

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16933

研究課題名(和文) 脈絡膜新生血管成熟と神経終末カルシウムチャネルの関係に立脚した新規治療戦略の樹立

研究課題名(英文) Establishment of a new therapeutic strategy based on the relationship between choroidal neovascular maturation and nerve terminal calcium channel.

研究代表者

岩西 宏樹 (Iwanishi, Hiroki)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40784319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：滲出型加齢黄斑変性の病態の本体である脈絡膜新生血管に対する研究は、その動物モデルである実験的アルゴンレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルが用いられる。新生血管の成熟化を促すことによる滲出型加齢黄斑変性の沈静化という新たな治療戦略の確立を目指した。本モデルで誘発される脈絡膜新生血管の大きさにばらつきに対しては非侵襲的に同一の新生血管に対する経時的な観察及び評価が理想的であり、同時に散瞳下での眼底検査中の不可逆的白内障の発症という大きな課題の克服を要した。それらに対しマウス専用光干渉断層計とマウス専用コンタクトレンズの導入で検査中の不可逆的白内障の発症を抑えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滲出型加齢黄斑変性の病態の本体である脈絡膜新生血管に対して臨床的には抗血管内皮増殖因子抗体治療が効果的であるが克服されるべき臨床的な課題は多い。脈絡膜新生血管研究は、その動物モデルである実験的アルゴンレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを用いた研究が活発におこなわれているが、誘発される新生血管はばらつきがあり、同一の新生血管の経時的な検査が理想である。そのためには、散瞳処置後の眼底検査中の不可逆的白内障と非侵襲的な脈絡膜新生血管撮影が必要である。マウス専用光干渉断層計とマウス専用コンタクトレンズの使用で検査中の不可逆的白内障の発症を抑えられた。これらは今後の脈絡膜新生血管研究への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：The mice experimental Argon laser-induced choroidal neovascularization model is an established animal model of human exudative age-related macular degeneration. We aimed to establish a new therapeutic strategy for exudative age-related macular degeneration by promoting the maturation of neovascularization.

Non-invasive observation and evaluation of the same neovascularization over time is ideal for variations in the size of induced choroidal neovascularization on this model. At the same time, it was necessary to overcome the major problem of the onset of irreversible cataracts during fundus examination under mydriasis.

We were able to suppress the onset of irreversible cataracts during the examination by introducing the mouse-specific optical coherence tomography and mouse-specific contact lens.

研究分野：創傷治癒

キーワード：脈絡膜血管新生 滲出型加齢黄斑変性 血管成熟化

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は、本邦における中途失明原因の第4位、米国では第1位の疾患である。滲出型と萎縮型に分類される。滲出型の特徴は黄斑部網膜下の脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization: 以下 CNV) で、その血管未熟性に起因する滲出液の貯留や黄斑浮腫、網膜下出血などを引き起こし重篤な視力障害を引き起こす。光線力学的療法による CNV の退縮 (破壊、閉塞) や抗血管内皮細胞成長因子 (vascular endothelial growth factor: 以下 VEGF) 療法による進行予防や CNV の退縮など、極めて有効な治療法が臨床で使用されている一方で、無効例、治療中の線維瘢痕化、一度抑制された CNV の再燃、継続的な治療の必要性など克服されるべき課題は多い。

実験的な CNV 増生抑制による治療方針に関する研究は血管内皮細胞そのものに対する抑制作用、炎症抑制による新生血管抑制、線維瘢痕化抑制に大まかに分類される。CNV の成長には VEGF 以外の成長因子も関与している。申請者はトランスフォーミング成長因子 β (transforming growth factor β : 以下 TGF β) のシグナル伝達因子である Smad3 のノックアウトマウスではアルゴンレーザー誘発 CNV が炎症軽減とともに抑制された。しかし線維芽細胞をフィーダーとしたヒト臍帯静脈内皮細胞の培養研究では薬剤 (SIS3) による Smad3 阻害は管腔形成 (血管新生) 作用を増強した。従って in vivo ではレーザー誘発 CNV が Smad3 ノックアウトマウスで抑制されたことは、血管内皮細胞自体の血管形成抑制作用ではなく局所炎症の抑制が効果の原因と考察した (Iwanishi H et al. *Lab Invest* 2016)。

一方で、一般に生体内で血管壁には神経線維が分布しているので、神経由来の液性因子などを介した血管に対する作用は無視できないものであろうと考えるものの、その血管壁に分布する神経線維の新生血管の増生や成熟に対する役割に着目した研究報告は非常に少ない。一般に新生血管は解剖学的に未熟な血管であるが、血管周囲神経の神経性調節と神経増殖因子 (nerve growth factor: 以下 NGF) 発現を介した血管成熟化による抗腫瘍作用の可能性が他施設から他臓器で示唆された。加齢黄斑変性症の場合を考えると、血管成熟は血管壁からの液性成分の漏出の抑制や退縮しないまでも成熟化に伴って沈静化することで、本症の病勢の制御には有益と考えることができる。その点に着目した CNV を伴う疾患の新たな治療戦略の展開を図る。

2. 研究の目的

他施設から血管周囲神経の神経性調節を介した血管成熟化による抗腫瘍作用の可能性が示唆された。悪性腫瘍においては栄養血管の成熟化は腫瘍細胞の栄養にとって不利な環境であることが報告された。その中で NGF が腫瘍新生血管で血管周囲神経の分布を促進し、さらに血管平滑筋量を増加させ血管の成熟を介して血管外漏出を抑制し、栄養供給を減少させることで抗腫瘍作用を発揮するとされている。CNV においても血管成熟化の促進による網膜下滲出液の漏出による浮腫の軽減と出血の防止という、これまででない治療戦略の発案に至った。

新生血管の成熟には、上記のごとく血管周囲の神経支配と NGF の関与が大きいとされる。局所での NGF 発現には、分布する知覚神経からの神経ペプチドによる刺激が大

きな役割を演じていることが知られている。知覚神経からの神経ペプチド分泌には神経終末の transient receptor potential (以下 TRP) チャネル群が大きな役割を演じている。申請者の所属ではいくつかの TRP 知覚神経イオンチャネル受容体による角膜創傷治癒の制御に関する研究を行っている。所属の岡田由香准教授らは、TRPV4 欠失マウスでは NGF 発現低下を伴って、角膜上皮治癒が遅延することを示した (Okada Y et al. *Lab Invest* 2019)。本研究においては所属で保有している TRPV4 欠失マウスと野生型マウスでレーザー誘発 CNV の大きさやレーザー照射組織での神経ペプチド発現や NGF などの各種炎症性サイトカイン発現を比較検討し、知覚神経と新生血管成熟の病原性に関する新しい知見を得ることで、新規治療戦略の樹立につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1) 血管成熟化をめざす in vivo 実験：野生型雄 C57/BL6 マウス両眼に全身麻酔下でアルゴンレーザー (GYC-2000 NIDEK) を、各象限に 1 スポット照射 (200 mW, スポットサイズ 80 μ m, 照射時間 50 ms) する。両眼照射で和歌山医大動物実験計画の承認を受けている。CNV の面積評価は、10%フルオレスセインデキストラン (2 \times 10⁶ MW; Sigma) 50 mg/mL を心腔から注入し血管造影を行い蛍光顕微鏡でフラットマウント法で撮影し、コンピューターソフトウェア WinROOF(三谷)で解析する (Iwanishi H et al. *Lab Invest* 2016)。Zeiss 社アポトーム蛍光顕微鏡が所属研究室に設置されている。

1) -1 レーザー照射後に NGF 投与を行い、非投与群と NGF 投与群と比較検討する。
1) -2 レーザー4 および 5 週目において眼球をフラットマウント法および薄切切片にてレーザー誘発 CNV と血管周囲神経の分布走行特性および血管成熟化を血管内皮細胞と壁細胞のマーカーを用い二重免疫染色法で比較検討する。

