

令和 6 年 6 月 3 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・医学研究院・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。EAUマウスに対して、Ang2阻害効果をもつ抗Ang2抗体と非特異的抗体(対照)をEAU誘導の前日から5日毎に計5回投与した群を作製し、臨床的重症度を経時的(3-4日毎)に観察し、21日目に眼球を摘出して病理組織学的重症度を評価した。EAUマウスの臨床的重症度と病理組織学的重症度は、抗Ang2投与群では対照群と比較して有意に低下した($p<0.05$)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Ang2の阻害でEAUの臨床的重症度と病理組織学的重症度が低下することを明らかとした。Ang2を阻害したことでAng1優位となり、内皮細胞上の白血球接着分子が減少し、炎症が軽減したと考えられる。この結果から、Ang2が非感染性ぶどう膜炎の炎症の進展に関与しており、Ang2の阻害が非感染性ぶどう膜炎の治療に有効である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of angiopoietin (Ang) 2 inhibitor treatment on clinical and histological severity of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). 6-week-old C57BL/6 mice were induced EAU. A group of EAU mice was created in which an anti-Ang2 antibody and a non-specific antibody (control) were administered a total of 5 times every 5 days starting the day before EAU induction, the clinical severity was observed over time (every 3-4 days), and the eyes were removed on day 21 to evaluate histopathological severity. The clinical and histopathological severity of the EAU mice was significantly reduced in the anti-Ang2 group compared to the control group ($p<0.05$).

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った厳しい現実がある (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

非感染性ぶどう膜炎患者におけるAng1、Ang2ならびにVEGFAの眼局所でのタンパク濃度の変化を調べるため、硝子体液を用いた検討を行った。対象は特発性ぶどう膜炎患者16名 (ぶどう膜炎群)、非炎症性眼疾患患者16名 (対照群) とし、硝子体手術時に採取された硝子体液中のAng1、Ang2、VEGFA、炎症性サイトカインであるinterferon (IFN)- γ 、TNF- α 、interleukin (IL)-17のタンパク濃度をMagnetic Luminex Assayを用いて測定した。

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炎 (experimental autoimmune uveoretinitis; EAU) マウスを用いた検討では、B10.BRマウスにヒト網膜視細胞間レチノイド結合蛋白由来ペプチド (K2ペプチド) とcomplete Freund's adjuvant (CFA) の懸濁液を皮下に注射して免疫し、EAUを惹起した。免疫後、11、16、21日目のマウスから網脈絡膜を摘出し、リアルタイム定量PCR法を用いて、Ang1、Ang2、VEGFAのmRNAの発現を測定し、K2ペプチドを除いて免疫した対照群との結果を比較した。

また、EAUに対して、抗Ang2抗体、抗VEGFA抗体、抗Ang2抗体と抗VEGFA抗体の両方、抗Ang2/VEGFA二重特異性抗体、非特異的抗体 (対照群) をそれぞれ免疫の前日から5日毎に計5回投与し、既報 (Namba K et al. J Immunol, 2000) に基づき、臨床的重症度を経時的 (3-4日毎) に観察した。また21日目の各群のマウスの眼球を摘出して病理組織学的重症度を評価した。

4. 研究成果

(1) 硝子体液中のAng1、Ang2、VEGFAのタンパク濃度

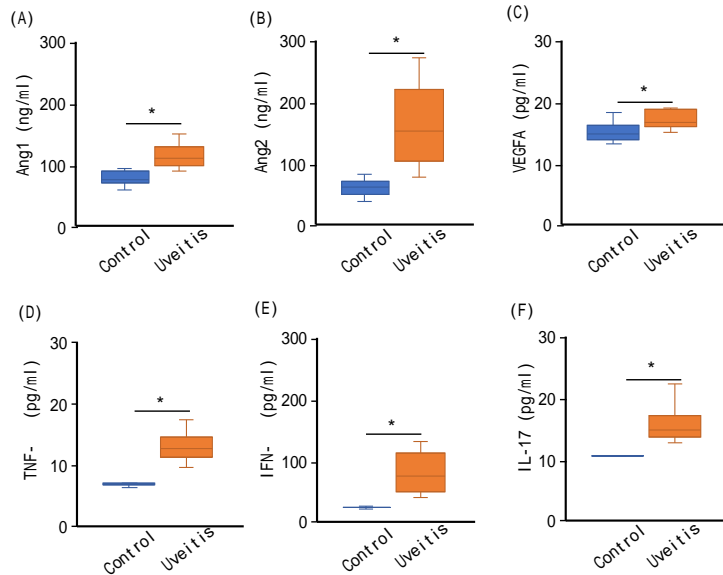
非感染性ぶどう膜炎の病態におけるAng2とVEGFAの関与を明らかにするために、非感染性ぶどう膜炎患者ならびに対照群として非炎症性眼疾患患者の硝子体液中のAng1、Ang2、VEGFA、炎症性サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ 、IL-17のタンパク濃度を測定した。

ぶどう膜炎群の硝子体液中のAng1、Ang2、VEGFA、TNF- α 、IFN- γ 、IL-17のタンパク濃度 (117.2 \pm 26.9ng/ml、194.4 \pm 122.6ng/ml、38.0 \pm 73.5pg/ml、13.0 \pm 2.1pg/ml、80.77 \pm 30.4pg/ml、15.7 \pm 2.5pg/ml) は、対照群 (78.4 \pm 9.7ng/ml、60.6 \pm 11.79ng/ml、17.0 \pm 6.0pg/ml、

6.9±0.3pg/ml、23.4±1.1pg/ml、10.4±0.2pg/ml)と比べて有意に高かった(図1)。また、ぶどう膜炎群のAng2はAng1よりも有意に高かった(p<0.05)のに対して、対照群ではAng2がAng1よりも有意に低かった(p<0.01)。

図1 . 硝子体液中の Ang1, Ang2, VEGFA と炎症性サイトカイン

ぶどう膜炎群(Uveitis)ならびに対照群(Control)の (A)Ang1、(B)Ang2、(C)VEGFA ならびに炎症性サイトカインである(D)TNF-、(E)IFN-、(F)IL-17の硝子体液中のタンパク濃度 *p<0.05.



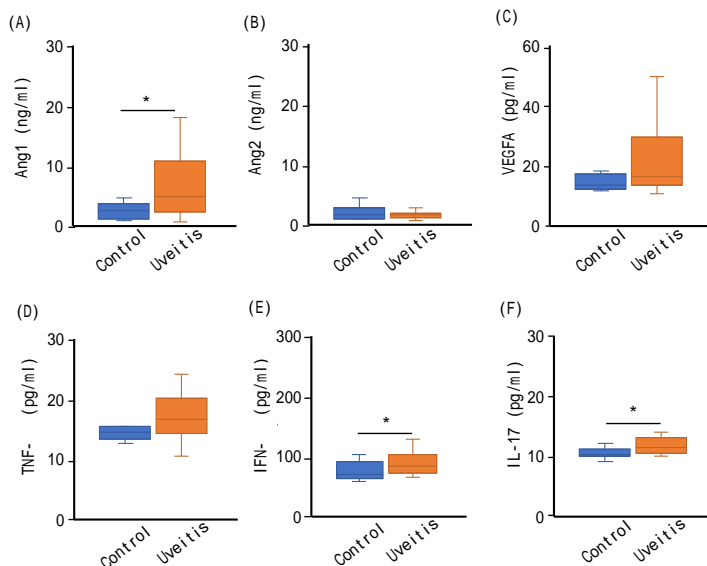
(2) 血清中の Ang1, Ang2, VEGFA のタンパク濃度

硝子体液と同様に、血清中の Ang1, Ang2, VEGFA、ならびに炎症性サイトカインである TNF-、IFN-、IL-17のタンパク濃度を測定した。

ぶどう膜炎群の血清中の Ang1、IFN-、IL-17(6.9±5.8ng/ml、89.9±21.3pg/ml、12.0±1.8pg/ml)は、対照群(2.5±1.3ng/ml、75.2±14.8pg/ml、10.5±0.9pg/ml)と比べて、有意に高かった(図2; p<0.05)。一方、血清中 Ang2、VEGFA、TNF- については、両群間で有意差はなかった(p=0.16-0.91)。また、Ang1とAng2を比較すると、ぶどう膜炎群ではAng1がAng2よりも有意に高値を示したが(p<0.05)、対照群では差はみられなかった。さらに、血清中の Ang1、Ang2、VEGFA、TNF-、IFN-、IL-17のタンパク濃度を非感染性ぶどう膜炎の原因疾患別に検討してみたものの、群間に有意差はみられなかった。

図2 . 血清中の Ang1, Ang2, VEGFA と炎症性サイトカイン

ぶどう膜炎群(Uveitis)ならびに対照群(Control)の (A)Ang1、(B)Ang2、(C)VEGFA、(D)TNF-、(E)IFN-、(F)IL-17の血清中のタンパク濃度。 *p<0.05.

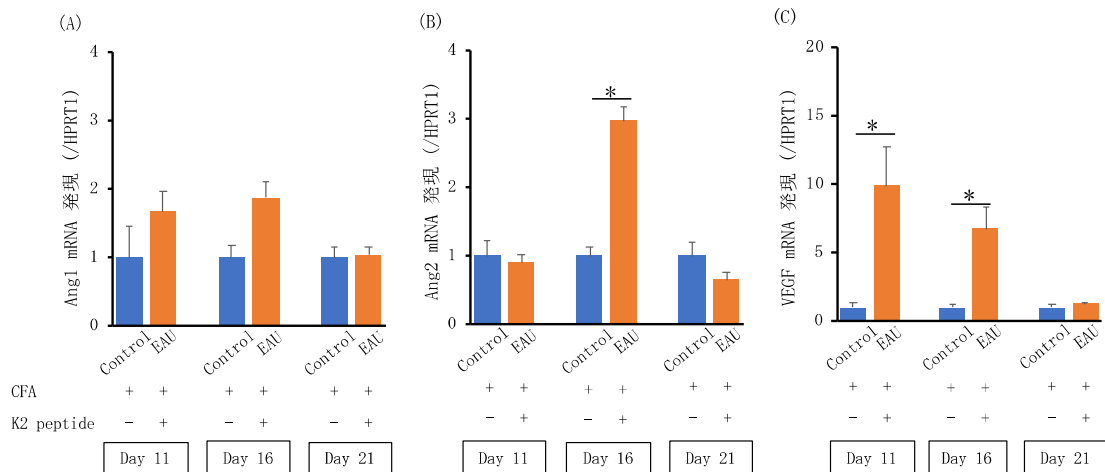


(3) EAU の網脈絡膜組織における Ang1、Ang2、VEGFA の mRNA 発現

EAU マウスおよび網膜抗原をのぞいて免疫したコントロールマウス(対照群)由来の網脈絡膜組織の Ang1、Ang2 および VEGFA の mRNA 発現の EAU 経過中の経時的変化を検討した(n=6)。Ang1 の mRNA 発現には、EAU 経過中に EAU 群と対照群の間で有意差はみられなかった(図 3A; p=0.06-0.85)。一方、Ang2 の mRNA 発現は、免疫後 16 日目において EAU 群が対照群よりも有意に亢進した(図 3B, p<0.05)。VEGFA の mRNA 発現は、免疫後 11 日目および 16 日目に EAU 群で対照群と比べ有意に亢進した(図 3C; p<0.05)。

図 3. EAU マウスの網脈絡膜組織における mRNA 発現の経時的変化

コントロールマウス(Control)と EAU マウス(EAU)における網脈絡膜組織の Ang1、Ang2、VEGFA mRNA 発現の経時的変化 *p<0.05

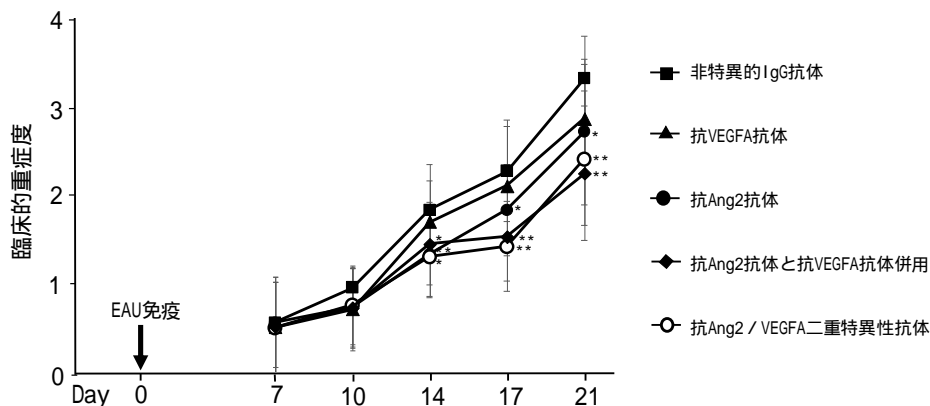


(4) Ang2 と VEGFA の阻害による EAU の重症度の変化

EAU に対する Ang2 と VEGFA の阻害による炎症抑制効果を検討するため、それぞれの抗体の投与群での臨床的重症度の検討を行った。EAU の経過中の各治療群の臨床的重症度を図 4 に示す(n=18-20)。抗 VEGFA 抗体投与群では、対照群(非特異的 IgG 抗体投与群)の臨床的重症度より有意な変化ではなかったものの、低い傾向を示した。抗 Ang2 抗体投与群では、14 日目(p<0.01)、17 日目(p<0.05)、21 日目(p<0.05)において対照群よりも有意に低値であった。さらに、二重阻害群(抗 Ang2 抗体と抗 VEGFA 抗体の併用投与群および抗 Ang2/VEGFA bispecific 抗体投与群)は、EAU 経過中に類似した臨床経過を示し、これらの臨床的重症度は 14 日目(p<0.05)、17 日目(p<0.01)、21 日目(p<0.01)に対照群よりも有意に低く、それぞれの単独阻害群よりも低い傾向にあった。

図 4. EAU の臨床的重症度の推移

対照群(非特異的 IgG 抗体)と各治療群(抗 VEGFA 抗体、抗 Ang2 抗体、抗 Ang2 抗体と抗 VEGFA 抗体併用、抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体)の臨床的重症度の推移 *p<0.05 (対照群との比較)

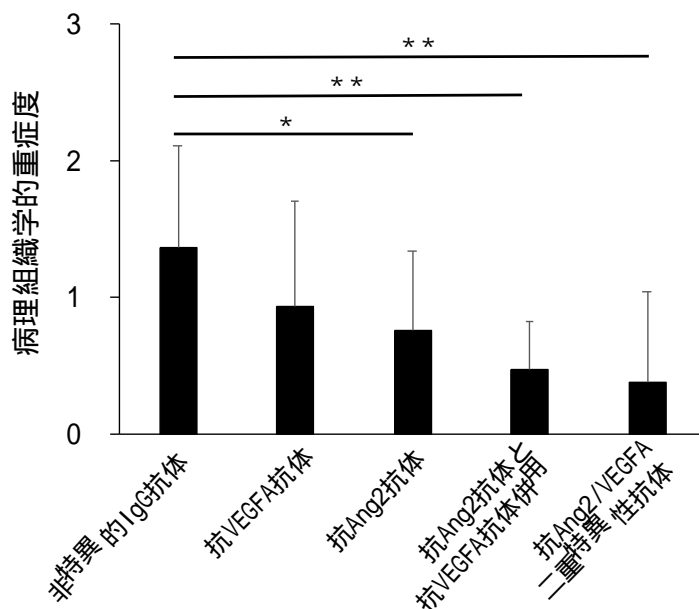


次に、それぞれの治療群の病理組織学的重症度の評価を行った。結果を図5に示す(n=18-20)。抗 VEGFA 抗体投与群(0.9±0.8)では、対照群(1.4±0.7)と比べ低い傾向にあったが、有意な差は認められなかった(p=0.12)。抗 Ang2 抗体投与群(0.8±0.6)は対照群に比べ、有意に低かった(p<0.05)。また、二重阻害群(抗 Ang2 抗体と抗 VEGFA 抗体治療群; 0.5±0.4、抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体治療群; 0.4±0.6)では、対照群(1.4±0.7)よりも有意に低く(p<0.01)、それぞれの単独阻害群よりも低い傾向にあった。

図5. EAU の病理組織学的重症度

対照群(非特異的 IgG 抗体)と各治療群(抗 VEGFA 抗体、抗 Ang2 抗体、抗 Ang2 抗体と抗 VEGFA 抗体併用、抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体)の病理組織学的重症度

*p<0.05, **p<0.01 (対照群との比較)



本研究では、Ang2 および VEGFA の眼炎症病態への関与について検討し、非感染性ぶどう膜炎患者の硝子体液中において Ang2 および VEGFA のタンパク濃度が高いこと、EAU の網脈絡膜において Ang2 および VEGFA の mRNA 発現が亢進すること、そして Ang2 と VEGFA の阻害により EAU の臨床的重症度と病理組織学的重症度が低下することを明らかにした。Ang2 は、NF- κ B を介して内皮細胞上の白血球接着分子の発現を上昇させることにより炎症細胞の浸潤を誘導すると報告されており (Zhang et al. 2003; Imhof and Aurrand-Lions 2006; Scholz et al. 2015)、Ang2 を阻害したことで NF- κ B の活性が抑制され、炎症が軽減したと考えられる。また、VEGFA には Ang2 の細胞外への分泌を促進させる働きに加え、IL-1、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を増幅する働きや白血球遊走を促進する働きがあることも知られている (Heil et al. 2000; Murakami et al. 2006; Koch and Claesson-Welsh 2012; Jeltsch et al. 2013)。このようなメカニズムが本研究で明らかとしたぶどう膜炎の眼局所での VEGFA や Ang2 の上昇、ならびにこれらの分子を二重阻害することによる EAU の炎症抑制効果の要因となっていることが考えられる。

Ang2 と VEGFA が非感染性ぶどう膜炎の炎症の進展に関与しており、Ang2 と VEGFA の二重阻害が非感染性ぶどう膜炎の治療に有効である可能性が示された。ただし臨床的な使用にはさらに抗 Ang2 抗体の投与量、投与間隔の調整について検討する必要があるが、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。

引用文献