

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6月4日現在

機関番号：24303
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2012
課題番号：22791679
研究課題名（和文） 瘢痕抑制による加齢黄斑変性の新しい治療法の開発
研究課題名（英文） Development of new treatment for age-related macular degeneration with suppressing scaring.
研究代表者
米田 一仁 (YONEDA KAZUHITO)
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医
研究者番号：00347460

研究成果の概要（和文）：

先進国の主な社会的失明原因である加齢黄斑変性に対する新しい治療法の開発に取り組んできた。まず、新規物質CTLA2 alphaによる脈絡膜新生血管の抑制に成功した。また、すでに臨床応用されている経瞳孔温熱療法を用いることにより脈絡膜新生血管の発生を抑制するような抗血管新生作用を示す変化がBruch膜周辺でおこることを発見した。さらに眼内増殖性疾患全般の治療法開発に向け、PPAR gammaによるヒト網膜色素上皮細胞の上皮間葉移行制御方法の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We have challenged to develop new therapeutic method for age-related macular degeneration that is a leading cause of irreversible blindness in the developed world. Firstly, we found that CTLA2alpha suppressed the choroidal neovascularization. Secondly, we found that trans-pupillary thermotherapy (TTT) that had been already applied in a clinical setting restore Bruch membrane integrity and barrier function against new vessel growth. Additionally we found that PPARgamma suppressed epithelial mesenchymal transition of human RPE cell.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼病理・加齢黄斑変性・リンパ管・TGF-beta

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は 50 歳以上の主たる社会的失明原因であり、眼科領域において非常に重要な疾患である。なかでも、脈絡膜新生血管を発生し、急激な視力低下をきたす滲出型加齢黄斑変性は、網膜色素上皮破壊による脈絡膜からの新生血管を発生することによって発症する。滲出型加齢黄斑変性による視力低下は、発生した脈絡膜新生血管からの網膜下出血、滲出液の漏出による網膜剥離と黄斑浮腫、網膜下の繊維化による瘢痕形成が原因と考えられている。脈絡膜新生血管を含め血管新生には、種々のサイトカインが関与しており、血管の安定化と成熟化に、TGF- β が重要な働きを果たしていることが報告されている。また、リンパ管内皮増殖抑制に TGF- β が深く関与していることも報告されている。脈絡膜新生血管の線維化による瘢痕形成は、組織学的に皮膚の瘢痕形成と類似しており、皮膚科領域では、瘢痕形成の抑制に TGF- β 1,2,3 アイソフォームの量的な比率が重要であることが知られている。TGF- β 1 及び TGF- β 2 は、瘢痕形成を促進する作用を有しており、逆に TGF- β 3 は、瘢痕形成を抑制する働きがある。このため皮膚創傷治癒過程において、TGF- β 1 と TGF- β 2 を中和抗体にて阻害し、同時に TGF- β 3 を局所に投与することにより、瘢痕形成を抑制することが可能であることが明らかになった (Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004)。したがって滲出型加齢黄斑変性の瘢痕形成過程においても、TGF- β が重要な働きをしている可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

眼科領域の血管・リンパ管新生に対して、これまではその退縮を目的とした抗血管・リンパ管新生促進因子投与や光線力学療法などの治療法が開発されてきた。今回、我々は血管・リンパ管新生に対する、従来とは異なるコンセプトのもとに加齢黄斑変性に対する新規治療法を開発することを試みる。すなわち、血管の安定化・成熟化、リンパ管内皮増殖抑制に重要な役割を果たす Transforming Growth Factor(TGF)- β の作用を検討し、血管の安定化と瘢痕形成抑制・リンパ管新生抑制をターゲットにした新規治療法を開発を行う。

