

平成21年5月22日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19592020
研究課題名（和文） 眼内血管新生疾患に対する新規薬物療法の検討
研究課題名（英文） Novel pharmacological treatments for intraocular neovascular diseases
研究代表者 大島 佑介（OSHIMA YUSUKE）
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20362717

研究成果の概要：

生理的に眼内に存在する血管新生抑制因子であるテノモジュリン（TeM）のC末端機能ドメインの硝子体内投与が、虚血マウスモデルにおける眼内新生血管の発生と無灌流領域の形成を抑制し得る結果が本研究から得られた。この結果により、眼内新生血管に対する新規薬物による治療の可能性を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：血管新生、糖尿病網膜症、眼内増殖、血管内皮増殖因子、抗 VEGF 抗体

1. 研究開始当初の背景

眼内血管新生は増殖糖尿病網膜症をはじめとする様々な重篤な眼科疾患の主要病態になっている。最近の手術手技や様々な治療法の開発にもかかわらず、これら疾患における治療成績は決して芳しくなく、とりわけ視機能の維持に重要な黄斑部網膜が障害されると、不可逆的な視力障害をもたらす。

本邦では、糖尿病の罹病人口は国内では増加の一途にあり、これに伴って増殖糖尿病網膜症に至るケースが少なくなく、とりわけ壮年者における急速進行例は手術治療を行っても、続発する新生血管緑内障によって失明

に至る危険性が極めて高いことが知られている。これらの眼内新生血管に起因する重篤疾患において、従来の手術療法のみならず、血管新生そのものを抑制する薬物療法の併用が新しい治療法として必要不可欠である。

研究代表者らは以前より生理的に眼内に存在する血管新生抑制因子であるテノモジュリン（Tenomodulin: TeM）の血管新生抑制作用について研究し、これらのタンパク分子のC末端機能ドメインによる血管新生抑制作用を見出した。

2. 研究の目的

新規の生理的な血管新生抑制因子であるテノモジュリン (TeM) のC末端機能ドメインによるマウス虚血モデルにおける血管新生抑制効果を評価し、新規薬物療法としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

TeM のC末端機能ドメインを含めた低分子タンパクのリコンビナント (rTeM) の精製単離を行った。In vitro において、精製した rTeM のヒト血管内皮細胞 (HUVEC と HREC) に対する増殖抑制、マトリゲルにおける内皮細胞の管腔形成抑制などの生理活性を確認した。例えば、抗 VEGF 抗体に代わる新薬の候補として、精製した rTeM タンパクを高圧酸素下飼育にて作成した血管新生モデルマウス (マウス ROP モデル) に硝子体内投与し、血管新生抑制効果をもうまくフラットマウントにおける新生血管の発芽と無灌流領域の面積として定量的に評価し、至適タンパク濃度の検討を行った。また、網膜を含めた眼内組織に対する毒性の有無を免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

rTeM (16kD) はVEGF刺激によるHUVECとHRECのDNA合成能を有意 ($p<0.01$) に抑制した (図1)。

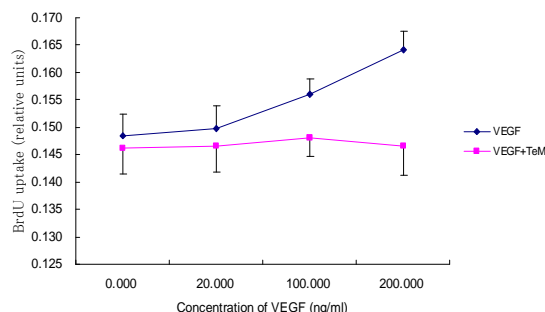


図1, rTeM にHRECのDNA合成抑制
VEGF刺激によるHRECのDNA合成能はrTeM (1ug/mL) 存在下では、有意に抑制されてい

る。またVEGF刺激による血管内皮細胞の管腔形成を dose-dependent に阻害した (図2A, B)。

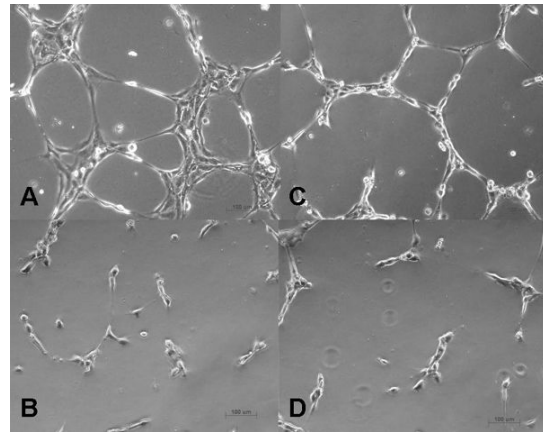


図2A, HRECによる管腔形成

A) VEGF(100ng/mL) による刺激のみ、B) rTeM (10ng/mL)、C) rTeM (100ng/mL)、D) rTeM (1ug/mL)添加下による管腔形成

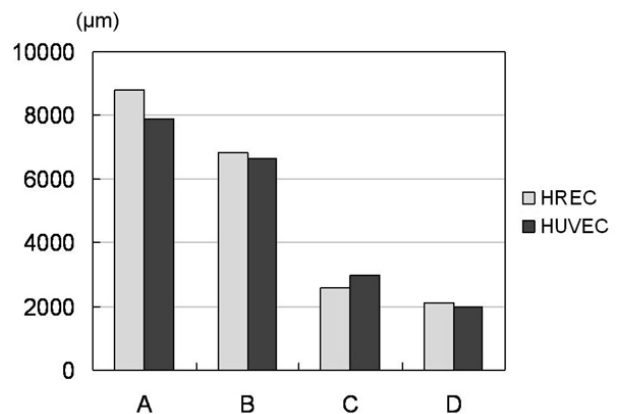


図2B, HRECおよびHUVECの管腔形成の測定

A) VEGF(100ng/mL) による刺激のみ、B) rTeM (10ng/mL)、C) rTeM (100ng/mL)、D) rTeM (1ug/mL)添加下による管腔形成。rTeM 添加群 B~D) はいずれも対象群A) に比べて有意に管腔形成が抑制された ($p<0.01$)。

一方、rTeM (1ug/0.5uL) を硝子体内注入したマウスROPモデルの眼球組織の抽出物から確かに約16kDのrTeMが存在したことが Western-blot法にて確認され (図3)、rTeMを硝子体内注入したマウスROPモデルでは、対照群 (PBS投与群) に比較して、血管新生の発生が抑制され、無灌流領域の面積 (図4A, B)

はrsTeM投与群で有意に減少していた
($p < 0.001$)。

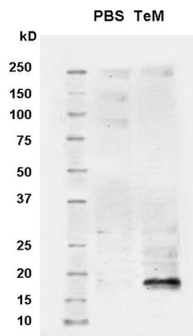


図3, rTeMの存在
眼球組織抽出物による
Western-blot法で約16kDの
rsTeMの存在を確認した

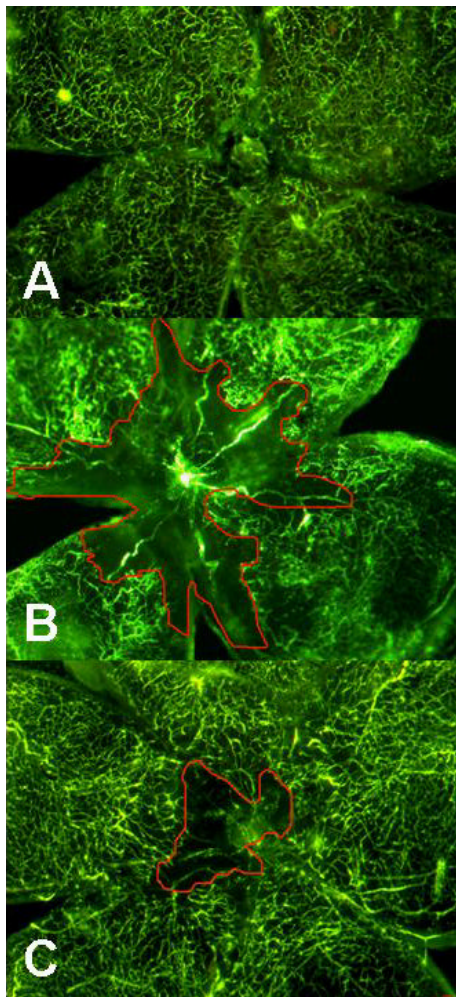


図4A, マウス (P7) 網膜フラットマウント
A) 正常マウス, B) PBS注入のROPモデルマウス, C) rTeM (1μg/0.5μL) 硝子体内注入のROPモデルマウス. 赤ラインは無血管野 (無灌流野) を囲んでいる.

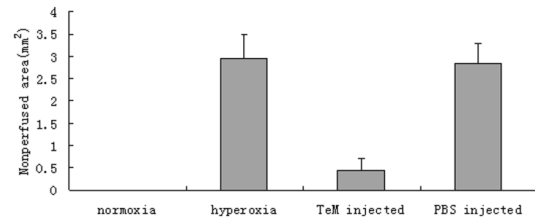


図4B, 無血管野面積の比較

rTeM (1μg/0.5μL) を硝子体内投与したROPモデルは無注入群 (hypoxia) や対象群 (PBS注入) に比べて無血管野の面積が有意に少なかった ($p < 0.001$).

網膜切片における単位面積当りの硝子体腔内への新生血管の発芽もrTeM投与群で有意に ($p < 0.01$) 減少していた (図5A, B)。

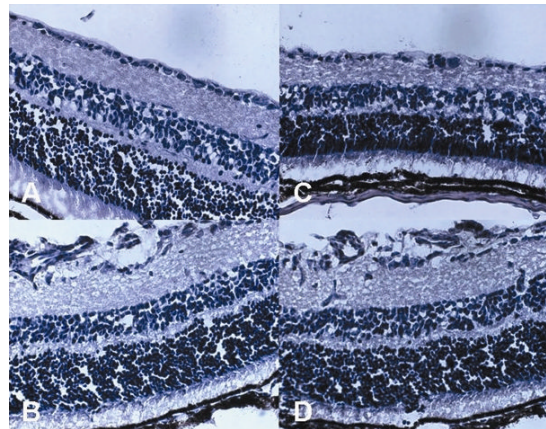


図5A, マウス (P7) 網膜切片

A) 正常マウス, B) ROPモデルマウス, C) rTeM (1μg/0.5μL), D) PBS注入の硝子体内注入のしたROPモデルマウス.

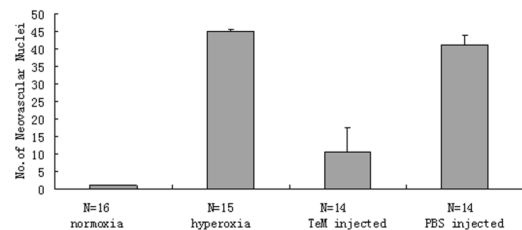


図5B, 硝子体腔内への新生血管の発芽

単位面積あたりの硝子体腔内への新生血管の発芽を血管内皮細胞核で定量的に測定. N=測定切片数. rTeM (1μg/0.5μL) を硝子体内投与

したROPモデルは無注入群 (hypoxia) や対象群 (PBS注入) に比べて硝子体腔内への新生血管の発芽が有意に少なかった ($p < 0.001$).

今回精製した無糖鎖の C 末端機能ドメインを含むリコンビナントタンパクの血管新生に対する生理活性を *in vitro* と *in vivo* の両面から確認することができ、すなわち、TeM の C 末端機能ドメインを含むリコンビナントタンパクは有意に血管内皮細胞の増殖や管腔形成を阻害し、実際の ROP モデルにおいても血管新生や無血管野形成を有意に抑制したことが証明された。現在のところ、C 末端機能ドメインが VEGF を介する血管新生を抑制できる分子メカニズムがまだ明らかにできていないが、生理的に存在する血管新生抑制物質 (TeM) による抗血管新生治療への応用は、より副作用の少ない創薬となること可能性が期待できる。血管新生抑制する分子メカニズムの解明と硝子体腔内やテノン嚢などへの局所投与による組織への副作用の検討を継続的に行うことが今後の課題と思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Oshima Y, Shima C, Wakabayashi T, Kusaka S, Shiraga F, Ohji M, Tano Y. Microincision vitrectomy surgery and intravitreal bevacizumab as a surgical adjunct to treat diabetic traction retinal detachment. *Ophthalmology* 2009 (in press) 査読あり
2. Wakabayashi T, Oshima Y, Sakaguchi H, Ikuno Y, Miki A, Gomi F, Otori Y, Kamei M, Kusaka S, Tano Y. Intravitreal bevacizumab to treat iris neovascularization and neovascular glaucoma secondary to ischemic retinal diseases in 41 consecutive cases. *Ophthalmology* 2008;115;1571-1580. 査読あり
3. 大島佑介. 眼科手術 特集: 糖尿病網膜症の最新治療戦略; 増殖糖尿病網膜症の治療における抗 VEGF 抗体の使用.(編集; 小椋祐一郎, 白神史雄) 21: 23-31, 2008. 査読あり
4. 大島佑介, 王蔚, 山名慶, 佐藤達彦, 鈴木な三保子, 田野保雄. テノモジュリン C 末端機能ドメインリコンビナント (rsTeM) による網膜血管新生抑制作用. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業: 網脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究. 平成 19 年度総括・分担研究報告書 2008; 5: 38-42. 査読あり
5. 大島佑介. IOL& RS トピックス: VEGF と抗 VEGF 療法. 日本眼内レンズ屈折手術学会誌 (編集; 綾木雅彦) Vol.21, No.3, 365-370, 2007. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. 大島佑介. 「血管新生緑内障に対する抗 VEGF 療法: 硝子体術者の立場から」第 32 回日本眼科手術学会総会・シンポジウム (2009.1.23-25 神戸)
2. 大島佑介, 王蔚, 山名慶, 佐藤達彦, 鈴木な三保子, 田野保雄. 「テノモジュリン C 末端機能ドメインリコンビナント (rsTeM) による網膜血管新生抑制作用」厚生労働省難治性疾患克服研究事業: 網脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班 2007 年度班会議 (2008.1.18-19 博多)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

大島 佑介 (OSHIMA YUSUKE)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 20362717

(2) 研究分担者：
五味 文 (GOMI FUMI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：80335364

生野 恭司 (IKUNO YASUSHI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：50294096

田野 保雄 (TANO YASUO)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80093433

(3) 連携研究者： なし