

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592080

研究課題名(和文) 脈絡膜新生血管に伴う網膜下線維痕病巣形成の抑制

研究課題名(英文) The inhibition of subretinal fibrosis due to choroidal neovascularization

研究代表者

園田 康平 (SONODA KOHEI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10294943

研究成果の概要(和文)：網膜色素上皮細胞がマクロファージと共同で様々な炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を網膜下で行うことが判った。主なものはIL-6とMCP-1であった。液性因子が長期作用することで、網膜色素上皮細胞は自らの形態変化を来し、網膜下線維痕病巣を形成する。脈絡膜新生血管病の早期に網膜下線維痕抑制を意識した治療を開始することが、黄斑部機能の長期維持につながるということが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Activated macrophages formed subretinal fibrosis when they were placed in the subretinal space and induce myofibrotic changes in RPE cells. The major factors to form fibrosis were IL-6 and MCP-1. We confirmed the in vivo blocking of IL-6 and MCP-1 reduced subretinal fibrosis and might be beneficial to maintain visual acuity in CNV-related diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：自然免疫、脈絡膜血管新生、網膜線維痕、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization:CNV)は黄斑部に生じやすく、これによる新生血管黄斑症は重篤な視力低下を来す。従来CNV関連疾患に関する基礎的あるいは臨床的研究はその形成機序に関するものが多い。しかし最新治療をもってしても「進行を止めるのが精

一杯」「CNVは治療しても視力は回復しない」というジレンマが存在する。脈絡膜新生血管病の治療ターゲットとしてCNVからの出血・滲出後に生じる黄斑部の機能障害(線維痕治療)過程も重要である。仮に網膜下出血を起こしても、それに対して起こる必要以上の免疫炎症反応を制御することができれば、黄斑部組織破壊を最小限に

止めることができると考えた。

本研究では、これまでの眼局所炎症と自然免疫系の研究基盤を元に、マウス網膜下癒痕モデルを中心に、脈絡膜新生血管病の最終的な予後不良原因である黄斑部機能障害・癒痕化抑制に向け、具体的な治療法確立を目指す。

2. 研究の目的

そもそも正常眼はある程度の眼炎症を抑える自浄能力を備える。ゆえに眼は免疫炎症反応が起きにくい「免疫学的に特別な臓器 (immune privileged site)」といわれてきた。眼が本来持つ自浄機構を回復させることで、副作用のない新たな免疫療法を実現できる可能性がある。自然免疫細胞群が眼の恒常性維持に不可欠な存在であることが認知されつつある (Sonoda KH et al., *JEM*1999, JW Streilein, *Nat Rev Immunol.*, 2003)。眼内に浸潤した自然免疫細胞群を適切にコントロールすることで、一度過剰炎症・組織破壊に傾いた流れを、もとの炎症抑制型に戻すことができる可能性がある。出血・滲出後の局所炎症反応にスポットをあて、反応形成に関与する細胞群を明らかにした上で、その機能抑制を行い、黄斑部機能維持を図る。

具体的には以下の目的を掲げた。

- (1) マウスを用いた網膜下癒痕化モデルにおいて、マクロファージ (および他の局所自然免疫細胞群) と RPE が病態に関与するメカニズムを明確にする。
- (2) 癒痕化に関与する起炎症因子のスクリーニングを行い、主な炎症因子・経路を明らかにする。
- (3) 黄斑部癒痕化の具体的な抑制法を提案する。

3. 研究の方法

上記の観点から、独自に網膜下癒痕モデルの作成を行った。これは癒痕形成に重要とされる活性化型マクロファージ (具体的にはチオグリコレート誘導腹腔マクロファージ) をマウス網膜下に注入することで、検眼鏡的にも、また組織学的にもヒトに類似した局所癒痕を再現するものである。この独自に開発したマウス網膜下癒痕モデルを用いて、タンパクアレーの手法を用いて局所炎症性液性因子をスクリーニングした。ターゲットとなる因子を同定した後、その局在と機能抑制を試みた。

マクロファージに加えて病態形成に重要と考えられるのが網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cell:RPE) である。RPEは、生理的条件下では視細胞の外節の食機能をはじめ神経網膜の環境を保持するのに重要である。一方で、いったん炎症状態にシフトすると、機能変化を生じ各種ケモカイン・サイトカインを産生し炎症反応を増強する。事実マクロファージと共培養したRPEは細胞内・SMAが上昇し、網膜下注入によって、網膜下癒痕形成に至ることが判っている。

(1) ルミネクスによる局所炎症性サイトカイン・ケモカインのスクリーニング

ルミネクスは特異抗体で標識された蛍光マイクロビーズとフローサイトメトリーを組み合わせることで、短時間で多検体の同時定量を可能にするシステムである。本システムを用いて、モデルマウス硝子体液中の種々のサイトカイン・ケモカイン濃度を同時スクリーニング測定する。測定項目は GM-CSF, IL-1 \cdot , IL-6, MIP-2, IL-17, TNF- \cdot , IFN- \cdot , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, EGF, VEGF, basic FGF, G-CSF,

eotaxin, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES であった。

(2) マウス網膜下癒痕モデルの作成・評価

①マウス眼底後極部に、1カ所レーザー強凝固を行う。この際ブッフ膜を破壊する程度の強凝固とする。これにより脈絡膜からの炎症細胞浸潤を可能にすると同時に、網膜下にエアバブルを生じさせる。

②毛様体扁平部から 33G 針を刺入し、網膜下にチオグリコレート誘導腹腔マクロファージを注入する。

③エアバブルが網膜刺入創をシールするため、直後に注入細胞が硝子体内に播種するのを防ぐことが可能である。また光凝固を行っているため、数時間で網膜刺入創は自己閉鎖する。

④7日後に脈絡膜フラットマウントを作成する。網膜下癒痕組織は通常脈絡膜側に付着する。

⑤グリオシスマーカーである GFAP で免疫染色する。脈絡膜に付着した癒痕組織が可視化されるため、定量化のための面積測定が可能となる。このモデルは網膜癒痕化に重要な炎症性液性因子の同定と、その抑制による臨床効果判定の両方に用いた。



(3) 眼内 IL-6 の機能抑制: 特異抗体と siRNA の硝子体内投与

予備実験の結果やヒト網膜下癒痕組織の解析から、眼内 IL-6 が病態に関与していると考えられた。ゆえに下記の実験を行った。

①IL-6 機能抑制に作用する抗体は、IL-6 そのものの中和抗体とレセプターのブロック抗体の2つが存在する。全身投与では網膜下病変に限られた量しか移行しない恐れがあるため、高濃度の抗体を直接硝子体腔に注入した。

②タンパクレベルでの抑制に加えて、siRNA による核酸レベルでの抑制を試みた。

4. 研究成果

RPE がマクロファージと共同で様々な炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を網膜下で行うことが判った。主なものは IL-6 と MCP-1 であった。液性因子が長期作用することで、RPE は自らの形態変化を来し、網膜下線維癒痕病巣を形成することが明らかとなった。IL-6 の作用を抗体投与や遺伝子ノックダウンのよって局所で抑制すると、網膜下線維癒痕病巣形成が抑制された。脈絡膜新生血管病に伴う網膜癒痕に対して、診断後早期に網膜下線維癒痕抑制を意識した治療を開始することが、黄斑部機能の長期維持につながる事が明らかになった。

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1件)

①Establishment of a new animal model of

focal subretinal fibrosis that resembles disciform lesion in advanced age-related macular degeneration. Jo YJ, Sonoda KH et al., Investigative Ophthalmology and Visual Science in press (2011) 査読有

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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) 研究代表者

園田 康平 (SONODA KOHEI)

山口大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10294943

(2) 研究分担者

畑 快右 (HATA YASUAKI)

福岡歯科大学・眼科・教授

研究者番号：90346776

石橋達朗 (ISHIBASHI TATSURO)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：301050428

(3) 連携研究者

なし