

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592573

研究課題名(和文) 難治型加齢黄斑変性に関する分子遺伝学的研究とオーダーメイド治療研究

研究課題名(英文) Molecular biological investigation for age-related macular degeneration and order made treatment

研究代表者

大島 裕司 (Yuji, Oshima)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00536237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)は中高齢者の網膜黄斑部に生じる疾患で、視力予後不良の難治性疾患である。現在の抗VEGF療法は、治療法の中では画期的な治療法であるが、まだ難治症例が多い。今回我々はAMDに対して遺伝的因子、および種々のサイトカインの影響を検索し、その新しい治療法を検討した。マウス脈絡膜新生血管(CNV)モデルに対してIL-27を眼内に投与したところ有意にCNVの抑制が認められ、それはVEGFの産生を抑制することによって示された。またCNVモデルマウスにIL-17を投与するとCNVを促進し、IL-27を抑制することでCNVが縮小することが示され、治療的展望が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Age Related Macular Degeneration (AMD) is the main cause of legal blindness in the Western and Asian countries. The pathogenesis is the choroidal neovascularization (CNV) beneath the macula in the retina. The anti-VEGF therapy is the major treatment, but there still many intractable cases. We investigated the effectiveness of cytokines for CNV progression, and the correlation of genetic background and treatment effect to search new treatment. IL-27 was significantly reduced CNV progression by VEGF secretion blocking. And the injection of IL-17 blockage in CNV model mouse eye significantly reduced CNV progression. These cytokines are supposed to be one of the new treatment targets for AMD. Although we also investigated the correlation between some SNPs and the effectiveness of anti-VEGF therapy from clinical data, there aren't significantly differences between them for early treatment phase.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 眼科学

キーワード：眼生化学 分子生物学

### 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD)、増殖糖尿病網膜症 (PDR)、未熟児網膜症 (ROP) に代表される眼内血管新生を伴う疾患や眼内線維性増殖を伴う増殖性硝子体網膜症 (PVR) は眼内増殖性疾患と呼ばれ、視力予後が不良の難治性疾患であり失明原因の上位を占める疾患群である。その中でも AMD は高齢化社会が進行中の我が国をはじめとした先進国において、成人の失明や視力低下の主因となっている。現在、これらの網脈絡膜疾患に対する根本的な治療はなく、その病因解明は社会的急務である。AMD の病態は網膜下に伸展した脈絡膜新生血管とそれに伴う出血、滲出、そしてその線維性瘢痕が視力低下の主因である。

その脈絡膜新生血管の発症には、血管内皮増殖因子 Vascular endothelial growth factor (VEGF) が関わっていることが明らかとなっており近年本邦でも VEGF をターゲットとした治療が主流となっている。しかし、抗 VEGF 治療によっても早期病変の拡大、進行抑制は制御できるが、一度出血を伴った線維性瘢痕に対する治療法はない。症例によって同じ病変タイプでも抗 VEGF 療法が著効する症例と多数回治療を施行しても効果が現れない症例があり、どのような症例が治療に抵抗性であるのかを調べるのが今後のもっとも重要な課題である。治療抵抗性の因子として、患者の遺伝子背景も関与することが欧米の報告で明らかにされている (Lee AY et al, *Br J Ophthalmol.* 93(5):610-3.2009)。欧米における AMD と日本人の AMD では病変のタイプや遺伝的背景、危険因子などが違うことが報告されており (Kondo N et al, *Ophthalmology*. in print. 2010)、日本人において病変に伴う因子と遺伝的因子を包括的に解析し、日本人においてどのような症例が抗 VEGF 治療に適しているのか、あるいは治療に抵抗性であるのかを明らかにする必要がある。我々はこれまで、脈絡膜血管新生や眼内血管新生には VEGF はもちろんであるがその周辺で VEGF 関連分子やアンジオポイエチンファミリー、IL-18 や種々のサイトカイン、ケモカインが眼内血管新生に関与していることを報告してきた (Oshima Y et al, *FASEB J.* 19(8):963-5. 2005)。近年、炎症性サイトカインである IL-27 が分離され、Th1 を介して炎症機転の初期や血管新生に関与していることが報告され、単球から TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-18 が分泌されることも明らかとなっている (Carl JW et al, *Int J Clin Exp Pathol*, 1:117-123, 2008)。また IL-27 は血管新生を抑制する作用があることが知られており、マウス大腸癌モデルにおいて抗血管新生、抗腫瘍作用を示していることが報告されている (Shimizu M et al, *The Journal of Immunology*, 176:7317-7324, 2006)。IL-27 は TGF- $\beta$  と密接な関係がある Th17 の分化を抑制することが報告されている。(Huber M. *Int Immunology*.;20:223-234, 2007) しかし、眼

