

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592597

研究課題名(和文) 未熟児網膜症における病態研究と抗血管内皮細胞増殖因子療法の検討

研究課題名(英文) Studies on the pathogenesis and anti-VEGF treatment of retinopathy of prematurity

研究代表者

日下 俊次 (KUSAKA, Shunji)

近畿大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60260387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症未熟児網膜症11例に対して抗血管内皮細胞増殖因子(VEGF)治療(アバスタチン投与)を行った症例について、投与翌日、1週後、2週後に血清を採取、血清中のアバスタチン濃度、VEGF濃度を測定した。その結果、アバスタチン投与後に血清アバスタチン濃度は経時的に上昇し、逆に血清VEGF濃度は経時的に減少し、両者は負の相関を示した。これらの結果から眼内に投与したアバスタチンは血清中に移行し、血清中のVEGF濃度を低下させる可能性があることが示された。今後、抗VEGF治療を考える上で、薬剤選択の際の判断材料になるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Serum samples were collected from 11 infants with ROP who had received intravitreal bevacizumab injection before and 1 day, 1 week, and 2 weeks after the injection. The serum concentrations of bevacizumab and VEGF were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. As a result, the serum concentration of bevacizumab before and 1 day, 1 week, and 2 weeks after a total of 0.5 mg of intravitreal bevacizumab was 0, 195, 946, and 1214 (ng/mL), respectively. The serum concentration of VEGF before and 1 day, 1 week, and 2 weeks after a total of 0.5 mg intravitreal bevacizumab was 1628, 427, 246, and 269 (pg/mL), respectively. There was a significant negative correlation ( $r = -0.575$ ,  $P = 0.0125$ ) between the serum concentration of bevacizumab and VEGF. These results indicate that bevacizumab can escape from the eye into the systemic circulation and reduce the serum level of VEGF in infants with ROP.

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：未熟児網膜症 血管内皮細胞増殖因子 血管新生 抗体治療 抗VEGF治療

### 1. 研究開始当初の背景

未熟児網膜症は1942年にアメリカの眼科医によって初めて報告(Terry TL, Am J Ophthalmol;25:203-204,1942)されたが、後の研究により本疾患の発症には酸素投与が関係していることが判明した(Kinsey VE, Arch Ophthalmol 56: 481-543, 1956)。一時、高濃度酸素投与を避けることで未熟児網膜症の発症頻度は低下したが、その後の周産期医学の進歩によって超低出生体重児、すなわち生下時に眼の未熟性がより高い児の生存率が向上してきたことより、未熟児網膜症の重症例はむしろ増加傾向にある。重症未熟児網膜症では網膜から硝子体内に新生血管を生じ、牽引性網膜剥離を来たして最終的に失明する。網膜光凝固は未熟児網膜症に対して確立した治療法であるが、アメリカで行われた前向き多施設研究では網膜光凝固を適切な時期に行っても9.1%の患児は網膜剥離や後部水晶体増殖膜を来たし重篤な視力障害を生じると報告(Early Treatment For Retinopathy Of Prematurity Cooperative Group, Arch Ophthalmol. 2003; 121: 1684-94.)されており、その治療効果には限界がある。また、網膜光凝固には高度近視の発生(Davitt BV et al. Ophthalmology. 112: 1564-8, 2005)、白内障、眼球癆(Lambert SR et al. Am J Ophthalmol. 129:585-91, 2000)などの合併症の問題もある。

