

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592670

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性に対する発症機序に基づく新規薬剤治療と1次予防の開発

研究課題名(英文) Developing a novel treatment and primary prevention for age-related macular degeneration based on disease mechanisms

研究代表者

瓶井 資弘 (Kamei, Motohiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40281125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脈絡膜新生血管(CNV)に対するMCP-1阻害剤による抑制効果を実証した。レーザーCNVモデルに選択的MCP-1阻害剤INCB3344を硝子体腔に注入したところ、14日後にはCNV面積が42%抑制されていた。我々の開発した低照度長期間青色光照射によるCNVモデルでは、硝子体内投与により、70%ものCNV縮小効果が得られた。青色光による網膜光ストレスの評価をおこなった。照射パターンを変化させた結果、隔日もしくは2日おきの照射では、3ヶ月照射しても網膜の組織障害を引き起こすことなく、酸化ストレスのみを誘導することができた。一方、連続照射すると、低照度であっても網膜障害を生じることが判った。

研究成果の概要(英文)：We verified the efficacy of anti-MCP-1 drug to suppress a choroidal neovascularization (CNV). An intravitreal injection of a selective MCP-1 inhibitor, INCB3344, could significantly suppress the CNV area down to 42% in the laser-induced CNV model mouse and 70% in the low-intensity blue light-irradiation-induced CNV model. We evaluated the photo-toxicity by the blue light to the retina. We evaluated various patterns of blue light irradiation cycles. Every 2day- or 3day-cycle irradiations for 3 months induced oxidative stress to the retina without causing any histopathological changes, while a continuous irradiation for 3 months, even a low intensity, caused histological retinal damages.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 青色光 酸化ストレス マクロファージ 酸化リン脂質 脈絡膜新生血管 MCP-1阻害剤

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は先進国における60歳以上の失明原因の第一位であり、本邦でも人口の高齢化、生活習慣の欧米化に伴い、急速に発症頻度が増加している疾患である。統計では、現在本邦における視覚障害原因の第4位を占め、この15年間で最も顕著に増加した疾患(4.9%、9.3%、1.97倍)として挙げられている(厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業、網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究 研究報告書、P99-103、平成20年3月)。病状が進行すれば中心視野が障害され、就労が困難になることも多く、社会的損失が非常に大きい疾患である。近年、光線力学的療法や抗血管内皮細胞増殖因子(VEGF)薬の開発により、病状の悪化をある程度抑制することが可能となった。しかし、これらの治療はあくまで対症療法であり、短期的には効果的であるものの数ヶ月で再発・増悪することが多い。そのため、2-3ヶ月おきにレーザー照射や硝子体注射が必要であり、これは眼内感染症の危険性を伴うのみならず、医療費の増大という社会的問題にもつながっている。変性した網膜に対し、網膜移植および網膜幹細胞移植による視力回復の研究も試みられているが、実用化には未だ遠い状況である。そこで本研究では、上記のような対処療法ではなく、加齢黄斑変性の発症・進展メカニズムに基づいた根治療法の開発、ひいては1次予防法を確立することを長期目標としている。本申請は、平成17年度から科学研究費補助金を得て続けてきた研究である「加齢黄斑変性の病因解明と治療法開発」(H17-18)および「加齢黄斑変性の病態解明 視細胞における脂質酸化とマクロファージの役割」(H19-20)、「加齢黄斑変性の病態解明 光ストレスによる脂質酸化と自然免疫の関与」(H21-23)の研究成果を更に発展させて、病因解明・治療法開発を推し進めるためのものである。

加齢黄斑変性を広義の炎症性疾患としてとらえる考え方は、研究の発展とともに世界的に受け入れられてきている。代表的なものとしては、補体因子HやToll-like receptor 4などの一塩基多型が加齢黄斑変性の発症と有意に相関するというものが挙げられる(Science 2005, Proc Natl Acad Sci USA 2005)。われわれはこれまでに、加齢黄斑変性集積しているマクロファージが酸化リン脂質を認識するスカベンジャーレセプターを発現していること(Kamei et al, Invest Ophthalmol Vis Sci

