慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	加齢黄斑変性に対する光線力学的療法(PDT)の眼組織変化の分子メカニズムの解析
Sub Title	Molecular mechanisms of ocular tissue in photodynamic therapy for age-related macular degeneration
Author	鈴木, 美砂(Suzuki, Misa) 小澤, 洋子(Ozawa, Yoko)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	我々はPDT(光線力学療法)後の抗VEGF(血管内皮増殖因子)剤投与の時期により、網膜への影響が異なるのかを組織学的に免疫染色を用いて解析した。その結果、PDT後の抗VEGF製剤は投与時期により、アポトーシスを引き起こすことが解明された。さらに、アポトーシを引き起こすサイトカインの発現をみる事により、PDT直後に発現するVEGFはPDTによって障害される神経網膜の修復メカニズムに関与することが分かった。本研究結果は今後も出てくる新薬との併用においても大変有意義な情報であり、近年罹患率が増加傾向にあり、我が国の中途失明率の上位をしめる疾患である加齢黄斑変性の治療において重要な結果であると考える。 Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs and/or photodynamic therapy (PDT) constitute current treatments targeting pathological vascular tissues in age-related macular degeneration. Concern that PDT might induce VEGF and exacerbate the disease has led us to current practice of using anti-VEGF drugs with PDT simultaneously. However, the underlying molecular mechanisms of these therapies are not well understood. We performed PDT on normal, intact mouse retina, using a laser level below the damage threshold for normal tissue, and analyzed VEGF expression. We also studied the histological consequences of suppressing VEGF function after PDT, and examined the activation of a downstream component of the VEGF signal. The immediate and transient induction of VEGF in response to PDT is neuroprotective and is required for photoreceptor cell survival. Combined therapy may promote photoreceptor cell death and visual function impairment, based on our results.
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2011～2013 課題番号：23592587 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23592587seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　５　月　３０　日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５９２５８７

研究課題名（和文）加齢黄斑変性に対する光線力学的療法（ＰＤＴ）の眼組織変化の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of ocular tissue in photodynamic therapy for age-related macular degeneration

研究代表者
鈴木　美砂（Misa, Suzuki）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：３０４０４９６６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円、（間接経費）　　1,230,000円

研究成果の概要（和文）：我々はPDT(光線力学療法)後の抗VEGF（血管内皮増殖因子）剤投与の時期により、網膜への影響が異なるのかを組織学的に免疫染色を用いて解析した。その結果、PDT後の抗VEGF製剤は投与時期により、アポトーシスを引き起こすことが解明された。さらに、アポトーシを引き起こすサイトカインの発現をみる事により、PDT直後に発現するVEGFはPDTによって障害される神経網膜の修復メカニズムに関与することが分かった。本研究結果は今後も出てくる新薬との併用においても大変有意義な情報であり、近年罹患率が増加傾向にあり、我が国の中途失明率の上位をしめる疾患である加齢黄斑変性の治療において重要な結果であると考える。

研究成果の概要（英文）：Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs and/or photodynamic therapy (PDT) constitute current treatments targeting pathological vascular tissues in age-related macular degeneration. Concern that PDT might induce VEGF and exacerbate the disease has led us to current practice of using anti-VEGF drugs with PDT simultaneously. However, the underlying molecular mechanisms of these therapies are not well understood.
We performed PDT on normal, intact mouse retina, using a laser level below the damage threshold for normal tissue, and analyzed VEGF expression. We also studied the histological consequences of suppressing VEGF function after PDT, and examined the activation of a downstream component of the VEGF signal. The immediate and transient induction of VEGF in response to PDT is neuroprotective and is required for photoreceptor cell survival.
Combined therapy may promote photoreceptor cell death and visual function impairment, based on our results.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：加齢黄斑変性　光線力学療法　抗血管新生療法　VEGF　脈絡膜新生血管　AMD　PDT　神経保護

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)は、先進国における高齢者の主要な失明原因の一つであり、現代の高齢化社会における重要な疾患の一つである。AMD の本態は、脈絡膜血管新生(choroidal neovascularization: CNV)であり、その滲出性変化が、神経網膜を障害して、視機能低下を引き起こす。そこで、CNV の閉塞・消退、もしくは CNV からの滲出性変化の抑制が治療目標とされてきた。そのために開発されたのが光線力学的療法 (photodynamic therapy: PDT)であり、日本では 2004 年に認可が下り、急速に普及した。

(2) PDT は、静脈内に注射されたベルテポルフィンが、CNV に集積したところでレーザーにより光活性化され、酸化ストレス・炎症を発生させて CNV を閉塞させる。ベルテポルフィンは、主に CNV に集積するはずであるが、網膜血管にも存在しうるので、網膜内でも酸化ストレス・炎症反応をきたしうる。血管閉塞はさらに、組織の酸化ストレス・炎症反応を生じうる。これは周囲組織に様々な影響を及ぼす可能性がある。

(3) PDT の治療後にはよい視力を望み難いのが実情である (Wormald et al. Cochrane Database Syst Rev. 2007) 。その一因が、PDT 施行後の網膜萎縮である。光干渉断層計 (Optical Coherence Tomography：OCT)で網膜の菲薄化が観察されることも知られる。網膜萎縮は上述の PDT に伴う酸化ストレス・炎症反応により生じうる副作用であり、視機能を障害しうる。しかし、その分子メカニズムは不明の点が多い。

(4)今回、PDT の正常網膜への影響を分子レベルで解析することとした。将来的には、この情報を元に、神経保護治療法を開発し、その併用を含めた PDT の効果的適応法の開発を目的とする。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)は先進国における高齢者の主要な失明原因の一つである。光線力学的療法(photodynamic therapy: PDT)は、AMD の本態である脈絡膜血管新生(choroidal neovascularization: CNV)の閉塞を目的に行われ、広く普及した治療法である。しかし、一般に施行後の視力予後は限定的とされ、その一因に網膜萎縮の誘発がある。本研究では、この PDT の副作用の分子メカニズムを明らかにし、網膜神経保護療法等の併用療法の開発につなげることを目的とする。

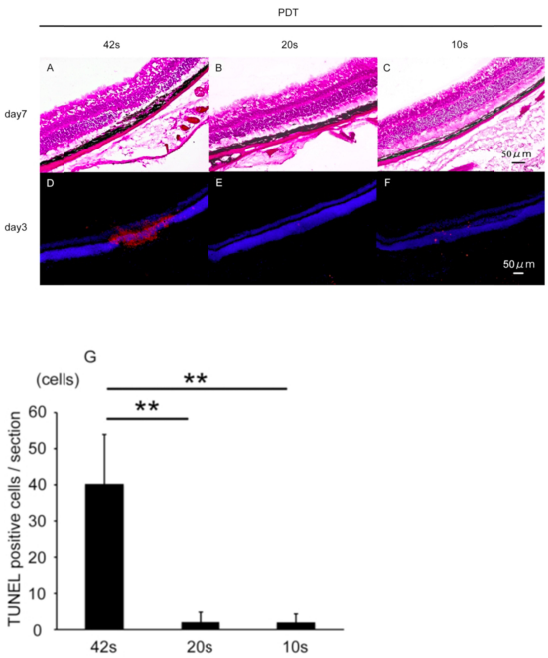
3. 研究の方法

マウス静脈内にベルテポルフィンを注射し、細隙灯顕微鏡を用いてレーザー照射することで PDT を施行する。PDT 施行後経時的にサンプルを採取して、組織染色・イムノブロット法・RT-PCR 法等を用いて、組織学的および分子生物学的に解析する。また、PDT に伴い、抗 VEGF 製剤等を硝子体内投与した際の変化を、同様の手法で解析する。

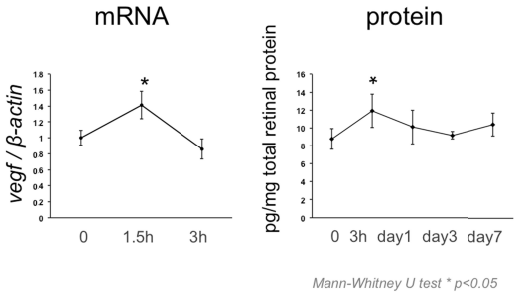
4. 研究成果

(1)マウス網膜における PDT 照射の影響

PDT 7 日後の Hematoxylin-eosin 染色(A-C)において PDT 照射 42 秒では照射部位の ONL(外顆粒層)の菲薄化が見られた（A）が、照射時間 20 秒と 10 秒では ONL 明らかな変化がみられなかった。(B,C). PDT 照射 3 日後の網膜切片(D-G)における TUNEL（赤）、Hoechst（青)染色。42 秒間 PDT 照射した部位では ONL における TUNEL 陽性細胞がみられた（D)。20 秒、30 秒では数個の TUNEL 陽性細胞が見られた(E,F)。各群における TUNEL 陽性細胞数（G). Scale bar, 50 μm. **p<0.01

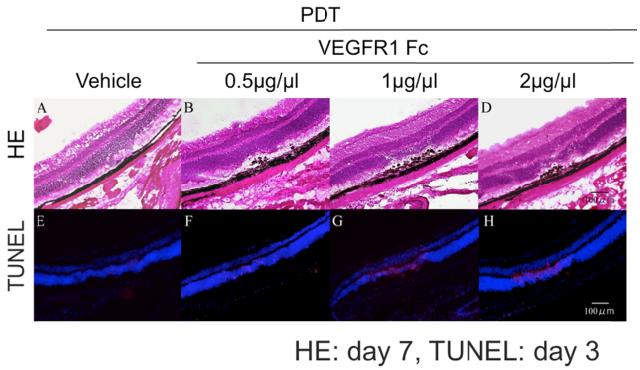


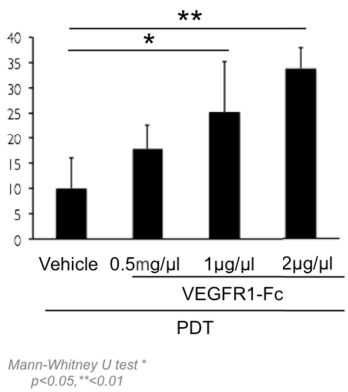
(2) PDT 照射後神経網膜への影響



PDT 後の神経網膜における m-RNA レベルは照射 1.5 時間後に上昇し、蛋白レベルは 3 時間後に上昇した。

(3) PDT 照射後における VEGF 抑制の影響





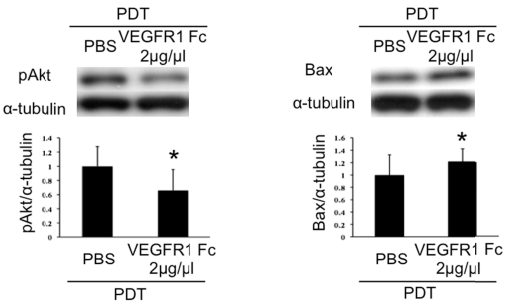
PDT 後に VEGF の発現が上昇したところで PDT 直後に VEGF を抑制し、その網膜切片を解析した。

HE 染色において、PDT 照射直後に VEGF を抑制した群では、７日後に光受容対細胞層の著しい傷害が見られた。(B-D). TUNEL 陽性細胞は、PDT 照射直後に VEGF を抑制した群では、PDT 3

日後に著しく増加した。(F-H).

TUNEL 陽性細胞は VEGF 阻害薬の濃度依存性に増加した。

(4) VEGF 抑制における AKT と BAX の影響



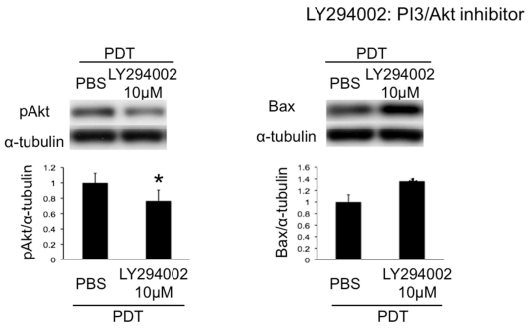
*Mann-Whitney U test * p<0.05*

(5) AKT 活性と BAX における VEGF の影響

次にイムノブロット解析で PDT による Akt 活性における VEGF の影響を解析した。活性化 Akt は Vehicle(PBS)投与群に比較して VEGF 抑制剤投与群で低下しており、VEGF 抑制は Akt 活性を抑制している事が分かった。一方、ミトコンドリア関連アポトーシス蛋白である BAX レベルは PDT 併用で VEGF 抑制した時に著しく上昇した。

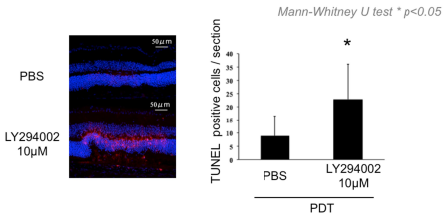
(6) PDT 後の AKT 阻害の影響

次に Akt 抑制が PDT 後の光受容体細胞のアポトーシスを引き起こすかどうか調べるため、Akt 上流シグナルの PI3K 阻害や区である LY294002 を PDT 直後に硝子体内注射した。イムノブロット解析にて PI3K/Akt 阻害薬注射群では PDT 1 日後の Akt の抑制が認められた。一方、同じ網膜で BAX の上昇は見られなかった。



*Mann-Whitney U test * p<0.05*

(7) PDT 後における AKT 抑制の影響(TUNEL)



PDT 3 日後の TUNEL 陽性細胞数は PI3K 阻害薬で AKT を抑制すると増加した。これより VEGF の神経網膜保護の役割は AKT 活性と次におこる BAX の抑制を介していた。

以上より PDT 後の一過性で急峻な VEGF の上昇は神経保護であり、光感受性細胞の保護に必要であった。

5. 主な発表論文等

［論文雑誌］（計2件）

1) Suzuki M, Ozawa Y, Kubota S, Hirasawa M, Miyake S, Noda K, Tsubota K, Kadonosono K, Ishida S. Neuroprotective response after photodynamic therapy: role of vascular endothelial growth factor. J Neuroinflammation. 2011 Dec 16;8:176.

doi: 10.1186/1742-2094-8-176.(査読あり)

2) Misa Suzuki, Takayoshi Suzuki, Aoi Nagano, Manabu Hirasawa, Kenichi Sakuyama, Nobuhisa Mizuki. Cyclooxygenase inhibitor improved an exudative lesion of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration.European journal of ophthalmology 07/2011; 22(3):495-8. (査読あり)

［学会発表］（計3件）

1) Histological changes after photodynamic therapy (PDT) combined with anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) therapy in the mouse retina. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2012 Annual Meeting. May 6 - 10, 2012; Fort Lauderdale, Florida, USA.

2) 光線力学的療法に伴う血管内皮増殖因子の発現亢進の生物学的意義　鈴木 美砂、久保田 俊介、平沢 学、三宅 誠二、野田 航介、石田 晋、小沢 洋子、坪田 一男 日本眼科学会 2012年4月5日～2012年4月08日 東京 日本

3) Neuroprotective response after photodynamic therapy: Role of vascular endothelial growth factor. M. Suzuki, Y. Ozawa, S. Kubota, M. Hirasawa, S. Miyake, T. Narimatsu. K. Noda, K. Tsubota, K. Kadonosono, S. Ishida. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2011 Annual Meeting. May 1 - 5, 2011; Fort Lauderdale, Florida, USA.

6.研究組織

1）研究代表者

鈴木　美砂　（Misa Suzuki）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号 30404966

2）研究分担者

小澤　洋子（Yoko Ozawa）

慶應義塾大学・医学部・ 講師

研究者番号 90265885