

令和元年5月14日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20294

研究課題名(和文) アンジオポエチン2阻害によるぶどう膜炎軽症化の検討

研究課題名(英文) The therapeutic effect of anti-Angiopoietin 2 antibody in EAU

研究代表者

岩田 大樹 (IWATA, DAIJU)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70374402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)を用いて、アンジオポエチン(Ang)2阻害薬の治療効果を臨床的重症度の推移ならびに組織学的重症度について検討した。6週齢のC57BL/6マウスにEAUを誘導した。抗Ang2抗体の投与はEAU誘導24時間前と7日目10mg/kg/timeを腹腔内注射した。その後投与日を変更した検討も行ったが抗体投与群、非投与群に有意な差がみられなかった。一方、抗Ang2抗体とともに抗VEGF抗体を併用した場合の炎症抑制効果について非特異的急性前眼部炎症のモデルであるエンドトキシン誘導ぶどう膜炎(EIU)マウスを用いた検討を行ったところ、炎症抑制効果がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回のEAUマウスモデルを用いた検討では抗Ang2抗体単独での十分な炎症抑制効果を示すことはできなかった。しかしながらEIUマウスモデルを用いた検討では抗Ang2抗体と抗VEGF抗体と併用することにより炎症抑制効果が得られる可能性を示すことができた。またその要因の一つとしてNF- κ Bを介した経路が関与していることが考えられた。このようにAng2阻害薬については投与量や投与間隔、そして他の薬剤との組み合わせをさらに検討することでEAUにおいても有意な治療効果が得られる可能性がある。ひいては将来的な臨床応用につながることも期待できる薬剤と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the therapeutic effect of anti-Angiopoietin(ANG) 2 antibody (Ab) with Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) mice. Anti-ANG2 Ab was administered twice at day-1 and day7 after EAU induction. In this study, both clinical score and histological score had no significant difference between anti-ANG2 Ab-treated group and untreated group. However, we elucidated the therapeutic effect of combination therapy with anti-ANG2 Ab and anti-VEGF Ab in Endotoxine induced uveitis (EIU) mouse model.

From these results, if EAU mouse is treated with monotherapy with anti-ANG2 Ab, it is necessary to re-consider the amount, timing, and frequency of administration. On the other hand, this combination therapy may have a potential to treat intraocular inflammation.

研究分野：眼科

キーワード：ぶどう膜炎 アンジオポエチン2 実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ぶどう膜炎は、先進国において40歳以上の中途失明原因の約10%を占める疾患である。世界25カ所を調査した研究では、ベーチェット病のぶどう膜炎患者の1/4が現在もなお失明に至るといふ厳しい現実がある (Kitaichi N et al. Br J Ophthalmol, 2007)。特に青壮年での発症が多く (Kitamei H et al. Acta Ophthalmol, 2009)、患者本人はもちろん社会的、経済的にも極めて重要な問題といえる。

ぶどう膜炎の治療には主としてステロイド薬、消炎鎮痛薬 (NSAIDs)、免疫抑制薬が用いられてきた。しかし実際には、これらの治療薬を用いても重篤な視力障害に陥る例をしばしば経験する。また全身的副作用により治療を中断せざるを得ないことも多い。全身への影響を懸念せずに、より効果の高い治療法を開発するためには、眼内で炎症を制御する因子をターゲットとすることが重要と考えられる。

近年では難治性ベーチェット病患者への抗 tumor necrosis factor (TNF)- 抗体に代表される生物学的製剤のような標的を絞った治療の開発研究・臨床応用が進んできている。2007年からはベーチェット病の難治性網膜ぶどう膜炎に対してインフリキシマブ (Ohno S et al. J Rheumatol, 2004; Goto H et al. Ocul Immunol Inflamm, 2018) が、そして2016年9月からは非感染性ぶどう膜炎に対してアダリムマブが保険適応となり、生物学的製剤はぶどう膜炎治療においても重要な位置を占めるに至っている。

これらの治療により従来の治療に抵抗する難治性ぶどう膜炎を以前よりは制御できるようになってきてはいるものの、それでも一次無効や初期には治療効果が得られても徐々に効果が不十分となる二次無効といった治療抵抗例はいまだに存在する。これらのことから新たな治療標的を有する薬剤の開発がいまだに強く望まれている。

2. 研究の目的

血管内皮細胞は血液成分が血管外に漏出しないようバリアとして機能している。炎症時には血管バリア機能が低下して血管透過性が亢進し、炎症細胞が血管外へ遊出する。アンジオポエチン (Ang) 1 は、Tie2 に対するリガンドとして、血管内皮細胞と平滑筋細胞または周皮細胞の結合を強化し、血管の安定と成熟を促進させる。炎症時の内皮ではリンパ球の遊走・接着が促進されるが、Ang1-Tie2 からのシグナルは PI3K を介した細胞死抑制や、IKK シグナルを介した NF- κ B などの転写因子に関与し抗炎症に作用していることが報告されている (Tadros, A et al. Blood, 2003) (Hughes, D. P et al. Circ Res, 2003)。

一方、Ang2はAng1の生理的拮抗タンパクでありTie2を競合的に阻害することで、血管内皮細胞と周皮細胞との結合を疎にして血管壁を不安定な状態に導き新規血管分枝の発芽を誘導する。さらに内皮細胞上の白血球接着分子の発現を制御して炎症細胞の浸潤を誘導することが報告されている。したがってAng2を治療標的の分子とし、これを阻害することで難治性自己免疫性眼炎症を軽症化できる可能性がある。しかし、ぶどう膜炎に対する治療効果については全く不明であった。

本研究計画では、ぶどう膜炎動物モデルの網膜で Ang2 の発現と役割を検討する。さらに抗 Ang2 抗体を用いて治療効果を検討した。

3. 研究の方法

ヒト難治性内因性ぶどう膜炎の動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis; EAU) を用いて、アンジオポエチン (Ang) 2阻害薬の治療効果を臨床的重症度の推移ならびに組織学的重症度について検討した。6-8週齢のB10.BRマウスにヒト視細胞間レチノイド結合蛋白 (IRBP)由来合成ペプチドと結核菌強化完全フロインドアジュバントエマルジョンで皮下免疫した。動物愛護の観点から足踵ではなく、背部皮下注射を選択する。追加免疫として百日咳菌毒素を0.1 μ g腹腔内投与してEAUを惹起した。抗Ang2抗体の投与はEAU誘導24時間前と7日目に10mg/kg/timeを腹腔内注射し、対照群には基剤のみを投与した。

免疫7日後から3から4日おきに21日目まで、麻酔下で散瞳薬と検眼鏡を用いて経瞳孔的にマウスの眼底検査をおこなった。当教室では我々の既報 (Namba K et al. J Immunol, 2000) に基づき、従来困難であった眼底検査を生きのまま評価する方法を確立しており、同一マウスの眼炎症所見の変化を経時的に評価した (臨床的重症度)。21日目にマウスを安楽死させ、眼球を摘出した。固定後組織標本作製し、組織学的に重症度を評価検討した (病理組織学的重症度)。また抗 Ang2 抗体単独治療効果の検討に加え、抗 Ang2 抗体と抗 Vascular endothelial growth factor (VEGF) 抗体の併用療法の治療効果の検討について、炎症性眼疾患モデルとして外毒素による非特異的急性前眼部炎症のモデルであるエンドトキシン誘導ぶどう膜炎 (endotoxin-induced uveitis; EIU) マウスを用いて検討した。

6週齢のC57BL/6マウスを用いて、治療として抗 Ang2 抗体と抗 VEGF 抗体の bi-specific 抗体 20mg/kg、抗 Ang2 抗体 10mg/kg を単独投与、抗 VEGF 抗体 10mg/kg を単独投与、非治療群を作成した。抗体投与は EIU 誘導 24 時間前に行った。EIU 誘導から 24 時間後に前房水を採取し、浸潤した白血球数を測定した。さらに抗体による抗炎症作用の分子機構を検索するため、摘出眼球を抗 NF- κ B 抗体で免疫染色を行い NF- κ B p65 の核内への移行を検討し、ぶどう膜炎による網膜ぶどう膜の障害と NF- κ B の関与について評価した。

4. 研究成果

今回の検討で、EAU マウスに対する抗 Ang2 抗体の単独治療では対照群と比べて臨床的重症度ならびに組織学的重症度は有意な改善がみられなかった。また抗体の投与時期を変更した検討においても有意な改善がみられなかった。一方で、EIU マウスモデルを用いた抗 Ang2 抗体と抗 VEGF 抗体の併用療法の治療効果の検討においては前房水中で白血球の浸潤が有意に減少した (図 1)。さらに抗 NF- κ B 抗体を用いた免疫染色では NF- κ B p65 の核内への移行が治療群で減少しており (図 2)、治療効果の要因の一つとして NF- κ B を介した経路が関与していることが示唆された。

これらの結果から、抗 Ang2 抗体の単独投与による EAU モデルに対する治療効果は十分に確認されなかったが、EIU モデルにおいては抗 Ang2 抗体と抗 VEGF 抗体の併用療法で有意な治療効果がみられた。抗 Ang2 抗体の投与量、投与間隔の調整以外に、抗 VEGF 抗体などの他の薬剤との組み合わせで治療することによりぶどう膜炎の動物モデルにおいても治療効果が得られる可能性があり、将来的な臨床応用につながることも期待できる薬剤であると考えられた。

図 1. 抗 Ang2 抗体と抗 VEGF 抗体の併用療法による EIU マウスの前房水中に浸潤した白血球数の変化

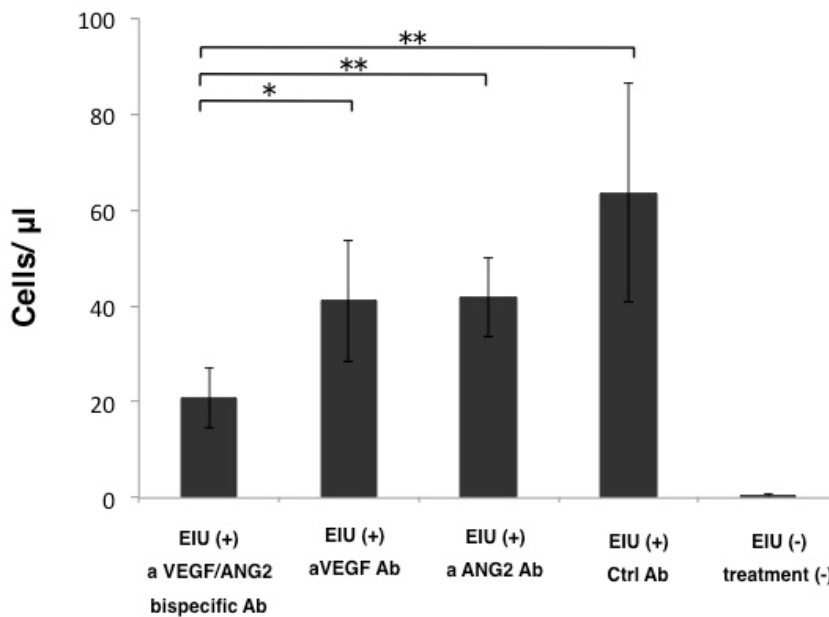
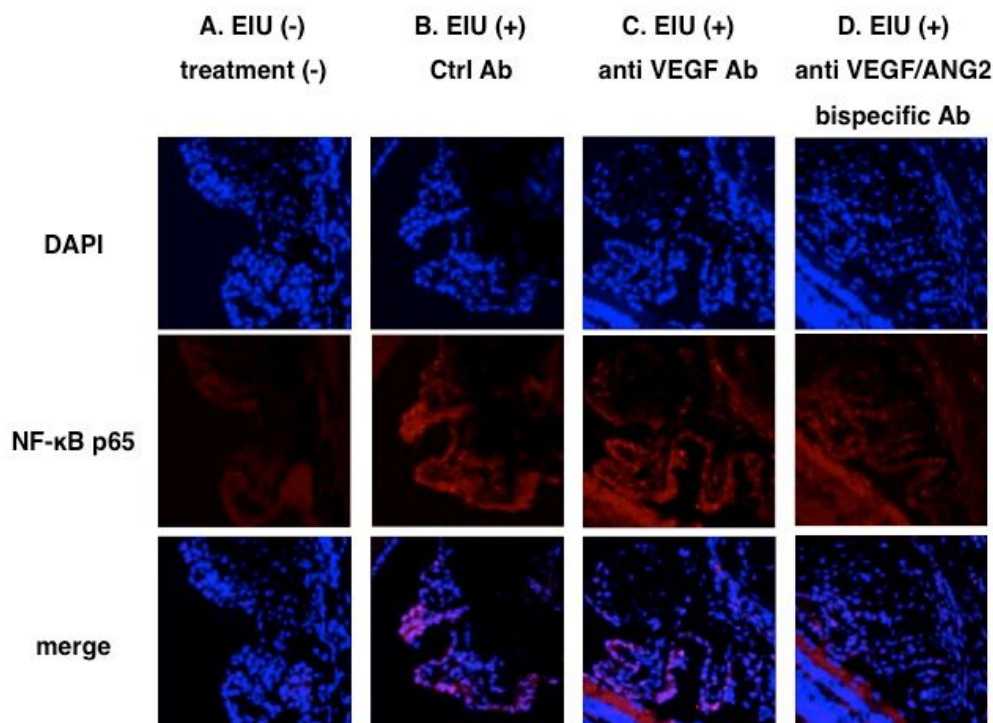


図 2. 抗 Ang2 抗体と抗 VEGF 抗体の併用療法による EIU マウスの毛様体における NF- κ B p65 の核内移行の抑制



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Sakai M, Takase H, Namba K, Mizuuchi K, Iwata D, Ishida S. Two cases of cytomegalovirus panuveitis in immunocompetent patients. *Am J Ophthalmol Case Rep.* 査読有, 2018, 10 巻, 189-191. DOI: 10.1016/j.ajoc.2018.01.025.
2. Hirooka K, Saito W, Namba K, Mizuuchi K, Iwata Daiju, Hashimoto Y, Ishida S. Early post-treatment choroidal thickness to alert sunset glow fundus in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease treated with systemic corticosteroids. *PLoS One.* 査読有, 2017, e0172612. DOI: 10.1371/journal.pone.0172612
3. Horie Y, Meguro A, Ohta T, Lee Eun Bong, Namba K, Mizuuchi K, Iwata D, Mizuki N, Ota M, Inoko H, Ishida S, Ohno S, Kitaichi N. HLA-B51 Carriers are Susceptible to Ocular Symptoms of Behçet Disease and the Association between the Two Becomes Stronger towards the East along the Silk Road: A Literature Survey. *Ocul Immunol Inflamm.* 査読有, 25 巻, 2017, 37-40. DOI: 10.3109/09273948.2015.1136422
4. Iwata D, Mizuuchi K, Aoki K, Horie Y, Kase S, Namba K, Ohno S, Ishida S, Kitaichi N. Serial Frequencies and Clinical Features of Uveitis in Hokkaido, Japan. *Ocul Immunol Inflamm.* 査読有, 2017, 25 巻, S15-S18. DOI: 10.1080/09273948.2016.1184286
5. 岩田大樹、北市伸義. ぶどう膜炎 ベーチェット病. 特集/眼科における薬物療法パーフェクトガイド. *Monthly Book OCULISTA.* 査読無, 48 巻, 2017, 59-64
6. Iwata D, Mizuuchi K, Aoki K, Horie Y, Kase S, Namba K, Ohno S, Ishida S, Kitaichi N. Serial frequencies and clinical features of uveitis in Hokkaido, Japan. *Ocul Immunol Inflamm.* 査読有, 20 巻, 2016, 1-4. DOI: 10.1080/09273948.2016.1184286
7. Satoh M, Namba K, Kitaichi N, Endo N, Kitamei H, Iwata D, Ohno S, Ishida S, Onoe K, Watarai H, Taniguchi M, Ishibashi T, Stein-Streilein J, Sonoda K, Kaer L V, Iwabuchi K. Invariant natural killer T cells play dual roles in the development of experimental autoimmune uveoretinitis. 査読有, *Exp Eye Res.* 153 巻, 2016, 79-89. DOI: 10.1016/j.exer.2016.10.003
8. Tagawa Y, Namba K, Mizuuchi K, Takemoto Y, Iwata D, Uno T, Fukuhara T, Hirooka K, Kitaichi N, Ohno S, Ishida S. Choroidal thickening prior to anterior recurrence in

- patients with Vogt-Koyanagi- Harada disease. Br J Ophthalmol. 査読有, 100 巻, 2016, 473-477. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2014-306439.
9. Takemoto Y, Namba K, Uno T, Mizuuchi K, Iwata D, Ohno S, Hirooka K, Hashimoto Y, Saito W, Sugiyama K, Ishida S. Choroidal circulation impairment during the anterior recurrence of Vogt-Koyanagi- Harada disease confirmed with indocyanine green angiography and laser speckle flowgraphy. Acta Ophthalmol. 査読有, 94 巻, 2016, e629-e636. DOI: 10.1111/aos.13024.
 10. 岩田大樹、南場研一. ぶどう膜炎の救急. 特集/眼科医のための救急マニュアル. Monthly Book OCULISTA. 査読無, 44 巻, 2016, 19-25

〔学会発表〕(計 38 件)

1. Iwata D, Namba K, Yamamoto T, Mizuuchi K, Saito W, Ohno S, Kitaichi N, Ishida S. Clinical features of intraocular inflammation in Hokkaido University Hospital, 14th Congress of the International Ocular Inflammation Society (IOIS), 2017
2. 岩田大樹、南場研一、北市伸義、水内一臣、長谷敬太郎、福原崇子、加瀬 諭、石田 晋. フォークト・小柳・原田病の新鮮例における画像検査の診断的有用性, 第 71 回日本臨床眼科学会, 2017
3. 岩田大樹. 自己免疫性ぶどう膜炎の新たな治療薬とその抑制機序の解析. 学術奨励賞受賞講演, フォーサム 2017 大阪, 2017
4. Iwata D. Practical analysis of uveitic macular edema with optical coherence tomography, 1st Japan-Taiwan Vitreoretinal Joint Meeting 2016, 2016
5. 岩田大樹. 眼炎症疾患におけるフルオレセイン蛍光標識白血球を用いたイメージングの検討. シンポ ジウム「眼炎症疾患におけるトランスレーショナルリサーチ」, 第 120 回日本眼科学会総会, 2016
(他 33 件)

〔図書〕(計 4 件)

1. 岩田大樹、南場研一 他, 金原出版. 主訴と所見からみた眼科 common disease(60 巻). 2018, 1146-1150
(他 3 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:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。