、申請者らが確立した Autoperfused Micro Flow Chamber System[Hafezi-Moghadam A, Noda K, et al. *FASEB J.* 21: 464, 2007]を用いて、抗 VEGF 治療薬による白血球遊走増加の機序を解析することを目的とした。過去に我々のグループは、LPS 投与によって白血球接着分子 P-selectin のみならず、その counter ligand である PSGL-1 にも機能亢進が生じて、白血球ローリングが増加し、その速度が低下する(つまり次のステップである白血球接着が生じやすくなる)ことを Autoperfused Micro Flow Chamber System を用いて報告した[Almulki L, Noda K, et al. *FASEB J.* 2009 ;23:929-39.]。前述の Walsh らは PSGL-1 については検討をしていないため、VEGF 阻害による白血球上の PSGL-1 の機能変化については全く不明である。

本研究結果は上記副作用の発症メカニズムの解明につながり、その打開に有用な情報をもたらすと考えられた。

3. 研究の方法

前述のごとく過去の研究において、抗 VEGF 抗体を投与された動物では白血球遊走が亢進し、そのメカニズムとして血管内皮細胞上の接着分子 P-selectin が関与していることが明らかとされていた。しかしながら、P-selectin の counter-receptor である PSGL-1 の機能亢進が生じるか否かについては、既存の実験方法では検討が困難であり不明のままであった。

そこで今回我々は、その検討方法として Autoperfused Micro Flow Chamber System を用いることによって血管内皮細胞側の接着分子の条件を一定化することで、P-selectin の counter-receptor である PSGL-1 の機能評価を試みた。

(1) Autoperfused Micro Flow Chamber System の確立

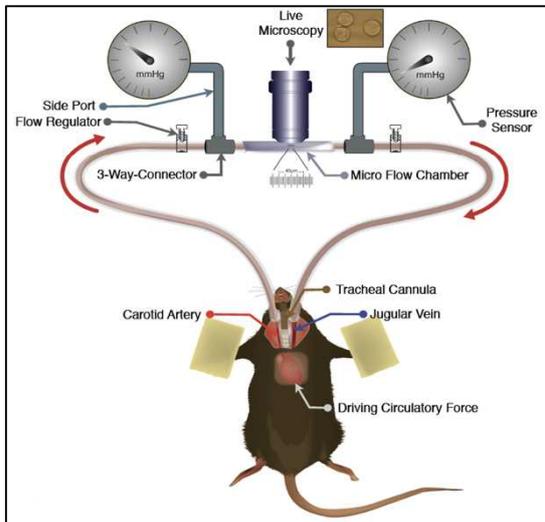
本システムは、マウス頸動脈および頸静脈に生体適合性の高い polyethylene tubing を留置した後に、ガラス製 microslide をその tubing と連結させて体外循環路を作成する。また、tubing に管内圧を測定するモニターと圧調整をするスクリーンを図の如く設置し、

microslide に到達する血流が常に一定となるように調整する。この microslide 内には特定の白血球接着分子を一定の濃度でコーティングすることができるため、従来の in vivo 研究では不可能であった、例えば「PSGL-1 が機能的に亢進しているか否かの検討」が、microslide を一定濃度の P-selectin でコーティングするという手法でおこなうことができる。

初年度は同システムを確立し、白血球動態の観察を可能とすることに従事した。すなわち、microslide 内部を mouse recombinant P-selectin (5 μ g/ml) でコーティングして、正常マウスに接続し、評価可能な白血球ローリングが観察できるかを検討した。

Autoperfused Micro Flow Chamber System の概要図を示す。

< Micro Flow Chamber System >



(2) 抗 VEGF 抗体投与マウスの作成

生後 12-16 週の C57/B6 マウスに抗 VEGF 抗体 0.1mg/100 μ l を 10 日間連続で腹腔内投与した。また、対照群には同容量の PBS を 10 日間連続で腹腔内投与した。

(3) microslide を用いた白血球ローリング速度の測定および評価

P-selectin でコーティングした microslide を抗 VEGF 中和抗体投与マウス (n=8) および対照群マウス (n=8) に接続して、P-selectin に対する白血球ローリングを生体顕微鏡下に撮影した。既報 [Almulki L, Noda K, et al FASEB J. 2009 ;23:929-39.] にしたがってビデオ画像を解析することで、ローリング速度を算出した。

(4) microslide を用いた接着白血球数のカウントおよび評価

体外循環開始 10 分後に microslide を取り外し、ポンプを用いて生理食塩水で一定時間内部を還流し、P-selectin に対して生じた白

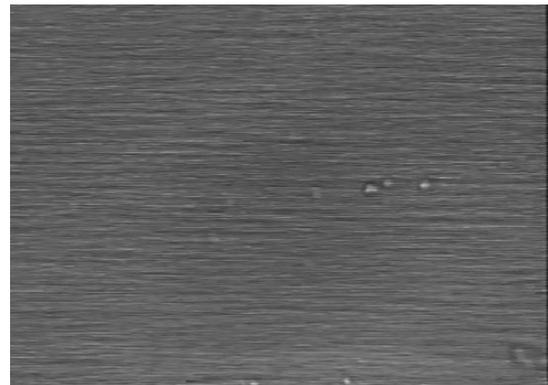
血球接着を光学顕微鏡下に撮影した。既報 [Hafezi-Moghadam A, Noda K, et al. FASEB J. 21: 464, 2007] にしたがって一視野あたりの接着白血球数をカウントした。

