

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791832

研究課題名(和文) 抗新生血管治療のテーラーメイド化

研究課題名(英文) Establishment of anti-choroidal neovascularization tailor-made therapy

研究代表者

石川 有美(鴫田有美)(Ishikawa, Yumi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・技術補佐員

研究者番号：60396439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：最適のVEGF抗体投与方法検討のため、治療法のテーラーメイド化、投与方法の最適化、VEGF刺激因子の検討を目的とした。まずRPEが低酸素でEGFPを発現するものを作製し、最もVEGF発現が増強される条件(低酸素培養、低グルコース)でVEGF発現に影響を与える因子を解析した。核蛋白のプロテオミクス解析後、real-time PCRとウエスタンブロッティングで標的因子の追加解析を行った。その結果この因子のsiRNAでVEGFの発現が抑制されることが確認された。この因子の遺伝子KOマウスが作製されていることがわかったので、このマウスの個体作製を行い、現在光凝固誘発新生血管モデルで検討を開始した。

研究成果の概要(英文)：For optimum VEGF antibody administration, we aimed to develop a tailor-made treatment. This purpose included the optimization of the method of administration and examination of VEGF-stimulating factor. We analyzed RPE, which was stressed by hypoxic culture and low glucose, to find possible VEGF expression enhancing factors this year. From the results of proteomic analysis, the known-gene was presumed to be important, we analyzed the factors by additional real-time PCR and Western blotting. Expression of VEGF was confirmed to be suppressed with the resulting siRNA. Since gene KO mice of this factor was found to have been made, we performed an individual preparation of the mice. We initiated photocoagulation induced neovascularization model studies currently.

研究分野：眼科

キーワード：眼科臨床

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症 (AMD) や糖尿病網膜症は失明疾患の上位にあるが、最新の VEGF 抗体治療は比較的良好な結果が報告されている。しかし繰り返しの長期間投与が必要で、さらに投与の終了の時期については、今回基準がなく不明な点が多い。したがって、今回の研究テーマは治療法のテーラーメイド化と投与方法の最適化、並びに VEGF 刺激因子を検討することを目的とした。24 年度は虚血などのストレス応答の中枢に近い hypoxia-inducible factor (HIF) 因子結合 element をプロモーターに持つ EGFP 遺伝子を組み込んだ細胞を作成し、この細胞の培養液に眼内液を添加して EGFP 発現を調べた。細胞の作製は予定通りに進み、24 - 25 年度は東北大学倫理委員会で承認を得た患者前房水を利用するか、硝子体手術等の手術時に得られた眼内液で解析を開始した。眼内液を培地に添加した時に発現する EGFP と VEGF 遺伝子発現は正常 (白内障患者の前房水、あるいは PBS 添加) で強い相関を示した ($R^2 = 0.6218$)。一方、糖尿病網膜症がある前房水は相関が見られるものの ($R^2 = 0.5032$) 正常よりばらつきが大きく、HIF 発現には患者の眼内液間で異なっていることが予想された。したがって網膜色素上皮細胞 (RPE) への負荷でどのような因子が核内へ移行し、HIF 発現や VEGF 発現に影響を与えるか検討した。方法は核内移行蛋白質を回収し、正常と負荷間でプロテオミクス解析を行った。25 - 26 年度で行ったが、既知の遺伝子ファミリーの存在が重要な役割を担っていることが推測されたため、real-time PCR とウエスタンブロッティングで追加解析を行い、この因子はすでに KO マウスが作製されていたために、凍結胚から個体の作製を行い、繁殖を行った。現在解析できるまでになったために、まず光凝固誘発の脈絡膜新生血管マウス動物モデル作製から開始・評価予定である。この解析が進むと、HIF や VEGF 発現に影響を与える因子の一部が明らかになり、治療方針決定に貢献できる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

情報の 80% は視覚情報であり、視機能は生活の質を維持するのに非常に重要である。失明原因の上位は新生血管が出現する糖尿病網膜症や加齢黄

斑変性 (AMD)、あるいは一部の緑内障が占めているが、高齢者に多い。超高齢化社会を迎えた日本では今後さらに発症頻度が増加すると考えられる。AMD は、視機能にもっとも重要な黄斑部に脈絡膜新生血管が出現し、厚生省の特定疾患に指定されている。最近血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 抗体投与有効な成績が期待できる治療法として報告されている。しかし VEGF 抗体投与は繰り返し長期的な硝子体内注射が必要になる。いつ投与を開始し、いつ終了していいか明確な決まりがない。投与する医師側も時間的制約や感染症の発症などに対してストレスであるが、患者側も費用や精神的ストレスはたいへんなものがある。また、抗 VEGF 抗体は神経網膜細胞保護などの VEGF の生理機能も抑制する可能性が指摘されている。この治療法は現在他の網膜疾患 (糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、近視性脈絡膜新生血管症) にも適応が拡大され、今後さらに治療頻度が増すと考えられる。すなわち本投与方法では対象患者は雪だるま式に増加し、外来は常にパンク状態であり、投与方法の改善について緊急の対応に迫られている。一方、AMD は人種差も知られており、欧米人でのデータが基準になっている現状では本邦に最適の治療方法が実際におこなわれているか不明のところもある。

私は H20-22 年の科学研究費で糖尿病患者の硝子体液、前房水、血液から内因性新生血管抑制因子である Vasohibin (バソヒビン) を測定してきました。バソヒビンはもともと血管内皮細胞に特異的に発現する血管新生抑制因子で抗 VEGF 抗体とは違う経路で新生血管を抑制していると考えられています。この測定の結果、バソヒビンは網膜症の程度に反比例して前房水で低下傾向がみられ、眼内の状況を反映する可能性があることが推測されました。またこれまでも常時感染症等の眼内液の解析を行っており、前房水は眼内の状況を判断するのに好都合なサンプルであると考えています。

一方、私はこれまでの検討で *in vitro*, *in vivo* の実験系で行われる虚血負荷の実験が実験方法の違いで必ずしも同じ条件の負荷がかかっていないことを明らかにしました。これまでの検討の中で過去の報告と同様に hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1) が主要な役割をなしていることが推測されました。したがって HIF が誘導される割合を容易に比較できる簡便な方法を考え、その結果 HIF 反応 element (HRE) をプロモーターに持つ GFP 発現ベク

ター (HRE-EGFP) を作成し、RPE に恒常的に発現する細胞系を作成し比較することを検討しました。その結果本システムを利用すれば、細胞への虚血負荷を容易に確認でき、虚血負荷の程度の判断に利用できることが判明しました。したがって本方法を利用し改善し、眼内液をサンプルとして利用すれば虚血状況を容易に推測できると考えました。

さらに現在臨床的に VEGF 抗体や抗新生血管抑制因子として利用されているものは複数ありますが、私はこれまでにそれぞれは VEGF の発現や機能を抑制する以外に HIF 発現へ影響をあたえることを推測しています。しかも、それぞれの薬剤は同様に HIF 発現レベルに影響を与えるわけではなく、それぞれで発現に与える影響がかなり異なることも推測しています。今後虚血性網膜疾患治療に関しては VEGF だけを抑制すればいい病態か、根本的にもっと上流の HIF レベルまで抑制する必要がある病態なのか判断する必要が出てくる可能性が考えられると考えました。したがって、今回の研究ではこれらのことを明らかにし、抗 VEGF 療法をもっと有効で経済的なものにできないか検討したいです。

3. 研究の方法

(1)細胞の作製、負荷のレベル検討【平成 24 年度】

測定に用いる細胞は現在当分野に存在する RPEJ, ARPE, D407 の RPE 細胞株を用いる。虚血による遺伝子の一連の動きには HIF-1 α (Semenza, 1994) が関与すると考えられるので、HIF-1 α の cis-element である HRE のリピートと EGFP を組み込んだベクターを RPE 内に導入する (この細胞を用いて虚血や低酸素、低グルコース、活性酸素負荷などへの反応が容易に確認できるようにする。また各種負荷条件が HIF 発現に与える影響を比較する)。

負荷に対する GFP 発現レベルを正確に把握するために、まず HRE-EGFP 遺伝子導入培養細胞への付加をさまざまに変化させて GFP の変化量を正確に定量する。インキュベーター内の酸素分圧は正常酸素濃度 (20%酸素) 低酸素 (1-5%酸素) 無酸素 (<0.0001%以下の酸素) 状態にし、さらに培地中のグルコース濃度を変動させる。さらに上記した低酸素状態を疑似する CoCl₂ と窒素ガス灌流を利用し細胞負荷状態を比較し ATP 合成量を最

終的に確認する。

また caspase 活性の測定と細胞カルシウム動態を dye indo-acetoxymethyl ester (Indo-1) と FACS で測定する。同時に HIF-1 α との相関が報告されている vascular endothelial growth factor (VEGF) 等の発現を RNA、タンパク質の両方で評価する。

GFP 発現が微妙なときは同様の方法で HRE-EGFP 遺伝子を組み込んだ RPE の培地に前房水を添加するが、その後 RNA を回収して GFP の遺伝子発現量を定量する。この時コントロールの CoCl₂ は 5, 10, 20, 40, 60, 120 マイクロで行う。微量な量は real-time PCR で測定できることを確認している。

(2)GFP 発現の測定【平成 24 年度】

HRE-EGFP 遺伝子を組み込んだ RPE を 96 ウェルに測定開始の 2 日前に 5000 個播種しておく。測定当日細胞状態を確認して培地を前房水入りの培地に交換する。前房水は患者ごとに採取量が異なっているので、10, 20, 30, 40 マイクロの中から可能な 2 点以上を選択して添加する。硝子体液も同様に扱う。培地の合計量は 100 マイクロにする。添加 1 時間後より 2 時間置きに 24 時間後まで多点タイムラプスで蛍光写真撮影を行うが、24 時間時には必ず目視調整による写真撮影を行う。コントロールとしてこれまでの検討通り CoCl₂ を 50, 100, 150, 200, 250, 300 マイクロの濃度で調整した培地を利用する。これらの濃度は確実に多点タイムラプスで蛍光写真撮影ができ、また FACS と蛍光プレートリーダーで蛍光量を定量できる。

(3)患者の前房水の採取・保存【平成 24-25 年度】

まず東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で承認を得る。VEGF 抗体治療の適応と考えられた患者は VEGF 抗体投与時に同時に採取される前房水を解析に利用する。患者によっては複数回 (抗 VEGF 抗体投与時毎) のサンプルを回収する。治療 3 日前より抗生物質の点眼を行い、当日はイソジン点眼、イソジン消毒で処理後に滅菌ドレープ処理して開眼器使用後、顕微鏡下で硝子体内に VEGF 抗体の投与を行うが、同時に眼圧調整の目的で前房水を 27G 針で採取する。この前房水は基本的に -80℃ に保存するが長期間保存することなく 1 週間以内に下記した処理を行い、臨床像と比較する。白内障手術時の前房水は特に虚血性網膜疾患の有無での差を比較し、網膜の

臨床所見と比較するが、AMDのコントロールとしても利用する。糖尿病網膜症などの手術で得られる硝子体液も同様に処理し、光凝固やVEGF抗体治療など過去に行われた治療の有無などとも比較・検討する。

(4) 既存の VEGF 抗体の HIF 発現に与える影響の検討【平成 24-26 年度】
これまでに使用される VEGF 抗体と、当分野で検討中の新規新生血管抑制因子バソヒピンを利用して同じ検討系での確認を行う。VEGF 抗体は VEGF の機能を抑制するが、これまでの検討では HIF の発現にも影響を与えている可能性が推測された。臨床で使用されている濃度で使用すると、興味深いことに新生血管を抑制する因子間でこの作用は異なることが推測された。失明疾患の上位は AMD、糖尿病網膜症、緑内障の一部など虚血性の網膜疾患が原因であり、HIF 発現はこれらの病態に重要な役割をなることが推測されるので、VEGF 抗体などの薬剤が実際は VEGF 機能以外に広く虚血に対応する機能を持つ可能性があるのであれば詳細に検討する意味がある。

(5) VEGF 発現に影響を与える核内因子の検討【平成 25-26 年度】
培養細胞を用いて HIF や VEGF 発現に影響を与える因子の解析を行う。このために計画しているのはこれらの因子発現に影響を与える核内因子であり、基本的な方法として VEGF 発現に著明な発現影響を与える条件時の核内タンパク質のプロテオミクス解析を行い、関連因子解析を追及する。もし、この因子の解析が進めば遺伝子改変マウスの利用などを行い、生体内での働きを実際に評価する。

(6) 臨床像との比較【平成 26 年度】
各症例は視力などの一般所見以外に、活動性の指標になる画像解析などの結果と EGFP データと比較する。EGFP データは毎回コントロールとともに写真撮影されるが変化量と臨床データは常に照らし合わせる。EGFP データは臨床像に関係するのかわからないのか？ 関係するのであれば EGFP レベルは安定した状態で一定になるのか、正常状態と同様に反応がなくなるのかを検討する。この解析は上記の評価が明らかになったところで施行する。

4. 研究成果

培地中に前房水あるいは硝子体液を添加することで HIF 遺伝子発現に影響を与える検討ができる細胞の作製を行った。
我々の従来の方で HIF の cis-element に EGFP 遺伝子を組み込んだベクターを網膜色素上皮細胞株 (RPEJ) に導入した結果、蛍光写真撮影では判断と定量が難しいと判断されたために real-time PCR で EGFP 発現を検討したが、 CoCl_2 を負荷した場合は濃度依存的に EGFP 発現が見られた。

(2)(3) 患者の前房水・硝子体液の採取・保存【平成 24-25 年度】
東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で承認を得ることができた (2015 年 1 月まで)。その後 VEGF 抗体治療の適応と考えられた患者は VEGF 抗体投与時に同時に採取される前房水を、また硝子体手術等の手術時に眼内液が得られた場合は解析に利用する予定で検討を開始した。白内障手術時の前房水、あるいは黄斑前膜・黄斑円孔手術時の硝子体液はコントロールとして使用した。加齢黄斑変性 (AMD) の外来処置時に得られる予定であった前房水は同意が得られにくいのと、外来の混雑で採取が困難であったので、今年度は主として糖尿病網膜症などの手術で得られる前房水・硝子体液を処理して、比較・検討した。眼内液を培地に添加した時に発現する EGFP と VEGF 遺伝子発現は正常 (白内障患者の前房水、あるいは PBS 添加) で強い相関を示した ($R^2 = 0.6218$)。一方、糖尿病網膜症がある前房水は相関が見られるものの ($R^2 = 0.5032$) 正常よりばらつきが大きく、HIF 発現には患者の眼内液間で異なっていることが予想された。
これらのサンプルは東北大学眼科網膜グループの先生方の協力を得て回収した。

(4)(5) 現在使用されている VEGF 抗体をはじめとする治療薬が、HIF や関連遺伝子発現にどのような影響を与えるのか、あるいは VEGF 発現刺激因子が他に存在するのかラットとヒトの網膜色素上皮細胞 (RPE) を利用して検討した。この RPE には HIF に誘導される EGFP 遺伝子が発現されるベクターを組み込んだものも用いた。RPE を通常培養、低酸素培養、低酸素培養とさらにグルコース低濃度培養を行い、最も VEGF 発現が増強される低酸素培養 + グルコース低濃度培養の結果

をその他の群と比較し、プロテオミクス解析を利用して、VEGF 発現に影響を与える因子を解析した。その結果、既知の遺伝子ファミリーの存在が重要な役割を担っていることが推測された。そのため、real-time PCR とウエスタンブロッティングで追加解析を行った(ウエスタンブロッティングを行うと低酸素培養+グルコース低濃度培養では VEGF のアイソフォームが通常培養や低酸素培養と違うことも判明した)。どちらの解析でもこの因子は VEGF 発現と強く相関していた。またこの因子発現を siRNA で抑制すると VEGF 発現が抑制されることが判明した。この因子はすでに KO マウスが作製されていたために、凍結胚から個体の作製を行い、繁殖を行った。現在解析できるまでになったために、まず光凝固誘発の脈絡膜新生血管マウス動物モデル作製から開始・評価予定である。

(6) 考察

最適の VEGF 抗体投与方法検討のため、治療法のテーラーメイド化、投与方法の最適化、VEGF 刺激因子の検討を目的とした。この目的を遂行するには、患者の眼内動態を確認すること以外に、将来を見据えた VEGF 刺激因子解析も必須の課題と考えられる。まず、眼内の薬物動態や VEGF 発現に影響を与える虚血環境などを簡便な方法で確立することが必要になるために、これらを感じしやすい細胞を作製した。眼内の低酸素状態や VEGF 発現へ影響を与える環境を確認するために RPE に HRE-HIF-EGFP ベクターを導入して、眼内液を負荷したときの EGFP 発現状態から低酸素、虚血など HIF 発現に影響を与えている因子解析を行い、さらに VEGF 発現に関与することまでを可能にした。この解析では、蛍光反応が顕微鏡の観察で差がわかる程度に変化ができることが理想であったが、顕微鏡だけの観察ではこの判断が難しいと考えられた。したがって正確は定量方法として EGFP 遺伝子発現の解析を real-time PCR で行い、定量・比較評価が可能になった。HIF だけが VEGF 発現に影響をあたえるものではないので、解釈にはさまざまな考慮が必要ではあるが、これまでに報告のない方法であり、今後様々な解析に利用できる有意義なものになったと考えられる。このシステムを利用した結果、眼内液の投与ではコントロールに比較して、症例によっては変動の大きいものもあることが判明した。この解析は患者間や

病期からも影響を受ける可能性がある」と推測されたために、患者眼内液の追加採取をすすめると同時に VEGF 発現に影響を与える因子の検討も行うことにした。

この検討のために考慮したのは、様々な修飾を受ける可能性のある細胞質内の変動を解析するのではなく、核内因子の解析をする必要性を考えた。したがって、網膜内で VEGF 発現細胞の 1 つである RPE を利用し、最も VEGF 発現が増強される条件(低酸素、低グルコース培養)で VEGF 発現に影響を与える因子を解析した。まず、プロテオミクス解析を利用しネットワーク解析で候補因子解析を行ったが、既知の遺伝子が VEGF 発現に影響を与える重要な因子であることが推測されたため、real-time PCR とウエスタンブロッティングで追加解析を行った。その結果、VEGF 発現と強く相関し、siRNA で VEGF の発現が抑制されることが確認された。この因子の遺伝子 KO マウスが作製されていることがわかったので、このマウスの個体作製と繁殖を行い、光凝固誘発新生血管モデルで検討を開始した。

24-26 年度に実行されたこの研究課題は、治療法のテーラーメイド化の 100% 目的達成には至ってはいないが、いくつかの新しいことが明らかになりつつあり、この研究継続により目標達成を超えたさらに有意義な成果も期待できると考える。明らかになりつつある 1 つは眼内液の評価方法を確立したことであり、もう 1 つは VEGF 発現に影響を与える核内因子の 1 つが新たに判明する可能性があることである。これは、環境因子が VEGF 発現に影響を与える状況を解析するのに重要な情報をもたらす可能性が考えられ、AMD の疫学調査にみられる環境因子にも対応できるようになる可能性を秘めている。これらの解析を進めることが治療法改善に貢献できるものを考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- 1) Nagai N, Kaji H, Onami H, Ishikawa Y, Nishizawa M, Osumi N, Nakazawa T, Abe T. "A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye" *Acta Biomaterialia*, **10**, 680-687 (2014). 査読有。
- 2) Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yuki Katsu

kura, Yumi Ishikawa, Zhaleh K ashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Noriko Osumi, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe. "A Platform for Controlled Dual-Drug Delivery to the Retina: Protective Effects against Light-Induced Retinal Damage in Rats" *Advanced Healthcare Materials*, **3**(10), 1555-1560 (2014).査読有.

3) Abe T, Tokita-Ishikawa Y, Onami H, Katsukura Y, Kaji H, Nishizawa M, Nagai N. "Intrascleral Transplantation of a Collagen Sheet with Cultured Brain-Derived Neurotrophic Factor Expressing Cells Partially Rescues the Retina from Damage due to Acute High Intraocular Pressure" *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **801**, 837-843 (2014).査読有.

4) Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Shigeki Machida, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Yumi Ishikawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. "Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes" *Retina*. Jun;**32**(6):1204-13 (2012).査読有.

5) Yumi Tokita-Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Hikaru Sonoda, Tomoaki Takakura, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. "Vasohibin and retinal pigment epithelium" *Adv Exp Med Biol*, **723**, 305-310 (2012).査読有.

〔学会発表〕(計 4件)

1) Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Takuya Yamada, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe "Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Photoreceptor Cell Death in S334ter Rhodopsin Mutant Rats" *2013 ARVO annual meeting, Seattle, Washington* (May 5-9, 2013)

2) Abe T, Ishikawa Y, Onami H, Katsukura Y, Nagai N. "Intra-

scleral transplantation of collagen sheet with cultured brain-derived neurotrophic factor expressing cells partially rescued the retina from the damage of acute high intraocular pressure" *RD2012 XV International Symposium on Retinal Degeneration, Bad Gogging, Bavaria, Germany* (July 16-21, 2012)

3) Nagai N, Onami H, Kaji H, Yamada T, Katsukura Y, Sato M, Ishikawa Y, Nakazawa T, Nishizawa M, Abe T. "Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Light-induced Retinal Damage in Rats" *2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida. U.S.A* (May 6-10, 2012)

4) Onami H, Nagai N, Wakusawa R, Kaji H, Yamada T, Ishikawa Y, Nishizawa M, Sato Y, Nakazawa T, Abe T. "Suppression of Rat Choroidal Neovascularization by Transscleral Vasohibin-1 Delivery Device" *2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida.U.S.A* (May 6-10, 2012)

〔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

<http://www.dcct.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 有美 (Ishikawa Yumi)
東北大学・大学院医学系研究科・技術補佐員

研究者番号：60396439