2007)、網膜内の酸化リン脂質量が年齢とともに増加しており、加齢黄斑変性眼では年齢をマッチさせた正常眼に比べ有意な増加が見られること(Suzuki et al, Molecular Vision, 2007)を報告した。さらに、光照射により網膜内のリン脂質が酸化され、MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)の発現誘導を介して、マクロファージの集積が見られることを見出し、網膜下酸化リン脂質投与による脈絡膜新生血管の誘導に成功した。酸化されていないリン脂質の投与や、MCP-1あるいはそのレセプターであるCCR-2のノックアウトマウスへの投与では、脈絡膜新生血管は生じなかったことより、酸化リン脂質がMCP-1の発現を介してマクロファージ集積、脈絡膜新生血管を誘導している可能性を示唆できた。さらに、低照度長期間(4-6ヶ月)光照射により、実際のヒトの病態に類似した加齢黄斑変性動物モデルを確立した(現在 revise 中)。このような成果から、光酸化ストレス リン脂質酸化 MCP-1上昇 マクロファージ誘導 VEGF 等分泌 加齢黄斑変性発症(滲出型)と言う機序が存在する可能性を示し、酸化ストレスや慢性の炎症反応の抑制が、根治療法につながると考える。その一つとして本研究課題で検討するMCP-1を標的にした加齢黄斑変性治療は、従来の抗VEGF療法よりも疾患メカニズムの上流をターゲットした、より根本的な治療法であると考えられる。

一方、標的遺伝子のmRNAに特異的なオリゴヌクレオチドを細胞へ投与し、当該遺伝子の発現のみを特異的に抑制しうるアンチセンス法は、新しい疾病の治療法として非常に注目を集めている(核酸医薬)しかし、現在広く用いられているアンチセンス分子は体内で分解されやすく、標的mRNAに対する結合親和性が十分でない、タンパク質との非特異的相互作用が見られる等の問題を抱えている。近年、小比賀らは従来のアンチセンスやsiRNAよりも酵素耐性が高く、体内で分解されにくく、標的RNAとの結合親和性が顕著に高く強力な効果を発揮する、新規構造の生合成(2',4'-BNA/LNA)を開発した(Obika et al, Tetrahedron Lett., 1997)。この系をMCP-1標的治療に用いることにより、発症後の病変治療のみならず、点眼による慢性炎症抑制が可能となれば、一次予防まで実現に向けた全く新しい加齢黄斑変性治療薬を開発できる可能性があると考えられる。

さらに、加齢黄斑変性に対するサプリメント摂取は2次予防効果(初期病変から進行病変への抑制)が証明されたが、1次予防としての有効性は示されなかった

(Arch Ophthalmol. 2008) 現在1次予防法としては疫学調査の結果から禁煙や緑黄色野菜・3脂肪酸の摂取などが推測されている。これらはいずれも抗酸化力の増強・低下抑制に基づく効果を期待していると考えられるが、我々のこれまでの研究成果からは、光(特に短波長光)による酸化ストレスを軽減することが、抗酸化力増強の更に上流の1次予防法となる可能性が示唆される。短波長光遮光は急性網膜光障害に対して有効であることが示されてきたが(J Cataract Refract Surg. 2006, Exp Eye Res. 2006, Mol Vis. 2009) 慢性の光酸化ストレス、加齢黄斑変性への影響に関しては報告がない。そこで、我々が開発した低照度長期照射マウスモデルを応用し、網膜障害が強いとされる短波長光のみを選択的に遮光することで、加齢黄斑変性病変の抑制効果があるかを検討する着想に至った。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性の2次予防に加え、光ストレスを抑制することやMCP-1を阻害する薬剤により、1次予防の確立を目指す。また、1次予防は発症前から開始し、長期間を経て初めて効果があると考えられるので、30歳代、40歳代での介入開始が必要である。その適応を見いだすため、加齢黄斑変性発症のハイリスク因子・バイオマーカーを探索する。

3. 研究の方法

(1) MCP-1阻害剤を用い、脈絡膜新生血管を抑制できるかを検討する。急性期モデルであるレーザー誘導脈絡膜新生血管に対する発生抑制効果と、ヒト加齢黄斑変性に近い動物モデルである長期低照度青色光照射により既に発症している脈絡膜新生血管の退縮効果の2項目を検討する。更に、その奏功機序を、細胞レベル・分子レベルで明らかにする。最終的に臨床応用にまで持ち込むため、硝子体内投与における安全閾値・毒性閾値を検出するとともに、眼内における薬物動態を明らかにする。

(2) 低分子量の核酸医薬として、MCP-1を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発を行う。MCP-1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを複数作成し、その薬理学的性能をin vitro/in vivoで検討する。上記MCP-1阻害剤の評

価と同様に、急性期モデルであるレーザー誘導脈絡膜新生血管、および、慢性期の低照度光長期照射モデルにおいて、新生血管発生抑制効果と退縮効果の2面から有効性を検討する。

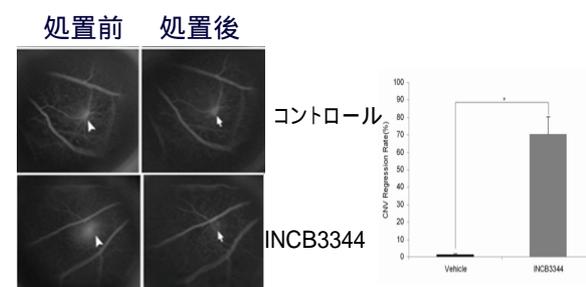
(3) 短波長光選択的遮光により、酸化ストレス・炎症反応が抑制できるか、ひいては、加齢黄斑変性初期病変を抑制ができるかを、低照度光長期照射マウスモデルを応用して検討する。

1次予防の適応決定のため、患者および対照群の血清検体を集積し、酸化ストレスや炎症に関連した加齢黄斑変性発症ハイリスク因子・バイオマーカーを検索して、候補を絞る。

4. 研究成果

(1) MCP-1阻害剤の脈絡膜新生血管(CNV)に対する抑制効果の検討をおこなった。マウスを用い、レーザーCNVモデルを作成した。レーザー照射直後に選択的MCP-1阻害剤INCB3344をマウス硝子体腔に注入した(Day 0)。Day 14にCNV面積を評価したところ、薬剤投与眼で対照眼に比べ42%抑制されていた。

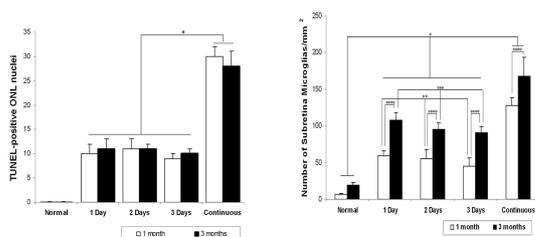
(2) 既に完成したCNVに対する退縮効果について検討した。低照度長期間青色光照射によりCNVを誘導したマウスの硝子体内に薬剤を投与し、2週間後に蛍光眼底造影を用いてCNVサイズを投与前と比較した。その結果、CNVのサイズは、対照群では変化なかった(2%)が、薬剤投与群では有意な縮小(70%)が認められた。



(3) MCP-1阻害剤の脈絡膜新生血管(CNV)に対する抑制メカニズムの解析をおこなった。Day 3の時点で、マクロファージの浸潤を免疫染色とFACSで評価し、VEGFの発現を定量した。その結果、薬剤投与によりレーザー照射部位へのマクロファージ浸潤は有意に抑えられ、VEGFは組織中の蛋白量とmRNA発現が有意に抑制されていた。

(4) 短波長光照射による網膜細胞応答に関して、刺激パターンの違いによる応答の違いを検討した。隔日、2日毎、3日毎の照射では

3ヶ月照射しても網膜の組織障害を引き起こすことなく、酸化ストレスのみを誘導することができた。マイクログリアの活性化などの細胞応答に関して、3者の間に有意差は認めなかった。一方、連続照射すると、低照度であっても網膜障害を生じることが判った。また、マイクログリアの活性化も不連続照射に比べて、有意に亢進していた。



(5) MCP-1 遺伝子のアンチセンスオリゴを4種類作成した。抑制効果を評価しようと試みたが、細胞への遺伝子導入効率が悪く、改良を重ねた。しかし、十分な成果を得るには至らなかった。

(6) ハイリスク因子検索のための血液検体採取を行ったが、解析には至っていない。

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 11 件)

Sakimoto S, Kamei M, Suzuki M, Yano S, Matsumura N, Sakaguchi H, Gomi F, Nishida K. Relationship between grades of macular perfusion and foveal thickness in branch retinal vein occlusion. Clin Ophthalmol. 7:39-45, 2013.

Sakimoto S, Kidoya H, Kamei M, Naito H, Yamakawa D, Sakaguchi H, Wakabayashi T, Nishida K, Takakura N. An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization. PLoS One. 8(3):e58096, 2013.

Yamane S, Kamei M, Sakimoto S, Inoue M, Arakawa A, Suzuki M, Matsumura N, Kadonosono K. Matched control study of visual outcomes after arteriovenous sheathotomy for branch retinal vein occlusion. Clin Ophthalmol. 8:471-6, 2014.

Kamei M, Matsumura N, Suzuki M,

Sakimoto S, Sakaguchi H, Nishida K. Reperfusion of large ischemic areas associated with central retinal vein occlusion: a potential novel treatment with activated protein C. JAMA Ophthalmol. 132(3):361-2, 2014.

Sakimoto S, Sakaguchi H, Ohji M, Gomi F, Ikuno Y, Fujikado T, Kamei M, Nishida K. Consecutive case series with long-term follow-up of full macular translocation for myopic choroidal neovascularisation. Br J Ophthalmol. 98(9):1221-5, 2014.

Sakimoto S, Kamei M, Sakaguchi H, Suzuki M, Matsumura N, Nishida K, Nishida K. Direct photocoagulation to leakage points to treat chronic macular edema associated with branch retinal vein occlusion: a pilot study. Clin Ophthalmol. 8:2055-60, 2014.

Kamei M, Nishida K. Reply to "Reperfusion of areas of ischemia in central retinal vein occlusion. JAMA Ophthalmol. 133(2):228-9, 2015.

Sakimoto S, Gomi F, Sakaguchi H, Akiba M, Kamei M, Nishida K. Analysis of retinal nonperfusion using depth-integrated optical coherence tomography images in eyes with branch retinal vein occlusion. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56(1):640-6, 2015.

[学会発表](計 4 件)

Kamei M. Low-Dose Lipopolysaccharide Pretreatment Suppresses Choroidal Neovascularization, World Ophthalmology Congress 2012, Abu Dhabi, UAE

Kamei M. MCP-1 (Ccl-2) as a Therapeutic Target for AMD, The 27th APAO Congress, Busan, 2012

Kamei M. et al: Efficacy of a CCR2 Antagonist for Treating Choroidal Neovascularization, The 2012 ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA,

2012

Kamei M. Photo-oxidative stress induced chronic inflammation as a causal factor of Age-related Macular Degeneration.

Kamei, M, 1st International Symposium of Blue Light Society, Tokyo, 2013

Kamei M. Blue light stress and retinal responses. Kamei, M. Plenary Session: Recent Advances in Retinal Basic Research, 2015 Asia-ARVO, Yokohama, Japan, Feb. 17, 2015.

Kamei M. Blue light induced chronic inflammation as a causative factor for age-related macular degeneration.

Kamei, M. SIG: "The Aging Eye: Blue Light Matters as a Camera and a Clock!" ARVO 2015, Denver, CO, USA, May. 5, 2015.

(4)研究協力者
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

瓶井 資弘 (KAMEI MOTOHIRO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40281125

(2)研究分担者

鈴木三保子 (SUZUKI MIHOKO)

大阪大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：40611166

松村永和 (MATSUMURA NAGAKAZU)

大阪大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：40611174

辻川 元一 (TSUJIKAWA MOTOKAZU)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70419472

小比賀 聡 (OBIKA SATOSHI)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：80243252

五味 文 (GOMI FUMI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80335364

坂口 裕和 (SAKAGUCHI HIROKAZU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80379172

(3)連携研究者

なし