

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16963

研究課題名(和文)難治性網膜疾患の進行防止と、VEGFに依存しない追加治療法の充実

研究課題名(英文)The development of novel VEGF non-dependent therapy for the refractory retinal diseases

研究代表者

兼子 裕規(Kaneko, Hiroki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：20647458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：増殖硝子体網膜症患者の増殖膜ではCaveolin-1の発現が亢進していた。Caveolin-1は網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換を抑制した。ヒト硝子体中におけるmicroRNAの発現と、増殖硝子体網膜症の関連性について総説を作成した。糖尿病モデルラットではエイコサペンタエン酸(EPA)の給餌によって網膜電図の律動様小波(OP)が改善された。ミュラー細胞中の脳由来栄養因子(BDNF)がEPAにより上昇した。加齢黄斑変性の研究では、AluをヒトRPE細胞およびマウス眼球内に投与し、IL1・IL18の上昇を確認しLamivudineによって抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、現在加齢黄斑変性・糖尿病黄斑浮腫といった主要網膜疾患の多くが抗VEGF治療薬に強く依存しており、同時に抗VEGF治療薬が著効しない症例で治療の選択肢が著しく制限されることや抗VEGF薬の負の要素が注目されづらい状態を打開する策を模索するものである。VEGF受容体R2は網膜神経細胞に発現していることから、VEGFは網膜神経細胞の活性とも関連があり、糖尿病網膜症に対する抗VEGF薬使用には負の影響が懸念される。我々が確認したEPAによる網膜神経細胞保護効果は、糖尿病網膜症の長期的な神経保護という点で非常に重要であり、社会的失明患者を減少させる手段として検討の余地が十分あると考える。

研究成果の概要(英文)：Caveolin-1 was enhanced in the proliferation membrane of patients with proliferative vitreoretinopathy, and we confirmed similar changes in the mouse eye. Caveolin-1 was expressed in proliferating tissue has an effect of suppressing epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. Attenuation of the oscillatory potential (OP) wave of the electroretinogram (ERG) was confirmed in diabetic model rats and it was improved by oral administration of eicosapentaenoic acid (EPA). In addition, brain-derived trophic factor (BDNF) in Muller cells was elevated by EPA intake. In studies of age-related macular degeneration, Alu was administered into human RPE cells and in the eye of mice to confirm elevation of IL1 and IL18 and the reverse transcriptase inhibitor Lamivudine suppressed the increase of IL1 and IL18.

研究分野：網膜硝子体学

キーワード：VEGF 糖尿病網膜症 加齢黄斑変性 増殖硝子体網膜症 caveolin-1 エイコサペンタエン酸 ミュラー細胞 網膜電図

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

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) は先進国の失明原因第 1 位の疾患である。AMD は大きく滲出型(wet AMD)と萎縮型(dry AMD)に分けられる。Wet AMD の原因は脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization: CNV)であり、抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 薬の硝子体内投与などが一定の治療効果を出しているが、再発症例も決して少なくなく、抗 VEGF 薬だけでない更なる治療法の開発が期待されている。一方 dry AMD は網膜色素上皮細胞(RPE)の変性が主病態であるが、長らくその原因は明らかにされてこなかった。我々はこれまで wet AMD の新規治療ターゲットとして VEGF に依存しないヒスタミン受容体 H4(HRH4)を提案し(Kaneko H, *Br J Pharmacol*, 2014)、さらに名古屋大学工学部との共同研究で開発されたプラズマ賦活液(PAM)に抗腫瘍作用、抗血管新生作用があることを発見し、これらが wet AMD の新規治療法になり得ることを報告した(Ye F, Kaneko H, *Sci Rep*, 2015)。一方で dry AMD の研究では、逆転写因子阻害薬(NRTI) が NLRP3 inflammasome を阻害する効果を持つことが発表され(Fowler BJ, *Science*, 2014)、我々は共同研究者としてこのプロジェクトに参加した。

網膜剥離は、硝子体の牽引など様々な原因によって、感覚網膜が RPE から離れてしまう疾患である。手術器具や診断器具の発達によって解剖学的回復は 90%以上見込まれるようになった。しかし、黄斑部が剥離してしまった症例では視機能の回復が不十分であることなど、機能面ではまだまだ改善すべき問題点が多く残っている。また重症の網膜剥離では、時に増殖硝子体網膜症(PVR)に進行する症例があり、一旦 PVR になってしまうと仮に解剖学的復位が得られたとしても視機能の消失は著しい。これらのことから、網膜剥離に対するより良い治療成績を得るためには、視細胞の損傷を減少させ、PVR への進行を予防することが鍵と言える。

また糖尿病網膜症(DR)/糖尿病黄斑浮腫(DME)においても幾つかの問題点が残っている。例えば、重症 DR の手術をする際、術前に抗 VEGF 薬を投与することが多くなったが、時に増殖膜の牽引が悪化し網膜剥離が合併することがあり、増殖膜の牽引を除去するために治療戦略改善の必要性がある。一方 DME に対しは抗 VEGF 薬が浮腫の改善効果を示しているが、何度注射をしても浮腫が改善しない症例も多い。なぜ患者間で抗 VEGF 薬への治療反応性に著しい違いが生じるのか、原因を追求する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は AMD に対しては自施設で内服薬の臨床治験を開始へむけて準備し、また網膜剥離・糖尿病網膜症に対しては現在持ち合わせている実験結果から、社会にインパクトと貢献度の高い、新規治療薬開発に繋がる研究成果を報告する。また、糖尿病モデルラットを用いた実験では、 ω -3 脂肪酸の eicosapentaenoic acid (EPA)内服によって、糖尿病モデルラットの網膜電図で機能温存が確認された。これらのことから、IL-17、EPA をキーワードとして、DR/DME に対する治療法開発を進める。

3. 研究の方法

(1) 逆転写酵素阻害薬(NRTI)の RPE 細胞保護に関する研究を進める

NRTI による RPE の細胞保護効果は、前述した通り既に国際学会のシンポジウムで発表しており、すみやかに研究論文作成に取り掛かる。具体的には、RPE の萎縮を *in vivo*, *in vitro* で誘導し、NRTI 投与による inflammasome の抑制と、それに伴う細胞死の抑制を

証明する。

(2) microRNA の網膜剥離眼球内での作用について検討する

我々の予備実験として、網膜剥離患者の手術時に網膜下液・硝子体液を採取し microRNA の PCR array を行い、対照眼のそれと発現パターンを比較した。その結果、対照眼では発現が確認されず、網膜剥離眼にのみ発現し、しかも網膜下液に強く発現が確認された miR148 に注目した。この miR148 の網膜視細胞・RPE に対する作用を *in vitro* で検討し、既に研究報告した(Takayama K, **Kaneko H** et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016)。そこで今後、miR148 の発現量が網膜剥離から増殖硝子体網膜症へ進行する予測因子となり得るかを検討する。具体的には、網膜剥離の臨床所見と miR148 の発現量とに科学的な関係があるかを統計学的に検討する。

(3) Caveolin-1 が増殖硝子体網膜症(PVR)の発症を促進するメカニズムを解明する

microRNA の予備実験と同様に、自分で手術した PVR 患者の増殖膜を術中に採取し、mRNA・タンパクの発現を確認した。その結果、Caveolin-1 の発現が亢進していることを発見し、さらに同様の变化を野生型マウスに作成した PVR 眼球でも確認した。そこで、PVR 発症における Caveolin-1 の分子生物学的意義について検討する。具体的には、Caveolin-1 ノックアウト(Cav1KO)マウスを入手し、同様に PVR を作成する。その後組織を採取し、増殖性変化のメカニズムとして重要である上皮間葉転換のマーカーである α SMA や Vimentin の発現を比較する。また、野生型マウス・Cav1KO マウスから RPE の primary cell を作成し、migration assay などを行って機能的な違いがあるか検討する。

4. 研究成果

(1) 増殖硝子体網膜症(PVR)の発症を促進するメカニズムを解明する研究

自施設で手術を受けた増殖硝子体網膜症(PVR)患者の増殖膜を術中に採取し、mRNA・タンパクの発現を確認した結果、Caveolin-1 の発現が亢進していることを発見し、同様の变化を野生型マウスに作成した PVR 眼球でも確認した。Caveolin-1 ノックアウト(Cav1KO)マウスを入手し、実験的に PVR を作成した。その後組織を採取し、増殖性変化のメカニズムとして重要である上皮間葉転換のマーカーである α SMA や Vimentin の発現を比較した。また、野生型マウス・Cav1KO マウスから RPE の primary cell を作成し、migration assay を行い遊走能に違いがあるか検討した。Cav1KO マウスの PVR 眼球では、野生型マウスのそれに比べて細胞の増殖聖変化が強く、Smad2/3 のリン酸化なども亢進した。これらのことから、増殖組織で発現する Caveolin-1 は網膜色素上皮細胞の上皮間葉転換を抑制する作用があることが確認された。さらに、Cavolin-1 は網膜剥離硝子体から確認された microRNA の一つである miR199 によって発現量が変化することを確認した。このことから、過去に我々が報告した miR148 だけでなく、miR199 も Caveolin-1 発現を介して増殖硝子体網膜症の発症に関与している可能性が示唆された。また、過去に報告数が少ないヒト硝子体中における microRNA の発現と、既報から確認された microRNA の種類、さらに疾患との関連性について総説を作成した。

(2) 糖尿病網膜症(DR)における網膜神経保護作用に関する研究

ストレプトゾシン(STZ)負荷ラットにおいて網膜電図(ERG)の律動様小波(OP)が減弱することは以前から報告されている。今回我々は、STZ 負荷ラットに EPA を給餌することによって ERG の OP が回復することを確認した。また、Müller cell line である MIO-M1cell を用い過酸化水素負荷 (H_2O_2) 投与後の MIO-M1cell の機能障害を分析した。その結果、

H₂O₂ 負荷 MIO-M1 では細胞増殖能が低下し、脳由来栄養因子 (BDNF) の mRNA・タンパク発現量が低下した。一方、EPA 投与により MIO-M1 cell の BDNF の mRNA・タンパク発現量が上昇した。

(3) 加齢黄斑変性 (AMD) と Alu に関する研究

AMD の研究では、自施設で生成した Alu をヒト RPE 細胞およびマウス眼球内に投与し、インターロイキン(IL)-1 β ・IL18 の上昇を確認した。さらに逆転写酵素阻害剤 (NRTI) の一つである Lamivudine (3TC) を投与することによって IL1 β ・IL18 の増加が抑制できるが、その negative control である 3,4-(methylenedioxy)cinnamic acid (3,4MCA) では IL1 β ・IL18 の増加が抑制できないことを確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

1. Makin RD, Apicella I, Nagasaka Y, **Kaneko H**, Turner SD, Kerur N, Ambati J, Gelfand BD.
“RF/6A Choriorretinal Cells Do Not Display Key Endothelial Phenotypes.”
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018 Dec 3;59(15):5795-5802. doi: 10.1167/iovs.18-25215. (査読あり)
2. Takayama K, **Kaneko H**, Ito Y, Kataoka K, Iwase T, Yasuma T, Matsuura T, Tsunekawa T, Shimizu H, Suzumura A, Ra E, Akahori T, Terasaki H.
“Novel Classification of Early-stage Systemic Hypertensive Changes in Human Retina Based on OCTA Measurement of Choriocapillaris.”
Sci Rep. 2018 Oct 11;8(1):15163. doi: 10.1038/s41598-018-33580-y. (査読あり)
3. Kataoka K, Takeuchi J, Nakano Y, Fujita A, **Kaneko H**, Ito Y, Terasaki H.
“Characteristics and classification of type 3 neovascularization with B-scan flow overlaid and en face flow images of optical coherence tomography.”
Retina. 2018 Oct 9. doi: 10.1097/IAE.0000000000002357. [Epub ahead of print]
4. Fukukita H, Ito Y, Iwase T, **Kaneko H**, Yasuda S, Kataoka K, Terasaki H.
“Inner macular changes after vitrectomy with internal limiting membrane peeling for rhegmatogenous retinal detachment: Similarity With Alport Syndrome.”
Retina. 2018 Sep 7. doi: 10.1097/IAE.0000000000002310. (査読あり)
5. Takeuchi J, Kataoka K, Ito Y, Takayama K, Yasuma T, **Kaneko H**, Terasaki H.
“Optical Coherence Tomography Angiography to Quantify Choroidal Neovascularization in Response to Aflibercept.”
Ophthalmologica. 2018;240(2):90-98. doi: 10.1159/000487611. Epub 2018 May 8. (査読あり)
6. Horio J, **Kaneko H***, Takayama K, Tuzuki K, Kakihara H, Iwami M, Kawase Y, Tsunekawa T, Yamaguchi N, Nonobe N, Terasaki H.
“Changes in refractive characteristics in Japanese children with Down syndrome.”
Jpn J Ophthalmol. 2018 Mar;62(2):231-236. doi: 10.1007/s10384-018-0565-x. Epub 2018 Jan 30. (*Corresponding author) (査読あり)
7. Nonobe N, **Kaneko H**, Ito Y, Takayama K, Kataoka K, Tsunekawa T, Matsuura T, Suzumura A, Shimizu H, Terasaki H.

“Optical coherence tomography angiography of the foveal avascular zone in children with a history of treatment-requiring retinopathy of prematurity.”

Retina. 2017 Nov 28. doi: 10.1097/IAE.0000000000001937. (査読あり)

8. **Kaneko H***, Matsuura T, Takayama K, Ito Y, Iwase T, Ueno S, Nonobe N, Yasuda S, Kataoka K, Terasaki H.

“Increased retinal thinning after combination of internal limiting membrane peeling and silicone oil endotamponade in proliferative diabetic retinopathy”

Ophthalmologica. 2017;238(4):226-235. (*Corresponding author) (査読あり)

9. Ra E, Ito Y, Kawano K, Iwase T, **Kaneko H**, Ueno S, Yasuda S, Kataoka K, Terasaki H.

“Regeneration of Photoreceptor Outer Segments after Scleral Buckling Surgery for Rhegmatogenous Retinal Detachment.”

Am J Ophthalmol. 2017 May;177:17-26 (査読あり)

10. **Kaneko H***, Takayama K, Asami T, Ito Y, Tsunekawa T, Iwase T, Funahashi Y, Ueno S, Nonobe N, Yasuda S, Suzumura A, Shimizu H, Kimoto R, Hwang SJ, Terasaki H.

“Cytokine profiling in the sub-silicone oil fluid after vitrectomy surgeries for refractory retinal diseases”

Sci Rep 2017 May 25;7(1):2640. (*Corresponding author) (査読あり)

11. Takayama K, **Kaneko H***, Kataoka K, Hattori K, Ra E, Tsunekawa T, Fukukita H, Haga F, Ito Y, Terasaki H.

“Comparison between 1-year outcomes of aflibercept with and without photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy: Retrospective observation study.”

PLoS One. 2017 May 3;12(5):e0176100. (*Corresponding author) (査読あり)

12. **Kaneko H***, Terasaki H. “Biological involvement of microRNAs in proliferative vitreoretinopathy” **REVIEW**

Transl Vis Sci Technol. 2017;6(4):5 (*Corresponding author) (査読あり)

13. Fukami M, Iwase T, Yamamoto K, **Kaneko H**, Yasuda S, Terasaki H.

“Changes in Retinal Microcirculation After Intravitreal Ranibizumab Injection in Eyes With Macular Edema Secondary to Branch Retinal Vein Occlusion.”

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017 Feb 1;58(2):1246-1255.

14. Takayama K, Ito Y, **Kaneko H**, Kataoka K, Sugita T, Maruko R, Hattori K, Ra E, Haga F, Terasaki H.

“Comparison of indocyanine green angiography and optical coherence tomographic angiography in polypoidal choroidal vasculopathy”

Eye (London) 2017 ;31,45–52 (査読あり)

15. Takayama K, **Kaneko H**, Sugita T, Maruko R, Hattori K, Ra E, Kawano K, Kataoka K, Ito Y, Terasaki H.

“One-Year Outcomes of 1 + pro re nata versus 3 + pro re nata Intravitreal Aflibercept Injection for Neovascular Age-Related Macular Degeneration.”

Ophthalmologica. 2017;237(2):105-110. (査読あり)

16. Takayama K, **Kaneko H**, Kachi S, Ra E, Ito Y, Terasaki H.

“High-dose intravenous pulse steroid therapy for optic disc swelling and subretinal fluid

in non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy.”

Nagoya J Med Sci. 2017 Feb;79(1):103-108. (査読あり)

17. Nagasaka Y, **Kaneko H***, Ye F, Kachi S, Asami T, kato S, Takayama K, Hwang SJ, Kataoka K, Shimizu H, Iwase T, Funahashi Y, Higuchi A, Senga T, Terasaki H.

“Role of Caveolin-1 for Blocking the Epithelial-Mesenchymal Transition in Proliferative Vitreoretinopathy”

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017 Jan 1;58(1):221-229 (*Corresponding author) (査読あり)

〔学会発表〕(計 3件)

1. **兼子 裕規** “免疫・補体経路と網膜疾患”インストラクションコース, 網膜橋渡し研究アップデート 2018, 第72回日本臨床眼科学会, 2018/10/11-14, 東京
2. **兼子 裕規** “バックリング手術に必要な準備” インストラクションコース, 網膜復位術の基本と極意, 第71回日本臨床眼科学会, 2017/10/12-15, 東京
3. **Hiroki Kaneko** “Cytokine profiling in the sub-silicone oil fluid after vitrectomy surgeries for refractory retinal diseases” EURETINA Congress 2017, 2017/9/7-10, Barcelona

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：清水 英幸

ローマ字氏名：(SHIMIZU, hideyuki)

研究協力者氏名：鈴木 文那

ローマ字氏名：(SUZUMURA, ayana)

研究協力者氏名：南波 里奈

ローマ字氏名：(NAMBA, rina)

研究協力者氏名：山田 和久

ローマ字氏名：(YAMADA, kazuhisa)