加齢黄斑変性は 50 歳以上の主たる社会的失明原因であり、眼科領域において非常に重要な疾患である。なかでも、脈絡膜新生血管を発生し、急激な視力低下をきたす滲出型加齢黄斑変性は、網膜色素上皮破壊による脈絡膜からの新生血管を発生することによって発症する。滲出型加齢黄斑変性による視力低下は、発生した脈絡膜新生血管からの網膜下出血、滲出液の漏出による網膜剥離と黄斑浮腫、網膜下の繊維化による瘢痕形成が原因と考えられている。脈絡膜新生血管を含め血管新生には、種々のサイトカインが関与しており、血管の安定化と成熟化に、TGF- β が重要な働きを果たしていることが報告されている。また、リンパ管内皮増殖抑制に TGF- β が深く関与していることも報告されている。脈絡膜新生血管の線維化による瘢痕形成は、組織学的に皮膚の瘢痕形成と類似しており、皮膚科領域では、瘢痕形成の抑制に TGF- β 1,2,3 アイソフォームの量的な比率が重要であることが知られている。TGF- β 1 及び

TGF- β 2 は、癒痕形成を促進する作用を有しており、逆に TGF- β 3 は、癒痕形成を抑制する働きがある。このため皮膚創傷治癒過程において、TGF- β 1 と TGF- β 2 を中和抗体にて阻害し、同時に TGF- β 3 を局所に投与することにより、癒痕形成を抑制することが可能であることが明らかになった (Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004)。したがって滲出型加齢黄斑変性の癒痕形成過程においても、TGF- β が重要な働きをしている可能性があると考えられる。

TGF- β は哺乳類において、TGF- β 1,2,3 の3つのアイソフォームを持ち、細胞増殖など多くの重要な作用を持っている。これまで、眼科領域においても、多彩な作用を持ち、緑内障や増殖硝子体網膜症の疾患発症メカニズムへの関与が報告されている。TGF- β 1,2,3 のアイソフォームは、それぞれがアミノ酸配列で約 80%の相同性を持つにもかかわらず、生物学的に特異性のある異なった作用を有しているとの報告がなされている。われわれのグループもこの TGF- β のアイソフォーム間の作用の違いに着目し、従来報告のあった TGF- β 1 と TGF- β 2 のみではなく TGF- β 3 も含めてすべてのアイソフォームが疾患発症に関与していると考え、眼内液（前房水）中の TGF- β 1,2,3 アイソフォームの濃度を高感度かつ正確に測定する系を確立している (Yoneda K, *etc*, *Growth Factors*, 2007,)。このような病態メカニズム解明において TGF- β 1,2,3 アイソフォームの個々の作用もしくは量的な比率を持つ作用が重要であると思われるが、血管・リンパ管新生について、各 TGF- β 1,2,3 アイソフォームの及ぼす影響について検討した報告はない。しかし、

我々は血管・リンパ管新生において重要な働きをするマクロファージが TGF- β 2 刺激によって、その特性が抑制されることを発見した。以上のことから、我々は血管・リンパ管新生に TGF- β 1,2,3 が重要な働きをしていると考え、その量的比率を適切に調節することによって、新生血管の早期安定化と成熟化を起こさせて血管の漏出を抑制し、さらに癒痕形成の抑制を可能にすると同時にリンパ管内皮増殖抑制によるリンパ管新生の抑制という全く新しい発想の治療方法を眼内血管・リンパ管新生のみならず腫瘍などの全身疾患への応用することを目的として本研究を行う。

3. 研究の方法

血管・リンパ管新生の新しい治療法の開発に向けて、*in vivo* の実験系として、ラットを用いた滲出型加齢黄斑変性モデルとマウス角膜血管・リンパ管新生モデルを用いる。ラット網膜に光凝固を行うことによって滲出型加齢黄斑変性様の脈絡膜新生血管が作成できることが以前から報告されており、このモデルラットを用いて、各 TGF- β 1,2,3 アイソフォームの量的な比率を調節することの作用を検討する。モデル動物の眼底写真による病変の拡大と蛍光眼底造影写真（写真参照）による蛍光色素の漏出の増減及び網膜浮腫の有無等の検討を行う。またいくつかの時間経過における組織採取をし、各 TGF- β 1,2,3 アイソフォームの発現量を経時的に観察し、血管周皮細胞の存在より血管の安定化と成熟化の程度を判定する。角膜血管・リンパ管新生モデルは我々が以前から行っているマ

