

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893004

研究課題名(和文) Angpt12阻害点眼薬によるぶどう膜炎軽症化の検討

研究課題名(英文) Analysis of the potential validity of Angpt12 for the treatment in ocular inflammation

研究代表者

岩田 大樹 (IWATA, DAIJYU)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70374402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Angpt12阻害薬を炎症性眼疾患EIUマウスモデルに投与し効能を検討した。治療群と非治療群について網膜における各種炎症性サイトカイン、ケモカインの発現変化を解析したが、点眼治療による有意な発現の変化はみられなかった。また、点眼回数の増量による効果増強はみられなかった。硝子体内投与に投与方法を変更したところ、治療群の網膜ではtnfa、ccl2、icam1の発現は低下傾向、il-6は有意な発現低下がみられた。現時点で点眼治療では十分な効果は確認されていないが、今回の検討から投与時期、方法、量を調整することでAngpt12阻害薬は抗炎症効果を示す可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Angiopoietin-like protein (Angptl) 2 is a key mediator linking obesity to chronic adipose-tissue inflammation and systemic insulin resistance, and increasing evidence has shown that Angptl2 is associated with various chronic inflammatory diseases such as cancer and dermatomyositis. Recently, a single-stranded proline-modified short hairpin anti-Angptl2 RNA interference molecule has been produced. In this study, we evaluated the efficacy of this Angptl2 inhibitor in acute ocular inflammation with endotoxin-induced uveitis (EIU). We generated EIU in wild-type (C57BL/6) and anti-Angptl2 RNA interference molecule was administered with intravitreal injection. Compared with control animals, retinal mRNA expression levels of tnfa, ccl2 and icam1 tended to be low and il6 was significantly decreased. The present study suggest a potential validity of nti-Angptl2 RNA interference molecule as a new drug for the treatment of ocular inflammation.

研究分野：ぶどう膜炎

キーワード：ぶどう膜炎 Angpt12

## 1. 研究開始当初の背景

ぶどう膜炎は、先進国においては40歳以上の中途失明原因の約10%を占める疾患である。その多くがベーチェット病や炎症性腸疾患などの膠原病または類縁疾患に起因する。世界25カ所を調査した研究では、現在なおベーチェット病のぶどう膜炎患者の4人に1人が失明に至るという厳しい現実がある (Kitaichi N et al. *Br J Ophthalmol*, 2007)。

北海道大学病院に1994-2003年の10年間に初診したぶどう膜炎患者1,240名の平均発症年齢は男性41.7歳、女性45.7歳であり、とくにベーチェット病患者の発症年齢はさらに低いことを我々は報告した (Kitamei H et al. *Acta Ophthalmol*, 2009)。ぶどう膜炎は特に青壮年での発症が多く、患者本人はもちろん、社会的、経済的にも極めて重要な問題といえる。

アンジオポエチン様因子(Angptl2)は血管新生制御因子として報告をされた。また、肥満の脂肪組織ではAngptl2が多く発現しており、肥満の内蔵脂肪組織で発現が増加し、単球細胞を病変部に呼び込むことや、血管内被細胞の炎症性病変を引き起こすことが知られている。

我々はAngptl2ノックアウト-マウスを用いた研究の中でAngptl2が網膜においても広く発現していること、炎症性眼疾患マウスモデルにおいてもNF- $\kappa$ B活性化を介した炎症の進展に重要な役割を持つことを報告した (Kanda A et al. *Lab Invest*, 2012)。しかし、ぶどう膜炎に対する治療効果についてはAngptl2阻害薬を用いた検討がされておらず、その効果はいまだに不明である。

Angptl2阻害薬は市販はされておらず、我々はRNA interference moleculeとして開発されたAngptl2阻害薬(ボナック核酸)を、ボナックから供給を受けた。また、この薬剤については点眼薬や硝子体内投与などの眼局所投薬として用いることから全身投与と比べ安全面でも臨床応用しやすいと考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では、Angptl2阻害薬を用いて点眼、硝子体内投与などで眼局所治療を行い、炎症性眼疾患マウスモデルに対する治療効果とそのメカニズムについて検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

炎症性眼疾患モデルとして外毒素による非特異的急性前眼部炎症のモデルであるエンドトキシン誘導ぶどう膜炎(endotoxin-induced uveitis; EIU)マウスを用いた。

6週齢のC57BL/6マウスに点眼し、Angptl2阻害薬治療群と非治療群を作成した。点眼は

EIU誘導24時間前から6時間毎もしくは3時間毎に行った。

点眼開始から24時間後にリポポリサッカライド(LPS)を腹腔内に投与し、EIUを誘導した。EIU誘導から6時間後に麻酔薬投与下で安楽死させ、網膜を摘出しRT-PCRにて、網膜における各種炎症性サイトカイン、ケモカインの発現変化をmRNAレベルで解析した。これらの2群については、さらに網膜血管の白血球接着数を測定した。EIU誘導から24時間後に過剰量の麻酔薬投与下で開胸し、左心室よりコンカナバリンA(以下Con-A)で灌流する。眼球を摘出し、網膜フラットマウントを作成した。網膜白血球接着の測定をし、治療群と非治療群とを比較した。

また点眼以外の投与方法としてAngptl2阻害薬100 $\mu$ M/1 $\mu$ lを硝子体内投与した群と基剤のみを投与した対照群を作成し、検討を行った。硝子体注射から24時間後にEIUを誘導し、さらにその6時間後に網膜を摘出しRT-PCRにて、網膜における各種炎症性サイトカイン、ケモカインの発現変化をmRNAレベルで解析した。

## 4. 研究成果

EIUマウスに対する点眼治療による炎症性サイトカイン、ケモカインの発現に関する変化としてtnfa, ccl2, icam1そしてil-6の発現変化を検討した。しかしながらAngptl2阻害薬の点眼治療群においては点眼間隔が6時間もしくは3時間毎であっても対照群と比較して有意な変化はみられなかった。また同様に点眼治療によるEIUマウスモデルでの網膜血管内の白血球接着数、眼内への炎症細胞浸潤の変化は確認されなかった。

点眼治療において十分な治療効果がえられなかったことから、Angptl2阻害薬の投与時期、回数ならびに投与方法を改めて検討を行う必要があった。

そのため次にAngptl2阻害薬を硝子体内投与に投与方法を変更した。各種炎症性サイトカイン、ケモカインの発現変化をmRNAレベルで解析したところ、現在までtnfa, ccl2, icam1では発現の低下傾向がみられた。さらにil-6については有意な発現の低下がみられていた(図1)。

これまでの検討から、Angptl2阻害薬を用いた炎症抑制が可能であることを示唆する結果が見出された。ただし炎症抑制を導くにはこの薬剤の至適な投与量、時期、投与方法を検討することが重要であった。現在までのAngptl2阻害薬の治療効果の検討においては網膜血管における白血球接着数の減少は確認されていないが、治療によるmRNAの発現変化の解析結果から投与量やその投与時期を調整することで有意な治療効果が得られることが想定された。

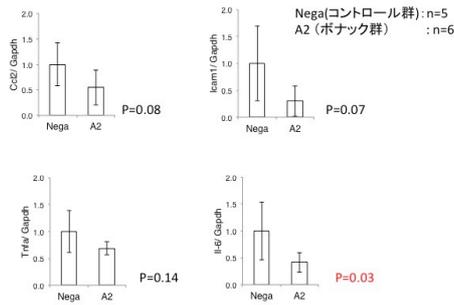


図 1. EIU マウスの網膜における Angpt12 阻害薬による炎症性サイトカイン・ケモカインの発現変化

## 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 5 件)

- Hirooka K, Saito W, Namba K, Mizuuchi K, Iwata D, Hashimoto Y, Ishida S. Significant role of the choroidal outer layer during recovery from choroidal thickening in Vogt-Koyanagi-Harada disease patients treated with systemic corticosteroids. *BMC Ophthalmol.* 2015; 15: 181, 査読有 doi: 10.1186/s12886-015-0171-3
- 岩田大樹, 南場研一. 眼疾患と炎症 ベーチェット病の病態. 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患. 4: 99-104, 2015, 査読有
- 岩田大樹, 南場研一. Vogt-小柳-原田病. ぶどう膜炎と類縁疾患. *眼科.* 57: 273-278, 2015, 査読有
- 岩田大樹, 南場研一. ベーチェット病の眼病変. 特集 ベーチェット病の最近の知見. *リウマチ科.* 53: 554-558, 2015, 査読有
- Dong Z, Iwata D, Kitaichi N, Takeuchi M, Sato M, Endo N, Iwabuchi K, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S, Lennikov A, Kitamura M, Mizuuchi K, Kanda A, Noda K, Namba K, Yamagishi S, Ohno S, Ishida S. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of glyceraldehyde derived-advanced glycation end product formation. *J Leukoc Biol.* 2014; 96: 1077-1085, 査読有, doi: 10.1189/jlb.3A0513-288RRR

[学会発表] (計 21 件)

- 廣岡季里子, 齋藤 航, 南場研一, 水内一臣, 岩田大樹, 橋本勇希, 齋藤理幸, 石田 晋. Vogt・小柳, 原田病の再発の有無

によるステロイド全身投与後の脈絡膜循環動態の比較. 第 54 回日本網膜硝子体学会総会, 第 32 回日本眼循環学会合同学会, 2015/12/4-6, 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区)

- Iwata D. Practical analysis of uveitic macular edema with OCT. 2015 Seoul National - Hokkaido University Joint Symposium, 2015/11/20, Dalgaebi (Seoul, Korea)
- Kase S, Namba K, Mizuuchi K, Iwata D, Kitaichi N, Ohno S, Ishida S. Clinicopathological study on epiretinal membrane of ocular sarcoidosis. AAO (American Academy of Ophthalmology) 2015, 2015/11/14-17, Sands Expo (Las Vegas, USA)
- 岩田大樹, 南場研一, 橋本勇希, 大野重昭, 北市伸義, 水内一臣, 宇野友絵, 鈴木智浩, 石田 晋. 光干涉断層計を用いたぶどう膜炎の嚢胞様黄斑浮腫の形状および治療反応性の解析. 第 69 回日本臨床眼科学会, 2015/10/22-25, 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市)
- 水内一臣, 南場研一, 齋藤航, 橋本勇希, 鈴木智浩, 田川義晃, 宇野友絵, 岩田大樹, 北市伸義, 石田 晋. 汎ぶどう膜炎を呈した多発消失性白点症候群の一例. 第 69 回日本臨床眼科学会, 2015/10/22-25, 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市)
- 酒井正人, 南場研一, 岩田大樹, 水内一臣, 鈴木智浩, 近藤太郎, 石田 晋. 健康成人に発症したサイトメガロウイルス汎ぶどう膜炎の 1 例. 第 162 回北海道眼科集談会, 2015/10/10, 旭川大雪クリスタルホール (北海道, 旭川市)
- Kase S, Namba K, Iwata D, Mizuuchi K, Ishida S. Diagnostic efficacy of cell block method for vitreoretinal lymphoma. 13th IOIS (International Ocular Inflammation Society), 2015/9/25-27, Hilton San Francisco Union Square (San Francisco, USA)
- 北市伸義, レニコフ アントン, 南場研一, 水内一臣, 岩田大樹, 大野重昭, 石田 晋. ウニ外殻色素によるぶどう膜炎モデルの軽症化. 第 36 回日本炎症・再生医学会, 2015/7/21-22, 虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都, 港区)
- 岩田大樹, 南場研一, 田川義晃, 水内一臣, 大野重昭, 北市伸義, 石田 晋, 小笠原励起. 視力予後が良好であった進行性網膜外層壊死の 1 例. フォーサム 2015, 2015/7/10-12, コングレコンベンションセンター (大阪府, 大阪市)
- 加瀬 諭, 南場研一, 水内一臣, 岩田大樹, 北市伸義, 石田 晋. 眼内悪性リンパ腫の診断におけるセルブロック (細胞塊) 標本の有用性. フォーサム 2015,

- 2015/7/10-12, コングレコンベンションセンター(大阪府、大阪市)
11. 廣岡季里子、齋藤 航、南場研一、水内一臣、岩田大樹、宇野友絵、田川義晃、橋本勇希、石田 晋. フォークト・小柳・原田病のステロイド薬全身投与後における脈絡膜厚の層別経時変化. フォーサム 2015, 2015/7/10-12, コングレコンベンションセンター(大阪府、大阪市)
  12. Kitaichi N, Iwata D, Mizuuchi K, Aoki K, Namba K, Ohno S, Ishida S. Changes of frequencies and clinical features of uveitis in Japan, Uveitis Workshop 2015, 2015/5/15-17, Radisson Blu Hotel (Cebu, Philippines)
  13. 宇野友絵、南場研一、水内一臣、岩田大樹、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 若年性慢性虹彩毛様体炎の臨床像の検討. 第 119 回日本眼科学会総会, 2015/4/16-19, ロイトン札幌(北海道、札幌市)
  14. 水内一臣、南場研一、岩田大樹、宇野友絵、北市伸義、大野重昭、石田 晋. Vogt-小柳-原田病再発例に対するシクロスポリン併用療法の検討. 第 119 回日本眼科学会総会, 2015/4/16-19, ロイトン札幌(北海道、札幌市)
  15. Iwata D. Laser speckle flowgraphy in uveitis. Plenary session: Imaging in uveitis. Asia-ARVO 2015, 2015/2/18, Pacifico Yokohama (Yokohama, Japan)
  16. 木嶋理紀、大口剛司、北尾仁奈、岩田大樹、水内一臣、野村友希子、田川義継、石田 晋. 眼所見を中心に粘膜病変のみ呈した Stevens-Johnson 症候群の 1 例. 角膜カンファランス 2015, 2015/2/11-2/13, 高知市文化プラザかるぼーと(高知県、高知市)
  17. Iwata D. Towards live assessment of human leukocyte dynamics in retinal disease with fluorescein-labelled peripheral blood mononuclear cells. 2015 Meeting with Hokkaido University, 2015/1/31, The Landisresort Yangminshan (Taipei, Taiwan)
  18. Iwata D. Towards live assessment of human leukocyte dynamics in retinal disease with fluorescein-labelled peripheral blood mononuclear cells. 9th Japan-Korea International Symposium in Ophthalmology, 2014/12/1, Hokkaido University(Sapporo, Japan)
  19. 岩田大樹、南場研一、櫻井友梨、新明康弘、水内一臣、田川義晃、岡田耕平、豊嶋崇徳、石田 晋. 成人 T 細胞白血病の網膜下浸潤後に網膜外層症を呈した 1 例. 第 68 回日本臨床眼科学会, 2014/11/13-16, 神戸ポートピアホテル(兵庫県、神戸市)
  20. 宇野友絵、南場研一、水内一臣、岩田大樹、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 若年

性慢性虹彩毛様体炎の臨床像の検討. 第 68 回日本臨床眼科学会, 2014/11/13-16, 神戸ポートピアホテル(兵庫県、神戸市)

21. 水内一臣、南場研一、竹本裕子、田川義晃、宇野友絵、岩田大樹、北市伸義、大野重昭、石田 晋. 抗インフリキシマブ抗体価の上昇とともに眼発作と投与時反応がみられたベーチェット病. 第 68 回日本臨床眼科学会, 2014/11/13-16, 神戸ポートピアホテル(兵庫県、神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩田 大樹 (IWATA DAIJYU)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：70374402

### (2) 研究分担者

なし