

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791847

研究課題名(和文)セマフォリン3E / プレキシンド1経路の制御による脈絡膜新生血管の治療法開発

研究課題名(英文)Therapeutic potential of semaphorin 3E for the treatment of choroidal neovascularization

研究代表者

大石 明生(Oishi, Akio)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50572955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：セマフォリン3Eを投与することが、滲出型加齢黄斑変性の治療に応用出来るかを調べるため、動物モデルでその効果を検討した。対象にはこの疾患の動物モデルであるレーザー誘発脈絡膜新生血管を用いた。結果、セマフォリン3Eの投与で脈絡膜新生血管の拡大が抑制され、受容体であるプレキシンド1がなくなるとこの効果が消失することが分かった。この受容体は正常の組織にはほとんど発現がないことから、もし治療が実現した場合、現行の治療と比べてより異常な部位のみに作用するものとなることが期待出来る。

研究成果の概要(英文)：We performed the study to investigate the effects of Semaphorin3E (Sema3E)/PlexinD1 signal in the development of choroidal neovascularization (CNV) and explore the therapeutic potential of the pathway. We used a laser-induced CNV model in mouse. The presence of PlexinD1 was confirmed immunohistochemically in the endothelial cells of CNV. Intravitreal injection of recombinant Sema3E decreased the CNV size in a dose-dependent manner. This inhibitory effect of Sema3E in the formation of CNV was canceled in the PlexinD1 knockout mice. These results indicate that Sema3E-PlexinD1 signal is involved in the development of CNV and stimulation of the pathway has the therapeutic potential for CNV.

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：脈絡膜新生血管 semaphorin3E plexinD1

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は脈絡膜に生じた異常な新生血管からの滲出や出血によって網膜の障害を来す疾患であり、現在先進国で後天性の失明の大きな原因となっている。現在行われている加齢黄斑変性の治療は、高額な薬剤費、頻回の投与を必要とし、新たな方法が望まれていた。

セマフォリン3Eとその受容体であるプレキシンド1を介したシグナルは、主に発生段階での血管および神経のガイダンスに働いていることが知られていたが、近年この経路が成体でも、特に癌や虚血など病的な血管新生で働いていることが示されている。

脈絡膜新生血管も病的な血管新生の一種であり、この経路が関与している可能性は十分考えられる。またプレキシンド1は正常の血管にはほとんど発現していないとされており、この経路を介した治療が可能になれば、現在行われている抗VEGF薬に比べ、より選択的な治療となることが期待される

2. 研究の目的

セマフォリン3E/プレキシンド1の経路が脈絡膜新生血管の発生に関与しており、この経路を操作することで脈絡膜新生血管を抑制する可能性を示すこと。

3. 研究の方法

C57Bl/6 マウスを麻酔下にコンタクトレンズを装着、アルゴンレーザーを照射しBruch膜を障害することで実験的脈絡膜新生血管を作成する。新生血管作成後3,5,7,14日目にマウスを安楽死させ灌流固定を行い網膜切片を作成する。切片上で脈絡膜新生血管内およびその周囲のSemaphorin 3E、Plexin D1の発現をin situ hybridizationで確認する。レーザー後1,3,5,7,14日目に脈絡膜、網膜色素上皮を摘出し、セマフォリン3Eおよびプレキシンド1の発現を、免疫染色、RT-PCRとWestern blottingで確認する。

レーザー照射直後にセマフォリン3Eまたは牛血清アルブミンを硝子体内投与し、1週後の脈絡膜新生血管の大きさに差が出るかを検討する。

プレキシンド1のコンディショナルノックアウトマウスを用い、プレキシンド1をノックアウトした状態でのセマフォリン3E投与の効果がどのようになるかを検討する。

4. 研究成果

免疫染色により脈絡膜新生血管の組織にプレキシンド1が発現していることが確認された。プレキシンド1の発現はレーザー照射後5日をピークにupregulateされていた。一方セマフォリン3Eはそれぞれの実験の結果から、その発現量は少ないものと思われた。

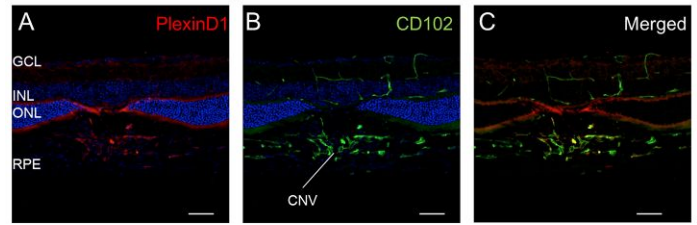


図1 免疫染色によりプレキシンド1が脈絡膜新生血管内に発現していることが確認された(発表論文1より改変引用)

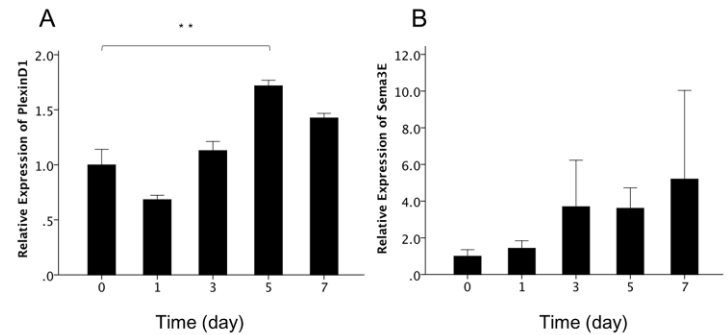


図2 RT-PCRの結果。プレキシンド1の発現はレーザー照射後に亢進していることが確認された(発表論文1より改変引用)

0.1μg以上のセマフォリン3Eを硝子体内に投与することで、脈絡膜新生血管の増大を50%程度抑制できることが確認された。この効果は既に効果の確率されているVEGF阻害と遜色のないものであった。

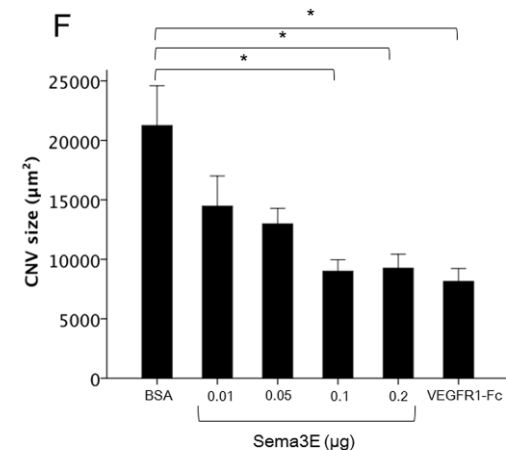


図3 様々な濃度のセマフォリン3E投与による脈絡膜新生血管の大きさ。0.1μg以上の投与で脈絡膜新生血管が有意に小さくなっていることが確認された。(発表論文1より改変引用)

さらにプレキシンド1のコンディショナルノックアウトマウスを用いて同じ実験を行ったところ、セマフォリン3E投与による脈絡膜新生血管抑制作用は認められなかった。

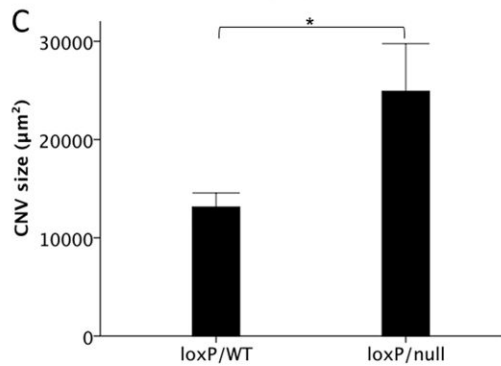


図4 プレキシニンD1ノックアウトマウス(右)とその同胞に対し、セマフォリン3Eを投与した結果。プレキシニンD1をノックアウトすると、脈絡膜新生血管の抑制効果がなくなることが確認された(発表論文1より改変引用)

これらの結果から、実験的脈絡膜新生血管の形成過程において、セマフォリン3E/プレキシニンD1の経路が関与しており、これを操作することで、治療効果が得られる可能性が示された。

本研究はマウスモデルでの検討であるため、さらにヒトの病理組織や遺伝子解析などで、この経路の関与を示し、サルなどを用いて安全性を確認していく必要はあるが、今後の加齢黄斑変性の治療を考えるうえで、新たな戦略の一つを示す成果を得られたものと考えられる。

また動物実験と並行して、臨床研究を行い脈絡膜新生血管の所見や遺伝的背景について様々な知見を得られた。

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 件)

全て査読有

1 Kenji Suda, Congrong Guo, Akio Oishi, Shinya Ikeda, Akiyoshi Uemura, Nagahisa Yoshimura

Therapeutic potential of semaphorin 3E for the treatment of choroidal neovascularization

Invest Ophthalmol Vis Sci in press

2 Ueda-Arakawa N, Ooto S, Ellabban AA, Takahashi A, Oishi A, Tamura H, Yamashiro K, Tsujikawa A, Yoshimura N. Macular Choroidal Thickness and Volume of Eyes with Reticular Pseudodrusen Using Swept-Source Optical Coherence Tomography. Am J Ophthalmol. 2014 in press

3 Oishi A, Miyamoto N, Mandai M, Honda S, Matsuoka T, Oh H, Kita M, Nagai T, Bessho N, Uenishi M, Kurimoto Y, Negi A. LAPTOS Study: A 24-Month Trial of Verteporfin

Versus Ranibizumab for Polypoidal Choroidal Vasculopathy. Ophthalmology. 2014 in press

4 Ogino K, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Oishi A, Nakata I, Miyake M, Takahashi A, Ellabban AA, Yoshimura N. Multimodal evaluation of macular function in age-related macular degeneration. Jpn J Ophthalmol. 2014 in press

5 Ooto S, Ellabban AA, Ueda-Arakawa N, Oishi A, Tamura H, Yamashiro K, Tsujikawa A, Yoshimura N. Reduction of Retinal Sensitivity in Eyes With Reticular Pseudodrusen. Am J Ophthalmol. 2013;156(6):1184-1191.e2.

