

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(c)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592032  
 研究課題名（和文） 血管分子細胞学的アプローチによる黄斑部特殊性の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of the pathogenesis of avascularity in the macula via vascular- and molecular-biological approach  
 研究代表者  
 野崎 実穂 (NOZAKI MIHO)  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
 研究者番号：00295601

研究成果の概要：なぜ加齢黄斑変性は黄斑部にのみ脈絡膜新生血管が発生するのか？なぜ黄斑部（中心窩）は無血管なのか？血管新生内皮増殖因子(VEGF-A)を血管新生促進あるいは抑制に働かせるスイッチの働きを持つ SPARC に着目し、マウスレーザー誘導実験的脈絡膜新生血管モデルを用いて検討した。レーザー照射後、SPARC の投与により、血管新生は有意に促進され、黄斑部における血管新生促進作用に SPARC が関与しており、今後加齢黄斑変性の治療ターゲットになりうると思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：加齢黄斑変性、脈絡膜新生血管、VEGF-A、SPARC

## 1. 研究開始当初の背景

(1)なぜ、加齢黄斑変性(Age-related macular degeneration: AMD)は黄斑部にのみ発症するのか？なぜ、黄斑部-中心窩-は無血管なのか？この謎は解明されていない。そして、この謎が解明されれば、現在中途失明の原因の上位となっているAMDの発症機序の解明、治療法の確立への大きなブレークスルーになると考えられる。

AMDをはじめとする脈絡膜新生血管は、現在欧米における失明の主原因となっており、本邦においても患者数は増加の一途を辿っている。その治療法として、光線力学療法、ステロイド局所投与、抗血管内皮細胞増殖因

子(VEGF-A)の硝子体内投与などが治療法として試みられているが、どの治療法も再発するため反復治療が必要という問題がある。光線力学療法では、専用のレーザーでの照射の繰り返し、ステロイドや抗VEGF-A因子の投与では、反復する硝子体注射が必要で、患者自身の苦痛の他に、白内障、網膜剥離、硝子体出血、眼内炎といった合併症の危険性が増す。また、これらの治療の効果は、視力を維持することであり、発症以前の視力まで改善させることは困難である。

AMDをはじめとする脈絡膜新生血管の視力予後が悪いこと、また治療を困難にしている

最大の理由は、脈絡膜新生血管は黄斑部—中心窩を含む領域—にのみ発生するという特徴である。黄斑部には視細胞が最も多くあり、レーザー凝固や手術の侵襲により、視細胞自体が傷害され不可逆性の変化をきたす恐れがあるため、治療法が限定されてしまう。また、脈絡膜新生血管が生じる部位が黄斑部で、正常でも視機能を高めるために毛細血管さえ存在しない無血管帯にあるため、たとえ微小の新生血管があっても、その視力に与える影響は大きいことも問題である。黄斑部にのみ脈絡膜新生血管が生じる原因として、紫外線による黄斑部光障害というのが通説ではある。しかし、紫外線は黄斑部以外の網膜にも入ってきており、紫外線だけでは説明はつかない。また網膜移動術で中心窩の位置を移動させても、新たな中心窩に脈絡膜新生血管が生じることから、感覚網膜から何らかの絡膜新生血管を誘導させる因子が出ている可能性も示唆された。

(2) 代表研究者らは、角膜が、VEGF-A が存在するにもかかわらず無血管を維持しているのは、可溶性 VEGF-R1 (soluble flt-1: sflt-1) が存在しているからということを示した (Ambati BK, et al: *Nature*, in press, 2006)。さらに、マウス網膜において、VEGF-A が細胞外マトリックス SPARC によって VEGFR-1 を介する抗血管新生作用あるいは VEGFR-2 を介する血管新生促進作用への誘導をコントロールされていることも報告した (Nozaki M, et al: *J Clin Invest*, 2006)。興味深いことに、SPARC はサル網膜においては、黄斑部網膜に多量に存在するものの、周辺部網膜にはほとんど存在していないと報告されている (Rodriguez IR, et al: *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000)。また、実験的に脈絡膜新生血管モデルとして、レーザーにより脈絡膜を過凝固し新生血管を発生させる方法が、マウスを初めラット、サルで一般的に用いられているが、黄斑部を持つ実験動物はサルだけである。そして、サルの黄斑部以外の周辺部網膜に高エネルギーのレーザー光凝固を行っても、黄斑部網膜にしか実験的脈絡膜新生血管が発生しないということも報告されている (Shen YW, et al: *Arch Ophthalmol*, 2004)。

(3) 我々は、この 2 つのことから黄斑部にある SPARC が VEGFR-2 の血管新生作用を促進させていて脈絡膜新生血管が形成され、周辺部網膜には SPARC がないことから VEGFR-1 による抗血管新生作用が働き、脈絡膜新生血管が形成されないのではないかと推察した。この、黄斑部にのみ脈絡膜新生血管が発生するメカニズムを明らかにすることで、黄斑部に脈絡膜新生血管を発生させない新たな治療法を見出すことができると考えた。

## 2. 研究の目的

なぜ、加齢黄斑変性 (AMD) は黄斑部にのみ発症するのか？なぜ、黄斑部—中心窩—は無血管なのか？この謎を解明し、現在中途失明の原因の上位となっている AMD の発症機序の解明、治療法の確立への大きなブレークスルーになると考え、マウス脈絡膜新生血管モデルを用い、SPARC の関与について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) レーザー誘導実験的脈絡膜新生血管作成 C57BL/6 マウスに、レーザー照射を行い、実験的脈絡膜新生血管を作成、7 日目に眼球を摘出、4%パラホルムアルデヒドで固定し、網膜色素上皮—脈絡膜—強膜フラットマウントを作成、FITC で標識されたレクチンで免疫染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡を用いて、脈絡膜新生血管の容積を測定した。(図 1)

### (2) 硝子体内投与

レーザー直後、マウス硝子体腔内に、33G シリンジを用いて、Recombinant SPARC (osteonectin) 100ng および 300ng を投与した。対照には PBS を投与した。

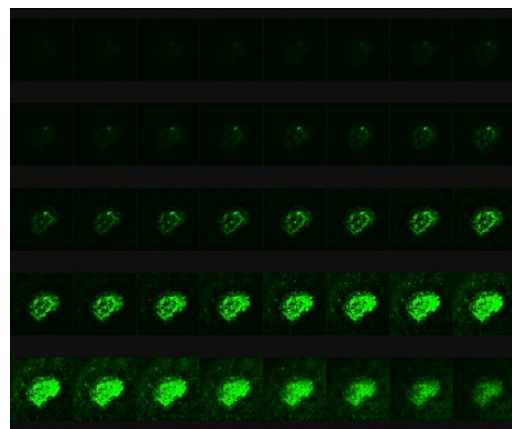


図 1 FITC-レクチンで染色した脈絡膜新生血管

## 管連続撮影像

### 4. 研究成果

(1) C57BL/6 マウスに、レーザー照射を行い、実験的脈絡膜新生血管を作成、7 日目に眼球を摘出、4%パラホルムアルデヒドで固定し、網膜色素上皮-脈絡膜-強膜フラットマウントを作成、FITC で標識されたレクチンで免疫染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡を用いて、脈絡膜新生血管の容積を測定した。

(2) Recombinant SPARC (osteonectin) 100ng および 300ng をレーザー照射翌日にマウスの硝子体腔内に注入し、7 日目に眼球を摘出し脈絡膜新生血管の容積を測定した。対象は PBS を硝子体腔内に注入した。

(3) 脈絡膜新生血管容積は、レーザー照射のみの群は  $523542 \pm 50282 \mu\text{m}^3$ 、PBS 注入群は  $487132 \pm 31331 \mu\text{m}^3$ 、Recombinant SPARC 100ng 注入群は  $506902 \pm 25137 \mu\text{m}^3$ 、recombinant SPARC 300ng 注入群  $854700 \pm 176922 \mu\text{m}^3$  で、SPARC 300ng 注入群で有意に脈絡膜新生血管容積が増大した ( $p < 0.05$ )。 (図 2)

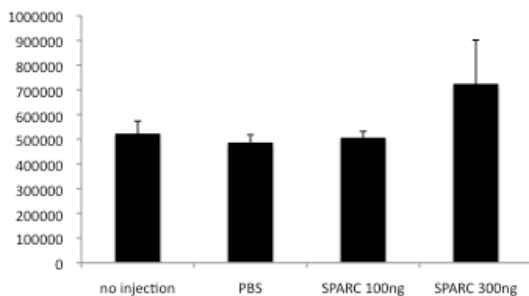


図 2 脈絡膜新生血管容積 ( $\mu\text{m}^3$ )  
SPARC300ng 投与群で有意に増大している  
(\* $P < 0.05$ )

(4) ヒトと同様に黄斑部をもっているサル網膜では、周辺網膜ではほとんど SPARC が認められないが、黄斑部に SPARC が認められるという報告がある。(Rodríguez IR, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000)  
SPARC は VEGF receptor-1 と結合し、VEGF receptor-2 の働きを増強させるという報告もあり (Kupprion C, et al. J Biol Chem. 1998)、今回のマウス脈絡膜新生血管の研究結果から、ヒト黄斑部において SPARC が

VEGF-A と親和性が高く、血管新生抑制作用のある VEGF receptor-1 と結合することにより、血管新生作用の強い VEGF receptor-2 が作用し、血管新生を促進させている可能性が考えられた。今後 SPARC が加齢黄斑変性の治療のターゲットになりうると思われた。

### 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 4 件)

- ① Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJ, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, Appukuttan B, Gibbs D, Yang Z, Karikó K, Ambati BK, Wilgus TA, DiPietro LA, Sakurai E, Zhang K, Smith JR, Taylor EW, Ambati J, Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*. 3;452(7187):591-597, 2008 査読有り
- ② Raisler BJ, Nozaki M, Baffi J, Hauswirth WW, Ambati J, Toward a higher fidelity model of AMD. *Adv Exp Med Biol*. 613:185-192. 2008, 査読無し
- ③ Itaya M, Sakurai E, Nozaki M, Yamada K, Yamasaki S, Asai K, Ogura Y, Upregulation of VEGF in murine retina via monocyte recruitment after retinal scatter laser photocoagulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48(12): 5677-5683, 2007 査読有り
- ④ Hirata M, Nozaki M, Ozeki H, Hirata F, Ogura Y, A case of adult limbal xanthogranuloma. *Jpn J Ophthalmol*. 51(4):302-304, 2007 査読有り

[学会発表] 計 ( 4 ) 件

- ① 野崎実穂、Non-targeted siRNA suppresses laser-induced choroidal neovascularization、第 34 回日本微小循環学会、2009 年 2 月 21 日、東京、日本
- ② M. Nozaki, Long-Term Results of Surgical Removal of Choroidal Neovascularization-Series of a Single Surgeon in 10 Years. WOC、2008 年 6 月 28 日-7 月 2 日、香港、中国
- ③ M. Nozaki, Targeted and Non-Targeted

Small Interfering RNAs Equally Suppress  
Choroidal Neovascularization Through  
Activation of Toll-Like Receptor 3.  
Euretina, 2008 年 5 月、ウィーン、オースト  
リア

- ④ 野崎実穂、CCR3 阻害による脈絡膜新生血  
管抑制、日本眼循環学会、2007 年 7 月、  
香川、日本
- ⑤ R. Albuquerque , M. Nozaki, et al., Topical  
gene ablation of sflt-1 abolishes corneal  
avascularity. ARVO, 2007 年 5 月、フォート  
ローダーデール、米国

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野崎 実穂 (NOZAKI MIHO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00295601

### (2) 研究分担者

小椋 祐一郎 (OGURA YUICHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70191963

櫻井 英二 (SAKURAI EIJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30305528

安川 力 (YASUKAWA TSUTOMU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00324632