未熟児網膜症の病態に強く関与するものとして血管内皮細胞増殖因子(VEGF)が挙げられる。これまで我々は未熟児網膜症の動物モデルである酸素誘導網膜症マウスに対して包括的な遺伝子プロファイル解析を行い、種々のサイトカインの中でもVEGFとangiopoietin-2の値が最も網膜症の程度と相関していることを報告(Sato T, Kusaka S, et al. Br J Ophthalmol 2009; 93:96-103)した。また、実際の臨床例でも硝子体中のVEGFが高値であることが我々の報告を含め、これまで示されている(Sonmez K et al, Ophthalmology 2008;115:1065-1070, Sato T, Kusaka S, et al. Ophthalmology 2009; 116: 1599-603)。一方、未熟児網膜症と同様にVEGFがその病態に重要な役割を果たす加齢黄斑変性に対しては抗VEGF抗体であるpegaptanib(Gradoudas ES et al. N Engl J Med. 351:2805-16, 2004)やranibizumab(Rosenfeld PJ et al. N Engl J Med. 355: 1419-31, 2006)を硝子体内投与することがすでに広く行われ、また、適応外使用ではあるがbevacizumab(Avery RL et al. Ophthalmology. 113:363-372, 2006)も広く臨床的に使用されている。

### 2. 研究の目的

未熟児網膜症に対する抗VEGF抗体治療としてはbevacizumabの硝子体内投与が網膜症の活動性を低下させ、予後を改善させる効果があることが我々のグループを含めて

いくつか報告されている(Kusaka S, et al. Br J Ophthalmol 2008; 92: 1450-5, Wu WC et al. Ophthalmology 2010; July 27. Epub ahead of print)。しかし、bevacizumabの適切な投与時期、投与量、安全性、長期予後などは不明であり、本治療法が広く行われるために解決されるべき課題となっている。今回の研究では上記の点を踏まえ、硝子体手術を要する症例の硝子体中サイトカインの解析、bavacizumab投与を要する症例の血清および硝子体内のbevacizumab, VEGF濃度測定を行い、bevacizumabの適切な投与量を検討すること、bevacizumabを用いて治療された患児の視機能の評価を行うことを目的に行う

### 3. 研究の方法

網膜光凝固を行っても病状が沈静化しない、あるいは著明な水晶体血管膜によって網膜光凝固そのものを行えない重症未熟児網膜症に対してbevacizumab硝子体内投与を行う。この際、院内倫理審査委員会の承認を得た上で、両親に本研究の目的、方法、検体採取に伴う危険性、協力頂けない場合にも治療上何らデメリットがないこと等を説明し、書面による同意書を得た上で、bevacizumab投与前、投与翌日、7日後、14日後に血清(0.5ml)を採取する。また、硝子体手術を要する症例では同意を得た上で硝子体液を採取する。これらのサンプル中のbevacizumab濃度、VEGF濃度の測定を行う。血清は常温で15分静置、遠沈後、測定まで-80度で冷凍保存する。硝子体液は採取後すぐにドライアイスにて急速凍結し、-80度で冷凍保存する。VEGF濃度、bevacizumab濃度測定前にサンプルを解凍し、15000回転/分で10分遠沈後、上清を解析に用いる。VEGF濃度測定は市販のキット(R&D system)を用いて、Enzyme-linked immunosorbent assay法でプロトコールに従って行う(Sato T, Kusaka S, et al Ophthalmology 2009;116: 1599-603)。また、bevacizumab濃度測定は既報(Zhu Q, et al. Ophthalmology 2008;115: 1750-1755)に従い、いわゆるsandwich ELISA法を用いて行う。まずrecombinant human VEGF165をコーティングした96穴プレート上に血清を100µl加えて、3時間清置し、吸光度を測定する。既知濃度のbevacizumab溶液を対照して検量線を引き、濃度を決定する。なお、bevacizumab投与量は当初はこれまで行ってきた0.5mg/眼とするが、血清中のVEGF濃度、bevacizumab濃度の値を参考に変更することも考えている。

### 4. 研究成果

重症未熟児網膜症11例に対して抗血管内皮細胞増殖因子(VEGF)治療(アバスチン投与)を行った症例について、投与翌日、1週後、2週後に血清を採取、血清中のアバスチン濃度、VEGF濃度を測定した。その結果、ア

バスチン投与後に血清アバスチン濃度は経時的に上昇し、逆に血清 VEGF 濃度は経時的に減少し、両者は負の相関を示した。これらの結果から眼内に投与したアバスチンは血清中に移行し、血清中の VEGF 濃度を低下させる可能性があることが示された。今後、抗 VEGF 治療を考える上で、薬剤選択の際の判断材料になるものと思われる。

#### 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 6 件)

1. Kodama A, Sugioka K, Kusaka S, Matsumoto C, Shimomura Y. Combined treatment for Coats' disease: retinal laser photocoagulation combined with intravitreal bevacizumab injection was effective in two cases. BMC Ophthalmol. 2014 Mar 25;14:36.(査読有)
2. Kuniyoshi K, Sugioka K, Sakuramoto H, Kusaka S, Wada N, Shimomura Y. Intravitreal injection of bevacizumab for retinopathy of prematurity. Jpn J Ophthalmol. 2014 Feb 26. [Epub ahead of print](査読有)
3. Tahija SG, Hersetyati R, Lam GC, Kusaka S, McMenamin PG. Fluorescein angiographic observations of peripheral retinal vessel growth in infants after intravitreal injection of bevacizumab as sole therapy for zone I and posterior zone II retinopathy of prematurity. Br J Ophthalmol. 2014 Apr;98(4):507-12. (査読有)
4. Imaizumi A, Kusaka S, Noguchi H, Shimomura Y, Sawaguchi S. Efficacy of Short-term Postoperative Perfluoro-n-octane Tamponade for Pediatric Complex Retinal Detachment. Am J Ophthalmol 2014 Feb;157(2):384-389.e2.(査読有)
5. Sugioka K, Kodama A, Okada K, Iwata M, Yoshida K, Kusaka S, Matsumoto C, Kaji H, Shimomura Y. TGF- $\beta$ 2 promotes RPE cell invasion into a collagen gel by mediating urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression. Exp Eye Res. 2013 Jun 28;115C:13-21.(査読有)
6. Kondo H, Kusaka S, Yoshinaga A, Uchio E, Tawara A, Tahira T. Genetic variants of FZD4 and LRP5 genes in patients with advanced retinopathy of prematurity. Mol Vis. 2013; 19: 476-85. Epub 2013 Feb 25.(査読有)

[学会発表](計 18 件)

1. The 8<sup>th</sup> Asia Pacific Vitreo-retina

Society Congress (Dec 6 -8,2013 Nagoya) Symposium 5. Shunji Kusaka: Vitrectomy and Bevacizumab for Severe Retinopathy of Prematurity.

2. 第 34 回 産業医大眼科研究会 (2013 年 11 月 30 日、北九州市) 特別講演 日下俊次 小児網膜疾患に対する外科的治療
3. American Academy of Ophthalmology Annual Meeting(Nov16-19,2013 New Orleans,LO,USA) Occurrence of Retinal Detachment in Japanese Patients with Stickler Syndrome Kondo H, Hayashi T, Kondo M, Ohji M, Kusaka S
4. The 2<sup>nd</sup> Annual Meeting of Taiwan Retina Society(Nov9-10,2013Taipei,Taiwan) Keynote Lecture, Shunji Kusaka: Surgical Treatment of Complex Retinal Detachment
5. 第 43 回 RETINA の会 (2013 年 11 月 2 日、横浜市) 特別講演 日下俊次 小児における網膜硝子体手術
6. 第 67 回 日本臨床眼科学会 (2013 年 10 月 30 日~11 月 3 日、横浜) 一般講演 網膜手術「広角眼底観察システム用曇り防止装置の開発」日下俊次 下村嘉一 (2013 年 10 月 31 日)
7. 第 67 回 日本臨床眼科学会 (2013 年 10 月 30 日~11 月 3 日、横浜) 一般講演 眼内レンズ「2つのマーキング法によるトーリック眼内レンズ軸ずれの検討」立花都子 日下俊次 小池英子 河本庄平 青松圭一 藤井明子 檜垣史郎 下村義一 (2013 年 11 月 1 日)
8. 第 67 回 日本臨床眼科学会 (2013 年 10 月 30 日~11 月 3 日、横浜) 学術展示 小児眼科「ベバシズマブ硝子体注射と PDT を施行した小児に発症した網膜血管腫の 1 例」馬場高志 三宅敦子 山崎厚志 日下俊次 井上幸次 (2013 年 11 月 2 日)
9. 第 7 回琵琶湖眼底疾患研究会 (2013 年 10 月 3 日、大津市) 特別講演 日下俊次 「小児網膜手術 tips and pearls」
10. Singapore National Eye Centre (SNEC) and Aapos Joint Meeting (July 14 - 16, 2013 Singapore) Imaizumi A, Noguchi H, Kusaka S. Subretinal drainage and vitrectomy are helpful in diagnosing and treating eye with advanced Coats' s disease
11. 第 69 回 日本弱視斜視学会総会 第 38 回 日本小児眼科学会総会 合同学会 (2013 年 7 月 5 日、6 日、広島国際会議場) 日下俊次  
(ア) 未熟児網膜症に対するベバシズマブ単独治療の成績  
(イ) 硝子体手術が診断と治療に有用であった重症コーツ病の 1 症例

(ウ)前房内に迷入した空気により瞳孔  
ブロックを来した小児の1例

12. 第 69 回 Tokyo Ophthalmology Club  
(2013年6月20日、東京都) 特別講  
演 日下俊次 小児網膜硝子体疾患の  
治療
13. 第 58 回山陰眼科集談会(2013年6月16  
日、出雲市)特別講演 日下俊次 小  
児網膜硝子体疾患の治療
14. 第 96 回阪大眼科同窓会学術講演会  
(2013年6月2日、大阪市)特別講演 日  
下俊次 小児網膜硝子体疾患の治療
15. 2013 Association for Research in  
Vision and Ophthalmology (May 5-9,  
2013 Seattle, WA, USA) Sugioka K,  
Kodama A, Yoshida K, Okada K, Kusaka  
S., Matsumoto C, Shimomura Y.  
TGF-beta2 promotes RPE cell invasion  
into collagen gel by mediating  
urokinase-type plasminogen activator  
(uPA) expression.
16. 2013 Association for Research in  
Vision and Ophthalmology (May 5-9,  
2013 Seattle, WA, USA) Kusaka S., Komoto  
S, Fujii A, Aomatsu K, Koike E,  
Tchibana K, Higaki S, Shimomura Y.  
Comparison of surgical results  
between intrascleral posterior  
chamber intraocular lens (PC-IOL)  
fixation and transscleral suturing of  
PC-IOL in eyes without capsular  
support.
17. The Vail Vitrectomy 2013 Meeting (Mar.  
16-20, 2013 Vail, CO) Kusaka S.  
Efficacy of short-term postoperative  
PFO tamponade in pediatric complex  
retinal detachment
18. 豊中市眼科医会学術研究会 (2013年4  
月20日、豊中市) 特別講演 日下俊  
次 小児網膜硝子体疾患の治療

〔図書〕(計2件)

1. 日下俊次:未熟児網膜症 眼科疾患 最新  
の治療 2013-2015. 南江堂 213-214,  
2013
2. 日下俊次:第一次硝子体過形成遺残 専  
門医のための眼科診療クオリファイ 裂孔原  
性網膜剥離 -How to treat 217-220, 2013  
中山書店

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

日下 俊次 (KUSAKA, Shunji)  
近畿大学 医学部附属病院・教授  
研究者番号: 60260387

### (2)研究分担者

國吉 一樹 (KUNIYOSHI, Kazuki)  
近畿大学 医学部附属病院・講師  
研究者番号: 30234470

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: