

論文の内容の要旨

論文題目 **血管内皮増殖因子およびその受容体を対象とした
脈絡膜新生血管の新規治療法に関する基礎的検討**

指導教員 新家眞教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 高橋秀徳

背景

加齢黄斑変性(Age-related Macular Degeneration, AMD)とは

AMD は先進国の失明原因第一位である。網膜の視野中心にあたる黄斑に変性を来たすため視力低下を来す。脈絡膜新生血管(Choroidal NeoVascularization, CNV)を原因とした滲出性 AMD は、急激で強い視力低下を来し予後が悪い。CNV の発生・伸展には血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor、VEGF)の関与が大きいとされる。新規治療法の探索が長年行われ、網膜光凝固、経瞳孔温熱療法、光線力学的療法、抗 VEGF 抗体硝子体投与などが開発されたが、未だに視機能を完全に回復する療法はなく、今後更に有効な治療法の開発が望まれる。

マウスレーザー誘発 CNV モデル

眼底にレーザーを照射すると、透明な前眼部・中間透光体・網膜は通過し、色素のある網膜色素上皮(Retinal Pigment Epithelium、RPE)に吸収される。強いレーザーを照射することで RPE を障害し、CNV を誘発する。

我々も本方法を導入したが、詳細は後述するが既報の条件では照射強度が強すぎて RPE 破壊以外の脈絡膜熱障害が起きること、実際に破壊される RPE の面積がばらつくことを発見したので、検討の上条件を変更した。

更にスクリーニングに用いやすいように短い日数で検討できないか検討した。

1. VEGF 受容体 2(VEGF Receptor 2、VEGFR2)選択的阻害薬のスクリーニング

VEGFR2 阻害薬は多数開発されており、その強い血管新生阻害作用から抗ガン剤としてガンの栄養血管抑制に用いられている。しかしその多くはチロシンキナーゼ一般に対して阻害作用があるため、全身副作用としての体重減少を来す用量と新生血管抑制用量が近い。そのような薬剤を AMD を初めとする慢性疾患に応用することは困難であり、我々は中外製薬でスクリーニングされた新規 VEGFR2 選択的阻害薬をマウス CNV モデルを用いて検討し、CNV に特に抑制効果を持つ化合物をスクリーニングし、その効果を検討した。

2. VEGFR1 に対する siRNA 療法の検討

VEGFR1 も VEGFR2 同様血管新生及び血管透過性亢進に関与する。また、siRNA(short intestinal RNA)は 20 塩基対ほどの RNA であり、細胞に導入することで相補的な mRNA を阻害し特定の遺伝子を knock down することができる。siRNA は RNA 分解酵素存在下ではきわめて容易に分解され、血中半減期は約 5 分であり、病変に到達しない。そこで、協和発酵工業の Wrapped Liposome(WL)というリポソーム製剤を用いた。これは siRNA 等の薬剤を内包することができ、血中半減期が長く CNV の様な血管漏出部位に集積する。まず実際に集積するかマウス CNV モデルで検討し、VEGFR1 siRNA を WL に内包してその有用性を検討した。

3. VEGFR2 由来ペプチドによる免疫療法の検討

VEGFR2 は主に新生血管部位の血管内皮に発現する。VEGFR2 を対象とした免疫により、細胞障害性 T リンパ球(CTL)を誘導し、新生血管を抑制することがマウス腫瘍モデル報告されている。同モデルではヒト HLA-A*0201 を発現しヒトと CTL レパートリリーが 71%共通な A2Kb トランスジェニックマウスを用い、最も新生血管抑制効果の強いペプチドがスクリーニングされている。そこで我々は同ペプチドを用い、同マウス(医科学研究所細胞臓器工学田原秀晃博士より贈与)を用いて CNV 抑制効果を検討した。

方法

マウスレーザー誘発 CNV モデルの検討

CNV 作成方法

7 週齢♂の C57BL/6j mouse を用いた。全身麻酔し、トロピカミドを点眼し散瞳させ、細隙灯顕微鏡(TOPCON SL7F)で観察し、半導体レーザー(NIDEK NC3200)で眼底視神経乳頭から 1mm の網膜色素上皮に両眼 3 カ所ずつ照射し、CNV を誘発した。

CNV はフルオレセイン眼底造影(FA)で検討した。トロピカミドで散瞳し、フルオレセインを 7mg/kg 投与した。眼底カメラ(TOPCON TRC-50IX)で 450nm 励起光を用い 470nm で撮影した。画像はレーザー非照射部位の網膜毛細血管領域の輝度を 0、網膜大血管の最大輝度を 1、と規定し、レーザー照射による CNV の蛍光漏出部位の輝度を合計して蛍光漏出指数とした。