4. 研究成果

(1) Autoperfused Micro Flow Chamber System の確立

初年度は正常マウスに mouse recombinant P-selectin (5 μ g/ml) を接続して評価可能な白血球ローリングが観察できるかについて検討した。しかしながら、実験開始後数分が経過すると凝血反応が生じてマウスの血流が安定しなくなるという事象が生じ、実験施行が困難となった。いくつかの対策を試みた結果、マウスに対してヘパリンの腹腔内投与をおこなってから血液灌流を開始すると実験系の安定が得られ、評価可能な白血球ローリングを観察できることがわかった。そのため、以降の実験は上記のヘパリン前投与をおこなってから施行した (下図)。

< 白血球ローリング >



(2) 抗 VEGF 抗体投与マウスの作成

当初の計画では、ヒト AMD 患者に対して実際に投与される遺伝子組換え型ヒト化抗 VEGF モノクローナル抗体ベバシズマブ、あるいはその Fab 断片製剤であるラニズマブを使用する予定であったが、マウスにおいてはその VEGF 阻害能が低下するという報告があったため、抗マウス VEGF 中和抗体を使用して検討を行う事とした。抗 VEGF 抗体 0.1mg/100 μ l の腹腔内投与では、特に個体死亡などの事象は認められなかった。

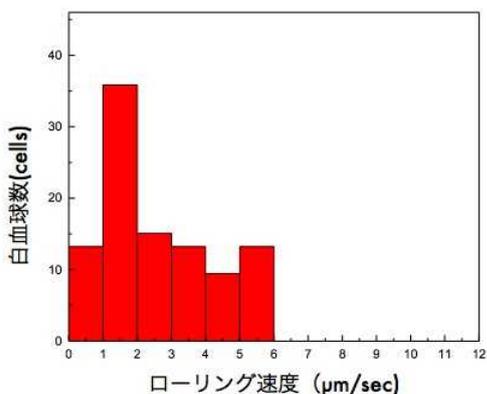
(3) microslide を用いた白血球ローリング速度の測定および評価

本実験では、白血球ローリングが観察され、ローリング速度の測定が可能であった。対照群における白血球ローリング速度は 2.76 \pm 1.33 μ m/sec (観察白血球数は 53 cells)、抗マウス VEGF 中和抗体投与群における白血球ローリング速度は 2.27 \pm 0.59 μ m/sec (観察白血

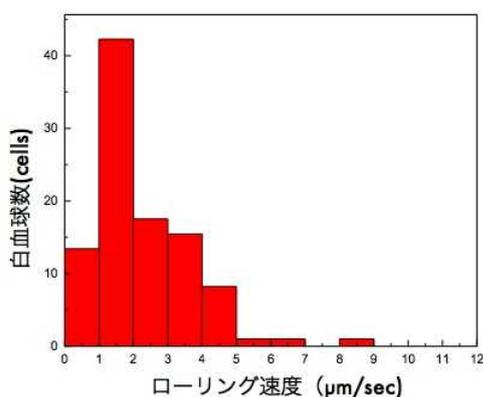
球数は 100cells)であり、両者には統計学的有意差が認められなかった (P=0.21)。結果をグラフに示す。

＜白血球ローリング速度の分布＞

対照群



抗体投与群



(4) microslide を用いた接着白血球数のカウントおよび評価

体外循環開始 10 分後に取り外し、ポンプを用いて生理食塩水で一定時間内部を還流した microslide 内には、光学顕微鏡下に接着白血球が観察され、その定量が可能であった。対照群における接着白血球数は 16.7 ± 3.5 cells/mm² (n=9)、抗マウス VEGF 中和抗体投与群における接着白血球数は 19.6 ± 3.3 cells/mm² (n=8) であり、両者には統計学的有意差が認められなかった (P=0.56)。

以上の結果は、前述の VEGF 阻害によって白血球ローリングの増加が生じるという現象は、PSGL-1 の機能変化によるものではないことを示唆していた。抗 VEGF 抗体によって生じる白血球ローリングの亢進は、以前我々のグループが明らかとした LPS 投与に

よる白血球ローリングの亢進メカニズムとは異なる機序が関連しているのかもしれない。また近年の報告では、ヒト AMD 患者に対して投与されるベバシズマブ、ラニズマブは VEGF と凝集体を形成し、ヘパリン存在下で血小板の活性化とそれに続発する動脈塞栓症を引き起こすことが明らかとされている。今回の検討開始時に凝結反応が繰り返し生じて実験が困難となったのは、その機序と何らかの関連があるのかもしれない。

Autoperfused Micro Flow Chamber System は、条件を設定することで血小板のローリングも評価可能な実験系であるため、今後は本研究結果を基盤としてその点に着目した研究を施行する予定である。

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 2 件)

1. Noda K, Nakao S, Ishida S, Ishibashi T. Leukocyte Adhesion Molecules in Diabetic Retinopathy. J Ophthalmol. 2012;2012:279037. Epub 2011 Nov 2. doi: 10.1155/2012/279037 査読有
2. 野田航介. 糖尿病網膜症と白血球接着分子. あたらしい眼科 28: 245-247, 2011 <http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=ah9atgke&ye=2011&vo=28&nu=2> 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Noda K. Adhesion molecules in diabetic retinopathy. Symposium: Pathogenesis of diabetic retinopathy: angiogenesis, inflammation, and beyond. 11th International Ocular Inflammation Society (IOIS) Congress and International Assembly of Ocular Inflammation Societies: Goa, India; 2011/11/15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田航介 (NODA KOUSUKE)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 90296666

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: