

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18877

研究課題名(和文) 未熟児網膜症モデルへの抗VEGF薬投与による、血清VEGFおよび反対眼への影響

研究課題名(英文) The systemic antiangiogenic effect of intravitreal anti-VEGF injection in a mouse model of retinopathy of prematurity

研究代表者

一山 悠介 (Ichiyama, Yusuke)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10749021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：未熟児網膜症(ROP)の治療は、近年、抗血管内皮増殖因子(VEGF)薬の眼内注射が第一選択になりつつある。しかし、眼球に注射した抗VEGF薬は全身の血流に移行するため、血行性に全身性の副作用を生じる可能性がある。そこで本研究ではROPモデルマウスに対して抗VEGF薬の一つであるアフリベルセプトを眼内注射し、全身への影響を解析した。その結果、アフリベルセプト投与後には短期間の体重成長不良、反対眼や腎臓の血管への血行性副作用を認めた。一方で、脳血管には影響を認めなかった。以上より、ROPに対する抗VEGF薬の眼内注射は短期間の全身性副作用を有し、その影響の程度は臓器によって異なる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未熟児網膜症(ROP)は小児の失明原因の第1位であり、これまで網膜光凝固(レーザー治療)が標準的な治療法とされてきた。近年、ROPに対して抗血管内皮増殖因子(VEGF)薬を眼内注射する治療の有効性が示され第一選択になりつつある。しかし、眼球に注射した抗VEGF薬は全身の血流に移行するため、血行性に全身性の副作用を生じる可能性が懸念されてきた。本研究ではROPのモデルマウスを用いて抗VEGF薬眼内注射の全身性副作用を解析したところ、短期間ではあるが全身性副作用を有する結果が得られた。この研究成果により、未解明であった抗VEGF薬眼内注射の全身性副作用が明らかになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Retinopathy of prematurity (ROP) is a leading cause of childhood blindness and intravitreal anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) injection is becoming a first line choice for treatment of ROP. However, there is a major concern that intravitreally injected anti-VEGF agents could escape from the eye into the systemic circulation and impair systemic development. In this study, we investigated the hematogenous effect of a single intravitreal anti-VEGF injection in a mouse model of ROP. Here, we showed that single intravitreal aflibercept injection to one eye can affect body weight gain, the fellow eye, and renal vessels, although no apparent effect was observed in brain vessels. Our results provide very important insights into the clinical use of anti-VEGF agents for ROP treatment.

研究分野：虚血性網膜疾患

キーワード：未熟児網膜症 抗VEGF薬 全身性副作用 反対眼 僚眼

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

未熟児網膜症 (ROP) は本邦における小児の失明原因の第 1 位であり、治療法確立が強く期待される疾患である。これまで ROP の治療は無血管領域への光凝固術が標準的な治療法とされてきたが、近年、ROP に対して抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 薬を眼内注射する治療の有効性や眼局所での安全性が示され、世界的に使用されるようになってきている。

しかしこの治療法では、眼球に注射した抗 VEGF 薬が全身の血流に移行してしまい、眼内だけでなく血液中の VEGF まで低下させることが報告されている。哺乳類の発生において VEGF が必須の分子であることはすでに明らかにされているため、発育段階の新生児に対して抗 VEGF 薬の眼内注射を行うことによる全身性の副作用を生じる可能性が強く懸念されている。さらに、片眼に注射した抗 VEGF 薬が血液を介して反対眼に悪影響を及ぼしたとする報告もあり、抗 VEGF 薬の眼内注射後の血行性の副作用の詳細な解析は非常に重要な研究課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、抗 VEGF 薬のひとつであるアフリベルセプトを ROP モデルマウスに対して眼内注射し、注射眼、反対眼、腎臓、脳への影響を検討することで、臓器別の影響の違いを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ROP マウスモデルの作製および薬剤投与方法

出生した新生児とその母親を、生後 8 日より 3 日間、85% の高濃度酸素環境で飼育し、その後は通常酸素下にもどすことで ROP マウスモデルを作成した。通常酸素下に戻して 1 日後にアフリベルセプト (0.02mg/0.5 $\mu$ l)、ヒト IgG (0.02mg/0.5 $\mu$ l) もしくは PBS (0.5 $\mu$ l) を硝子体内注射し、注射後は毎日の体重を測定した。注射後 2 日目および 4 日目に麻酔下に心臓より全採血を行い安楽死させ、以下の解析を行った。

#### 注射眼および反対眼の解析

注射眼、反対眼を摘出して網膜ホルマウントを作成、抗 isolectin B4 抗体を用いた免疫染色により網膜血管を可視化し、抗ヒト IgG 抗体を用いてアフリベルセプトの局在を観察した。得られた画像から新生血管 (NV) 面積、血管蛇行度を定量し、アフリベルセプトの影響を検討した。

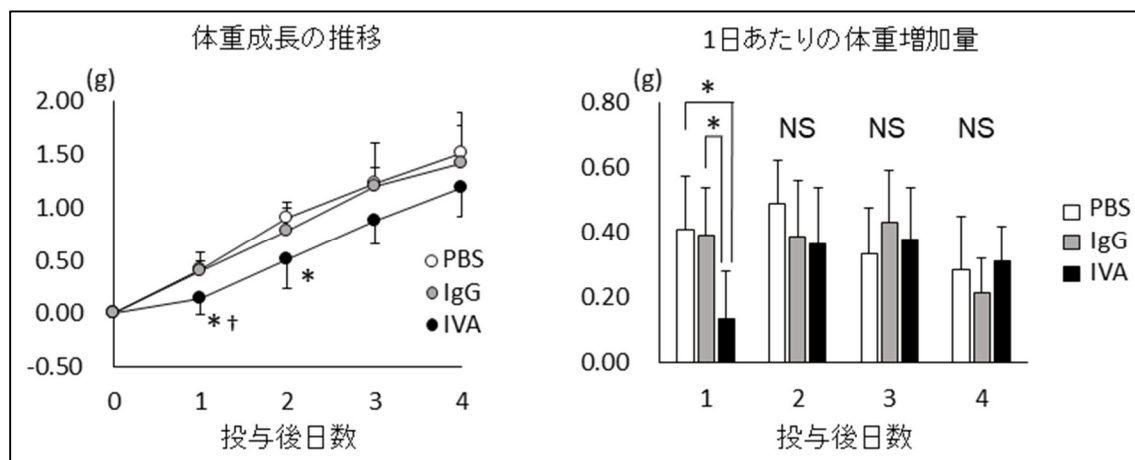
#### 脳および腎臓の解析

腎臓、脳を摘出し、凍結切片を作成、抗 CD31 抗体、抗 Erg 抗体を用いて血管構造を可視化し、抗ヒト IgG 抗体を用いてアフリベルセプトの局在を観察した。腎血管、脳血管の血管内皮細胞数を定量し、アフリベルセプトの影響を検討した。

### 4. 研究成果

#### アフリベルセプト眼内注射による体重成長への影響

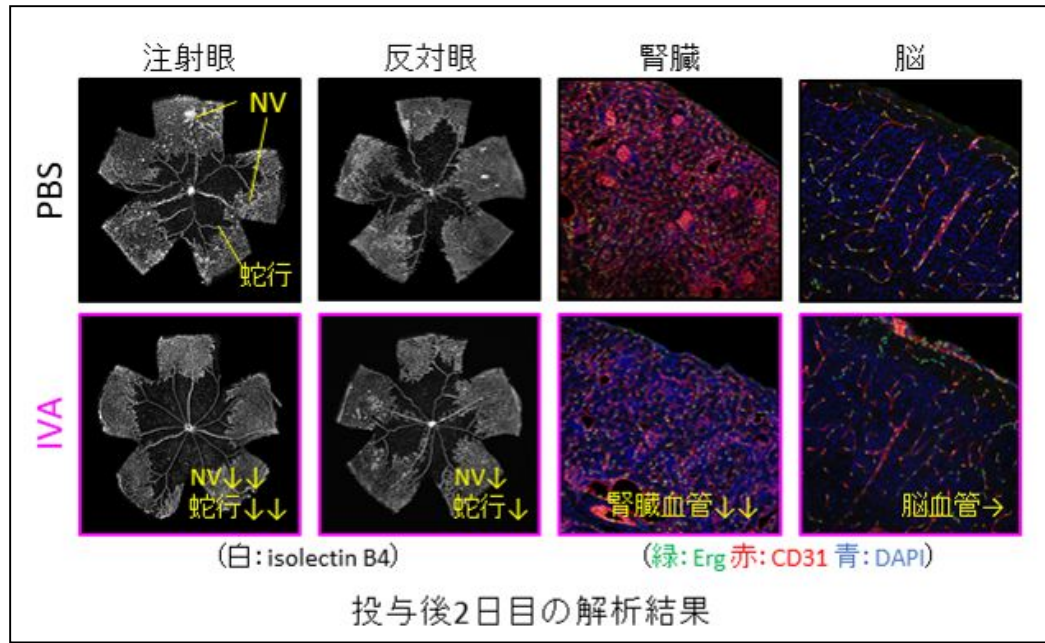
アフリベルセプト、ヒト IgG、PBS 投与後の体重成長の推移を観察したところ、注射後 1 日から 3 日目までの間、アフリベルセプト群 (IVA 群) の体重成長が PBS 群、IgG 群と比較して有意に不良であった (下図左)。さらに、1 日あたりの体重増加量を解析したところ、アフリベルセプトによる有意な体重増加不良は注射後 1 日のみであった (下図右)。これらのことから、アフリベルセプトは眼球投与であっても体重成長に影響を及ぼし得ること、またその影響は非常に短期間に留まることが明らかとなった。



アフリベルセプト眼内注射による注射眼、反対眼、腎臓、脳の血管への影響

アフリベルセプト注射後2日目の網膜血管解析では、注射眼だけでなく反対眼においても、有意な新生血管（NV）面積の減少、蛇行度の低下を認めた（下図左）。アフリベルセプト注射後4日目の網膜血管解析では、これらの変化は注射眼のみとなっており反対眼には認めなかった。アフリベルセプト注射後2日目の腎臓血管解析では、腎臓血管内皮細胞の有意な減少を認めた（下図中）。この変化も注射後4日目には消失しており、これらのことから、アフリベルセプト眼内注射後の血行性の全身への影響は短期間に留まることが示唆された。

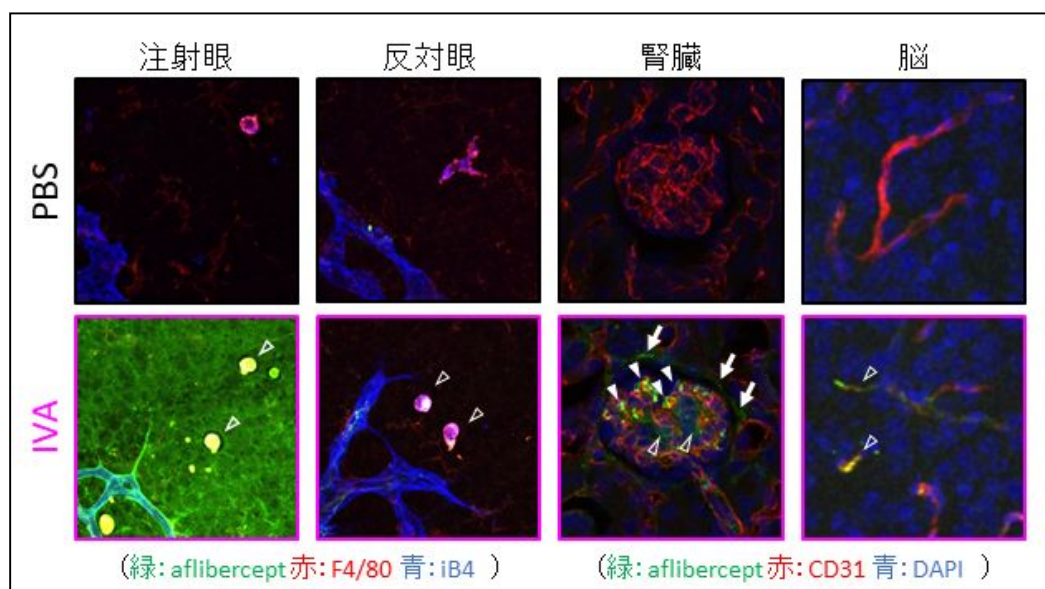
一方、脳血管解析では、アフリベルセプト注射後2日目であってもPBS群とIVA群で有意な血管内皮細胞数の変化を認めなかったため（下図右）、臓器によって血行性の影響の度合いは異なる可能性が示された。



アフリベルセプト眼内注射後の注射眼、反対眼、腎臓、脳におけるアフリベルセプトの局在

アフリベルセプト注射後の注射眼、反対眼、腎臓、脳におけるアフリベルセプトの局在を観察したところ、アフリベルセプト投与によって血管構造に変化を認めた注射眼、反対眼、腎臓では血管外の細胞や組織にアフリベルセプトが局在していたのに対して、血管構造に変化を認めなかった脳ではアフリベルセプトは血管内にとどまっていた（下図）。

このことから、臓器によってアフリベルセプトの局在が異なることが、アフリベルセプト投与の影響が臓器によって異なる原因であると考えられた。



### 研究成果のまとめ

ROP モデルマウスに対してアフリベルセプトを硝子体内注射すると、短期間ではあるが血行性の全身性副作用を有することが分かった。またその影響は臓器によって程度が異なる可能性があり、投与したアフリベルセプトの局在がその原因であると考えられた。

ヒトのROPに対して抗VEGF薬を硝子体内注射した後の全身性副作用を検討した報告は散見されるが、いずれも数か月から数年単位の中期的な影響を検討した報告である。今回の動物実験の結果を踏まえると、ROPに対して抗VEGF薬を硝子体内注射した後の全身性副作用は、注射後の非常に短期間において生じている可能性が高い。今後は、注射後早期の全身性副作用に着目して、ヒトのROPの診療データの解析を行っていく予定である。

### 雑誌論文

1. **Ichiyama Y**, Obata S, Saishin Y, Sawada O, Kakinoki M, Sawada T, Kubota Y, Ohji M.  
The systemic antiangiogenic effect of intravitreal aflibercept injection in a mouse model of retinopathy of prematurity. FASEB J. 35:e21390, 2021.

### 学会発表

1. **一山悠介** 抗VEGF薬の全身への影響(インストラクションコース48) 第74回日本臨床眼科学会総会 2020年11月5日-12月6日 ウェブ開催
2. **一山悠介**、小幡峻平、西信良嗣、澤田修、柿木雅志、澤田智子、大路正人 未熟児網膜症モデルマウスへのアフリベルセプト眼内投与による体重および療眼への影響 第58回日本網膜硝子体学会総会 2019年12月6日 長崎

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichiyama Yusuke, Obata Shumpei, Saishin Yoshitsugu, Sawada Osamu, Kakinoki Masashi, Sawada Tomoko, Kubota Yoshiaki, Ohji Masahito	4. 巻 35
2. 論文標題 The systemic antiangiogenic effect of intravitreal aflibercept injection in a mouse model of retinopathy of prematurity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202002414R	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 一山悠介、小幡峻平、西信良嗣、澤田修、柿木雅志、澤田智子、大路正人
2. 発表標題 未熟児網膜症マウスモデルへのアフリベルセプト眼内投与による体重および傍眼への影響
3. 学会等名 第58回 日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一山悠介
2. 発表標題 抗VEGF薬の全身への影響
3. 学会等名 第74回 日本臨床眼科学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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