

平成 31 年 5 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16997

研究課題名(和文)抗VEGF療法に依存しない糖尿病黄斑浮腫根治療法の開発

研究課題名(英文)Novel treatment for diabetic macular edema not dependent on anti-VEGF therapy

研究代表者

有馬 充(Arima, Mitsuru)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60772845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病黄斑浮腫(DME)に対して抗血管内皮増殖因子抗体の硝子体注射(抗VEGF療法)が行われるが約4割の患者で効果がない。そこで抗VEGF療法に替わる治療法を開発すべく研究を行った。DMEモデル動物を用いた実験により、DME網膜で活性化したROCKが網膜血管透過性亢進を促すことを突き止めた。DME動物モデル・培養血管内皮細胞を用いたさらなる検証により、ROCKが1)網膜炎症を制御する上流分子であること、2)VEGFのみならず炎症性サイトカインの下流で作用し血管内皮細胞密着結合の破壊に関与することを明らかにした。以上の結果からROCK阻害療法が抗VEGF療法に優る治療法になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在糖尿病黄斑浮腫(DME)に対する第一治療選択肢は抗血管内皮増殖因子抗体の硝子体注射(抗VEGF治療)であるが、複数年継続加療を行っても約4割の患者で効果がない。つまり抗VEGF療法に依存しない治療法の開発が急務である。本研究成果により、ROCK阻害療法が抗VEGF療法に優る治療効果を有する可能性が示唆された。抗VEGF療法抵抗性DMEは本邦だけでも十数万人存在しており、これらの患者の視機能改善を達成すべく現在国内企業とともにROCK阻害剤の臨床応用に着手している。

研究成果の概要(英文)：Although intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor antibody (anti-VEGF therapy) is performed for diabetic macular edema (DME), it is ineffective in about 40% of patients. Therefore, we attempted to develop a novel therapy not dependent on anti-VEGF therapy. In vivo experiments using DME model mice revealed that ROCK activated in DME retina promotes retinal vascular hyperpermeability. To identify the association of ROCK with DME formation in detail, we also conducted in vitro experiments using cultured endothelial cells. Finally, we demonstrated 1) ROCK is an upstream molecule controlling retinal inflammation, and 2) ROCK acts as a downstream molecule of various inflammatory cytokines as well as VEGF and promotes the disruption of tight junction assembly between vascular endothelial cells. Our results suggested that ROCK inhibition may be superior to anti-VEGF therapy.

研究分野：網膜硝子体

キーワード：糖尿病黄斑浮腫 血液網膜関門 密着結合

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦での糖尿病網膜症(DR)罹患数は約100万人に上る。糖尿病黄斑浮腫(DME)はDRにおける視力障害の主因病態であり、DRの約3割に合併する(Ophthalmology.2015)。大規模臨床試験の結果から、DMEへの抗VEGF治療の有効性が示され(Ophthalmology.2016)、現在DME治療の第一選択となっているが、同時に複数年継続的に抗VEGF治療を行っても約4割には効果が乏しいことも証明されている(JAMA ophthalmol.2018)。現時点でこのような抗VEGF治療抵抗性DMEに対する有効な治療法はなく視力低下を防ぐ術がないことが大きな問題となっている。

2. 研究の目的

DMEは血液網膜関門(BRB)の破綻により生じる。そこでBRBの機能維持に必須の分子であるclaudin-5の発現調節に関わる分子を特定し、新規治療標的となるか検証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

a. DME硝子体中のVEGF、炎症性サイトカイン測定

DME硝子体中ではVEGFのみならず複数の炎症性サイトカインの濃度が上昇しており、DMEの形成には炎症が深く関与することが定説となっている(Prog Retin Eye Res. 2011)。しかしDMEの過半数は抗VEGF治療の継続のみで浮腫が消失する。そこで未治療DMEと治療抵抗性DMEの硝子体中のVEGF及び炎症性サイトカインをELISA法で測定し、炎症の「質」について比較を行った。

b. 抗VEGF治療抵抗DMEモデルの確立

DMEの過半数が抗VEGF治療のみで寛解する一方で、抗VEGF治療抵抗性DMEも存在する。そして抗VEGF治療抵抗性の原因として炎症の関与が示唆されている(JAMA Ophthalmology.2016)。そこでVEGF高発現の遷延化が炎症を誘発するという仮説を立て、視細胞特異的ヒトVEGF強制発現マウス(Kimbaマウス)を用いて炎症性サイトカインの発現をPCRとELISA法で検証し、さらに血管透過性を蛍光色素の血管内投与で可視化し、claudin-5の発現を免疫染色で確認した。

c. 新規治療標的分子の同定

野生(WT)マウスとKimbaマウスの網膜を回収し、リン酸化タンパク質のみを抽出した後に質量解析を行った。網膜内で動くリン酸化シグナルの変化から新規治療標的分子の同定を行った。

d. 新規治療標的分子(=ROCK)に対する阻害剤を用いた治療効果検証

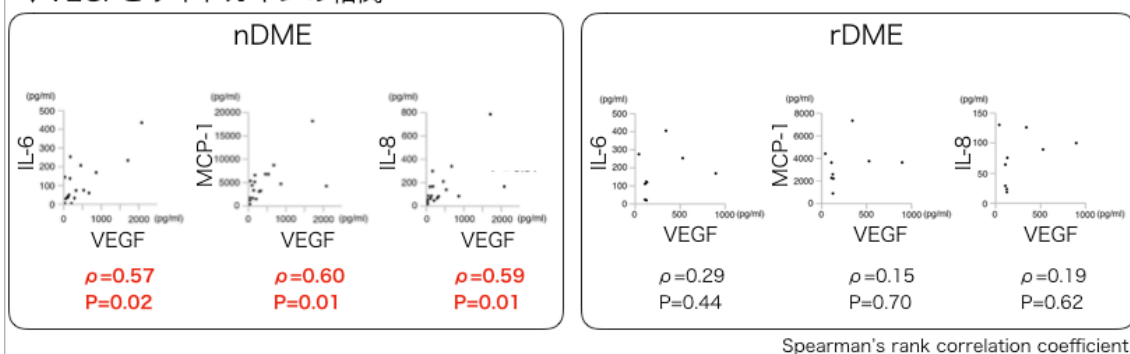
Kimbaマウスに対しROCK阻害剤であるリバスジルの点眼を1日2回行い、網膜血管透過性とclaudin-5発現に与える影響を検証した。ELISA法を用いて網膜中の炎症性サイトカインの定量も行った。また、培養血管内皮細胞をリバスジルで前処置後、VEGF及び炎症性サイトカインで刺激し、血管バリアー機能(経内皮電気抵抗値[TEER]の測定)及びclaudin-5の発現に与える影響についても検証を行った。

4. 研究成果

a. DME硝子体中のVEGF、炎症性サイトカイン測定

未治療DMEと比較し、治療抵抗性DMEではVEGF濃度は低下していたが(491 vs 267 pg/ml)、炎症性サイトカインはむしろ高値を示した(TNF: 3.1 vs 3.8 pg/ml, IL-6: 152 vs 167 pg/ml, MCP-1: 2998 vs 3417 pg/ml, IL-8: 72 vs 73 pg/ml)。また、未治療DMEではVEGFとIL-6($\rho=0.57$, $P=0.02$)、VEGFとMCP-1($\rho=0.60$, $P=0.01$)、VEGFとIL-8($\rho=0.59$, $P=0.01$)に相関を認めしたが、治療抵抗性DMEではこれらの相関は認めなかった。以上のことから、両者の炎症は「質」が異なっており、治療抵抗性DMEではVEGF非依存性の炎症が起きていることが分かった。

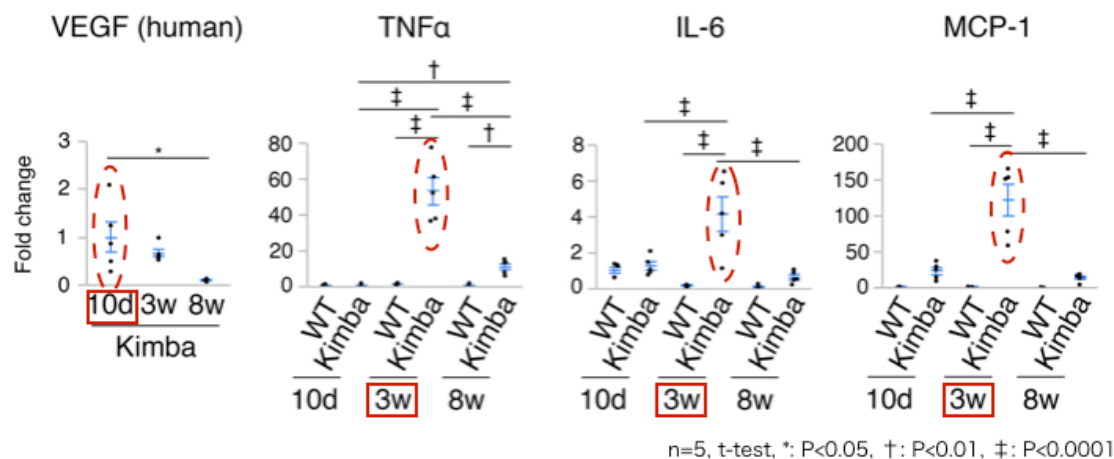
▼VEGFとサイトカインの相関



b. 抗VEGF治療抵抗DMEモデルの確立

PCR を行ったところ、Kimba マウス網膜における VEGF 発現のピークは生後 10 日であったが、炎症性サイトカイン(TNF, IL-6, MCP-1)のピークは生後 3 週であった。生後 3 週齢で Kimba マウスの網膜を回収し、ELISA 法で VEGF 及び TNF, IL-6, MCP-1 の濃度測定を行ったが、VEGF 濃度と相関を示すものは無く、3 週齢で既に VEGF 非依存性の炎症が起きていることが示唆された。また、この状態に至っては Kimba マウスに抗 VEGF 治療を行っても網膜血管透過性亢進(蛍光色素の漏出)や claudin-5 の発現低下を防ぐことはできないことも確認した。以上のことから、VEGF のみで確かに網膜炎が起きること、そして Kimba マウスが抗 VEGF 治療抵抗性 DME の疾患モデルとなることが示された。

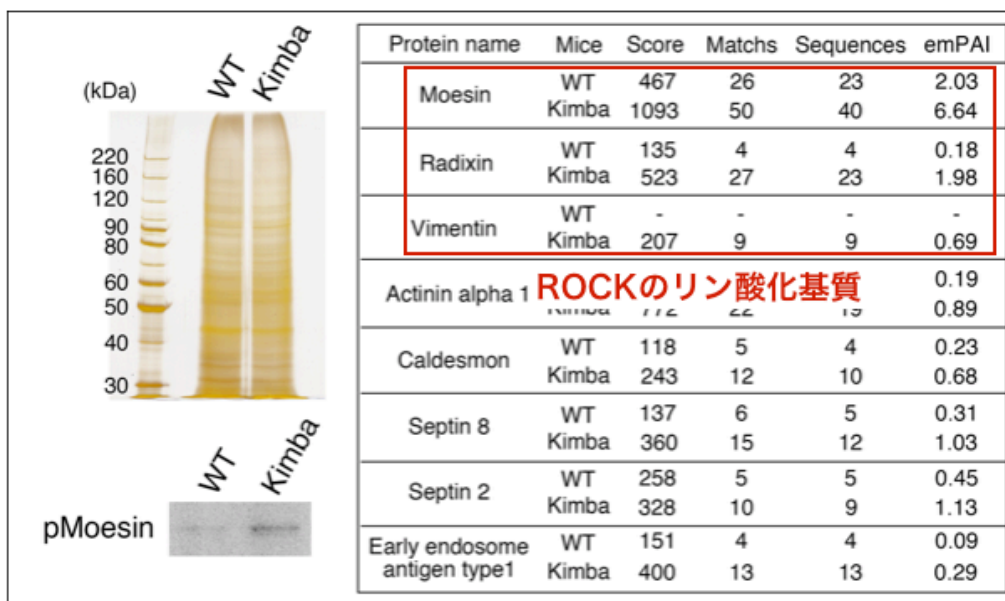
▼視細胞特異的ヒトVEGF強制発現マウス(Kimbaマウス)網膜のmRNA



c. 新規治療標的分子の同定

Kimba マウス網膜において moesin, radixin, vimentin が WT マウスと比較して著明にリン酸化されていた(emPAI の比較, moesin: 2.03 vs 6.64, radixin: 0.18 vs 1.98, vimentin: 検出感度以下 vs 0.69)。これらはすべて ROCK のリン酸化基質であり、ROCK が新規治療標的分子の候補となることが示唆された。

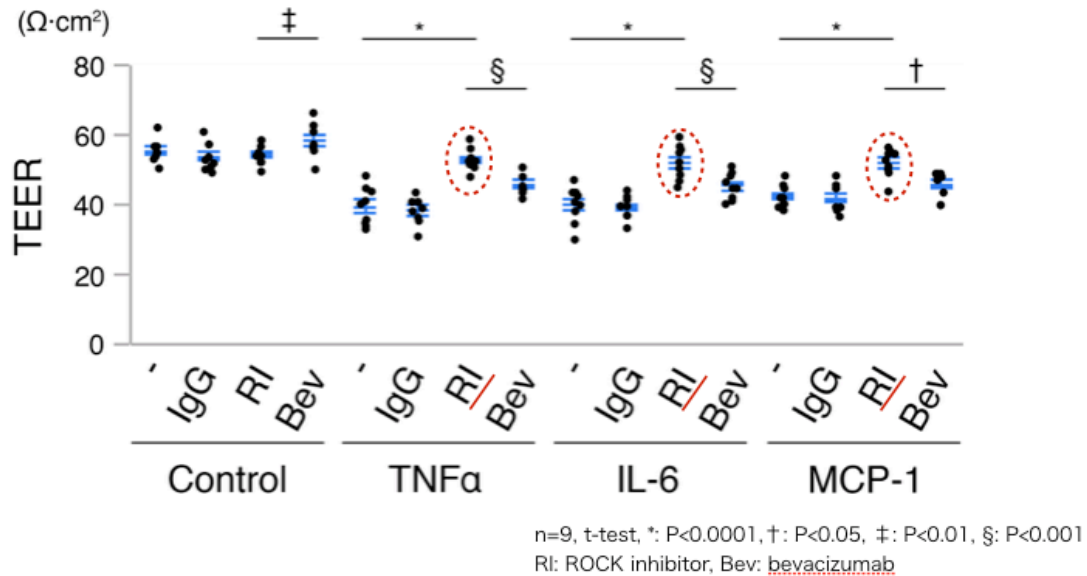
▼リン酸化タンパク質のsilver stain(左上)、質量解析結果(右)、pMoesin抗体でのWB(左下)



