

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2017
課題番号：15K15637
研究課題名(和文)眼科セラノスティクス(theranostics)の研究

研究課題名(英文)Study of ophthalmic theranostics

研究代表者

坂本 泰二(SAKAMOTO, Taiji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：10235179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：極性細胞を用いた透過性モデルの作成に成功した(PLoS One, 2013)。この系により、網膜色素上皮(RPE)細胞は極性を持たせることで、VEGFの極性分泌能を獲得するを証明した。次に、現在臨床で用いられている薬物が、RPEをどのように透過するかメカニズムを検討した。予想としては、paracellular/intracellular pathwayが考えられるが、特にFc receptorを介した、endocytosisに着目した。endocytosis抑制薬物を投与することで、抗VEGF薬のRPE層の透過性を抑制した。このことから抗VEGF薬の臨床作用の違いを証明することができた。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in creating a permeability model using polar cells. This system proved that retinal pigment epithelium (RPE) cells acquire polar secretion ability of VEGF by having polarity. Next, we examined the mechanism of how drugs currently used clinically permeate RPE. As a prediction, a paracellular / intracellular pathway can be considered, but focusing on endocytosis, in particular via Fc receptor. By administering an endocytosis inhibiting drug, the permeability of the RPE layer of the anti-VEGF drug was suppressed. From this, it was possible to demonstrate the difference in clinical action of anti-VEGF drugs.

研究分野：網膜疾患

キーワード：網膜 サイトカイン 眼球

1. 研究開始当初の背景

医学の進歩にもかかわらず、失明患者は少なくない。直接生命に関係がなくても、労働や生活に支障をきたすことによる社会経済的遺失は小さくない。

わが国の中途失明の主原因である糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などは、主に感覚網膜が障害されることが原因と考えられて、多くの研究がなされてきた。このことは真実であり、最近の治療法の進歩により、感覚網膜の保護あるいは障害防止が可能になった。しかし、その治療にも関わらず、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) が障害されて、続発的に感覚網膜も機能障害に陥り、長期的には視力不良になるケースが増えている。つまり、これらの疾患の治療を長期的に成功させるには、感覚網膜のみならず、RPE 細胞も治療する必要があることがわかってきた。特に長寿社会においては、長期的に治療効果を得る戦略が必要である。

RPE 細胞は感覚網膜と毛細血管層の間に存在する上皮細胞で、栄養因子の分泌、古くなった視細胞外節の貪食など視機能に重要な働きがある。RPE 細胞の機能低下は栄養因子の不足、貪食しきれない排泄物による炎症の惹起など、炎症や浮腫の遷延化など視機能の悪化に直結している。つまり、網膜疾患の治療には、RPE を長く健康な状態で維持することが非常に重要である。

我々は、従来培養が困難であった分化した RPE (極性 RPE) を培養することに成功した。さらに、ヒト極性 RPE と未分化の (病的な) 細胞モデルである非極性 RPE 細胞のそれぞれで発現する分子をマイクロアレイで解析し、その一部を報告した。驚くことに、極性 RPE にだけ高発現している分子の中には、既に臨床で頻用されているものがあつた。

一方、我々は超音波バブルによる眼内局所薬物投与に成功している (坂本、園田、特許取得済)。この優位点は、物質をナノサイズのバブルに封入可能になっただけでなく、表面をリガンドで修飾することである。この方法を用いれば、画像の形態診断だけでなくその性状をも知ることができる。さらに、このバブルに治療薬などを封入することにより、画像上で病変の性状を確認しつつ、治療を行うことができる。これは、近年急速に広がる診断と治療の融合という新概念「セラノスティクス (theranostics)」にほかならない。

2. 研究の目的

神経網膜から、RPE を経て脈絡膜に至る組織は、脈絡膜血管新生の発生母地であるが、生体下で観察することが困難である。一方、実験動物を用いても、そこをモニターするこ

とは事実上不可能である。

そこで、微小眼内環境を再現するために in vitro 環境を確立する。その際に各種薬物が環境に及ぼす影響及びメカニズムを探索する。そこで明らかになったメカニズムを用いた新しい治療法を開発する。

人の眼内環境の変化を非侵襲的にモニターする方法を開発する。

3. 研究の方法

培養皿の上室と下室を持つ 2 chamber システムを用いて、網膜色素上皮の上面と下面の状況を再現した。上下の Chamber の境界には、有孔膜を置いて、そこで分化の進んだ網膜色素上皮細胞 (RPE) を培養する。RPE 細胞の分化については、我々が開発した方法を用いた。その特徴は以下の様である (図 1)。

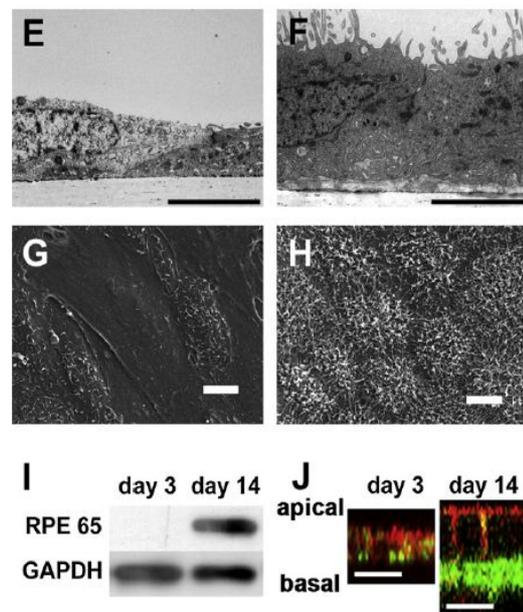


図 1 実験で用いた分化した RPE 細胞。細胞表面に多数の cilia があることが分かる。

そして、chamber に各種抗 VEGF 薬を投与した。その際の、下 chamber の薬剤濃度と、VEGF 薬の濃度、および VEGF 自体の濃度、生物学的活性を調べた。さらには、各種シグナル伝達経路防止剤を投与することで、この作用のメカニズム解明を試みた。

4. 研究成果

RPE は分化するにしたがって、細胞層の抵抗が上昇した (図 2)。それは、電気抵抗値の上昇、トレーサーの細胞層透過性でも示された。

重要なことは、RPE 細胞からの V 血管内皮増殖因子 (VEGF) の分泌が上昇しただけでなく、基底側への分泌 (極性分泌) が増加したことである (図 3)

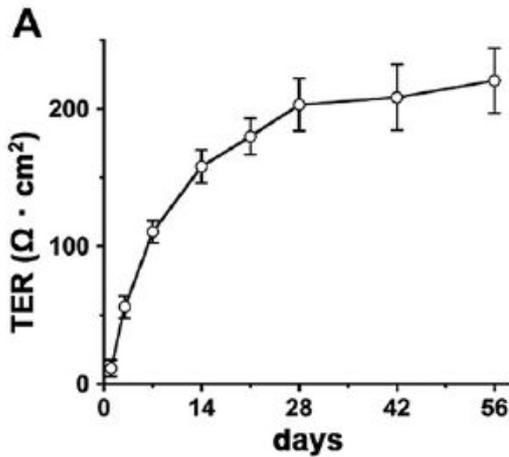


図2 RPE 細胞層を通した電気抵抗値。培養が進み、分化が進むにつれて、電気抵抗値が上がる。つまり、バリアー機能が獲得されていると言える。

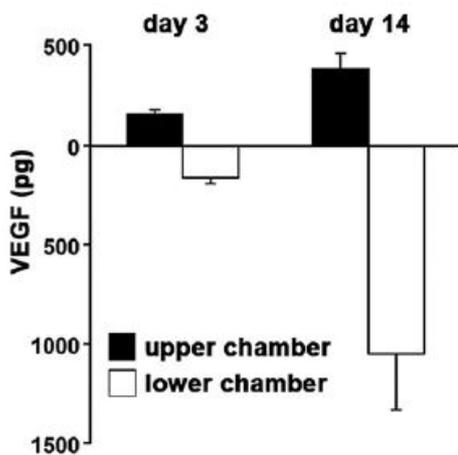


図3 RPE 細胞による VEGF 分泌。分化が進んだ 14 日後には、全体として VEGF 分泌量が増加しただけでなく下 chamber への分泌が増加していた。これは、生体下の RPE の極性分泌を良く表したものである。

これらの RPE の神経網膜側、つまりは apical side に薬物を添加して、その後の薬物の変化を調べた。なお、薬物投与により、RPE 細胞に明らかな変化は見られなかった。

RPE を介した薬物送達には活発に行われており、分子レベルでは ranibizumab > aflibercept > bavadizumab の順に透過性が良いことが分かった (図 4)。しかし、VEGF の生物活性を抑制する力は、aflibercept が最も強力であった。RPE を通した薬物の移動は、眼局所治療のために行った薬物硝子体投与が全身に影響を及ぼすメカニズムを始めて示したものである。

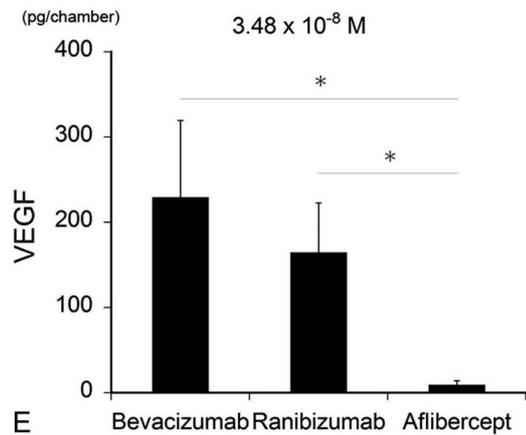


図4 chamber 下側の培養液の VEGF 量。aflibercept 投与をしたものが一番 VEGF 量が抑制されている。

このことは、functionla bioassay でも同様のことが示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 86 件)

1. Sainohira M, Yamashita T, Terasaki H, Sonoda S, Miyata K, Murakami Y, Ikeda Y, Morimoto T, Endo T, Fujikado T, Kamo J, Sakamoto T. Quantitative analyses of factors related to anxiety and depression in patients with retinitis pigmentosa. PLoS One. 2018 Apr 23;13(4):e0195983. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0195983. e
2. Yamashita T, Sakamoto T, et al; writing committee of Japan-Clinical Retina Research Team (J-CREST). Best surgical technique and outcomes for large macular holes: retrospective multicentre study in Japan. Acta Ophthalmol. 2018 Apr 19. 査読有 doi: 10.1111/aos.13795.
3. Shiihara H, Terasaki H, Sonoda S, Kakiuchi K, Sakamoto T. Evaluation of shape of foveal avascular zone by optical coherence tomography angiography in eyes with branch retinal vein occlusion J Vit Ret Dis (in press 2018 Mar 23) 査読有
4. Yamashita T, Terasaki H, Yoshihara N, Kii Y, Uchino E, Sakamoto T. Relationship between retinal artery trajectory and axial length in Japanese school students. Jpn J Ophthalmol. 2018 Feb 13. 査読有 doi: 10.1007/s10384-018-0572-y.
5. Sonoda S, Sakamoto T, Kakiuchi N, Shihara H, Sakoguchi H, Tomita T, Yamashita T, Uchino E. Semi-automated software to measure luminal and stromal areas of choroid on optical coherence

- tomographic images. *Jpn J Ophthalmol.* 2018 Mar;62(2):179-185. 査読有
doi: 10.1007/s10384-017-0558-1. Epub 2017 Dec 21.
- 6 . Yamashita T, Sakamoto T, et al. Correlations between local peripapillary choroidal thickness and axial length, optic disc tilt, and papillo-macular position in young healthy eyes. *PLoS One.* 2017 Oct 12;12(10):e0186453. 査読有
- 7 . Shiihara H, Sakamoto T, et al. Effect of fluid-air exchange on reducing residual silicone oil after silicone oil removal. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017 Sep. 査読有
doi:10.1007/s00417-017-3701-2.
- 8 . Shiihara H, Sakamoto T, et al. Reproducibility and differences in area of foveal avascular zone measured by three different optical coherence tomographic angiography instruments. *Sci Rep.* 2017 Aug 29;7(1):9853. 査読有
doi: 10.1038/s41598-017-09255-5.
- 9 . Terasaki H, Yamashita T, Yoshihara N, Kii Y, Sakamoto T. Association of lifestyle and body structure to ocular axial length in Japanese elementary school children. *BMC Ophthalmol.* 2017 Jul 12;17(1):123. 査読有
doi: 10.1186/s12886-017-0519-y.
- 10 . Nakao K, Abematsu N, Sakamoto T. Systemic diseases in patients with HTLV-1-associated uveitis. *Br J Ophthalmol.* 2017 Jul 8. pii: bjophthalmol-2017310658. 査読有
doi:10.1136/bjophthalmol-2017-310658.
- 11 . Yamashita T, Sakamoto T, et al. Correlations between retinal nerve fiber layer thickness and axial length, peripapillary retinal tilt, optic disc size, and retinal artery position in healthy eyes. *J Glaucoma.* 2017 Jan;26(1):34-40. 査読有
doi: 10.1097/IJG.0000000000000550.
- 12 . Kawano H, Sonoda S, Saito S, Terasaki H, Sakamoto T. Choroidal structure altered by degeneration of retina in eyes with retinitis pigmentosa. *Retina.* 2017 Jan 16. 査読有
doi: 10.1097/IAE.0000000000001465.
- 13 . Yoshihara N, Terasaki H, Shirasawa M, Kawano K, Sonoda S, Hisatomi S, Ishibashi T, Sakamoto T. Permeability and anti-VEGF effect of bevacizumab, ranibizumab and aflibercept in polarized retinal pigment epithelial layer *in vitro*. *Retina.* 2017 Jan;37(1):179-190. 査読有
doi: 10.1097/IAE.0000000000001117.
- 14 . Nakazawa M, Terasaki H, Yamashita T, Uemura A, Sakamoto T. Changes of visual field defects during ten year follow-up after indocyanine green-assisted macular hole surgery. *Jpn J Ophthalmol* 2016 60(5), 383-387 査読有
doi:10.1007/s10384-016-0453-1.
- 15 . Sonoda S, Sakamoto T, et al. Structural changes of inner and outer choroid in central serous chorioretinopathy determined by optical coherence tomography. *PLoS One.* 2016 Jun 15;11(6):e0157190. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0157190.
- 16 . Terasaki H, Yamashita T, Yoshihara N, Kii Y, Tanaka M, Nakao K, Sakamoto T. Location of Tessellations in Ocular Fundus and Their Associations with Optic Disc Tilt, Optic Disc Area, and Axial Length in Young Healthy Eyes. *PLoS One.* 2016 Jun 8;11(6):e0156842. 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0156842. eCollection 2016
- 17 . Kawano H, Sonoda S, Yamashita T, Maruko I, Iida T, Sakamoto T. Relative changes in luminal and stromal areas of choroid determined by binarization of EDI-OCT images in eyes with Vogt-Koyanagi-Harada disease after treatment *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2016 Mar;254(3):421-6 査読有
- 18 . Shiihara H, Terasaki H, Yoshihara N, Yamashita T, Sakamoto T. Amount of residual silicone oil in vitreous cavity is significantly correlated with axial length. *Retina.* 2016 Jan;36(1):181-7. 査読有
- 19 . Terasaki H, Sakamoto T, et al. Penetration of bevacizumab and ranibizumab through retinal pigment epithelial layer *in vitro*. *Retina.* 2015 May;35(5):1007-15. 査読有
- 20 . Yoshihara N, Sakamoto T, Y. Wider retinal artery trajectories in eyes with macular hole than in fellow eyes of patients with unilateral idiopathic macular hole. *PLoS One.* 2015 Apr 13;10(4):e0122876. 査読有
- 21 . Yamashita T, Sakamoto T, et al. Circumpapillary course of retinal pigment epithelium can be fit to sine wave and amplitude of sine wave is significantly correlated with ovality ratio of optic disc. *PLoS One.* 2015 Apr 7;10(4):e0122191 査読有

〔学会発表〕(計 60 件)

〔図書〕(計 6 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称： 画像処理装置、画像処理方法、診断システム及びプログラム

発明者：坂本泰二、園田祥三

権利者：鹿児島大学

種類：特許

基礎出願番号：特願 2015-201495

出願日：2015年10月16日

国内外の別：国際特許

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~op/info_detail.php?no=41

<https://www.facebook.com/ganka.kagoshima>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 泰二 (SAKAMOTO Taiji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：10235179

(2)研究分担者

園田 祥三 (SONODA Shozo)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：20325806

(3)連携研究者

丸山 一雄 (MARUYAMA Kazuo)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：30130040

立花 克郎 (TACHIBANA Katsurou)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605