ウス角膜に縫合を行い血管・リンパ管新生を誘導する。誘導後角膜を血管・リンパ管マーカーで染色し、その範囲を測定する。治療には TGF- β や TGF- β 抗体を使用する。また、*in vitro* の実験系として、滲出型加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管及び癒痕組織の主たる細胞要素である網膜色素上皮細胞と血管内皮細胞の培養細胞に対して、各 TGF- β 1,2,3 アイソフォームの刺激を行い *in vitro* 下での創傷治癒過程の影響を調べるとともに、血管内皮細胞増殖と周皮細胞 (10T1/2 細胞を使用) との共培養で、各 TGF- β 1,2,3 アイソフォームが *in vitro* での血管成熟へ与える影響を検討する。同時にリンパ管内皮培養でも TGF- β の影響を増殖アッセイと tube formation assay を行う。

4. 研究成果

加齢黄斑変性のモデルマウスを作成するためにマウスに網膜光凝固にて脈絡膜新生血管を作製し、本来免疫抑制物質として同定されていた cytotoxic T lymphocyte antigen-2 (CTLA2) alpha が眼組織において角膜や網膜色素上皮といった血管新生を阻害している部位で特異的に発現していることを発見した。そこでこの CTLA2alpha に免疫抑制効果以外に血管新生抑制作用があるのではないかとの仮説のもと全身投与による脈絡膜新生血管の抑制効果を免疫組織化学的に検討した。また同様の血管新生抑制作用の検討を *in vitro* の評価系として血管内皮細胞の培養系を用いて行った。その結果 CTLA2alpha はモデルマウスにおいて優位に CNV の発生を抑えた ($p=0.01$)。またマウス血管内皮細胞の増殖を有意に抑制していた ($p=0.0286$)。加

齢黄斑変性は先進国における社会的失明原因の首位を占める疾患であり、その克服は眼科領域に置いて非常に重要な課題である。この研究成果は加齢黄斑変性において、劇的な視力低下をもたらす原因である脈絡膜新生血管 (CNV) の発生を抑制することによる新たな治療薬の候補となる。

また、さらに脈絡膜新生血管の癒痕化のコントロールを目的としてヒト網膜色素上皮細胞である ARPE19 と家兔の網膜色素上皮細胞の培養細胞を用いて PPARgamma による上皮間葉移行による癒痕形成の抑制作用を検討しており、いくつかの PPARgamma 作用薬にて *in vitro* での癒痕抑制作用を確認している。これらは加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管の癒痕化による視力低下を予防できる可能性があると考えられる。

また、既に臨床応用されている経瞳孔温熱療法による網膜の温度上昇により、網膜内の Bruch 膜における抗血管新生因子の増加や加齢黄斑変性のマウスモデルにおいて発症する脈絡膜新生血管の形成を抑制することを発見した。

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 1 件)
Sekiyama E, Saint-Geniez M, Yoneda K, Hisatomi T, Nakao S, Walshe TE, Maruyama K, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Kinoshita S, D'Amore PA.
Heat treatment of retinal pigment epithelium induces production of elastic lamina components and antiangiogenic activity.
FASEB journal. 査読有、26 巻、567-575、DOI: 10.1096/fj.11-184127

[学会発表] (計 1 件)
米田一仁、丸山和一、杉田直、山本芳美、丸

山悠子、小池正人、内山安男、木下茂、加齢
黄斑変性の脈絡膜新生血管に対する新規血
管新生抑制物質 CTLA2-alpha の検討、第 11
回日本抗加齢医学会総会、2011 年 5 月 27 日、
国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 一仁 (YONEDA KAZUHITO)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻
医

研究者番号：00347460

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：