

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670733

研究課題名(和文)加齢黄斑変性の戦略的な疾患特異遺伝子探索と治療応用

研究課題名(英文)Strategy for the discovery of the candidate genes associated with the age-related macular degeneration and their therapeutic applications

研究代表者

馬場 高志 (BABA, Takashi)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40304216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)患者の前房水の網羅的解析の過程で、血管新生への関与の報告がない因子Xについて新しく注目し、AMD病態に果たす役割について、血管内皮細胞を用いたin vitro解析、AMDモデルマウスを用いた免疫組織学的解析、AMD患者由来のゲノム情報を元に行ったSNP解析から検討した。因子Xと因子X受容体の遺伝子欠損AMDモデルマウスとsiRNAによる解析から、因子Xと因子X受容体のシグナル阻害で脈絡膜血管新生(CNV)が抑制された。蛍光標識骨髄細胞移植マウスを応用して、免疫組織学的解析により、因子X依存的に骨髄細胞から誘導された単球系細胞によってCNVが制御されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Under the comprehensive analysis of the aqueous humor from the age-related macular degeneration (AMD) patients, the candidate factor X was isolated, which has not been reported the participation in the angiogenesis. The role of the factor X in the pathogenesis of the AMD was investigated with the in vitro analysis using vascular endothelial cells, the immunohistological analysis using the AMD model mice and the SNP analysis using the genome information from the AMD patients. It was revealed that the choroidal neovascularization (CNV) was inhibited by the blockage of the signal pathway under the factor X and the factor X receptor from the analysis of the AMD models using the knockout mice and the knockdown analysis by the siRNA. It was suggested that the CNVs were modified by the monocytes derived from the bone marrow cells depending on the factor X by the immunohistological analysis with the application of the fluorescein tagged bone marrow cells transplanted mice model.

研究分野：眼病理学、眼血管新生、加齢黄斑変性

キーワード：加齢黄斑変性 疾患モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

AMDは、高齢者の視覚障害の原因疾患の一つであり、滲出型と萎縮型の2つの病型に分類される。萎縮型に比べて滲出型は進行が早く、予後が不良である。滲出型は黄斑部の脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization: CNV) を特徴としており、CNVの発生を抑制することで、視機能の改善が期待できる。従って、この滲出型AMDの病態メカニズムを解明し、治療法を開発することは、重要な課題である。

我々は、これまでAMDの原因遺伝子を探索する目的で、ヒトAMDの再現性のある動物モデルとして確立されているレーザー誘発脈絡膜血管新生マウス (AMDマウス) を用いて、CNV発生メカニズムに関与する候補遺伝子を2番染色体 (AngCNVq1) と19番染色体 (AngCNVq2) 上に同定した。また、AMDの新しい治療法として、リボザイムによる遺伝子発現調節系を用いたマウス網膜下への安全で新しいドラッグデリバリーを確立した。

ヒトでは、当研究施設で得られた1000検体以上のAMD患者の眼内液をもとに、AMDのサブタイプであるポリープ状脈絡膜血管症にIL-23が関与していることを明らかにした。これらと同時に進めていたAMD患者の前房水の網羅的解析の過程で、血管新生への関与の報告がなく、現在までに報告されているどのAMDの発生機序とも結びつかない複数の因子について解析を進めた。その過程で、AMDの感受性に関与する可能性のある候補因子Xに着目した。現在までに確認した限りでは、この因子XのAMD発生機序や血管新生への直接的な関与について注目した報告はない。

当研究室で確立された手法を用いて、候補因子Xがどのような機序でCNV発生を制御しているかを解明するため、この研究プロジェクトを開始した。

## 2. 研究の目的

(1) 患者由来の眼内液を用いた解析により、CNVの発生機序を明らかにする。

(2) AMD患者の眼内液由来の候補因子XのCNV発生に果たす役割を、マウスモデルと分子生物学的手法を用いて明らかにする。

(3) AMD患者のSNP解析により、候補因子Xのゲノムレベルでの関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 前房水のプロテオミクス解析：近視性CNVとの比較

AMD患者の前房水プロテオミクス解析の過程で、AMDと同様にCNVを発生する疾患である近視性CNVについて、AMDとの病態メカニズムの相違を明らかにするため、近視性CNV患者前房水のプロテオミクス解析を行った。

近視性CNV 51眼、CNVのない強度近視 14眼、健常被験者 35例の計 100例 100眼を対象とし、VEGF、MCP-1、IL-8、IL-10、IL-23などのCNV関連サイトカインの前房内濃度をELISA法を用いて測定した。

(2) マウスモデルの解析

### レーザー誘発マウスモデル

7週齢の雄を使用し、麻酔下にマウス眼底にレーザーを照射した。毛様動脈の走行部位である3時、9時と炎症や網膜下液が貯留しやすい6時を避けて、鼻側、耳側、上側で、視神経乳頭から2.5~3乳頭径の距離に、片眼に3発ずつ照射した。各時系列での眼内サイトカインの解析とCNVの解析に使用した。

### ノックアウトマウス

レーザー誘発CNVマウスモデルに使用するマウスの毛色を全て黒色に調整するため、海外の他施設から提供を受けた遺伝子欠損マウスを体外受精により生産し、黒色の野生型マウスを用いて3代以上戻し交配を施行し、その過程で作成された野生型、ヘテロまたはホモ遺伝子欠損マウスをもとに、十分なコロニーを準備した。実験には、7週齢の雄で体色が黒色の候補因子Xと因子X受容体欠損マ

ウスを用いた。

#### 骨髄移植マウスモデル

GFP マウスまたは、野生型マウスまたは遺伝子欠損マウスをドナーとして骨髄細胞を採取し、低毒性生細胞蛍光標識した上で、放射線照射処置後の野生型マウスをドナーとして、尾静脈から骨髄細胞を移植した。移植後、ドナー骨髄細胞が定着した2週間後、レーザー処置を行いAMDモデルを作成した。更に2週間後に脈絡膜伸展標本を作成し、CNVの定量と各種細胞マーカーを用いた多重蛍光免疫染色法と共焦点レーザー顕微鏡を用いてCNVの解析を行った。また、同時に骨髄移植後のホストマウスの骨髄細胞を採取し、フローサイトメトリーで、蛍光標識された細胞の比率を計測し、移植後の生着率を確認した。

動物実験は、鳥取大学動物実験委員会によって承認を得た上で、鳥取大学動物実験規則や関連法令等を遵守して行った。遺伝子組み換え実験については、鳥取大学遺伝子組み換え実験規則に則って、鳥取大学遺伝子組み換え実験安全管理規則と関連法令等に則って行った。

#### (3) 血管内皮細胞を用いた in vitro 解析

マウス骨髄由来血管内皮細胞を用いて予備実験を行った上で、マウス初代網膜血管内皮細胞 (Cell Biologics Company、米国) を用いて、In vitro 血管内皮細胞チューブ形成アッセイを行った。異なる濃度の候補因子 X で刺激すると同時に、抗 X 抗体、抗 X 受容体抗体で抑制することで、候補因子 X に関連した上清のサイトカイン濃度を測定するとともに、管腔形成を定量した。

#### (4) AMD 患者の SNP 解析

AMD 患者と健常被験者を対象に血液を採取し、既知の加齢黄斑変性関連遺伝子 (CFH、HTRA1、ARMS2 の複数のリスクアリル) と候補因子 X のプロモーター領域に存在するアリルについて加齢黄斑変性の感受性との相関を

確認した。

患者情報の取り扱いに関しては、鳥取大学医学部付属病院倫理委員会規定に則って行った。

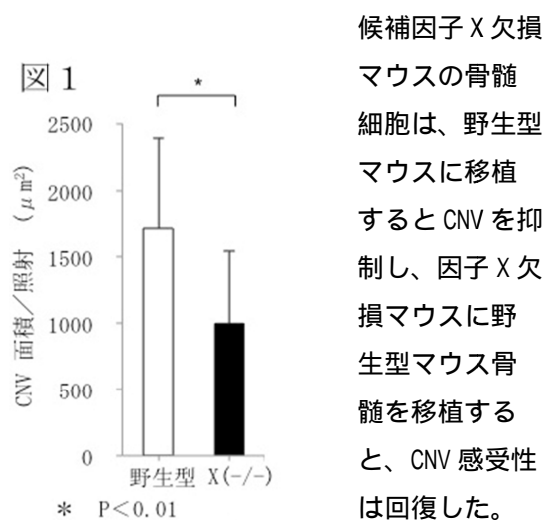
## 4. 研究成果

### (1) 前房水のプロテオミクス解析：近視性 CNV との比較検討

VEGF と IL-8 の濃度は、近視性 CNV のない強度近視眼に比べて、近視性 CNV 眼で有意に高かった。近視性 CNV の患者では、IL-8 と MCP-1 は、黄斑症の程度に応じて有意に上昇し、VEGF 濃度は、ブルッフ膜の機械的断裂のある限局性萎縮、または、限局性萎縮を伴わないびまん性萎縮が高かった。黄斑症の進行は、頻回のベバシズマブ硝子体内投与の必要性和有意に相関し、頻回のベバシズマブ硝子体内投与を要した症例では、MCP-1 濃度が有意に上昇していることが確認された。以上から、近視性 CNV の病因には VEGF だけでなく炎症が関与していることが強く示唆された。

### (2) マウスモデルの解析

野生型マウスの候補因子 X 抗体や候補因子 X の siRNA による阻害で CNV は有意に抑制された。因子 X 受容体抗体投与でも抑制が確認された。候補因子 X 欠損マウスの CNV は野生型マウスと比較して有意に縮小し (図 1)



\* P<0.01  
エラーバー：± 標準偏差

新しく開発した低毒性生細胞蛍光標識を用いた骨髄細胞移植 AMD モデルが、CNV に集簇した細胞のプロファイルに应用可能である事を確認した。この方法を用いて、CNV に集簇した細胞を確認すると、局所に常駐している細胞だけでなく、骨髄由来の候補因子 X 陽性細胞がリクルートされて CNV 外周に沿って集簇しているのを確認し、因子 X 陽性の骨髄由来細胞が CNV 発生に関与していることが示唆された。(図 2)

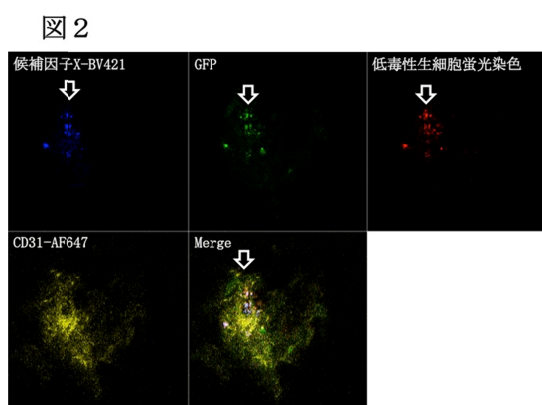


図 2 GFP マウス骨髄細胞を低毒性生細胞染色した後に、野生型マウスに移植し、AMD モデルマウスを作成した。脈絡膜伸展標本を因子 X 抗体 (青) と CD31 (黄) で多重免疫染色し、レーザー共焦点顕微鏡で解析した。ドーム状の CNV 外周に一致して、GFP (緑) と低毒性染色 (赤) に陽性で、因子 X (青) を発現した細胞が骨髄から誘導されて集簇している。

### (3) 血管内皮細胞を用いた in vitro 解析

候補因子 X 刺激により VEGF と MCP-1 濃度は上昇し、管腔形成は促進された。因子 X 抗体または因子 X 受容体抗体による阻害によって管腔形成が抑制され、そのメカニズムに MCP-1 の関与が示唆された。

