

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791984

研究課題名（和文）免疫制御因子を標的とした加齢黄斑変性に対する分子治療法の戦略的開発

研究課題名（英文）Analysis on roles of immune modulating cytokines for strategic development of molecular therapeutics for age-related macular degeneration

研究代表者

池田 欣史（IKEDA YOSHIFUMI）

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：10444639

研究成果の概要（和文）：

加齢性黄斑変性症の主要病型であるポリープ状脈絡膜血管症（PCV）患者の前房水の検索により、IL-23, IL-4, VEGF が PCV と有意に関連することを見いだした。次に、血管新生黄斑症をきたすもうひとつの重要な疾患である近視性血管新生黄斑症に着目し、その病態を理解するため前房水を用いた解析を行い、病態と IL-10 を含めた炎症性サイトカインが強く関連し、加齢性黄斑変性とは、病態が大きく異なることが判明した。一方、加齢性黄斑変性症の疾患モデルとしてマウスレーザー誘導性脈絡膜新生血管症を用いて、関連するサイトカインの寄与の解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the relationship between the levels of intraocular inflammatory cytokines and polypoidal choroidal vasculopathy (PCV), a major form of age related macular degeneration (ARMD), and found a significantly high risk was provided by elevation of IL-23, VEGF, and IL-4.

To further understand molecular pathology of choroidal neovascularization (CNV), we also analyzed cytokine levels of myopic CNV patients. IL-10 provided a significantly high risk for myopic CNV. To understand inflammatory aspect of CNV, murine laser induced choroidal neovascularization model was used. Currently, our analysis on the mouse CNV model has identified the candidate target signaling molecule for ARMD using analysis of transgenic mouse strains for signaling of the molecule.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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

1. 研究開始当初の背景

AMD やポリープ状脈絡膜血管症(PCV)、さらに近視性血管新生黄斑症など新生血管脈絡膜症は重篤な視力低下をきたす疾患である。現在、治療法として光線力学療法(PDT)や抗 VEGF 療法が適応となるが、再発症例や効果不良例も多い。そこでより標準化された治療ストラテジーや新たな治療法の開発が望まれている。その病態解析の一手法として、一塩基多型を用いて遺伝学的アプローチにより、知見が蓄積しつつある。これまで判明してきた補体経路との関連のみならず、IL-6 を始めとした炎症性サイトカインと AMD の関連性も報告されてきた。しかし実際に眼局所からのサイトカインレベルがこれらの病態を記述できるかに関しては、VEGF 以外十分な検証がされていない。そこで十分なサンプル数を背景に層別化をはかり、前房水のプロテオームをベースにして病態のより深い理解に加え新規治療標的因子の抽出、さらにその検証を試みていくことを目的とする。

2. 研究の目的

本研究は加齢黄斑変性(AMD)に代表される新生血管黄斑症の分子病態を、特に免疫制御因子関与の観点から解析し、発症、治療への反応性、さらに予後と関連する因子を明らかにする。次に *in vitro*, *in vivo* におけるモデルを用いて検証し、薬剤標的の抽出をはかる。

3. 研究の方法

加齢黄斑変性(AMD)に代表される新生血管黄斑症の各病態の分子的基盤を免疫制御因子関与の観点から包括的に解析し、発症、治療への反応性、さらに予後関連する因子を明らかにするとともにその寄与を数値化する。システムバイオロジー手法を併用してプロテオームおよびトランスクリプトームを介し

た分子病態の抽出をはかる。さらにレーザー誘導性脈絡膜新生血管モデルを用いて免疫制御因子の治療標的としての有用性を検証する。

4. 研究成果

ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)と眼内の炎症性サイトカイン濃度との関連を調べた。

対象は鳥取大学眼科にて抗 VEGF 治療を行った 62 例の PCV 患者と、対照群として白内障手術を行った 36 例。全例で書面による説明を行い、同意を得て検討を行った。PCV 群および対照群で治療前に前房水を採取して前房水中のサイトカイン、ケモカイン、成長因子の濃度を測定し、それぞれ PCV との関連を比較検討した。その結果、PCV 群では対照群と比較し前房水中の IL-4、IL-10、IL-23 濃度が有意に上昇していた。またロジスティック回帰分析から、特に IL-23 の上昇が PCV のハイリスクであると示された(下位 25%に対する上位 25%のオッズ比 16.3、95%信頼区間 3.5-75.2) (P=0.0003)。次いで VEGF (オッズ比 5.7 95%信頼区間 1.2-26.1)、IL-4 (オッズ比 4.0 95%信頼区間 1.3-12.7) のリスクが高かった。なお、PCV 群では IL-10 ($\rho=0.477$) (P<0.0005)、IL-4 ($\rho=0.281$) (P=0.05) は VEGF と正の相関がみられたが、IL-23 と VEGF の相関は見られなかった ($\rho=0.24$) (P=0.16)。また蛍光眼底造影でみられる滲出性病変と IL-5、IL-4、IL-10、IL-23、IL-1 α の上昇が強く関連していた。以上より PCV 患者では前房水中の IL-23 濃度の有意な上昇がみられ、PCV の発生過程には VEGF と関連しない別の炎症性プロセスが関与していることが強く示唆された (Sasaki et al IOVS 2012)。

次に mCNV と眼内の炎症性サイトカイン濃度との関連を調べた。

対象は鳥取大学眼科にて抗 VEGF 治療を行った 41 例の mCNV 患者と、対照群として白内障手術を行った 44 例。同様に mCNV との関連を比較検討した。mCNV 患者においては IL-10 が上昇しており、mCNV と有意に関連していた（下位 quintile に対する上位 quintile のオッズ比 4.8、95%信頼区間 1.1-20.0）。MCP-1 レベルは、病的近視ステージの進行とともに増大し、複数回の bevacizumab 硝子体投与を必要とした症例で上昇していた。VEGF レベルは、眼軸の延長と逆相関し、病的近視の特定のステージにおいて増大を認めた。mCNV の発生過程には AMRD と独立した別の炎症性プロセスの関与が強く示唆された（投稿準備中）。

前房水のプロテオーム解析により抽出した分子群の妥当性を *in vitro* あるいは *in vivo* の系を用いて検証を始めた。*In vitro* の系の検証には 骨髄より分化させた血管内皮細胞を用いて該当分子群の血管新生機序への関与の解析に着手した。該当因子の寄与の検証には 該当シグナル分子の遺伝子欠損マウス由来の血管内皮あるいは、抗体投与、siRNA 投与による阻害を用いて検証した。*In vivo* における検証には、加齢性黄斑変性症の疾患モデルとしてマウスレーザー誘導性脈絡膜新生血管症を用いた。同様に、該当シグナル分子の遺伝子欠損マウスおよび、抗体あるいは siRNA の投与、あるいは、該当分子の投与によりその寄与を検証した。その結果、これまでその重要性があまり認識されていなかったシグナル経路が脈絡膜新生血管症の発症に重要な役割を果たすことが判明しつつあり、引き続き検証およびその寄与の探索を継続中である。

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. Sasaki S, Miyazaki D, Miyake K, Terasaka Y, Kaneda S, Ikeda Y, Funakoshi T, Baba T, Yamasaki A, Inoue Y. Associations of IL-23 with Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Jun 5;53(7):3424-30. 査読 有

2. Ikeda Y, Miyazaki D, Yakura K, Kawaguchi A, Ishikura R, Inoue Y, Mito T, Shiraishi A, Ohashi Y, Higaki S, Itahashi M, Fukuda M, Shimomura Y, Yagita K: Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of acanthamoeba and prognosis determinants of acanthamoeba keratitis. *Ophthalmology* 119:1111-1119, 2012. 査読 有

[学会発表] (計 3 件)

1. 佐々木慎一, 宮崎大, 三宅賢一郎, 寺坂祐樹, 金田周三, 池田欣史, 船越泰作, 馬場高志, 山崎厚志, 井上幸次: ポリプ状脈絡膜血管症と前房内 IL-23 の関連. 第 51 回日本網膜硝子体学会総会 甲府

2. 山崎厚志, 宮崎大, 山本由紀美, 金田周三, 池田欣史, 富長岳史, 三宅賢一郎, 井上幸次: 近視性脈絡膜新生血管に対するベバシズマブ硝子体内投与後の再発と前房水中 VEGF 濃度 東京

3. Associations of IL-10 with choroidal Neovascularization in High Myopia
Yukimi Yamamoto, Dai Miyazaki, Shin-ichi Sasaki, Ken-ichiro Miyake, Shuzo Kaneda, Yoshifumi Ikeda, Atsushi Yamasaki, and Yoshitsugu Inoue 2013 ARVO Seattle

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 欣史 (IKEDA YOSHIFUMI)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：10444639