

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592668

研究課題名(和文) 網膜疾患における血管新生抑制性ペプチド VEGF165b の病態解析と治療法の開発

研究課題名(英文) Role of VEGF165b in neovascular vitreoretinal diseases and development of treatments for it

研究代表者

大路 正人 (Ohji, Masahito)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90252650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カニクイザルの硝子体内にペガプタニブを投与した後に眼内VEGFは増加したが、アイソフォームによる差異は認めなかった。培養細胞を用いた実験ではペガプタニブによりVEGFが増加し、特にVEGF165bの増加が多くみられた。カニクイザルにおけるラニビズマブおよびアフリベルセプトの硝子体内投与時の半減期は両薬剤間に差は無く、どちらの薬剤も無硝子体眼では有硝子体眼よりも半減期が短かった。カニクイザルにおいても加齢黄斑変性症例においてもアフリベルセプトの方がラニビズマブよりも有硝子体眼でも無硝子体眼でもVEGFを長い期間抑制した。アフリベルセプトは血中VEGFを抑制したが、ラニビズマブは影響しなかった。

研究成果の概要(英文)：VEGF concentration increased after intravitreal injection of pegaptanib sodium into macaque eyes and there was no difference in the increase among the isoforms. Pegaptanib increased VEGF165 production by cultured ARPE65 cells while it did not increase VEGF165b production. In monkey experiments, the half-lives of intravitreally injected ranibizumab (IVR) and aflibercept (IVA) in the aqueous humor were similar and they were shorter in vitrectomized eyes. IVA suppressed VEGF level in the injected eyes for longer period compared with IVR. IVA also, but not IVR suppressed VEGF level in untreated fellow eye for a short period. The pharmacokinetics of anti-VEGF drugs and its effect may be different among drugs. It is also different between in vitrectomized eyes and non-vitrectomized eyes. In AMD patients, IVA completely suppress aqueous VEGF for 2 months while IVR partially suppress VEGF at 2 month after injection. IVA suppressed serum and plasma VEGF while IVR did not.

研究分野：眼科

キーワード：VEGF VEGF165b 抗VEGF薬 眼内薬物動態

### 1. 研究開始当初の背景

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) は増殖糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などの網脈絡膜疾患の病態に非常に深く関与していることが、われわれの報告を含め複数の報告により証明されている (Sawada, Ohji, et al Acta Ophthalmol. 2011, Sawada, Ohji et al. Jpn J Ophthalmol. 2011)。最近では VEGF に結合しその作用を阻害するアプタマー (pegaptanib sodium) や抗体断片 (ranibizumab) が加齢黄斑変性の治療薬として承認され、その硝子体内注射が加齢黄斑変性治療の第一選択となっており、糖尿病黄斑浮腫や静脈閉塞症に対しても多くの国々で治験がなされ、一部には適応拡大が承認されている。さらに、抗癌剤として承認された抗 VEGF 抗体である bevacizumab の硝子体内投与も適応外使用として網脈絡膜疾患の治療に幅広く用いられている。われわれはこれまでに臨床検体およびカニクイザルを用いた実験で bevacizumab の硝子体内投与で眼内の VEGF が低下し、VEGF の作用が完全にブロックされ、その効果が 4 週間持続することを報告してきた (Sawada, Ohji, et al Arch Ophthalmol 2007. Miyake, Ohji, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010)。一方で、硝子体内注射された抗 VEGF 薬によっても血中の VEGF の低下も報告され、VEGF がもつ生理的作用の抑制による合併症も危惧されている。しかしながら、その効果は薬剤によっても異なり、その詳細は明らかになっていない。VEGF には選択的スプライシングによりいくつかのアイソフォーム (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> など) があり、それぞれ生理的な作用と病理的な作用の比重が異なっている。さらに最近 VEGF<sub>165</sub> などの VEGF<sub>xxx</sub> 以外に VEGF<sub>165b</sub> などの VEGF<sub>xxx</sub>b があり、VEGF<sub>xxx</sub> は血管新生を促進する方向に作用し、VEGF<sub>xxx</sub>b は抑制する方向に働くことが証明されてきた。VEGF<sub>xxx</sub>b は血管新生抑制作用に加えて、血管内皮の survival factor としての作用も最近報告されており、血管新生が関係する疾患において重要な働きが推定されている。既存の抗 VEGF 薬を用いた治療では新生血管を抑制することはできるものの、VEGF の持つ生理的な作用までも抑制し、種々の血管の合併症が生じている。VEGF<sub>xxx</sub>b を用いることにより VEGF の生理的な作用を維持しながら、VEGF<sub>xxx</sub> の血管新生促進作用を抑制し、血管合併症の少ない治療法が開発される可能性がある。われわれは糖尿病網膜症や加齢黄斑変性 ranibizumab や bevacizumab などの VEGF 全体を抑制する薬剤を硝子体内に投与した後は、眼内の free VEGF が著明に低下することを報告したが、一方で

VEGF<sub>165</sub> を特異的に阻害する pegaptanib sodium を眼内注射した後は眼内の血管新生が抑制されるにもかかわらず、眼内の free VEGF が数倍に増加することを報告した (Sawada, Ohji, et al, RETINA 2009)。pegaptanib sodium は VEGF<sub>165</sub> を阻害するが、VEGF<sub>165b</sub> は阻害しないことが報告されており、我々が報告したこのパラドキシカルな変化もこれで説明できる可能性がある。

VEGF<sub>xxx</sub>b に関する研究は眼科領域では少数の基礎的な報告があるのみで、ヒトを対象とした研究はほとんどなされていない。本研究では、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、加齢黄斑変性などの網脈絡膜疾患症例において眼内に存在する全 VEGF を定量するとともに主たる抑制性の VEGF である VEGF<sub>165b</sub> を定量し、網脈絡膜疾患における血管新生促進性と抑制性の VEGF が果たす役割を解明するとともに、カニクイザルを用いて血管新生抑制性の VEGF の治療薬としての可能性を検討する。

### 2. 研究の目的

血管新生を伴う網膜硝子体疾患の病態に VEGF が大きく関与している。加齢黄斑変性に対して抗 VEGF 薬が承認され、広く用いられるようになってきているが、頻回の硝子体注射自体とそれに起因する合併症が問題となってきている。VEGF の中には血管新生を促進する VEGF<sub>xxx</sub> (VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub> など) と血管新生抑制性の VEGF<sub>xxx</sub>b (VEGF<sub>165b</sub> など) があることが最近判明した。しかしながら網膜硝子体疾患の病態における VEGF<sub>xxx</sub>b の役割はほとんど解明されていない。本研究の目的はカニクイザルと培養細胞を用いて、血管新生を伴う網膜硝子体疾患における VEGF<sub>xxx</sub> の役割を解明するとともに、VEGF<sub>xxx</sub>b の治療薬としての可能性を検討するものである。

さらに現在臨床で用いられている抗 VEGF 薬の硝子体注射時の眼内薬物動態および眼内 VEGF の動態をカニクイザルで検討するとともに、加齢黄斑変性症例においても眼内及び血中における VEGF 動態と検討する。

これらを通じて、抗 VEGF 薬の最適な治療方法の確立を目指すものである。

### 3. 研究の方法

1) カニクイザルの前房水における VEGF と VEGF<sub>165b</sub> の正常値の検討  
全 VEGF の定量に加えて、VEGF<sub>165b</sub> を定量するために、眼疾患を有しないカニクイザルに全身麻酔をかけ、カニクイザルから前房水を採取し、ELISA を用いて VEGF<sub>165b</sub> の濃度を測定する。

2) カニクイザルの前房水における pegaptanib sodium 投与時の全 VEGF と

#### VEGF<sub>165b</sub> の変化の検討

カニクイザル 3 匹の片眼に臨床で通常用いられている投与量の pegaptanib sodium (0.3mg) を硝子体内投与する。投与前、投与翌日、3 日目、1 週目、2 週目、3 週目、4 週目、6 週目、8 週目に投与眼の前房水を採取し、全 VEGF ならびに VEGF<sub>165b</sub> の濃度を測定し、眼内の VEGF の動態を検討する。同時に眼圧上昇や眼内炎を含めた眼内への悪影響の有無を検討するために薬物投与直後、30 分後に眼圧測定と眼底検査を行う。投与後の前房水採取時にも細隙灯顕微鏡検査、眼底検査、眼圧検査を行い、眼内の炎症の有無や眼圧変化について臨床的に検討する。

#### 3) 培養細胞を用いた pegaptanib sodium の VEGF および VEGF<sub>165b</sub> 産生への影響の検討

培養細胞 ARPE65 を用いて抗 VEGF 薬投与後の VEGF アイソフォームの変化を検討した。網膜色素上皮由来の細胞である ARPE65 細胞を培養し、種々の濃度のペガプタニブを添加し、培養後の VEGF アイソフォームの産生量を Western blotting で測定した。

#### 4) 加齢黄斑変性患者における抗 VEGF 薬 (ranibizumab および aflibercept) 投与時の眼内 VEGF 動態およびけ血中 VEGF への影響の検討

加齢黄斑変性患者に抗 VEGF 薬である ranibizumab あるいは aflibercept を硝子体注射する。ranibizumab 投与例では 1 か月毎投与症例と 2 か月毎投与症例において投与直前に前房水を採取し、測定時まで -80 で保存する。また、投与前、投与 1 週後、1 か月後、2 か月後に採血を行い、血漿および血清を測定時まで -80 で保存する。前房水、血漿、血清中の VEGF は ELISA を用いて測定する。

#### 4. 研究成果

##### 1) カニクイザルの前房水における VEGF と VEGF<sub>165b</sub> の正常値の検討

ペガプタニブの投与前には前房水中の総 VEGF 濃度は  $80.5 \pm 15.8$  pg/ml であり、VEGF<sub>165b</sub> の濃度は  $28.7 \pm 20.4$  pg/ml であった。これらの値はヒトで報告されている値に近いものである。

##### 2) カニクイザルの前房水における pegaptanib sodium 投与時の全 VEGF と VEGF<sub>165b</sub> の変化の検討

ペガプタニブの投与前には前房水中の総 VEGF 濃度は  $80.5 \pm 15.8$  pg/ml であり、投与翌日には急激に増加し  $155.9 \pm 76.7$  pg/ml となり、2 週後に最高値  $205.0 \pm 70.7$  pg/ml となった。VEGF<sub>165b</sub> の濃度も同様の变化を示し、ペガプタニブ投与前には  $28.7 \pm 20.4$  pg/ml であり、2 週後に最高値  $60.5 \pm 46.7$  pg/ml に達し、その後減少した。VEGF<sub>121</sub> は投与前、投与後の全期間を通じ

て検出できなかった。今回の観察期間を通じて、著明な眼圧上昇や眼内の炎症などの重篤な合併症はみられなかった。

#### 3) 培養細胞を用いた pegaptanib sodium の VEGF および VEGF<sub>165b</sub> 産生への影響の検討

主たるアイソフォームである VEGF<sub>165</sub> の産生量はペガプタニブ添加で濃度によってもほとんど変化がみられなかった。血管新生抑制性のアイソフォームである VEGF<sub>165b</sub> の産生量はコントロールであるペガプタニブ無添加群と比較し、ペガプタニブ  $1.6 \mu\text{g/ml}$  では変化が認められなかったが、 $4.0 \mu\text{g/ml}$  添加群では VEGF 産生量は約 2 倍となり、その後添加するペガプタニブ濃度が  $160 \mu\text{g/ml}$  まで高くなるにつれて VEGF 産生量は徐々に減少していった。臨床ならびにカニクイザルの実験においてペガプタニブ投与後に VEGF が増加していたのは、低濃度のペガプタニブ投与時の VEGF<sub>165b</sub> アイソフォームの増加による可能性があると考えられた。

#### 4) 加齢黄斑変性患者における抗 VEGF 薬 (ranibizumab および aflibercept) 投与時の眼内 VEGF 動態およびけ血中 VEGF への影響の検討

加齢黄斑変性症例に ranibizumab あるいは aflibercept を 1 か月毎あるいは 2 か月毎の投与し、前房水、血漿、血清中の VEGF 濃度の変化を検討した。ranibizumab 毎月投与例では投与 1 か月後には前房水 VEGF 濃度は 9 例中 8 例で測定感度以下に低下していた。2 か月投与群では投与 2 か月後には前房水 VEGF 濃度は 17 眼中 2 眼で測定感度以下であり、他の 15 眼では測定可能であったが、投与前に比べて減少していた。aflibercept 投与例では前房水中の VEGF は投与 2 か月後においても全例で測定感度以下に抑制されていた。血清中の VEGF は aflibercept 投与症例では、投与前には  $28.3$  pg/ml であったが、投与 1 週後には全例で測定感度以下に低下し、1 か月後には平均  $11.7$  pg/ml に増加したが、投与前に比べ有意に低値であった。投与 2 か月後には  $23.9$  pg/ml に増加し投与前との間に有意差を認めなかった。ranibizumab 投与例では血清中の VEGF は測定期間を通じて変化はなかった。血漿中の VEGF も同様の变化を示し、aflibercept 投与症例では投与前に  $16.2$  pg/ml であったものが、投与 1 週後には測定感度以下に低下し、1 か月後にも有意に低値であり、2 か月後に  $13.6$  pg/ml となり投与前と有意差が無くなった。ranibizumab 投与例では血漿中の VEGF は測定期間を通じて変化はなかった。

#### 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 3 件)

Wang X, Sawada T, Sawada O, Saishin Y, Liu P, Ohji M. Serum and plasma vascular endothelial growth factor concentrations before and after intravitreal injection of aflibercept or ranibizumab for age-related macular degeneration Am J Ophthalmol. 2014 Oct;158(4):738-744. 査読有

Wang X, Sawada O, Miyake T, Kakinoki M, Sawada T, Miyake T, Kawamura H, Saishin Y, Liu P, Ohji M. Aqueous vascular endothelial growth factor and ranibizumab concentrations after monthly and bimonthly intravitreal injections of ranibizumab for age-related macular degeneration Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2014 Jul;252(7):1033-9. 査読有

Fujikawa M, Sawada O, Miyake T, Kakinoki M, Sawada T, Kawamura H, Ohji M. Correlation between vascular endothelial growth factor and nonperfused areas in macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. Clin Ophthalmol. 2013;7:1497-501. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Ohji M Serum vascular endothelial growth factor concentrations before and after intravitreal injection of aflibercept or ranibizumab for age-related macular degeneration. Club Jules Gonin 2014.9-3-6 Zurich, Switzerland

Ohji M Management of diabetic macular edema 19th Congress of Chinese Ophthalmological Society 2014.9.18-19 Xi'an, China

Ohji M Age-related macular degeneration: Optimal regimen of anti-VEGF treatments. 22nd Annual International Wu Ho-Su Memorial Congress - International Symposium of Vitreoretinal Diseases. 2014.8.31 Taipei, Taiwan

Xiying Wang, Tomoko Sawada, Osamu Sawada, Yoshitsugu Saishin, Masahito Ohji Serum and aqueous vascular endothelial growth factor concentration of patients with

age-related macular degeneration after intravitreal injection of aflibercept ARVO 2014/5/3-7 Orlando USA

Xiying Wang, Tomoko Sawada, Masashi Kakinoki, Taichiro Miyake, Osamu Sawada, Hajime Kawamura, Yoshitsugu Saishin, Ping Liu, Masahito Ohji Aqueous Vascular Endothelial Growth Factor and Ranibizumab Concentrations after Monthly and Bimonthly Intravitreal Injections of Ranibizumab for Age-Related Macular Degeneration ARVO 2013.5.5.-5.9, Seattle, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大路 正人 (OHJI Masahito)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90252650

(2) 研究分担者

柿木 雅志 (KAKINOKI Masashi)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80531516