

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：23903  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21592237  
 研究課題名（和文）  
 細胞外マトリックスによる脈絡膜血管新生の制御機構解明と新たな治療法開発  
 研究課題名（英文）  
 Extracellular matrix as a new therapeutic target for choroidal neovascularization  
 研究代表者  
 野崎 実穂（NOZAKI MIHO）  
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
 研究者番号：00295601

研究成果の概要(和文):オステオポンチン(OPN)は細胞外マトリックスの一種で、炎症、癌転移などの疾患に関与している。今回我々は、マウスを用いて、実験的レーザー脈絡膜新生血管(CNV)における OPN の関与について検討した。抗 OPN 抗体硝子体内投与により、CNV は有意に抑制され、血管内皮増殖因子(VEGF)も有意に抑制された。手術で摘出したヒト CNV 組織マウス CNV において OPN はマクロファージと共発現していた。これらの結果から、OPN は CNV の発症に関与しており、OPN を標的とした AMD 治療の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文):Osteopontin (OPN) is a chemokine like phospholyrated glycoprotein and involved in inflammation, tumor genesis and wound healing. The purpose of the study was to clarify a role of OPN in the development of laser-induced choroidal neovascularization (CNV) in mice. OPN neutralizing Abs significantly abolished CNV area. Genetic ablation of OPN also significantly suppressed CNV area compared with wild-type mice. OPN was immunopositive in the CNV lesions and co-localized with infiltrated macrophages. Collectively these findings demonstrate a significant role of OPN in the development of CNV. OPN blockade may be considered further therapeutic potential for age-related macular degeneration.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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:加齢黄斑変性、脈絡膜新生血管、VEGF-A、オステオポンチン、マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症(AMD)をはじめとする CNV は、欧米では高齢者の失明原因の第一位であり、わが国でも高齢化と生活様式の欧米化に伴い、年々増加傾向にある。CNV の発症に VEGF-A の関与が示唆されており、最近次々と抗 VEGF

治療薬が開発されており、注目を集めている (Gragoudas ES et al: N Engl J Med 2004, 30: 2805-2816, Rosenfeld PJ et al: N Engl J Med 2006, 355: 1419-1431)。さらに眼科用に開発されたアプタマーと抗体(Fab)以外にも本来全身投与(癌治療)目的でつくられた抗 VEGF 抗体

自体もAMDの治療薬として急速に使われており(Rosenfeld PJ et al: Ophthalmic Surg Lasers Imaging 2005, 36:331-335)、AMD治療領域における抗VEGF治療はめざましいものがある。一方、VEGFはヒトのあらゆる組織に存在しているサイトカインであり、以前からアルツハイマー病、脳梗塞、てんかんなどに関連して神経保護作用があることが報告されてきた。正常眼にもVEGFは存在しており、網膜神経保護(Nishijima K et al: Am J Pathol 2007,171: 53-67)、脈絡膜毛細血管板の発生・維持(Mameros AG et al: Am J Pathol 2005, 167: 1451-1459)といった正常眼機能維持にも非常に重要な働きをしていることが明らかになってきている。現在のAMD治療では、4週から6週毎に硝子体内に抗VEGF薬を投与するプロトコルであるものの、上記のような神経保護作用、脈絡膜毛細血管板維持の観点から、長期的な使用による副作用が危惧される。また、代表研究者らは、マウスレーザーCNVモデルを用い、マウス硝子体内にVEGFを投与したところ、CNVが逆に抑制されることを発見した(Nozaki M et al: J Clin Invest 2006, 116: 422-429)。この機序として、細胞外マトリックスであるSPARCがVEGFの作用を制御していることを明らかにした。

細胞外マトリックスは生体内で細胞を取り巻いている物質であり、細胞を物質的に支持する役割を担っていることが知られている。しかし、近年細胞外マトリックス自体が細胞の接着を担うだけでなく、接着を通じて移動、分化、増殖等の細胞機能調節を積極的に演じていることが明らかになっている。SPARCも血管内皮細胞細胞の増殖を抑制し、血管新生に深く関与しているといわれている。SPARCは元々骨から発見された細胞外マトリックスであるが、同様に骨から発見された細胞外マトリックスのオステオポンチンも、最近、癌転移や血管新生に関与していることが報告されてきており、眼科領域では糖尿病網膜症患者の硝子体中にオステオポンチンが有意に高く存在しているといわれている(Kase S, et al: Ophthalmic Res 2007, 39:143-147)。オステオポンチンはそれ自体に内皮細胞遊走作用があるほかに、IL-1(Naldini A et al: J Immunol 2006, 177:4267-4270)やFGF(Leali D et al: J Immunol 2003, 171:1085-1093)といったサイトカインにも作用し、血管新生促進機序を有すると考えられており、抗血管新生治療のターゲットとして非常に高い可能性があると思われる。我々は、細胞外マトリックスによる脈絡膜血管新生の制御機構を解明することにより、細胞外マトリックスを標的とする新しいAMD治療を開発することができると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞外マトリックスによる脈絡膜血管新生の制御機構を解明し、細胞外マトリックスを標的とする新しいAMD治療を開発することであり、現在盛んに行われているVEGFを標的とするAMD治療にかわる新しい安全な治療法確立をめざすものである。

## 3. 研究の方法

(1) レーザー誘導実験的脈絡膜新生血管作成  
C57BL/6マウスあるいはOPNノックアウトマウスに、レーザー照射を行い、実験的脈絡膜新生血管を作成、7日目に眼球を摘出、4%パラホルムアルデヒドで固定し、網膜色素上皮-脈絡膜-強膜フラットマウントを作成、FITCで標識されたレクチンで免疫染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡を用いて、脈絡膜新生血管の面積を測定した(図1)。

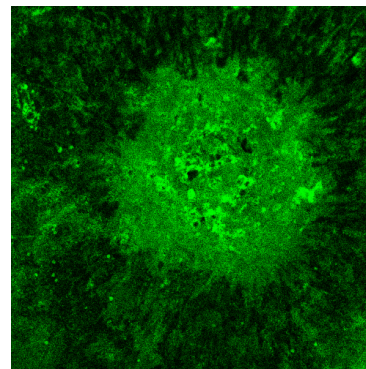


図1 レクチンで染色した脈絡膜新生血管

(2) 硝子体内投与  
レーザー直後、マウス硝子体腔内に、33Gシリンジを用いて、抗OPN抗体10ng、100ngを投与した。対照にはPBSを投与した。

(3) 免疫染色  
生後8週のC57BL/6Jマウスを用いてレーザー照射後3日目に眼球を摘出し、冷凍薄切切片を作成した。抗OPN抗体およびマクロファージを染色するF4/80抗体を用いて免疫染色を行った。AMDによるCNV摘出術を施行した、CNV組織を、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した後、4μm厚の連続切片を作成した。OPNの発現について、抗ヒトOPN抗体、マクロファージを染色するCD68抗体、血管内皮を染色するvWF抗体を用いて免疫染色を行った。

(4) ELISA  
抗OPN抗体と対照としてPBSをレーザー照射後に硝子体内に投与した。OPNとVEGFの感覚網膜および網膜色素上皮細胞/脈絡膜内の発現量を経時的にELISAを用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) CNV 面積は PBS 投与群で平均 35662.0  $\mu\text{m}^2$ 、抗 OPN 抗体 10 ng 投与群で平均 24954.8  $\mu\text{m}^2$  ( $p=0.015$ )、抗 OPN 抗体 100 ng 投与群で平均 12985.7  $\mu\text{m}^2$  ( $p<0.0001$ ) と容量依存性に CNV 面積の有意な抑制を認めた。(図 2)

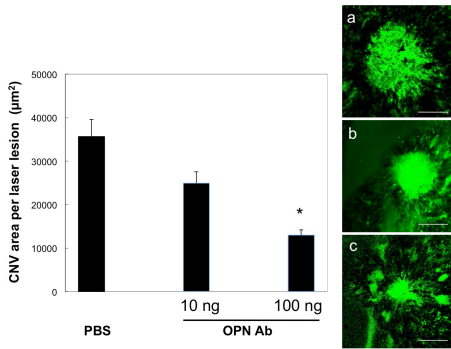


図 2 OPN 抗体による CNV 抑制

(a) PBS  
(b) OPN 抗体 10 ng  
(c) OPN 抗体 100 ng (Bar= 100  $\mu\text{m}$ )  
OPN 抗体 100 ng 硝子体内投与群で、有意に CNV が抑制されている。

(2) レーザー網膜光凝固後、3 日目に浸潤マクロファージ数は有意に増加した。OPN ノックアウトマウスあるいは抗 OPN 中和抗体硝子体内投与群では、wild-type あるいは PBS 硝子体内投与群と比較して、浸潤マクロファージ数は有意に減少していた ( $p<0.05$ )。

(3) CNV 面積は wild-type と比較して、OPN ノックアウトマウスで有意に抑制されていた ( $p<0.01$ )。(図 3)

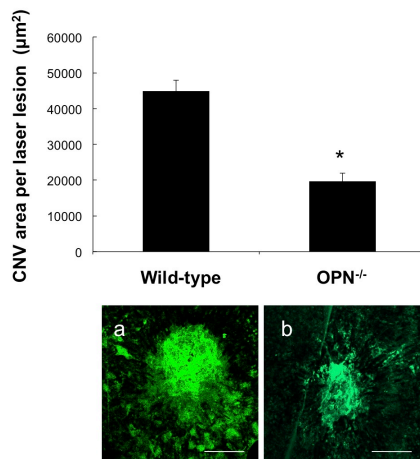


図 3 OPN ノックアウトマウスにおける CNV 抑制

(a) 野生型マウス  
(b) OPN ノックアウトマウス  
(Bar = 100  $\mu\text{m}$ )  
野生型と比較して、OPN ノックアウトマウスでは CNV が有意に抑制されている。

(4) マウス組織では、OPN 陽性細胞は F4/80 陽性細胞と共発現していた。ヒト CNV 組織には、CD68 陽性細胞が多数認められ、新生血管内腔に沿って vWF 陽性細胞を認めた。OPN は、マウス組織結果と同様 CD68 陽性細胞と共発現していた。

(5) レーザー 3 日後、感覚網膜、網膜色素上皮/脈絡膜において VEGF は有意に増加するが、OPN 抗体投与群では PBS 投与群と比較して、VEGF の発現が有意に抑制されていた (図 4・5)。

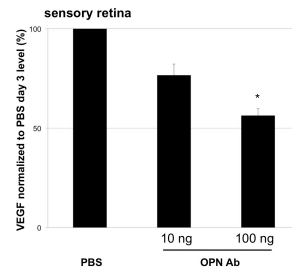


図 4 感覚網膜における VEGF 発現

PBS 投与群と比較して、OPN 抗体 100 ng 投与群で有意に VEGF 発現が有意に抑制された。

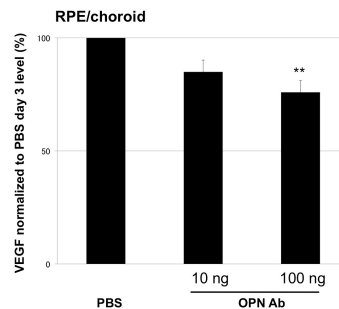


図 5 網膜色素上皮/脈絡膜における VEGF 発現

PBS 投与群と比較して、OPN 抗体 100 ng 投与群で有意に VEGF 発現が有意に抑制された。

(6) 以上の結果から、OPN は、マクロファージを介して、マウスにおける実験的レーザー CNV の発症に関与しており、OPN 抑制により、マクロファージが抑制され、CNV が抑制されることが明らかとなった。今後、OPN を標的とした AMD 治療の可能性が考えられた。

現在抗 OPN 抗体は関節リュウマチの治療薬として治験が始まっており、今後 AMD 治療にも有用である可能性が示唆された。

#### 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 2 件)

① Ashikari M, Tokoro M, Itaya M, Nozaki M,

Ogura Y: Non-targeted siRNA suppresses laser-induced choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有, 51 巻, 2010, 3820-3824

- ② Takeda A, Baffi JZ, Kleinman ME, Cho WG, Nozaki M, Yamada K, Kaneko H, Albuquerque RJ, Dridi S, Saito K, Raisler BJ, Budd SJ, Geisen P, Munitz A, Ambati BK, Green MG, Ishibashi T, Wright JD, Humbles AA, Gerard CJ, Ogura Y, Pan Y, Smith JR, Grisanti S, Hartnett ME, Rothenberg ME, Ambati J: CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. Nature, 査読有, 460 巻, 2009, 225-230

[学会発表](計 3 件)

- ① Masayuki Ashikari, Miho Nozaki, Takeshi Mizutani, Yuichiro Ogura: Anti-angiogenic effect of IFN-gamma and IL-12 on laser-induced choroidal neovascularization model in mice. ARVO 2011, 2011 年 5 月 1-5 日フォートローダーデール(アメリカ)
- ② Miho Nozaki, Atsushi Nakajima, Nobutaka Morimoto, Noriaki Kato, Yuichiro Ogura: Anti-angiogenic effect of fidarestat on laser-induced choroidal neovascularization in mice. ARVO 2011, 2011 年 5 月 1-5 日フォートローダーデール(アメリカ)
- ③ Masayuki Ashikari, Mayumi Tokoro, Miho Nozaki, Yuichiro Ogura: CCR3 antagonist suppresses laser-induced choroidal neovascularization in mice. Euretina, 2010 年 9 月, パリ(フランス)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

野崎 実穂 (NOZAKI MIHO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号:00295601

### (2)研究分担者

小椋 祐一郎 (OGURA YUICHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号:70191963

安川 力 (YASUKAWA TSUTOMU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号:00324632