実験 2) TRPV4 ノックアウトマウス、野生型マウスでのレーザー誘発 CNV と血管周囲神経を比較検討し、両群での血管成熟化の比較を行う in vivo 実験：

2) -1 6-8 週齢雄 TRPV4 ノックアウトマウス、野生型雄マウスに実験 1) と同じ条件でレーザー照射し、レーザー二週間後の CNV の面積を比較検討する。

2) -2 レーザー照射後 3.7.14 日における眼球をフラットマウント法および薄切切片にてレーザー誘発 CNV と血管周囲神経の分布、壁細胞の接着様式を免疫組織学的に比較検討する。

2) -3 レーザー照射 1、3 日後に、屠殺、眼球摘出後、脈絡膜(強膜付き)組織から RNA 抽出、TaqMan real-time RT-PCR で遺伝子発現を評価する。NGF、サブスタンス P などの神経ペプチドや VEGF、インターロイキン(IL)-6、TGF β 1、マクロファージ走化性因子(MCP-1)、MPO、F4/80 を内因性 GAPDH をもとに Applied Biosystem 社 $\Delta\Delta$ Ct 法で解析し、統計処理を行う。

実験 3) CNV モデルおよび血管内皮細胞への NGF の効果を検討する in vitro 実験

3) -1 市販の血管新生キットを用い NGF 添加群と、非添加群で血管内皮細胞による管腔構造の長さ、分岐数、血管内皮細胞と壁細胞の二重免疫染色法にて成熟度を比較検討する。

3) -2 ヒト臍帯静脈内皮細胞及びヒト微小血管内皮細胞の単独培養条件で NGF 添加群と非添加群で、血管新生関連因子や血管成熟関連因子の発現を比較検討する。

4. 研究成果

滲出型加齢黄斑変性の病態の本体である脈絡膜新生血管に対する研究は、その動物モデルである実験的アルゴンレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルが用いられる。本モデルにおいて誘発される脈絡膜新生血管の大きさにばらつきがあり、統計学手法を用いた群間比較で一般に評価が行われる。

我々は、研究開始当初、同一の新生血管の性状や大きさを経時的に測定することが理想的であり、マウス実験的アルゴンレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルに導入できれば、同モデルの限界を克服し、本研究課題だけでなく脈絡膜新生血管研究において多大な恩恵をもたらすことが明白であるからである。

その実行のためには、マウスを散瞳処置後眼底検査をし、同一の脈絡膜新生血管を経時的に検査測定する必要があるが、マウス散瞳処置後に分単位で明らかな白内障を生じ、眼底検査が極めて困難であり、また検査が可能であっても不可逆的な白内障により、その後の経時的な検査が不可能となるために、薬剤を用いる群間比較では薬剤コストの問題点がある。我々は、様々なマウス専用コンタクトレンズを使用し、約二年半を要し検査中の不可逆的な白内障の発症を30分程度抑えられ、不可逆的な白内障を生じないマウス専用コンタクトレンズの同定、と使用可能な状態にまで持ち込むことに成功した。

またもう一つの課題としての、非侵襲的な経時的脈絡膜新生血管の評価に対しては、研究開始当初、マウス専用の光干渉断層計は一社のみ上市されていたが、眼底断層像を撮影できるものの機器のスペックが原因で脈絡膜新生血管を撮影できない機器であった。そこで、我々は光干渉断層血管撮影が可能なマウス専用に変更したNIDEK社製干渉断層計を導入した(本研究課題の期間中にマウス光干渉断層血管撮影が可能な機器は上市されていない)。

上記マウス専用コンタクトレンズを装用し、マウス専用に変更した光干渉断層計による非侵襲的な光干渉断層血管撮影での同一脈絡膜新生血管の経時的測定は、現在もなお容易ではなく、他施設からの報告もなされていない。我々は短期間の経時的測定までは計測することができているが、血管成熟化や薬剤の効果判定ができるレベルには至っていない。しかし、これまで克服困難であったマウス点眼処置による白内障と同一脈絡膜新生血管の非侵襲的な経時的測定と二つのハードルに対し一定の成果を上げることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------