

令和元年6月3日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11293

研究課題名(和文) 加齢黄斑変性の病態におけるブルッフ膜への加齢性沈着脂質の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a role of age-related lipid accumulation on Bruch's membrane in the pathogenesis of age-related macular degeneration

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)の病態における30代から認める網膜色素上皮(RPE)下の脂質沈着の役割を解明するため、ニデック社の共焦点走査型検眼鏡F10のDR/DLモードでの撮影で認める眼底の黒い陰影を観察したところ、AMDのリスクである加齢、喫煙の影響でより広範囲に認めるため、これが沈着脂質である可能性が示唆された。

次に、老齢のapoEノックアウトマウスのRPE下に脂質沈着を認め、若年マウスと老齢マウスで、脂質沈着(apoE発現)、血管内皮増殖因子発現上昇、レーザー誘導脈絡膜新生血管サイズを比較し、沈着脂質のAMDへの関与を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMDは環境や遺伝素因など多因子が関与する疾患であるが、高度の脂質沈着がAMD発症を直接予測する所見である可能性があり、AMD発症と沈着脂質の程度や分布の関連性について検討することで、AMDの発症リスクを推定することができれば、社会的意義が大きい。

今後、apoEノックアウトマウスの眼底をF10で観察し、黒い陰影が沈着脂質であることを動物実験で実証する。その他、ABCA1ノックアウトマウスなどのコレステロール沈着マウスなども使って実験を行い、免疫組織学的手法と、電子顕微鏡検査も用いて、AMDの病態解明を行う。これにより、AMD発症予防や悪化予防の脂質関連の新薬候補を見いだせる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the role of lipid deposition under retinal pigment epithelium (RPE) from the 30s in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD), black shadows in the fundus observed in DR / DL mode of confocal scanning ophthalmoscope (F10, Nidek, Aichi, Japan) were observed. These shadows were related to age and smoking status, which are well known as a risk of AMD, suggesting that these shadows might represent lipid deposits. Next, apoE knockout mice showed lipid deposition under RPE with aging. The relationship of lipid deposition (apoE expression) to vascular endothelial growth factor expression, size of laser induced choroidal neovascular in young and old mice suggested that deposited lipids might be related to the pathogenesis of AMD.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 網膜色素上皮 ブルッフ膜 脂質 リポフスチン ノックアウトマウス 光障害 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) は、光線暴露を起因とする眼の加齢変化を背景に、黄斑下の慢性炎症により脈絡膜新生血管が発生する滲出型と、徐々に網膜視細胞、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE)、脈絡膜毛細血管が萎縮に至る萎縮型が存在し、いずれも末期には中心視野障害、視力低下を来す。欧米先進国における成人の失明原因の首位であり、我が国でも約70万人が罹患し、失明原因の第4位に位置している。現在、国内に多い滲出型AMDに対して、光線力学的療法に加え、2008年より抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 療法が登場し、約4割の患者は矯正視力0.5以上を維持できるようになった。しかし、ラニズマブやアフリベルセプトなどの抗VEGF薬は、薬価が高額な上、1度の硝子体内注射で約1ヶ月しか薬効を維持することができず、しばしば頻回の投与が必要となる。AMDは加齢変化を背景にした慢性炎症が病態に関与し、治療を行っても生涯にわたって再燃を繰り返す、結局、視力低下に至る症例も多く、また、注射に関連する合併症も皆無ではなく、患者の精神的、肉体的、経済的負担、医療経済の圧迫、高齢化社会におけるQOLの低下など社会的にも多くの問題があり、新たな治療法の開発が求められる。

新しい治療法や予防法の開発には、眼の加齢変化とAMDの病態の関連を解明する必要がある。眼は光線暴露の環境下で視細胞外節が酸化変性を起こすためメンテナンスのために内節の方から新生していて、古くなった外節先端はRPEが貪食して処理しているが、酸化変性した物質がライソゾーム内で処理できずにリポフスチンと呼ばれる顆粒としてRPEの細胞質内に貯蓄してくる。近年の画像機器の進歩で、臨床でも、リポフスチンの自発蛍光を検出することが可能となり、異常な過蛍光所見はAMDの前駆所見であることがわかっている。リポフスチン蓄積は出生直後から起こり、細胞質内を占拠するようになる30代ぐらいからRPE下に脂質が沈着してくることがわかっている (Huang JD, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49:2721-2727, 2008)。脂質沈着はその後、加齢とともに増えていき、沈着した脂質がブルッフ膜の水の透過性を減少させるため (Moore DJ, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36:1290-1297, 1995) RPEの生理的なVEGFの放出による脈絡膜毛細血管の形態維持を妨げる要因であると推察される。また過酸化脂質の産生による慢性炎症の病態との関連が報告されている (Weismann D, et al. *Nature* 478:76-81, 2011)。40代ぐらいから出現するドルーゼンやRPEの色素異常などの所見は、AMDの危険因子であることが疫学調査で明らかである。これらの前駆病変が出現する前の加齢変化を考える場合、脂質沈着が重要であると考えられるが、画像診断で容易に同定できないために注目されず、脂質沈着と前駆病変、さらにはAMDとの関連性に関する研究はほとんど行われていないのが現状であった。しかしながら、インドシアニングリーン蛍光眼底造影の超後期像 (造影開始後3時間~24時間) において、脂質沈着を示唆する低蛍光斑を眼底に認めるという報告があり (Mori K et al. *Retina* 22:309-316, 2002) また、F10という眼底カメラの特殊な撮影方法で、黒い陰影が写り、同様の所見を見ている可能性がある。これらの所見が脂質沈着であることを解明できれば、今後、脂質沈着に関する病態研究が進むと考えられる。

2. 研究の目的

AMDの病態解明のために、出生直後から始まるRPE内へのリポフスチン蓄積に続く、30代頃からのRPE下への脂質沈着のAMDの病態への関与を調べるために、臨床で、加齢眼などで認める脂質沈着を示唆する画像所見に注目し、apoEノックアウトマウスなどの眼に認める沈着脂質の画像所見と比較し、この所見が脂質に由来することを解明し、我々が開発した脂質代謝を評価できるRPE3次元球体培養とマウスに対して人工的にリポフスチン蓄積や光線暴露やレーザー照射を負荷し、病態への影響を調査する。

3. 研究の方法

ボランティアとAMD患者の傍眼のF10画像で見られる陰影とインドシアニングリーン蛍光眼底造影超後期像の低蛍光斑と、ApoEノックアウトマウスなどの脂質沈着マウスの眼底所見を比較し、これらの所見が沈着した脂質であることを確認する。次に、脂質沈着マウスに光線暴露を負荷して、過酸化脂質の産生、VEGF産生亢進、補体の活性化などを免疫組織学的に検証する。また、リポフスチン蓄積を再現した場合や、過剰な光線暴露による網膜色素上皮に対する影響や、レーザー脈絡膜新生血管モデルにおける脈絡膜新生血管の大きさの差異などを調

査する。網膜色素上皮細胞の3次元球体培養で認める脂質の光線暴露の影響や構成成分の分析を行う。

4. 研究成果

加齢黄斑変性 (AMD) の病態における30代から認めるRPE下の脂質沈着の役割を解明するため、ニデック社の共焦点走査型検眼鏡F10のDR/DLモードでの撮影で認める眼底の黒い陰影が、AMDのリスクである加齢、喫煙の影響で広範囲に認めるため、これが沈着脂質である可能性が示唆された。AMDは人種、年齢、喫煙、遺伝素因など多因子が関与して発症する疾患であるが、沈着脂質がAMD発症を直接予測する所見である可能性があり、AMD発症と沈着脂質の程度や分布の関連性について検討することで、加齢黄斑変性の発症リスクを推定することができれば、社会的意義が大きい。

次に、apoEノックアウトマウスが老齢マウスでRPE下に脂質沈着を認め、若年マウスと老齢マウスで、脂質沈着 (apoE)、VEGF発現上昇、レーザー誘導脈絡膜新生血管サイズを比較し、沈着脂質のAMDへの関与を示唆する結果を得た。今後、apoEノックアウトマウスの眼底をF10で観察し、黒い陰影が沈着脂質であることを動物実験で実証する。その他、ABCA1ノックアウトマウスなどのコレステロール沈着マウスなども使って実験を行い、免疫組織学的手法と、電子顕微鏡検査も用いて、AMDの病態解明を行っていく。これにより、AMD発症予防や悪化予防の脂質関連の新薬候補を見いだせる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)(全て査読あり)

1. Yasukawa T, Mori R, Sawa M, Shinojima A, Hara C, Sekiryu T, Oshima Y, Saito M, Sugano Y, Kato A, Ashikari M, Hirano Y, Asato H, Nakamura M, Matsuura K, Kuno N, Kimura E, Nishiyama T, Yuzawa M, Ishibashi T, Ogura Y, Iida T, Gomi F. Fundus autofluorescence and retinal sensitivity in fellow eyes of age-related macular degeneration in Japan. PLoS One. 2019;14:e0213161.
2. Araki T, Ishikawa H, Iwahashi C, Niki M, Mitamura Y, Sugimoto M, Kondo M, Hasegawa A, Kinoshita T, Nishi T, Ogata N, Kato A, Yasukawa T, Takamura Y, Gomi F. Central serous chorioretinopathy with and without steroids: a multicenter survey. PLoS One. 2019;14:e0213110.
3. Usui H, Nishiwaki A, Landiev L, Kacza J, Eichler W, Wako R, Kato A, Noriaki T, Kuwayama S, Ohashi K, Yafai Y, Bringmann A, Kubota A, Ogura Y, Seeger J, Wiedemann P, Yasukawa T. In vitro drusen model: three-dimensional spheroid culture of retinal pigment epithelial cells. J Cell Sci. 2018;132: Epub.
4. Akiyama M, Takahashi A, Momozawa Y, Arakawa S, Miya F, Tsunoda T, Ashikawa K, Oshima Y, Yasuda M, Yoshida S, Enaida H, Tan X, Yanagi Y, Yasukawa T, Ogura Y, Nagai Y, Takahashi K, Fujisawa K, Inoue M, Arakawa A, Tanaka K, Yuzawa M, Kadonosono K, Sonoda K, Ishibashi T, Kubo M. Genome wide association study suggests four variants influencing outcomes with ranibizumab therapy in exudative age-related macular degeneration. J Hum Genet. 2018;63:1083-1091.
5. Kimura M, Yasukawa T, Shibata Y, Kato A, Hirano Y, Uemura A, Yoshida M, Ogura Y. Flattening of retinal pigment epithelial detachments after pneumatic displacement of submacular hemorrhages secondary to age-related macular degeneration. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2018;256:1823-1829.
6. Arai KI, Yasukawa T, Kato A, Kubota A, Usui H, Takase N, Kuwayama S, Ogura Y. Tissue plasminogen activator as an antiangiogenic agent in experimental corneal neovascularization in rabbits. Ophthalmic Res. 2018;59:170-175.
7. Shinojima A, Sawa M, Sekiryu T, Oshima Y, Mori R, Hara C, Sugano Y, Kato A, Asato H, Yuzawa M, Gomi F, Ogura Y, Ishibashi T, Nanri T, Yasukawa T. A multicenter randomized controlled study of antioxidant supplementation with lutein for chronic central serous chorioretinopathy. Ophthalmologica. 2017;237:159-166.

8. Suetsugu T, Kato A, Yoshida M, Yasukawa T, Nishiwaki A, Hasegawa N, Usui H, Ogura Y. Evaluation of peripheral fundus autofluorescence in eyes with wet age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 2016;10:2497-2503.
9. Momozawa Y, Akiyama M, Kamatani Y, Arakawa S, Yasuda M, Yoshida S, Oshima Y, Mori R, Tanaka K, Mori K, Inoue S, Terasaki H, Yasuma T, Honda S, Miki A, Inoue M, Fujisawa K, Takahashi K, Yasukawa T, Yanagi Y, Kadonosono K, Sonoda K, Ishibashi T, Takahashi A, Kudo M. Low-frequency coding variants in CETP and CFB are associated with susceptibility of exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. *Hum Mol Genet*. 2016;25:5027-5034.
10. Ozone D, Mizutani T, Nozaki M, Ohbayashi M, Hasegawa N, Kato A, Yasukawa T, Ogura Y. Tissue plasminogen activator as an anti-angiogenic agent in experimental laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:5348-5354.
11. Shinojima A, Fujita K, Mori R, Kawamura A, Yuzawa M, Yasukawa T. Investigation of the etiology of central serous chorioretinopathy using en face OCT and indocyanine green angiography. *Ophthalmologica*. 2016;236:100-107.
12. Hirahara S, Yasukawa T, Kominami A, Nozaki M, Ogura Y. Densitometry of choroidal vessels in eyes with and without central serous chorioretinopathy by wide-field indocyanine green angiography. *Am J Ophthalmol*. 2016;166:103-111.
13. Ye F, Kaneko H, Hayashi Y, Takayama K, Hwang SJ, Nishizawa Y, Kimoto R, Nagasaka Y, Tsunekawa T, Matsuura M, Yasukawa T, Kondo T, Terasaki H. Malondialdehyde induces autophagy dysfunction and VEGF secretion in the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Free Rad Biol Med*. 2016;94:121-134.
14. Kachi I, Yasukawa T, Kato A, Takase N, Morita H, Kubota A, Hirano Y, Uemura A, Ogura Y. Combination therapy with intravitreal tissue plasminogen activator and ranibizumab for subfoveal type 2 choroidal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol*. 2016;60:179-186.

〔学会発表〕(計4件)

1. Usui H, Kato A, Shimizu H, Terasaki H, Ogura Y, Yasukawa T. Preretinal glial membrane with Rock activation after internal limiting membrane peeling. 第34回アジア太平洋眼科学研究会議 (APAO). Poster 発表. 2019.03.06-09. Bangkok, Thailand.
2. Yasukawa T. Mechanism of macular hole closure by internal limiting membrane peeling. 2019年ベイル硝子体手術会議. 招待講演. 口頭発表. 2019.02.09-12. Vail, USA.
3. Yasukawa T, Ogura Y. Combination therapy of intravitreal tissue plasminogen activator and ranibizumab for type 2 choroidal neovascularization: a pilot study. The 30th meeting of the Club Jules Gonin. 口頭発表. 2016.07.06-09, Bordeaux, France.
4. Masko S, Yasukawa T, Hirahara S, Fujino S, Kato A, Nishiwaki A, Yoshida M, Ogura Y. Visual outcomes of polypoidal choroidal vasculopathy with or without prompt treatment. The 2016 annual meeting of Association for Research of Vision and Ophthalmology (ARVO). Poster 発表. 2016.05.01-05, Seattle, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小椋 祐一郎
ローマ字氏名：Yuichiro Ogura
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：70191963

研究分担者氏名：平野 佳男
ローマ字氏名：Yoshio Hirano
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師
研究者番号（8桁）：40405163

研究分担者氏名：堂前 純子
ローマ字氏名：Sumiko Dohmae
所属研究機関名：中京大学
部局名：応用生物学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：70227700

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。