6 Miyake M, Yamashiro K, Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Nakata I, Nakanishi H, Oishi A, Tsujikawa A, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Vascular Endothelial Growth Factor Gene and the Response to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment for Choroidal Neovascularization in High Myopia. Ophthalmology. 2014;121(1):225-33.

7 Nakata I, Yamashiro K, Kawaguchi T, Gotoh N, Nakanishi H, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Tsujikawa A, Oishi A, Saito M, Iida T, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N; Nagahama Study Group. Association between the cholesteryl ester transfer protein gene and polypoidal choroidal vasculopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 in press

8 Oishi A, Kojima H, Mandai M, Honda S, Matsuoka T, Oh H, Kita M, Nagai T, Fujihara M, Bessho N, Uenishi M, Kurimoto Y, Negi A. Comparison of the effect of ranibizumab and verteporfin for polypoidal choroidal vasculopathy: 12-month LAPTOS study results. Am J Ophthalmol. 2013;156(4):644-51

9 Ellabban AA, Tsujikawa A, Ooto S, Yamashiro K, Oishi A, Nakata I, Miyake M, Akagi-Kurashige Y, Ueda-Arakawa N, Arichika S, Yoshitake S, Takahashi A, Yoshimura N. Focal choroidal excavation in eyes with central serous chorioretinopathy. Am J Ophthalmol. 2013;156(4):673-83.

10 Ogino K, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Oishi A, Nakata I, Miyake M, Yoshimura N. Intravitreal injection of ranibizumab for recovery of macular function in eyes with subfoveal polypoidal choroidal vasculopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(5):3771-9.

11 Ueda-Arakawa N, Ooto S, Tsujikawa A, Yamashiro K, Oishi A, Yoshimura N. Sensitivity and specificity of detecting reticular pseudodrusen in multimodal

imaging in Japanese patients. Retina. 2013;33(3):490-7

1 2 Ueda-Arakawa N, Ooto S, Nakata I, Yamashiro K, Tsujikawa A, Oishi A, Yoshimura N.

Prevalence and genomic association of reticular pseudodrusen in age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol. 2012;155(2):260-269.e2

1 3 Ellabban AA, Tsujikawa A, Matsumoto A, Yamashiro K, Oishi A, Ooto S, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Yoshimura N. Macular choroidal thickness measured by swept source optical coherence tomography in eyes with inferior posterior staphyloma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53(12):7735-45

1 4 Ellabban AA, Tsujikawa A, Ogino K, Ooto S, Yamashiro K, Oishi A, Yoshimura N. Choroidal thickness after intravitreal ranibizumab injections for choroidal neovascularization. Clin Ophthalmol. 2012;6:837-44.

1 5 Jirarattanasopa P, Ooto S, Nakata I, Tsujikawa A, Yamashiro K, Oishi A, Yoshimura N. Choroidal thickness, vascular hyperpermeability, and complement factor H in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53(7):3663-72

1 6 Oishi A, Shimozone M, Mandai M, Hata M, Nishida A, Kurimoto Y. Recovery of photoreceptor outer segments after anti-VEGF therapy for age-related macular degeneration. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2013;251(2):435-40.

1 7 Oishi A, Yamashiro K, Tsujikawa A, Ooto S, Tamura H, Nakata I, Miyake M, Yoshimura N. Long-term effect of intravitreal injection of anti-VEGF agent for visual acuity and chorioretinal atrophy progression in myopic choroidal neovascularization. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2013;251(1):1-7.

1 8 Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Oishi A, Ooto S, Yamashiro K, Tamura H, Nakata I, Ueda-Arakawa N, Yoshimura N. Relationship between retinal morphological findings and visual function in age-related macular degeneration. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012;250(8):1129-36.

1 9 Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, Gotoh N, Nakanshi H, Hayashi H, Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Otani A, Saito M, Iida T, Oishi A, Matsuo K, Tajima K, Matsuda F, Yoshimura N. Significance of C2/CFB variants in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in a Japanese population.

Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2012;53:794-798

〔学会発表〕(計 2 件)

須田謙史、大石明生ら

Semaphorin3E/PlexinD1 シグナル経路による脈絡膜新生血管形成の抑制効果

厚生労働省難治性疾患克服研究事業網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班

2013年01月11日～2013年01月12日 名古屋

須田謙史、郭从容、大石明生ら

Semaphorin3E/PlexinD1 シグナル経路による脈絡膜新生血管形成の抑制効果

第117回日本眼科学会総会

2013年4月4日～2013年4月7日 東京

〔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

大石明生 (Oishi Akio)

研究者番号: 50572955

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: