

氏名	新井 悠介
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 805 号
学位授与年月日	令和 3 年 6 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学位論文名	滲出性加齢黄斑変性に対する抗 VEGF 療法における前房中タンパク質と治療結果
論文審査委員	(委員長) 教授 蕪 城 俊 克 (委員) 教授 草 鹿 元 教授 金 澤 丈 治

論文内容の要旨

1 研究目的

滲出性加齢黄斑変性 (AMD) における血管新生と血管透過性亢進は主に血管内皮増殖因子 (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。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。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が、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、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、滲出性 AMD に対する抗 VEGF 治療の治療効果を予測可能かどうか検討した。

2 研究方法

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性 AMD 患者に対し 3 か月連続で抗 VEGF 薬 (ranibizumab) 硝子体注射を受けた 48 例 48 眼。1 回目、3 回目の抗 VEGF 薬投与前に前房水を採取し、前房中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。

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)。

3 研究成果

【治療前視力不良と関連するサイトカイン因子】

ステップワイズ変数選択後の重回帰分析では、各種前房中サイトカイン濃度の中で、logMCP-1 高値 (β 係数= 0.44、 $P < 0.001$) および logIL-10 低値 (β 係数= -0.16、 $P = 0.033$) が治療前最高矯正視力 (BCVA) 不良と独立して有意に関連していた。

【治療 12 か月での視力改善と関係するサイトカイン因子】

ステップワイズ変数選択後の重回帰分析では、各種前房中サイトカイン濃度の中で、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】

ステップワイズ変数選択後の重回帰分析では、各種前房中サイトカイン濃度の中で、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。

4 考察

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 や IP-10 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、IL-10 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脈絡膜新生血管 (CNV) の活動性に影響を与える。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。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、IL-10 は、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。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型 AMD における炎症の重要な指標であると推測した。

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 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。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報告されているが、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。

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、MMP-9 高値、治療 2 か月での CXCL12 低値および IL-10 高値が、治療に要した注射回数の増加に有意に関連していた。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示唆された。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、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閉門の透過性の制御に関与している。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。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)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。また、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おり、CNV 活性に関与する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、IL-10 が M2 マクロファージの数の増加と異常な血管新生に関連していると考えられているため、血管新生の増強が治療 2 か月後での注射回数が増加に影響していると考えられた。

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、プレシジョン・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。

論文審査の結果の要旨

・研究目的：

本学位論文は加齢黄斑変性（AMD）における前房水中生理活性蛋白（サイトカイン）濃度と治療結果の相関を明らかにすることを目的とした研究である。滲出型 AMD では抗 VEGF 治療の有効性が大規模臨床試験で示され、治療の第一選択となっているが、効果不良例や多数の再注射が必要な症例が存在する。治療前と抗 VEGF 薬治療の導入期後の炎症性サイトカインの前房中濃度を用いて、滲出型 AMD に対する抗 VEGF 治療の治療効果が予測できるかを解析することを目的として本研究を行った。

・研究方法：

本研究では、未治療の滲出型 AMD 患者に 3 か月連続で抗 VEGF 薬（ranibizumab）硝子体注射した後、再燃時再注射（PRN 法）で治療を継続し 1 年以上治療した 48 例 48 眼について、抗 VEGF 薬硝子体投与直前に前房水を採取し、9 種類のサイトカインを測定した。

・研究の学問的意義・新規性：

滲出型 AMD に対する抗 VEGF 治療前および治療開始早期の前房中の炎症性サイトカイン前房中濃度と視力予後・治療効果との関係を調べた研究報告は極めて少なく、定説がない。本研究では、滲出型 AMD に対する抗 VEGF 治療前および治療開始早期の前房中を用いて、既報において AMD の病態への関与が報告されている 9 種類のサイトカイン濃度を測定し、視力予後・治療効果の予測因子としての有用性を検討した。その結果、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 か月後での矯正視力改善と有意に関連した。また、治療 2 か月時での CXCL12 濃度高値と IL-10 濃度低値は、ranibizumab の少ない注射回数と関連していた。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濃度を調査することによって滲出型 AMD の抗 VEGF 治療の効果が予測でき、プレシジョン・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。

