

サル網脈絡膜血管病変モデルの確立及び
それを用いた病態解明と治療標的の探索に関する研究

稲垣 賢

目次

序論	1 頁
第 1 章 カニクイザル網膜静脈閉塞症モデルの確立	6 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 2 章 カニクイザル脈絡膜血管新生モデルの確立	30 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 3 章 浮腫を伴う網膜血管病変に対するバイオマーカー及び新規治療標的の探索	47 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
総括及び結論	59 頁
謝辞	62 頁
引用文献	63 頁
略語一覧表	74 頁

序論

視覚、聴覚、触覚、嗅覚、味覚からなる感覚機能は、ヒトが社会生活を営む上で重要な役割を担っている。中でも、私たちは 80% 程度の情報を視覚から得ており (1)、視覚は生活の質 (quality of life: QOL) を維持する上で欠くことの出来ない感覚機能である。視覚情報は次の

様にして取得される (2) (Fig. 1A)。まず、光が前眼部 (角膜、前房、水晶体) を通過し、硝子体を経て網膜上で像を結ぶ。網膜は Fig. 1B に示すような構造で構成されるが、網膜に届いた光が視細胞 (錐体細胞及び桿体細胞) において電気信号へと変換され、水平細胞、双極細胞及びアマクリン細胞などの介在ニューロンを経て網膜神経節細胞へと情報が伝達される (2)。網膜神経節細胞から伸長する神経軸索は視神経を構成し、脳内の外側膝状体及び上丘へと投射し、網膜の情報を伝達する (2)。最後に、後頭葉に存

在する一次視覚野で情報処理が行われることにより、私たちは視覚情報を得ることが出来る (2)。近年、視覚障害者は増加の一途を辿っている。世界の視覚障害者は 2017 年現在、3,600 万人存在するが、中途失明疾患に対する既存治療法が改良されなかった場合、2050 年には 1 億 1,500 万人に増加する可能性が示唆

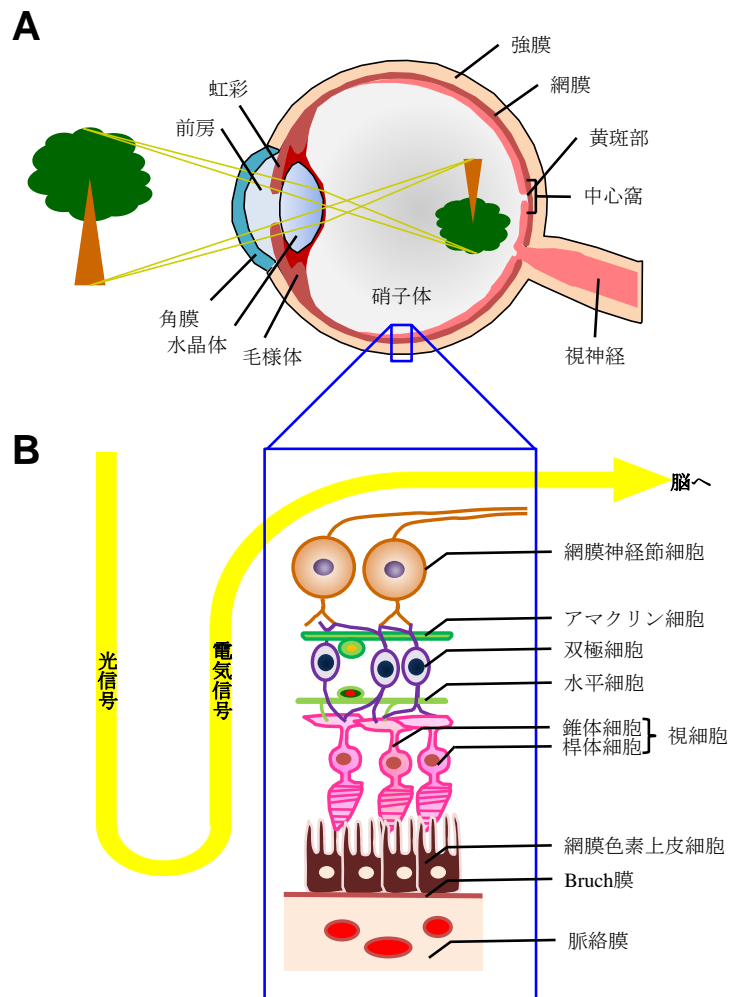


Figure 1 Structure of eye and retinal cells.

(<https://psychology-effect.com> から改変引用)

されている (3)。本邦では、医療費、介護保険料、研究費などによる視覚障害に関連するコストは 8 兆円に上ると考えられており、視覚障害者の増加による医療経済への影響は看過できない。本邦における中途失明原因疾患には、緑内障、糖尿病性網膜症、網膜色素変性症、加齢黄斑変性などが挙げられ、患者数もこの順に多く存在し (Fig. 2) (4)、何れの疾患においても「加齢」は最大の危険因子である。現在、先進国を中心に高齢化が急速に進んでいるが、我が国は世界でもとりわけ高齢者率の高い超高齢社会であることから、今後も中途失明者数は増加することが予測される。特に、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団「平成 22 年度国内基盤技術調査報告書－2020 年の医療ニーズの展望－」によると、加齢黄斑変性や糖尿病性網膜症などの網膜血管疾患は治療満足度や薬剤貢献度が未だ十分ではない疾患であり、これらの病態解明並びに治療法の開発は医学的意義が大きい。

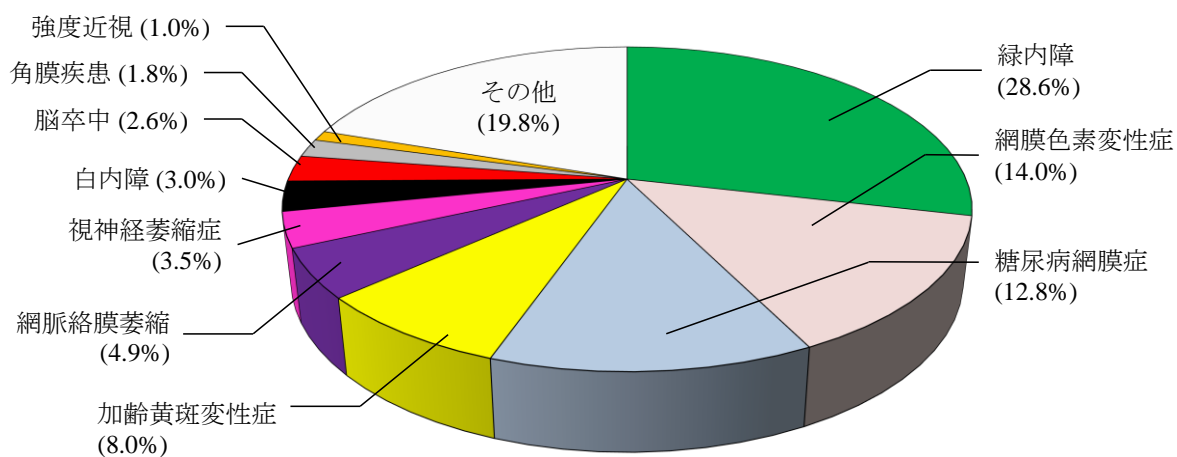


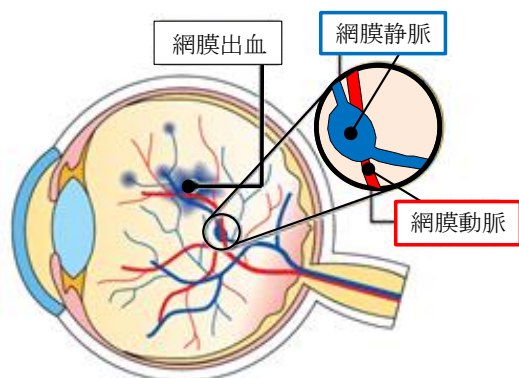
Figure 2 The ratio of causative diseases of blindness.

[文献(4)を基に作成]

網膜血管疾患の1つに、網膜静脈閉塞症 (Retinal vein occlusion: RVO) がある。本疾患は糖尿病性網膜症の次に罹患率が高く、RVO患者は世界で1,600万人程度存在すると推測される (5)。RVOは、病態機序の違いから網膜中心静脈閉塞症 (Central retinal vein occlusion: CRVO) 及び網膜静脈分枝閉塞症 (Branch retinal vein occlusion: BRVO) の2つの病型に分類される。いずれの病型においても血栓により血管が閉塞することで発症するが、CRVOは眼球の後方にある網膜中心静脈が詰まって発症するのに対し (5)、BRVOは網膜内で分岐した静脈が詰まって発症する (Fig. 3) (6)。網膜静脈閉塞症では、血管閉塞を起点にした出血や浮腫などにより視力が低下する (7)。現在治療の第一選択薬である抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 薬に抵抗性を示す症例や、浮腫が再発する症例も存在し (8-10)、眼科領域における臨床的課題の一つである。こうした背景を踏まえ、さらなる病態機序解明に基づいた新規治療標的の探索が行なわれているが、VEGF以外を標的とした治療法がまだ確立されていないのが実情である。その要因として、網膜静脈閉塞症病態 (嚢胞状の浮腫など) を正確に反映できる実験モデルが存在しないことが挙げられ、病態を反映したモデル動物の確立が必要とされている。以上、網膜静脈閉塞症の動物モデル確立は、病態解明及び治療薬開発に繋がることから、眼科領域における急務の課題である。

【網膜静脈分枝閉塞症】

閉塞した網膜静脈により網膜動脈が圧迫



【網膜中心静脈閉塞症】

閉塞した網膜中心静脈により網膜中心動脈が圧迫

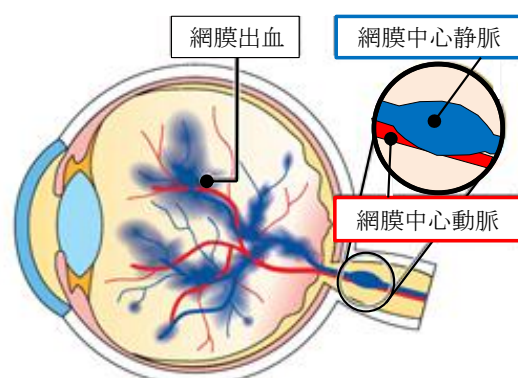


Figure 3 The pathology associated with retinal vein occlusion.

(<https://okushiba-eyeclinic.com/medical/index4.html> から改変引用)

加齢黄斑変性は欧米において中途失明原因の第1位を占める。加齢黄斑変性は、大きく萎縮型と滲出型に分類される。萎縮型加齢黄斑変性は視細胞の変性・脱落を伴う疾患であり、その病態機序としては以下の説が有力である。まず、視細胞（桿体細胞及び錐体細胞）からの老廃物の蓄積によるドルーゼン（網膜色素上皮細胞の機能低下により生じる老廃物）の形成が網膜色素上皮（Retinal pigment epithelium: RPE）細胞に対して炎症を誘発し、網膜色素上皮細胞及び視細胞が脱落する（Fig. 4）（11, 12）。一方、滲出型加齢黄斑変性においては、病的な脈絡膜血管新生（Choroidal neovascularization: CNV）に起因する血管外漏出により浮腫を生じ、網膜色素上皮及び神経網膜が障害を受ける（Fig. 4）（13）。滲出型加齢黄斑変性に対しては、脈絡膜新生血管の閉塞を目的としたレーザー光凝固術並びに光線力学療法及び血管漏出抑制を目的としたVEGF阻害薬による治療法が確立され、一定の治療成績を収めてきた（14）。一方、脈絡膜新生血管由来の漏出が慢性化した症例では、網膜色素上皮及びその近傍で線維性癒痕組織が形成され、患者の予後視力の低下に関与することが示唆される（15, 16）。残念ながら、線維性癒痕組織に対する治療薬開発は十分に進んでおらず、基礎研究及び臨床研究の進展が期待されている。線維性癒痕の治療法の確立には、まず、臨床所見に類似した病態を示す実験モデルにおける線維性癒痕の確立並びに正確な解析方法の構築が必要不可欠である。

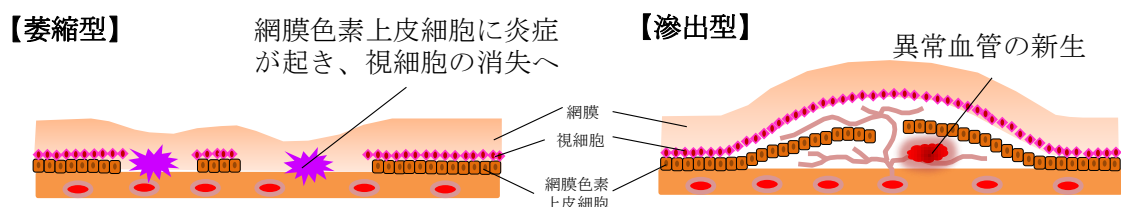


Figure 4 The pathogenic mechanisms associated with non-exudative and exudative age-related macular degeneration.

(<https://www.healios.co.jp/development/amd/>を改変引用)

以上より、本研究では網膜静脈閉塞症及び滲出型加齢黄斑変性に関する非ヒト霊長類であるカニクイザルを用いたモデル動物の確立に加え、浮腫形成に関する新規治療標的の同定及び線維性組織に対する評価法の構築を目的とした。非ヒト霊長類を用いる意義として、下記が挙げられる。齧歯類はヒトの視覚に重要な黄斑を有していないため、齧歯類を用いたモデル動物では黄斑に関する疾患を完全に模倣することは困難である (17) (Fig. 5)。さらに、交差性の観点から、抗ヒト抗体を齧歯類で正確に評価することは難しい。一方、非ヒト霊長類はヒトと同じく網膜に黄斑を有することや抗体においてもヒトと高い交差性を示すなど、非ヒト霊長類を実験動物として用いる意義は大きい。そこで、本研究では非ヒト霊長類であるカニクイザル (*Macaca fascicularis*) に着目した。カニクイザルは、マカカ属に分類され、体長 38-55 cm、体重 3-10 kg 程度であり、網膜疾患の実験動物として広く用いられている (18)。一方、サルを用いた実験は飼育コストなどを考慮するとその取り扱いを決して容易とは言えないが、眼球径が大きいため精緻な解析が行える、更に遺伝的背景がヒトに近いことため試験成績のヒトへの外挿性が高い点で優れた実験モデルになり得る。

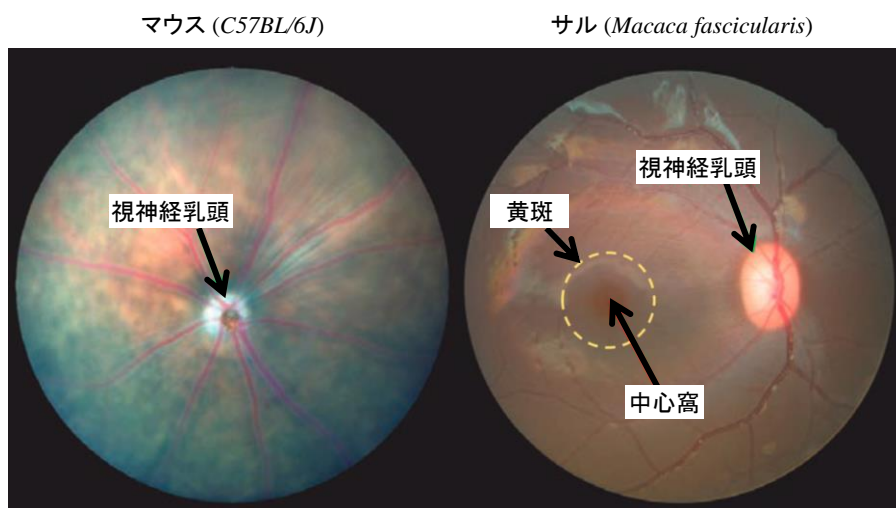


Figure 5 The difference of the vascularization and fovea between mice and monkey

[文献 (17) より改変引用]

第1章では、カニクイザルを用いた網膜静脈閉塞症モデルを作製し、抗VEGF薬として臨床応用されているラニビズマブの有効性を評価した。第2章ではカニクイザルを用いて、滲出型加齢黄斑変性病態モデルであるレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを確立し、新生血管、浮腫及び線維化に対する抗VEGF抗体の薬効を評価した。第3章においては、カニクイザル網膜静脈閉塞症モデルを用いた前房水中のサイトカイン及び成長因子を解析し、浮腫の形成に関与する新規治療ターゲットの同定を試みた。さらに、カニクイザルレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルにおける線維化病変と相関するイメージングバイオマーカーの探索にも着手した。

第1章 カニクイザル網膜静脈閉塞症モデルの確立

第1節 緒言

網膜静脈閉塞症 (Retinal vein occlusion: RVO) は、高齢者に好発する網膜血管疾患の1つであり、その患者数は世界中で累計1,600万人以上と推測される (5)。RVO では、血栓などにより血管が閉塞し、血管漏出による黄斑浮腫や眼底出血を伴い視力障害をもたらす (19)。また、網膜内で過剰に産生されたVEGFが黄斑浮腫や眼底出血の形成に寄与することが分かっている (19)。したがって、RVO に対して、ラニビズマブあるいはアフリベルセプトなどの抗VEGF薬が第一選択薬として硝子体内投与されている。しかし、抗VEGF療法は一過性の眼圧上昇や動脈血栓塞栓事象などの副作用を有する上 (20, 21)、治療が奏功しない患者も存在することから、さらなる病態分子の同定及び新規治療薬の創出が望まれている。

こうした背景をもとにラットやマウスなどの齧歯類、イヌ及びブタを用いた実験的RVOモデルがこれまで開発されてきたが (22)、これらの動物には黄斑が無いなど解剖学的見地からヒトとは異なることが指摘されている。すなわち、黄斑を有する非ヒト霊長類を用いた実験モデルが病態解明及び薬物評価に適している。さらに、非ヒト霊長類は齧歯類と比較して前房水の採取が容易であり (Table 1)、齧歯類では困難であった、前房水から病態関連分子並びに疾患特異的マーカーの探索が可能である。また、ヒトに近い遺伝背景を有することから、抗体の親和性においてもヒトと高い交差性を示す場合が多く、抗体医薬の評価にも活用できる。また、カニクイザルなどの非ヒト霊長類は眼球も大きい (Table 1) (23, 24)、臨床で使用されている先進検査機器を用いて評価できる。現在、臨床において光干渉断層撮影 (Optical Coherence Tomography: OCT) (Fig. 6)、光干渉断層血管撮影 (OCT-angiography: OCT-A) (Fig. 7)、補償光学 (Adaptive

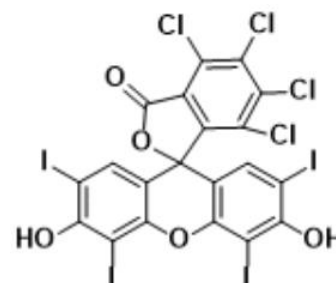
Table 1 The ocular anatomical features among commonly used preclinical animal species.

[文献 (20-23) を基に作成]

動物種	マウス	ラット	ウサギ	サル	ヒト
眼球重量	18-20 mg	0.2 g	2.6 g	3.1 g	7.5-8.0 g
眼軸長 (mm)	3.37	6.29	17.0	18.1	24.0
硝子体液量	5.3 μ L	54.4 μ L	1.3 mL	2.2 mL	5.2 mL
前眼房水量	5.90 μ L	13.6 μ L	287 μ L	123 μ L	260 μ L

Optis: AO) 眼底カメラ (Fig. 8) 及び網膜血管酸素飽和度測定カメラなどの先進検査機器が用いられており、網膜組織及び血管等を精緻に観察できる (25, 26)。つまり、同様の検査機器を用いたデータであれば、非ヒト霊長類モデルの試験成績と臨床成績を直接的に比較検討できる可能性が高い。また、先行研究として、非ヒト霊長類を用いた RVOモデルの確立を目的とした研究が行われているが、これらのモデルでは RVOの主な病態の1つである囊胞状浮腫の形成を認めず (27-29)、RVO病態を模倣できているとは言い難い。

したがって、本研究ではRVO病態をより精緻に反映できる非ヒト霊長類モデルの開発を目的とした。当研究室のこれまでの齧歯類を用いた検討から、ローズベンガル及びレーザー照射の併用により、囊胞状浮腫の形成が認められることを明らかにしている (27)。ローズベンガルは、有機増感剤であり、レーザー照射によりヒドロキノン体へと励起する。その後、励起したローズベンガルが酸素と反応することで一重項酸素が生成される。この機序により、血管に対しては、内皮細胞を障害し、結果的に血管を閉塞出来ることから、脳血管の閉塞に用いられている。本研究では、これらに基づき、カニクイザル網膜血管にお



Rose Bengal

<https://www.chem-station.com/odos/2013/01/-singlet-oxygen.html> より
改変引用

いてもローズベンガル及びレーザー照射により、血管閉塞が誘発され、その結果として嚢胞状浮腫の形成が認められるかを検討した。その後、ヒトへの外挿を念頭に、検査機器としてOCTを活用した評価を実施した。さらに本章では、黄斑浮腫及び網膜菲薄化に加え、網膜神経節細胞層、網膜神経線維層及び内網状層より構成される網膜神経節細胞複合体に対するラニビズマブの作用を検討した。現在、抗VEGF薬は黄斑浮腫の抑制を目的としてRVO患者に用いられるが、本検討によって黄斑浮腫に加え、新たな抗VEGF薬の作用が明らかになることが期待される。

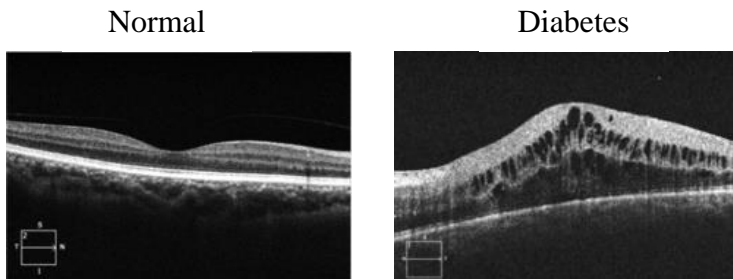


Figure 6
The typical images of the retinal edema in OCT image

(left) the normal retina
(right) the diabetic macular edema
[文献 (25) より改変引用]

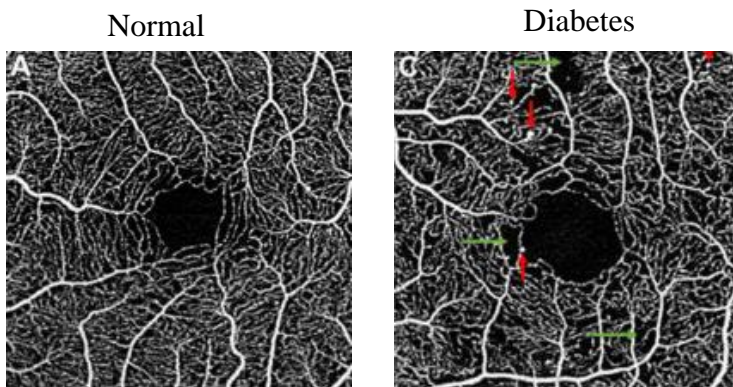


Figure 7
The typical images of the retinal vascular network in OCT-A image

red arrows; microaneurysms
green arrows; capillary nonperfusion
[文献 (26) より改変引用]

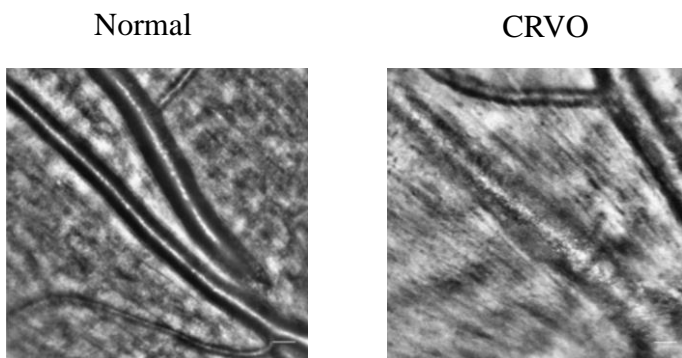


Figure 8
The typical images of the retinal vascular in Adaptive Optics retinal imaging

(left) the normal retina
(right) the central retinal vein occlusion (RVO)
[後町ら、日本医科大学医学会雑誌 2020; 16 (2)]

第2節 実験方法

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

リン酸緩衝生理食塩液 (Phosphate Buffered Saline: PBS) は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)、抗生剤 (クラビット点眼液 0.5%)、散瞳剤 (ミドリン P 点眼液)、表面麻酔剤 (ベノキシール 0.4%液) は参天製薬株式会社 (Osaka, Japan)、塩酸ケタミンは Arevipharma GmbH (Radebeul, Germany)、キシラジン塩酸塩 (セラクター 2%注射液) はバイエル薬品株式会社 (Osaka, Japan)、イソジン液 10%は Mundipharma K.K. (Tokyo, Japan)、PA・ヨード点眼・洗浄液は日本点眼薬研究所株式会社 (Aichi, Japan)、ローズベンガルは富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan)、生理食塩液は大塚製薬工場 (Tokushima, Japan)、造影剤 (フルオレサイト静注 500 mg) は日本アルコン株式会社 (Tokyo, Japan)、ペントバルビタールナトリウムは東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。ラニビズマブ (ルセンチイス硝子体内注射液 10 mg/mL) はノバルティスファーマ株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

体重 2.0~6.0 kg、2~6 年齢の雄性カニクイザル 10 頭は、株式会社新日本科学にてステンレスケージ (奥行 680 × 幅 620 × 高さ 770 mm) 内で 23~29°C、湿度 30~70 % の環境で飼育した。また、換気は 1 時間に 15 回実施した。動物は 12 時間/12 時間の明暗サイクルのもと、自由給水下に固形飼料 (HE Primate J 12G5K9J, Purina Mills, LLC) を 108 g (12 g × 9 片) /日与えた。実験動物の取り扱いは、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で決められたガイド

ラインを遵守して行った。また実験内容については、株式会社新日本科学安全性研究所の動物実験委員会により承認されており、株式会社新日本科学の動物実験規定に従って実施した。なお、試験施設は AAALAC International により認証されている。

2-2-2 カニクイザルRVOモデルの作製

ケタミン塩酸塩 (50 mg/kg) とキシラジン (2%) を 7:1 で混合した溶液を筋肉内投与 (0.2 mL/kg, 10 mg/kg) し、実験動物を麻酔下においた。網膜レーザーレンズ (セントラリスダイレクト, Volk Optical Inc.) 接眼部に特殊コンタクトレンズ角膜装着補助剤 (スコピゾル眼科用液) を適量滴下した上で、照射眼に網膜レーザーレンズを圧着し、眼底を確認後、ローズベンガル調製液を前腕の橈側皮静脈から投与し (20 mg/kg, 10 mg/mL, 2 mL/kg/min)、投与後直ちにマルチカラーレーザー光凝固装置 (MC-500, 株式会社ニデック) を用いて網膜静脈にレーザー照射を行い、視神経乳頭近傍の静脈を 2 ヶ所閉塞させた。レーザー照射条件を下表に示す (Table 2)。

モデル作製後のケアとして、照射翌日から 3 日間抗生剤 (クラビット点眼液 0.5%) を 1 日 1 回点眼投与した。

Table 2 The condition of the laser irradiation

出力 (mW)	照射時間 (sec)	スポット径 (μm)	照射回数(回/部位)
100	3	50	40

2-2-3 被験薬の硝子体内投与

Figure 9 に示すタイムコースにて溶媒投与群及び抗VEGF薬投与群に対して、それぞれ溶媒投与及び被験薬を硝子体内投与した。抗VEGF薬にはラニビズマブ (Lucentis[®]、ノバルティス ファーマ株式会社) を使用した。レーザー照射前日に、溶媒投与群及び抗VEGF薬投与群に対してそれぞれ生理食塩液及び被験薬を投与した。また、溶媒投与群に対しては生理食塩液を投与した。それぞれの投与に先立って、投与3日前より毎日1回、抗生剤 (クラビット点眼液、参天製薬株式会社) を両眼に点眼した。投与時に際しては、散瞳剤 (ミドリンP点眼液、参天製薬株式会社) を点眼し散瞳を確認後、塩酸ケタミン (Arevipharma GmbH, 50 mg/mL) を筋肉内投与 (0.2 mL/kg、10 mg/kg) した。イソジン液10% (ムンディファーマ株式会社) を浸した綿花又は滅菌ガーゼなどで使用し、投与眼の眼瞼及び眼周囲を消毒した。乾燥後、生理食塩液で4倍に希釈したPA・ヨード点眼・洗眼液 (株式会社日本点眼薬研究所) を浸した綿花で眼瞼を消毒した。その後、投与眼に対しては、表面麻酔剤 (ベノキシール 0.4%液、参天製薬株式会社) を点眼し、滅菌消毒済みの開瞼器にて眼を開き、眼球を生理食塩液で4倍希釈したPA・ヨード点眼・洗眼液で消毒・洗浄し、生理食塩液で洗い流した。実験動物を仰臥位に保持し、抗VEGF薬または溶媒をディスプレイサブル注射筒及び注射針 (30G) を用いて、角膜輪部の約2.0-3.0 mm 後方から、水晶体や水平直筋付着部位の近傍を避け6時方向から眼球の中心に向け針を刺入して硝子体内に投与した。投与後、ポータブルスリットランプ (SL-15、興和株式会社) を使用して投与眼の中間透光体について観察し、その後、抗生剤 (クラビット点眼液 0.5%) を投与眼に点眼投与した。投与翌日より毎日1回、3日間、抗生剤 (クラビット点眼液 0.5%) を点眼投与した。なお、実験動物が覚醒するまで、体位は右側臥位に保持した。

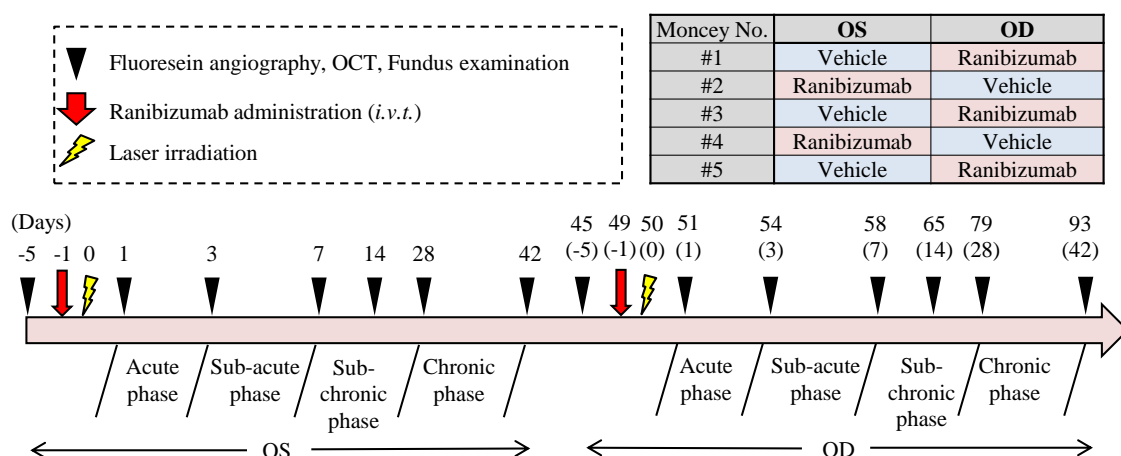


Figure 9 Time course for experimental procedures including laser irradiation, intravitreal ranibizumab (IVR) injections, fluorescein angiography (FA), optical coherence tomography (OCT), and fundus examinations in cynomolgus monkeys.

The retinal vein occlusion (RVO) was created by laser irradiation with rose bengal. The vehicle and IVR injections were performed 1 day before the laser irradiation in the vehicle- and ranibizumab-treated groups. In both groups, FA and OCT imaging, and fundus examinations were performed at 5 days before and 1, 3, 7, 14, 28, and 42 days after the laser irradiation. The data obtained at -5 days was used as the normal values. The experiments were performed as crossover trials with the experiment on the left eyes performed before that on the right eyes. The experimental groups for the left and right eyes are shown in the upper right Table.

2-2-4 眼底画像及び光干渉断層画像 (optical coherence tomography: OCT) 並びに蛍光眼底造影

麻酔及び散瞳を施した後、蛍光眼底造影 (Fluorescein angiography: FA)、OCT 画像撮影及び眼底観察を Fig. 9 に示すように実施した。FA においては、造影剤 (フルオレサイト静注 500 mg、日本アルコン株式会社) をディスポーサブル注射筒及び留置針を用いて、前腕の橈側皮静脈から投与 (0.1 mg/kg、0.1 mL/s) した。造影剤投与直後から 30 秒まで連続して、レーザー照射部位周囲を撮影し、その後約 30 秒、1、3 及び 5 分後に眼底カメラ (VX-10α、興和株式会社) を用いて黄斑周囲とレーザー照射部位の 2 ヶ所を撮影した。得られた蛍光眼底画像におけ

る血管外漏出及び無灌流領域に対する作用を評価した。

OCT 画像の解析については、analySIS software (Soft Imaging System GmbH) を用いて、網膜厚を評価した。浮腫面積や網膜中心窩厚は、内境界膜から網膜色素上皮層に至る面積及び厚みを Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) により測定することで算出した。網膜神経節細胞層複合体 (Ganglion Cell Layer complex: GCL complex) の面積は、網膜神経節細胞層と内網状層 (Inner plexiform layer: IPL) との合計面積によって定義した (Fig. 10)。網膜体積は Heidelberg Spectralis[®]の画像処理アルゴリズムに基づき算出し、Fig. 11 に示す様に網膜を A-I の領域に分割し、各領域別に取得した体積和を評価することにより算出した。

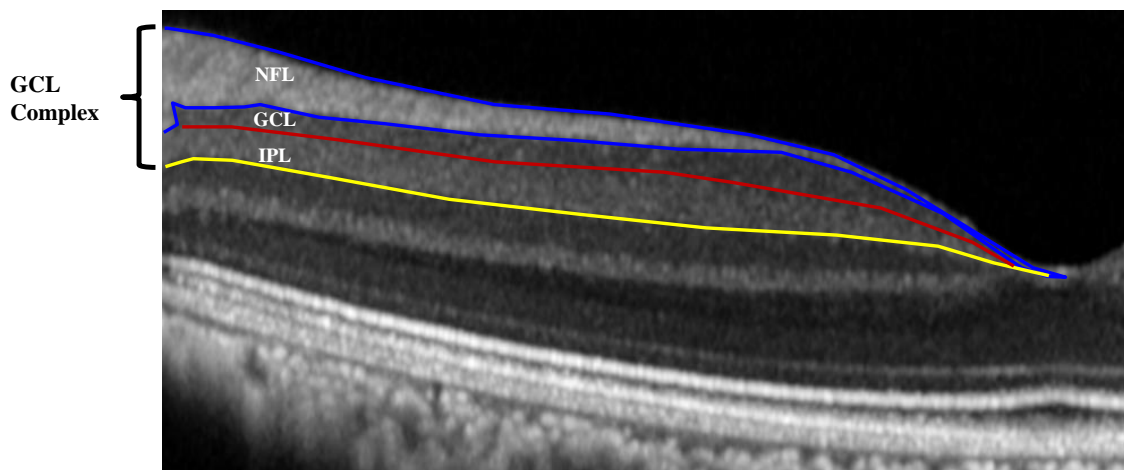


Figure 10 The imaging of GCL complex in the retina of cynomolgus monkey.

The ganglion cell complex layer (GCL) consists of the three inner-most layers of the retina: nerve fibre layer (NFL), ganglion cell layer (GCL), and inner plexiform layer (IPL).

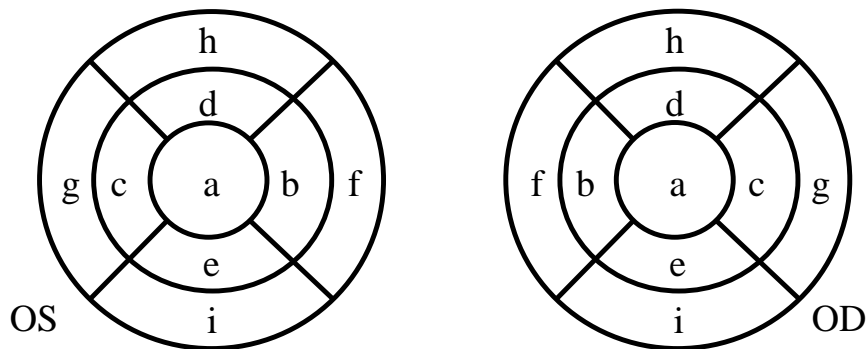


Figure 11 The retinal area divided by OCT map

2-3 統計処理

実験結果はすべて平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な解析は Statistical Package for the Social Science 15.0J for Windows software (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて行った Student's *t*-test、paired *t*-test (一方向への変動が予測される場合は片側検定、両方向への変動が予測される場合は両側検定を使用した) または Mann-Whitney *U*-test を用いて検討を行った。また、相関解析については、Pearsonの相関解析により実施した。危険率が5%未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 持続的な網膜静脈閉塞モデルの確立

齧歯類を用いたRVOモデルを参考に (27-31)、カニクイザルを用いてローズベンガル静脈投与後のレーザー照射により、持続的な網膜静脈閉塞が観察されるかを検討した。ローズベンガル投与群においては、持続的な網膜静脈の閉塞に加え、網膜内に嚢胞状浮腫を認めた (Fig. 12A)。一方、ローズベンガル非投与群においては、一過性の血管閉塞は認められたものの、浮腫は認められなかった (Fig. 12B)。

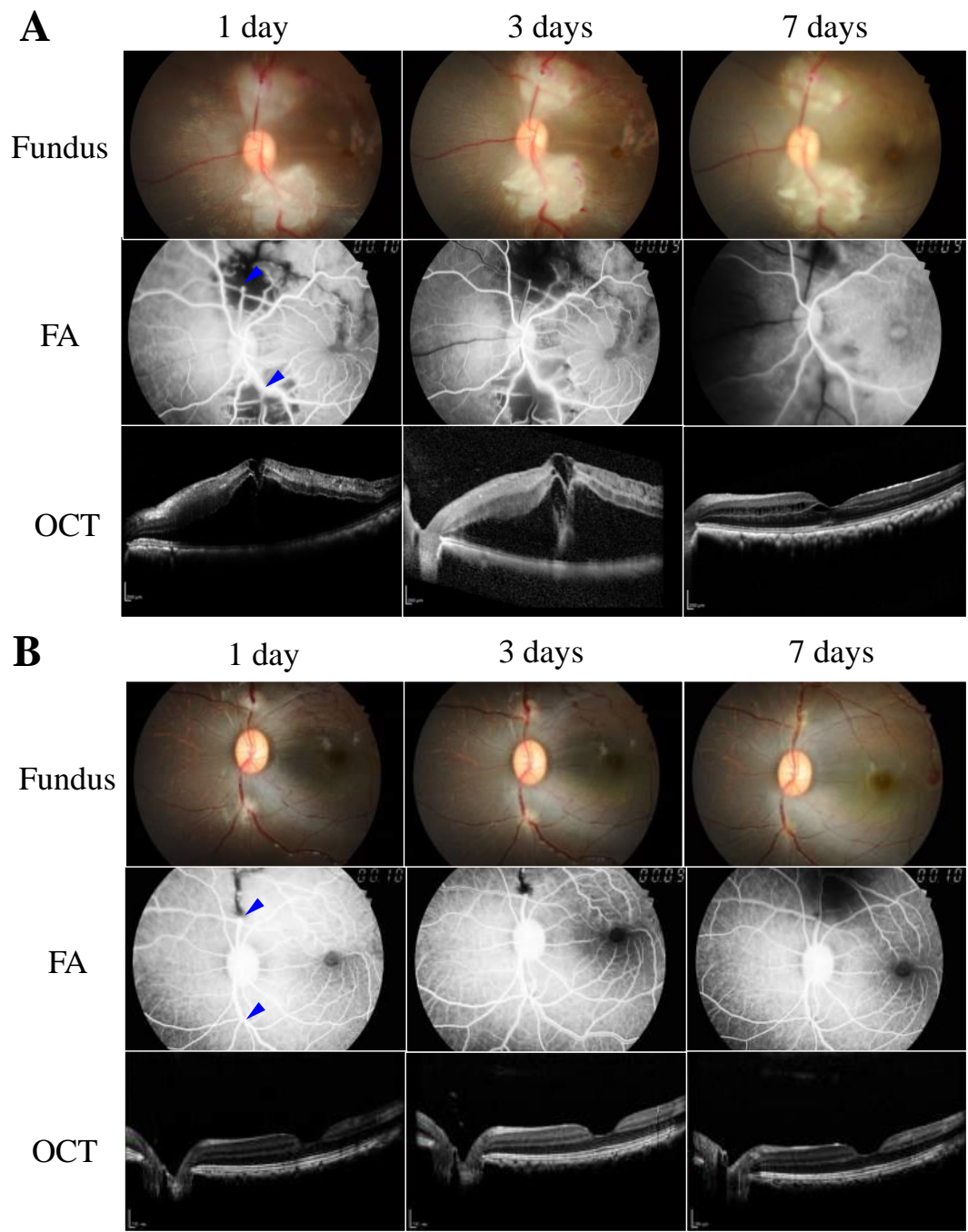


Figure 12 Evidence that rose bengal plays an important role in the creation of an RVO that resembles that of human eyes with RVO.

Typical FA (upper panel) and OCT (lower panel) images at 1-7 days by the same power laser irradiation with rose bengal (A) or without rose bengal (B). As shown, edema was not observed without rose bengal (lower panels) of Figure 2B. However, temporal vascular occlusions occurred. Arrowheads show the spot of laser irradiation.

3-2 RVO 病態急性期及び亜急性期における血管漏出に対するラニビズマブの作用

今回確立したカニクイザルRVOモデルを用いて、臨床の病態及び薬物効果を検証するために血管漏出が認められるか、また、それはラニビズマブの投与によって抑制されるかについて検討した。血管閉塞 1、3 及び 7 日後において、ラニビズマブ投与群では血管閉塞 1 日後及び 3 日後と比較して、7 日後では血管漏出が有意に抑制されたが、溶媒投与群ではそれらは抑制されなかった (Fig. 13A-G)。

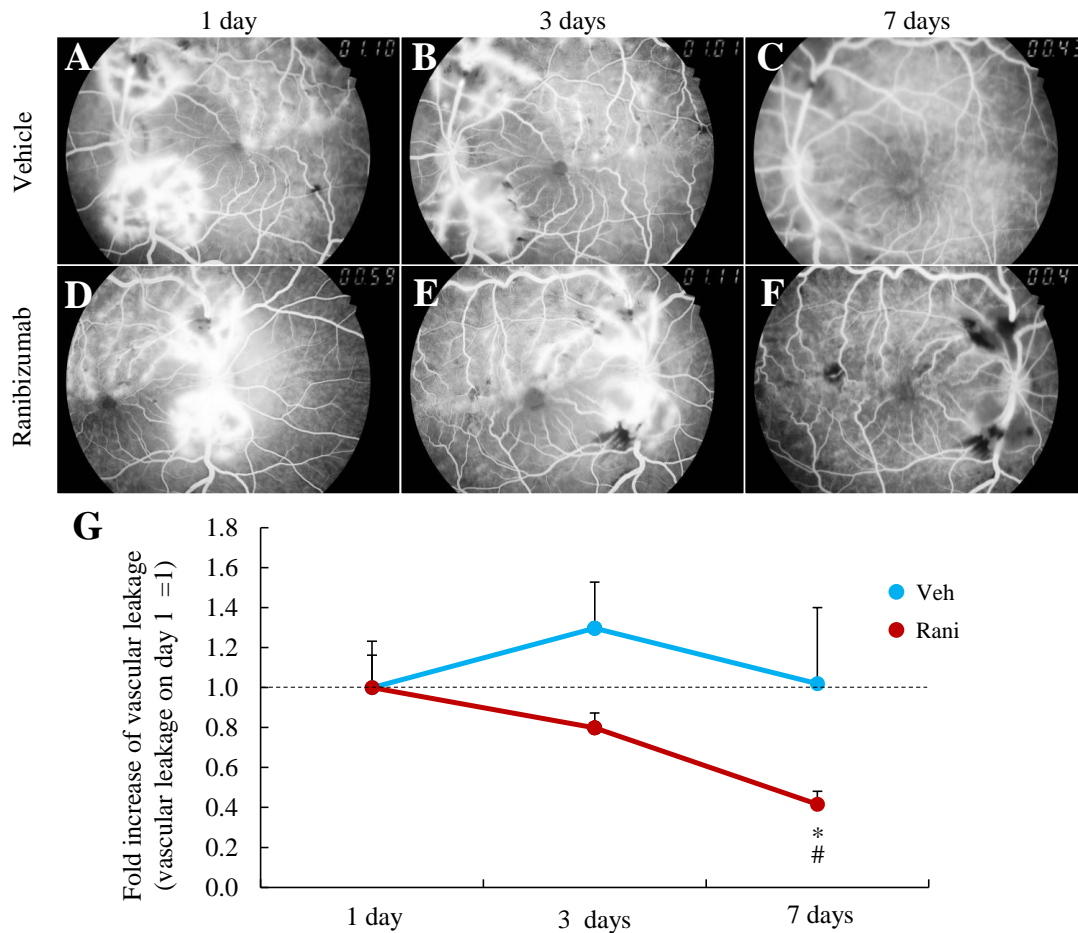
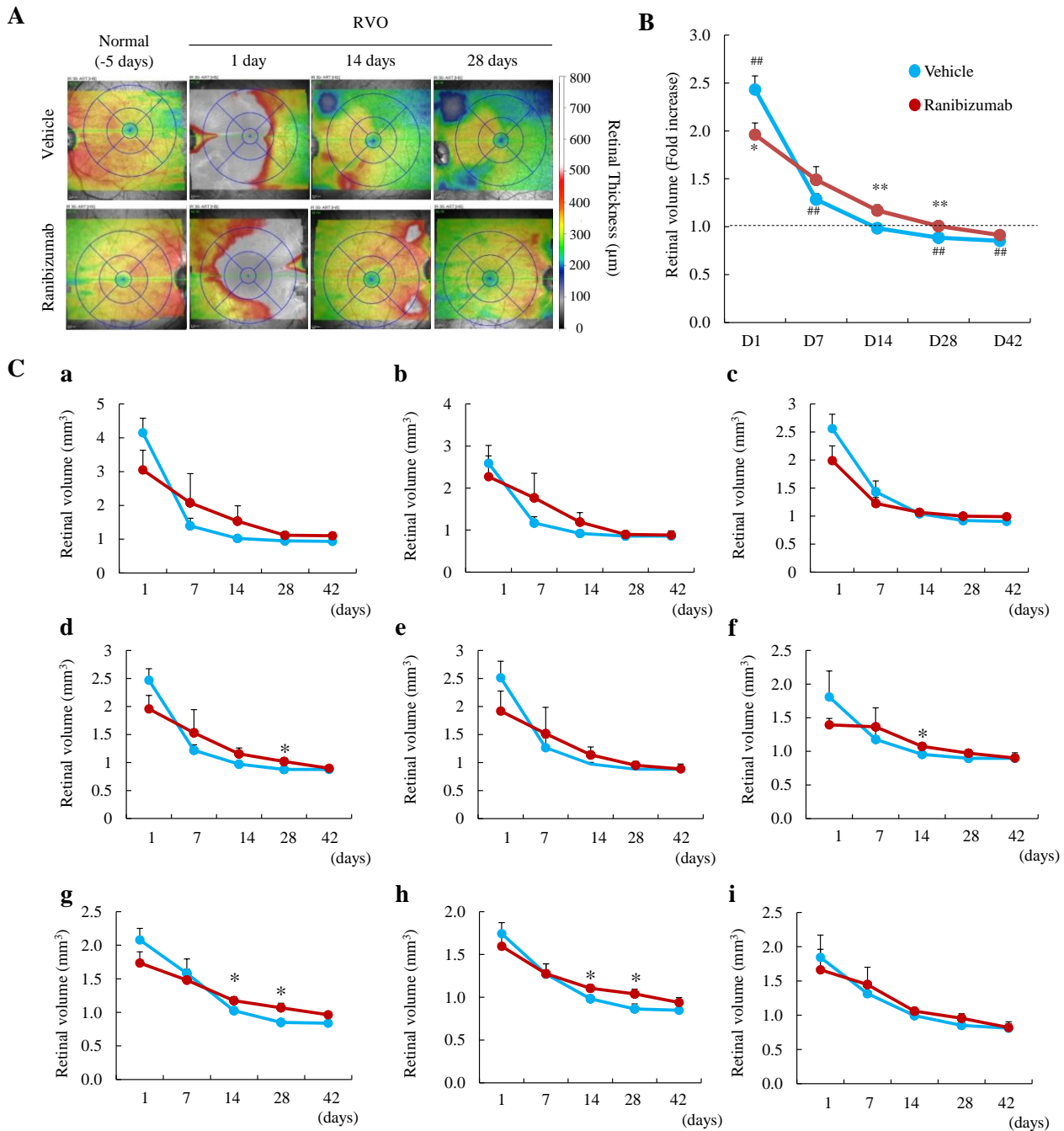


Figure 13 Vascular leakage in RVO model of cynomolgus monkey and the effect of ranibizumab.

A: to F: FA images at 1 day (left panel), 3 days (middle panel), and 7 days (right panel). All images were recorded at about 1 minute after the fluorescein injection. Upper figures show the vehicle-treated group, lower figures show the ranibizumab injected group. A': to F': Fundus images at 1 day (left panels), 3 days (middle panels), and 7 days (right panels). Upper figures show vehicle-treated group and lower figure shows ranibizumab-injected group. G: Quantitative data of the vascular leaked area. The means at the baseline (1.0) of the vascular leaked area on day 1 after the laser irradiation. Data are the means \pm SEMs (n = 5). * $P < 0.05$ versus vascular leakage on day 1, # $P < 0.05$ versus vascular leakage at day 3 (paired t -tests, two-tailed test).

3-3 OCT map を用いた網膜体積に対するラニビズマブの作用の評価

RVO 患者の網膜では、浮腫の形成による体積の増加が認められる (32)。そこで、網膜血管閉塞を施したカニクイザル網膜においても、これらの表現型が観察されるかを検討した。その結果、正常網膜と比較して溶媒投与群では血管閉塞 1 日後 (2.43 ± 0.14 倍) 及び 7 日後 (1.31 ± 0.05 倍) において有意に網膜体積が増加した (Fig. 14B; Vehicle、D1 及び D7)。また、血管閉塞 14 日後においては、網膜体積は正常網膜と同等まで回復した一方で、血管閉塞 28 日後 (0.89 ± 0.05 倍) 及び 42 日後 (0.87 ± 0.03 倍) においては網膜体積が有意に減少したことから、溶媒投与群では網膜菲薄化が経時的に進行することが示唆された (Fig. 14B; Vehicle、D28 及び D42)。一方、溶媒投与群と比較して、ラニビズマブ投与群における網膜体積は、血管閉塞 1 日後 (1.96 ± 0.12 倍) 及び 7 日後 (1.52 ± 0.14 倍) では、その増加が有意に抑制された (Fig. 14B; ラニビズマブ、D1 及び D7)。また、血管閉塞 28 日後 (1.01 ± 0.02 倍) においてはラニビズマブ投与群において網膜体積の減少が抑制されたが、42 日後 (0.94 ± 0.02 倍) においては正常網膜と同等であった (Fig. 14B; ラニビズマブ、D28 及び D42)。これらの結果は、Fig. 14C に示す 8 ヶ所に分割された OCT map の各領域 (a-i) においても確認された (Fig. 14C: a-i)。



3-4 血管閉塞後の網膜浮腫の変化及びラニビズマブの作用

網膜中心窩の OCT 画像を用いて浮腫に対するラニビズマブの作用を評価した。血管閉塞 1 日後 (acute phase)、溶媒投与群とラニビズマブ投与群では中心窩においていずれも浮腫を認めたが、7 日後 (sub-acute phase) にはそれらは消失していた (Fig. 15A-D)。また、網膜体積と中心窩における浮腫の面積とは正の相関を示した ($r=0.540$ 、 $p < 0.01$) (Fig. 15E)。浮腫の最大丈と網膜体積との間においても、正の相関を認めた ($r = 0.691$ 、 $p < 0.01$) (Fig. 15F)。中心窩における浮腫の減少面積は溶媒投与群 ($2.75 \pm 0.23 \text{ mm}^2$) と比較して、ラニビズマブ投与群 ($3.88 \pm 0.50 \text{ mm}^2$) では有意に高値を示した (Fig. 15G)。これらの結果は、ラニビズマブの投与により血管透過性亢進の抑制を介して網膜体積が減少したことを示唆するものである。

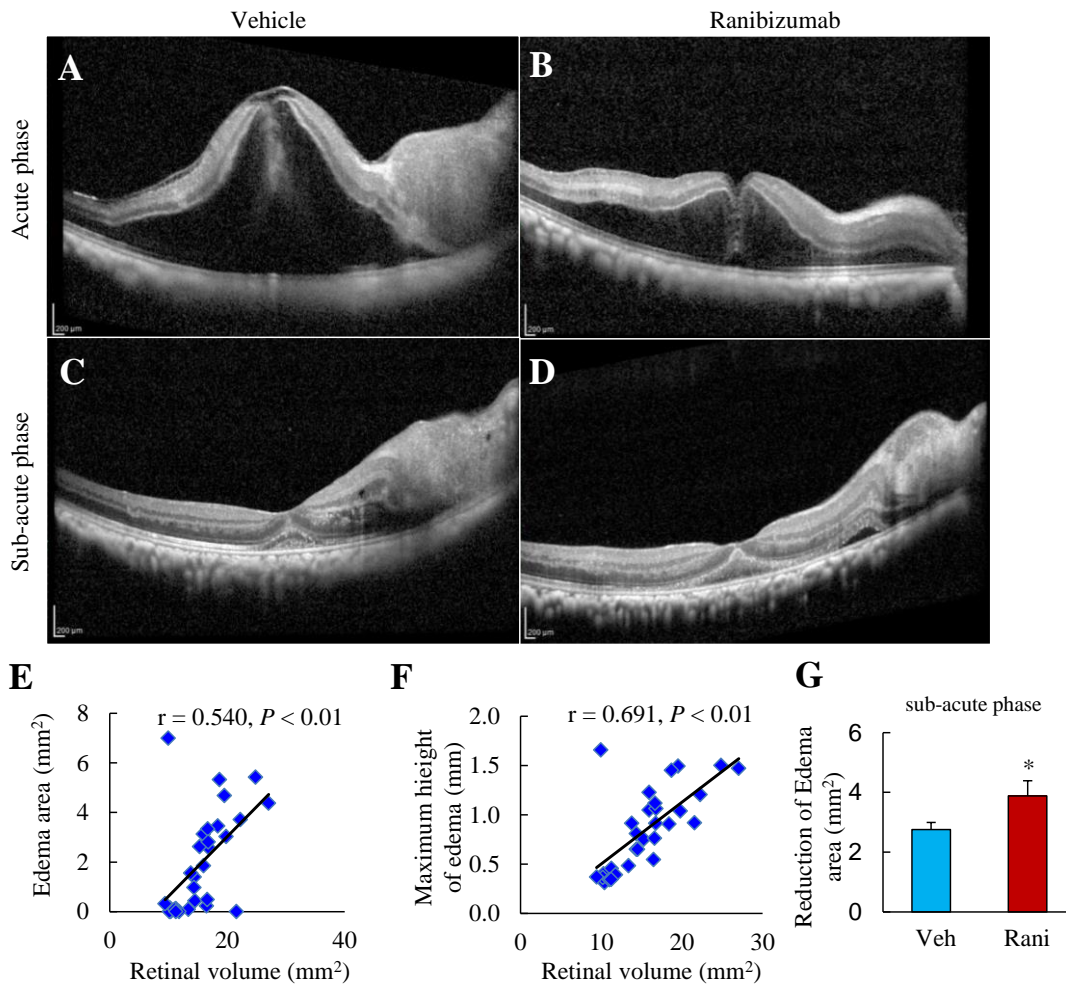


Figure 15 Changes in retinal edema after RVO and the effect of IVR.

A: Typical images of vehicle- and ranibizumab-treated group determined by OCT at acute-phase and sub-acute phase after the laser irradiation. B: Sequential quantitative data of the retinal volume. Blue graph shows vehicle-treated group and red graph shows ranibizumab-injected group. The volume was increased at 1 and 7 days but the volume was smaller at 28-42 days in the vehicle-treated group. The IVR injection reduced the retinal volume at 1-7 days and increased the volume at 14-28 days compared with the vehicle-treated group. Data are the means \pm SEMs. $^{##}P < 0.01$ versus normal retinal volume. (paired t -tests, two-tailed test) $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$ versus vehicle-treated group. (Student's t -tests, two-tailed test)

3-5 網膜神経節細胞複合体 [Ganglion cell layer Complex (GCL Complex)] 及び中心窩厚に対するラニビズマブの作用

網膜血管閉塞後における GCL Complex 及び中心窩の菲薄化に対するラニビズマブの作用を検討した。GCL Complex は、Fig. 11 に示したように中心窩を境として鼻側、耳側及びそれらの合計面積をそれぞれ算出した。溶媒投与群においては、血管閉塞 28 日後及び 42 日後で GCL complex の菲薄化が観察された (Fig. 16A、C、E)。ラニビズマブ投与群においては、これらの菲薄化が軽減される傾向が認められた (Fig. 16B、D、F)。GCL Complex の耳側及び鼻側の合計面積については、血管閉塞 28 日後及び 42 日後では、溶媒投与群と比較してラニビズマブ投与群ではその減少が抑制された (Fig. 16G 及び 16J)。次に、鼻側 GCL Complex の面積についても解析を行った。血管閉塞 28 日後及び 42 日後においては、上記の合計面積と同様に溶媒投与群と比較して、ラニビズマブ投与群においては GCL Complex の面積の減少は抑制された (Fig. 16H)。一方、血管閉塞 28 日後及び 42 日後における耳側の GCL Complex の面積については、溶媒投与群とラニビズマブ投与群との間で有意な差は認められなかった。次に、血管閉塞 42 日後における中心窩厚について評価を行ったところ、溶媒投与群 ($197 \pm 12.0 \mu\text{m}$) に比較して、ラニビズマブ投与群 ($254 \pm 23.9 \mu\text{m}$) では、中心窩厚の減少が抑制された (Fig. 16M)。また、血管閉塞 42 日後における溶媒投与群では、血管閉塞前の正常網膜と比較して $60.0 \pm 3.92\%$ の中心窩厚となったが、ラニビズマブ投与群においては $75.8 \pm 4.60\%$ であり溶媒投与群と比較して中心窩厚の減少は抑制された (Fig. 16N)。

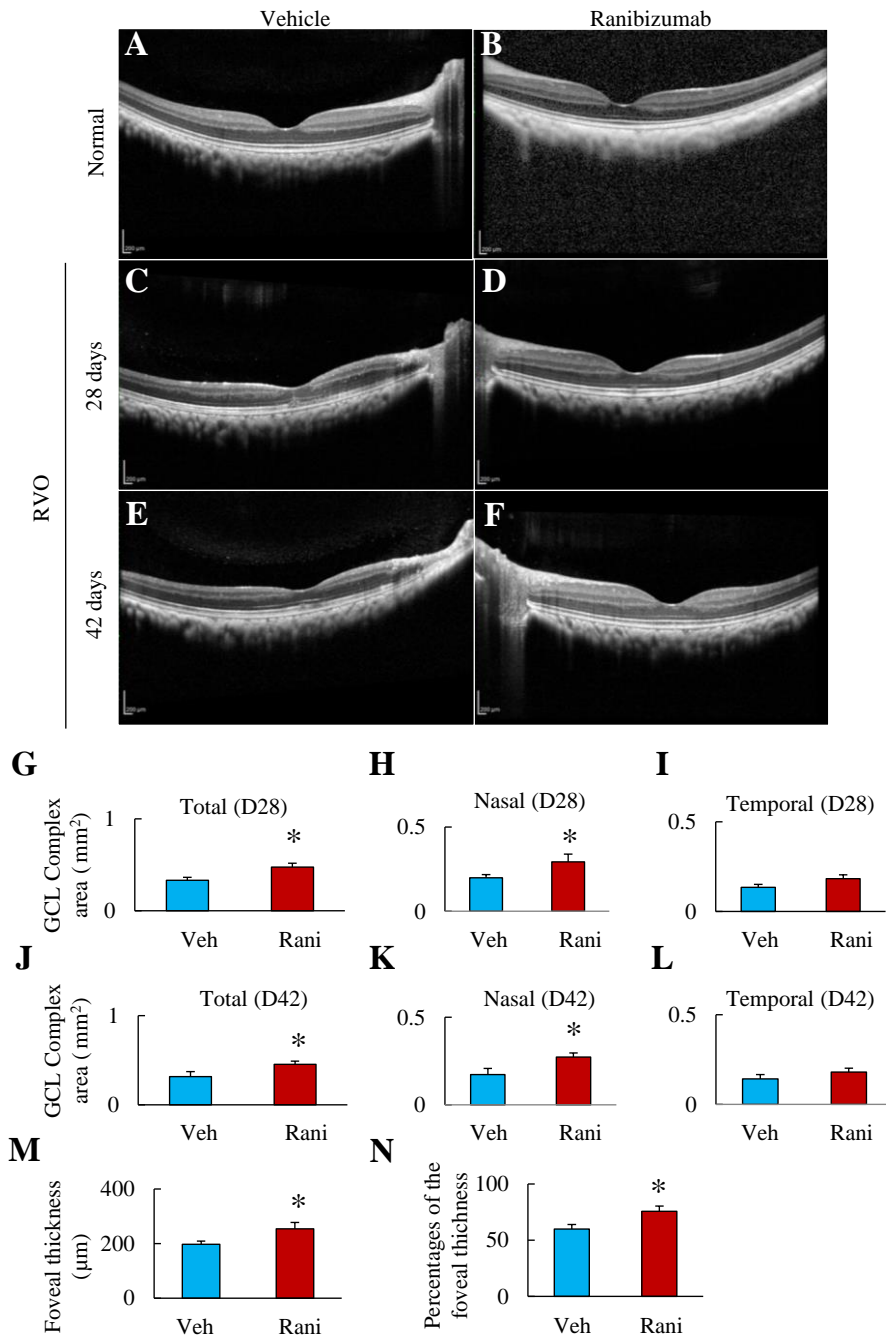


Figure 16 Effect of IVR on retinal thickness in the chronic phase.

A: and B: Typical OCT images in normal group (at -5 days). C: and D: Typical OCT images in the vehicle- and ranibizumab-treated group at 28 days. E: and F: Typical OCT images in the vehicle- and ranibizumab-treated group at 42 days. G: Quantitative data of the total GCL complex area at 28 days. H: Quantitative data of the nasal GCL complex area at 28 days. I: Quantitative data of GCL complex area on temporal ear side at 28 days. J: Quantitative data of the total GCL complex area at 42 days. K: Quantitative data of the nasal GCL complex area at 42 days. L: Quantitative data of GCL complex area on the temporal side at 42 days. M: Quantitative data of the foveal thickness at 42 days. N: Percentages of the foveal thickness relative to that of normal retina. Data of G-N are the means \pm SEMs (n = 5). * $P < 0.05$ versus vehicle-treated group. (Student's t -test, one-tailed test)

3-6 中心窩無血管領域 (Foveal avascular zone: FAZ) に対する Ranibizumab の作用

GCL Complex をはじめとする神経網膜の機能維持において、血流は重要な役割を担う。中心窩の血流量は FAZ を制御し、網膜静脈閉塞症において FAZ は拡大することが知られる (33)、本検討では、血管閉塞 28 日後及び 42 日後の FAZ の面積を測定した (Fig. 17A-D)。溶媒投与群 ($1.01 \pm 0.12 \text{ mm}^2$) に比較してラニビズマブ投与群 ($0.66 \pm 0.15 \text{ mm}^2$) では FAZ 面積は減少し (Fig. 17E)、血管閉塞 28 日後及び 42 日後における GCL Complex と FAZ 面積との相関解析を実施した。鼻側 GCL Complex 及び FAZ 面積は負の相関関係にあった ($r = -0.630, P < 0.01$) (Fig. 17F)。一方、耳側 GCL Complex と FAZ 面積の間には相関関係は認められなかった (Fig. 17G)。

28 days

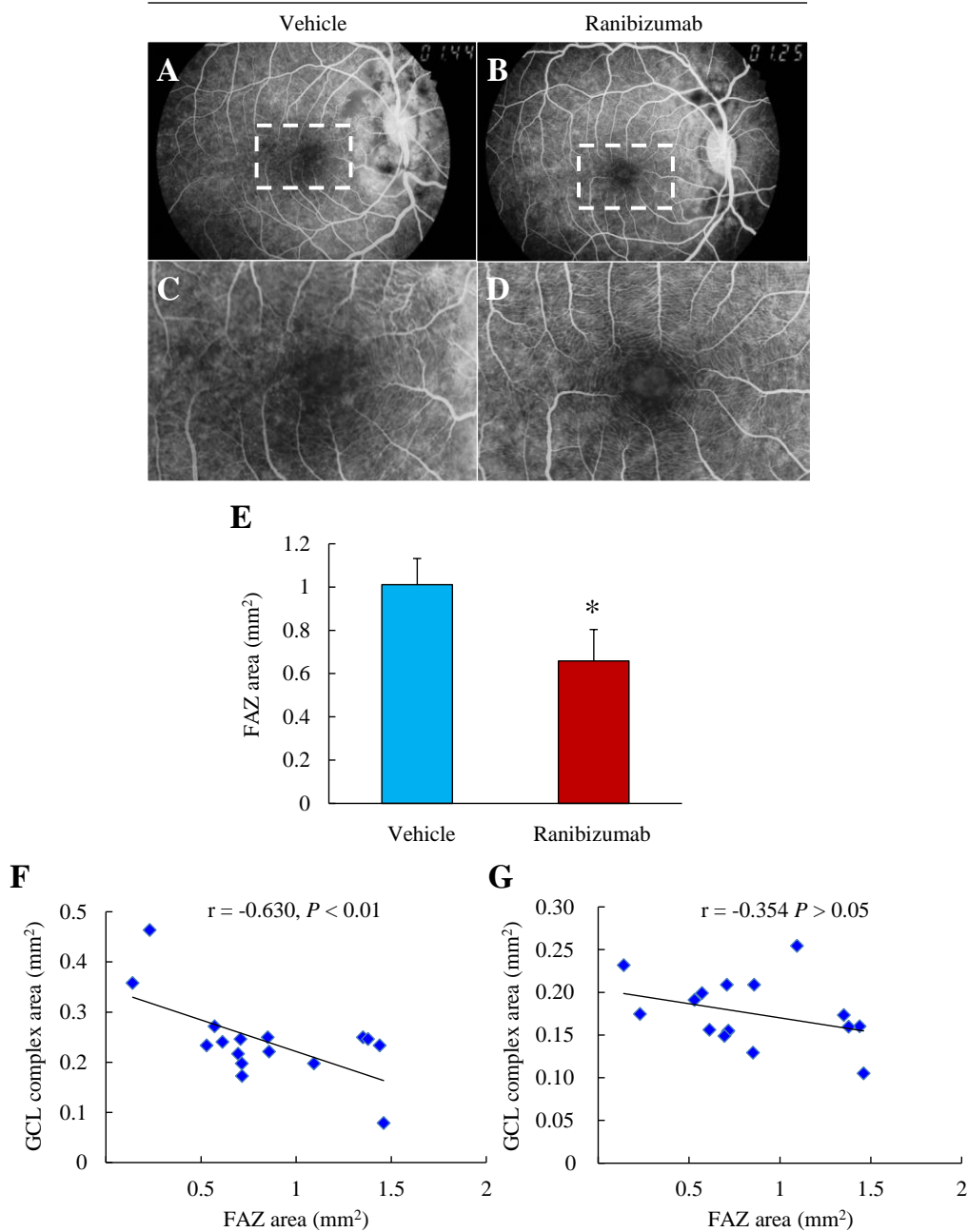


Figure 17 Effects of IVR injection on the area of foveal avascular zone (FAZ).

A: and B: Typical images of vehicle- and IVR-injected groups at 28 days. C: and D: Magnified images of the FAZ in dashed area of Figures 5A and 5B. E: Quantitative data of FAZ area at chronic phase (28 and 42 days). Data are the means \pm SEMs. (n = 8) * $P < 0.05$ versus vehicle-treated group. (Student's *t*-test, one-tailed test) F: Pearson's coefficient of correlation analysis of the area of the nasal GCL complex and the area of the FAZ at chronic phase (28 and 42 days) ($r = -0.630, P < 0.01, n = 16$). G: Pearson's coefficient of correlation analysis of the GCL complex area on the temporal side and FAZ area at chronic phase (28 and 42 days) ($r = -0.354, P > 0.05, n = 16$)

第4節 考察

網膜静脈閉塞症 (RVO) 患者では、閉塞血管からの漏出による嚢胞状浮腫が認められる (34)。本検討では、カニクイザルを用いてローズベンガルを静脈投与後、直ちにレーザー照射を行うことで、血管閉塞が生じ、閉塞血管からの漏出による嚢胞状浮腫の形成が認められた。この一連の所見は、臨床における RVO の所見と一致することから、カニクイザル実験的 RVO モデルの確立に成功したといえる。また、抗 VEGF 薬であるラニビズマブの投与は、ローズベンガル及びレーザー照射の併用による血管閉塞の前日に行った。ローズベンガルの血中半減期は 5-16 分である一方、ラニビズマブの眼内半減期は 9 日程度であることから、ローズベンガルが血管閉塞後の網膜やラニビズマブの作用に及ぼす影響は基本的には少ないと推察する。なお、今回の検討では薬効を検出しやすくすることを目的として、血管閉塞前日にラニビズマブを投与した。しかし、今後、ラニビズマブの血管閉塞後における投与も実施し、ラニビズマブが薬効を示すか検討することでより臨床に近い薬効評価モデルを確立することが重要である。

本章では、レーザー照射時にローズベンガルを併用することによって血管閉塞を誘発したが、これらの併用により以下 2 つの利点が挙げられる。1 点目として、低出力のレーザー照射条件で網膜血管閉塞を作製出来る点である。一般に、高出力のレーザー照射条件では網膜血管で出血する症例が散見されるが (35)、ローズベンガルを投与することで低出力のレーザー照射により網膜血管を閉塞できるため、出血する確率は低く、眼底検査等の評価を実施しやすい。さらに 2 点目として、嚢胞状の浮腫を惹起させることが出来る点である。ローズベンガルを併用せず、レーザー照射のみを実施したカニクイザル網膜では一過性に網膜血管が閉塞されたが、浮腫は形成されなかった (Fig. 12)。ローズベンガルは有機増感剤の 1 つであり、光照射により基底状態である三重項状態の酸素分子

より一重項酸素を生成する (36)。したがって、血管内皮細胞に集積したローズベンガルは、レーザー照射により生成した一重項酸素によって血管内皮細胞を障害し、血管閉塞を引き起こすと考えられる (37)。

さらに、カニクイザル RVO モデルを用いて、ラニビズマブの血管閉塞後の浮腫、網膜菲薄化及び中心窩無血管帯 (FAZ) に対する作用を検討した。臨床においては、ラニビズマブの血管漏出抑制作用が認められているが (38)、本検討によりラニビズマブの新たな作用を同定できる可能性がある。実際、サル RVO モデルの浮腫、網膜体積、GCL Complex 及びFAZ に対するラニビズマブの作用について下記の知見を得た。まず、ラニビズマブにより血管漏出 (Fig. 13) 並びに網膜体積の悪化は抑制された (Fig. 14B)。また、血管閉塞 28 日後の網膜体積は、溶媒投与群では血管閉塞前の正常網膜よりも減少した一方、ラニビズマブ投与群では正常網膜と同等であった (Fig. 14B)。これらの要因として、下記 2 点が考えられる。中心窩における嚢胞状の浮腫面積と網膜体積が正の相関を示したことから (Fig. 16E)、ラニビズマブは嚢胞状の浮腫を抑制したことが挙げられる。

浮腫は、血管より漏出した血漿成分により形成され、その血漿成分には炎症性サイトカインが含まれることから (39, 40)、浮腫を早期に抑制することが、RVO 病態末期の網膜菲薄化を抑制し得ることが示唆された。特に、ラニビズマブは視力の維持を担うとされる網膜神経節細胞複合体 (GCL Complex) の菲薄化抑制効果を示したことから (Fig. 17G 及び 17J) (41, 42)、GCL Complex は浮腫に含有される漿液性成分に対して脆弱である網膜層の 1 つであることが示唆される。実際、黄斑浮腫を有する RVO 患者の硝子体液中では、網膜神経節細胞に対して細胞死を誘導するインターロイキン-6 や腫瘍壊死因子 (Tumour necrosis factor)- α などが含まれていることから (43)、GCL Complex の菲薄化を抑制する観点で浮腫を早期に抑制することが重要であると考えられる。

今後、サル RVO モデルにおける GCL Complex 以外にも各網膜層を評価し、抗 VEGF 薬による菲薄化抑制効果が認められない網膜層を同定することで、抗 VEGF 薬投与によっても視力が回復しない患者の病態解明に繋がる可能性がある。また、ラニビズマブは、FAZ 面積の拡大に対する抑制効果 (Fig. 17E) を示し、GCL Complex 及び FAZ 面積における負の相関が見出された (Fig. 17F)。黄斑部の毛細血管密度の減少やその閉塞により FAZ 面積は拡大し、この増加は RVO 患者の視機能低下と相関することが報告されている (44-46)。また、抗 VEGF 療法を受けた RVO 患者の内、視力改善が乏しい症例では黄斑部血管密度は有意に減少する (46)。したがって、FAZ は RVO 病態の予後予測に関する重要な指標となり得ることが示唆された。この様に、OCT を用いた GCL Complex を始めとする各網膜層の解析及び FAZ に対する評価は、臨床では評価項目として用いられている。一方、齧歯類を用いた基礎研究では、網膜層及び FAZ を精緻に観察することが困難であった。本研究では、サルを用いたことにより、上記評価項目に基づき RVO 病態並びに薬剤の評価が可能となったことから、本モデルはトランスレーショナル研究に有用であるといえる。

本研究で得られた新しい知見は以下の 3 点である。①ローズベンガルを併用することにより、低出力のレーザー照射条件で出血させることなく網膜血管を閉塞させることが可能である。②カニクイザル RVO モデルにおいて、ラニビズマブは急性期では血管漏出を抑制し、慢性期では GCL Complex 面積の減少を抑制し及び網膜体積の悪化を抑制した。③FAZ は GCL Complex と負の相関を示したことから、FAZ の拡大は視力低下に関与することが示唆された。

本検討により、ラニビズマブは RVO 病態を改善したことから、カニクイザル RVO モデルにおいても VEGF は極めて重要な病態分子であることが示唆された。しかし、臨床では抗 VEGF 薬の投与によっても浮腫が抑制できない症例が存在することや

(47)、本モデルにおいてラニビズマブが血管閉塞 42 日後における網膜体積及び耳側GCL Complex面積に対する治療効果を示さなかった点を考慮すると、VEGF以外の新たな病態責任分子の同定及び治療ターゲットの創出が必要と考える。したがって、第3章ではこれらの課題を解決するために、確立したサルRVOモデルより前房水を採取し、サイトカイン及び成長因子の発現解析を実施した。

第2章 カニクイザル脈絡膜血管新生モデルの確立

第1節 緒言

滲出型加齢黄斑変性では、網膜下に存在する脈絡膜より新生血管が生じる。こうした新生血管は脆弱性が高く、漿液が漏出することにより浮腫が生じ、視力低下をもたらす (48)。この様な新生血管や浮腫に対して抗VEGF薬が抑制効果を示す (48)。しかし、抗VEGF療法が適切に実施されなかった場合、新生血管及び出血が生じ、5文字以上の視力低下といった症状が再発することから、臨床研究では最適な治療レジメンが模索されてきた。現在、本疾患に対する抗VEGF薬の主な治療レジメンは、毎月1回の固定投与であるが、患者や保健行政に対する抗VEGF薬のコスト削減に向けて随時投与 (pro re nata: PRN) 法が実施されている。PRN法は、初回3回の毎月投与後、毎月の定期健診の際に症状の再発が認められた際など必要に応じて、抗VEGF薬を硝子体内投与するものである (49)。PrONTO Studyでは、毎月投与及びPRN法による抗VEGF薬の投与による視力改善効果は同等であったことが報告されたことから、現在では本邦でも多くの施設で再治療の基準となっている (50, 51)。その一方、さらなる抗VEGF薬に要する医療費の削減や患者個別化医療の推進に向けて、Treat and Extend (T&E) 法も近年実施されている。T&E法は、再発予防を目的として実施される方法であり、患者ごとに最適な抗VEGF薬の投与間隔を探索するものである。具体的には、導入期毎月3回の投与後に、投与間隔を最大12週まで広げ、再発時に投与間隔を縮小して実施する (52)。PRN法と比較して、T&E法は、視力を維持しやすいことが示唆されているだけでなく (53)、必要最低限の投薬で済むことから、患者が負担する医療費を抑制することにも繋がる。しかし、臨床研究だけでは予防投与と治療投与に関して、視機能や網脈絡膜組織に及ぼす影響を詳細に検討することは難しい。そのため、病理組織学的並びに分子生物学的アプローチ

が可能なモデル動物を用いた検討が必要である。

さらに、滲出型加齢黄斑変性における現状の課題として、線維瘢痕組織への対応が挙げられる。抗VEGF療法を続けても、治療前の視力を維持できるのは平均で約7年程度であることが分かっている (54)。その要因の1つとして、加齢黄斑変性の増悪期に見られる脈絡膜血管新生 (Choroidal Neovascularization: CNV) に伴う出血や浮腫により網脈絡膜組織が障害され、結果的に線維瘢痕化が進むことが有力視されている (55)。黄斑の組織が線維化・瘢痕化すると不可逆的な視力低下を招き、現時点では視力を改善させる有効な治療法がない (55)。そのため増悪期に対するVEGF 以外の分子を標的とする治療法の開発、さらには瘢痕期への移行を防ぐ治療法の開発は临床上重要な課題である。

滲出型加齢黄斑変性の実験的動物モデルの1つにレーザー誘発CNVモデルがある。本モデルは、レーザー照射により網膜と脈絡膜との間に存在するブルッフ膜を破壊することによって、脈絡膜血管新生を

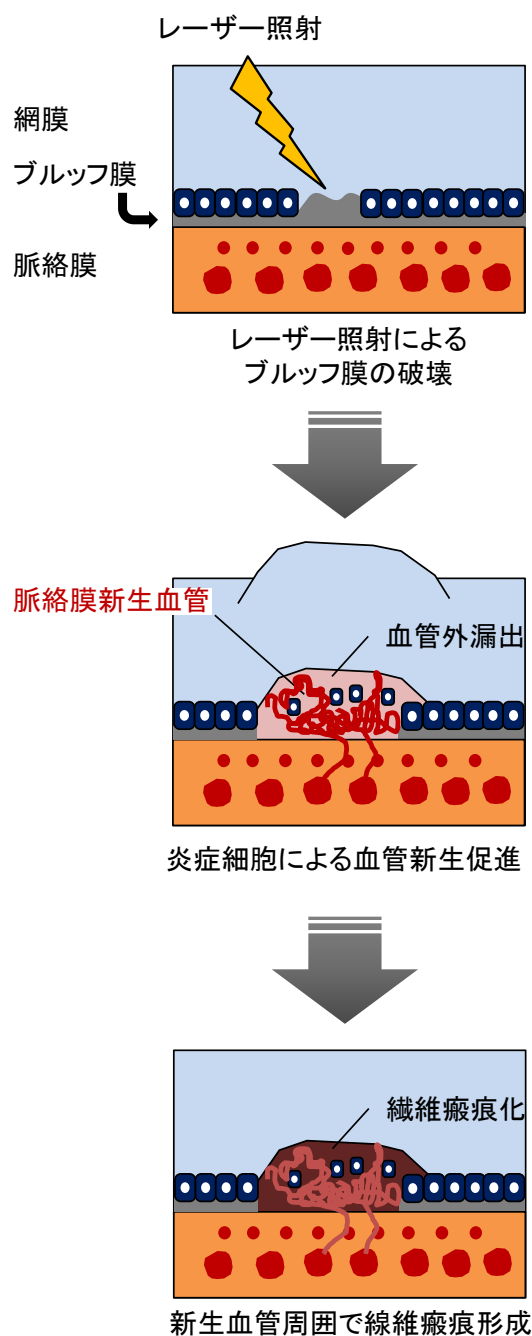


Figure 18 The progression of the neovascularization and fibrosis in the laser induced CNV model

誘発させるものであり (56)、慢性期では新生血管及びその周辺の組織が線維化することが報告されている (57) (Fig. 18)。滲出型加齢黄斑変性の病態を考慮した際、齧歯類と比較し、カニクイザルを用いた病態モデルの意義としては次が挙げられる。齧歯類では、網膜血管が視神経乳頭より放射状に網膜周辺部に伸長しているが、カニクイザルではヒトと同様に視神経乳頭より伸長した血管は、黄斑周囲を走行するようにして放射状に伸長しており、黄斑部の中心領域には網膜血管が存在しない (17) (Fig. 5)。一方、滲出型加齢黄斑変性では、本来、血管が存在しない黄斑部に生じた脈絡膜新生血管によって黄斑部が徐々に変性するため、中心視野が障害される。すなわち、黄斑部に網膜血管が存在しないカニクイザルをモデルとして用いることで、滲出型加齢黄斑変性の病態である脈絡膜血管新生による黄斑部への影響をより正確に再現することができる。したがって、滲出型加齢黄斑変性の病態解明及び被験薬の評価を行う上で、黄斑は病態の発症及び視覚機能に最も重要な部位であるため、黄斑部が存在しない齧歯類のみを用いて得られた知見をそのままヒトへ外挿することは困難である。また、抗VEGF療法を受けた長期経過症例のうち、治療後2年以内に約半数の症例で網膜色素上皮近傍に線維性瘢痕を生じ、それにより網膜色素上皮の機能が低下し、視力の予後不良を招くと考えられている (58, 59)。こうした滲出型加齢黄斑変性の一連の病態である血管漏出から線維性瘢痕組織形成過程までをヒトに近い網膜構造を有するカニクイザルを用いて再現することは、より正確な滲出型加齢黄斑変性の病態を解明する上で重要かつ有益な情報を得ることが可能となる。

本章では上述の臨床課題を解決するために、カニクイザルを用いてレーザー誘発CNVモデルを作製し、浮腫に対する抗VEGF薬の予防効果並びに治療効果について比較検討した。さらに、同モデルを用いて、CNV出現後の後期にみられる

線維化組織に対する抗VEGF薬の作用を検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

リン酸緩衝生理食塩液 (Phosphate Buffered Saline: PBS) は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)、抗生剤 (クラビット点眼液 0.5%)、散瞳剤 (ミドリン P 点眼液)、表面麻酔剤 (ベノキシール 0.4%液) は参天製薬株式会社 (Osaka, Japan)、塩酸ケタミンは Supriya Lifescience Ltd. (Mumbai, India)、キシラジン塩酸塩 (セラクター 2%注射液) はバイエル薬品株式会社 (Osaka, Japan)、イソジン液 10%は Mundipharma K.K. (Tokyo, Japan)、角膜保護剤 (スコピゾル) は千寿製薬株式会社 (Osaka, Japan)、生理食塩液は大塚製薬工場 (Tokushima, Japan)、造影剤 (フルオレサイト静注 500 mg) は日本アルコン株式会社 (Tokyo, Japan)、ペントバルビタールナトリウムは東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)、ベバシズマブ (アバスチン硝子体内注射液 10 mg/mL) は中外製薬株式会社 (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

体重 2.5~6.0 kg、3~4 年齢の雄性カニクイザル 15 頭は、株式会社新日本科学にてステンレスケージ (奥行 680 mm×幅 620mm×高さ 770mm) 内で 23~29 °C、湿度 30~70 %の環境で飼育した。また、換気は 1 時間に 15 回実施した。動物は 12 時間/12 時間の明暗サイクルのもと、自由給水下で固形飼料 (HE Primate J 12G5K9J、Purina Mills, LLC) を 108 g (12 g×9 片)/日与えた。実験動物の取り扱い

いは、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で決められたガイドラインを遵守して行った。また実験内容については、株式会社新日本科学安全性研究所の動物実験委員会により承認されており、当研究所の動物実験規定に従って実施した。なお、試験施設は AAALAC International により認証されている。

2-2-2 レーザー誘発脈絡膜血管新生 (choroidal neovascularization: CNV) モデル

ケタミン塩酸塩 (50 mg/kg) とキシラジン (2%) を 7:1 で混合した溶液を 0.2 mL/kg 筋肉内投与し、麻酔を導入した。ダイレクトコンタクトレーザーレンズは角膜保護剤を用いて角膜に接眼させた。レーザー照射は 532-nm 緑色光を用いて、黄斑周囲 8 ヶ所に行った (1000 mW、0.1 sec、スポットサイズ 80 μ m)。

2-2-3 抗VEGF抗体の硝子体内投与

Fig. 19 に示すタイムコースにて溶媒投与、抗VEGF抗体前投与及び抗VEGF抗体後投与群に対して硝子体内投与を実施した。抗VEGF抗体はベバシズマブ (アバスチン[®]、中外製薬株式会社) を使用し、予防投与群にはレーザー照射 2 週間前より、治療投与群にはレーザー照射 2 週間後に抗VEGF抗体を投与した。なお、溶媒投与群においては生理食塩液を投与した。それぞれの投与に先立ち、抗菌剤 (クラビット[®]、参天製薬株式会社) を点眼した。なお、硝子体内投与は 30 ゲージ針を用いて麻酔及び散瞳の下で実施した。硝子体内投与後、直ちに透光体はスリットランプ (SL-15、興和株式会社) を用いて観察した。また、抗菌剤は硝子体内投与前後に点眼した。

2-2-4 眼底観察

眼底観察は上述の通り、散瞳及び麻酔下で実施した。蛍光眼底造影は 2 週間
に一度実施した。フルオレセイン (アルコンジャパン、0.1 mL/kg) は橈側皮静脈
より投与を行った。眼底造影像は眼底カメラ (Genesis-Df、興和) により撮影し
た。

血管外漏出は下記に基づいてグレード評価した。

Grade 1	過蛍光なし
Grade 2	漏出を伴わない過蛍光
Grade 3	造影前期 ^{a)} 又は中期 ^{b)} の過蛍光と造影後期 ^{c)} の蛍光漏出
Grade 4	造影前期 ^{a)} 又は中期 ^{b)} の鮮明な過蛍光と損傷領域以外の 後期 ^{c)} 蛍光漏出

a) 造影剤投与約 30 秒～1 分後

b) 造影剤投与約 2～4 分後

c) 造影剤投与約 5 分後以降

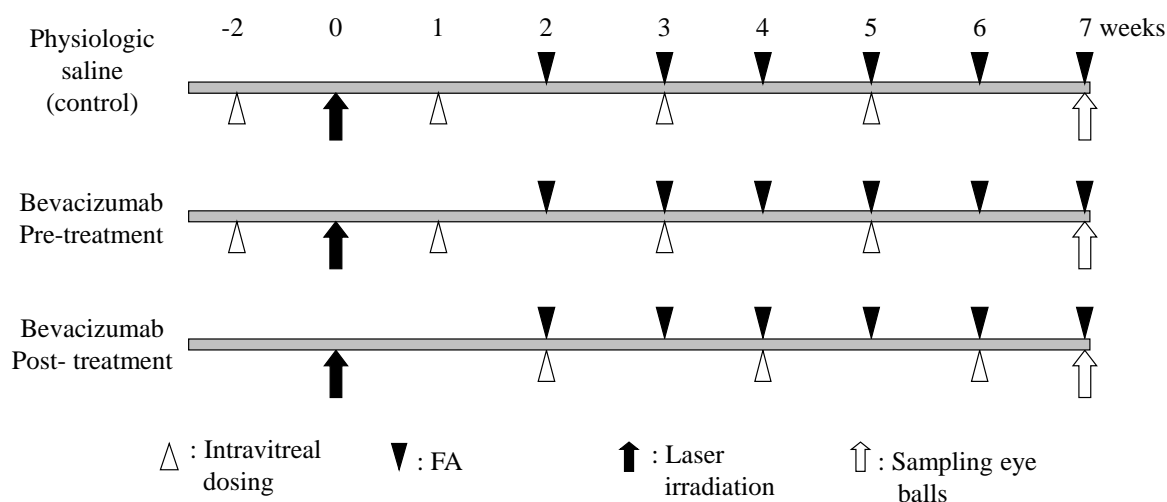


Figure 19 Time course for dosing, FA, and eye ball sampling relative to laser irradiation.

In the control and bevacizumab pre-treatment groups, intravitreal dosing was initiated 2 weeks before laser irradiation. In the bevacizumab post-treatment group, intravitreal dosing was initiated from 2 weeks after laser irradiation. In all groups, the dosing interval was set at 2 or 3 weeks. FA was performed once weekly from 2 weeks after laser irradiation. OCT images were taken at 2, 5, and 7 weeks after laser irradiation.

2-2-5 光干渉断層画像 (Optical Coherence Tomography: OCT) の解析

レーザー照射 2、3、5 及び 7 週間後、Heidelberg Spectralis (Heidelberg Engineering GmbH) を用いて、Optical Coherence Tomography (OCT) 画像を取得した。レーザー照射後 2、5 及び 7 週において各レーザー照射部位の中心を撮影した。網膜色素上皮層から内境界膜までの厚さを analySIS software (Soft Imaging System GmbH) を用いて測定した。網膜下高反射病巣 (subretinal hyper-reflective material: SHRM) は SHRM 領域内側からブルッフ膜との間を測定し、それらは analySIS software を用いて自動で測定を行った。

2-2-6 組織学的検討

レーザー照射 7 週間後、ペントバルビタールナトリウム (東京化学工業株式会社、Tokyo, Japan) の静脈内投与 (64.8 mg/mL、0.4 mL/kg) により安楽死させたカニクイザルより、眼球及び視神経を摘出した。その後、Davidson's fixative solution で 24 時間固定し、10%中性緩衝ホルマリンで置換した。固定した眼球及び視神経は、パラフィン中に包埋し、4 μm の連続横断切片を作製した。形態学的検討においては、ヘマトキシリン・エオジン染色及びマッソン・トリクローム染色を行った。マッソン・トリクローム染色におけるコラーゲン線維の解析においては、網膜及び脈絡膜の 600 μm の幅を採用した。青色で染色されたコラーゲン領域の面積は analySIS software により自動で解析した。

2-3 統計処理

実験結果はすべて平均 \pm 標準誤差で表し、危険率 5%未満を統計学的有意とみなした。統計学的比較については、SAS System for Windows, Release 9.2 (SAS Institute Inc.) を用いて、次のように実施した。OCT 画像における網膜厚に対し

では Dunnett's test を用いた。マッソン・トリクローム染色におけるコラーゲン線維領域面積は Tukey's test にて実施した。なお、Pearson's の相関係数及び P 値は Microsoft Excel 2010 を用いて算出した。

第3節 実験成績

3-1 レーザー照射部位における蛍光漏出

黄斑周囲8ヶ所にレーザーを照射後2~7週の間、毎週蛍光眼底造影を行った。その後、各血管外漏出をGrade 1~4に分類した。無治療(コントロール)群においては全血管外漏出のうち、臨床において病態形成に強く関与することが知られているGrade 4(60-62)に該当する血管外漏出の占める割合は、2~7週では50.0~66.7%であった(Fig. 20B, red column)。一方、ベバシズマブ予防投与群においては、Grade 4に該当する血管外漏出は認められなかった(Fig. 20C)。さらに、ベバシズマブ治療投与群においては、Grade 4の血管外漏出はレーザー照射2週後に47.5%、3週後に10.4%のGrade 4の割合で認められた(Fig. 20D, red column)が、それらはレーザー照射4週後には消失した(Fig. 20D)。

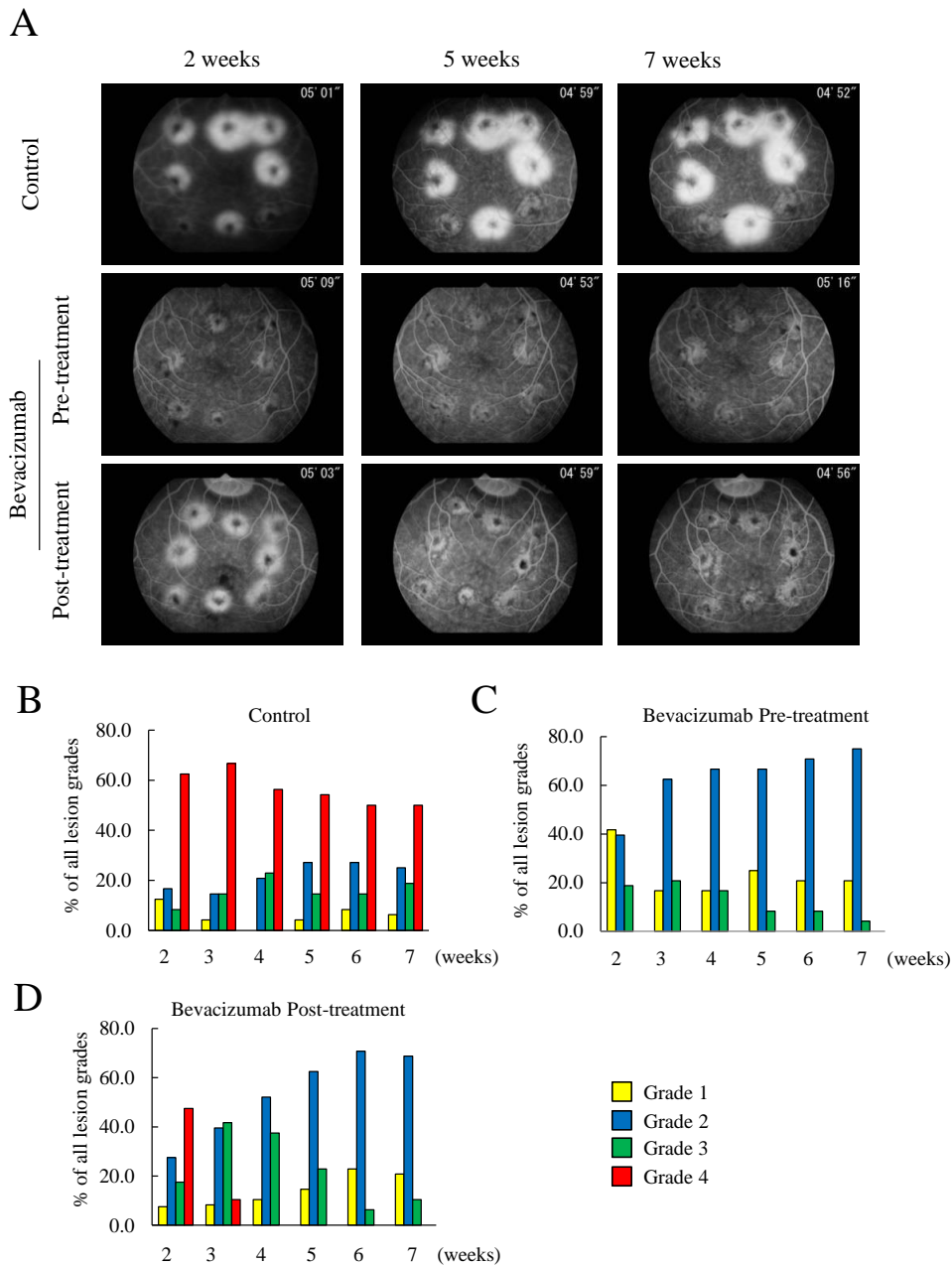


Figure 20 Representative images of FA and percentages of grade 1-4 CNV lesions

Late phase fluorescein angiograms at 2, 5 and 7 weeks after laser irradiation in the control and bevacizumab pre- and post-treatment groups are shown (A). The percentages of each grade CNV lesions from 2 to 7 weeks after laser irradiation are shown (B-D). A 50% or more incidences of grade 4 lesions was observed in the control group (B; red column). In bevacizumab pre-treatment group, the incidences of grade 4 lesions were completely inhibited until 7 weeks after laser irradiation (C; red column). In the bevacizumab post-treatment group, the incidences of grade 4 lesions were high at 2 weeks after laser irradiation, but were completely inhibited from 4 weeks to 7 weeks after laser irradiation (D; red column). Therefore, bevacizumab has the potential to decrease the CNV formation.

3-2 OCT 画像における網膜厚解析

撮影した OCT 画像を用いて、無治療群、ベバシズマブ予防投与群及び治療投与群における網膜厚の評価を実施した。いずれの群においても、レーザー照射 3 週から 7 週にかけて網膜厚は減少傾向を示した。無治療群と比較して、ベバシズマブ予防投与群ではレーザー照射 2 週 ($246.8 \pm 7.6 \mu\text{m}$) から 7 週 ($222.8 \pm 7.8 \mu\text{m}$) にかけて網膜厚は減少した (Fig. 21, filled circle)。また、ベバシズマブ治療投与群では、レーザー照射 7 週 ($266.2 \pm 8.9 \mu\text{m}$) においてのみ網膜厚は減少した (Fig. 21, open triangle)。

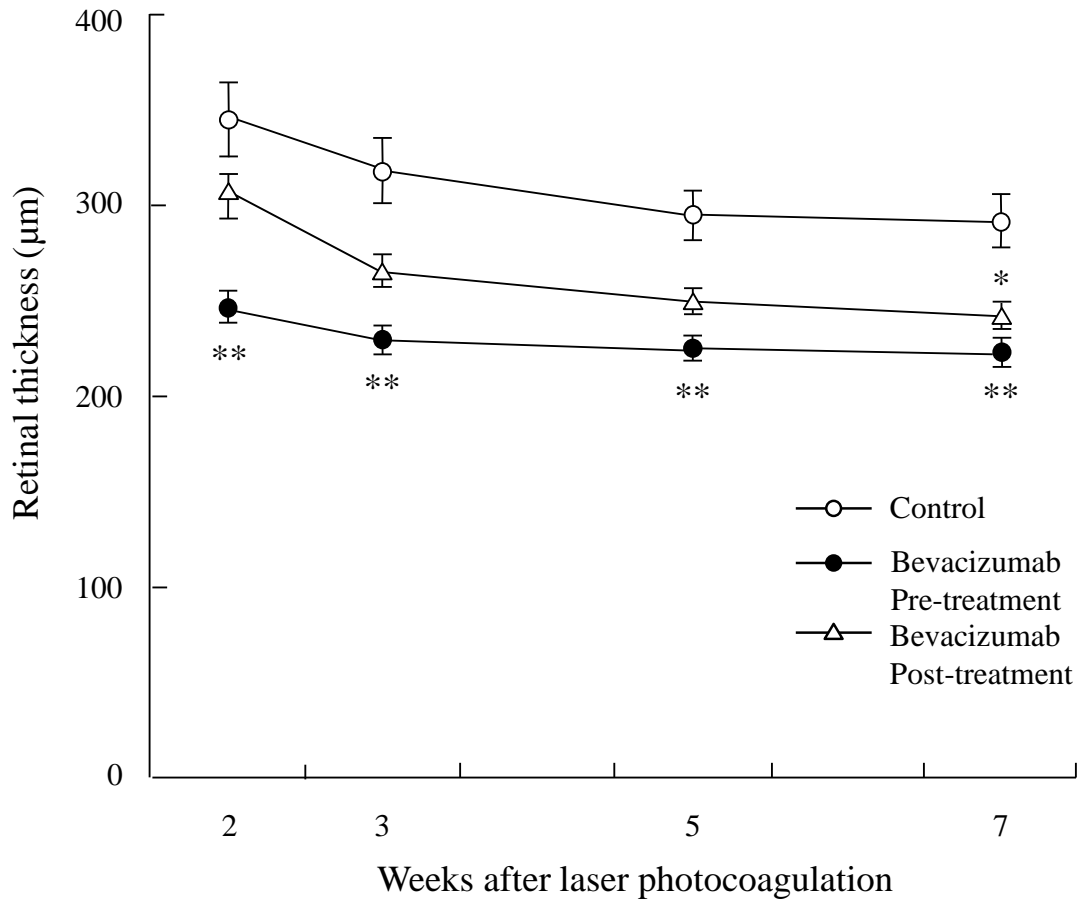


Figure 21 Thickness of retina in CNV lesions on OCT

The mean thickness value at 2, 3, 5, and 7 weeks after laser irradiation are shown (mean \pm S.E., N=40 or 48 lesions). The thicknesses from the RPE layer to the internal limiting membrane in the OCT images were measured. The retinal thicknesses in the bevacizumab pre-treatment (the open triangles) and post-treatment (the filled circles) groups were significantly decreased when compared with those in the control (the open circles) group (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, Dunnet's test), suggesting that bevacizumab has the potential to normalize the retinal thickness after laser irradiation.

3-3 線維化に関する組織学的検討

レーザー照射 7 週後、眼球を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色及びマッソン・トリクローム染色によりコラーゲン線維で着色された線維化領域の面積を計測した (Fig. 22A)。その結果、コントロール群における線維化領域と比較して、ベバシズマブ予防投与群では線維化領域の顕著な減少が認められた (Fig.

22B)。また、ベバシズマブ治療投与群における線維化領域は $31874.5 \pm 1585.3 \mu\text{m}^2$ であり、コントロール群よりも有意な減少が同様に認められた。なお、ベバシズマブ前投与群と後投与群との間では有意な差は認められなかった (Fig. 22B)。

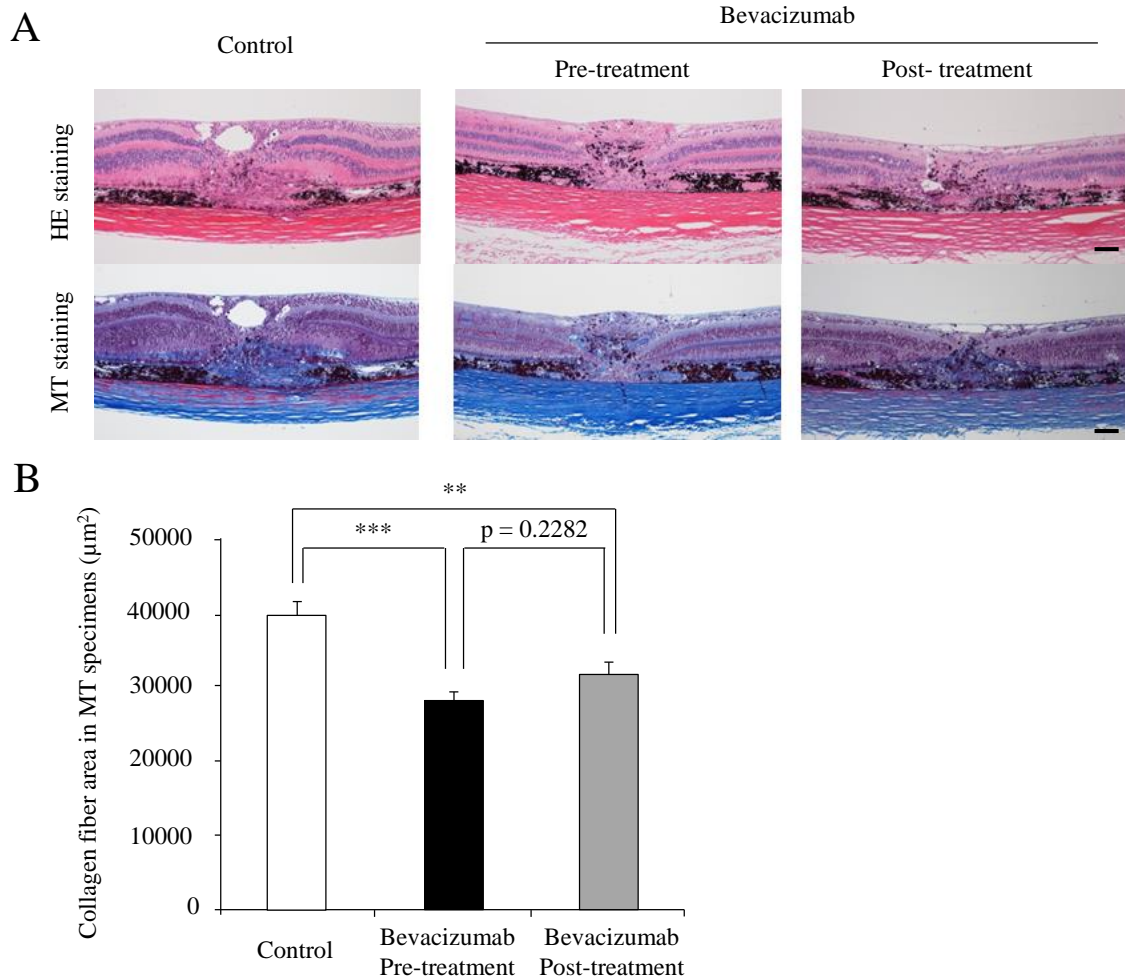


Figure 22 Collagen fiber area in CNV lesions in MT specimens

Representative images of HE-stained and MT-stained specimens at 7 weeks after laser irradiation are shown (A, scale bar: 100 µm). The mean collagen fiber area in MT specimens at 7 weeks after laser irradiation is shown (B, mean ± S.E., N=40 or 48 lesions). The collagen fiber area in the MT specimens was shown in the blue, and which was automatically extracted as the collagen area and measured using analySIS software (Soft Imaging System GmbH). Significantly small areas of collagen fiber in the pre-induction groups (filled bar) and bevacizumab post-induction (shaded bar) were noted when compared with that in the control group (open bar). There was no significant difference between the pre- and post-induction bevacizumab groups. (***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, Tukey's test) These data suggests that bevacizumab has the potential to decrease fibrosis.

第4節 考察

本章では、カニクイザルレーザー誘発脈絡膜血管新生 (CNV) モデルを用いて、予防投与及び治療投与によるベバシズマブの作用を検討した。本モデルにおいて、ベバシズマブは予防投与群及び治療投与群のいずれにおいても血管漏出を抑制したことに加え、光干渉断層画像 (OCT) を用いた解析により抗VEGF療法のエンドポイントの1つである網膜厚の肥厚抑制が確認された (Fig. 20 及び 21)。さらに、予防投与群では、治療投与群と比較し、より早期から血管外漏出並びに網膜体積に対する治療効果が認められた (Fig. 20 及び 21)。したがって、滲出性の変化など滲出型加齢黄斑変性病態の再発予防を目的とした T&E 法による抗VEGF薬投与の有効性が立証されたと考える。これらの結果は同時に、今回確立したカニクイザルモデルは抗VEGF薬をはじめとする被験薬の評価に適したモデル動物であり、薬剤投与タイミングの違いが血管漏出及び網膜体積に及ぼす影響についても評価が可能である事を示唆している。

滲出型加齢黄斑変性の慢性期における視力低下の一因として、線維癭痕化が挙げられる (63)。したがって、線維性癭痕形成メカニズムの解明に有用な CNV モデルの開発は医学的価値が高いといえる。マウスを用いたレーザー誘発CNVモデルにおいては、線維性癭痕を構成するタンパク質の1種であるコラーゲンの蓄積がCNV病巣で生じることが報告されているが (64)、非ヒト霊長類を用いたCNVモデルを用いた線維性癭痕に関する研究は皆無である。一方、今回確立したカニクイザルレーザー誘発CNVモデルでは、コラーゲン蓄積の定量的評価が可能であった (Fig. 22)。本検討結果から、本非ヒト霊長類CNVモデルは、線維性癭痕の定量的解析が可能であることを示し、線維性癭痕に有効な治療薬の探索や線維化発症機序の解明に有用と考えられる。

本検討から、ベバシズマブの投与により血管漏出及び網膜厚の肥厚化抑制が

認められたことに加え、コラーゲン蓄積が抑制された (Fig. 22)。一方、滲出型加齢黄斑変性患者の線維性瘢痕の形成は、抗VEGF薬の投与では抑制できないことが報告されている (58, 65, 66)。さらに基礎研究においても、抗VEGF療法は線維性瘢痕に対して抑制効果を示さないことが報告されており (67)、これらの知見は本章の結果と矛盾する。本検討でコラーゲン蓄積が減少した要因を以下のように考察する。本研究では、病態早期かつ線維性瘢痕の形成前であるレーザー照射 2 週間前及び照射 2 週間後において、それぞれ抗VEGF薬を投与した。CNV病態早期では、血管より漏出した大量の血漿成分や血液がブルッフ膜やコロイドの破綻により網膜下に流入する (55, 68)。すなわち、抗VEGF薬による線維性瘢痕形成の抑制は病態早期における血管漏出を抑制したことにより、間接的に線維性瘢痕形成が抑制されたと考えられる。したがって、滲出型加齢黄斑変性患者への抗VEGF療法の早期介入は線維性瘢痕形成を予防的に抑制し得る可能性が期待できると考えられる。しかし、抗VEGF薬投与によるコラーゲン線維の減少は 25-30%程度であり、70-75%は残存していることを考慮すると (Fig. 22)、線維性瘢痕形成を促進する治療標的の同定は滲出型加齢黄斑変性患者の予後改善に寄与すると期待できる。先行研究において、VEGF 以外のサイトカイン及び成長因子で線維性瘢痕形成を促進するものとして、Transforming growth factor- β (TGF- β)、Platelet-derived growth factor (PDGF)、Connective tissue growth factor (CTGF)、Epidermal growth factor (EGF) 及び Fibroblast growth factor (FGF) が示唆されているが (55, 69-71)、これらのサイトカインが病態の進行におけるどのタイミングで、どの様な細胞種から産生され、線維性瘢痕形成に関与するのかについては明らかになっていない。その点で、サルを動物実験モデルとして用いることは極めて有意義である。齧歯類では、眼球の体積が小さく、満足に前房水や硝子体液を採取することは困難である。しかし、サルは経時的な解析を実

施する上で必要となる前房水や硝子体液を十分に有していることから、線維性瘢痕形成に伴い増加する病態分子の同定が可能であると推測される。今後、カニクイザルレーザー誘発CNVモデルを用いて、線維性瘢痕形成に対するこれらのサイトカインの関与に関する研究並びに成長因子を標的とした治療薬開発を行うことは、滲出型加齢黄斑変性患者の予後改善に寄与する知見や新規治療薬の開発に貢献できる可能性が期待される。

本検討により、非ヒト霊長類レーザー誘発CNVモデルを用いた血管漏出及び網膜厚の定量的評価系の構築に加え、同モデルが線維性瘢痕形成を定量的評価が可能なことも確認した。本モデルは、滲出型加齢黄斑変性患者の予後に関わるとされる線維性瘢痕を標的とした治療薬開発に有用である。また、抗VEGF療法後に線維化が生じる症例を早期に予測・判別することが出来れば、線維化を標的とした治療薬による早期治療介入が可能となるため、非侵襲的に線維化の有無を判断できるバイオマーカーの探索が重要となる。さらに、網脈絡膜血管病変患者では、抗VEGF薬の投与によっても浮腫が抑制出来ない症例が報告されている (72, 73)。したがって、第3章では線維性瘢痕組織に対する非侵襲的評価法の確立に加え、浮腫形成に関与するサイトカインの同定に着手した。

第3章 浮腫を伴う網膜血管病変に対するバイオマーカー及び新規治療標的の探索

第1節 緒言

網膜静脈閉塞症、滲出型加齢黄斑変性、糖尿病網膜症及び病的近視などの網膜疾患では、増悪期に黄斑浮腫や網膜・硝子体出血を伴い、結果的に線維癍痕組織が形成される (70, 74-76)。上記疾患に対しては、浮腫抑制を期待して抗VEGF薬が用いられ、浮腫、視野障害や視力低下の改善に有効であることが示されている (70, 74-76)。しかし、抗VEGF薬を投与しても病態が改善しない患者が一定数存在する (77)。そこで、本章では、VEGF以外の治療ターゲットの探索を目的として、第1章で確立したサル RVO モデルの前房水に含まれるサイトカイン及び成長因子の解析を試みた。浮腫形成に関与するサイトカイン及び成長因子が同定できれば、予後予測マーカーや治療ターゲットの確立に繋がることが期待される。眼の解剖学的には、前房と硝子体とは水晶体で隔てられているが、一部は交通しており、硝子体と前房水はほぼ同等の組成と考えられており、網膜病変を反映することが示唆される。また、硝子体液に比べて、前房水は採取しやすい検体であることから、検体検査に応用可能であるといえる。

浮腫形成の長期経過後に網膜色素上皮及びその近傍で形成される線維癍痕組織は、網膜色素上皮の機能低下をもたらすこと及び視細胞変性を誘発することにより視力低下に繋がることが示唆される (55, 78)。しかし、残念ながら、線維癍痕化を抑制する治療法は存在せず、眼内の線維化に対する病態解明及び治療薬の開発が求められている。実験動物モデルを用いた研究では、線維癍痕化を観察するためにマッソン・トリクローム染色等による組織学的な検討が行なわれる (79)。一方、臨床研究では、非侵襲的に線維化組織を評価する必要があり、OCT 画像上でみられる網膜下高反射病巣 (Subretinal Hyper-reflective Material:

SHRM) が線維化の指標として利用されている (16, 80, 81)。Fig. 23 に示すように、SHRM は高輝度反射部位を指し (82, 83)、滲出型加齢黄斑変性患者の視力及び線維化組織と相関すること及び抗VEGF薬の治療効果予測に有用であることが示唆されている (84-86)。これらのことから、臨床において SHRM は、線維化組織の形成を間接的に推測できる有用な指標の一つといえる。トランスレーショナルリサーチにおけるアプローチ法として、治療薬の開発には基礎研究と臨床研究の橋渡しになる指標が必要とされるが、現状、線維化を正確に評価する共通の指標は確立されていない。SHRM は線維化に対する共通の評価指標になり得る可能性を十分に秘めている。そこで、第 2 章で確立した、線維化組織を発現するカニクイザルレーザー誘発 CNV モデルを用いて、SHRM に着目した線維性組織の評価系構築を目的とした。本章では、滲出型加齢黄斑変性において患者視機能に關与することが報告される SHRM に着目し、サル CNV モデルにおける線維化組織との關連を解析した。

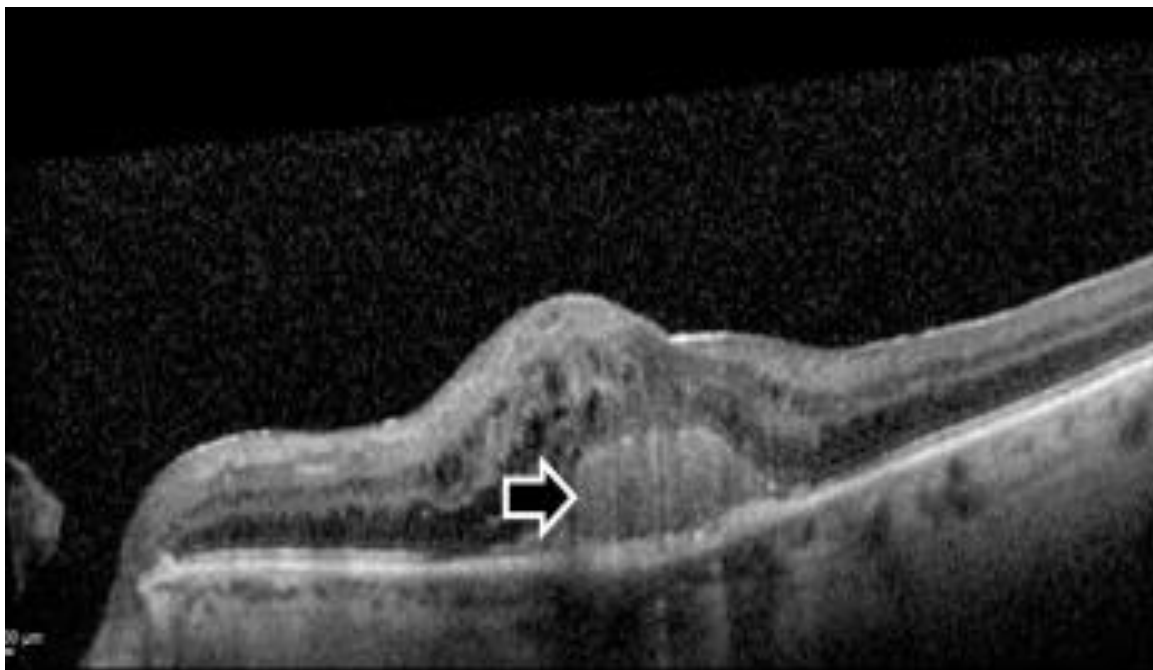


Figure 23 The imaging of SHRM in OCT image

The image demonstrates forveal SHRM that is distinct from the underlying retinal pigment epithelium. The black arrow shows the typical morphology of SHRM.

[文献 (83) より転載]

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

第1章 2-1 及び第2章 2-1 で使用した薬物並びに試薬に準じる。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

第1章 2-2-1 と同様に実施した。

2-2-2 網膜静脈閉塞症 (Retinal vein occlusion model: RVO) モデルの作製

第1章 2-2-2 に準じ、カニクイザル RVO モデルを作製した。

2-2-3 RVO モデルに対する抗VEGF抗体の硝子体内投与

第1章 2-2-3 に準じ、ラニビズマブを硝子体内投与した。

2-2-4 前眼房水の採取及びタンパク質解析

上記の眼底観察時における散瞳及び麻酔下にて、表面麻酔剤 (ベノキシール 0.4%液) を点眼後、滅菌消毒済みの開眼器にて眼を開き、眼球を生理食塩液で洗浄した。角膜よりディスプレイサブル注射筒 (30G) を用いて前房内より眼房水を採取した (約 50 μ L/眼)。得られた前眼房水はポリプロピレン製チューブに分注後、速やかに遮光氷冷し、超低温フリーザーで遮光凍結保存した。前眼房水の採取直後に1回、翌日以降毎日3回抗菌剤 (クラビット点眼液 0.5%) を点眼し、3日間実施した。前眼房水におけるタンパク質の解析はマルチプレックスプロファイリング (Luminex[®] Assays、富士フイルム 和光純薬株式会社) により諸種タンパク質発現を解析した。

2-2-5 レーザー誘発脈絡膜血管新生 (Choroidal Neovascularization: CNV) モデル

第 2 章 2-2-2 の手順に従って、CNV モデルを作製した。

2-2-6 CNV モデルに対する抗 VEGF 抗体の硝子体内投与

第 2 章 2-2-3 の手順に従って、ベバシズマブを投与した。

2-2-7 CNV モデルにおける眼底観察

第 2 章 2-2-4 の手順に従って、OCT により眼底を観察した。

2-2-8 CNV モデルにおける光干渉断層画像 (Optical Coherence Tomography: OCT) の解析

第 2 章 2-2-5 の手順に従って、実施した。

2-2-6 CNV モデルにおける組織学的検討

第 2 章 2-2-6 の手順に従って、実施した。

2-3 統計処理

実験結果はすべて平均 ± 標準誤差で表し、危険率 5%未満を統計学的有意とみなした。統計学的比較については、SAS System for Windows, Release 9.2 (SAS Institute Inc.) を用いた。なお、Pearson's の相関係数及び *P* 値 は Microsoft Excel 2010 を用いて算出した。

第3節 実験成績

3-1 RVOモデルにおける前眼房水中のサイトカイン及び成長因子の経時的解析

RVOモデルにおけるサイトカイン及び成長因子の経時的な変化を探索するために、前眼房水を血管閉塞5日前及び血管閉塞1、14、28及び42日後において採取し、溶媒投与群及びラニビズマブ投与群との間で比較した。解析対象因子として、血管新生及び炎症に関与する代表的なサイトカインである VEGF、interleukin-6 (IL-6)、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、angiopoietin-1 (ANG-1)、angiopoietin-2 (ANG-2) を選出した。その結果、溶媒投与群における血管閉塞1日後における VEGF及びIL-6の発現増加及び血管閉塞1日後及び14日後における MCP-1の発現が増加した (Fig. 24A-C)。さらに、ANG-2についても血管閉塞14日後における発現増加が認められた (Fig. 24E)。なお、ANG-1についてはレーザー照射後の発現変動は認められなかった (Fig. 24D)。一方、ラニビズマブ投与群では血管閉塞1日後及び14日後における VEGF発現は顕著に減少したが (Fig. 24A)、その他のサイトカイン及び成長因子に対する作用は認められなかった (Fig. 24B-E)。

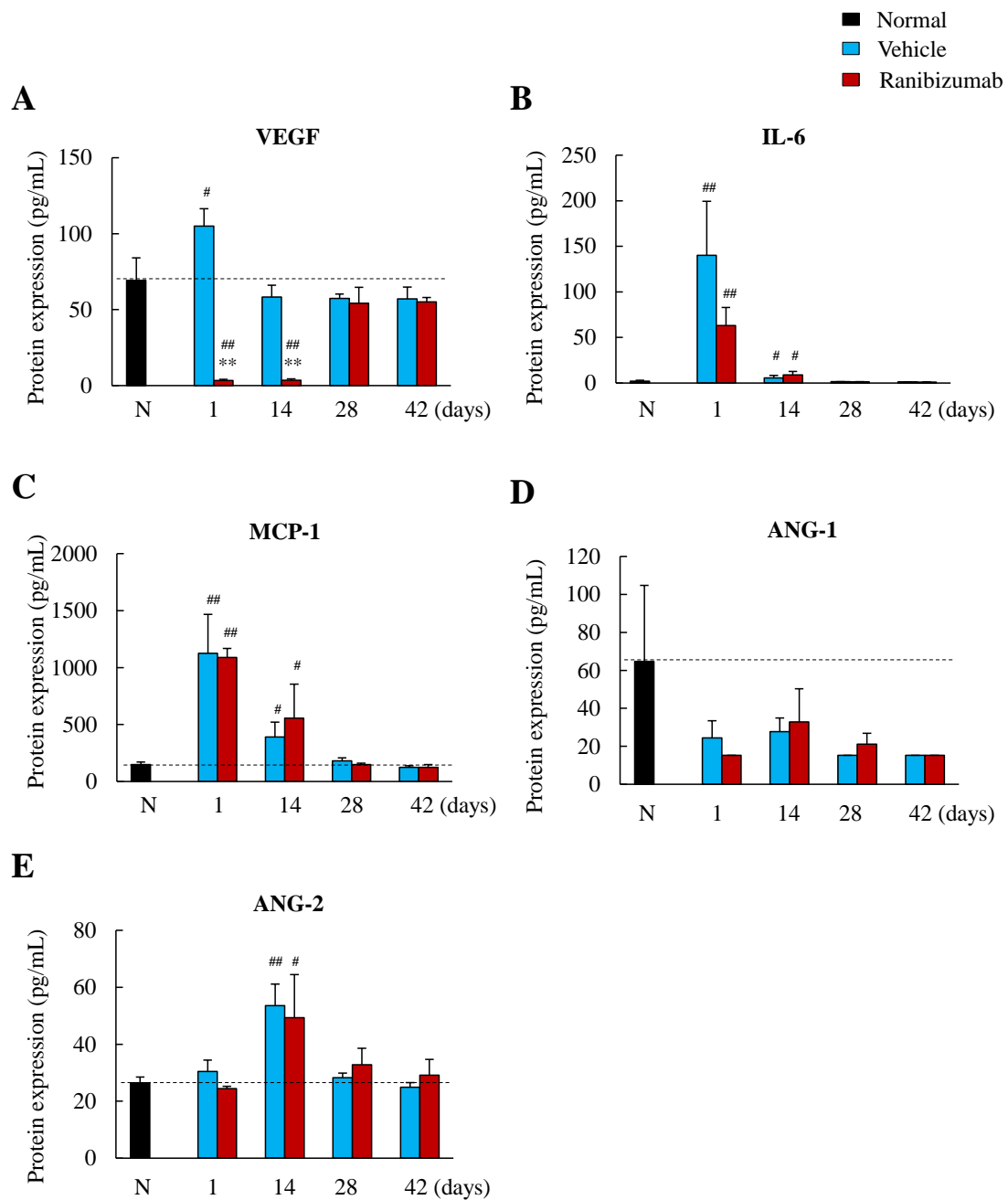


Figure 24 Time course of the expression of cytokines in aqueous humour of RVO model and the effect of ranibizumab on the level of expression.

The level of expression of VEGF (A), interleukin-6 (IL-6) (B), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (C), angiopoietin-1 (Ang-1) (D), angiopoietin-2 (Ang-2) (E) at -5, 1, 14, 28, and 42 days. Data are the means \pm SEMs (vehicle; n = 4, ranibizumab; n=3). ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$ versus normal group (at -5 days), ^{**} $P < 0.01$ versus vehicle-treated group (Mann-Whitney U -test, one-tailed test).

3-1 CNV モデルにおけるSHRMとコラーゲン線維領域の検討

滲出型加齢黄斑変性患者網膜において、SHRMは線維性組織と一部共局在し、視力と相関する新たなバイオマーカーとして利用できる事が報告されている(16, 80, 81)。実際に、OCT画像のSHRMは臨床試験で線維化に対する作用を評価する指標として用いられる(84-86)。これらのことから、作製したカニクイザルCNVモデルのOCT画像を用いて、SHRMと線維性組織との相関を検討した。OCTにより撮像した無治療群におけるSHRMを示した(Fig. 25、上図)。青線はSHRMの最長部分を示す(Fig. 25、上図)。また、マッソン・トリクローム染色により網膜下のコラーゲン蓄積が観察された(Fig. 25、下図)。これらのコラーゲン蓄積は、SHRMと一部共局在していた(Fig. 25)。

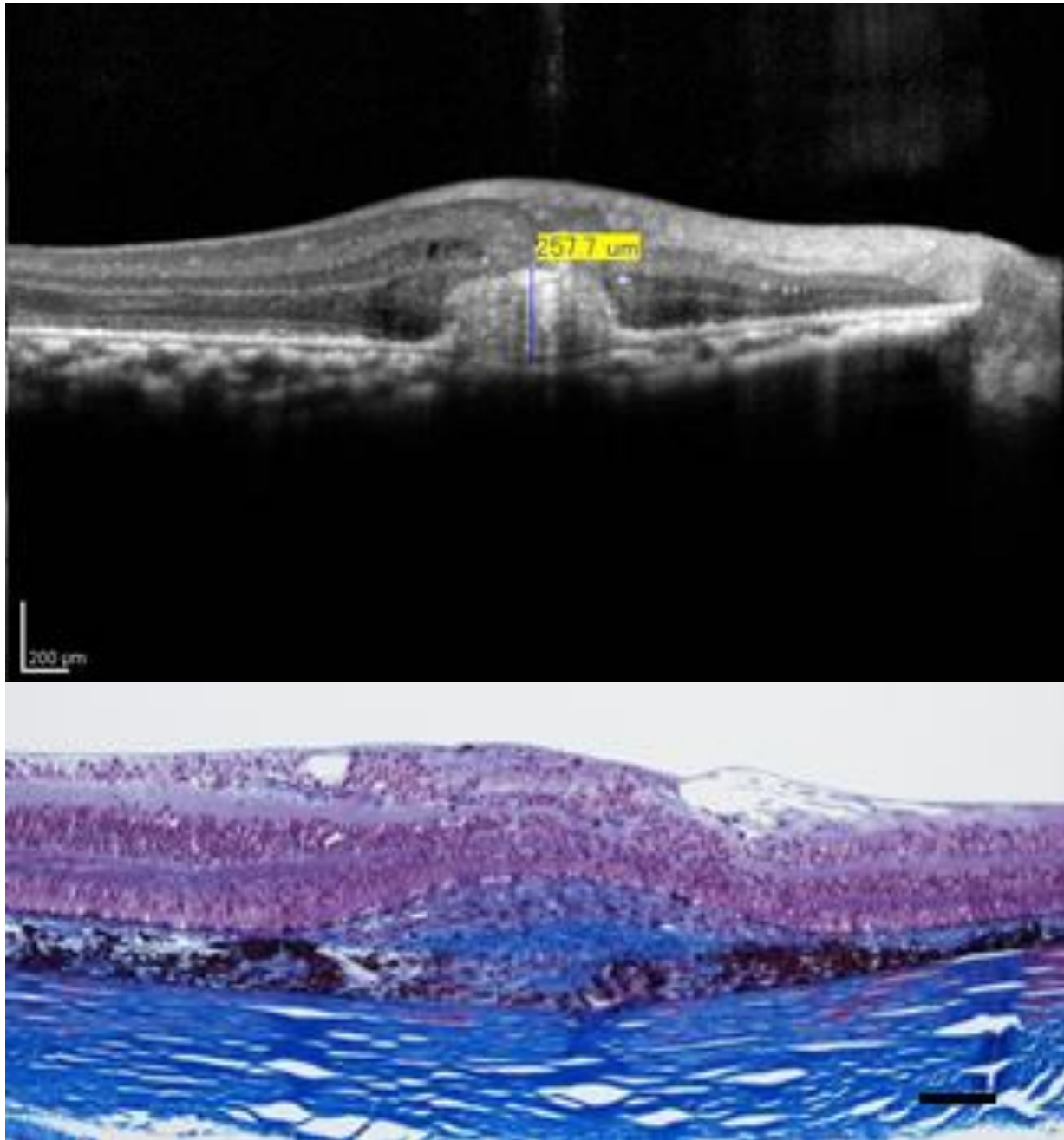


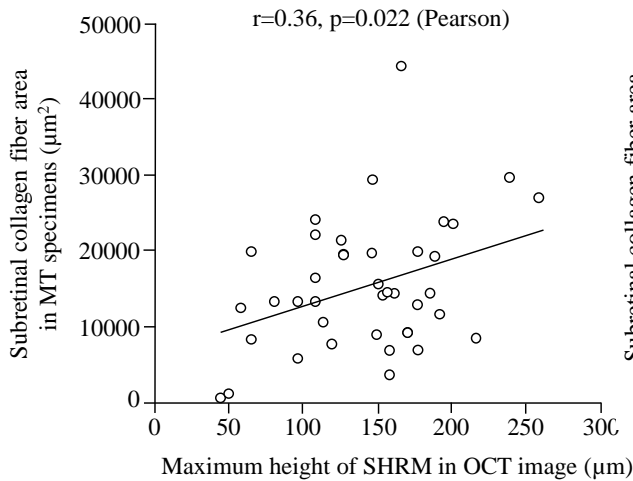
Figure 25 Representative images of SHRM in OCT and MT specimen

A representative OCT measurement image of SHRM is shown (top). The blue line indicates the maximum height of SHRM (257.7 μm). An MT specimen of the same lesion is also shown (lower, scale bar: 100 μm). SHRM in the OCT image correlates well with the collagen fiber indicated in MT specimen.

