

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09931

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性(AMD)患者のアンメットニーズに応える新たな抗線維化治療

研究課題名(英文) Inhibition and treatment for subretinal fibrosis that occurs severe visual impairment in patients with age-related macular degeneration

研究代表者

塩瀬 聡美 (Shiose, Satomi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90644758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)のレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルマウスを用い、細胞外マトリックス agrin の関与を確認したところ、網膜下線維化(SRF)の障害を受けたRPE細胞を中心として agrin が発現しており、RPE細胞の agrin 発現への関与が示唆された。Agrin 制御因子を発見するために DNA マイクロアレイ解析を行ったところ agrin が周囲の細胞増殖や細胞外基質の硬化を行う際に介するといわれる YAP/TAZ シグナルの活性化を確認できた。抗 VEGF 薬治療を行った AMD 眼 105 眼の SRF 発生の検討では高齢、網膜下の高輝度物、classic CNV、RPE の欠損部が長いこと、が SRF に関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在 AMD 患者の治療後の視機能障害に関連する網膜下の線維性変化には有効な治療はない。網膜下線維化に対する治療を確立することが不可欠である。今回、細胞外マトリックスの蛋白の一つである agrin が網膜下線維化に関連する可能性が示唆された。agrin を標的とした新たな治療を確立することは、AMD 患者のアンメットニーズに応える治療戦略となり、経済面や安全面の上でも非常に有効な治療となる。また、網膜下線維化を起こしやすい症例の特徴についても解析をおこなった。この結果は網膜下線維化について注意すべき患者の特徴、患者の予後、を予測する因子になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The extracellular matrix "agrin" was detected in subretinal fibrosis tissue of the mouse CNV model. The DNA microarray also showed the activation of YAP/TAZ signaling. It indicates "agrin" plays some role in subretinal fibrosis through the YAP/TAZ signaling pathway. AMD patients treated with anti VEGF drug in our hospital were retrospectively reviewed. The subretinal fibrosis in AMD eyes were correlated with age, subretinal hyperreflective materials in OCT(SHRMs), classic (type 2) CNV.

研究分野：加齢黄斑変性

キーワード：加齢黄斑変性 網膜下線維化病変 agrin 線維化阻害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) はわが国で失明原因の 4 位をしめ、高齢者の視力を脅かす重要な疾患である。現在、AMD に対する標準的な治療法である、抗 VEGF 療法は、脈絡膜新生血管 (CNV) 及び血管漏出を特徴とする活動期にのみ有効であり、その後生じる網膜下の線維性変化には有効な治療はない。抗 VEGF 薬による綿密な治療を行ったにもかかわらず、最終的に網膜下線維化による視機能障害がおこるケースが多い。AMD に対するアンメットニーズに応えるためには線維化への対策が不可欠である。今までに、線維化に関する様々な蛋白が同定され、それらをターゲットとした治療が試みられているが、未だ実用化されておらず、網膜下線維化のメカニズムの詳細を明らかにすることと、治療法を確立することは、臨床上重要な課題である。

近年、agrin という蛋白が肺、肝臓など多臓器の線維化に関連していることが示された。しかし、網膜の線維性変化に対する関与は未だ報告がない。我々は、新たなターゲットとして agrin という蛋白に着目した。

2. 研究の目的

網膜下線維化は、CNV によって傷害された網膜色素上皮細胞 (RPE) や、CNV に誘導された炎症細胞から分泌される様々な液性因子により、網膜下にコラーゲンなどの結合組織が残存し、線維性瘢痕組織が形成される。他臓器の線維性疾患では、徐々にその機序が明らかになってきているが、眼疾患ではその病態メカニズムの詳細は不明である。我々は、線維増殖特異的分泌タンパクである、ペリオスチン、テネイシン C が線維増殖予測バイオマーカーであると報告した (Ishikawa K et al. *FASEB J.* 2014)。それ以外に網膜下線維化ともさまざまな分子との関連が報告されているが、実際の治療にむすびついているものはない。2017 年に agrin というタンパクを阻害することで、細胞増殖抑制および抗線維化効果があることが報告された。agrin は YAP/TAZ シグナルを活性化し、周囲の細胞の増殖、細胞外基質の硬化を担っているといわれているが、agrin と線維化の関連の報告は、肺、肝、腎などでも散見される程度であり、網膜の線維性変化に対する関与の報告はない。本研究の目的は、細胞外マトリックス agrin の網膜下線維化への関与の分子機序を解明し、agrin を標的とした治療を確立することである。それは、眼内線維増殖の予防的治療の構築につながり、AMD 患者のアンメットニーズに応える治療戦略となる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 網膜下線維化形成における agrin の関与

