

表 題 滲出性加齢黄斑変性に対する抗 VEGF 療法における
前房中サイトカインと治療効果

論文の区分 論文博士

著 者 名 新井 悠介

所 属 自治医科大学 眼科学講座

2021年 2月 15日申請の学位論文

紹介教員 地域医療医学系 専攻 皮膚・感覚器疾患学眼科
職名・氏名 教授・川島秀俊

目次

1	はじめに	2 頁
2	目的と方法	8 頁
3	結果	12 頁
4	考按	21 頁
5	結論	28 頁
6	謝辞	29 頁
7	参考文献	29 頁

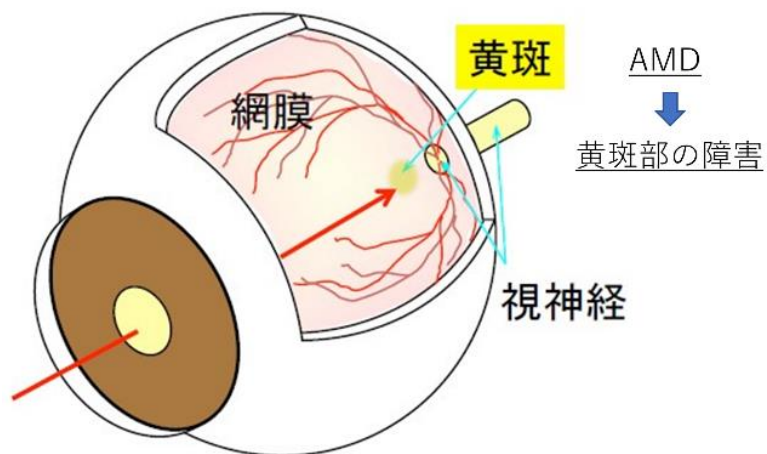
1. はじめに

眼球は、外膜である強膜・角膜により中膜（ぶどう膜）と内膜（網膜）が保護される構造になっている。光受容機能を有する網膜は層状構造をしており、神経網膜としての9層と色素上皮合わせて10層からなる。神経網膜の最外層に位置する錐体細胞や杆体細胞などの視細胞に視覚情報は受容され、最終的に後頭葉視中枢に伝達・処理され、「見える」感覚として認識される。眼内に入射した光線が焦点を結ぶ中心窩は視神経乳頭を中心から4,000 μ m外側、800 μ m下方に位置し、光を遮る神経線維層や血管がなく、錐体細胞のみが存在しているため最良の視機能が得られる構造となっている。解剖学的には黄斑は「中心窩を中心に直径6,000 μ mの円の中」と定義されるが、視機能に最も重要な部位であると同時に疾患を生じやすい部位でもある。黄斑部が障害されると重篤な視力低下、変視、中心暗点などの症状が出現する。そのような黄斑疾患には黄斑上膜、黄斑円孔、黄斑ジストロフィーなど様々あるが、その中で加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)は中心視力が低下する進行性の疾患で中途失明の主要な原因のひとつである[1]。(図1)世界の失明原因第3位であり全世界で1億7千万人罹患していると言われ、高齢化に伴い今後も患者数の増加が見込まれている[2]。本邦でも失明原因第3位であり、高齢化と食生活の欧米化に伴い有病率が上昇している[3,4]。

AMDは、網膜色素上皮直下に生じるドルーゼンと呼ばれる老廃物の沈着や網膜色素上皮の異常などの前駆病変から滲出型と萎縮型へ進行する[5]。近年の研究により病態

の背景は網膜色素上皮とブルッフ膜の慢性的な炎症が原因であるとされている。つまり、視細胞代謝物質の残渣からなる老化色素リポフスチンの網膜色素上皮への沈着を背景にした慢性的な網膜色素上皮の機能不全がドレーゼンなどの前駆病変の形成を促進し [6, 7]、さらに進行すると脈絡膜から新生血管が生じると推定されている (図 2)。

(A)



(B)

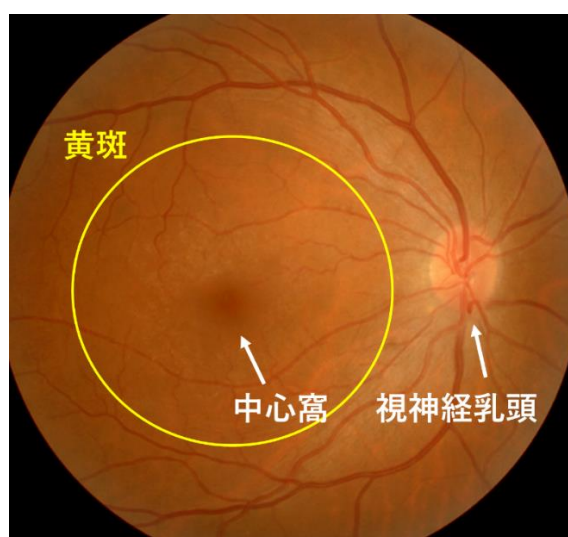


図1：眼球の構造。(A)光が眼内に入ると網膜の中心部である黄斑で光を受容し視神経を経て後頭葉へ伝達される。加齢黄斑変性はこの黄斑部が障害される。(B)網膜後極部の眼底写真。黄色の円で囲われた範囲が黄斑部でその中心を中心窩と呼ぶ

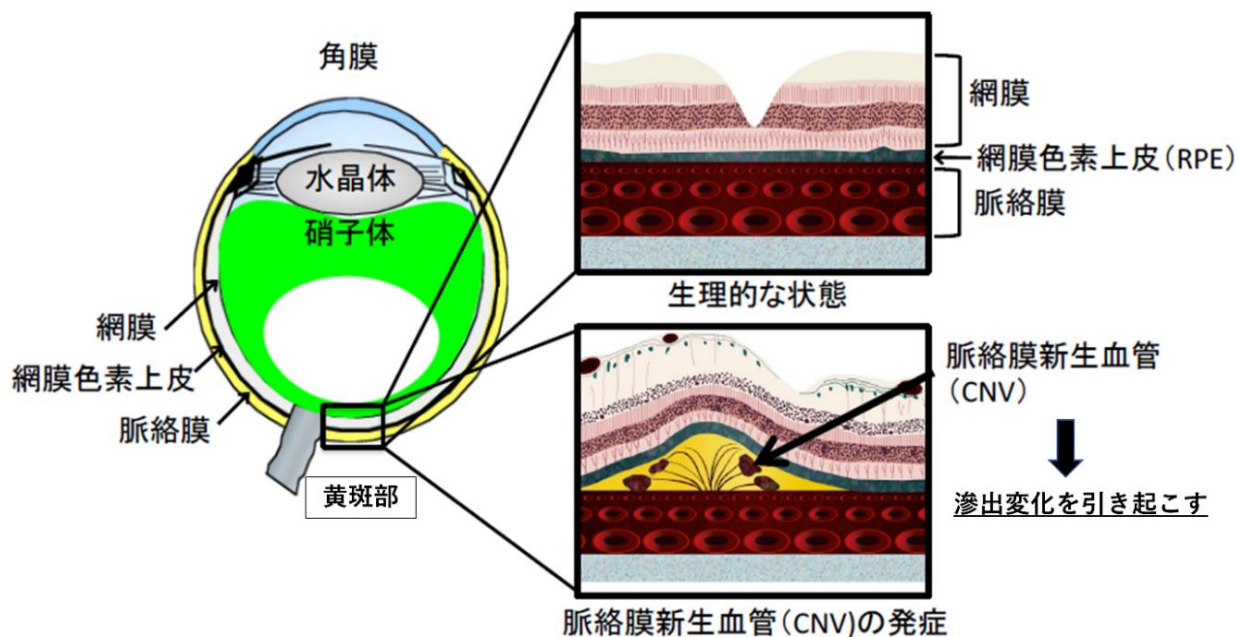


図2：眼球及び網膜脈絡膜断面図。黄斑部に脈絡膜新生血管が発症すると滲出変化を引き起こす。

萎縮型 AMD は視細胞と網膜色素上皮細胞の萎縮を呈し[8]、滲出型 AMD は黄斑部に脈絡膜新生血管が生じる進行性の疾患で[1]、典型 AMD とポリープ状脈絡膜新生血管 (polypoidal choroidal vasculopathy: PCV) および網膜内血管腫状増殖 (retinal angiomatous proliferation: RAP) に分類される[9, 10]。脈絡膜新生血管による滲出変化によって網膜色素上皮剥離、漿液性網膜剥離、網膜下出血、嚢胞様黄斑浮腫、硬性白斑、網膜内出血、網膜下線維性瘢痕組織の形成など様々な所見を呈する[1] (図3)。

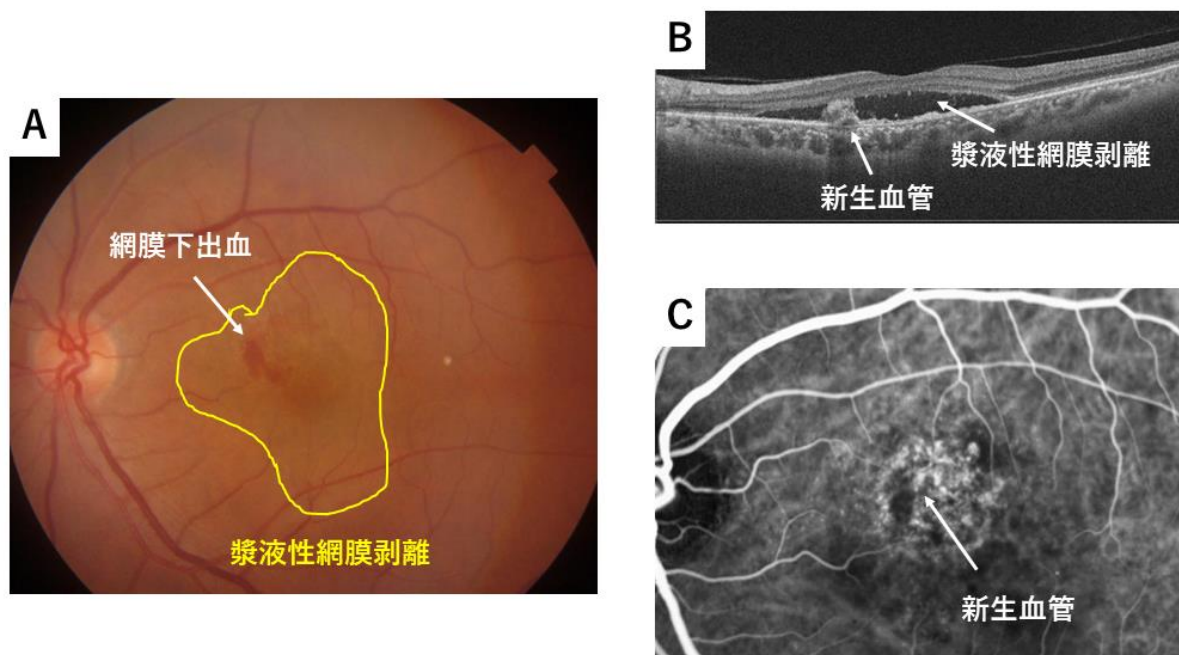


図3：滲出型AMDの臨床像。(A) 後極部の眼底写真。黄色い線で囲われた範囲に漿液性網膜剥離を認める。中心窩の横に赤い網膜下出血を認める。(B) 光干渉断層計写真。新生血管と漿液性網膜剥離を認める。(C) フルオロセイン蛍光眼底造影検査。新生血管を認める。(→)

これらによって惹起された視力低下は不可逆的であり、重篤な視力低下を来す原因となる[11]。新生血管を発生・進展させる血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) に対する抗体を硝子体中に注入する治療 (抗 VEGF 治療) が [12-14]、滲出型 AMD に対して視力の改善・維持ができることが大規模臨床試験で示され [15-17]、治療の第一選択となる。初期の大規模臨床試験である MARINA 試験 [16]、ANCHOR 試験 [15] では、抗 VEGF 薬 (ranibizumab) の毎月投与が行われたが、抗 VEGF 薬の投与は眼内炎などの局所副作用や脳卒中などの全身副作用のリスク

がありうる[18, 19]。さらに承認された抗 VEGF 薬は高額であり患者の経済的負担が大きい。また、疾患活動性が患者ごとに異なるため、画一的な毎月投与では多くの患者にとって過剰治療になると考えられている。このことから、実臨床では治療回数を減らし同等の効果が得るための投与方法の検討がなされた。なかでも、大規模臨床試験にて治療開始後 3 か月で視力が大きく改善し、疾患の活動性が抑制され、その後 24 か月まで視力を維持していたことに着目し、治療開始後 3 か月を導入期として毎月 1 回連続 3 回投与を行い、その後、維持期として毎月検査を行い、滲出性変化の出現時に治療を行う *pro re nata* (PRN)法が広く検討され使用されるようになった (図 4)。

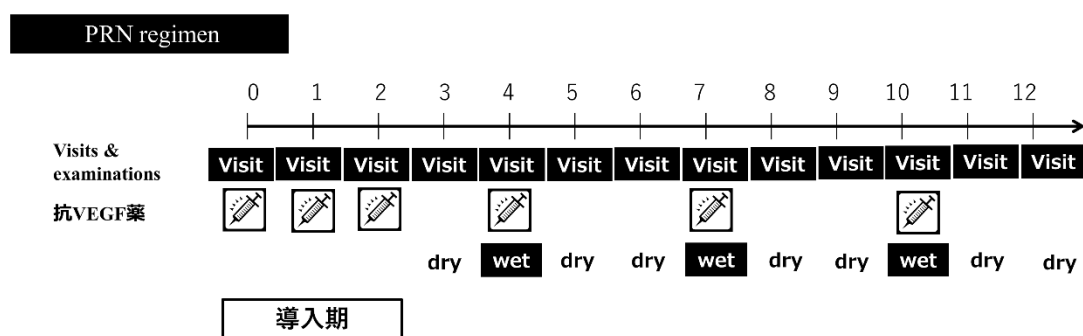


図 4：PRN 法。導入期として毎月 1 回 3 回投与を行い、その後、維持期として毎月受診し滲出変化を認めた場合に硝子体注射を行う。

このうち、わずかな滲出性変化でも厳格に投与し、疾患活動性の抑制を行った HARBOR 試験では[20]、治療開始後 2 年間は維持期の PRN 法に毎月投与と同等の視力維持効果があることが示された。しかし、その後、実臨床で行われた多くの PRN 法の報告では

治療不足が原因で視力が低下していた[21]。また、治療に対する反応が患者ごとに異なるため、治療反応に対する指標の確立と個別化医療を確立することが今後の重要な課題となっている。

滲出型AMDにおける血管新生と血管透過性亢進は主に VEGF と炎症性サイトカインが原因であることが知られている[22]。炎症促進作用がある monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、monokine induced by INF- γ (MIG)、transforming growth factor beta (TGF- β)、VEGF が正常眼と比較し滲出型 AMD では上昇していると報告されている[23]。血管新生を促進・阻害する因子と治療効果との関連を調べる研究が行われており、前房中サイトカイン濃度が抗 VEGF 治療において効果の良否を予測するのに有用である可能性が示されている[24-26]。しかし、実臨床において治療前の前房中サイトカイン濃度が治療予後を予測する上でどのような価値があるのかについては依然として議論がある。近年の研究では、治療開始前のベースラインではなく、抗 VEGF 治療導入期が終了してからの疾患活動性の評価が長期的な治療効果を予測するうえで重要であることが強調されている[27-32]。同様に臨床所見に加えて治療開始のベースライン時だけでなく導入期後の前房中サイトカイン濃度を調べることは、治療効果の予測に有用であると考えられる。

上述の様に、前房中サイトカイン濃度が視力予後との検討は重要な課題であると考えられる。しかし、現在のところ、治療前の前房中サイトカイン濃度とベースライン視力・

治療によって変化した前房中サイトカイン濃度と治療予後の関係を調べた研究は報告されていない。そこで我々は、抗 VEGF 治療導入期後の前房中各種サイトカイン濃度が、ベースラインと比較しどのように変化しているかを調査し[33]、治療開始 2 か月では MMP-9 のみ上昇し、その他の各種サイトカイン濃度は低下する、という結果を得た。その結果を以て、ベースライン時と導入期後の前房中サイトカイン濃度を用いて、滲出型 AMD に対する抗 VEGF 治療の治療効果が予測できるのではないかとこの予想を立てた。

2. 目的と方法

本研究では、前述の予想を検証すべく、治療開始のベースライン時と治療中の前房中サイトカイン濃度を用いて、滲出型 AMD に対する抗 VEGF 治療の治療効果を予測可能かどうか検証することを目的とした。

【対象・臨床検査】

対象は 2010 年 11 月から 2012 年 8 月までに JCHO 東京新宿メディカルセンターを受診した未治療の滲出型 AMD 患者に対し 3 か月連続で抗 VEGF 薬 (ranibizumab) 硝子体注射を受け 1 年以上治療した 48 例 48 眼。緑内障やぶどう膜炎などの他の眼科疾患を有する症例は除外した。JCHO 東京新宿メディカルセンターの倫理委員会で本試験は承認され、全例から文章で同意を得た。1 回目、3 回目の抗 VEGF 薬投与前に約 0.2ml の前房水を採取し、採取後速やかに低タンパク質吸着滅菌チューブに入れ、それをすぐ

にドライアイスの入った BOX で冷凍した。その後、解析まで-80°Cで保存した。マルチプレックスサイトカインアッセイキット (Affymetrix、サンタクララ、カリフォルニア州) を用いて下記のサイトカイン濃度を測定した。濃度を測定した前房中サイトカインを以下に列挙する。これらは AMD と関連があるとされるサイトカインの報告や我々の過去の報告をもとに選定した[34,35]。C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) / monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), C-C motif chemokine ligand 11 (CCL11) / Eotaxin, C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1) / growth related oncogene α (GRO α), C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) / interferon-inducible protein 10 (IP-10), C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12) / Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), C-X-C motif chemokine ligand 13 (CXCL13) / B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)。各サイトカインの測定限界は順に 0.95, 0.43, 1.25, 2.76, 2.87, 0.76, 0.41, 0.15, 0.57pg/mL であった。測定はそれぞれのサンプルで 2 回行い、平均値を計算した。濃度が検出限界よりも低い場合は最小検出限界の半分の濃度を代入した。また前房中サイトカイン濃度は硝子体中サイトカイン濃度を確実に反映しないことが報告されているため[36]、前房水と同時に採取された 5 つの硝子体液サンプルを用いて 9 つのサイトカイン濃度を予備的に調べ、今回の 9 つのサイトカインにおいて前房中サイトカイン濃度が硝子体中サイトカイン濃度を反映していることを確認した。

VEGF 濃度は ELISA キット (R&D Systems、ミネアポリス、ミネソタ州) を使用して測定した。測定限界は 2.2pg/mL であった。最初にサンプルをマルチプルサイトカインアッセイで解析したのち、残りのサンプルで ELISA を行ったので、初回注射時の 29 例 (60%) のみ VEGF 濃度を測定することができた。

典型的 AMD、PCV、および RAP を診断するために[9, 10, 37]、フルオレセインとインドシアニングリーン血管造影を施行した。(ただし、薬物アレルギー、肝機能障害、または直近の脳血管イベントによる禁忌を除いた) [33]。眼軸長の測定には、A モード超音波断層計 (UD-6000; トーメーコーポレーション、愛知、日本) を用いた。また過去の報告と同様に[35,38-42]、B モード超音波検査 (UD-6000) を使用して後部硝子体剥離 (posterior vitreous detachment: PVD) を検査し PVD ありとなしのグループに分類した。すべての患者は、4 週間ごとに連続 3 回の ranibizumab (0.5 mg / 0.05 mL) 注射を受けた後、毎月 1 回の経過観察を行い、滲出変化を認めた場合に ranibizumab を再投与した[28]。初診時とその後の診察毎に 5m 先のランドルト環を使用して最高矯正視力 (best-corrected visual acuity: BCVA) を測定し、光干渉断層計 (optical coherence tomography: OCT; CirrusHD-OCT モデル 4000; Carl Zeiss Meditec AG、オーバーコッヘン、ドイツ) で撮影した。OCT による定性的評価に基づいて再治療が行われ、網膜浮腫・滲出性網膜剥離・網膜出血が観察された場合は ranibizumab を再投与した。再治療基準に BCVA 低下は含まなかった。BCVA は、ランドルト環で測定した最小角

(minimum angle of resolution: MAR) の対数をとった logMAR 視力に変換し統計解析した。最大病変直径 (greatest liner dimension: GLD) は、フルオレセイン血管造影検査の結果に基づいて決定した。罹病期間は患者の症状に基づいて決定した。中心窩網膜厚 (central retinal thickness: CRT) は内境界膜とブルッフ膜の間の距離、中心窩脈絡膜厚 (central choroidal thickness: CCT) はブルッフ膜から脈絡膜と強膜の境界までの距離と定義した。厚さは、OCT のキャリパー機能を使用して中心窩で手動にて測定した。

【統計解析】

統計ソフト JMP (SAS institute、米国) を用いて統計解析した。視力および中心窩網膜厚の治療前との比較は対応のある student's t 検定を用いて解析した。対数に変換したサイトカイン濃度を含む治療前の因子と対数に変換したサイトカイン濃度、視力および CRT 変化の関連は、連続変数の各因子をシャピロ-ウィルクの W 検定で正規分布を確認後、ピアソンの相関係数を算出し、カテゴリ変数を含む場合はスピマンの rho を算出した。多変量解析は、ベースライン BCVA、12 か月での BCVA の変化、ranibizumab 注射回数、および CRT と CCT (ベースラインから 2 か月の変化) を応答変数として解析した。病型、罹病期間 (月)、性別、年齢、眼軸長 (mm)、PVD の有無、GLD (μm)、CRT (μm)、CCT (μm)、BCVA、および前房中サイトカインの各対数濃度を予測変数とした。前房中サイトカインの濃度は、対数正規分布に従っていたため、対数変換した。重回帰分析の客観性と多重共線性のリスクを回避するために、ステップ

ワイズ法を使用して変数を絞り込んだ。次に、重回帰分析を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。探索的研究であるので、Familywise Error Rate の調整を行わなかった。

3. 結果

平均年齢はそれぞれ 73.0 歳 (54-89 歳) で、31 眼 (64.6%) が男性だった。平均眼軸長は 23.8mm で、PVD は、22 眼 (45.3%) で認めた。ranibizumab の 2 回の注射後に新たに PVD を発症したものはなかった。48 眼中 PCV は 27 眼で、RAP は認めなかった (表 1)。

表 1 : 患者背景

	AMD
n	48
male, n(%)	31 (61.6)
age, years; mean \pm SD	72.9 \pm 7.7
Axial length, mm; mean \pm SD	23.8 \pm 1.5
PVD, n(%)	22 (45.3)
Disase type	
Typical AMD, n(%)	21 (43.8)
PCV, n(%)	27 (56.3)
RAP, n(%)	0 (0)

AMD, age-related macular degeneration; 加齢黄斑変性
PCV, polypoidal choroidal vasculopathy; ポリープ状脈絡膜新生血管
PVD, posterior vutreous detachment; 後部硝子体剥離
RAP, retinal angiomatous proliferation; 網膜内血管腫状増殖

【治療開始 1 年後の BCVA と中心窩網膜厚】

ranibizumab の硝子体内注射を導入期として毎月連続 3 回投与された後、48 眼すべてで PRN 法により ranibizumab の硝子体内注射が行われた。12 か月間の BCVA(logMAR)と CRT の変化を図 5 に示す。BCVA と CRT とともに治療後 12 か月でそれぞれ 0.29 と 180 μm で有意に改善した ($P < 0.01$)。

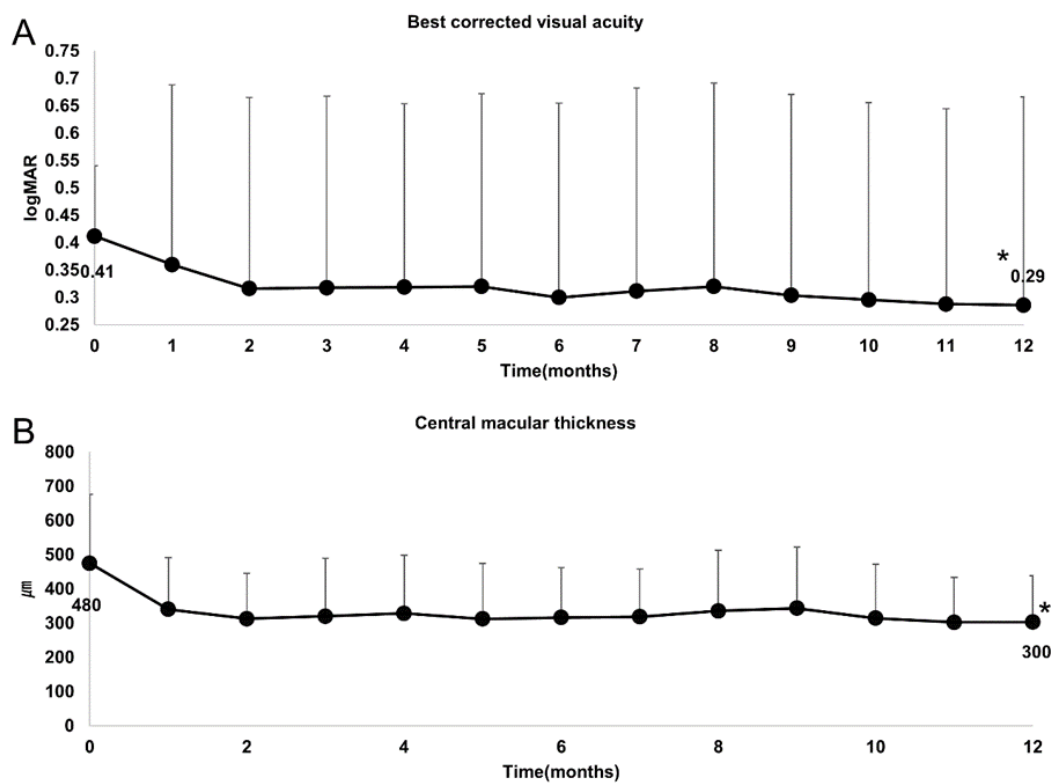


図 5：治療 12 か月間での BCVA と CRT の変化。BCVA、CRT とともに 12 か月で有意に改善していた ($P < 0.01$)。

【治療前視力不良と関連するサイトカイン因子】

治療前 BCVA 不良は、単回帰分析で IP-10 高値 ($r=0.44$, $P=0.016$)、MCP-1 高値 ($r=0.54$, $P=0.0025$)、および IL-6 高値 ($r=0.44$, $P=0.018$) と関連していた (表 2)。ステップワイズ変数選択後の重回帰分析では、logMCP-1 高値 (β 係数= 0.44、これは MCP-1 濃度が 2.72 倍になるごとに BCVA が 0.44 増加することを意味する、 $P<0.001$) および logIL-10 低値 (β 係数= -0.16、 $P=0.033$) が治療前 BCVA 不良と独立して関連していた (表 2)。

【治療前中心窩網膜厚と中心窩脈絡膜厚の肥厚と関係するサイトカイン因子】

治療前 CRT の増加は、単回帰分析では IP-10 高値 ($r=0.44$, $P=0.016$)、MCP-1 高値 ($r=0.41$, $P=0.029$)、IL-6 高値 ($r=0.47$, $P=0.010$) と有意に関連していた。ステップワイズ変数選択後の重回帰分析でも IL-6 (β 係数= 82、 $P=0.0047$) が有意なままであった (表 3)。一方で、治療前 CCT 肥厚に関しては単回帰分析、ステップワイズ変数選択後の重回帰分析でも有意に関連しているサイトカイン因子はなかった。(表 3)。

【治療 2 か月での中心窩脈絡膜厚と中心窩脈絡膜厚改善と関係するサイトカイン因子】

治療 2 か月での CRT 変化が良好なものは、単回帰分析では、IP-10 高値 ($r=-0.45$, $P=0.014$)、MCP-1 高値 ($r=-0.45$, $P=0.014$)、IL-6 高値 ($r=-0.44$, $P=0.016$) と有意に関連していたが、ステップワイズ変数選択後の重回帰分析では MMP-9 低値が有

意に関連していた。(β係数= 24、P = 0.024) (表 4)。治療 2 ヶ月での CCT の改善には、単回帰分析では、有意に関連する因子は認めなかったが、ステップワイズ変数選択後の重回帰分析では IL-6 高値が有意に関連していた。(β係数= -34、P <0.001) (表 4)。

【治療 12 か月での視力改善と関係するサイトカイン因子】

治療 12 か月での BCVA 改善は、単回帰分析において治療前 MCP-1 高値 ($r = -0.29$ 、 $P = 0.042$) と有意に関連していた (表 5)。ステップワイズ変数選択後の重回帰分析で、治療前 MCP-1 高値 (β 係数= -0.20、 $P = 0.015$) および治療前 CXCL13 低値 (β 係数= 0.10、 $P = 0.0054$) が独立して治療 12 か月での BCVA 改善と関連していた。

【治療 12 か月で治療に要した注射回数増加と関連するサイトカイン因子】

治療に要した ranibizumab 注射の回数に関連する因子は単回帰分析で、治療 2 か月での CXCL12 低値のみが治療に要した注射回数に有意に関連していた。($r = -0.40$ 、 $P = 0.0045$) しかし、ステップワイズ変数選択後の重回帰分析では、初回注射時の MMP-9 高値 (β 係数= 0.56、 $P = 0.01$)、治療 2 か月での CXCL12 高値 (β 係数= 0.10、 $P = 0.0002$)、治療 2 か月での IL-10 高値 (β 係数= 1.3、 $P = 0.001$) が、治療に要した注射回数の増加 ($R^2 = 0.38$) と関連していた。一方で、前房中サイトカインを除く臨床所見と患者背景のパラメーターは、治療に要した注射回数と関連していなかった (図 6)。

表 2：ベースライン視力との関係因子

	BCVA (logMAR)	
	Univariate	Multivariate
Age (years)	-0.070 (0.71)	
Sex (male)	-0.20 (0.058)	-0.088 (-0.170 to -0.007, 0.040)*
BCVA (logMAR)		
Disease type (PCV)	0.028 (0.79)	
Duration of disease (months)	-0.043 (0.82)	
GLD (μm)	0.25 (0.19)	
PVD (+)	0.024 (0.82)	
Axial length (mm)	-0.063 (0.74)	
CRT (μm)	0.43 (0.020)*	0.00051 (0.00007 to 0.00094, 0.027)*
CCT (μm)	0.15 (0.42)	0.00083 (-0.00016 to 0.00181, 0.11)
VEGF (pg/mL)	0.13(0.50)	
CXCL1 (pg/mL)	0.14 (0.46)	
IP-10 (pg/mL)	0.44 (0.016)*	
CXCL12 (pg/mL)	0.20 (0.30)	
CXCL13 (pg/mL)	0.27 (0.16)	
MCP-1 (pg/mL)	0.54 (0.0025)*	0.44 (0.20 to 0.68, <0.001)*
CCL11 (pg/mL)	0.18 (0.35)	
IL-6 (pg/mL)	0.44 (0.018)*	
IL-10 (pg/mL)	-0.13 (0.50)	-0.16 (-0.31 to -0.02, 0.033)*
MMP-9 (pg/mL)	0.044 (0.82)	
R ²		0.49

Univariate: Pearson's correlation (for continuous variables) and Spearman's rho (for categorical variables). R (*P* value). Multivariate analysis was performed after stepwise variable selection (BIC, forward method). β Coefficient (95% confidence interval, *P* value). **P* < 0.05.

表 3 : CRT と CCT の患者背景との関係

	CRT (μm)		CCT (μm)	
	Univariate*	Multivariate	Univariate*	Multivariate
Age (years)	-0.018 (0.92)		-0.33 (0.078)	-3.5 (-6.2 to 0.8, 0.016)*
Sex (Male)	13 (0.84)		6.3 (0.80)	
BCVA (logMAR)	0.43 (0.020)*		0.15 (0.42)	
Disease type (PCV)	30 (0.61)		38 (0.11)	
Duration of disease (months)	-0.11 (0.58)		0.30 (0.11)	2.8 (0.4 to 5.1, 0.027)*
GLD (μm)	0.40 (0.032)*	0.026 (0.003 to 0.048, 0.032)*	0.14 (0.48)	
PVD (+)	-53 (0.37)		8.2 (0.73)	
Axial length (mm)	-0.24 (0.21)		-0.17 (0.37)	
CRT (μm)			0.071 (0.72)	
CCT (μm)	0.071 (0.72)			
VEGF (pg/mL)	0.25 (0.19)		-0.20 (0.30)	
CXCL1 (pg/mL)	0.26 (0.17)		-0.052 (0.79)	
IP-10 (pg/mL)	0.44 (0.016)*		-0.083 (0.67)	
CXCL12 (pg/mL)	0.19 (0.33)		-0.090 (0.64)	
CXCL13 (pg/mL)	0.30 (0.11)		0.067 (0.73)	
MCP-1 (pg/mL)	0.41 (0.029)*		-0.16 (0.40)	
CCL11 (pg/mL)	0.082 (0.67)		-0.26 (0.18)	
IL-6 (pg/mL)	0.47 (0.010)*	82 (28 to 135, 0.0047)*	-0.051 (0.79)	
IL-10 (pg/mL)	0.18 (0.35)		-0.12 (0.52)	
MMP-9 (pg/mL)	-0.039 (0.84)		0.063 (0.75)	
R2		0.28		0.20

Univariate: Pearson's Correlation (for continuous variables) and Spearman's rho (for categorical variables). R (P value). Multivariate analysis was performed after stepwise variable selection (BIC, forward method). β Coefficient (95% confidence interval, P value). *: $P < 0.05$

表 4 : CRT と CCT の治療開始後 2 か月における改善度との関連因子

	CRT change (μm)		CCT change (μm)	
	Univariate*	Multivariate	Univariate*	Multivariate
Age (years)	-0.12 (0.53)	-4.5 (-8.1 to -0.9, 0.020)*	0.36 (0.053)	2.3 (0.6 to 4.1, 0.012)*
Gender (Male)	7.4 (0.98)		-1.8 (0.94)	
BCVA (logMAR)	-0.33 (0.079)		-0.15 (0.43)	
Disease type (PCV)	-86 (0.078)	-38 (10 to 65, 0.010)*	-43 (0.069)	
Duration of disease (months)	0.10 (0.60)		-0.26 (0.18)	
GLD (μm)	-0.22 (0.26)	0.013 (-0.001 to 0.026, 0.068)	-0.32 (0.096)	-0.0090 (-0.153 to -0.0028, 0.0069)*
PVD (+)	33 (0.51)		7.9 (0.74)	
Axial length (mm)	0.25 (0.19)		0.094 (0.63)	
CRT (μm)	-0.75 (<0.001)*	-0.65 (-0.80 to -0.50, <0.001)*	-0.047 (0.81)	0.12 (0.04 to 0.19, 0.0037)*
CCT (μm)	0.060 (0.76)		-0.74 (<0.001)*	-0.69 (-0.86 to -0.52, <0.001)*
VEGF (pg/mL)	-0.21 (0.27)		0.10 (0.59)	
CXCL1 (pg/mL)	-0.29 (0.12)		0.016 (0.93)	
IP-10 (pg/mL)	-0.45 (0.014)*		-0.20 (0.30)	
CXCL12 (pg/mL)	-0.34 (0.075)	-37 (-77 to 3, 0.076)	0.013 (0.95)	
CXCL13 (pg/mL)	-0.32 (0.087)		-0.20 (0.29)	
MCP-1 (pg/mL)	-0.45 (0.014)*		-0.055 (0.78)	
CCL11 (pg/mL)	-0.21 (0.26)		0.16 (0.42)	
IL-6 (pg/mL)	-0.44 (0.016)*		-0.26 (0.17)	-34 (-49 to -19, <0.001)*
IL-10 (pg/mL)	-0.072 (0.71)		0.084 (0.66)	
MMP-9 (pg/mL)	0.21 (0.28)	24 (4 to 44, 0.024)*	0.070 (0.72)	
R square		0.73		0.75

Univariate: Pearson's correlation (for continuous variables) and Spearman's rho (for categorical variables). R (P value).

Multivariate analysis was performed after stepwise variable selection (BIC, forward method). β Coefficient (95% confidence interval, P value). * $P < 0.05$.

表 5 : 治療 12 か月での BCVA 改善と関連する因子

	BCVA (logMAR)	
	Univariate	Multivariate
Age (years)	-0.13 (0.49)	
Sex (male)	0.14 (0.10)	
BCVA (logMAR)	-0.31 (0.031)	
BCVA change at 2 months (logMAR)	0.67 (<0.0001)	0.86 (0.63 to -1.08, <0.0001)*
Disease type (PCV)	-0.088 (0.30)	-0.095 (0.044 to 0.146, 0.0008)*
Duration of disease (months)	-0.017 (0.93)	
GLD (μm)	0.28 (0.14)	4.3e-5 (2.0e-5 to 6.5e-5, 0.0007)*
PVD (+)	-0.11 (0.20)	
Axial length (mm)	-0.14 (0.48)	
CRT (μm)	0.040 (0.84)	
CRT change at 2 months (μm)	0.34 (<0.019)	
CCT (μm)	0.18 (0.36)	
CCT change at 2 months (μm)	-0.13 (0.36)	
VEGF (pg/mL)	-0.18 (0.36)	
CXCL1 (pg/mL)	-0.25 (0.18)	
CXCL12 (pg/mL)	-0.15 (0.43)	
CXCL13 (pg/mL)	-0.018 (0.93)	0.10 (0.03 to 0.17, 0.0054)*
IP-10 (pg/mL)	-0.048 (0.80)	
MCP-1 (pg/mL)	-0.29 (0.042)	-0.20 (-0.34 to -0.05, 0.015)*
CCL11 (pg/mL)	-0.14 (0.45)	
IL-6 (pg/mL)	-0.11 (0.58)	
IL-10 (pg/mL)	0.12 (0.53)	
MMP-9 (pg/mL)	-0.024 (0.90)	
R ²		0.69

Univariate analysis: Pearson's correlation (for continuous variables) and Spearman's rho (for categorical variables). R (*P* value).

Multivariate analysis was performed after stepwise variable selection (BIC, forward method). β Coefficient (95% confidence interval, *P* value). **P* < 0.05.

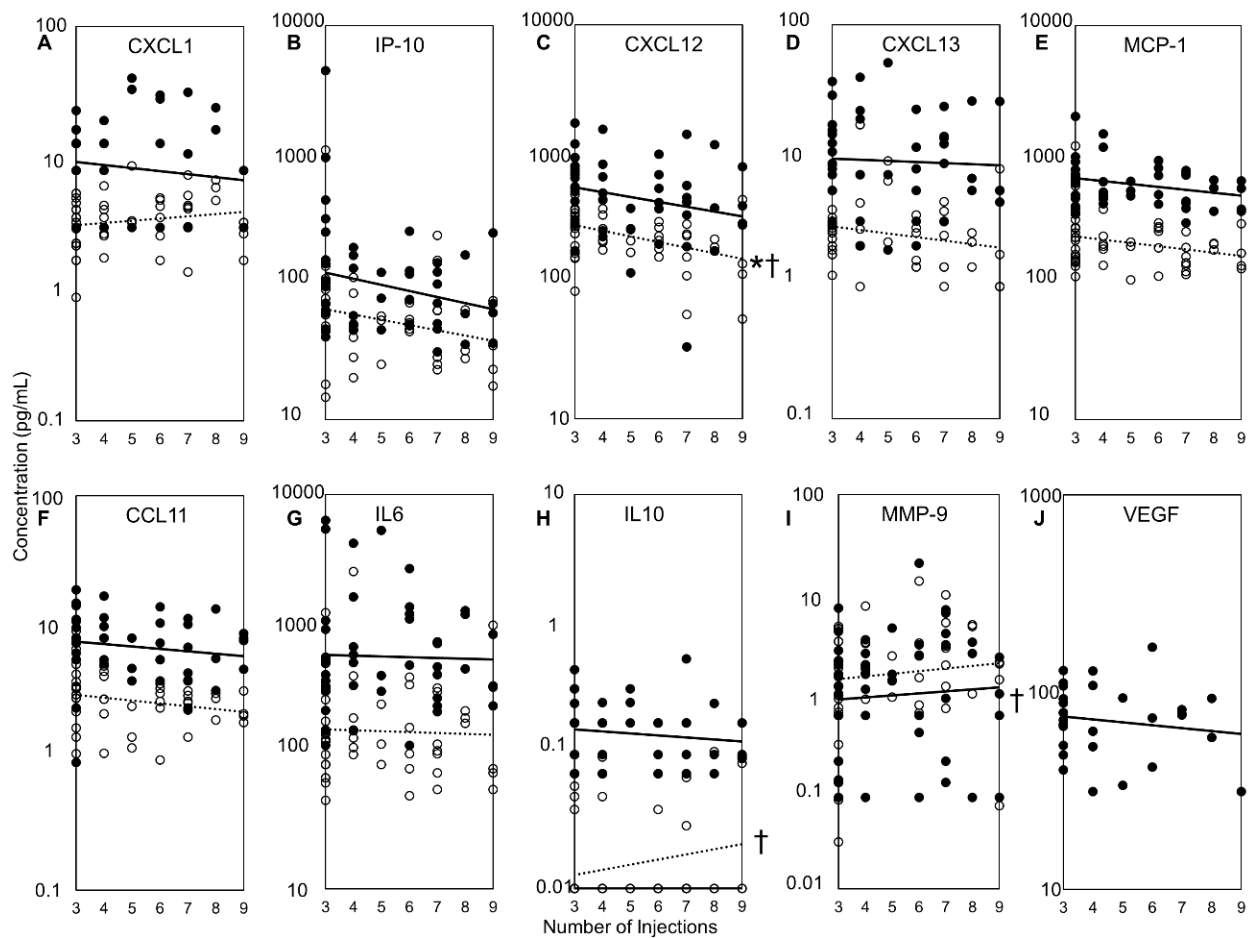


図6：治療に要した注射回数と各サイトカイン濃度の関係。縦軸は各サイトカイン濃度。横軸

は各症例の12か月で治療に要した注射回数。●は治療前で、○は治療2か月でのサイトカイン濃

度で各症例の注射回数と一致するところにプロットされている。直線は治療前、点線は治療2か

月でのサイトカイン濃度と治療に要した注射回数との相関を示す。A: CXCL1, B: IP-10, D:

CXCL13, E: MCP-1, F: CCL11, G: IL-6, and J: VEGFは治療に要した注射回数と関連は認めなかつた。

C: CXCL12は治療2か月での濃度低値が単回帰分析で治療に要した注射回数増加に有意

に関連し($P = 0.0045$)、重回帰分析後も有意に関連していた ($P = 0.0002$)。H: IL-10は重回帰分析で治療前2か月の濃度高値が治療に要した注射回数増加に有意に関連していた($P = 0.001$)。I: MMP-9は重回帰分析で治療前の濃度高値が治療に要した注射回数増加に有意に関連していた($P = 0.01$)。

4. 考按

抗 VEGF 阻害薬によって滲出型 AMD の治療は劇的に改善した[43]。滲出型 AMD の血管新生と血管透過性亢進は主に VEGF によって引き起こされる。しかし、抗 VEGF 療法による滲出型 AMD の長期管理は、他の要因の関与もあり[22]、抗 VEGF 阻害薬のみでは完治が困難である[21, 24]。我々の結果[33]や他の報告が示すように、滲出型 AMD の眼では、前房水中のサイトカイン/ケモカイン (MCP-1 [44]や IP-10 [45]などの C-X-C モチーフケモカイン) の濃度が上昇している。このような分子は、直接的な血管新生促進や、抗血管新生の活性への介入、単球を誘導し、VEGF、IL-6 [46]、IL-10 [47]などの血管新生/炎症性サイトカインを産生させ炎症を起こすことで CNV の活動性に影響を与える。さらに、サイトカインやケモカインに加えて、MMP-9[48]などの組織プロテアーゼ、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) や vascular cell adhesion molecule 1(VCAM-1) [49-51]などの細胞内接着分子も過剰に発現し、CNV の活動性を加速させる[52]。今回の研究では、治療歴のない滲出型 AMD48 眼からの9つ

の前房中サイトカイン（CXCL12、CXCL13、IL-10、IP-10、IL-6、MCP-1、CCL11、CXCL1、およびMMP9）の濃度と治療前および初回から2か月後のranibizumab注射時の最高矯正視力（BCVA）、中心窩網膜厚（CRT）、中心窩脈絡膜厚（CCT）、注射回数に関連を調査した。CCTが厚い症例では抗VEGF療法に対して治療抵抗性があり、治療12か月でのBCVAの変化は、GLDが小さく、治療前BCVAが悪い症例で良好だったように、今回の研究結果では眼の臨床所見との関連に関しては、過去の研究と同様であった[53]。今回のサイトカイン因子の結果を図7にまとめる。

今回の結果のまとめ

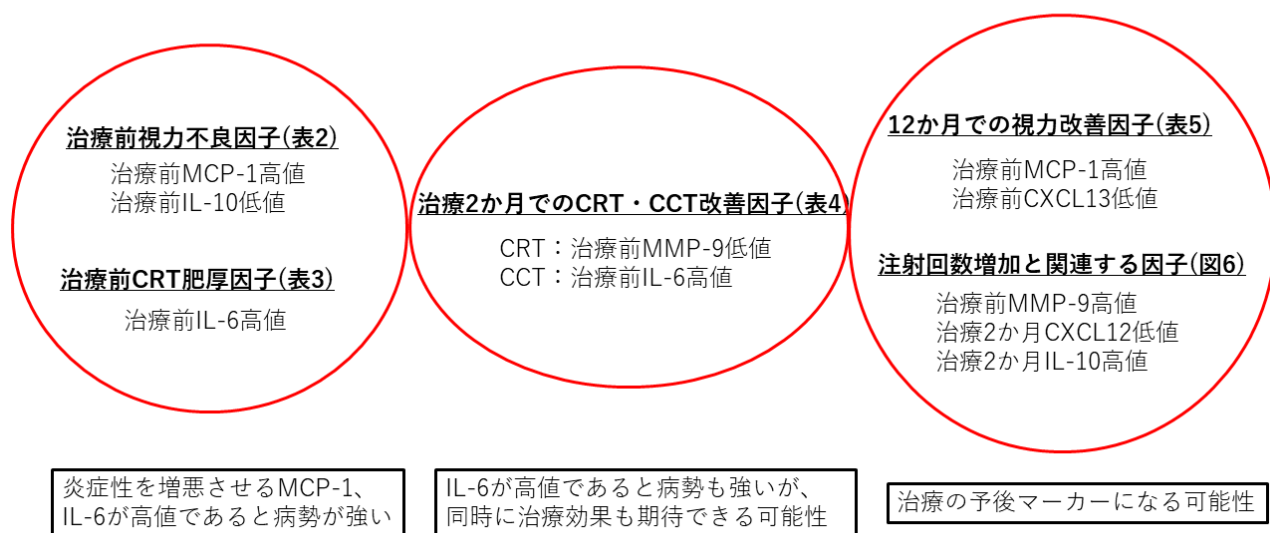


図7：今回の結果のまとめ。12か月での視力改善因子と注射回数増加に関連する因子が予後マーカーとして临床上重要になる。

本研究の結果では、治療前 BCVA は、治療前の MCP-1 の濃度が高く、IL-10 の濃度が低い眼で不良であったこと示した。過去の研究では、MCP-1 は治療前 BCVA とは関連していなかったが、IL-10 は視力の変化と正の相関があったと報告している [54]。MCP-1 は炎症性単球の主要な走化性物質で、炎症を増悪させることが知られている [55]。IL-10 は一般に、炎症と炎症誘発性サイトカインの合成を阻害する抗炎症性サイトカインと考えられている [56]。MCP-1 の増加は眼内マクロファージを遊走し、網膜色素上皮とブルッフ膜の変性を引き起こすと考えられている [57]。組織学的検査では、網膜色素上皮の萎縮、ブルッフ膜の破壊、および CNV が存在する領域にマクロファージが存在することが示されている [57-62]。一方、IL-10 は網膜下の線維化を抑制するのに重要な役割を果たすと考えられている [63]。IL-10 は、損傷した神経へのマクロファージの調節に関与し、炎症誘発性ケモカインおよびサイトカインの発現を低下させ、ミエリン貪食作用を介して炎症誘発性から抗炎症性に移行するようにマクロファージを誘導するとされている [64]。これらの生物学的関連を考慮すると、MCP-1 や IL-10 などの炎症性因子と抗炎症性因子のバランスが滲出性 AMD における炎症の重要な指標であると推測できる [65, 66]。

今回の研究で治療前 CRT 肥厚と IL-6 高値が関連していた。また治療 2 か月での CRT 改善と治療前 MMP-9 低値、CCT 改善と治療前 IL-6 高値が有意に関連していた。IL-6 は炎症誘発性のサイトカインで滲出性 AMD では上昇すると報告されている [67]。炎症

性サイトカインである IL-6 が高値であると CRT が厚く滲出型 AMD の治療前の活動性が強いことを示唆している一方で治療 2 ヶ月での CCT が改善していることから同時に治療効果も期待できる可能性が示唆された。

今回の研究で治療前 MCP-1 高値および CXCL13 低値が、治療 12 か月での BCVA の改善と関連していることも示された。前述したように、MCP-1 濃度が高いと治療前 BCVA が不良であることを考慮すると、治療前 MCP-1 濃度が高い眼は、BCVA を改善する可能性が高くなる。これは、治療前の MCP-1 濃度が高いことが BCVA の大幅な改善に関連する理由を少なくとも部分的に説明している。CXCL13 の受容体である CXCR5 は、網膜色素上皮と網膜細胞の保護に関与している可能性がある。それを喪失した老化型マウスでは AMD のような病理学的変化をもたらす可能性が報告されている [68]。しかし現在のところ、CXCL13 の役割は他のサイトカインと比較して滲出型 AMD では明確ではない。

今回の研究では、治療に要した注射回数の増加は治療前 MMP-9 高値、治療 2 か月での CXCL12 低値、IL-10 高値が有意に関連していた。視力は外境界膜の完全性を含む解剖学的変化などの多くの要因の影響も受けるため、注射回数は視力よりも疾患活動性を反映する重要なパラメーターであると想定した。今回の結果では、前房中サイトカイン濃度が最初の 1 年間に必要な注射回数と強く関連しているのに対し、臨床検査および患者背景とは関連していないことが示された。この研究で示されているように、治療前

MMP-9 と治療 2 か月での CXCL12 および IL-10 は、初回導入期後の ranibizumab 注射の回数を予測するのに役立つ可能性がある。MMP-9 は細胞外マトリックスの制御の役割を果たすとされている。網膜色素上皮および脈絡膜では、MMP-9 がブルッフ膜のリモデリングと外側網膜関門の透過性の制御に関与している [69]。MMP-9 は、CNV が網膜下腔に伸びるためにブルッフ膜の大きな孔形成に関与していると考えられている [70]。低濃度の MMP-9 が注射回数とどのように関連しているかを解明するには、Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) / Matrix metalloproteinases (MMPs) [71]などの細胞外マトリックスリモデリング因子のバランスを含むさらなる研究が必要である。CXCL12 はリンパ球の走化性因子であり、血管新生を促進する [35, 72]。マウスのレーザー誘発 CNV モデルに分布する骨髄由来細胞は CXCL12 受容体陽性であると報告されている [73]。したがって、治療 2 か月での CXCL12 の濃度の増加は、導入期投与後の無症候性の炎症/炎症細胞の残余を示唆するかもしれない。CNV 活性に関与することが推定されている MMP-9 や次に言及する IL-10 と同じように、CXCL12 もこれらに加えての重要な分子である可能性がある。

治療 2 か月で IL-10 濃度が高い患者は、より頻繁な注射が必要であった。これは、代替的に活性化されたマクロファージと呼ばれる亜集団が滲出型 AMD に関与しているという最近の仮説と一致している可能性がある [74]。滲出型 AMD の眼に発生する炎症は、いくつかのタイプの免疫細胞によって媒介されるが、その中でマクロファージ/単

球が最も重要であると考えられている。マクロファージ/単球は、少なくとも2つの亜集団（古典的に活性化あるいは代替的に活性化された単球/マクロファージ）すなわちM1/M2マクロファージに分類され、炎症の2つの異なる側面を制御する[75]。一般に、M1マクロファージは炎症の急性期に炎症を悪化させ、M2マクロファージは炎症の慢性期に血管新生を促進すると考えられているが、これは炎症が発生する状況や時間経過によって異なる。IL-10は、M2マクロファージによって産生されると考えられている[75]。したがって、滲出型AMDにおけるIL-10の高値は、M2マクロファージの数の増加と異常な血管新生に関連すると考えられる[76]。血管新生の増強のために、治療2か月後でのIL-10高値の患者は注射回数が増加する。我々の結果を検証するためにさらなる研究が必要であるが、我々の結果は、導入期後の予後に注射開始後の前房中サイトカインレベルに焦点を当てることの重要性を強調していると考えられる。

今回の結果から治療前・治療開始2か月のサイトカイン濃度から視力改善および注射回数の増加が予測できることは临床上重要な知見となりうる。つまり、今回の結果から治療前MCP-1高値、CXCL13低値な症例では12か月後の視力改善が期待でき、その旨を患者へ説明することで抗VEGF薬治療に対するモチベーションを上げる可能性が考えられる。また、治療前MMP-9高値、導入後2か月CXCL12低値とIL-10高値の場合、注射回数の増加の予測ができ病勢が強いことが予測される。抗VEGF薬の再投与基準を通常よりも厳重に行うことで視力悪化を防げる可能性がある。これらのサイト

カインは予後マーカーとして重要な役割を担う可能性がある。さらに今回の結果は抗 VEGF 治療の効果不良の機序を考える上でも有用な知見となりうるものと考えられる。

本研究にはいくつかの限界がある。サンプルサイズは比較的小さく、日本人のみで、PCV と典型的 AMD が混合していた。サンプルの不均一性は、研究の結論を制限する。この研究はまた、実臨床に基づいており、事前に決定された厳格な治療プロトコールではない。今回の結果は他のコホートで検証する必要があるが、すべての患者が提示したプロトコールを順守し、PRN 治療による投与レジメンは一般的に採用されている治療アプローチの 1 つであり、解析して得られた結果は有意義であると考えている。治療プロトコールについては、近年 treat and extend 法と呼ばれる方法が増えてきている。これは毎受診時に投与する代わりに受診間隔を増減させる手法で、再燃を確認してから投与する PRN 法に比べて治療不足になりにくい事と、患者が投与を受けるとのつもりで受診することから投与拒否が少なくなる利点がある。今後、今回の結果をまず treat and extend 方でも確認の必要がある。

研究手法の面では、近年深層学習と呼ばれる、画像のような情報量の多いデータを客観的に評価する手法が発展してきた。これにより、特定の臨床所見の有無のみを評価するのではなく、眼科において多用される画像をそのまま評価することが可能となる。しかし、これまでに気づかれていなかった予後予測に有用な所見を抽出可能な利点の代わりに、ビッグデータを必要とする欠点がある。そこで我々は自治医科大学の眼科画像

と視力や治療履歴といった重要なデータを匿名化して研究用データベースに蓄積し、更に国内外を問わず多数の施設と共同研究を行っている。大量のデータを用いることで、今回の結果を確認するのみならず、簡便に得られるデータのみから患者の予後を正確に予測し、各種治療の予後を患者とともに見ながら治療選択する、究極の個別化医療を目指したい。

5. 結論

治療開始ベースラインでの MCP-1 高値および CXCL13 濃度低値は、治療 12 か月後での BCVA 改善と有意に関連した予後予測の因子であった。治療前 MMP-9 高値と治療 2 か月時での CXCL12 濃度低値、IL-10 高値が、ranibizumab の注射回数増加と関連していた。抗 VEGF 薬による滲出型 AMD の治療予後は、これらの前房中サイトカインの濃度を調査することによって予測でき、プレジジョン・メディシンの潜在的なバイオマーカーとなりうることが示された。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜った自治医科大学眼科学講座 川島秀俊教授に心より感謝申し上げます。また、本研究の推進に尽力を頂いた Adjunct Professor, Duke NUS medical School、自治医科大学眼科講座 非常勤講師 柳靖雄先生、自治医科大学眼科講座 高橋秀徳准教授に深く感謝申し上げます。最後に、本研究に際しご助言、ご協力頂きました、JCHO 東京メディカルセンター眼科 藤野雄次郎先生、譚 雪先生、帝京大学眼科学講座 井上裕治准教授、自治医科大学眼科講座 坂本晋一先生、伊野田悟先生に厚く御礼を申し上げます。

7. 参考文献

1. Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong TY: Age-related macular degeneration. *The Lancet* 392:1147-1159, 2018
2. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, Wong TY: Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health* 2:e106-e116, 2014
3. Miyazaki M, Kiyohara Y, Yoshida A, Iida M, Nose Y, Ishibashi T: The 5-year incidence and risk factors for age-related maculopathy in a general Japanese

- population: the Hisayama study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1907-1910, 2005
4. Yasuda M, Kiyohara Y, Hata Y, Arakawa S, Yonemoto K, Doi Y, Iida M, Ishibashi T: Nine-year incidence and risk factors for age-related macular degeneration in a defined Japanese population the Hisayama study. *Ophthalmology* 116:2135-2140, 2009
 5. Ferris FL, 3rd, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR, Beckman Initiative for Macular Research Classification C: Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 120:844-851, 2013
 6. Eldred GE: Lipofuscin fluorophore inhibits lysosomal protein degradation and may cause early stages of macular degeneration. *Gerontology* 41 Suppl 2:15-28, 1995
 7. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF: An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 20:705-732, 2001
 8. Fleckenstein M, Mitchell P, Freund KB, Sadda S, Holz FG, Brittain C, Henry EC, Ferrara D: The Progression of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related

- Macular Degeneration. *Ophthalmology* 125:369-390, 2018
9. Spaide RF, Jaffe GJ, Sarraf D, Freund KB, Sadda SR, Staurenghi G, Waheed NK, Chakravarthy U, Rosenfeld PJ, Holz FG *et al*: Consensus Nomenclature for Reporting Neovascular Age-Related Macular Degeneration Data: Consensus on Neovascular Age-Related Macular Degeneration Nomenclature Study Group. *Ophthalmology* 127:616-636, 2020
 10. Yannuzzi LA, Negrão S, Iida T, Carvalho C, Rodriguez-Coleman H, Slakter J, Freund KB, Sorenson J, Orlock D, Borodoker N: Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina* 21:416-434, 2001
 11. de Jong PT: Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355:1474-1485, 2006
 12. Bourne RRA, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, Jonas JB, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K *et al*: Causes of vision loss worldwide, 1990–2010: a systematic analysis. *The Lancet Global Health* 1:e339-e349, 2013
 13. Coleman HR, Chan CC, Ferris FL, 3rd, Chew EY: Age-related macular degeneration. *Lancet* 372:1835-1845, 2008
 14. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY: Age-related macular degeneration. *The Lancet* 379:1728-1738, 2012

15. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T, Group AS: Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* 116:57-65 e55, 2009
16. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY: Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355:1419-1431, 2006
17. Schmidt-Erfurth U, Kaiser PK, Korobelnik JF, Brown DM, Chong V, Nguyen QD, Ho AC, Ogura Y, Simader C, Jaffe GJ *et al*: Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. *Ophthalmology* 121:193-201, 2014
18. Menchini F, Toneatto G, Miele A, Donati S, Lanzetta P, Virgili G: Antibiotic prophylaxis for preventing endophthalmitis after intravitreal injection: a systematic review. *Eye (Lond)* 32:1423-1431, 2018
19. Schmid MK, Bachmann LM, Fas L, Kessels AG, Job OM, Thiel MA: Efficacy and adverse events of aflibercept, ranibizumab and bevacizumab in age-related macular degeneration: a trade-off analysis. *Br J Ophthalmol* 99:141-146, 2015
20. Ho AC, Busbee BG, Regillo CD, Wieland MR, Van Everen SA, Li Z, Rubio RG,

- Lai P, Group HS: Twenty-four-month efficacy and safety of 0.5 mg or 2.0 mg ranibizumab in patients with subfoveal neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 121:2181-2192, 2014
21. Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, Sadda SR, Zhang K, Group S-US: Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* 120:2292-2299, 2013
 22. Funk M, Karl D, Georgopoulos M, Benesch T, Sacu S, Polak K, Zlabinger GJ, Schmidt-Erfurth U: Neovascular age-related macular degeneration: intraocular cytokines and growth factors and the influence of therapy with ranibizumab. *Ophthalmology* 116:2393-2399, 2009
 23. Minaker SA, Mason RH, Lahaie Luna G, Bapat P, Muni RH: Changes in aqueous and vitreous inflammatory cytokine levels in neovascular age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol* doi: 10.1111/aos.14537, 2020
 24. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research G, Maguire MG, Martin DF, Ying GS, Jaffe GJ, Daniel E, Grunwald JE, Toth CA, Ferris FL, 3rd, Fine SL: Five-Year Outcomes with Anti-Vascular Endothelial

- Growth Factor Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration:
The Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials.
Ophthalmology 123:1751-1761, 2016
25. Kwon JW, Jee D: Aqueous humor cytokine levels in patients with diabetic macular edema refractory to anti-VEGF treatment. *PLoS One* 13:e0203408, 2018
26. Rezar-Dreindl S, Eibenberger K, Pollreisz A, Buhl W, Georgopoulos M, Krall C, Dunavolgyi R, Weigert G, Kroh ME, Schmidt-Erfurth U *et al*: Effect of intravitreal dexamethasone implant on intra-ocular cytokines and chemokines in eyes with retinal vein occlusion. *Acta Ophthalmol* 95:e119-e127, 2017
27. Brown DM, Tuomi L, Shapiro H: Anatomical measures as predictors of visual outcomes in ranibizumab-treated eyes with neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 33:23-34, 2013
28. Kim BJ, Ying GS, Huang J, Levy NE, Maguire MG, Group CR: Sporadic visual acuity loss in the Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT). *Am J Ophthalmol* 158:128-135 e110, 2014
29. Regillo CD, Brown DM, Abraham P, Yue H, Ianchulev T, Schneider S, Shams N: Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER Study year 1. *Am J*

- Ophthalmol* 145:239-248, 2008
30. Schmidt-Erfurth U, Eldem B, Guymer R, Korobelnik JF, Schlingemann RO, Axer-Siegel R, Wiedemann P, Simader C, Gekkieva M, Weichselberger A *et al*: Efficacy and safety of monthly versus quarterly ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration: the EXCITE study. *Ophthalmology* 118:831-839, 2011
 31. Simader C, Ritter M, Bolz M, Deak GG, Mayr-Sponer U, Golbaz I, Kundi M, Schmidt-Erfurth UM: Morphologic parameters relevant for visual outcome during anti-angiogenic therapy of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 121:1237-1245, 2014
 32. Ying GS, Kim BJ, Maguire MG, Huang J, Daniel E, Jaffe GJ, Grunwald JE, Blinder KJ, Flaxel CJ, Rahhal F *et al*: Sustained visual acuity loss in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *JAMA Ophthalmol* 132:915-921, 2014
 33. Sakamoto S, Takahashi H, Tan X, Inoue Y, Nomura Y, Arai Y, Fujino Y, Kawashima H, Yanagi Y: Changes in multiple cytokine concentrations in the aqueous humour of neovascular age-related macular degeneration after 2 months of ranibizumab therapy. *Br J Ophthalmol* 102:448-454, 2018

34. Fujimura S, Takahashi H, Yuda K, Ueta T, Iriyama A, Inoue T, Kaburaki T, Tamki Y, Matsushima K, Yanagi Y: Angiostatic effect of CXCR3 expressed on choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:1999-2006, 2012
35. Takahashi H, Nomura Y, Tan X, Fujino Y, Kawashima H, Yanagi Y: Effects of posterior vitreous detachment on aqueous humour levels of VEGF and inflammatory cytokines. *Br J Ophthalmol* 99:1065-1069, 2015
36. Ecker SM, Hines JC, Pfahler SM, Glaser BM: Aqueous cytokine and growth factor levels do not reliably reflect those levels found in the vitreous. *Mol Vis* 17:2856-2863, 2011
37. Koh A, Lee WK, Chen LJ, Chen SJ, Hashad Y, Kim H, Lai TY, Pilz S, Ruamviboonsuk P, Tokaji E *et al*: EVEREST study: efficacy and safety of verteporfin photodynamic therapy in combination with ranibizumab or alone versus ranibizumab monotherapy in patients with symptomatic macular polypoidal choroidal vasculopathy. *Retina* 32:1453-1464, 2012
38. Krebs I, Brannath W, Glittenberg C, Zeiler F, Sebag J, Binder S: Posterior vitreomacular adhesion: a potential risk factor for exudative age-related macular degeneration? *Am J Ophthalmol* 144:741-746, 2007
39. Nomura Y, Takahashi H, Fujino Y, Kawashima H, Yanagi Y: ASSOCIATION

BETWEEN AQUEOUS HUMOR CXC MOTIF CHEMOKINE LIGAND 13 LEVELS AND SUBFOVEAL CHOROIDAL THICKNESS IN NORMAL OLDER SUBJECTS. *Retina* 36:192-198, 2016

40. Ondaş F, Yılmaz G, Acar MA, Unlü N, Kocaođlan H, Arsan AK: Role of the vitreous in age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol* 44:91-93, 2000
41. Robison CD, Krebs I, Binder S, Barbazetto IA, Kotsolis AI, Yannuzzi LA, Sadun AA, Sebag J: Vitreomacular adhesion in active and end-stage age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 148:79-82 e72, 2009
42. Weber-Krause B, Eckardt U: [Incidence of posterior vitreous detachment in eyes with and without age-related macular degeneration. An ultrasonic study]. *Ophthalmologe* 93:660-665, 1996
43. Wolf S: Current status of anti-vascular endothelial growth factor therapy in Europe. *Jpn J Ophthalmol* 52:433-439, 2008
44. Jonas JB, Tao Y, Neumaier M, Findeisen P: Cytokine concentration in aqueous humour of eyes with exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 90:e381-388, 2012
45. Mo FM, Proia AD, Johnson WH, Cyr D, Lashkari K: Interferon gamma-inducible protein-10 (IP-10) and eotaxin as biomarkers in age-related macular

- degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4226-4236, 2010
46. Strieter RM, Wiggins R, Phan SH, Wharram BL, Showell HJ, Remick DG, Chensue SW, Kunkel SL: Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 162:694-700, 1989
 47. Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, Owlia P, Hassan ZM, Faghihzadeh S: Roles of IL-10 in ocular inflammations: a review. *Ocul Immunol Inflamm* 20:406-418, 2012
 48. Liutkeviciene R, Lesauskaite V, Sinkunaite-Marsalkiene G, Zaliuniene D, Zaliaduonyte-Peksiene D, Mizariene V, Gustiene O, Jasinskas V, Jariene G, Tamosiunas A: The Role of Matrix Metalloproteinases Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Genet* 36:149-155, 2015
 49. Jonas JB, Tao Y, Neumaier M, Findeisen P: Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 128:1281-1286, 2010
 50. Roh MI, Kim HS, Song JH, Lim JB, Koh HJ, Kwon OW: Concentration of cytokines in the aqueous humor of patients with naive, recurrent and regressed

- CNV associated with amd after bevacizumab treatment. *Retina* 29:523-529, 2009
51. Sakurada Y, Nakamura Y, Yoneyama S, Mabuchi F, Gotoh T, Tateno Y, Sugiyama A, Kubota T, Iijima H: Aqueous humor cytokine levels in patients with polypoidal choroidal vasculopathy and neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res* 53:2-7, 2015
 52. Steen B, Sejersen S, Berglin L, Seregard S, Kvanta A: Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2194-2200, 1998
 53. Kang HM, Kwon HJ, Yi JH, Lee CS, Lee SC: Subfoveal choroidal thickness as a potential predictor of visual outcome and treatment response after intravitreal ranibizumab injections for typical exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 157:1013-1021, 2014
 54. Rezar-Dreindl S, Sacu S, Eibenberger K, Pollreisz A, Buhl W, Georgopoulos M, Krall C, Weigert G, Schmidt-Erfurth U: The Intraocular Cytokine Profile and Therapeutic Response in Persistent Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:4144-4150, 2016
 55. Tanaka T, Terada M, Ariyoshi K, Morimoto K: Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 enhances apoptotic cell removal by

- macrophages through Rac1 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 399:677-682, 2010
56. Ho AS, Moore KW: Interleukin-10 and its receptor. *The Immunol* 1:173-185, 1994
57. Austin BA, Liu B, Li Z, Nussenblatt RB: Biologically active fibronectin fragments stimulate release of MCP-1 and catabolic cytokines from murine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:2896-2902, 2009
58. Dastgheib K, Green WR: Granulomatous reaction to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 112:813-818, 1994
59. Hutchinson AK, Grossniklaus HE, Capone A: Giant-cell reaction in surgically excised subretinal neovascular membrane. *Arch Ophthalmol* 111:734-735, 1993
60. Killingsworth MC, Sarks JP, Sarks SH: Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Eye (Lond)* 4:613-621, 1990
61. Patel M, Chan CC: Immunopathological aspects of age-related macular degeneration. *Semin Immunopathol* 30:97-110, 2008
62. Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH: Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 223:69-76, 1985

63. Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T: IL-10 is significantly involved in HSP70-regulation of experimental subretinal fibrosis. *PLoS One* 8:e80288, 2013
64. Siqueira Mietto B, Kroner A, Girolami EI, Santos-Nogueira E, Zhang J, David S: Role of IL-10 in Resolution of Inflammation and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci* 35:16431-16442, 2015
65. Agawa T, Usui Y, Wakabayashi Y, Okunuki Y, Juan M, Umazume K, Kezuka T, Takeuchi M, Yamauchi Y, Goto H: Profile of intraocular immune mediators in patients with age-related macular degeneration and the effect of intravitreal bevacizumab injection. *Retina* 34:1811-1818, 2014
66. Nakamura R, Sene A, Santeford A, Gdoura A, Kubota S, Zapata N, Apte RS: IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis. *Nat Commun* 6:7847, 2015
67. Izumi-Nagai K, Nagai N, Ozawa Y, Mihara M, Ohsugi Y, Kurihara T, Koto T, Satofuka S, Inoue M, Tsubota K, Okano H, Oike Y, Ishida S: Interleukin-6-receptor-mediated activation of signal transducer and activator of transcription-3(STAT3) promotes choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 170:2149-58,2007.

68. Huang H, Liu Y, Wang L, Li W: Age-related macular degeneration phenotypes are associated with increased tumor necrosis-alpha and subretinal immune cells in aged Cxcr5 knockout mice. *PLoS One* 12:e0173716, 2017
69. Tatar O, Adam A, Shinoda K, Eckert T, Scharioth GB, Klein M, Yoeruek E, Bartz-Schmidt KU, Grisanti S: Matrix metalloproteinases in human choroidal neovascular membranes excised following verteporfin photodynamic therapy. *Br J Ophthalmol* 91:1183-1189, 2007
70. Ecker SM, Pfahler SM, Hines JC, Lovelace AS, Glaser BM: Sequential in-office vitreous aspirates demonstrate vitreous matrix metalloproteinase 9 levels correlate with the amount of subretinal fluid in eyes with wet age-related macular degeneration. *Mol Vis* 18:1658-1667, 2012
71. Krogh Nielsen M, Subhi Y, Rue Molbech C, Nilsson LL, Nissen MH, Sorensen TL: Imbalances in tissue inhibitors of metalloproteinases differentiate choroidal neovascularization from geographic atrophy. *Acta Ophthalmol* 97:84-90, 2019
72. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM: CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68:1-8, 2000
73. Kiefer F, Siekmann AF: The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 68:2811-2830, 2011

74. Tan X, Fujii K, Manabe I, Nishida J, Yamagishi R, Terashima Y, Matsushima K, Kaburaki T, Nagai R, Yanagi Y: Choroidal Neovascularization Is Inhibited in Splenic-Denervated or Splenectomized Mice with a Concomitant Decrease in Intraocular Macrophage. *PLoS One* 11:e0160985, 2016
75. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, vazini H, taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A: Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 233 :6425-6440,2018
76. Yang Y, Liu F, Tang M, Yuan M, Hu A, Zhan Z, Li Z, Li J, Ding X, Lu L: macrophage polarization in experimental and clinical choroidal neovascularization. *Sci Rep* 6:30933, 2016