- ・問題点および改訂の指導内容（あった場合）
- ・紙での学位論文と比べてスライドでの発表では、各サイトカインの意義についても言及され分かりやすくなっていた。本論文もスライドプレゼンテーションに従って改訂する必要がある。
- ・治療前と治療後のサイトカインの変化を調べた方がよかったとの指摘が出たが、これについては別論文が出版されているため今回の研究では言及しなかったと回答があった。
- ・今回測定した 9 種類のサイトカインはどのようにして選んだかを記載する。
- ・眼内液の採取後から保存までの手順、およびどのくらいの時間がかかったかについて記載する。
- ・今回の結果から幾つかのサイトカインが予後マーカーとなりうる事が分かったが、どのサイトカインが特に重要と考えるのかが書かれていない。
- ・今回の結果を受けて、滲出型 AMD の病態における本研究のサイトカインの役割に関する模式図を示すとよい。
- ・図、表の書き方に間違いがある。①図ではタイトルおよび図説は下に書くこと、表ではタイトルは上に、説明文（略語など）は下に書くこと。②図 6 では図内の ABCDE は大文字なのに、説明文では小文字になっている。③図 3 にはそれぞれの図に a,b,c を付けて図の下に説明を書く。④全ての図には図説を付けること。
- ・今回の結果で重要であったサイトカインに絞ってそのサイトカインの意義、その上昇でなぜ予後が悪くなるのかを過去の研究論文を引用して推測し、考按に記載すること。
- ・本研究の臨床上的意義について書く。このサイトカインが高ければ特に繰り返し抗 VEGF 注射を行ったほうがよい可能性など。
- ・タイトルを含め本文中の「前房水中タンパク質（濃度）」を「サイトカイン（濃度）」にすべきである。
- ・P11、5 行目：シャピロウィーク W 検定でサイトカイン濃度が正規分布を確認とあるが、サイトカイン濃度は通常正規分布はしない。サイトカイン濃度は対数変換し、対数値に対して正規分布であること確認、が正しい。
- ・P14,line10-18 12 ヶ月の注射回数と関連する因子を単回帰、重回帰それぞれ言及があるが、新たな表(7)と表記すべきでは？
P14, line 17,18 「回数と関連していなかった（図6）」とあるが、図6はサイトカインとの相関図であり、図6ではない。図6の説明が本文中にない。図6の統計方法は？白丸黒丸は何を意味するのか？相関近似直線が実践と破線の2本あるが何故か？図の説明を追加すること
- ・表5のタイトル 「…における改善度」を追加すべき
- ・P24, line16 骨髄細胞（マクロファージ・単球）とあるが両者は同じでない
- ・P24,line18 「骨髄細胞は少なくとも」→「骨髄由来の単球・マクロファージは」 …M1/M2 マクロファージのことを言いたいのでは？
- ・P25, line3 「代替的に活性化されたマクロファージ」→「M2 マクロファージ」
- ・P24,line17-p25,line3 単球、マクロファージ、IL-10 などについて引用文献が必要である。AMD と M2 マクロファージ、IL-10 については下記の既報があり、引用すべき。

Yang Y, Liu F, Tang M, et al. Macrophage polarization in experimental and clinical choroidal neovascularization. Sci Rep. 2016 Aug 4;6:30933.

・ P26、15-17 行目、結論を分かりやすく記載すべき。「IL-10 濃度も注射回数と関連していた」
→「また、治療 2 か月時での CXCL12 濃度高値と IL-10 濃度低値は、ranibizumab の少ない注射回数と関連していた。」

・ P27, line7-9 「特に、CXCL12 は、過去の報告で示唆されたように[74]、CNV 活性に関与する別の重要な分子である可能性がある。」とあるが、この意味が不明瞭である。「別の重要な」とは何と比べて別なのか？

以上。

・ 本学学位論文としての可否の判断結果およびその理由

本研究は滲出型 AMD に対する抗 VEGF 治療の治療効果を予測する因子として前房水中のサイトカインに着目し、滲出型 AMD の病態への関与が示唆されている 9 種類のサイトカインについて検討を行った。その結果、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 か月後での視力改善と有意に関連した。また、治療 2 か月時での CXCL12 濃度高値と IL-10 濃度低値は、ranibizumab の少ない注射回数と関連していた。これらの結果は新知見であり、滲出型 AMD の病態および抗 VEGF 治療効果不良症例の病態を考える上で重要な情報を有すると考えられる。よって本論文を本学学位論文として認めることを 3 名の審査委員の満場一致で決定した。なお、学位審査において指摘された修正事項に関しては、審査委員長の蕪城の責任で論文の修正を進め、各審査委員の先生にも修正後の論文を確認して頂くこととした。

試問の結果の要旨

・ 申請者による発表の具体的内容：

学位審査では、申請者から加齢黄斑変性 (AMD) の説明、および滲出型 AMD では抗 VEGF 治療が現在第一選択となっているが、効果不良例や多数の再注射が必要な症例が存在すること、本研究では滲出型 AMD における前房水中生理活性蛋白 (サイトカイン) 濃度と治療結果の相関を明らかにすることを目的とした研究であることの説明があった。研究方法としては未治療の滲出型 AMD 患者に 3 か月連続で抗 VEGF 薬 (ranibizumab) 硝子体注射した後、再燃時再注射 (PRN 法) で治療を継続し 1 年以上治療した 48 例 48 眼について、抗 VEGF 薬硝子体投与直前に前房水を採取し、凍結保存の後、9 種類のサイトカインを測定したことが説明された。続いて本研究の具体的な結果が提示された。最終的に、①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 か月後での矯正視力改善と有意に関連した、②治療 2 か月時での CXCL12 濃度高値と IL-10 濃度低値は、ranibizumab の少ない注射回数と関連していた。これらの結果から、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濃度を調査することによって滲出型 AMD の抗 VEGF 治療の効果が予測でき、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と結論付けた。

・ 審査員の質疑の具体的な内容、およびそれに対する応答

・ 草鹿委員からは、紙面で提出された学位論文と比べて本日スライドで提示された結果は分かりやすくなっているので、本日スライドで提示された結果に従って学位論文を修正するとよいと、

指摘があった。具体的には IL-10 が AMD にとって善玉か悪玉かの議論が、本日の発表では悪玉として提示されていた、この事は考按に記載するとよいと指摘があった。申請者からは、そのように修正すると返答された。また、治療前と治療後のサイトカインの変化を調べた方がよかったと指摘されたが、これについては別論文が出版されているため今回の研究では言及しなかったと申請者より回答があった。さらに、今回有意差のあったサイトカインについては、滲出型 AMD の病態における意義、なぜ視力予後に影響したのかを過去の文献を引用してスペキュレーションで良いので考按で記載すべきとの指摘があった。申請者からは、そのように修正すると返答された。

・金澤委員からは、今回 9 種類のサイトカインを測定したが、これらを選んだ理由を記載すべきとの指摘があった。申請者からは、過去の文献で AMD の病態に関連性があるとされているサイトカインの中から選んだ、と返答があった。次に、眼内液の採取後から保存までの手順、おおよびどのくらいの時間がかかったかについて記載すべきとの指摘があった。回答者からは、手術室で眼内液を採取後、なるべく早くドライアイスで凍結して保存したと回答があった。また、今回の結果から幾つかのサイトカインが予後マーカーとなりうる事が分かったが、どのサイトカインが特に重要か書かれていない、また今回の結果を受けて、滲出型 AMD の病態における本研究のサイトカインの役割に関する模式図を示すとよい、との指摘があった。申請者からは、その点を踏まえて修正するとの返答があった。

・蕪城委員からは、タイトルを含め本文中の「前房水中タンパク質（濃度）」を「サイトカイン（濃度）」にすべきであると指摘があった。申請者からは、そのように修正すると返答があった。次に、「P11、5 行目：シャピロウィーク W 検定でサイトカイン濃度が正規分布を確認とあるが、サイトカイン濃度は通常正規分布はしない。サイトカイン濃度は対数変換し、対数値に対して正規分布であること確認、が正しいのでは」と指摘された。申請者はその通りであり、修正すると返答があった。次に、今回の統計では単回帰、重回帰の結果をそれぞれ示し、結果に一部相違がみられるが、重回帰の結果を重視すると考えているのか、と質問があった。申請者からは、重回帰の結果を重視すると返答があった。また図 6 には白丸と黒丸の意味の説明がないなど、非常に分かりにくいので、図説および本文での説明を分かりやすく修正すべきとの指摘があった。申請者からはそのように修正すると返答があった。さらに P24, line16~P25, line3 にかけての AMD の病態にいける骨髓細胞（マクロファージ・単球）の記載が分かりにくい、骨髓細胞と単球・マクロファージは同一ではないので使い分けて記載する、M1/M2 マクロファージのことを言いたいのではないかと思われるので、M1/M2 マクロファージという言葉を使って説明した方がよい、それには Sci Rep 2016 の論文が参考になることが指摘された。申請者からは、指摘に従って修正するとの返答があった。

・申請者の応答とそれに対する評価

申請者は審査委員の指摘に対して適切に回答していた。3 人の審査委員からも今回の学位審査のプレゼンテーションおよび試問への回答は適切であると認められた。

・試問の合否の判断結果及びその理由

学位審査では、本研究では滲出型 AMD に対する抗 VEGF 治療の治療効果を予測する因子として前房水中のサイトカインに着目し、滲出型 AMD の病態への関与が示唆されている 9 種類のサ

イトカインについて検討を行ったこと、その結果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 か月後での視力改善と有意に関連し、治療 2 か月時での CXCL12 濃度高値と IL-10 濃度低値は、ranibizumab の少ない注射回数と関連していたことが示され、これらのサイトカインが滲出型 AMD の抗 VEGF 治療の効果予測因子となりうることが示された。これらの結果は新知見であり、滲出型 AMD の病態および抗 VEGF 治療効果不良症例の病態を考える上で重要な情報を有すると考えられる。また学位審査のプレゼンテーションおよび試問への回答は適切であると認められた。よって本論文を本学学位論文として認めることを 3 名の審査委員の満場一致で決定した。なお、学位審査において指摘された修正事項に関しては、審査委員長 蕪城の責任で論文の修正を進め、各審査委員の先生にも修正後の論文を確認して頂くこととした。