

令和元年9月13日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670753

研究課題名(和文)核磁気共鳴を用いた滲出型加齢黄斑変性に対する抗VEGF治療の反応性予測法の開発

研究課題名(英文)Development of the Method to Predict Efficacy of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy for Exudative Age-Related Macular Degeneration Using Nuclear Magnetic Resonance

研究代表者

吉村 長久 (YOSHIMURA, Nagahisa)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70211662

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)：遺伝子型や前房水VEGF濃度の測定など、従来から行われている方法では、典型的加齢黄斑変性(tAMD)とポリープ状脈絡膜血管症(PCV)を識別することは難しい。生体試料を核磁気共鳴(NMR)計測し、ケモメトリクスを用いてデータ解析する方法は、試料に含まれる豊富な情報を活用できるので、個々の試料の識別に役立つ。我々はこの手法によって、両疾患の識別が可能を検討した。まず、前房水の検体測定に最適なNMR計測値の取得法および信号処理法を開発した。次に、前房水58検体のNMR信号処理を行い、PLS-DA法によるクラス分類を行ったところ、両群は個々にクラスター化する傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前房水を生体試料とした核磁気共鳴(NMR)計測の報告は、これまでない。前房水のNMR計測値の取得法および信号処理法を開発したことで、眼科領域におけるNMR計測の応用の可能性を広げた点は、学術的意義が高いと考える。

また、NMR計測が、典型的加齢黄斑変性とポリープ状脈絡膜血管症を識別するための新たな手法となる可能性を示すことができた。眼底造影検査はアナフィラキシーショックの危険性がある検査であり、造影剤を用いずに両疾患を識別する新たな手法の可能性を示した点は、臨床的・社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to distinguish between typical age-related macular degeneration (tAMD) and polypoidal choroidal vasculopathy (PCV), using existing methods such as genetic analysis or measurement of vascular endothelial growth factor level in aqueous humor. As nuclear magnetic resonance (NMR) signals obtained from biological fluids contain a wealth of physicochemical information, NMR spectroscopy has been used to study the characteristics of biological fluids. The purpose of this study was to ascertain if analysis of NMR spectral data using chemometrics could distinguish both types of illness.

We first determined the optimum way to obtain NMR data and developed the best way of signal processing that is suitable for aqueous humor. We examined spectral data of aqueous humor samples by partial least squares discriminant analysis and visualized by plotting the scores. The scores obtained from both types of illness tended to cluster separately on the plots.

研究分野：眼科

キーワード：前房水 核磁気共鳴 加齢黄斑変性 ポリープ状脈絡膜新生血管症

## 1. 研究開始当初の背景

滲出型加齢黄斑変性(Age-related macular degeneration; AMD)の発症とCFH、ARMS2、C2/CFB、C3、VEGF等数多くの遺伝子との関連が報告されている。しかし、我々の研究でも(Am J Ophthalmol 2012;154:125-136)、また、NEIが主導したCATT studyにおいても、AMD発症に関与する遺伝子と抗VEGF薬の治療効果・投与回数との関連は発見されておらず、遺伝子から抗VEGFの治療反応性を予測することは現時点では難しい。

AMD発症には慢性炎症、網膜虚血が関わっていることが示されており、AMD患者の前房水中のVEGF濃度が有意に上昇している。しかし、抗VEGF薬に対する治療抵抗例や再発例をしばしば経験することから他の因子の関与も推測されている。AMD患者の眼内ではVEGF、IL-6、I、MCP-1等の種々のサイトカイン、炎症産物、AGEなど変化が報告されている。AMD患者の前房水中のVEGFなど個々のサイトカインを同定・定量したという報告はあるものの、個々の計測からでは病態全体を把握することは困難であり、抗VEGF薬への反応性を予測することは困難である。滲出型AMDは典型AMD(typical AMD; tAMD)とポリリーブ状脈絡膜血管腫症(Polypoidal choroidal vasculopathy; PCV)に大別される。一般的にはPCVの方がtAMDに比べて視力予後が比較的良好とされている一方で、PCVの中には大出血を起こす予後不良の症例もある。

生体試料を核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance: NMR)計測し、ケモメトリクスによるデータ解析を行う方法は、生体試料に含まれる豊富な情報を活用して、個々の試料を識別することを可能にする。我々は、臨床に役立つ新規病態解析法を開発することを目的に、生体サンプル由来の電磁波信号の解析手法に関する研究を続け、酸化ストレスや麻酔薬が組織へ及ぼす影響や、鑑別困難な疾患の早期鑑別法の確立、などに関し報告してきた(PLoS ONE 2010, 5(6): e11172, BMC Medical Imaging 2012, 12:28)。そして、近年、血液・臓器等由来の電磁波信号に適した信号処理方式を新たに考案し、電磁波信号の特性を評価・活用して、各生体サンプル固有の物理情報を、精度よく迅速に検出するデータ解析手法を開発した(特願2012-157593号)。本手法は、従来の化学分析による検査法とは、全く異なる視点にたつ。

## 2. 研究の目的

本研究では滲出型AMD患者から前房水・血清を採取してNMR計測し、NMR信号の特性を活用したデータ解析を行うことにより、tAMDとPCVを識別できるか検討した。更に、抗

Vascular endothelial growth factor (VEGF)薬である aflibercept による治療を開始する前に採取した前房水・血清に本手法を応用することによって、AMDに対する抗VEGF薬硝子体投与の反応性の予測を行うことが可能かどうかを検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 対象患者からの前房水・血清の採取  
滲出型AMD患者に対して治療である抗VEGF薬の硝子体注射を初回行う際に、房水ピペットを用いて前房水を100-200 $\mu$ l程度採取した。前房水は採取後即ドライアイスにて凍結し、-80度冷凍保存した。また治療前に静脈採血を行い、遠心分離により細胞成分等の不溶成分を除去し、血清を-80度冷凍保存した。

### (2) 対象患者からの臨床情報の取得

#### ベースラインの臨床情報の取得

治療歴のない滲出型AMDと考えられる初診患者を対象とし、問診(既往歴の聴取: 高血圧、脂質異常症、糖尿病、心疾患、脳血管疾患、その他の既往歴)、視力測定、眼圧測定、細隙灯顕微鏡検査による前眼部の診察を行った。その後散瞳薬による散瞳を行い、眼底カラー写真、光干渉断層計(OCT)、自発蛍光、フルオレセインおよびインドシアニンググリーン蛍光眼底造影の撮影、眼軸測定、眼底診察を施行した。複数の黄斑疾患専門医によって滲出型AMDの臨床確定診断を行い、本研究の対象患者とした。またサブタイプtAMDおよびPCVの病型診断を行った。

#### 治療効果判定

対象患者は、治療として抗VEGF薬 aflibercept 硝子体注射を毎月3回、その後隔月4回(Month0, 1, 2, 5, 7, 9, 11)すなわち1年間計7回fixed regimenにて施行した。

第一エンドポイントとして、毎月3回硝子体注射後の治療開始3か月後に、視力測定、カラー眼底写真およびOCT撮影を行い、治療効果判定をOCTにて行った。OCTでの滲出性変化の消失(網膜下液の消失かつ嚢胞様黄斑浮腫の消失)を治療効果あり、滲出性変化の残存を治療抵抗性と判定した。

第二エンドポイントとして、7回硝子体注射後の治療開始1年後に、視力測定、カラー眼底写真およびOCT撮影に加えて、再度フルオレセインおよびインドシアニンググリーン蛍光眼底造影を行った。

#### その他の眼科臨床情報の取得

上記の治療効果判定に加えて付随する項目として、カラー眼底写真およびOCTにて

ドルーゼンの有無・程度・種類を確認し、OCTにて治療前後の網膜厚、脈絡膜厚を計測し、蛍光眼底造影にて、治療前後の新生血管の病巣最大径を計測した。

### (3) NMR 計測

検体の前処理・保存など

対象患者より採取した前房水・血清は、前述の如く -80 度冷凍保存を行い、NMR 計測時に解凍して使用した。

NMR 測定試料の調整

解凍した前房水あるいは血清に、内部ロック用重水などを加え、ガラス性 NMR 試料管に入れた。

NMR 計測条件の検討およびデータ収集

NMR 装置は 7 テスラ (300MHz) FT-NMR 装置 (JEOL) を使用し、核種はプロトン ( $^1\text{H}$ ) についての計測を行った。多検体の連続自動測定が可能なケモトリクス用自動測定プログラムを用い、一次元測定、水信号抑制一次元測定、CPMG スピンエコー測定等を行った。

NMR 計測値の数値化処理

NMR 装置本体の PC より raw データ (FID 信号) をデータ処理専用の PC に転送した。

NMR データの確認および数値化処理

装置に搭載のソフトウェア (Delta™ ver.4.3.2) を用いて、NMR スペクトルを確認した。次に FID 信号を我々が独自に作成したプログラムを用いて処理し、数値化したデータを CSV 形式で保存した。

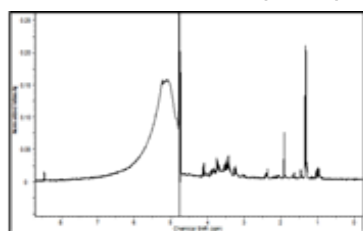
パターン認識による NMR データ解析

ソフトウェアは Unscrambler® ver10.3 (CAMO) を使用し、主成分分析 (PCA) によるデータの可視化を行った後、PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) 法によるクラス分類を行った。

## 4. 研究成果

前房水の NMR 計測について

前房水は、計測に利用可能な試料量が微量 (50  $\mu\text{L}$ ) なため、予備的検討として、NMR 計測条件を調整し、データの確認を行ったところ、微量試料用のガラス性 NMR 試料管 (内径 3mm) を使用し、測定パラメータの数値を微調整することで、血清と同等の NMR 計測データを得ることが確認できた (下図)。



ヒト前房水の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル(自験例)

臨床検体のデータ収集について

測定検体数は前房水 58、血清 63 であった。前房水 58 検体の臨床的診断の内訳は、tAMD 31、PCV 27 であった。我々が独自に確立した手法を用いて NMR 信号の処理を行い、PLS-DA 法による予備的解析を行ったところ、両群は個々にクラスター化し、両疾患が識別される可能性が示唆された。臨床的に治療開始 3 か月後の第一エンドポイントにおいて、治療有効例は 44、抵抗例は 14 であった。今後、この結果を臨床情報と組み合わせてブラッシュアップし、両サブタイプの識別、治療効果の予測に役立つモデル作成をめざす。また、前房水と血清の両検体がある症例総数は 50 (tAMD 27、PCV 23) であるが、血清についても同様の検討を行い、前房水の解析結果と比較する予定である。

## 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 1 件)

Keiko Hirakawa, Kaoru Koike, Yoshimasa Kanawaku, Tsuyoshi Moriyama, Norio Sato, Takao Suzuki, Kenichi Furihata, Youkichi Ohno, Short-time Fourier transform of free induction decays for the analysis of serum using proton nuclear magnetic resonance, Journal of Oleo Science, 査読有, 68, 2019, 369-378

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 特性評価方法、装置およびプログラム

発明者: 小池薫、平川慶子、金涌佳雅、大野曜吉、中川勝吾

権利者: 京都大学、日本医科大学、プラスパブレインズ

種類: 特許

番号: 特願 2019-10627

出願年: 平成 31 年

国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: 混合物試料の特性を表現する方法、混合物試料の特性を評価する方法、混合物試料の属性を識別する方法、及び混合物試料に由来する電磁波信号を処理する方法

発明者: 小池薫、平川慶子、大野曜吉、森山剛、森川秀行、村木秀樹

権利者: 京都大学、日本医科大学、東京工芸

大学、ユニフローズ  
種類：特許  
番号：特許第6281973号  
取得年：平成30年  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉村 長久(YOSHIMURA, Nagahisa)  
京都大学 医学(系)研究科(研究院)  
教授  
研究者番号:70211662

##### (2) 研究分担者

小池 薫(KOIKE, Kaoru)  
京都大学 医学(系)研究科(研究院)  
教授  
研究者番号:10267164

##### (3) 研究分担者

平川 慶子(HIRAKAWA, Keiko)  
日本医科大学 医学部  
助教  
研究者番号:30165162

##### (4) 研究分担者

辻川 明孝(TSUJIKAWA, Akitaka)  
香川大学 医学部  
教授  
研究者番号:40402846

##### (5) 研究分担者

西山 慶(NISHIYAMA, Kei)  
独立行政法人国立病院機構(京都医療セン  
ター臨床研究センター)・その他部局等  
研究員  
研究者番号:90444970

##### (6) 研究分担者

中西 秀雄(NAKANISHI, Hideo)  
京都大学 医学(系)研究科(研究院)  
助教  
研究者番号:80724278

##### (7) 研究分担者

佐藤 格夫(SATO, Norio)  
京都大学 医学(系)研究科(研究院)  
准教授  
研究者番号:30409205