また、CNV 膜(CNV membrane、CNVM)面積は 10%FITC conjugated lectin で灌流染色し、脈絡膜伸展標本を作製して面積を測定した。体積を測る際は眼球をカルノア固定し、35 μ m おきにパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色後光学顕微鏡(OLYMPUS BX50)と CCD(OLYMPUS MP500)で撮影した。CNVM 面積を測定し、合計することで体積を求めた。

蛍光漏出指数・面積・体積は対数変換の上枝分れ分散分析で統計解析を行った。

照射径の検討

直径の設定を 75, 200, 500, 990 μm の 4 通りにおいて、照射時間を最短の 20msec に設定し、照射眼底に泡が発生することを指標として、各群 10 匹のマウスを用いて様々な照射強度に設定し、レーザー照射した。脈絡膜伸展標本を作製して RPE の欠損面積を測定した。

照射強度の検討

次に 100 発照射しても泡発生を一つも失敗しないように照射強度を十分に上げた。直径 75 μm , 照射強度 200mW, 照射時間 50msec の条件と直径 200 μm , 照射強度 200mW, 照射時間 20msec の条件でレーザー照射を行い、脈絡膜伸展標本で RPE の欠損面積を測定した。

理論的検討

レーザー照射装置のメーカーである NIDEK より設定直径 75 μm と 200 μm におけるレーザー焦点面、およびその前後 $\pm 1\text{mm}$ 以内における 0.1mm 刻みのレーザー照射強度分布を取り寄せ、マウス眼底におけるレーザー照射強度分布を検討した。

レーザー照射後 FA を行うまでの日数の検討

レーザー照射翌日より連日 FA を行い、蛍光漏出量を半定量した。さらに照射 8 時間後、3 日後、7 日後に同一個体 30 匹で FA を行い、各日程間のデータの相関係数を計算した。

レーザー照射 3 日後の網脈絡膜切片を血管内皮特異的な CD31 で免疫染色した。

1. VEGFR2 選択的阻害薬のスクリーニング

中外製薬でスクリーニングされた VEGFR2 選択的阻害薬 6 種をマウス CNV モデルで検討した。

蛍光漏出指数からもっとも抑制率の高い化合物を選択し、更に低い用量を含めて各群 10 匹で同様に検討した。

2. VEGFR1 に対する siRNA 療法の検討

CNV 集積の検討

蛍光付加 siRNA を内包した WL を静注し、眼底カメラで蛍光撮影し、CNV 部位の各画素の輝度を合計した。

VEGFR1 siRNA/WL のマウス CNV モデルにおける検討

VEGFR1 の siRNA はすでに *in vitro* 及び *in vivo* での knock down 効果が報告されているものを、マウス脳血管内皮細胞(EOMA)を用いて *in vitro* での knock down 効果を確認し

て用いた。

1. コントロール群(生理食塩水静注)
2. VEGFR1 siRNA 群
3. VEGFR1 siRNA/WL 群

各群マウスを 6 匹ずつ用いた。CNV をレーザーで誘発し、3 日連続静注した。レーザー照射 3 日後に FA を施行し、CNVM 面積を求めた。

3. VEGFR2 由来ペプチドによる免疫療法の検討

マウス 1 匹 20g あたり PBS200ul にペプチド 100ug を溶解し、アジュバンド 100ul: SIGMA FREUND'S ADJUVANT INCOMPLETE F5506 を用いてエマルジョン(IFA)を作成した。

マウスは各群 15 匹用いた。

1. PBS(10ml/kg)接種群
2. IFA(10ml/kg)接種群
3. ペプチド(5mg/kg)と IFA(10ml/kg)の懸濁接種群

生後 7-10 週に右腋下に注射し、10 日後に左腋下注。20 日後にレーザー照射し、23 日後に FA を施行し、24 日後に脈絡膜伸展標本を作製した。一部は凍結切片を作成し、CD31, VEGFR2, CD4, CD8 で免疫染色を行った。

結果

マウスレーザー誘発 CNV モデル

照射径の検討

RPE の欠損直径は設定値 $75\mu\text{m}$ で約 $116\mu\text{m}$ 、設定値 $200\mu\text{m}$ で $169\mu\text{m}$ であった。泡が発生する照射強度と、伸展標本における RPE 欠損面積は良く比例した。

照射強度の検討

直径 $75\mu\text{m}$ 、照射強度 200mW 、照射時間 50msec では RPE の欠損円の直径は平均 $168\mu\text{m}$ 、標準偏差 $41\mu\text{m}$ であった。一方直径 $200\mu\text{m}$ 、照射強度 200mW 、照射時間 20msec では平均 $169\mu\text{m}$ 、標準偏差 $17\mu\text{m}$ とばらつきが小さかった。

理論的検討

収束光である直径 $75\mu\text{m}$ 設定の時はピン트가ずれた時拡散した光線で広い範囲の RPE 破壊されるのに対し、平行光に近い直径 $200\mu\text{m}$ 設定の時は多少ピン트가ずれてもほぼ同じ直径で RPE が破壊されることが分かった。

レーザー照射後フルオレセイン眼底造影を行うまでの日数の検討

レーザー照射後蛍光漏出指数は 2 日目でピークを迎え、その後急速に減少した。照射 4 日後が照射翌日と同等だった。

レーザー照射 8 時間後と 3 日後の相関係数は 0.15 と相関がなかったのに対し、3 日後と 7 日後の間には 0.57 と強い相関が認められた。

レーザー照射 3 日後の網脈絡膜切片にて、RPE より上に CD31 染色像が認められた。

1. VEGFR2 選択的阻害薬のスクリーニング

6 化合物を体重減少しない濃度とその半分の濃度で投与したところ、2 化合物が FA にて特に有効であった。

更に半分の濃度で投与したところ、総合的に#0451 でもっとも強い抑制効果がみられた。

#0451 は分子量 490、化学構造上ジフェニルウレアの特徴を有し、VEGFR2 の IC50 は 0.0026 ときわめて小さかった(中外製薬提供データ)。

FA は体重抑制濃度の 1/8 の濃度でも抑制が認められ、体積も用量依存に減少した。

2. VEGFR1 に対する siRNA 療法の検討

CNV 集積の検討

1 時間後から蛍光が見られ、8 から 24 時間後に掛けてプラトーに達し、3 日後まで蛍光が検出できた。

VEGFR1 siRNA/WL のマウス CNV モデルにおける検討

VEGFR1 siRNA/WL 投与群は生食静注に比べて 40%抑制された($p=0.005$)。siRNA 単独静注群と比べても抑制傾向にあった($p=0.06$)が、siRNA 単独静注群は生食静注群に対し特に有意な差はなかった($p=0.2$)。

3. VEGFR2 由来ペプチドによる免疫療法の検討

ペプチド群は PBS 群に比べ、蛍光漏出指数が 18%抑制 ($p<0.05$)、面積は 20%抑制 ($p<0.05$) された。

CNVM 中に CD31 陽性細胞と VEGFR2 陽性細胞が認められた。ヒト VEGFR2 免疫群の CNVM 中に CD4, CD8 陽性細胞が多く観察された。

結論

マウスレーザー誘発 CNV モデル

照射径と照射強度

既報に近い直径 75 μ m, 照射強度 200mW, 照射時間 50msec の条件よりも、直径 200 μ m, 照射強度 200mW, 照射時間 20msec の方が照射強度半分以下で同等の直径の RPE をばらつき少なく破壊できる。

レーザー照射後フルオレセイン眼底造影を行うまでの日数の検討

CNV は 3 日目で評価しても既報に多い 7 日目に相関するデータが得られる。CNV は 3 日目でも認められる。

1. VEGFR2 選択的阻害薬のスクリーニング

#0451 は CNV 内服治療に有用である可能性がある。

2. VEGFR1 に対する siRNA 療法の検討

WL は全身投与により CNV に集積し、VEGFR1 siRNA がマウス CNV を抑制する。同療法は CNV 治療に有用である可能性がある。

3. VEGFR2 由来ペプチドによる免疫療法の検討

マウス CNVM 中に VEGFR2 は発現しており、VEGFR2 に対する免疫により CTL が誘導され CNV を抑制すると考えられた。ヒトにおいても今回使用したペプチドが有効である可能性がある。

まとめ

マウスレーザー誘発 CNV モデルを精度良く作成する条件を発見した。スクリーニング用に短期間で評価が可能であることも発見した。同条件にて各種新規治療法を検討し、VEGF 関連因子を対象とした CNV 新規治療法を 3 つ開発した。今後ヒトへの応用を目指し、改良を重ねる必要がある。