Agirin が網膜下線維化形成に関与しているかを加齢黄斑変性のモデルマウスを用いて検討する。本研究にはレーザー誘発性脈絡膜新生血管 (CNV) モデルを使用する。マウスの脈絡膜にレーザーを照射し、CNV と網膜下線維化を誘導するモデルである。線維化誘導後、免疫染色を用いて agrin 発現の有無および発現場所を検討する。次に、ヒト網膜色素上皮 (hRPE) 細胞を用いた *in vitro* 実験にて、線維化にとって重要なプロセスである上皮間葉移行 (EMT) について RT-PCR 法を用いて検討する。EMT 誘導因子には眼内の主要な炎症性サイトカインである TGF- β 2 を用いる。

(2) Agrin 制御因子の探索

細胞外マトリックスである agrin の制御因子探索のため DNA マイクロアレイ解析を行う。Agirin 発現部位特異的に検討するため、Laser-capture microdissection (LCM) を用いる。

この技術を用いることで、網膜下線維化部分のみを切り出して解析することが可能である。DNA マイクロアレイ解析については外部業者に委託する。また、網膜下線維化部分の対照群として、レーザー非照射の網膜下部分を用いる。

(3)臨床応用に向けて

今後の臨床応用を考え、実際のヒトサンプルでも agrin が発現しているかを検討する。現在、加齢黄斑変性の網膜下線維化の治療として硝子体手術を行うことは医学的見地から稀であり、同様の線維化機転である増殖硝子体網膜症の患者よりサンプルを入手する。Agrin の発現については免疫染色により検討する。

(4)AMD 患者における線維化の臨床的特徴の検討

2016 年 12 月から 2017 年 12 月までに九州大学眼科において、未治療 AMD 患者で抗 VEGF 薬である、アフリベルセプトを treat and extend 法で投与し、6 ヶ月以上経過観察できた 105 眼について、眼底写真、optical coherent tomography (OCT)の所見に基づいて網膜下線維化 (SRF) を認めた症例を SRF 群、それ以外を非 SRF 群とし、その治療前の背景、治療後の経過、線維化進展の経過を検討した。また、網膜下の線維化には網膜色素上皮 (RPE) が重要であることが報告されているので、治療前 OCT をもとに RPE の障害範囲を測定し、障害なし群 (grade 0)、500 μ m 未満の部分障害群 (grade 1)、500 μ m 以上の広範囲障害群 (grade 2)、に分類し、アフリベルセプト治療後の網膜下線維化との関連を検討した。さらに classic CNV (2 型 CNV) をもつ患者に網膜下線維化が有意にみられることがわかったため、2013 年 1 月から 2014 年 12 月に当院で抗 VEGF 薬治療を開始した 2 型 CNV を持つ患者の薬剤による線維化率の検討を行った。

