

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09970

研究課題名(和文) 難治性網膜疾患に対する網膜下薬物投与の検討

研究課題名(英文) Subretinal drug administration for refractory retinal disease

研究代表者

木村 修平 (KIMURA, Shuhei)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90628710

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)：抗血管内皮増殖因子(VEGF)薬が網膜色素(RPE)細胞に与える影響を抗VEGF薬の濃度を変えて検討し、抗VEGF薬を1/16および1/64倍希釈したベバシズマブ、アフリベルセプトでは細胞の有意な障害を認めなかった。組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)について以前に科研で報告した内容の追加検討を行った。結果はtPAの濃度が濃くなるほど、また、暴露時間が長くなるほど、経皮電気抵抗が低下することを認めた。またtPAによる網膜毒性でRPE細胞はネクローシスによる細胞死を起こすことを示す結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

少量の投与量となる抗VEGF薬(ベバシズマブ、アフリベルセプト、それぞれ1/16および1/64倍希釈)であれば、対照群と比較して有意な細胞障害を認めなかった。低濃度であれば抗VEGF薬の網膜下投与への可能性が示唆され、今後さらなる追加検討が望まれる。

組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)は濃度が濃くなるほど、暴露時間が長くなるほど、網膜色素上皮細胞の接着にも悪影響を及ぼし、ネクローシスによるものと思われる細胞死を引き起こしていた。よって、網膜下に投与するtPAは、できるだけ低濃度であることが望ましい。

研究成果の概要(英文)：The effect of anti-VEGF drugs on retinal pigment cells was examined at different concentrations of anti-VEGF drugs, lower concentration bevacizumab and aflibercept (1/16- and 1/64) did not show significant cellular damage compared to the control group. Tissue plasminogen activator (tPA) was examined in addition to a previous report. The results showed that the higher the concentration of tPA and the longer the exposure time, the lower the transcutaneous electrical resistance. In addition, RPE cells showed necrotic cell death due to tPA-induced retinal toxicity.

研究分野：眼科学

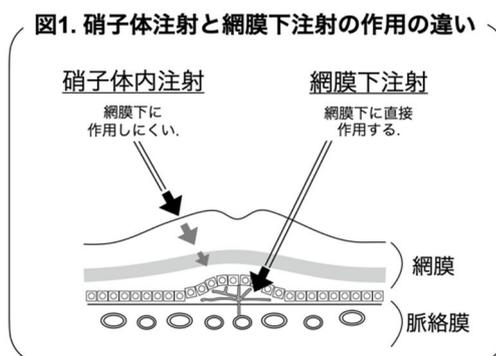
キーワード：加齢黄斑変性 糖尿病網膜症 iPS-RPE細胞 抗血管内皮増殖因子

1. 研究開始当初の背景

現在の日本の失明原因について、網膜疾患である第3位の糖尿病網膜症 (DR) と第4位の加齢黄斑変性 (AMD) を合わせると、1位の緑内障を上回る罹患数となる。現在、DR、AMD に対する治療は抗 VEGF 薬硝子体注射が第一選択であるが、急速な社会の高齢化により患者数が急増し、日本国内で消費される抗 VEGF 薬硝子体注射による医療費は年間 700 億円を超えている。注射は繰り返し必要で、それでも治療に抵抗する症例は、レーザー加療、硝子体手術との併用療法が行われている。申請者らは、抗 VEGF 薬硝子体注射に抵抗する AMD に対して、網膜硝子体界面疾患を合併する場合は硝子体手術を行い、抗 VEGF 薬硝子体注射の治療効果が改善することを報告した (Kimura et.al. Graefe Arch 2015)。さらには、抗 VEGF 薬硝子体注射に抵抗する難治性 DR に対して網膜下にオキシグルタチオン眼灌流液 (BSS) を注入することで網膜症を改善できることを報告した (Morizane, Kimura et.al. JJO 2015)。しかし、そういった治療をしてもなお、改善を認めない症例は失明に至っている。よって現状よりも効果的な DR、AMD の治療方法の開発が急務である。

2010 年、Treumer らは、AMD が原因の黄斑下出血に対して、硝子体手術を行い、その時、同時に網膜下に組織プラスミノゲン活性化因子と抗 VEGF 薬投与を行い、術後、良好な治療成績が得られたことを報告している。もし、この硝子体手術と網膜下に抗 VEGF 薬を注入する加療を、抗 VEGF 薬硝子体注射に

抵抗する DR、AMD に対して施行すると、網膜下もしくは網膜内の病変に対して薬剤を効率的に作用させることが期待でき、これまで治療に抵抗していた症例について、病態の改善が期待できると申請者は考えた。特に、1型脈絡膜新生血管を有する AMD については、抗 VEGF 薬硝子体注射が十分に脈絡膜新生血管に作用していないという報告もあり、網膜下への抗 VEGF 薬の投与が奏功する可能性がある (図 1)。しかし、問題点としては、抗 VEGF 薬の網膜下への投与については、十分な検討がなされていないことである。



黄斑下出血 (SMH) に対する治療は、1990 年代までは網膜に切開を行い、SMH を物理的に除去する治療が行われていた。しかし合併症が多いため、現在は SMH を黄斑部から周辺に移動させる治療 (出血移動術) が主流となっている。組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) を眼内に投与することにより、移動しやすくなり、術後良好な視力が得られことが報告されている。過去に tPA の毒性につ

いては報告があるものの、数に限りがあり、十分な検討がなされていない。

2 . 研究の目的

2-1) 抗 VEGF 薬の RPE 細胞に与える影響の検討

現在、抗 VEGF 薬の投与は硝子体注射のみが用いられており、網膜下注射での効果、毒性、生理活性に与える影響については十分な検討が行われていない。そこで、抗 VEGF 薬が網膜細胞、網膜色素上皮 (RPE) 細胞に与える影響の研究を行う。

2-2) tPA が hiPS-RPE 細胞の経皮電気抵抗に与える影響の研究、および、

2-3) tPA による網膜毒性による RPE 細胞死に関する研究

tPA の毒性が濃度および時間依存的に増悪することを以前の科研で報告している。これについてさらなる追加検討 (tPA が経皮電気抵抗に与える影響、および、細胞死の種類) の検討) を行う。

3 . 研究の方法

3-1) RPE 細胞に対する抗 VEGF 薬の濃度の違いによる毒性の検討として、種々の抗 VEGF 薬 (ベバシズマブ、アフリベルセプト) を primary RPE 細胞に投与し、毒性が生じるのかどうか、生じるのであれば、どの程度の濃度で毒性が生じるのかを明らかにする。対照は PBS を使用し、評価は MTT アッセイで行った。

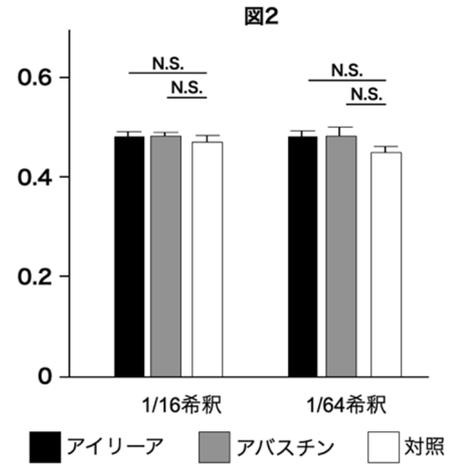
3-2) ヒト iPS 細胞由来 RPE (hiPS-RPE) に濃度の違う tPA を投与して、投与後の経皮電気抵抗 (*Transepithelial resistance, TER*) を比較する。詳細は 3 週間育成したシート状の hiPS-RPE (最低 TER が $200\Omega\text{cm}^2$ まで育成) に、0, 83 そして $250\ \mu\text{g/ml}$ の tPA を添加し、3, 6 時間後の TER を測定した。

3-3) tPA の添加物であるアルギニンが hfRPE に及ぼす影響について、Ethidium Homodimer III (EthD-III) と FITC-Annexin V 染色を用いてネクローシス細胞もしくはアポトーシス後期細胞の検出を行った。hfRPE に 8.2mg/ml のアルギニンを 0, 2, 4, 6 時間負荷した後に PBS で洗浄し、Hoechst 33342, EthD-III そして FITC-Annexin V を用いて染色した。ポジティブコントロールとして、 $50\ \mu\text{M}$ hydrogen peroxide (H_2O_2) を使用した。

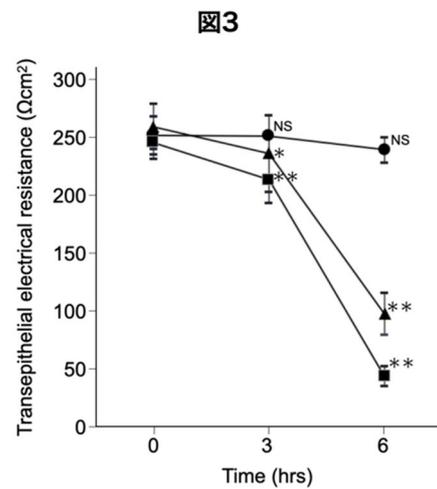
アルギニンが hfRPE に及ぼす影響について、Terminal transferase deoxyuridine triphosphatase nick-end labeling (TUNEL) 染色を用いてアポトーシス細胞の検出を行った。hfRPE に 8.2mg/ml のアルギニンを 0, 2, 4, 6 時間負荷した後に PBS で洗浄し、4%paraformaldehyde で 1 時間固定し PBS で洗浄後、0.1% Triton-X 100 で透過処理した。PBS で洗浄した後、DAPI と TUNEL 反応をおこなった。ポジティブコントロールとして、DNase で処理された hfRPE cells を使用した。

4 . 研究成果

4-1) 抗 VEGF 薬 (ベバシズマブ、アフリベルセプト) 投与後 48 時間後に検討を行った。抗 VEGF 薬が 1/16 および 1/64 倍希釈したベバシズマブ、アフリベルセプトでは、対照群と比較して、細胞の有意な障害を認めなかった (図 2)。抗 VEGF 薬の濃度が高くなると (培養液の 1/2 または 1/4)、一定した結果が得られないことが判明した。原因として培養液の濃度が薄くなり、培養液が薄い影響による細胞障害が起こっていることが推測された。



4-2) tPA を添加しなかった hiPS-RPE の TER は、3, 6 時間後の TER と比べて変化はなかった (どちらも $P > 0.05$, 図 3)。83 と 250 $\mu\text{g/ml}$ の tPA を添加した hiPS-RPE ではどちらも 3 時間の時点で有意に電気抵抗が低下し (それぞれ $P < 0.05$, < 0.01)、6 時間では更に低下した (どちらも $P < 0.01$)。tPA を添加しなかった hiPS-RPE の TER にくらべて、83 and 250 $\mu\text{g/ml}$ を添加した 6 時間後の TER はどちらも有意に低下した (どちらも $P < 0.01$)。さらに 250 $\mu\text{g/ml}$ を添加した hiPS-RPE は 83 $\mu\text{g/ml}$ を添付した hiPS-RPE よりも TER が低下していた ($P < 0.05$)。



4-3) アルギニン 8.2mg/ml を 2, 4, 6 時間負荷された hfRPE を Hoechst 33342, EthD-III そして FITC-Annexin V で染色すると、EthD- および FITC-Annexin V 陽性細胞が暴露時間とともに増加した (図 4)。

アルギニン8.2mg/mlを2, 4, 6 hours負荷されたhfRPEをDAPIおよびTunel染色した結果、2, 4, 6時間暴露しても、TUNEL陽性細胞を認めなかった (図5)。

図4

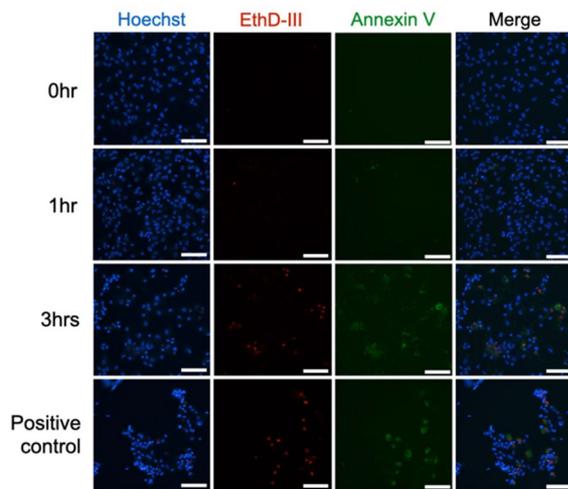
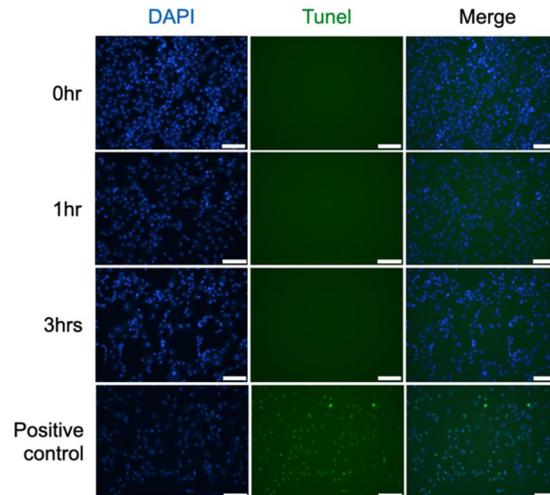


図5



5) 総括

少量の投与量 (1/16 および 1/64 倍希釈) となる抗 VEGF 薬 (ベバシズマブ、アフリベルセプト) であれば、対照群と比較して有意な細胞障害を認めなかった。抗 VEGF 薬の安全な網膜下への投与について、今後さらなる追加検討が望まれる。

tPA は濃度が濃くなるほど、暴露時間が長くなるほど、RPE の接着にも悪影響を及ぼし、ネクローシスによると思われる細胞死を引き起こしていた。今後、tPA を網膜下に投与する場合、できるだけ低濃度での使用が望ましい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimura S, Morizane Y, Toshima S, Shiode Y, Doi S, Takahashi K, Matoba R, Kanzaki Y, Shiraga F	4. 巻 5
2. 論文標題 Cytotoxic effects of alteplase, a recombinant tissue plasminogen activator, on human retinal pigment epithelial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 731-739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-021-00848-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村修平
2. 発表標題 教育セミナー 眼底疾患の画像診断、基本と応用 サージカルレチナ編 黄斑下出血
3. 学会等名 網膜硝子体学会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	大内 淑代 (Ohuchi Hideyo) (00253229)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

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
---------	---------