

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791966

研究課題名(和文) 眼内血管新生に対する VEGF - A165b の抑制効果

研究課題名(英文) Anti-angiogenic effect by VEGFA-165b in ocular neovascular disease

## 研究代表者

馬場 隆之 (Baba, Takayuki)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00361725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者の失明原因として重要な加齢黄斑変性(AMD)症例において、眼内液における血管新生抑制的 isoform である VEGFA-165b の濃度を測定した。AMD における VEGF-A165b はコントロールと差がなく、AMD では VEGF-A165b の関与が少ない可能性が示唆された。さらに、眼内血管新生をきたす重要な疾患である網膜静脈閉塞症(RVO)でも検討したところ、コントロールよりも低下しており、網膜静脈閉塞症では血管新生促進にバランスがとられていることがわかった。酸化脂質13(S)-HpODEによるラット脈絡膜新生血管モデルにて、VEGFA-165bにより脈絡膜新生血管が抑制される傾向が見られた。

研究成果の概要(英文)：We investigated level of vascular endothelial growth factor A - 165b (VEGFA-165b) which has been reported to be anti-angiogenic, in the anterior chamber of eyes with age related macular degeneration (AMD) and retinal vein occlusion (RVO). The level of VEGFA-165b in AMD was similar to that in controls suggesting the role of anti-angiogenic isoform of VEGF is not very important in AMD. On the other hand, the level of VEGFA-165b was low in eyes with RVO. We suggest the anti-angiogenic effect by VEGFA-165b is less in the eyes RVO and there is a pro-angiogenic shift of VEGF in RVO. The experimental choroidal neovascularization model induced by 13(S)-HpODE was reduced by intravitreal injection of human recombinant VEGFA-165b but the effect was limited.

研究分野：眼科学

キーワード：脈絡膜新生血管 加齢黄斑変性 血管内皮増殖因子 VEGFA-165b 網膜血管新生 網膜静脈閉塞症

### 1. 研究開始当初の背景

先進国における高齢者の失明原因として重要視されている疾患として加齢黄斑変性がある。加齢黄斑変性は、萎縮型と滲出型の二つに大分されるが、本邦においては滲出型の頻度が多く、急激な進行と、不可逆かつ大幅な視力の低下が特徴である。近年の高齢化に伴い、本疾患の罹患率も上昇傾向を示し、眼科治療の重要性は増すばかりである。現在、本疾患に対しては光線力学療法および抗血管内皮増殖因子抗体(抗 VEGF 抗体)の硝子体内投与が行われているが、抵抗性を示す症例も多く、また症状改善の程度に限界があり、新たな治療法が求められている。

### 2. 研究の目的

高齢者の失明原因として最も多い加齢黄斑変性の原因である脈絡膜新生血管(CNV)について、新しい実験動物モデルおよびヒト前房水サンプルを用いて検討を行う。血管内皮増殖因子(VEGF)は CNV の発生と密接に関係しているが、この VEGF には異なる転写プロセスにより、2つの Family がある。この二者は相反する作用を持ち、VEGF-A<sub>165</sub>は血管新生促進の、VEGF-A<sub>165b</sub>は血管新生抑制の効果があり、両者のバランスで正常な血管系を維持していると考えられる。そこで、(1)加齢黄斑変性患者から採取した前房水中の VEGF-A<sub>165b</sub> のレベルを調べ、血管新生バランスを検討する。さらに、(2)CNV 発生における VEGF-A<sub>165b</sub> の関与を動物モデルで調べ、CNV 抑制効果について検討する。

### 3. 研究の方法

(1)加齢黄斑変性患者の前房水を硝子体注射の際に採取し、ELISA 法を用いて、VEGF-A<sub>165b</sub> を定量し、実際の疾患で増加あるいは減少しているか検討する。コントロールとしては、眼底疾患をもたない白内障症例の手術の際に採取した前房水を用いた。さらに同様にして網膜新生血管を生じる疾患である網膜静脈閉塞症(RVO)の患者の前房水における VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度を測定した。

(2)酸化脂質である 13(S)-HpODE をラット網膜下に注入し脈絡膜新生血管モデルを作成する。脈絡膜新生血管は 3 週間で活動性が高まるため、この時点で硝子体内にヒトリコンビナント VEGF-A<sub>165b</sub> を注入し、脈絡膜新生血管の抑制効果を検討する。眼球は 4 週間で摘出し、前眼部、網膜を除去したのちに脈

絡膜フラットマウントを作成し、新生血管をラベルしたのちにその面積を測定する。

### 4. 研究成果

(1)抗 VEGF 抗体の硝子体注射の際に、前房水を 30G 針と 1CC シリンジを用いて約 0.1ml 採取し、冷凍保存したものを使用した。ELISA は、抗 VEGF-A<sub>165b</sub> 抗体を用いてサンドイッチ方にて行った。比較対象群として明らかな眼血管病変を持たない白内障症例を用いた。前房水中の VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度は、AMD 症例(n=77)<15-98(中央値 16.4) pg/ml、RVO 症例(n=38)<15-47(中央値<15)pg/ml、白内障症例(n=19)<15-46(中央値 20.6)pg/ml、であった。コントロールと AMD 症例には差はなく(P=0.63、Mann-Whitney 検定) RVO(P=0.04)はコントロールより低い傾向にあった。(図 1) この結果から RVO では、血管新生に抑制的に働く VEGF ファミリーの一つである VEGF-A<sub>165b</sub> は低値であり、AMD では正常と同レベルに保たれていることが分かった。理由としては、AMD では VEGF のバランスが RVO ほどは血管新生促進的に傾いていないことが考えられる。しかし、AMD では病変が網膜下にあり前房からは距離があり、RVO に比べるとサイトカインの変化が前房に反映しにくい可能性があることも考慮に入れる必要があるかもしれない。

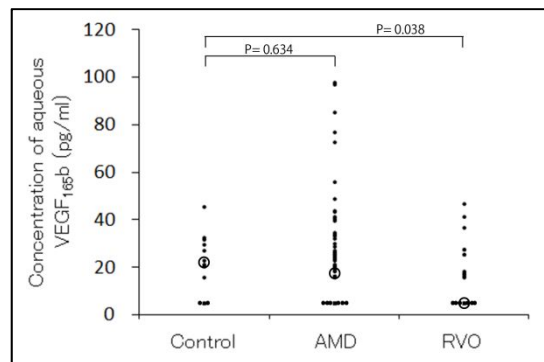


図 1 前房水中の VEGFA-165 b 濃度 AMD とコントロールの間に差はないが、RVO は有意に低値であった。

RVO 症例では、VEGF-A<sub>165b</sub> 低値の症例のほうが活動性の指標である中心窩網膜厚(P=0.006、図 2)と網膜下液(P=0.048、図 3)が大きく、VEGF-A<sub>165b</sub> の血管滲出性に対する抑制的效果を示唆する所見と考えられた。

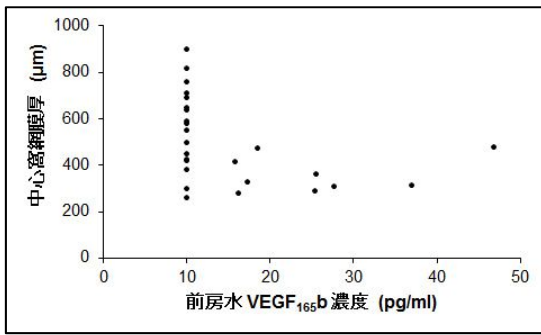


図2 RVO患者の前房水中の VEGF-A<sub>165b</sub>濃度は中心窩網膜厚と相関がみられた。

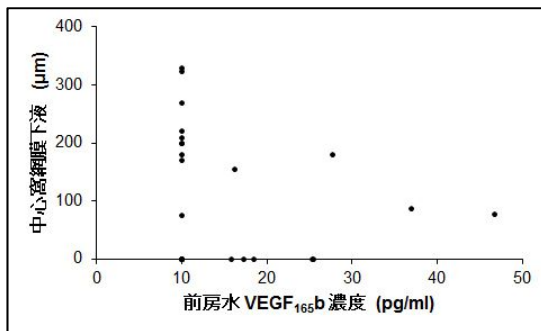


図3 RVO患者の前房水中の VEGF-A<sub>165b</sub>濃度は中心窩に見られた網膜下液の高さと相関がみられた。

(2)酸化脂質 HpODE を用いたラットにおける実験的脈絡膜新生血管モデルを用いて、VEGF-A<sub>165b</sub> の脈絡膜新生血管抑制効果を検討した。S-D ラット(200g)の網膜下に HpODE 30 μgを注入し、脈絡膜新生血管を人工的に誘導する。3週間後に、PBS ないしヒトリコンビナント VEGF-A<sub>165b</sub> を 2ng、硝子体内に注入し、1週間後に眼球を摘出し、脈絡膜フラットマウントを作成し脈絡膜新生血管のサイズを Image Jを用いて測定した。(図4)

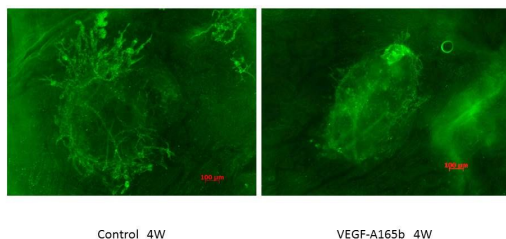


図4 脈絡膜新生血管

コントロール(左)に比べて VEGF-A<sub>165b</sub>(右)を投与したものは、脈絡膜新生血管の末梢の枝分かれが減少し、退縮がみられる。

コントロールでは CNV サイズは、 $1059950 \pm 719122 \mu\text{m}^2$  に対して、VEGF-A<sub>165b</sub> 群では  $609175 \pm 389138 \mu\text{m}^2$  であった。両者の間には有意差はなかった ( $P=0.629$ ) が、VEGF-A<sub>165b</sub> を投与した群のほうが CNV は抑制される傾向があった。(図5)

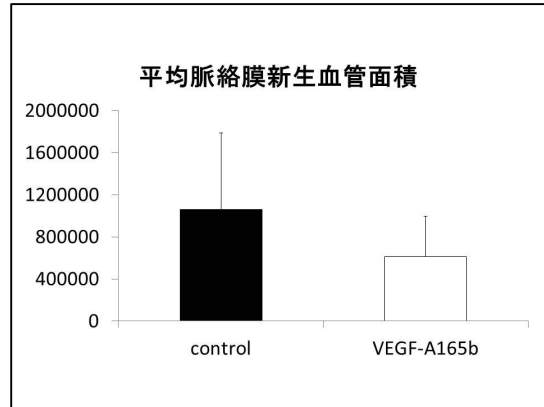


図5 脈絡膜新生血管面積  
コントロールに比べて VEGF-A<sub>165b</sub> を投与した群では平均脈絡膜新生血管面積は小さい傾向がみられた。 ( $P=0.629$ )

#### 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)

Baba T, Bikbova G, Kitahashi M, Yokouchi H, Oshitari T, Yamamoto S. Level of Vascular Endothelial Growth Factor 165b in Human Aqueous Humor. *Curr Eye Res* 2014; 39; 830-836. Epub 2014 Feb 6. DOI: 10.3109/02713683.2013.877935. 査読有

[学会発表](計 2件)

Baba T, Bikbova G, Kitahashi M, Yokouchi H, Sakurai M, Kubota-Taniai M, Yamamoto S. Level of vascular endothelial growth factor 165b in human aqueous humor. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2013 Annual Meeting, May 6-9, 2013, Seattle (USA)

馬場隆之, Guzel Bikbova, 北橋正康, 横内裕敬, 櫻井まどか, 窪田真理子, 山本修一. 前房水における VEGF165b 濃度. 第 117 回日本眼科学会総会. 2013/4/6. 東京国際フォーラム (東京都・千代田区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

馬場 隆之 (BABA, Takayuki)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：00361725

### (2)研究分担者

なし  
( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

なし  
( )

研究者番号：