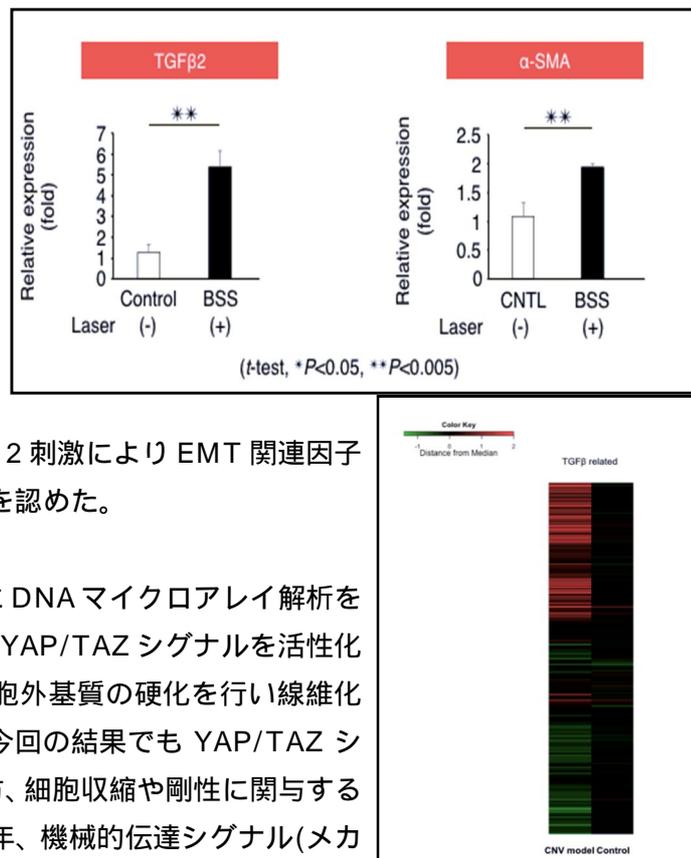
4. 研究成果

(1)網膜下線維化形成における agrin の関与

レーザー誘発性 CNV モデルを用いて agrin 発現を確認したところ、網膜下線維化部分有意に発現を認めた。さらに、レーザーにより障害を受けた RPE 細胞を中心として、表面を覆うように発現しており、障害を受けた RPE 細胞が agrin 発現に関与していることが示唆された。また、hRPE 細胞を用いた *in vitro* 実験では、TGF β 2 刺激により EMT 関連因子である SMA の mRNA 発現亢進を認めた。

(2)Agrin 制御因子の探索

Agrin 制御因子を発見するために DNA マイクロアレイ解析を行った。既知の報告では、agrin は YAP/TAZ シグナルを活性化することで、周囲の細胞増殖や細胞外基質の硬化を行い線維化に関与していると言われている。今回の結果でも YAP/TAZ シグナルの活性化を確認できた。一方、細胞収縮や剛性に関する Rho-kinase の活性化も認めた。近年、機械的伝達シグナル(メカノトランスダクション)が注目を集めており、Rho 活性化による



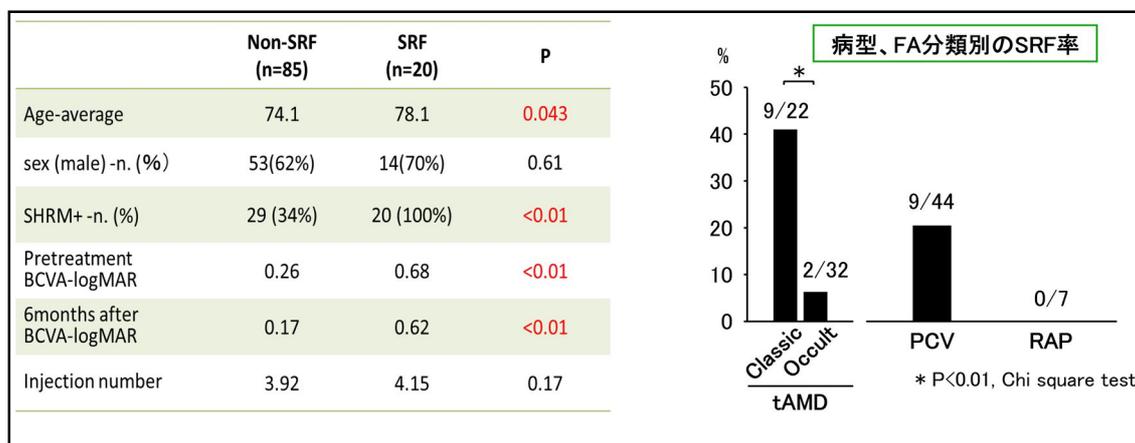
機械的刺激が Actin-YAP/TAZ シグナルの更なる活性化に関与している可能性がある。細胞の剛性に着目した治療法は眼科領域においては確立しておらず、今後の新規治療標的となると考えられる。

(3)臨床応用に向けて

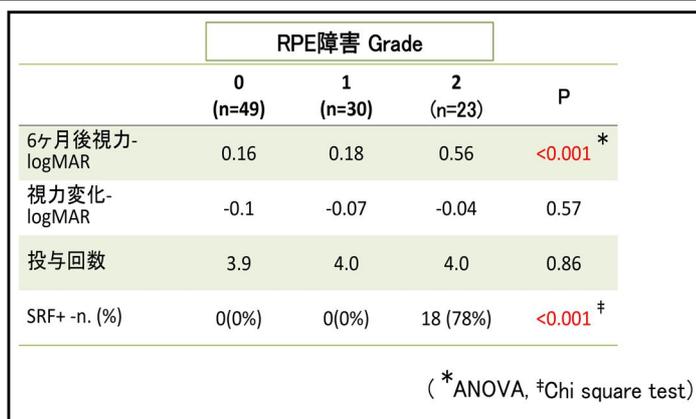
増殖硝子体網膜症患者の増殖膜サンプルを用いて agrin の発現を検討した。レーザーCNVモデルと同様に増殖膜の膜表面に発現していることが分かった。今後の臨床応用には治験を含めた更なる臨床的検討が必要だが、agrin が新たな分子標的となる可能性が示唆された。

(4)AMD 患者における線維化の臨床的特徴

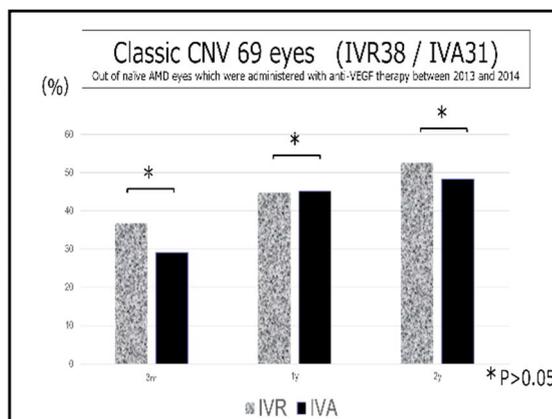
治療開始後 6 ヶ月の時点で網膜下線維化を 20%の症例にみとめた。SRF 群、非 SRF 群に分けると、SRF を認めた症例は治療後視力、治療後視力は不良であった。また、高齢、OCTで網膜下高輝度反射物 (SHRM) を認める、classic CNV (2型 CNV) をもつ、症例が多くなっていた。これらは治療後の SRF 発症の予測因子となりえると考えられた。



治療前の RPE 障害範囲が広範囲の grade 2 のみ、SRF を認めた。RPE は細胞間接着が失われると形質転換により網膜下線維化をきたすことが報告されているので、今回の「広範囲な RPE 障害の症例では 100%線維化がおこっていた」という結果はそれを裏付けるものとなるかもしれない。



の結果から classic CNV (2型 CNV) をもつ患者に網膜下線維化が有意にみられることがわかったため、2013年1月から2014年12月に当院で抗 VEGF 薬治療を開始した 2型 CNV69 眼の線維化について検討をおこなった。1年で43%、2年で50%程度に線維化をみとめ、ラニズマブ群とアフリベルセプト群の線維化率に有意差はなかった。今回線維化を生じやすい患者の臨床像については解析できたため、今後はそれらの患者の遺伝子を検討していく必要があると思われる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wada Iori, Oshima Yuji, Shiose Satomi, Kano Kumiko, Nakao Shintaro, Kaizu Yoshihiro, Yoshida Shigeo, Ishibashi Tatsuuro, Sonoda Koh-hei	4. 巻 257
2. 論文標題 Five-year treatment outcomes following intravitreal ranibizumab injections for neovascular age-related macular degeneration in Japanese patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1411 ~ 1418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-019-04361-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Notomi S, Shiose S, Ishikawa K, Fukuda Y, Kano K, Mori K, Wada I, Kaizu Y, Matsumoto H, Akiyama M, Sonoda KH	4. 巻 16(7)
2. 論文標題 Drusen and pigment abnormality predict the development of neovascular age-related macular degeneration in Japanese patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0255213.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada I, Shiose S, Ishikawa K, Kano K, Notomi S, Mori K, Akiyama M, Nakao S, Sonoda KH	4. 巻 260(6)
2. 論文標題 One-year efficacy of "rescue photodynamic therapy" for patients with typical age-related macular degeneration, polypoidal choroidal vasculopathy, and pachychoroid neovascularopathy refractory to anti-vascular endothelial growth factor therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 2029-2036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-022-05553-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中間崇仁, 塩瀬聡美	4. 巻 38
2. 論文標題 抗VEGF治療：加齢黄斑変性の長期マネジメント	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 91-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 塩瀬聡美	4. 巻 39-4
2. 論文標題 安全・迅速な抗VEGF薬硝子体内注射のコツと注意点	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 479-480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 末廣久美子, 塩瀬聡美, 狩野久美子, 橋本左和子, 和田伊織, 大島裕司, 園田康平	4. 巻 73(3)
2. 論文標題 近視性脈絡膜新生血管に対するラニピズマブ硝子体内注射の2年経過	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 871-877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 永吉美月, 塩瀬聡美, 和田伊織, 狩野久美子, 石川桂二郎, 秋山雅人, 森賢一郎, 納富昭司, 中尾新太郎, 久富智朗, 園田康平	4. 巻 74
2. 論文標題 ポリープ状脈絡膜血管症に対する光線力学的療法併用抗血管内皮増殖因子治療後短期における治療成績と再発予測因子	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 1241-1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 福山文里, 塩瀬聡美, 石川桂二郎, 狩野久美子, 和田伊織, 森賢一郎, 海津嘉弘, 秋山雅人, 中間崇仁, 納富昭司, 園田康平	4. 巻 75
2. 論文標題 Pachychoroid neovascularopathyに対する光線力学療法の短期治療成績	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 1227-1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川桂二郎
2. 発表標題 AMDに伴う網膜下線維性瘢痕の臨床的特徴
3. 学会等名 AMD Medical Web講演会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 塩瀬聡美
2. 発表標題 プロルシズマブの特性について
3. 学会等名 Oita-Fukuoka Macula Meeting
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 塩瀬聡美
2. 発表標題 AMD治療を再考する「当科でのBeovuの治療の位置づけ」
3. 学会等名 信州大学 網膜合同カンファレンス
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 塩瀬聡美
2. 発表標題 AMD診療アップデート
3. 学会等名 筑豊ブロック眼科医会講演会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 塩瀬聡美
2. 発表標題 AMDの最新治療
3. 学会等名 Macular disease workshop in Kitakyushu
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 塩瀬聡美
2. 発表標題 加齢黄斑変性一問一答
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 福井卓磨, 石川桂二郎, 塩瀬聡美
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性に伴う網膜色素上皮裂孔の発生パターン
3. 学会等名 網膜硝子体学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 福山文里, 塩瀬聡美, 石川桂二郎
2. 発表標題 Pachychoroid neovascularopathyに対する光線力学療法の短期治療成績
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 永田純也, 塩瀬聡美, 石川桂二郎
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性における網膜色素上皮裂孔の臨床的特徴
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Ishikawa K, Shiose S, Akiyama M, Kano K, Kaizu Y, Wada I, Nakao S, Oshima Y, Sonoda KH
2. 発表標題 An association between RPE disruption and fibrotic scar formation after aflibercept therapy for neovascular age-related macular degeneration
3. 学会等名 ARVO
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 福田洋輔, 塩瀬聡美, 和田伊織, 狩野久美子, 石川桂二郎, 秋山雅人, 森賢一郎, 海津嘉弘, 納富昭司, 中尾新太郎, 大島裕司, 園田康平
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性に対するアフリベルセプト治療後の黄斑萎縮に関連する因子の検討
3. 学会等名 日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 和田伊織, 塩瀬聡美, 狩野久美子, 海津嘉弘, 石川桂二郎, 中尾新太郎, 園田康平
2. 発表標題 滲出型加齢黄斑変性における "rescue PDT" 半年間の治療成績について
3. 学会等名 日本眼循環学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 石川桂二郎, 塩瀬聡美, 秋山雅人, 狩野久美子, 海津嘉弘, 和田伊織, 中尾新太郎, 大島裕司, 園田康平
2. 発表標題 加齢黄斑変性における網膜色素上皮層の障害範囲とアフリベルセプト治療後の線維化の関連
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 塩瀬聡美
2. 発表標題 実臨床におけるPCV治療
3. 学会等名 日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 塩瀬聡美
2. 発表標題 生活習慣病と加齢黄斑変性
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 和田伊織, 中尾新太郎, 海津嘉弘, 山口宗男, 森賢一郎, 石川桂二郎, 有馬充, 塩瀬聡美, 園田康平
2. 発表標題 AMDにおける抗VEGF療法後のCNV消退メカニズム
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 塩瀬聡美, 納富昭司, 石川桂二郎, 狩野久美子, 和田伊織, 橋本左和子, 森賢一郎, 福田洋輔, 秋山雅人, 中尾新太郎, 園田康平
2. 発表標題 Pachychoroid neovascularopathy における hyperreflective foci の治療前後の変化
3. 学会等名 日本眼循環学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 福田洋輔, 塩瀬聡美, 石川桂二郎, 納富昭司, 狩野久美子, 秋山雅人, 和田伊織, 森賢一郎, 山口宗男, 園田康平
2. 発表標題 2型脈絡膜新生血管を伴った 典型加齢黄斑変性に対する 抗VEGF薬治療後再発の検討
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 永吉美月, 塩瀬聡美, 和田伊織, 狩野久美子, 石川桂二郎, 秋山雅人, 森賢一郎, 納富昭司, 中尾新太郎, 園田康平
2. 発表標題 ポリープ状脈絡膜血管症への抗VEGF薬併用光線力学療法の再発率の検討
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 塩瀬聡美
2. 発表標題 典型AMDへの治療戦略
3. 学会等名 日本眼科学会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 桂二郎 (Ishikawa Keijiro) (00795304)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	園田 康平 (Sonoda Koh-hei) (10294943)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	秋山 雅人 (Akiyama Masato) (10757686)	九州大学・医学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	久富 智朗 (Hisatomi Toshio) (50404033)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	
研究分担者	有馬 充 (Arima Mitsuru) (60772845)	九州大学・大学病院・学術研究員 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------