3-2 CNV モデルにおける SHRM とコラーゲン線維領域との相関

無治療群とベバシズマブ治療投与群について、SHRMの最大丈とマッソン・トリクローム染色陽性のコラーゲン領域との相関を解析した。その結果、無治療群 ($r = 0.36$, $p < 0.05$) 及びベバシズマブ治療投与群 ($r = 0.38$, $p < 0.05$) 共に相関を認めた (Fig. 26)。

Control



Bevacizumab post-treatment

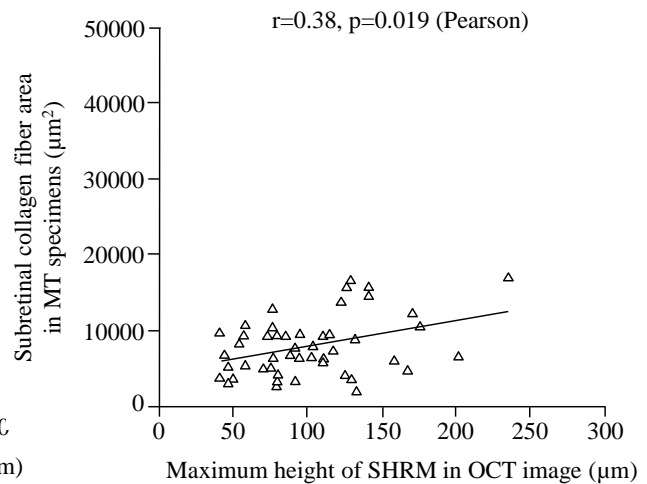


Figure 26 Scatter plots between the maximum height of SHRM in OCT images and the subretinal collagen fiber area in MT specimens

Pearson correlation analysis between the maximum height of SHRM in the OCT images and the subretinal collagen fiber area in the MT specimens was performed for the control group (open circle, left panel) and the bevacizumab post-treatment group (filled triangles, right panel). Correlation between the maximum height of SHRM and the subretinal collagen fiber area was statistically significant in the control ($r=0.36$, $p=0.022$) and the bevacizumab post-induction group ($r=0.38$, $p=0.019$), suggesting that SHRM detected by OCT reflects fibrous tissue and scars.

第4節 考察

本検討では、眼内血管疾患に係る浮腫及びその後に形成される線維化組織形成までの一連の病態に着目した。まず、第1章で確立したサル網膜静脈閉塞症 (RVO) モデルの前房水中におけるサイトカイン及び成長因子を解析することにより、浮腫の形成に関わる病態分子の同定を試みた。また、非侵襲的な線維化組織の評価法の確立については、既に第2章で確立したサル脈絡膜血管新生 (CNV) モデルを用いて実施した。

第1章の研究成果に基づき、網膜静脈閉塞症における新規治療ターゲットの探索を行った。その結果、炎症 (IL-6 及び MCP-1) 及び血管新生 (ANG-2) に関与するサイトカイン・成長因子は RVO 誘導によりその発現は増加した (Fig. 24, C, E)。これらのサイトカインは、網膜血管内皮細胞に対してタイトジャンクション機能の指標となる経上皮電気抵抗値を減少させることから、バリア機能の喪失に加え、網膜色素上皮細胞の線維化促進に関与することが報告されている (87-91)。さらに、IL-6 並びに MCP-1 は網膜神経節細胞に対して、ANG-2 はアストロサイトに対して、それぞれアポトーシスを誘導し (92-95)、RVO 患者の予後視力の増悪に関与すると考えられる。同時に、RVO 患者の前房水中では IL-6、MCP-1 及び ANG-2 などのサイトカインの発現が増加することが報告されていることから (96, 97)、今回確立したサル RVO モデルは、病態形成因子の探索に適したモデルであることを示唆している。その一方で、本研究や先行する臨床研究により見出されたサイトカインが、どのようなメカニズムで RVO 病態の進行に関与するのかについては不明である。したがって、臨床及び霊長類であるサル前臨床モデルで得られた知見を、再度、細胞実験や齧歯類のモデルにフィードバックして RVO の発症メカニズムを精緻に解明することが新たな治療標的の同定につながると考えられる。

さらに、抗VEGF薬を投与したサル眼の前房水を用いて、VEGF阻害による影響を検討した。抗VEGF薬の投与によって発現が減少したのは VEGFのみで、その他の因子群 (IL-6、MCP-1、ANG-1 及び ANG-2) に対する影響は認められなかった (Fig. 24)。抗VEGF薬により視機能が改善しない患者の前房水中では、抗VEGF薬が奏功した患者と比較し、MCP-1 を始めとする炎症性サイトカイン群の発現が高いことを考慮すると (97)、炎症性サイトカインをターゲットとした創薬アプローチが今後重要になるかもしれない。

一方、先行研究において、RVO 患者に対する抗 VEGF薬の投与により、前房水中における VEGF、IL-6 及び MCP-1 の発現量は減少することが報告されている (97)。今回、先行する臨床研究と今回の研究との間で異なる結果が得られたのは、以下の要因が考えられる。RVO 患者では、血栓などによる血管閉塞が生じるが、本研究ではレーザー照射によって血管閉塞を実験的に惹起している。したがって、血管閉塞に起因する炎症に加え、レーザー照射に起因する炎症も生じている可能性がある。実際、先行研究では、50 mW 出力のレーザーによっても網膜炎症が誘発されることが報告されることから (98)、今回のサル RVO モデルでは、RVO 患者と比較して炎症が強く誘発されたことにより、抗 VEGF薬の投与によっても前房水中の IL-6 及び MCP-1 で減少が認められなかった可能性は否定できない。

続いて、第 2 章のカニクイザルレーザー誘発 CNV モデルを用いて、網脈絡膜血管疾患の視機能増悪に関与することが示唆される線維性瘢痕と SHRM は共局在することが認められた (Fig. 25)。また、線維性瘢痕面積と SHRM の最大丈は正の相関を示した (Fig. 26)。SHRM は、抗 VEGF薬による治療前の滲出型加齢黄斑変性患者のうち約 77% に認められ、視機能と相関することが示唆されている (99, 100)。本検討によりサル CNV モデルで、SHRM は線維性瘢痕組織と共局在することが示唆された。さらに、溶媒投与群及びベバシズマブ投与群で、SHRM の大き

さは線維性瘢痕組織の面積と正に相関した (Fig. 26)。これまで生命倫理の観点から、患者組織を用いてSHRMの構成成分を検討することは容易ではなかったが、サル CNV モデルを利用することによってこれらの検討が実施可能となった。また、臨床ではSHRMは線維性組織などの指標として利用されているが、本検討で、はじめて非ヒト霊長類モデルでSHRMを指標とした線維性組織の評価系を構築した。これにより、基礎研究と臨床研究で同じ評価項目を用いた比較検討が可能となり、線維性組織に対する創薬開発の基盤が確立したといえる。しかし、SHRMは線維性組織だけではなく、ドルーゼン、出血・浸出液または新生血管などによっても構成され、患者ごとにSHRMの構成物が異なるとされる (101-103)。こうしたSHRM構成物の違いにより、抗VEGF薬のSHRMに及ぼす影響が患者ごとに異なることが示唆されるため (86)、今後、さらにSHRMの構成物の違いを非侵襲的に評価できれば、抗VEGF薬のSHRMに及ぼす影響を推測できる可能性が考えられる。

以上、本章では第 1 章及び第 2 章で確立した実験的サルモデルを用いて、網脈絡膜血管病態としての浮腫に着目し、IL-6、MCP-1 及び ANG-2 などのサイトカインが新規治療標的の候補となることを示唆した。また、今回確立した実験的サルモデルでは、SHRMを観察することにより、網脈絡膜血管病態で形成される線維化組織を評価できることを明らかにした。

総括及び結論

網膜静脈閉塞症及び滲出型加齢黄斑変性に対する実験的動物モデルは、取扱いの容易さやコストの観点から、これまではマウスやラットなどの齧歯類が汎用されてきた。しかし、齧歯類には黄斑が存在せず、臨床上、黄斑に血管新生や浮腫が形成される網膜静脈閉塞症及び滲出型加齢黄斑変性の病態を完全に模倣することは困難である。一方、非ヒト霊長類は、黄斑を含む網膜構造を有することから臨床に近い病態を呈する。また、遺伝子がヒトに類似していることから、病態関連因子の同定や抗体医薬品や遺伝子治療の有効性の検討に有用である。すなわち、これらの非ヒト霊長類モデルを用いて得られた病態機序に関する知見及び候補薬はヒトへ外挿できる可能性が高い。こうした背景から、本研究では非ヒト霊長類であるカニクイザルを用いて網膜静脈閉塞症 (RVO) モデル及び脈絡膜血管新生 (CNV) モデルを確立し、抗VEGF薬の作用を検討した。これらサル病態モデルを用いた研究成果として、浮腫の治療ターゲットになり得るサイトカインの同定や線維性組織に対する評価法を確立した。

第1章では RVO に焦点を当て、カニクイザルを用いて、網膜の静脈を閉塞させ、浮腫を誘発するモデルを確立した。その後、本モデルで、血管漏出や網膜厚の増加並びに慢性期における網膜菲薄化が生じることを確認した。続いて、代表的な抗VEGF薬であるラニビズマブを用いて、本モデルに対する有効性を検討した。

- 1) ローズベンガル静脈投与後のレーザー照射により、低出力レーザーで網膜静脈閉塞及び浮腫が形成された。
- 2) 本研究で確立した RVO モデルでは、血管漏出、急性期における網膜厚の増加を認めた。さらに、慢性期において網膜の菲薄化がみられた。

- 3) 抗VEGF薬の投与により、血管漏出及び網膜菲薄化に対して抑制効果が認められた。

第2章では、滲出型加齢黄斑変性に焦点を当て、作製したサルCNVモデルを用いて臨床所見で見られる血管漏出及び網膜厚の増加が再現できるかを検討した。また、滲出型加齢黄斑変性患者の予後悪化に関わる線維化組織の有無を検討し、眼内の線維化に対する抗VEGF薬の作用を検討した。カニクイザルレーザー誘発CNVモデルを用いた検討結果を以下にまとめる。

- 1) 滲出型加齢黄斑変性患者にみられる所見と類似した血管漏出及び網膜厚の増加が再現された。
- 2) 新生血管部位においてコラーゲンで染色される線維性瘢痕の形成を認めた。
- 3) 抗VEGF薬の投与によって血管漏出及び網膜厚増加は共に抑制された。
- 4) 線維性瘢痕の形成は、抗VEGF薬の投与によって20-25%程度抑制された。
- 5) 血管漏出及び網膜厚増加に対して、抗VEGF薬の予防投与及び治療投与との間で差は認められなかった。

第3章では、カニクイザルRVOモデルより採取した前房水を用いて、浮腫に含有されるサイトカイン並びに成長因子の同定を行なった。また、カニクイザルCNVモデルのOCT画像から、線維性組織に対するイメージングバイオマーカーを探索した。本検討結果を以下にまとめる。

- 1) カニクイザルRVOモデルの前房水において、VEGFに加え、IL-6、MCP-1及びANG-2はRVO誘導後に発現が増加した。
- 2) 抗VEGF薬の投与によって、カニクイザルRVOモデルより採取した前房水に

においてVEGFの発現は減少したが、IL-6、MCP-1、ANG-1及びANG-2に対する影響は認められなかった。

- 3) カニクイザルCNVモデルの網膜OCT画像に見られるSHRMは線維性組織と共局在した。
- 4) カニクイザルCNVモデルにおいて、抗VEGF薬投与の有無に関わらず、SHRMの最大丈は線維性組織の面積と正の相関を示した。

以上、本検討では、カニクイザルを用いて網膜静脈閉塞症及び滲出型加齢黄斑変性に対する実験的動物モデルの確立を行った。これらのモデルではいずれも臨床に類似した所見が再現され、病態解明及び治療薬開発に有用であることが示唆された。具体的には、本モデルを用いることで、浮腫に関与する因子の解析並びに線維性組織を非侵襲的に評価することが可能となった。以上、本研究で確立した実験的動物モデルは、黄斑浮腫並びに線維瘢痕組織を伴う網脈絡膜血管疾患におけるトランスレーショナル研究に有用であると考えられる。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究を行うにあたり終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学 生体機能学大講座 薬効解析学研究室教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御親切なる御助言を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士、同講師 中村信介博士、バイオメディカルリサーチ寄付講座特任教授角崎英志博士並びに同特任助教大津航博士に深謝いたします。また、御協力と御助言を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室諸氏に心からの感謝の意を表します。

本論文の審査に当たり有益なる御指導・御助言を賜りました岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 薬物動態学研究室教授 北市 清幸博士、医療薬剤学大講座 臨床薬剤学研究室准教授 原 宏和博士及び医療薬剤学大講座 薬物治療学研究室准教授 位田 雅俊博士に深謝致します。

また、本研究の遂行に当たり、御支援を賜りました新日本科学株式会社沼田洋輔様、荒木智陽様に心から感謝の意を表します。

引用文献

1. Haupt, C., and Huber, A. B. (2008) How axons see their way--axonal guidance in the visual system. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 3136-3149
2. Celesia, G. G., and DeMarco, P. J., Jr. (1994) Anatomy and physiology of the visual system. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* **11**, 482-492
3. Bourne, R. R. A., Flaxman, S. R., Braithwaite, T., Cicinelli, M. V., Das, A., Jonas, J. B., Keeffe, J., Kempen, J. H., Leasher, J., Limburg, H., Naidoo, K., Pesudovs, K., Resnikoff, S., Silvester, A., Stevens, G. A., Tahhan, N., Wong, T. Y., and Taylor, H. R. (2017) Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Global health* **5**, e888-e897
4. Morizane, Y., Morimoto, N., Fujiwara, A., Kawasaki, R., Yamashita, H., Ogura, Y., and Shiraga, F. (2019) Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Japanese journal of ophthalmology* **63**, 26-33
5. Rogers, S., McIntosh, R. L., Cheung, N., Lim, L., Wang, J. J., Mitchell, P., Kowalski, J. W., Nguyen, H., and Wong, T. Y. (2010) The prevalence of retinal vein occlusion: pooled data from population studies from the United States, Europe, Asia, and Australia. *Ophthalmology* **117**, 313-319.e311
6. Klein, R., Klein, B. E., Moss, S. E., and Meuer, S. M. (2000) The epidemiology of retinal vein occlusion: the Beaver Dam Eye Study. *Transactions of the American Ophthalmological Society* **98**, 133-141; discussion 141-133
7. Ip, M., and Hendrick, A. (2018) Retinal Vein Occlusion Review. *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa.)* **7**, 40-45
8. Walsh, J., Sharareh, B., and Gallemore, R. (2016) Therapeutic effect of dexamethasone implant in retinal vein occlusions resistant to anti-VEGF therapy. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* **10**, 947-954
9. Labriola, L. T., and Sadda, S. R. (2011) Rapid resolution of macular edema associated with central retinal vein occlusion using ranibizumab after failure with multiple bevacizumab injections. *Seminars in ophthalmology* **26**, 387-391
10. Wolfe, J. D., Shah, A. R., Yonekawa, Y., Al Faran, A., Franklin, M. S., Abbey, A. M., and Capone, A., Jr. (2016) Receiver operating characteristic curve to predict anti-VEGF resistance in retinal vein occlusions and efficacy of Ozurdex. *European journal of ophthalmology* **26**, 168-173
11. Bhutto, I., and Lutty, G. (2012) Understanding age-related macular degeneration

- (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular aspects of medicine* **33**, 295-317
12. Fisher, C. R., and Ferrington, D. A. (2018) Perspective on AMD Pathobiology: A Bioenergetic Crisis in the RPE. *Investigative ophthalmology & visual science* **59**, Amd41-amd47
 13. Gheorghe, A., Mahdi, L., and Musat, O. (2015) AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. *Romanian journal of ophthalmology* **59**, 74-77
 14. Nowak, J. Z. (2006) Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacological reports : PR* **58**, 353-363
 15. Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G., and Wong, T. Y. (2012) Age-related macular degeneration. *Lancet (London, England)* **379**, 1728-1738
 16. Daniel, E., Toth, C. A., Grunwald, J. E., Jaffe, G. J., Martin, D. F., Fine, S. L., Huang, J., Ying, G. S., Hagstrom, S. A., Winter, K., and Maguire, M. G. (2014) Risk of scar in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology* **121**, 656-666
 17. Shimazawa, M., Nishinaka, A., and Hara, H. (2017) [Experimental techniques for animal models of retinal vein occlusion in mice]. *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* **150**, 293-297
 18. Kobayashi, H., Okamoto, H., Murakami, A., and Iwata, T. (2014) Plasma proteome analysis on cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigrees with early onset drusen formation. *Experimental animals* **63**, 305-310
 19. Noma, H., Funatsu, H., Yamasaki, M., Tsukamoto, H., Mimura, T., Sone, T., Jian, K., Sakamoto, I., Nakano, K., Yamashita, H., Minamoto, A., and Mishima, H. K. (2005) Pathogenesis of macular edema with branch retinal vein occlusion and intraocular levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6. *American journal of ophthalmology* **140**, 256-261
 20. Dedania, V. S., and Bakri, S. J. (2015) SUSTAINED ELEVATION OF INTRAOCULAR PRESSURE AFTER INTRAVITREAL ANTI-VEGF AGENTS: What Is the Evidence? *Retina (Philadelphia, Pa.)* **35**, 841-858
 21. Williams, D., and Argáez, C. (2019) CADTH Rapid Response Reports. In *Acute, Sustained, Intraocular Pressure increases following Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment for Retinal Conditions: A Review of Clinical Evidence and Guidelines*, Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health Copyright © 2019 Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health., Ottawa (ON)
 22. Khayat, M., Lois, N., Williams, M., and Stitt, A. W. (2017) Animal Models of Retinal Vein Occlusion. *Investigative ophthalmology & visual science* **58**, 6175-6192