### (4) AMD 患者の SNP 解析

AMD 感受性に関与すると報告されている既知の CFH、HTRA1、ARMS2 の複数のリスクアリ

ルは、当施設で得られたゲノム検体の解析で、統計解析による検定に耐えうる症例数としては不十分ながら、AMD 疾患感受性を反映する傾向があった。一方、候補因子 X のプロモーター領域に存在する候補リスクアリルについては、有意な相関は確認できず、更に解析を進める計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

馬場高志、井上幸次(7 番目)、他 5 名、経過中に顕性化した特発性頭蓋内圧亢進症による乳頭腫脹、臨床眼科、査読有、71 巻、2017、771-776

Yamasaki A、Inoue Y(5 番目)他 3 名、A CASE OF UNILATERAL RETINAL PIGMENT EPITHELIUM DYSGENESIS、Retinal cases & brief reports、査読有、11 巻、2017、156-159、doi: 10.1097/ICB.0000000000000317

馬場高志、井上幸次(5 番目)、他 3 名、サルコイドーシスに合併した網膜色素上皮剥離の経過、臨床眼科、査読有、70 巻、2016、773-778

馬場高志、井上幸次(7 番目)、他 5 名、両眼網膜中心動脈閉塞症を契機に発見された肺小細胞癌の 1 例、臨床眼科、査読有、69 巻、2015、355-360

Yamamoto Y、Miyazaki D、Baba T(7 番目)、Inoue Y(10 番目)他 6 名、Associations of inflammatory cytokines with choroidal neovascularization in highly myopic eyes、Retina、査読有、35 巻、2015、344-350、doi:10.1097/IAE.0000000000000311

春木智子、馬場高志、井上幸次(5番目)、  
他2名、インターフェロン治療中に発症し前  
眼部OCTが有用であった原田病の1例、臨床  
眼科、査読有、68巻、2014、831-836

馬場高志、井上幸次(5番目)、他3名、  
ベバシズマブ硝子体注射と光線力学的療法  
で加療した網膜血管腫の小児例、臨床眼科、  
査読有、68巻、2014、339-343

Miyazaki D、Inoue Y(9番目)、他7  
名、Pharmacologic inhibition of I B  
kinase activates immediate  
hypersensitivity reactions in mice、Am J  
Pathology、査読有、183巻、2013、96-107、  
doi:10.1016/j.ajpath.2013.04.006.

唐下千寿、馬場高志(4番目)、宮崎 大  
(5番目)、井上幸次(6番目)、他2名、  
トリアムシノロン硝子体内注入後にサイト  
メガロウイルス網膜炎を発症した1例、臨床  
眼科、査読有、67巻、2013、809-813

[学会発表](計4件)

馬場高志、他、経過中に顕性化した特発  
性頭蓋内圧亢進症によるうっ血乳頭、第70  
回臨床眼科学会、2016年11月5日、京都国  
際会館(京都・京都)

馬場高志、他、サルコイドーシスに合併  
した網膜色素上皮剥離の経過、第69回臨床  
眼科学会、2015年10月23日、名古屋国際会  
議場(愛知・名古屋)

馬場高志、他、両眼網膜中心動脈閉塞症  
を契機に発見された肺小細胞癌の1例、第68  
回臨床眼科学会、2014年11月4日、神戸国  
際展示場(兵庫・神戸)

馬場高志、他、ベバシズマブ硝子体注射

とPDTを施行した小児に発症した網膜血管腫  
の1例、第67回臨床眼科学会、2013年11月  
2日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

馬場 高志(BABA, Takashi)  
鳥取大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 40304216

### (2)研究分担者

井上 幸次(INOUE, Yoshitsugu)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号: 10213183

宮崎 大(MIYAZAKI, Dai)  
鳥取大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 30346358

### (3)連携研究者 なし

### (4)研究協力者 なし