内での分布や眼病変における関わりは、未だ不明な点も多い。近年のゲノム医学の進歩は著しく、眼科領域においても網膜色素変性などの遺伝性眼疾患のみならず、AMD などの多因子性疾患の責任 (疾患感受性) 遺伝子の同定の試みが国際的に加速しており、そのゲノムレベルの病態が少しずつ明らかになっている。本研究においては眼内増殖性疾患における種々の炎症性サイトカインの関与を、特に IL-27 にフォーカスを置き、明らかにすることを目的とし、また日本人 AMD の抗 VEGF 療法感受性に対する遺伝的危険因子を特定するとともに今後のオーダーメイド治療への応用を検討する。

### 2. 研究の目的

加齢黄斑変性 AMD は視力予後不良の難治性疾患である。近年施行開始された抗 VEGF 療法は、今まで視力改善が皆無であった治療法の中では画期的な治療法のひとつであるが、視力改善する症例は 3 割程度とまだまだ難治症例が多い。AMD の発症に直接関与する遺伝子の存在は明かではないが、近年種々の遺伝子多型との関連が報告されている。本研究では AMD 患者から採取した血液より DNA を抽出し、抗 VEGF 療法に対する感受性や AMD の進展に影響を及ぼす SNP を解析し、その関連性を検討する。またすでに瘢痕化してしまっている症例に対しては現在視力を改善させる有効な治療法はない。そこでモデルマウスを用いて炎症性サイトカイン、特に IL-27 との関連を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) マウス脈絡膜新生血管 (CNV) モデルを用いた CNV に対するサイトカインの関連性の検討

眼内における上記炎症性サイトカインの作用を検討するために AMD の動物モデルである実験的レーザー CNV モデルを用いた。このモデルはマウス脈絡膜へのレーザー光凝固で炎症を励起し、脈絡膜に新生血管を誘導することが可能であり広く汎用されている。C57BL/6 マウス眼底に 4 カ所のレーザー凝固を行い、CNV モデルを作成した。レーザー照射による眼内での各サイトカインの発現量・発現経過を realtime PCR 法にて検討した。またサイトカイン投与・抗体投与による CNV の形成変化を比較し、更には各サイトカイン欠損マウスでの CNV 形成変化も検討し、その作用について確認を行った。加えて各条件下での VEGF の発現量も測定し、サイトカインの VEGF 産生への影響も検討した。眼組織におけるサイトカイン産生細胞の同定には FACS や免疫組織化学染色を用い検討を行った。

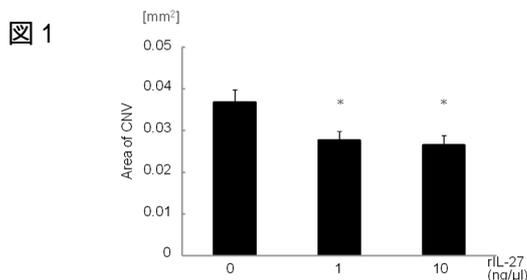
(2) 加齢黄斑変性患者のラニズマブ硝子体投与後の治療経過の検討と遺伝的危険因子の検討

九州大学大学院医学研究院眼科学分野 AMD の専門外来で、研究期間中に抗 VEGF 薬硝子体投与による治療を受けた患者で文書による同意を得られた成人の臨床経過（視力、眼底所見、蛍光眼底造影所見、光干渉断層計による中心窩網膜厚、臨床病型、病変の大きさ）や活動性などを検討し治療に対する効果を総合的に判定した。また患者の血液サンプルを収集し、各サンプルの臨床所見、年齢、性別、治療歴、合併症、生活歴、家族歴などを含んだデータベースを作成した。聞き取り調査の対象者の中で、本遺伝子解析研究用の採血に同意された方に対し、従来報告のある既知の候補遺伝子（CHF, HTRA-1, ELOVL4, FBLN5, BF, CFB, CFI, LIPC, ARMS2, C2）を用いて SNP 解析を行う。具体的には、九州大学大学院医学研究院眼科学分野において末梢血より DNA を抽出し、遺伝子領域を中心に同定された SNP を用い各群間での相関解析を行った。治療感受性良好群と不良群に対する一塩基多型（SNPs）を比較し、AMD 治療に対する感受性関連遺伝子を探索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) IL-27 は CNV を抑制した

まず IL-27 の CNV への関与について検討を行った。レーザー照射後に IL-27 を眼内に投与した群で CNV は有意に減少した（図 1）。逆に抗 IL-27 抗体を投与した群と IL-27 サブユニット EB13 欠損マウスで CNV が有意に増加することを確認した。続いて VEGF 発現量について検討したところ、IL-27 を眼内投与した群ではコントロール群に比べ眼内 VEGF の発現が有意に抑制されていた（図 2）。このことより IL-27 は VEGF の発現を抑えることで血管新生を抑制していると考えられた。MD において VEGF の主要な産生細胞としてはマクロファージと網膜色素上皮細胞が知られている。In vitro の実験では網膜色素上皮細胞に IL-27 を添加しても培養上清中の VEGF の産生に変化はなかったが、マクロファージに IL-27 を添加すると培養上清中 VEGF の発現が有意に減少した。一方でマクロファージの眼内浸潤に IL-27 は影響しなかった。以上の結果より IL-27 は炎症後マクロファージの眼内浸潤に影響しないもののマクロファージの VEGF 産生を抑え血管新生抑制作用を発揮していることが示された。



##### (2) IL-17 は CNV を促進した

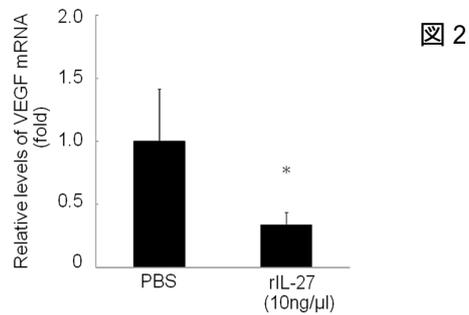


図 2

続いて IL-17 の CNV への関与について研究を行った。レーザー照射後 IL-17 を眼内に投与すると CNV 形成が有意に増大した（図 3）。眼内における IL-17 の発現はレーザー照射後 3 日目より上昇し 4 日目にピークであった。続いてレーザー後抗 IL-17 抗体を眼内投与した群及び IL-17 欠損マウス群では、野生型マウスと比較して誘導される CNV が有意に縮小することが判明した（図 4）。また IL-17 欠損マウスの眼内 VEGF の発現は野生型マウスと差がなかった。従って IL-17 は VEGF 非依存的に CNV を促進することが判明した。これら IL-17 のソースを細胞内染色 FACS で検索したところ、IL-17 を産生する細胞は驚くべきことに helper T 細胞ではなく  $\gamma\delta$ T 細胞であった（図 5）。免疫染色による解析で  $\gamma\delta$ T 細胞がレーザー照射後の脈絡膜に浸潤していることを確認した。除去抗体の投与により  $\gamma\delta$ T 細胞を除去したマウスや TCR  $\gamma\delta$  欠損マウスを用いて CNV を誘導すると CNV が縮小した。IL-17 の血管新生作用が VEGF 非依存的であることより、IL-17 が現在の抗 VEGF 療法以外の新たな治療法としての可能性を示した。同時に IL-17 産生細胞である  $\gamma\delta$ T 細胞を治療標的とすることで CNV を抑制出来る可能性が示唆された。

図 3

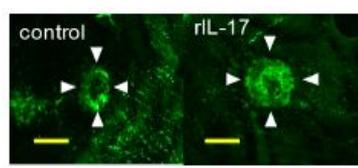
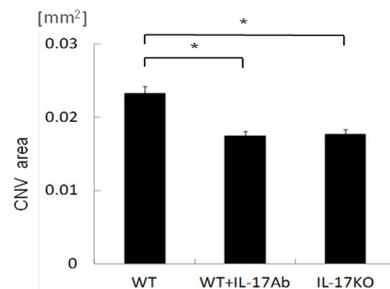
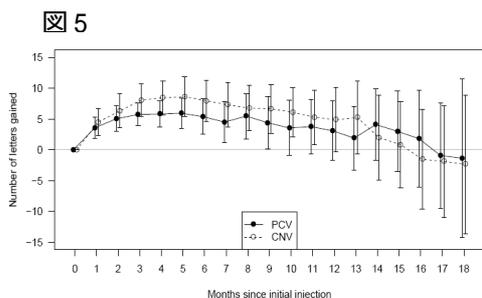


図 4



(3) 短期治療後の治療反応と SNP には有意な相関は認められなかった。導入期治療とし連続 3 回のランビズマブ硝子体投与後、視力および中心窩網膜厚は有意に改善が得られ、その後維持期には病状悪化時

に追加投与を行った。治療開始後1年後、治療開始時と比較すると視力、中心窩網膜厚ともに改善が得られたが、導入期終了時の改善した視力は維持できなかった(図5)。導入期治療としてラニビズマブ硝子体投与を連続3回行った後の視力および光干渉断層計による中心窩網膜厚の変化量と既知のSNPとの相関を方法に記した背景因子を加えてロジスティック回帰分析を行ったが、視力変化量および中心窩網膜厚変化量とも有意な相関を認めるSNPは認められなかった。



## 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 2件)

Eiichi Hasegawa, Yuji Oshima, Atsunobu Takeda, Kazuko Saeki, Hiroki Yoshida, Koh-hei Sonoda, and Tatsuro Ishibashi. IL-27 inhibits pathophysiological intraocular neovascularization due to laser burn. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;91(2):267-273. 査読有り  
doi:10.1189/jlb.1110603.

Eiichi Hasegawa, Koh-hei Sonoda, Takashi Shichita, Rimpei Morita, Takashi Sekiya, Akihiro Kimura, Yuji Oshima, Atsunobu Takeda, Takeru Yoshimura, Shigeo Yoshida, Tatsuro Ishibashi, and Akihiko Yoshimura. IL-23-independent induction of IL-17 from T cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. *J Immunol*. 2013;190(4):1778-1787. 査読有り  
doi:10.4049/jimmunol.1202495.

[学会発表](計 5件)

太島裕司、安田美穂、吉田綾子、狩野久美子、石川桂二郎、朝隈朋子、納富昭司、安里瞳、橋本左和子、中尾新太郎、吉田茂生、石橋達朗  
滲出型加齢黄斑変性に対するラニビズマブ硝子体内投与の1年治療成績  
第65回日本臨床眼科学会、東京都  
2011年10月9日

長谷川英一、大島裕司、武田篤信、園田康平、石橋達朗、吉村昭彦  
マウス脈絡膜新生血管モデルにおける T細胞の IL-17 産生機構  
第116回日本眼科学会総会 2012年4月5~6日 東京都

Y. Oshima, M. Yasuda, K. Kano, A. Yoshida, H. Asato, S. Nakao, S. Yoshida, T. Ishibashi  
Predictive Factors of Visual Acuity Deterioration after Ranibizumab Treatment for Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy  
ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Fort Lauderdale  
2012/5/8

Hasegawa E, Oshima Y, Takeda A, Yoshimura T, Sonoda K-H, Ishibashi T, Yoshimura A

T cells promote experimental choroidal neovascularization via IL-23 independent manner.  
ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Fort Lauderdale  
2012/5/6-10

Y. Oshima, S. Shiose, M. Yasuda, K. Kano, A. Yoshida, K. Ishikawa, S. Notomi, S. Yoshida, T. Ishibashi  
Predictive Factors for Visual Acuity "Gain and Maintain" after Ranibizumab Treatment for Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy  
ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology), Seattle  
2013/05/09

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島 裕司 ( OSHIMA, Yuji )  
九州大学病院・眼科・助教  
研究者番号：00536237

### (2) 研究分担者

園田 康平 ( SONODA, Koh-Hei )  
山口大学医学部・眼科・教授  
研究者番号：10294943

### (3) 連携研究者

(         )

研究者番号：