23. Remtulla, S., and Hallett, P. E. (1985) A schematic eye for the mouse, and comparisons with the rat. *Vision research* **25**, 21-31
24. Onodera, H., Sasaki, S., Otake, S., Tomohiro, M., Shibuya, K., and Nomura, M. (2015) General considerations in ocular toxicity risk assessment from the toxicologists' viewpoints. *The Journal of toxicological sciences* **40**, 295-307
25. Wang, J., Deng, G., Li, W., Chen, Y., Gao, F., Liu, H., He, Y., and Shi, G. (2019) Deep learning for quality assessment of retinal OCT images. *Biomedical optics express* **10**, 6057-6072
26. Johannesen, S. K., Viken, J. N., Vergmann, A. S., and Grauslund, J. (2019) Optical coherence tomography angiography and microvascular changes in diabetic retinopathy: a systematic review. *Acta ophthalmologica* **97**, 7-14
27. Fuma, S., Nishinaka, A., Inoue, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Kondo, M., and Hara, H. (2017) A pharmacological approach in newly established retinal vein occlusion model. *Scientific reports* **7**, 43509
28. Hida, Y., Nakamura, S., Nishinaka, A., Inoue, Y., Shimazawa, M., and Hara, H. (2018) Effects of ripasudil, a ROCK inhibitor, on retinal edema and nonperfusion area in a retinal vein occlusion murine model. *Journal of pharmacological sciences* **137**, 129-136
29. Nishinaka, A., Fuma, S., Inoue, Y., Shimazawa, M., and Hara, H. (2017) Effects of kallidinogenase on retinal edema and size of non-perfused areas in mice with retinal vein occlusion. *Journal of pharmacological sciences* **134**, 86-92
30. Nishinaka, A., Inoue, Y., Fuma, S., Hida, Y., Nakamura, S., Shimazawa, M., and Hara, H. (2018) Pathophysiological Role of VEGF on Retinal Edema and Nonperfused Areas in Mouse Eyes With Retinal Vein Occlusion. *Investigative ophthalmology & visual science* **59**, 4701-4713
31. Nitta, K., Nishinaka, A., Hida, Y., Nakamura, S., Shimazawa, M., and Hara, H. (2019) Oral and ocular administration of crocetin prevents retinal edema in a murine retinal vein occlusion model. *Molecular vision* **25**, 859-868
32. Jonas, J. B., Monés, J., Glacet-Bernard, A., and Coscas, G. (2017) Retinal Vein Occlusions. *Developments in ophthalmology* **58**, 139-167
33. Kadomoto, S., Muraoka, Y., Ooto, S., Miwa, Y., Iida, Y., Suzuma, K., Murakami, T., Ghashut, R., Tsujikawa, A., and Yoshimura, N. (2018) EVALUATION OF MACULAR ISCHEMIA IN EYES WITH BRANCH RETINAL VEIN OCCLUSION: An Optical Coherence Tomography Angiography Study. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **38**, 272-282
34. Scott, I. U., VanVeldhuisen, P. C., Oden, N. L., Ip, M. S., Blodi, B. A., Hartnett, M. E.,

- and Cohen, G. (2011) Baseline predictors of visual acuity and retinal thickness outcomes in patients with retinal vein occlusion: Standard Care Versus Corticosteroid for REtinal Vein Occlusion Study report 10. *Ophthalmology* **118**, 345-352
35. Wyrsh, S., Baenninger, P. B., and Schmid, M. K. (2010) Retinal injuries from a handheld laser pointer. *The New England journal of medicine* **363**, 1089-1091
 36. Kim, S., Jo, H., Jeon, M., Choi, M. G., Hahn, S. K., and Yun, S. H. (2017) Luciferase-Rose Bengal conjugates for singlet oxygen generation by bioluminescence resonance energy transfer. *Chemical communications (Cambridge, England)* **53**, 4569-4572
 37. Naranjo, A., Pelaez, D., Arrieta, E., Salero-Coca, E., Martinez, J. D., Sabater, A. L., Amescua, G., and Parel, J. M. (2019) Cellular and molecular assessment of rose bengal photodynamic antimicrobial therapy on keratocytes, corneal endothelium and limbal stem cell niche. *Experimental eye research* **188**, 107808
 38. Campa, C., Alivernini, G., Bolletta, E., Parodi, M. B., and Perri, P. (2016) Anti-VEGF Therapy for Retinal Vein Occlusions. *Current drug targets* **17**, 328-336
 39. Hang, H., Yuan, S., Yang, Q., Yuan, D., and Liu, Q. (2014) Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy. *Molecular vision* **20**, 1137-1145
 40. Daruich, A., Matet, A., Moulin, A., Kowalczyk, L., Nicolas, M., Sellam, A., Rothschild, P. R., Omri, S., Gélizé, E., Jonet, L., Delaunay, K., De Kozak, Y., Berdugo, M., Zhao, M., Crisanti, P., and Behar-Cohen, F. (2018) Mechanisms of macular edema: Beyond the surface. *Progress in retinal and eye research* **63**, 20-68
 41. Na, J. H., Kook, M. S., Lee, Y., and Baek, S. (2012) Structure-function relationship of the macular visual field sensitivity and the ganglion cell complex thickness in glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science* **53**, 5044-5051
 42. Kim, J. H., Lee, H. S., Kim, N. R., Seong, G. J., and Kim, C. Y. (2014) Relationship between visual acuity and retinal structures measured by spectral domain optical coherence tomography in patients with open-angle glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science* **55**, 4801-4811
 43. Noma, H., Mimura, T., and Shimada, K. (2014) Role of inflammation in previously untreated macular edema with branch retinal vein occlusion. *BMC ophthalmology* **14**, 67
 44. Werner, J. U., Böhm, F., Lang, G. E., Dreyhaupt, J., Lang, G. K., and Enders, C. (2019) Comparison of foveal avascular zone between optical coherence tomography angiography and fluorescein angiography in patients with retinal vein occlusion.

PloS one **14**, e0217849

45. Balaratnasingam, C., Inoue, M., Ahn, S., McCann, J., Dhrami-Gavazi, E., Yannuzzi, L. A., and Freund, K. B. (2016) Visual Acuity Is Correlated with the Area of the Foveal Avascular Zone in Diabetic Retinopathy and Retinal Vein Occlusion. *Ophthalmology* **123**, 2352-2367
46. Díez-Sotelo, M., Díaz, M., Abraldes, M., Gómez-Ulla, F., M, G. P., and Ortega, M. (2019) A Novel Automatic Method to Estimate Visual Acuity and Analyze the Retinal Vasculature in Retinal Vein Occlusion Using Swept Source Optical Coherence Tomography Angiography. *Journal of clinical medicine* **8**
47. Low, A., Faridi, A., Bhavsar, K. V., Cockerham, G. C., Freeman, M., Fu, R., Paynter, R., Kondo, K., and Kansagara, D. (2019) Comparative effectiveness and harms of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor agents for three retinal conditions: a systematic review and meta-analysis. *The British journal of ophthalmology* **103**, 442-451
48. Rosenfeld, P. J., Brown, D. M., Heier, J. S., Boyer, D. S., Kaiser, P. K., Chung, C. Y., and Kim, R. Y. (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **355**, 1419-1431
49. Busbee, B. G., Ho, A. C., Brown, D. M., Heier, J. S., Suñer, I. J., Li, Z., Rubio, R. G., and Lai, P. (2013) Twelve-month efficacy and safety of 0.5 mg or 2.0 mg ranibizumab in patients with subfoveal neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **120**, 1046-1056
50. Lalwani, G. A., Rosenfeld, P. J., Fung, A. E., Dubovy, S. R., Michels, S., Feuer, W., Davis, J. L., Flynn, H. W., Jr., and Esquiabro, M. (2009) A variable-dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the PrONTO Study. *American journal of ophthalmology* **148**, 43-58.e41
51. Augsburger, M., Sarra, G. M., and Imesch, P. (2019) Treat and extend versus pro re nata regimens of ranibizumab and aflibercept in neovascular age-related macular degeneration: a comparative study. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **257**, 1889-1895
52. Wykoff, C. C., Croft, D. E., Brown, D. M., Wang, R., Payne, J. F., Clark, L., Abdelfattah, N. S., and Sadda, S. R. (2015) Prospective Trial of Treat-and-Extend versus Monthly Dosing for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: TREX-AMD 1-Year Results. *Ophthalmology* **122**, 2514-2522
53. Berg, K., Pedersen, T. R., Sandvik, L., and Bragadóttir, R. (2015) Comparison of ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration

- according to LUCAS treat-and-extend protocol. *Ophthalmology* **122**, 146-152
54. Rofagha, S., Bhisitkul, R. B., Boyer, D. S., Sadda, S. R., and Zhang, K. (2013) Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* **120**, 2292-2299
 55. Ishikawa, K., Kannan, R., and Hinton, D. R. (2016) Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration. *Experimental eye research* **142**, 19-25
 56. Shah, R. S., Soetikno, B. T., Lajko, M., and Fawzi, A. A. (2015) A Mouse Model for Laser-induced Choroidal Neovascularization. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e53502
 57. Cao, J., Zhao, L., Li, Y., Liu, Y., Xiao, W., Song, Y., Luo, L., Huang, D., Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J., and Wen, R. (2010) A subretinal matrigel rat choroidal neovascularization (CNV) model and inhibition of CNV and associated inflammation and fibrosis by VEGF trap. *Investigative ophthalmology & visual science* **51**, 6009-6017
 58. Hwang, J. C., Del Priore, L. V., Freund, K. B., Chang, S., and Iranmanesh, R. (2011) Development of subretinal fibrosis after anti-VEGF treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye* **42**, 6-11
 59. Gräfe, M. G. O., van de Kreeke, J. A., Willemsse, J., Braaf, B., de Jong, Y., Tan, H. S., Verbraak, F. D., and de Boer, J. F. (2020) Subretinal Fibrosis Detection Using Polarization Sensitive Optical Coherence Tomography. *Translational vision science & technology* **9**, 13
 60. Krzystolik, M. G., Afshari, M. A., Adamis, A. P., Gaudreault, J., Gragoudas, E. S., Michaud, N. A., Li, W., Connolly, E., O'Neill, C. A., and Miller, J. W. (2002) Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **120**, 338-346
 61. Nork, T. M., Dubielzig, R. R., Christian, B. J., Miller, P. E., Miller, J. M., Cao, J., Zimmer, E. P., and Wiegand, S. J. (2011) Prevention of experimental choroidal neovascularization and resolution of active lesions by VEGF trap in nonhuman primates. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **129**, 1042-1052
 62. Lichtlen, P., Lam, T. T., Nork, T. M., Streit, T., and Urech, D. M. (2010) Relative contribution of VEGF and TNF-alpha in the cynomolgus laser-induced CNV model: comparing the efficacy of bevacizumab, adalimumab, and ESBA105. *Investigative ophthalmology & visual science* **51**, 4738-4745

63. Riusala, A., Sarna, S., and Immonen, I. (2005) Visual acuity and structural findings in old age-related macular degeneration. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **243**, 947-950
64. Teodoro, W. R., de Jesus Queiroz, Z. A., Dos Santos, L. A., Catanozi, S., Dos Santos Filho, A., Bueno, C., Vendramini, M. B. G., Fernezlian, S. M., Eher, E. M., Sampaio-Barros, P. D., Pasoto, S. G., Lopes, F., Velosa, A. P. P., and Capelozzi, V. L. (2019) Proposition of a novel animal model of systemic sclerosis induced by type V collagen in C57BL/6 mice that reproduces fibrosis, vasculopathy and autoimmunity. *Arthritis research & therapy* **21**, 278
65. Cohen, S. Y., Oubraham, H., Uzzan, J., Dubois, L., and Tadayoni, R. (2012) Causes of unsuccessful ranibizumab treatment in exudative age-related macular degeneration in clinical settings. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **32**, 1480-1485
66. Barikian, A., Mahfoud, Z., Abdulaal, M., Safar, A., and Bashshur, Z. F. (2015) Induction with intravitreal bevacizumab every two weeks in the management of neovascular age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **159**, 131-137
67. Matsuda, Y., Nonaka, Y., Futakawa, S., Imai, H., Akita, K., Nishihata, T., Fujiwara, M., Ali, Y., Bhisitkul, R. B., and Nakamura, Y. (2019) Anti-Angiogenic and Anti-Scarring Dual Action of an Anti-Fibroblast Growth Factor 2 Aptamer in Animal Models of Retinal Disease. *Molecular therapy. Nucleic acids* **17**, 819-828
68. Soubrane, G. (2017) Macular Edema of Choroidal Origin. *Developments in ophthalmology* **58**, 202-219
69. Friedlander, M. (2007) Fibrosis and diseases of the eye. *The Journal of clinical investigation* **117**, 576-586
70. Little, K., Ma, J. H., Yang, N., Chen, M., and Xu, H. (2018) Myofibroblasts in macular fibrosis secondary to neovascular age-related macular degeneration - the potential sources and molecular cues for their recruitment and activation. *EBioMedicine* **38**, 283-291
71. Wynn, T. A. (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation* **117**, 524-529
72. Pham, B., Thomas, S. M., Lillie, E., Lee, T., Hamid, J., Richter, T., Janoudi, G., Agarwal, A., Sharpe, J. P., Scott, A., Warren, R., Brahmhatt, R., Macdonald, E., Straus, S. E., and Tricco, A. C. (2019) Anti-vascular endothelial growth factor treatment for retinal conditions: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open* **9**, e022031

73. Yang, S., Zhao, J., and Sun, X. (2016) Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug design, development and therapy* **10**, 1857-1867
74. Tuuminen, R., and Loukovaara, S. (2014) High intravitreal TGF- β 1 and MMP-9 levels in eyes with retinal vein occlusion. *Eye (London, England)* **28**, 1095-1099
75. Ahn, S. J., Park, K. H., and Woo, S. J. (2016) SUBRETINAL FIBROSIS AFTER ANTIVASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR THERAPY IN EYES WITH MYOPIC CHOROIDAL NEOVASCULARIZATION. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **36**, 2140-2149
76. Roy, S., Amin, S., and Roy, S. (2016) Retinal fibrosis in diabetic retinopathy. *Experimental eye research* **142**, 71-75
77. Hussain, R. M., and Ciulla, T. A. (2016) Treatment strategies for refractory diabetic macular edema: switching anti-VEGF treatments, adopting corticosteroid-based treatments, and combination therapy. *Expert opinion on biological therapy* **16**, 365-374
78. Green, W. R., and Enger, C. (1993) Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* **100**, 1519-1535
79. Jiao, C., Elliott, D., Spee, C., He, S., Wang, K., Mullins, R. F., Hinton, D. R., and Sohn, E. H. (2019) APOPTOSIS AND ANGIOFIBROSIS IN DIABETIC TRACTIONAL MEMBRANES AFTER VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR INHIBITION: Results of a Prospective Trial. Report No. 2. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **39**, 265-273
80. Jaffe, G. J., Ying, G. S., Toth, C. A., Daniel, E., Grunwald, J. E., Martin, D. F., and Maguire, M. G. (2019) Macular Morphology and Visual Acuity in Year Five of the Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* **126**, 252-260
81. Jaffe, G. J., Ciulla, T. A., Ciardella, A. P., Devin, F., Dugel, P. U., Eandi, C. M., Masonson, H., Monés, J., Pearlman, J. A., Quaranta-El Maftouhi, M., Ricci, F., Westby, K., and Patel, S. C. (2017) Dual Antagonism of PDGF and VEGF in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Phase IIb, Multicenter, Randomized Controlled Trial. *Ophthalmology* **124**, 224-234
82. Dansingani, K. K., Tan, A. C. S., Gilani, F., Phasukkijwatana, N., Novais, E., Querques, L., Waheed, N. K., Duker, J. S., Querques, G., Yannuzzi, L. A., Sarraf, D., and Freund, K. B. (2016) Subretinal Hyperreflective Material Imaged With Optical Coherence Tomography Angiography. *American journal of ophthalmology* **169**, 235-248

83. Leung, K. F. C., Downes, S. M., and Chong, V. (2018) A Retrospective Analysis of the Effect of Subretinal Hyper-Reflective Material and Other Morphological Features of Neovascular Age-Related Macular Degeneration on Visual Acuity Outcomes in Eyes Treated with Intravitreal Aflibercept over One Year. *Vision (Basel, Switzerland)* **2**
84. Cheung, C. M. G., Grewal, D. S., Teo, K. Y. C., Gan, A., Mohla, A., Chakravarthy, U., Wong, T. Y., and Jaffe, G. J. (2019) The Evolution of Fibrosis and Atrophy and Their Relationship with Visual Outcomes in Asian Persons with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology: Retina* **3**, 1045-1055
85. Balaskas, K., Ali, Z. C., Saddik, T., Gemenetzi, M., Patel, P., and Aslam, T. M. (2019) Swept-source optical coherence tomography angiography features of sub-retinal fibrosis in neovascular age-related macular degeneration. *Clinical & experimental ophthalmology* **47**, 233-239
86. Kawashima, Y., Hata, M., Oishi, A., Ooto, S., Yamashiro, K., Tamura, H., Miyata, M., Uji, A., Ueda-Arakawa, N., and Tsujikawa, A. (2017) Association of Vascular Versus Avascular Subretinal Hyperreflective Material With Aflibercept Response in Age-related Macular Degeneration. *American journal of ophthalmology* **181**, 61-70
87. Suzuki, T., Yoshinaga, N., and Tanabe, S. (2011) Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *The Journal of biological chemistry* **286**, 31263-31271
88. Stamatovic, S. M., Keep, R. F., Kunkel, S. L., and Andjelkovic, A. V. (2003) Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *Journal of cell science* **116**, 4615-4628
89. Stamatovic, S. M., Dimitrijevic, O. B., Keep, R. F., and Andjelkovic, A. V. (2006) Protein kinase C α -RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability. *The Journal of biological chemistry* **281**, 8379-8388
90. Yun, J. H., Han, M. H., Jeong, H. S., Lee, D. H., and Cho, C. H. (2019) Angiopoietin 1 attenuates interleukin-6-induced endothelial cell permeability through SHP-1. *Biochemical and biophysical research communications* **518**, 286-293
91. Pizurki, L., Zhou, Z., Glynos, K., Roussos, C., and Papapetropoulos, A. (2003) Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *British journal of pharmacology* **139**, 329-336
92. Echevarria, F. D., Formichella, C. R., and Sappington, R. M. (2017) Interleukin-6 Deficiency Attenuates Retinal Ganglion Cell Axonopathy and Glaucoma-Related Vision Loss. *Frontiers in neuroscience* **11**, 318
93. Krishnan, A., Kocab, A. J., Zacks, D. N., Marshak-Rothstein, A., and Gregory-Ksander, M. (2019) A small peptide antagonist of the Fas receptor inhibits

- neuroinflammation and prevents axon degeneration and retinal ganglion cell death in an inducible mouse model of glaucoma. *Journal of neuroinflammation* **16**, 184
94. Sun, L., Li, Y., Jia, X., Wang, Q., Li, Y., Hu, M., Tian, L., Yang, J., Xing, W., Zhang, W., Wang, J., Xu, H., Wang, L., Zhang, D., and Ren, H. (2017) Neuroprotection by IFN- γ via astrocyte-secreted IL-6 in acute neuroinflammation. *Oncotarget* **8**, 40065-40078
 95. Gruol, D. L., Huitron-Resendiz, S., and Roberts, A. J. (2018) Altered brain activity during withdrawal from chronic alcohol is associated with changes in IL-6 signal transduction and GABAergic mechanisms in transgenic mice with increased astrocyte expression of IL-6. *Neuropharmacology* **138**, 32-46
 96. Zeng, Y., Cao, D., Yu, H., Zhuang, X., Yang, D., Hu, Y., He, M., and Zhang, L. (2019) Comprehensive analysis of vitreous chemokines involved in ischemic retinal vein occlusion. *Molecular vision* **25**, 756-765
 97. Shchuko, A. G., Zlobin, I. V., Iureva, T. N., Ostanin, A. A., Chernykh, E. R., and Mikhalevich, I. M. (2015) Intraocular cytokines in retinal vein occlusion and its relation to the efficiency of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Indian journal of ophthalmology* **63**, 905-911
 98. Matsuda, T., Noda, K., Murata, M., Kawasaki, A., Kanda, A., Mashima, Y., and Ishida, S. (2017) Vascular Adhesion Protein-1 Blockade Suppresses Ocular Inflammation After Retinal Laser Photocoagulation in Mice. *Investigative ophthalmology & visual science* **58**, 3254-3261
 99. Kovacs, A., Kiss, T., Rarosi, F., Somfai, G. M., Facsko, A., and Degi, R. (2018) The effect of ranibizumab and aflibercept treatment on the prevalence of outer retinal tubulation and its influence on retreatment in neovascular age-related macular degeneration. *BMC ophthalmology* **18**, 298
 100. Maruyama-Inoue, M., Sato, S., Yamane, S., and Kadonosono, K. (2018) Variable response of subretinal hyperreflective material to anti-vascular endothelial growth factor classified with optical coherence tomography angiography. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **256**, 2089-2096
 101. Keane, P. A., Patel, P. J., Liakopoulos, S., Heussen, F. M., Sadda, S. R., and Tufail, A. (2012) Evaluation of age-related macular degeneration with optical coherence tomography. *Survey of ophthalmology* **57**, 389-414
 102. Shah, V. P., Shah, S. A., Mrejen, S., and Freund, K. B. (2014) Subretinal hyperreflective exudation associated with neovascular age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **34**, 1281-1288
 103. Sahoo, N. K., Govindhari, V., Bedi, R., Goud, A., Singh, R., Wu, L., and Chhablani, J.

(2020) Subretinal hyperreflective material in central serous chorioretinopathy.
Indian journal of ophthalmology **68**, 126-129

略語一覽表

ANG-1	angiopoietin-1
ANG-2	angiopoietin-2
AMD	age-related macular degeneration
AO	Adaptive ooptis
CNV	choroidal neovascularization
CTGF	connective tissue growth factor
EGF	epidermal growth factor
FGF	fibroblast growth factor
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
OCT	optical coherence tomography
OCT-A	optical coherence tomography angiography
PDGF	platelet-derived growth factor
RPE	retinal pigment epithelium
RVO	retinal vein occlusion
TGF- β	transforming growth factor- β
VEGF	vascular endothelial growth factor