d. 新規治療標的分子(=ROCK)に対する阻害剤を用いた治療効果検証

Kimba マウスにリバスジル点眼を行ったところ、血管透過性亢進及び claudin-5 発現低下が阻害された。また ELISA 法にて、リバスジル点眼により Kimba マウス網膜中の TNF, MCP-1 濃度が有意に低下することも分かった(P<0.05)。つまり ROCK が上流分子として作用し、網膜炎を制御することが示唆された。また、培養血管内皮細胞をリバスジルで前処置後、VEGF 及び TNF, IL-6, MCP-1 で刺激したところ、確かに TEER が有意に回復し(両者とも P<0.0001)、claudin-5 の発現低下も抑制されていた。これらのことから、ROCK は VEGF や炎症性サイトカインに共通した下流分子として作用し、血管バリアー機能の調節に深く関与することが示された。

▼TEER(血管バリアー機能の指標)



本研究成果により、ROCK 阻害療法が抗 VEGF 治療に優る治療法となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yamaguchi M, Nakao S, Arima M, Wada I, Kaizu Y, Hao F, Yoshida S, Sonoda KH: Rho-Kinase/ROCK as a Potential Drug Target for Vitreoretinal Diseases. J Ophthalmol. 2017. 8543592
2. Kaizu Y, Nakao S, Yoshida S, Hayami T, Arima M, Yamaguchi M, Wada I, Hisatomi T, Ikeda Y, Ishibashi T, Sonoda KH. Optical Coherence Tomography Angiography Reveals Spatial Bias of Macular Capillary Dropout in Diabetic Retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017;58:4889-97

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 有馬充、園田康平. 糖尿病網膜症の網膜血管における claudin-5 発現調節機構. 日本眼循環学会(2017)
2. 海津嘉弘、中尾新太郎、吉田茂生、有馬充、藤原康太、和田伊織、山口宗男、岸本淳司、石橋達朗、園田康平. OCTA による網膜灌流密度の空間的パターンは糖尿病網膜症の検出に有用である. 日本眼循環学会(2017)
3. 石龍悠、中尾新太郎、海津嘉弘、吉田茂生、有馬充、和田伊織、山口宗男、石橋達朗、園田康平. OCTA による網膜灌流密度は糖尿病網膜症の無灌流領域検出に有用である. 日本眼循環学会(2017)
4. 有馬充、中尾新太郎、馮浩、山口宗男、海津嘉弘、和田伊織、吉田茂生、園田康平. 糖尿病黄斑浮腫における claudin-5 発現調節への ROCK 阻害剤リパスジルの効果. 日本眼科学会総会(2018)
5. Arima M, Nakao S, Feng H, Yamaguchi M, Shibata K, Kaizu Y, Wada I, Yoshida S, Sonoda KH. Impact of a ROCK inhibitor ripasudil on distribution of claudin-5 in vascular endothelial cells in diabetic retinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (2018)
6. Kaizu Y, Nakao S, Arima M, Wada I, Yoshitomi K, Sugino M, Hashiguchi N, Hirashima K, Sonoda KH. Detection capability of microaneurysms in diabetic retinopathy eyes improves using averaged optical coherence tomography angiography image. Asia-Pacific Vitreo-retina Society (APVRS) Congress (2018)
7. 海津嘉弘、中尾新太郎、有馬充、和田伊織、岸本淳司、吉富景子、杉野迪子、橋口直哉、平島昂太、園田康平. 糖尿病網膜症の毛細血管瘤検出における加算平均 OCT angiography の有用性. 日本網膜硝子体学会(2018)
8. 海津嘉弘、中尾新太郎、有馬充、和田伊織、石川桂二郎、吉富景子、杉野迪子、橋口直哉、平島昂太、園田康平. 糖尿病網膜症における OCT angiography の網膜血管描出再現性は病期により異なる. 日本眼循環学会(2018)

〔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：なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

※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。