

## 血管新生疾患の分子機構解明と治療に関する研究

## <<研究の概要>>

年齢を重ねると身体にさまざまな病気が発症する。加齢黄斑変性のその1つで、加齢により網膜の中心部である黄斑部に脈絡膜新生血管や浮腫が生じ、中心視力を失う場合がある。欧米では、成人(特に50歳以上)の中途失明原因の1位で、眼科分野では、もっとも基礎的・臨床的治療法の研究がなされている疾患である。最近、日本でも増加傾向にあり、国民の注目度も高い眼疾患の1つとなってきた。脈絡膜新生血管を生じるものは滲出型加齢黄斑変性と呼ばれ、基礎疾患として、高血圧、不整脈、虚血性心疾患などの循環器系の病気をもっている方でのその発症頻度が高いことが分かってきている。

本研究では、血管新生疾患の代表である滲出型加齢黄斑変性および脈絡膜新生血管を来す網膜疾患にターゲットを絞り、その分子遺伝学的・分子生物学的アプローチにより、疾患の発症機序、病因の究明を目指し、治療については、脈絡膜新生血管に対する抗 VEGF（血管内皮増殖因子）薬の治療効果、またモデルマウスを用い、分子免疫アプローチにより、将来可能性のある新たな治療法について検討した。

滲出型加齢黄斑変性の約200例からゲノムDNAを抽出し、ヒトゲノム全体を網羅する一塩基多型(SNPs)について検討し、いくつかの疾患感受性因子のSNPsを同定した。滲出型加齢黄斑変性の特殊型・重症型である網膜血管腫状増殖症例における検討では、*ARMS2/HTRA1* 遺伝子内の risk allele と強く関連している可能性が示された。治療法に関して、網膜色素線条に合併した脈絡膜新生血管に対する多数例の検討で、抗 VEGF 薬であるベバシズマブの硝子体注入が、脈絡膜新生血管の退縮のみならず視機能の維持・改善に有効であることが示された。実験的ぶどう膜炎・脈絡膜新生血管モデルにおける自然免疫と炎症の関与とその治療に関する研究では、新規 drug delivery system (DDS)製剤であるステルスナノステロイドおよび PPAR $\alpha$  活性化薬のフィブラート系脂質低下薬であるフェノフィブラートの全身投与が、抗炎症作用および眼内の VEGF 濃度を低下させる作用が判明し、脈絡膜新生血管に対する新規治療薬の候補となる可能性が示唆された。

今後は、本研究をさらに発展させ、疾患感受性 SNPs を有する高齢者への滲出型加齢黄斑変性予防法・治療法に関する研究、抗 VEGF 薬以外の新規治療薬の開発研究が重要であると考え、研究を継続していきたい。

|      |                    |                        |
|------|--------------------|------------------------|
| 林 孝彰 | 東京慈恵会医科大学<br>眼科学講師 | 血管新生疾患に対する分子<br>遺伝学的解析 |
| 酒井 勉 | 東京慈恵会医科大学<br>眼科学講師 | 血管新生疾患に対する分子<br>免疫学的解析 |
| 常岡 寛 | 東京慈恵会医科大学<br>眼科学教授 | データ解析・研究の統括            |

## 研究報告

### I. 研究目的

#### (1) 滲出型加齢黄斑変性症に対する分子遺伝学的検討

近年、滲出型加齢黄斑変性症 (AMD) で、疾患易罹患性・感受性遺伝子や疾患抵抗性遺伝子に関して、一塩基多型(single nucleotide polymorphisms: SNPs)がいくつか同定されてきている。SNPs 解析を行うことによって、AMD への易罹患性、治療効果を把握することが可能になり、AMD 発症の予防や、自覚症状出現後早期に眼科受診するための啓発に繋がる可能性がある。そこで、本研究では、どの SNPs が AMD (日本人症例)発症に関与しているかケース・コントロール関連研究を行ない、疾患関連因子を特定する研究を行った。

#### (2) 脈絡膜新生血管の分子生物学的検討

脈絡膜新生血管 (CNV) は、AMD でもみられるが、遺伝的黄斑ジストロフィ、コラーゲンや弾性繊維の脆弱に起因する疾患(網膜色素線条など)、網膜色素変性症に合併することが知られている。黄斑ジストロフィのなかで、常染色体優性遺伝形式をとる家族性ドルーゼン (ML/DHRD)は、30 歳代より黄斑部のドルーゼンが多発する疾患で、若年性の脈絡膜新生血管 (CNV)を合併する。家族性ドルーゼンの発症メカニズムを明らかにする目的で、候補遺伝子の変異解析を行い、疾患ハプロタイプ解析を行った。また、網膜・網膜色素上皮が原発性・進行性に障害される網膜色素変性でも CNV が起こりうる。網膜色素変性に対しても分遺伝学的アプローチによって原因遺伝子を特定する研究を行った。

#### (3) 脈絡膜新生血管に対する抗 VEGF 治療プロトコルの確立

AMD では、抗 VEGF (血管内皮増殖因子) 薬であるラニビズマブやアフリベルセプトの硝子体注入が保険適応となり広く治療に用いられている。しかし、遺伝的黄斑ジストロフィ、網膜色素線条、網膜色素変性症に合併する CNV に対しては、ラニビズマブやアフリベルセプトの保険適応はない。そこで、上記疾患に対して、転移性大腸癌にのみ認可されている抗 VEGF

剤であるベバシズマブ(アバスチン)の硝子体内注入を行い治療効果について検討した。

#### (4) 実験的ぶどう膜炎・脈絡膜新生血管モデルにおける自然免疫と炎症の関与とその治療に関する研究

実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)における VEGF と PEDF の発現様式に関して、血管新生の分子機構の解明とその治療に関する研究は、失明予防につながる重要な研究課題である。そこで、まず着目したのは VEGF と血管新生阻害作用をもつ pigment epithelium-derived factor (PEDF)である。眼内血管新生には血管新生因子の VEGF と PEDF のバランスが大きく作用するとされている。そこで、ぶどう膜炎のモデルである EAU を用いて VEGF と PEDF の発現様式を検討した。また、眼内 VEGF の発現を抑制する新規治療薬の可能性について検討した。

## II. 研究計画および材料と方法

### (1) 滲出型加齢黄斑変性症に対する分子遺伝学的検討

①東京慈恵会医科大学の学内ゲノム解析倫理委員会承認後、AMD の約 200 例からゲノム DNA を抽出した。ヒトゲノム全体を網羅する 500,5688 個以上の一塩基多型(SNPs)について、Affymetrix Human Mapping Arrays と TaqMan assay 法を応用し SNPs のタイピングを行った。

②AMD の特殊型・重症型である網膜血管腫状増殖(RAP) と診断された 8 例(平均年齢 85.6 歳、男性 4 例、女性 4 例)の血液から DNA 抽出後、PCR 法を用い直接シーケンス法により塩基配列を解析した。AMD の疾患感受性遺伝子である *ARMS2/HTRA1*, *CFH*, *C8* 遺伝子の SNPs 解析を行った。

### (2) 脈絡膜新生血管性疾患の分子生物学的・分子遺伝学的検討

①黄斑ジストロフィのなかで、常染色体優性遺伝形式をとる家族性ドルーゼンは、30 歳代より黄斑部のドルーゼンが多発する疾患で、若年性の脈絡膜新生血管 (CNV)を合併する。家族性ドルーゼン(ML/DHRD)の発症メカニズムを明らかにする目的でその原因遺伝子である *EFEMP1* 遺伝子の変異解析、疾患ハプロタイプ解析を行った。

②網膜・網膜色素上皮が原発性・進行性に障害される網膜色素変性でも CNV が起こりうる。学内ヒトゲノム解析倫理委員会承認後、網膜色素変性およびその類縁疾患の患者約 150 症例のゲノム DNA を抽出した。候補遺伝子の分子遺伝学的アプローチおよび、エクソームシーケンス法を用いた全エクソンの網羅的遺伝子解析を行った。

③弾性繊維の脆弱性に起因する網膜色素線条は、常染色体劣性遺伝病であり、高頻度(生涯で 72%~86%)に CNV を合併することが知られている。網膜色素線条と診断された 20 例に対して、原因である *ABCC6* 遺伝子変異解析を行った。

### (3) 脈絡膜新生血管に対する抗 VEGF 治療プロトコルの確立

CNV に対するベバシズマブの眼内注入は、学内倫理委員会に受理された内容に沿って行われたベースライン、術後 1 週・1 か月・3 か月・6 か月の視力、光干渉断層計を用い 網膜厚を測定した。

#### (4) 実験的ぶどう膜炎・脈絡膜新生血管モデルにおける自然免疫と炎症の関与とその治療に関する研究

EAU では網脈絡膜内においてさまざまな炎症性サイトカインの発現について研究した。新たな治療法に関して、EAU に対して新規治療薬の可能性として、新規 DDS 製剤であるステルスナノステロイドおよび PPAR $\alpha$  活性化薬のフィブラート系脂質低下薬であるフェノフィブラートの全身投与を試み治療効果を検討した。

### III. 研究成果

#### (1) 滲出型加齢黄斑変性症に対する分子遺伝学的検討

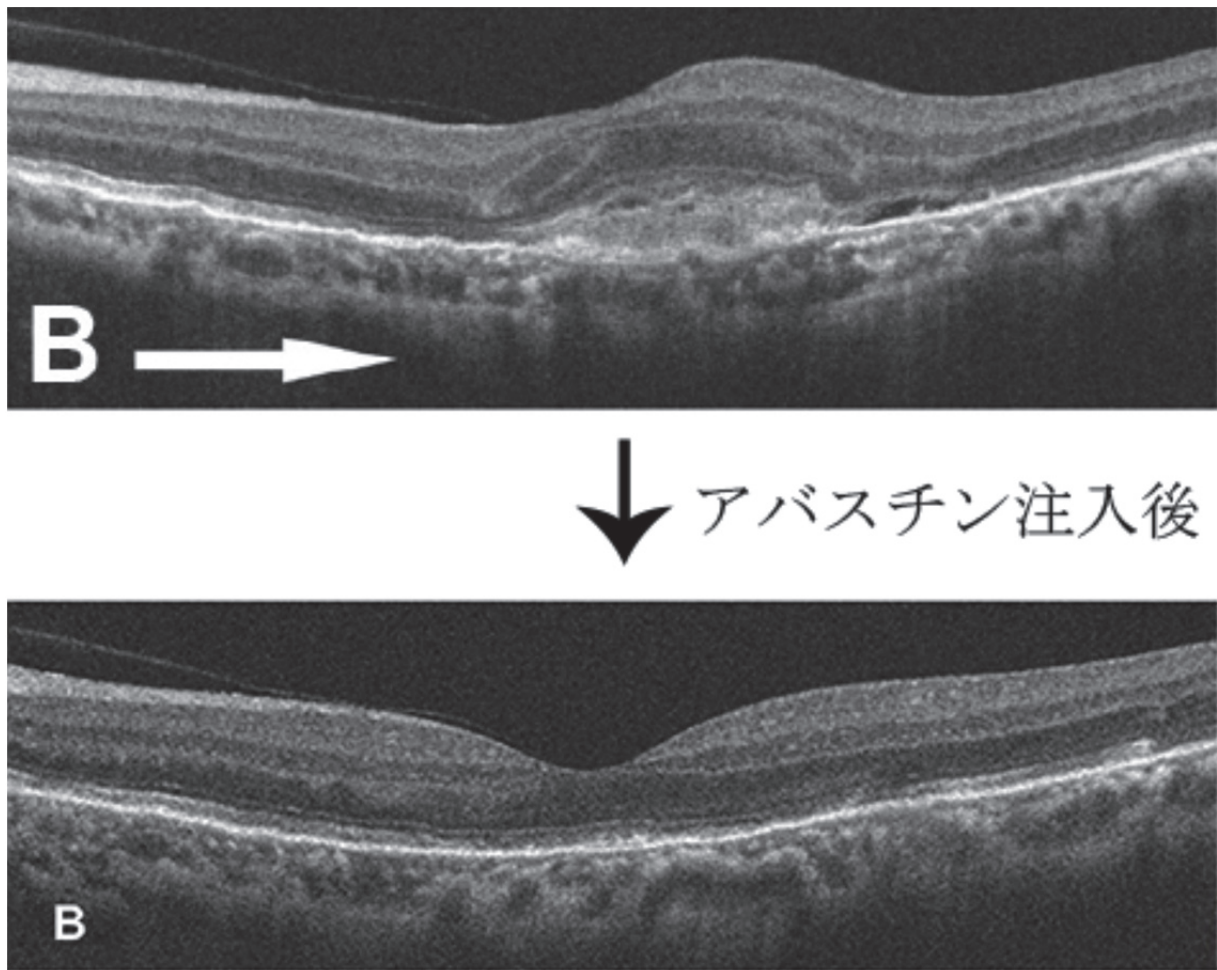
AMD の感受性遺伝子として *CFH* 遺伝子の I62V 多型及び *ARMS2* 遺伝子の A69S 多型、*HTRA1* 遺伝子の rs1120638、*C3* 遺伝子の rs2241394 が報告されている。AMD の特殊型である RAP は、他の病型と比較して両眼発症が多く、より重症であることから、疾患感受性遺伝子との相関が強いと考えられている。RAP と診断された 8 例中 4 例で RAP は、両眼に発症していた。I62V 遺伝子型(risk allele:G , non-risk allele:A)では AA 型が 8 例全例で認められた。A69S 遺伝子型(risk allele:T , non-risk allele:G)では TT 型が 7 例、GT 型が 1 例で認められた。rs1120638(risk allele:A, non-risk allele:G)遺伝子型では AA 型が 7 例、AG 型が 1 例で認められた。rs2241394 遺伝子型(risk allele:G , non-risk allele:C)では CC 型が 5 例、CG 型が 3 例で認められた。

#### (2) 脈絡膜新生血管性疾患の分子生物学的・分子遺伝学的検討

ML/DHRD と診断された日本人 1 家系について、海外で報告された ML/DHRD 家系と疾患ハプロタイプについて比較検討した。発端者を含む 4 症例すべてに R345W 変異を認めた。疾患ハプロタイプは、過去に報告されたインド人家系、米国家系とは明らかに異なっていた。本研究によって、ML/DHRD の日本人家系の存在が明らかにされた。

#### (3) 脈絡膜新生血管に対する抗 VEGF 治療プロトコルの確立

網膜色素線条に合併した CNV の 20 例に対して、ベバシズマブ(アバスタチン)の硝子体内注入を行った結果、治療後 1 か月より、光干渉断層計所見のみならず、視力の改善が得られ治療効果が期待できる治療法と考えられた。ベバシズマブ(アバスタチン)注入前後の代表症例を図に示す。代表症例では、CNV の著しい退縮を認めている。



#### (4) 実験的ぶどう膜炎・脈絡膜新生血管モデルにおける自然免疫と炎症の関与とその治療に関する研究

EAU では網脈絡膜内において VEGF, interleukin 6, interleukin 17 などの炎症性サイトカインの発現の上昇がみられ、PEDF の発現は減弱していた。この効果は抗炎症作用を有するステロイドの全身投与により抑制された。また、ステルスナノステロイドおよびフェノフィブラートの全身投与は EAU における眼内の VEGF の発現を抑制した。

#### IV. 考察

本研究で、網膜の血管新生疾患の代表である AMD および CNV 症例に対して、分子生物学的・分子遺伝学的アプローチによって、その病態解明の一端を明らかにした。また、実験動物をもちいた基礎的・治療的研究では、新規治療薬の候補を同定し、臨床応用に向けた基礎的データが得られた。

AMD の特殊型・重症型である RAP 症例において I62V、rs2241394 との関連は明らかでなかったが、*ARMS2/HTRA1* の risk allele と強く関連している可能性が示唆された。*ARMS2/HTRA1* の risk allele は、おそらく、すべてのタイプの AMD の易罹患性因子である可能性が考えられる。

若年 AMD と同様な病態を示す遺伝的疾患である ML/DHRD 家系で、欧米と同様に *EFEMP1* 遺伝子変異(R345W)を認めたが、疾患ハプロタイプは、欧米の症例と比べ異なっていることを明らかにし、その変異が日本人祖先において独立に発生したと考えられた。

網膜色素線条や網膜色素変性に合併する CNV に対するベバシズマブ硝子体注入による治療効果を検討し、光干渉断層計所見のみならず、視力の改善もみとめた。網膜色素線条に合併した CNV の特殊例として、黄斑上膜および白内障手術後に出現した CNV に対して、複数回の治療で CNV の活動性を低下させた。また、眼外傷(眼球打撲)の2か月後に脈絡膜新生血管を発生した症例では、1回の治療で脈絡膜新生血管を退縮させることができた。網膜色素線条については症例毎に異なるが、治療回数は、1回から複数回を要し、最善の治療プロトコルを確立するにはさらなる症例検討が必要であると考えられる。本研究から、ベバシズマブ硝子体注入は、CNV に対して安全かつ有効な治療法であると結論できる。

実験的ぶどう膜炎・脈絡膜新生血管モデル(EAU)において、VEGF を含めた炎症性サイトカインの発現上昇がみられ、また、ステルスナノステロイドおよびフェノフィブラートの全身投与によって、EAU における眼内の VEGF の発現を抑制したことから眼内 VEGF の発現を抑制する新規治療薬の候補となる可能性が示唆された。

今後も、AMD および CNV の病態解明・治療に向けた基礎的および臨床的研究を続け、少しでも高齢者が、血管新生疾患で失明しない世の中になることを切望し、研究を継続していきたい。

最後に、本研究の遂行にあたり多大なるご支援を賜りました公益財団法人車両競技公益記念財団に深く感謝申し上げます。

## V. 研究成果の発表

1. Takeuchi T, **Hayashi T**, Bedell M, Zhang K, Yamada H, **Tsuneoka H**. A novel haplotype with the R345W mutation in the *EFEMP1* gene associated with autosomal dominant drusen in a Japanese family. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 51: 1643-1650, 2010.
2. **Sakai T**, Ishihara T, Higaki M, Akiyama G, **Tsuneoka H**. Therapeutic effect of stealth-type polymeric nanoparticles with encapsulated betamethasone phosphate on experimental autoimmune uveoretinitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 52: 1516-1521, 2011.
3. Rocha Sousa A, **Hayashi T**, Lourenço Gomes N, Brandão E, Penas S, Rocha P, **Tsuneoka H**. A novel mutation (Cys83Tyr) in the second zinc finger of *NR2E3* in enhanced S-cone syndrome. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol** 249: 201-208, 2011.

4. **Hayashi T**, Tsuzuranuki S, Kozaki K, Urashima M, **Tsuneoka H**. Macular dysfunction in Oguchi disease with the frequent mutation 1147delA in the *SAG* gene. **Ophthalmic Res** 46 : 175-180, 2011.
5. **Hayashi T**, Gekka T, Nakano T, **Tsuneoka H**. Improvement in S-cone-mediated visual fields and rod function after correction of vitamin A deficiency. **Eur J Ophthalmol** 21 : 657-660, 2011.
6. Kitakawa T, **Hayashi T**, Tsuzuranuki S, Kubo A, **Tsuneoka H**. Color vision in an elderly patient with protanopic genotype and successfully treated unilateral age-related macular degeneration. **Int Ophthalmol** 31: 471-475, 2011.
7. Akiyama G, **Sakai T**, Kuno N, Kimura E, Okano K, Kohno H, **Tsuneoka H**. Photoreceptor rescue of pigment epithelium-derived factor- impregnated nanoparticles in Royal College of Surgeons (RCS) rats. **Mol Vis** 18: 3079-3086, 2012.
8. **Hayashi T**, Gekka T, Kozaki K, Ohkuma Y, Tanaka I, Yamada H, **Tsuneoka H**. Autosomal dominant occult macular dystrophy with an *RP11* mutation (R45W). **Optom Vis Sci** 89: 684-691, 2012.
9. Aoyagi R, **Hayashi T**, Masai A, Mitooka K, Gekka T, Kozaki K, **Tsuneoka H**. Subfoveal choroidal thickness in multiple evanescent white dot syndrome. **Clin Exp Optom** 95: 212-217, 2012.
10. Kitakawa T, **Hayashi T**, Takashina H, Mitooka K, Gekka T, **Tsuneoka H**. Improvement of central visual function following steroid pulse therapy in acute zonal occult outer retinopathy. **Doc Ophthalmol** 124: 249-254, 2012.
11. Kuniyoshi K, **Hayashi T**, Sakuramoto H, Nakao A, Sato T, Utsumi T, Shimomura Y, **Tsuneoka H**. Novel mutations in enhanced S-cone syndrome. **Ophthalmology** 120: 431.e1-6, 2013.
12. Aoyagi R, **Hayashi T**, Gekka T, Kozaki K, **Tsuneoka H**. Multifocal electroretinographic evaluation of macular function in acute posterior multifocal placoid pigment epitheliopathy. **Doc Ophthalmol** 124: 253-258. 2013.
13. Ohkuma Y, **Hayashi T**, **Sakai T**, Watanabe A, **Tsuneoka H**. One year results of reduced fluence photodynamic therapy for central serous chorioretinopathy: the outer nuclear layer thickness is associated with visual prognosis. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol** (in press)



14. Okuno T, **Hayashi T**, Sugasawa J, Oku H, Yamada H, **Tsuneoka H**, Ikeda T. Elderly case of pseudo-unilateral occult macular dystrophy with Arg45Trp mutation in *RP111* gene. **Doc Ophthalmol** (in press)
15. Kubota M, **Hayashi T**, Arai K, **Tsuneoka H**. Choroidal neovascularization after blunt ocular trauma in angioid streaks. **Clin Ophthalmol** (in press)
16. Katagiri S, **Hayashi T**, Takashina H, Mitooka K, **Tsuneoka H**. Choroidal neovascularization in angioid streaks following microincision vitrectomy surgery: a case report. **BMC Ophthalmol** (in press)
17. Ogasawara M, Matsumoto Y, **Hayashi T**, Ohno K, Yamada H, Kawakita T, **Tsuneoka H**. *KRT12* mutations and *in vivo* confocal microscopy in two Japanese families with Meesmann corneal dystrophy. **Am J Ophthalmol** (in press)
18. Ohkuma Y, **Hayashi T**, Yoshimine S, **Tsuneoka H**, Terao Y, Akiyama M, Ida H, Ohashi T, Okumura S, Ebihara N, Murakami A, Shimozawa N. Ocular findings in X-linked adrenoleukodystrophy with an *ABCD1* mutation (Gly266Arg). (submitted)
19. Katagiri S, **Hayashi T**, Gekka T, Ida H, Ohashi T, Eto Y, **Tsuneoka H**. A novel deletion mutation of the *OAT* gene in gyrate atrophy of the choroid and retina. (submitted)
20. Gocho K, Kikuchi S, Kabuto T, Takahashi H, Usui A, Kameya S, Yamaki K, **Hayashi T**, **Tsuneoka H**, Mizota A, Takahashi H. High-resolution imaging of cone photoreceptors of eyes with Bietti crystalline dystrophy associated with *CYP4V2* mutation. (submitted)
21. Katagiri S, **Hayashi T**, Gekka T, Yamada H, Iwata T, **Tsuneoka H**. A novel *CYP4V2* mutation (S121Y) in choroideremia-like phenotype. (submitted)
22. Katagiri S, Yoshitake K, Sergeev Y, Akahori M, **Hayashi T**, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, **Tsuneoka H**, Iwata T. Whole-exome sequencing identifies a novel *PDE6C* mutation (E591K) in a Japanese family with congenital achromatopsia. (submitted)
23. Katagiri S, Yoshitake K, Akahori M, **Hayashi T**, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, **Tsuneoka H**, Iwata T. Whole-exome sequencing identifies a novel *ALMS1* mutation (Q2007X) in two Japanese brothers with Alström Syndrome. (submitted)

24. Ohkuma Y, **Hayashi T**, Yamada H, Itabashi T, Akahori M, Iwata T, Noda T, **Tsuneoka H**. Retinal angiomatous proliferation, a severe form of AMD, associated with risk alleles of *ARMS2/HTRA1* gene polymorphisms in Japanese patients. (submitted)