

表 題 滲出性加齢黄斑変性に対するラニズマブ治療前後の前房中のサイトカイン濃度の変化

論文の区分 論文博士

著 者 名 坂本 晋一

所 属 自治医科大学 眼科学講座

2021年10月14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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11 頁
3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16 頁
4. 考按・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35 頁
5. 結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44 頁
6. 謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44 頁
7. 参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45 頁

1. はじめに

加齢黄斑変性症(age-related macular degeneration : AMD)は 50 歳以上の症例において、黄斑部(中心窩を中心とする直径 6000 μ m 以内の領域)に病変が生じるものの総称で、進行性の中心視機能障害を引き起こす[1・2]。多因子疾患であり、加齢のみならず、遺伝や喫煙などの関与が報告されている。不可逆的な失明の原因であり、2020 年までに世界で 1 億 9600 万が影響を受け、2040 年までに 2 億 8800 万人に増加すると推定されており、増加傾向にある[3]。我が国では 1988 年時点で黄斑変性は 8 位(4.9%)で上位 5 疾患に入っていなかったが、2007 年 4 位(10.9%)、2015 年 4 位(8.0%)と近年で増加している表 1[4-6]。

表 1

失明原因の上位5疾患の推移

	1988年(中江公裕ら)	2007年(山田昌和)	2015年(Morizane Y et.al.)
1	糖尿病網膜症(18.3%)	緑内障(24.3%)	緑内障(28.6%)
2	白内障(15.6%)	糖尿病網膜症(20.6%)	網膜色素変性(14.3%)
3	緑内障(14.5%)	変性近視(12.2%)	糖尿病網膜症(12.8%)
4	網膜色素変性(12.2%)	加齢黄斑変性(10.9%)	黄斑変性(8.0%)
5	高度近視(10.7%)	白内障(7.2%)	網脈絡膜萎縮(4.9%)

網膜は 10 層構造からなり、網膜の最外層にある網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium : RPE) は、視細胞の老廃物を処理する機能があるが、加齢や酸化ストレスなどにより機能障害が生じると、老廃物が網膜下にドルーゼンとして蓄積する。ドルーゼンは炎症を引き起こし、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) が誘導され、脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization : CNV) の出現の基盤になる。

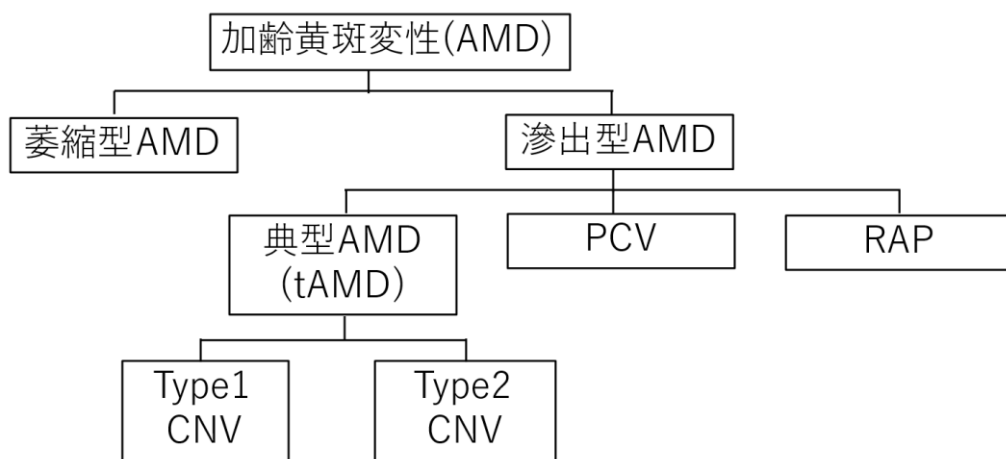
AMD の症状は歪み、中心暗点、視力低下である。眼底検査では黄斑部に出血や滲出性変化を認める。診断や治療の評価に眼底検査および光干渉断層計 (Optical Coherence Tomography : OCT)、フルオレセイン蛍光造影 (fluorescein angiography : FA) やインドシアニングリーン蛍光造影 (indocyanine green angiography : IA) を施行する。近年は、OCT 画像から血流情報を検出して画像を再構築し血管構造を送別に表示する光干渉断層血管撮影 (OCT angiography : OCTA) も用いられ、造影剤を使用せず非侵襲的に CNV の抽出も可能となった。

日本において加齢黄斑変性は前駆病変と加齢黄斑変性に分けられており、前駆病変は軟性ドルーゼンと RPE の異常である。また、加齢黄斑変性は滲出型と萎縮型に分けられ、滲出型 AMD は典型 AMD (typical AMD) と、ポリープ状脈絡膜血管症 (polypoidal choroidal vasculopathy : PCV) と、網膜血管腫状増殖 (retinal angiomatous proliferation : RAP) に分けられる (図 1)。欧米人の AMD

では PCV の頻度は高くないが、日本を含めたアジア人の AMD では PCV が約半数を占め、アジア人と欧米人で滲出型 AMD の表現型が大きく異なる[7]。滲出型 AMD の主要所見として、CNV、1 乳頭径以上の漿液性の網膜色素上皮剥離(retinal pigment epithelial detachment : PED)、出血性 PED、繊維性瘢痕が挙げられ、少なくとも 1 つを満たせば滲出型 AMD 確定診断となる[1]。また、CNV は病理組織分類で RPE の下にある Type 1 CNV と RPE の上にある Type2 CNV に分けられる[8]。病理学的研究では、Type1 CNV 単独が 15%、Type2 CNV 単独が 21%、混在が 48%であった[9]。実臨床では病理組織像は得られないので、OCT を用いて CNV の位置を判断する。

図 1

加齢黄斑変性(AMD)の分類



AMD : age-related macular degeneration tAMD : typical AMD
PCV : polypoidal choroidal vasculopathy RAP : retina angiomatous proliferation
CNV : choroidal neovasculariation

图 2

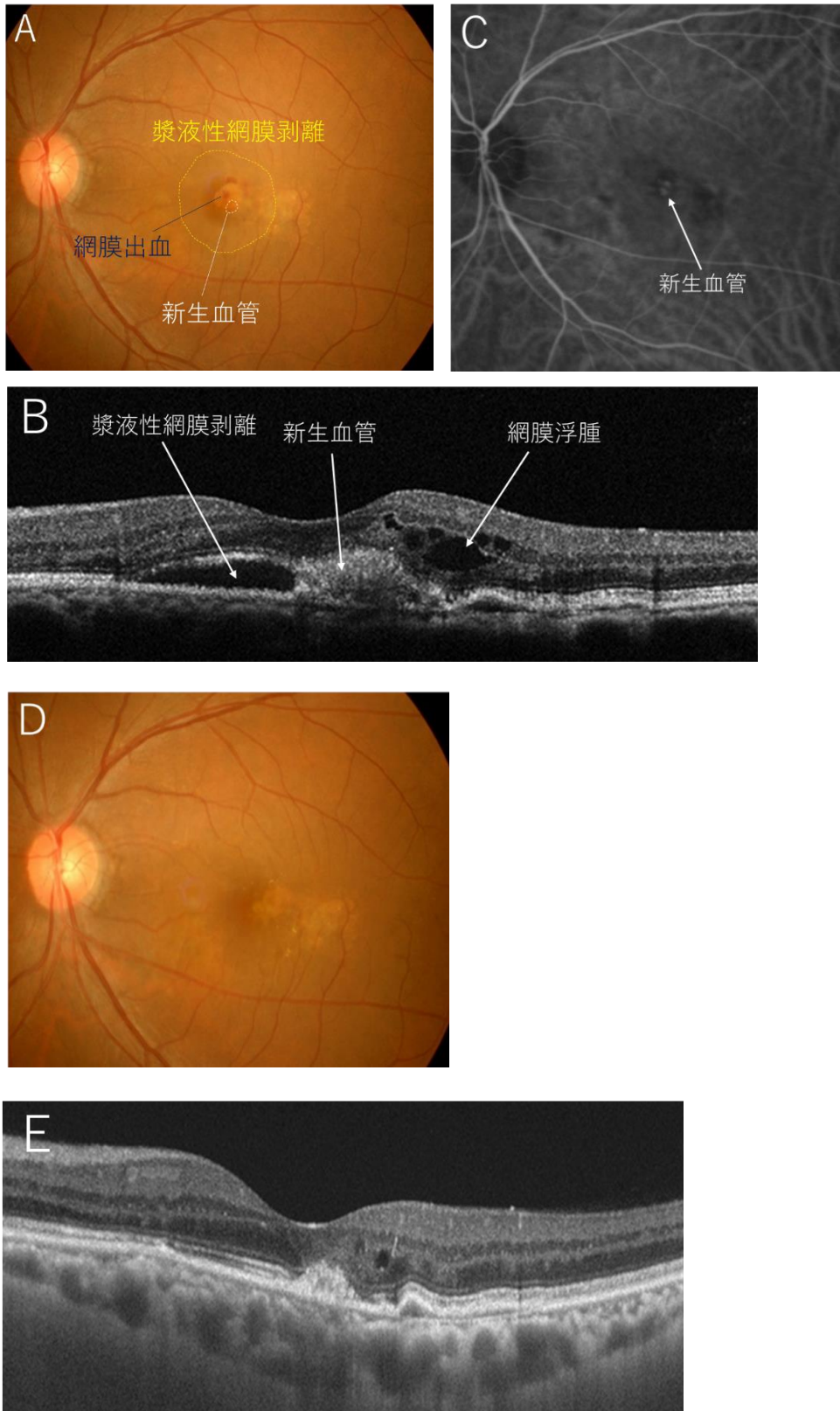


図 2：滲出型 AMD の臨床像

(A)眼底写真を示す。黄色の破線で囲われた部位に漿液性網膜剥離を認める。中心窩近傍に網膜下出血と新生血管を認める。(B)OCT 画像を示す。漿液性網膜剥離と新生血管、網膜浮腫を認め、滲出性変化を示している。(C)インドシアニンググリーン蛍光眼底造影検査を示す。中心窩近傍に過蛍光の所見を認め、新生血管である。(D)抗 VEGF 療法後の眼底写真を示す。漿液性網膜剥離や網膜下出血は消退している。(E)抗 VEGF 療法後の OCT 画像を示す。漿液性網膜剥離や網膜浮腫は消退し、滲出性変化が消失している。

治療の対象となるのは、滲出型 AMD で、レーザー光凝固、光線力学療法、抗 VEGF 療法がある。このうち、抗 VEGF 療法が、滲出型 AMD に対して、視力改善・維持ができることが、大規模臨床試験で示され[10-12]、治療の第一選択となっている。初期の大規模臨床試験である ANCHOR 試験 [10]、MARINA 試験[11]では、抗 VEGF 薬であるラニビズマブの毎月投与が行われたが、抗 VEGF 薬硝子体内投与は、眼内炎などの眼局所副作用のリスクや、わずかではあるが、脳梗塞の再発のリスク上昇がありうる [13・14]。さらに、抗 VEGF 薬は薬価が高額であり、毎月投与では患者の経済的負担が非常に大きくなる。また、治療効果や再発の頻度は患者ごとに異なるため、毎月投与では多くの患者では過剰治

療になる。そのため、実臨床では治療回数を減らしつつも、治療効果を得るため投与方法の検討が行われた。その中で、治療開始後3ヶ月で視力が改善し、疾患の活動性が抑制され、その後24カ月にわたり、視力維持効果があったことに着目し、3回目までの毎月投与を導入期と考え、その後、維持期と考え月1回の検査の上、滲出性変化があり注射の必要性があると判断した際に注射を行う、必要時投与(pro re nata : PRN)法が広く行われるようになった。

しかし、大規模臨床試験のその後の経過を追った、seven up study では実臨床で治療回数の減少に伴い、視力の低下を引き起こしていた[15]。PRN法では、滲出性変化が起きてから治療することも視力低下の原因と考えられ、現在では、導入期3回の毎月投与を行った後の維持期には、注射を継続しながら投与間隔を延長する Treat & Extend 法も広く行われるようになった。しかし、実臨床ではPRN法で再投与の必要がなくなる患者もいるため、Treat & Extend 法では過剰治療になる可能性も指摘されている。AMDは治療に対する反応が異なるため、治療反応の指標の確立と個別化医療の確立が、今後非常に重要である。

滲出型AMDにおける血管新生と血管の透過性亢進は、VEGFおよびほかの炎症性サイトカインにおいて主に引き起こされる[16]。抗VEGF療法は、VEGFをブロックすることで、血管透過性と炎症の両方を阻害する。

これまでの研究では、AMDを罹患する眼では、インターフェロン γ 誘導タ

ンパク質 10(IP-10)、単球化学誘引タンパク質 1(MCP-1)、C 反応性タンパク質 (CRP)、細胞間接着分子 1 および血管細胞接着分子 1 などの、多くのサイトカイン濃度が上昇していると報告されている [17・18]。これらのサイトカインはまた、滲出型 AMD における CNV の活性を変えている。滲出型 AMD で最もよく研究されたサイトカインである MCP-1 は、炎症を起こした組織に炎症性単球を遊走させる。また、単球は VEGF およびインターロイキン 6(IL-6) のようなほかの血管新生/炎症性サイトカインや、IL-4 および IL-10 などの抗炎症性サイトカインを産生することによって、炎症の増減を制御している [19]。AMD に関与するほかの重要な炎症性サイトカインには C-X-C モチーフケモカインリガンド 1(CXCL1)、CXCL10(IP-10)、CXCL12 および CXCL13 などの C-X-C モチーフサイトカインが含まれ、これらは白血球を遊走させ、血管新生の促進や抑制をする [20]。これらの C-X-C サイトカインの一部は、網膜色素上皮で発現し、AMD で増加している。重要なこととして、サイトカインおよびケモカイン以外のマトリックスメタロプロテイナーゼ 9(MMP-9) などの組織プロテアーゼは、CNV で過剰発現され、CNV 増殖を促進する [21]。しかし、滲出型 AMD において極めて重要や役割を果たすと考えられるこれらの分子の眼内濃度に関する報告は、いくつかあるものの研究によって結果が異なるなど、十分に解明されていない [17・18・22-25]。

以前のいくつかの研究では、抗 VEGF 薬の硝子体注射後の前房水のサイトカイン濃度の変化を調査している。Rezar らの研究では、ベバシズマブによるフレキシブルな 1+pro re nata (PRN : 1 回投与後に必要時投与を行う方法) 治療レジメンを行った結果、血小板由来成長因子 AA (PDGF-AA) の増加を伴う VEGF 濃度の減少が確認された [22]。Agawa らの研究では、ベバシズマブ注射の 2 日後に前房水サイトカイン濃度の変化を調査し、VEGF 濃度が減少する傾向があるのに対し、IL-6 および IL-8 濃度が増加することを明らかにした [23]。これらのパイロット研究は、抗 VEGF 薬の注射後のサイトカインレベルの変化を示しているが、いくつかの重要な問題は不明のままである。第一に、3 ヶ月間の毎月硝子体注射治療後の前房水サイトカインレベルの変化がどうであるかということである。様々な投与方法の上での前房水サイトカインが調査されたが、3 ヶ月間毎月硝子体注射を行う治療レジメンは 1+PRN レジメンと比較してよりよい治療結果であることが示されている [26]。よって、現在ではほとんどの医師は導入期の抗 VEGF 療法に 3 ヶ月毎月投与を行っており、我々の研究でも同様である。

第二に、サイトカインレベルと解剖学的結果との間に関連があるかどうかという点である。Rezar らの研究で、VEGF と PDGF は疾患活動性に関連している可能性が示唆されている [22]。しかし、他のサイトカインが解剖学的な結果に関連しているかどうかは不明である。一般的に抗 VEGF 薬の全身投与後に、様々

な炎症性サイトカインの血漿濃度に大きな変化があることは、受け入れられている。Salnikov らの研究では、これらのサイトカインのいくつかは、固形腫瘍の抗 VEGF 療法の治療結果を予測するために、潜在的なバイオマーカーとして使用することができることを示している [27]。

しかし残念ながら、Rezar らの研究では、調査された 29 のサイトカインのうち、VEGF、PDGF-AA、IL-6、IP-10 および MCP-1 のみが測定可能なレベルであった [22]。さらに、抗 VEGF 薬存在下で、市販の ELISA キットでは VEGF 濃度が過小評価されていることを我々は報告しており [28]、これらの以前の研究で使用された方法が不適切である可能性があり、所見を確認するためにさらなる研究が必要と考えられた。また、これまでの研究は、対象患者数が 28~37 例と多くはなかった。これらの問題点に対処するため、我々は今回の解析を行った。

2. 目的と方法

本研究では治療開始前として1回目のラニズマブ注射前の前房水を採取し、治療後として3回目のラニズマブ硝子体注射前の前房水を採取して、各種サイトカイン濃度を比較することで、抗 VEGF 療法による治療効果とサイトカインの濃度を調査・検討することを目的とした。これまでの研究と最近の実験に基づいて分析するサイトカインを選択し[29]、C-X-C motif chemokine ligand 1(CXCL1)、C-X-C motif chemokine ligand 10(CXCL10)/interferon- γ -induced protein10(IP-10)、C-X-C motif chemokine ligand 12(CXCL12)、C-X-C motif chemokine ligand 13(CXCL13)、monocyte chemoattractant protein 1(MCP-1)、C-C motif chemokine ligand11(CCL11)、interleukin-6(IL-6)、interleukin-10(IL-10)および matrix metalloproteinase 9(MMP-9)を選択した。

【研究の設計と承認】

この前向き研究は、ヘルシンキ宣言に従った。インフォームドコンセントはすべての患者から取得している。日本厚生年金(JCHO)東京新宿メディカルセンターより、制度審査委員会(IRB)の承認を得た。

【対象・臨床検査】

本研究には、48人の未治療の滲出型AMD患者の48眼で、2010年11月から2012年8月にかけて、JCHO東京新宿メディカルセンターで毎月の3回連続

ラニズマブ硝子体注射を受けた患者である。コントロールは眼底疾患のない 80 人の白内障手術患者の 80 眼である。

1 回目および 3 回目のラニズマブ硝子体注射直前に約 0.2ml の前房水を採取した。また、白内障手術開始時に、希釈されていない前房水(通常約 0.2ml)を手動で、使い捨ての注射器に吸引し、すぐに滅菌チューブに移し、必要になるまで-80°Cで保存した。

以下のサイトカインの濃度は、メーカーの指示に従って、マルチプレックスサイトカインアッセイ(Filgen、愛知、日本)を用いて測定した：CXCL1、IP-10、CXCL12、CXCL13、MCP-1、CCL11、IL-6、IL-10、MMP-9。検出限界はそれぞれ、1.25、2.76、2.87、0.76、0.95、0.43、0.41、0.15、0.57pg/ml だった。測定は各サンプルに対して 2 回行い、平均値を算出した。

VEGF の濃度は、サンプル量が VEGF 濃度を測定するのに十分であった場合、メーカーの指示に従って、ELISA キット(R&D Systems、ミネアポリス、ミネソタ、米国)を使用して測定した。VEGF キットは、4 つの VEGF アイソフォームのうち 2 つ(VEGF121 および VEGF165)の検出が可能で、検出限界 2.2pg/ml であった。

フルオレセイン蛍光眼底造影検査は、薬物アレルギー、肝機能障害または最近の脳血管イベントがある禁忌患者を除いて、AMD の診断と type1CNV および

type2CNV を判別するために滲出型 AMD 患者でルーチンに行われた。インドシアニンググリーン蛍光眼底造影検査はポリープ状脈絡膜血管症(PCV)を同定するために、フルオレセイン蛍光眼底造影検査とともに行われた。各患者は視力検査とスペクトラルドメイン光干渉断層計(SD-OCT; Cirrus HD-OCT Model4000(Carl Zeiss Meditec AG、イエナ、ドイツ))を受診毎に行った。視力検査は 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 視力に変換して統計解析を行った。中心窩網膜厚(central retinal thickness : CRT)は、内境界膜からブルッフ膜までの距離と定義した。各厚さは、OCT キャリパー機能を使用して中心窩を手動で測定した。眼軸長は A モード超音波検査(UD-6000、Tomey、愛知、日本)で測定した。最大病変直径(greatest linear 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。後部硝子体剥離(PVD)は、B モード超音波検査(UD-6000)にて、過去の文献と同様の方法で調べた[30・31]。簡単に説明すると、眼球運動の間の硝子体後部の可動性を、眼瞼にエコープローブを当てる方法を用いて調べた。もし、網膜表面から後部硝子体が剥離して眼球運動に伴う可動性があれば、完全な PVD を有する(PVD 群)と分類され、それ以外の場合は PVD なし群と分類された。PVD なし群には、部分的な PVD のもの

と、PVDがないものが含まれている。

滲出型AMDはtAMDとPCV、RAPに分けて検討した。tAMDはCNVの位置によってType1CNVとType2CNVに分けて検討した。網膜浮腫や網膜下液、新規の網膜下出血といった滲出性変化が残るものをwet、これら3つの滲出性変化が認められないものをdryとし、ラニビズマブ3回目注射前にwetであった群とdryとなった群に分けて検討した。

【統計解析】

統計解析はJMP Pro V.11.2.0ソフトウェア(SAS Institute、ケイリー、ノースカロライナ、米国)を使用して行った。カテゴリーデータはカイ二乗検定を使用して評価し、連続変数は、スチューデントのt検定を使用して評価した。サイトカイン濃度の変化は対数変換後に、対応のあるt検定で分析した。AMD群とコントロール群で濃度を比較したとき、年齢、性別、眼軸長、PVDの有無などのベースライン特性因子との関連を、重回帰分析にて補正した。この変数の分布が歪んでいるため、対数変換した濃度を使用した統計モデルを調べた。統計学者との議論の後、これはAMDとサイトカインの間の可能な関連を特定することを目的とした仮説生成研究であったため、ボンフェローニの補正は行われなかった。3回目の注射で滲出性変化の有無別の群間濃度、および最初の注射から4ヶ月以内の再発の有無の群間濃度を比較した場合、年齢、性別、眼軸長およびPVD

の有無などのベースライン特性間の関連は、重回帰分析によって修正された。サイトカイン濃度の説明変数を選択するために、段階的な可変選択(最小ベイズ情報基準、変数数の増加)を、年齢、性別、眼軸長、GLD、PVDの有無、罹病期間、ベースラインCRT、および最初の注射から4ヶ月以内の再発の有無で行った。再発については、毎月の受診毎の眼底検査とOCTにて網膜浮腫や網膜下液、新規の網膜下出血といった滲出性変化を認めた場合再発とした。

3. 結果

【患者の人口統計学的特徴】

滲出型 AMD および対照症例の平均年齢はそれぞれ 73.0(範囲、54-89)および 74.8(55-87)であった($p=0.17$)。48 例の滲出型 AMD 症例のうち 31 例(64.6%)、80 例のコントロールのうち 37 例(46.3%)は男性であった($p=0.043$)。滲出型 AMD と対照眼の眼軸長の平均は、それぞれ 23.8 および 23.2mm であった($p=0.041$)。PVD は AMD 患者 22 例(45.3%)で起こっており、コントロールでは 51 例(63.8%)であった($p=0.048$)。ラニビズマブを 2 回注射した後も、AMD 群の患者で新たに PVD は起きていなかった。AMD48 症例のうち典型 AMD が 21 例、PCV が 27 例であった。RAP は 1 例もいなかった(表 2)。典型 AMD のうち Type1CNV は 16 例、Type2CNV は 5 例であった。7 例は 3 回目の注射時に滲出性変化が残存していた(典型 AMD5 例、PCV2 例)。さらに、25 例は 4 カ月以内に再発を起こした。他の例は 6 カ月以降に再発を起こすか、12 カ月の観察期間中には再発を来さなかった。

表 2 患者の人口統計学的特徴

	AMD	Control	P value
<i>n</i>	48	80	
Male, <i>n</i> (%)	31 (64.6)	37 (46.3)	0.043 [†]
Age, y; mean ± SD	72.9 ± 7.7	74.8 ± 6.6	0.17*
Axial length, mm; mean ± SD	23.8 ± 1.5	23.2 ± 1.1	0.041*
PVD, <i>n</i> (%)	22 (45.3)	51 (63.8)	0.048 [†]
Disease type			
Typical AMD, <i>n</i> (%)	21 (43.8)		
Type1CNV	16		
Type2CNV	5		
PCV, <i>n</i> (%)	27 (56.3)		
RAP, <i>n</i> (%)	0 (0)		

AMD : age-related macular degeneration 加齢黄斑変性

SD, standard deviation 標準偏差

PVD : posterior vitreous detachment 後部硝子体剥離

CNV : choroidal neovascularization 脈絡膜新生血管

PCV : polypoidal choroidal vasculopathy ポリープ状脈絡膜新生血管

RAP : retinal angiomatous proliferation 網膜内血管腫状増殖

* Student's t-test, † chi-square test

【1回目および3回目のラニビズマブ注射前のAMD患者のBCVAとCRT】

AMD患者では、2回のラニビズマブ硝子体注射によって有意な視力改善を認め、中心窩網膜厚も有意に減少して解剖学的な所見も改善していた(表3)。

表3 1回目および3回目のラニビズマブ注射前のAMD患者のBCVAとCRT

	1回目注射前	3回目注射前	P value
BCVA mean ± SD	0.41(±0.36)	0.32(±0.35)	0.0078
CRT μ m; mean ± SD	479.4(±197.5)	318.5(±130.8)	<.0001

BCVA : best-corrected visual acuity 最高矯正視力

CRT : central retinal thickness 中心窩網膜厚

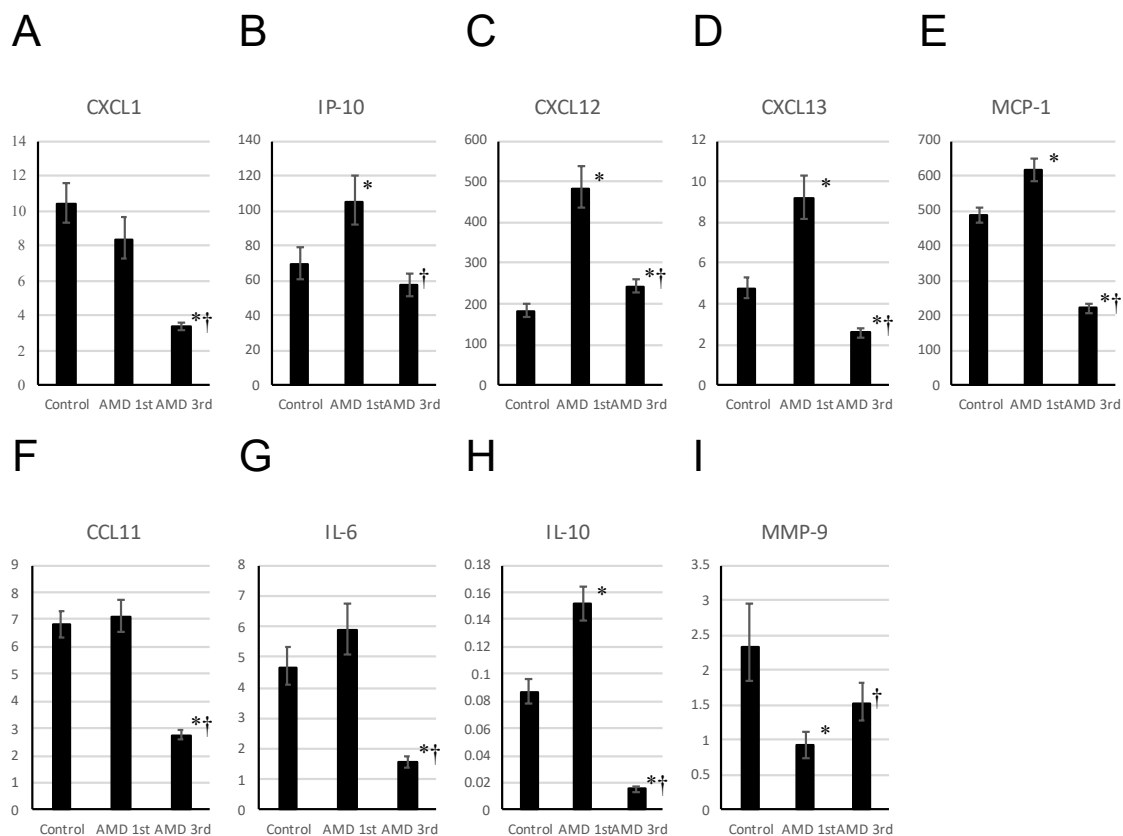
SD, standard deviation 標準偏差

【1回目および3回目のラニビズマブ注射前のAMD患者の前房水のサイトカイン濃度】

AMD患者の1回目および3回目のラニビズマブ注射前の前房水のサイトカイン濃度および対象患者の前房水のサイトカイン濃度を図3および表4に示す。治療前に採取したサンプル(AMD1st)と比較すると、MMP-9を除くすべてのサイトカインの濃度は、2回連続ラニビズマブ注射後(AMD3rd)に有意に減少した。MMP-9のみが有意に増加した。コントロールと比較すると、CXCL1(p<0.0001)、CXCL12(p=0.044)、CXCL13(p<0.0001)、MCP-1(p<0.0001)、CCL11(p<0.0001)、IL-6(p<0.0001)およびIL-10(p<0.0001)の濃度は、3回目の注射前にさらに低かった。IP-10(p=0.48)とMMP-9(p=0.11)の濃度だけがコントロールと比べ有意差なしであった。IL-10を除き、治療前のサイトカイン濃度は、3回目ラニビズマブ注射前のものと相関していた(表5)。VEGFに関しては、サンプル量がサイトカインとVEGFの両方の濃度を測定するのに十分で

はなかったため、すべての患者の濃度を測定できなかった。したがって、29例(60%)しか抗 VEGF 療法前の VEGF 濃度を測定できていない。測定できた範囲で、治療前の VEGF の濃度は、他の治療前サイトカイン濃度と相関していなかった(表6)。

図3 コントロールと AMD 患者の1回目のランビズマブ注射前および3回目のランビズマブ注射前の前房水中サイトカイン濃度の平均値の比較(bar 表示)



縦軸はサイトカイン濃度でいずれも pg/mL

エラーバーは標準誤差を示す

*コントロールと比較して $p < 0.05$ 、†AMD 患者の 1 回目ラニズマブ注射前と比較して $p < 0.05$ を示す。MMP-9 を除くすべてのサイトカインの濃度は、2 回連続ラニズマブ注射後に有意に減少した。MMP-9 のみが有意に増加した。ラニズマブ注射 3 回目の前のサイトカイン濃度はコントロールと比較して CXCL1($p < 0.0001$)、CXCL13($p < 0.0001$)、MCP-1($p < 0.0001$)、CCL11($p < 0.0001$)、IL-6($p < 0.0001$)、IL-10($p < 0.0001$)で有意に低かった。

表4 コントロールとAMD患者の1回目のラニズマブ注射前および3回目の

ラニズマブ注射前の前房水中サイトカイン濃度の平均値の比較(数値表示)

	Control (pg/ml)	AMD 1st (pg/ml)	* vs control p value	AMD 3rd (pg/ml)	** vs control p value	*** vs AMD1st p value
(A)CXCL1	10	8.4	0.25	3.3	<.00001	<.00001
(B)IP-10	69	110	0.017	55	0.48	<.00001
(C)CXCL12	180	480	<0.0001	240	0.044	<.00001
(D)CXCL13	4.8	9.2	0.0006	2.6	<.0001	<.00001
(E)MCP-1	490	620	0.0005	220	<.0001	<.00001
(F)CCL11	6.8	7.1	0.6	2.8	<.0001	<.00001
(G)IL-6	4.7	5.9	0.27	1.6	<.0001	<.00001
(H)IL-10	0.087	0.15	<0.0001	0.015	<.0001	<.00001
(I)MMP-9	2.3	0.92	0.0044	1.5	0.11	0.022

青色のサイトカインはAMDで上昇し、ラニズマブ投与後に下降したもの
 黄色のサイトカインはAMDでは上昇しなかったが、ラニズマブ投与後に下降したもの

橙色のサイトカインはAMDで下降し、ラニズマブ投与後に上昇したもの

表5 治療前とラニビズマブ3回注射前の間のサイトカイン濃度の相関性

	<i>R</i>	P value
CXCL1	0.51	0.0008
IP-10	0.64	<.0001
CXCL12	0.36	0.0131
CXCL13	0.49	0.0004
MCP-1	0.77	<.0001
CCL11	0.53	0.0001
IL-6	0.54	<.0001
IL-10	-0.11	0.4759
MMP-9	0.35	0.0155

R : correlation coefficient

表6 抗 VEGF 療法前のサイトカイン濃度と VEGF 濃度との相関関係

	<i>R</i>	<i>P</i> value
CXCL1	0.37	0.08
IP-10	0.11	0.62
CXCL12	-0.091	0.68
CXCL13	-0.13	0.55
MCP-1	0.17	0.44
CCL11	0.16	0.47
IL-6	0.20	0.35
IL-10	0.36	0.09
MMP-9	0.38	0.076

R : correlation coefficient

【典型 AMD(tAMD)と PCV の比較】

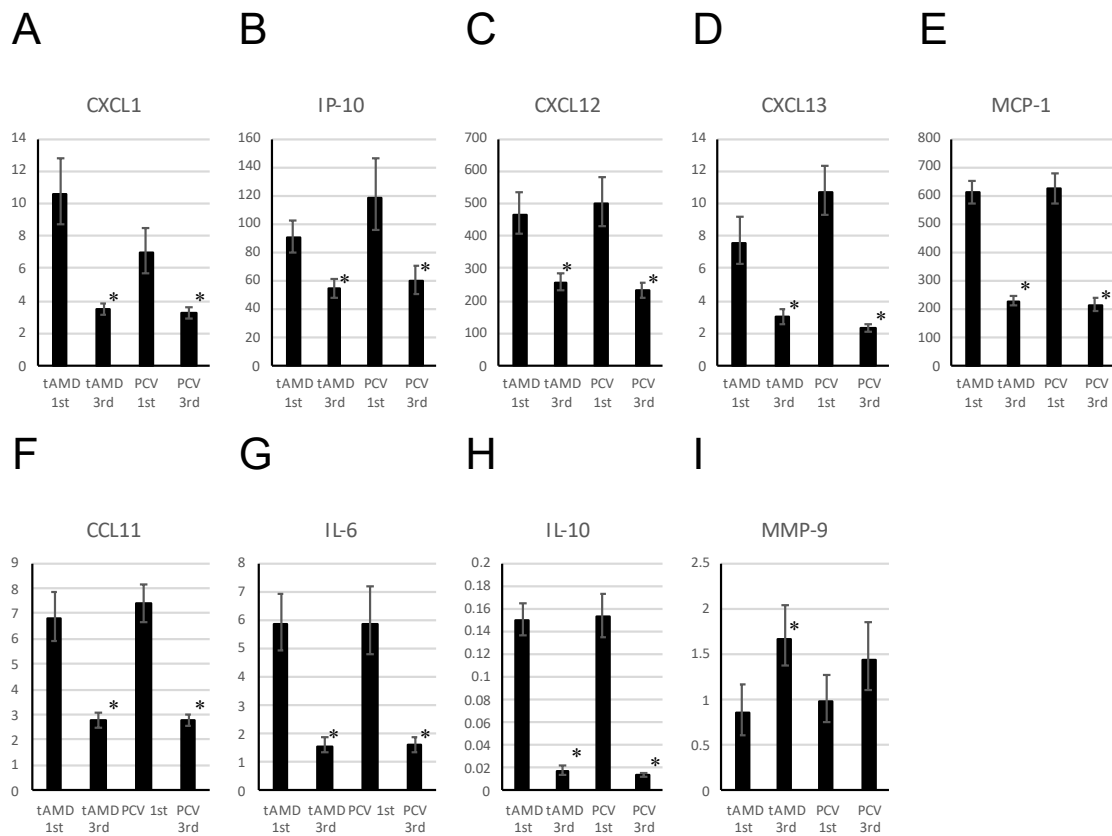
tAMD と PCV の間には、年齢、性別、眼軸長、PVD の有無およびサイトカイン濃度に有意差はなかった(表 7、図 4)。2 回のラニズマブ注射で tAMD と PCV とも CXCL1、IP-10、CXCL12、CXCL13、MCP-1、CCL11、IL-6、IL-10 で有意に減少した。MMP-9 は tAMD で有意に増加したが、PCV では有意差はなかった。PCV では tAMD と比較して CXCL13 のみが大幅に減少していた(図 4、表 8)。

表 7 tAMD および PCV の患者背景

	tAMD (n=21)	PCV (n=27)	p value
年齢(才(SD))	73(7.6)	73(8.0)	0.95
性別(男(%))	11(52)	20(74)	0.12
眼軸長(mm(SD))	23.2(0.98)	22.9(0.81)	0.25
PVD+(%)	12(57)	10(37)	0.16

図4 tAMDおよびPCVにおける1回目ラニビズマブ注射前と3回目ラニビズ

マブ注射前のサイトカイン濃度の平均値の比較



縦軸はサイトカイン濃度でいずれも pg/mL

エラーバーは標準誤差を示す。

* tAMD/PCV それぞれ 1 回目ラニビズマブ注射前と比較して $p < 0.05$ を示す。

表 8 tAMD および PCV における 1 回目ラニビズマブ注射前と比較した、3 回目

ラニビズマブ注射前のサイトカイン濃度の平均値の変化

	tAMD (n=21)	p value	PCV (n=27)	p value	p value (tAMD vs PCV)
(A)CXCL1	-68%	<0.0001	-49%	0.0001	0.054
(B)IP-10	-40%	<0.0001	-50%	0.0003	0.40
(C)CXCL12	-45%	0.0013	-53%	<0.0001	0.42
(D)CXCL13	-60%	<0.0001	-79%	<0.0001	0.0034
(E)MCP-1	-62%	<0.0001	-66%	<0.0001	0.29
(F)CCL11	-59%	<0.0001	-63%	<0.0001	0.59
(G)IL-6	-73%	<0.0001	-73%	<0.0001	0.98
(H)IL-10	-88%	<0.0001	-91%	<0.0001	0.34
(I)MMP-9	+97%	0.046	+47%	0.21	0.50

PCV では、tAMD と比較して CXCL13 のみが大幅に減少した。

【Type1CNV と Type2CNV の比較】

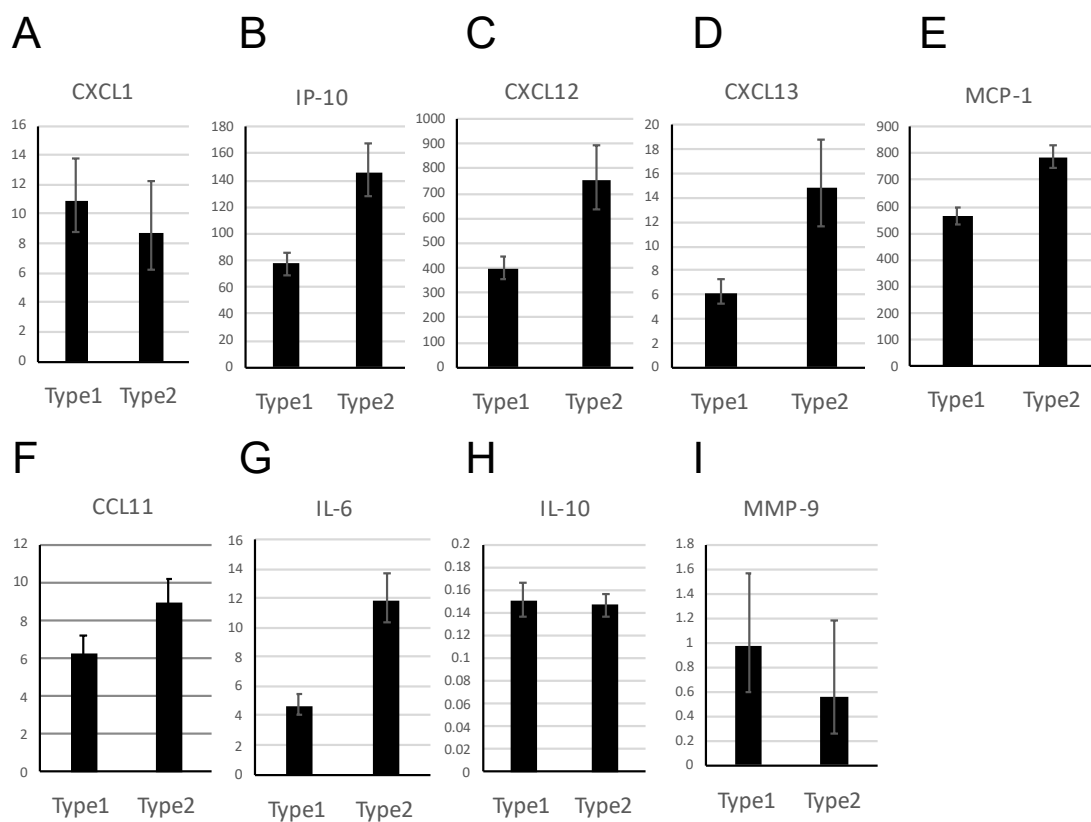
tAMD21 例のうち、Type1CNV が 16 例、Type2CNV が 5 例であった。

Type1CNV と Type2CNV の間に年齢、性別、眼軸長、PVD の有無での有意差はなかった(表 9)。Type1CNV と Type2CNV の間の治療前サイトカイン濃度には有意差はなかった(図 5)。Type1CNV と Type2CNV とのサイトカイン濃度の変化を表 10 に示す。

表 9 Type1CNV および Type2CNV の患者背景

	Type1CNV (n=16)	Type2CNV (n=5)	p value
年齢(才(SD))	75(4.7)	67(12)	0.05
性別(男(%))	9(56)	2(40)	0.52
眼軸長(mm(SD))	23.1(1.0)	23.5(0.89)	0.45
PVD+(%)	8(50)	4(80)	0.22

図5 Type1CNV と Type2CNV の治療前サイトカイン平均濃度



縦軸はサイトカイン濃度でいずれも pg/mL

エラーバーは標準誤差を示す。

いずれのサイトカインも有意差はなかった。

表 10 Type1CNV と Type2CNV とのサイトカイン濃度の平均値の変化

	Type1CNV (n=16)	Type2CNV (n=5)	p value
(A)CXCL1	-69%	-64%	0.78
(B)IP-10	-36%	-50%	0.35
(C)CXCL12	-35%	-67%	0.070
(D)CXCL13	-51%	-80%	0.042
(E)MCP-1	-62%	-63%	0.82
(F)CCL11	-56%	-69%	0.24
(G)IL-6	-74%	-69%	0.68
(H)IL-10	-91%	-76%	0.082
(I)MMP-9	+44%	+35%	0.079

Type2CNV では Type1CNV と比較して CXCL13 のみが大幅に減少していた

【3 回目のラニビズマブ注射の際に黄斑部に滲出性変化を認めなかった群(dry)と滲出性変化を認めた群(wet)の比較】

3 回目のラニビズマブ注射の際に滲出性変化が消退した dry 群は 41 例、滲出性変化が残存した wet 群は 7 例であった。dry 群と wet 群の間で治療前サイトカインの濃度に有意差は認めなかった(表 11)。また、治療による変化率にも有意差は認めなかった(表 12)。

表11 3回目のラニビズマブ注射の際に黄斑部に滲出性変化を認めなかった群(dry)と滲出性変化を認めた群(wet)の治療前サイトカイン平均濃度の比較

	Dry(n=41)	Wet(n=7)	P value
CXCL1	8.8 (6.4–12)	6.6 (3.3–13)	0.45
IP-10	110 (82–150)	85 (42–170)	0.50
CXCL12	490 (390–620)	430 (250–740)	0.64
CXCL13	8.8 (6.8–11)	12 (6.3–22)	0.38
MCP-1	620 (550–690)	620 (470–820)	0.97
CCL11	7.1 (6.0–8.6)	7.0 (4.5–11)	0.93
IL-6	5.7 (4.2–7.7)	6.7 (3.3–14)	0.68
IL-10	0.15 (0.12–0.18)	0.18 (0.12–0.27)	0.44
MMP-9	0.83 (0.53–1.3)	1.6 (0.53–4.6)	0.28

Cytokine levels(pg/ml) are geometric mean(95% confidence interval).

表12 3回目のラニビズマブ注射の際に黄斑部に滲出性変化を認めなかった群

(dry)と滲出性変化を認めた群(wet)のサイトカイン平均値の変化

	Dry(n=41)	Wet(n=7)	P value
(A)CXCL1	-63%	-44%	0.45
(B)IP-10	-48%	-29%	0.50
(C)CXCL12	-51%	-42%	0.64
(D)CXCL13	-72%	-71%	0.38
(E)MCP-1	-65%	-63%	0.97
(F)CCL11	-60%	-66%	0.93
(G)IL-6	-73%	-72%	0.68
(H)IL-10	-90%	-89%	0.44
(I)MMP-9	79%	13%	0.28

ラニビズマブ初回注射時点の CXCL12 濃度のみが、4 か月以内に再発を認めなかった群と比較して4か月以内に再発した群で有意に低かった(表 13)。年齢、性別、眼軸長、GLD、PVD の有無、罹患期間、年間注射回数、4 ヶ月以内の再発の有無のうち、ラニビズマブ初回注射時の CXCL12 濃度の説明変数としてステップワイズ変数選択によって 4 ヶ月以内の再発の有無のみが選択された(表 14)。

治療前 CRT を応答変数として調べた場合、IP-10 が説明変数として選択され、有意であった(表 15)。

表 13 4 ヶ月以内に黄斑部に滲出性変化を認めた(再発あり)群と認めなかった

(再発なし)群の比較

	再発あり (n=25)	再発なし (n=23)	<i>P</i> value
(A)CXCL1	8.3 (5.6–12)	8.4 (5.6–13)	0.96
(B)IP-10	86 (60–121)	132 (91–190)	0.10
(C)CXCL12	400 (300–520)	600(450–800)	0.041
(D)CXCL13	9.5 (6.9–13)	8.8 (6.3–12)	0.74
(E)MCP-1	580 (500–670)	660 (570–770)	0.26
(F)CCL11	6.7 (5.3–8.4)	7.7 (6.0–9.7)	0.74
(G)IL-6	6.3 (4.4–9.2)	5.4 (3.6–7.9)	0.55
(H)IL-10	0.15 (0.12–0.18)	0.16 (0.13–0.20)	0.71
(I)MMP-9	1.1 (0.63–1.9)	0.75 (0.42–1.4)	0.37

Cytokine levels(pg/ml) are geometric mean(95% confidence interval).

表 14 ラニビズマブ初回注射時の CXCL12 濃度(pg/ml)との単回帰及び

ステップワイズ変数選択後の多変量解析

	単回帰の推定値 (名義変数は差) (<i>P</i> value)	ステップワイズ 変数選択の結果 (推定値)	選択後の <i>P</i> value
年齢(才)	-0.0068 (0.62)	除外	
性別(男)	-0.32 (0.14)	除外	
眼軸長(mm)	0.05 (0.67)	除外	
GLD(μm)	3.1 (0.52)	除外	
PVD(有)	0.053 (0.80)	除外	
罹病期間(月)	0.00062 (0.96)	除外	
年間注射回数	-0.085 (0.088)	除外	
4ヶ月以内の再発(有)	-0.42 (0.041)	採択(-0.42)	0.041

表 15 治療前 CRT (μm)との単回帰及びステップワイズ変数選択後の多変量解析

	単回帰の推定値 (名義変数は差) (<i>P</i> value)	ステップワイズ 変数選択の結果 (推定値)	選択後の <i>P</i> value
年齢(才)	-0.47 (0.90)	除外	0.43
性別(男)	13 (0.84)	除外	0.36
眼軸長(mm)	-54.2 (0.098)	除外	0.070
GLD(μm)	0.035 (0.0051)	除外	0.28
PVD(有)	-53 (0.37)	除外	1.00
罹病期間(月)	-2.4 (0.47)	除外	0.43
CXCL1	57 (0.10)	除外	0.15
IP-10	97 (0.0016)	採択 (100)	0.0013
CXCL12	52 (0.20)	除外	0.74
CXCL13	74 (0.037)	除外	0.82
MCP-1	220 (0.0042)	除外	0.43
CCL11	28 (0.58)	除外	0.21
IL-6	99 (0.0008)	除外	0.095
IL-10	65 (0.22)	除外	0.85
MMP-9	-5.4 (0.79)	除外	0.72

4. 考按

今回の検討の結果、主に以下の3つの結果が判明した。第一に抗 VEGF 治療前の AMD 患者の前房水中サイトカイン濃度はコントロールと比較し、IP-10・CXCL12・CXCL13・MCP-1・IL-10 が上昇し、MMP-9 は低下していた。また、CXCL1・CCL11・IL-6 はコントロールと比較し有意差は認めなかった。第二に、抗 VEGF 治療前と3回目直前の前房水中サイトカイン濃度を比較すると、AMD で上昇したすべてのサイトカインとケモカイン(IP-10、CXCL12、CXCL13、MCP-1、IL-10)は、抗 VEGF 治療の後に減少していた。また、AMD では上昇しなかった CXCL1・CCL11・IL-6 も治療後に減少していた。一方、AMD で低下していた MMP-9 の濃度は治療後に増加していた。第三に、典型 AMD と PCV の AMD サブタイプ間で治療前サイトカイン濃度に差は認めず、典型 AMD のうちの Type1CNV と Type2CNV のサブタイプ間でも治療前サイトカイン濃度に差はなかった。また、2回の抗 VEGF 治療による治療効果を認めた dry 群と、治療効果の弱かった wet 群でサイトカイン濃度に差は認めなかった。

図 6

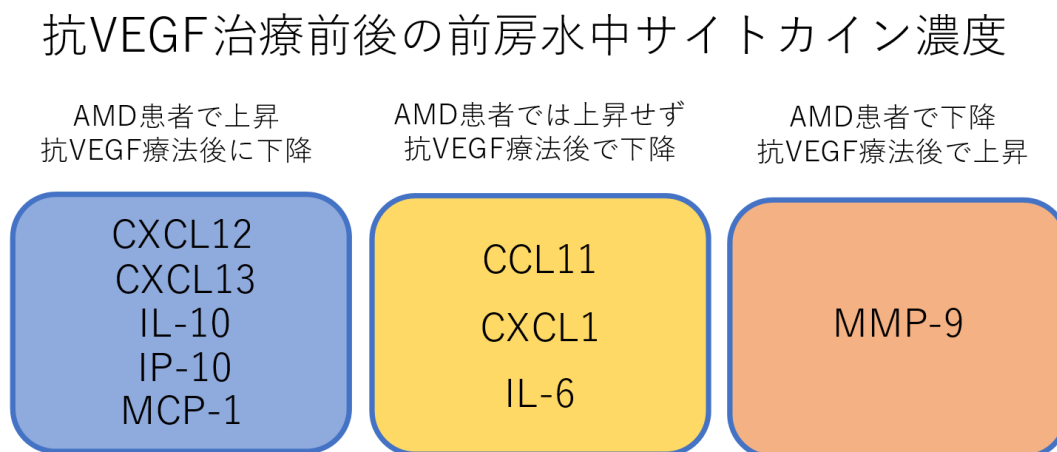


図 6：抗 VEGF 治療前後でのサイトカイン濃度変化のまとめ

抗 VEGF 療法によって様々なサイトカインの濃度が変化した。治療前のサイトカイン濃度は、IL-10 を除いて、3 回目のラニズマブ注射前のサイトカイン濃度と相関していた。抗 VEGF 療法前では、VEGF の濃度は他のサイトカインの濃度と相関していなかった。抗 VEGF 療法後の眼内 VEGF 濃度を測定することは難しいため、抗 VEGF 療法後の VEGF 濃度は調べなかった[28]。

これまでの研究では、炎症に関連するいくつかの眼内サイトカイン濃度が AMD 患者の抗 VEGF 療法後に減少することが示されているが、これらの研究の間でいくつかの違いがある。腫瘍学の最近の臨床研究で、複数の循環因子が VEGF 阻害剤によって変調されていることが分かっている[32・33]。しかし、眼

科では、滲出型 AMD に対する抗 VEGF 療法が広く使用されているにもかかわらず、眼内サイトカイン濃度に焦点を当てた調査はほとんどなかった。これまでの研究では、白内障の対照患者と比較して、ベバシズマブ眼内注射を受けた再発性 AMD 患者では IL-2 および TNF- α の前房水濃度が減少することが示され [14]、IL-2 および TNF- α が疾患活性に関連していることを示唆した。しかし、別の研究は、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 および TNF- α の濃度が 3 ヶ月以内にベバシズマブ注射を受けた AMD 患者とそうでない患者の間で有意に異なっていなかったことを示した [34]。これらの明らかな不一致は、AMD 患者の病態における炎症の関与割合の違いによる可能性がある。また、2 回のベバシズマブ注射後に IL-6 の濃度が変化しなかったことも示されているが [34]、別の研究では、ベバシズマブ注射の 2 日後に IL-6 および IL-8 の濃度が増加したことが示された [23]。したがって、IL-6 および IL-8 は抗 VEGF 薬物硝子体注射の直後に一時的に増加して、数か月後に下がる可能性が示唆されている。

各種サイトカインやケモカインが AMD において異なる役割を果たしているかどうかは不明である。IL-1 β は、主に単球/マクロファージによって産生され、インフラマソームの活性化を通じて産生される炎症性サイトカインである。IL-2 は活性化された T 細胞や NK 細胞から産生される。IL-6 は T 細胞をはじめ B 細胞・マクロファージ・線維芽細胞など多くの種類の細胞から産生される炎症性

サイトカインである。また、TNF- α は、白血球などから産生され、初期の炎症反応を引き起こして生体防御に広く関連するサイトカインである。IL-8 は、白血球によって産生される白血球の走化性因子である。IL-12 は、樹状細胞やマクロファージによって主に産生され、T細胞に作用して活性化T細胞の増殖支持、キラーT細胞の発現の補助、IL-2・インターフェロン γ の産生支持、IL-4産生抑制などの作用がある。一方、IL-10は、主にヘルパーTリンパ球、あるいは活性化された単球によって産生される抗炎症性サイトカインである。

我々の研究の結果は、血管新生に関連するサイトカインの濃度が、AMD患者に対する抗VEGF療法によって減少したことを示している。この研究の発見の1つは、日本人の滲出性AMDの眼で発現上昇しているIP-10の濃度 [18]が、抗VEGF療法により低下したことである。そして、CXCL1、CXCL12、CXCL13、MCP-1、CCL11、IL-6およびIL-10は抗VEGF療法後に対照よりも優位に低いことが二次的に予想外にわかった。IP-10はCNVレーザー誘発マウスで増加することが報告されており [29]、血清IP-10およびCCL11レベルはAMD患者で上昇していることが分かっている [35]。CCL11の受容体であるCCR3は、CNV内皮細胞で発現すると報告されており、CNVはCCR3遮断によって抑制される [36]。CXCL13は、CNVレーザー誘発マウスモデル [29] およびAMD患者 [37] で発現上昇され、CXCL13は内皮細胞に対する線維芽細胞成長因子2 (FGF-2)

の効果を抑制し、血管新生抑制に働く[38]。MCP-1 のレベルは、AMD の患者の方が対照よりも高いと報告されており[23]、CNV レーザー誘発マウスのマクロファージ浸潤に関与している[39]。CXCL12 はリンパ球の走化因子であり、ELR モチーフを有しないが CXCR4・7 を介して血管新生を促進する[30・40・41]。CXCL1 は好中球走化因子であり、ELR モチーフがあり CXCR2 を介して血管新生を促進する[40・41]。このことから、今回の研究では AMD における血管新生の促進および抑制に関わる種々のサイトカインの上昇があり、それらは抗 VEGF 療法で低下しており、血管新生に関与するサイトカインの発現レベルを制御する上での抗 VEGF 薬の重要性が強調される。

一方、今回の研究で他のサイトカインと異なった動態を示した MMP-9 は組織プロテアーゼであり、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[42]。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[43]。MMP-9 は CNV で過剰発現され、CNV 増殖を促進するとされている[21]。今回の研究において MMP-9 が AMD では低く、抗 VEGF 治療で上昇した機序について解明するには、Tissue Inhibitor of Metalloproteinase(TIMP)/Matrix metalloproteinases(MMPs) [44]などの細胞外マトリックスリモデリング因子の

バランスを含めたさらなる研究が必要である。

これらの分かったことについての考察であるが、第一に、減少したサイトカインは、CNV 病変で発生する炎症に加えて、慢性炎症の抑制の結果である可能性がある。いくつかの眼内サイトカインレベルは、若い被験者と比較して健康な高齢の被験者で上昇している。組織学的研究により、慢性炎症は一般に、ドルーゼンなどの AMD の初期兆候のある眼の網膜色素上皮・脈絡膜界面で発生すると考えられていることが明らかになっている[45]。さらに、滲出型 AMD では、網膜色素上皮細胞およびマクロファージ・単球からの炎症性サイトカイン・ケモカインのより顕著な発現上昇があり、CNV 活性を正および負に制御する。第二に、最近の臨床研究は、抗 VEGF 療法が脈絡膜に影響を与えることを示唆している。抗 VEGF 療法は脈絡膜厚を減少させ、脈絡膜の透過性亢進といくつかのサイトカインとの間に関連がある[31]。興味深いことに、代替的または古典的に活性化されたマクロファージ・単球は、今回の研究で調査されたサイトカインおよびケモカインのほとんどを発現する。VEGF の受容体である VEGFR-1 はマクロファージ系の炎症細胞にも発現しており、VEGF が単球やマクロファージの走化因子として機能する[46・47]。このことから、抗 VEGF 薬は VEGF シグナル伝達と VEGF 依存性走化性も遮断し、それによって動員された単球・マクロファージによって誘発される炎症反応を軽減すると考えられる。また、VEGF は血管

内皮細胞の VEGFR-2 を介して、強力な走化因子である MCP-1 や接着因子である ICAM-1 の発現誘導を促進することで、炎症性細胞のリクルートや血管内皮への接着を促進する [48]。これらのことから、抗 VEGF 薬によって、VEGFR-1 や VEGFR-2 を介した炎症反応の抑制が起き、今回検討したサイトカインのほとんどが抗 VEGF 薬で低下したと考えられるが、さらなるメカニズム研究が必要である。

そして、抗 VEGF 療法によるサイトカイン濃度の変化の治療効果への影響は、短期的には明らかではなかった。この研究では、ラニズマブ 3 回目の注射前で、滲出性変化の残存する眼と滲出性変化が消失した眼の間でサイトカイン濃度に有意差はなかった。この結果は、抗 VEGF 療法の 2 回投与では CNV 活性を抑制するには不十分で、より長期間の抗 VEGF 治療により VEGF が低レベルに維持されると他の炎症性サイトカインも低レベルに維持され CNV の活動性が抑制される可能性が示唆された。

我々は異なるタイプの AMD 間のサイトカインの影響を調査した。その結果、典型 AMD と PCV の間で、CXCL13 を除いてサイトカイン濃度に有意差はなかった。そして、典型 AMD の Type1CNV と Type2CNV の間で、IP-10、MCP-1、CXCL-12、IL-6 などのサイトカイン濃度に有意差はなかった。しかし、ほとんどのサイトカイン濃度は、Type2CNV よりも Type1CNV の方が低かった。理

由としては、Type1CNV は網膜色素上皮の下に存在していたため、Type1CNV から分泌されたサイトカインは硝子体および房水では容易に拡散できなかったと考えられる。抗 VEGF 療法の前の CRT は IP-10 を除いてサイトカイン濃度と相関していなかった。

今回の研究は、抗 VEGF 治療の導入期 3 ヶ月毎月硝子体投与を行った AMD における前房水中サイトカインプロファイルの変化について、またそのサイトカインプロファイル変化と解剖学的所見との関連があるかの、既報のない探索的研究であった。そして、今回の研究において、AMD の炎症に關与する大部分のサイトカイン濃度が抗 VEGF 治療により低下すると考えられた。また、その大部分の低下したサイトカインは PCV と tAMD、Type1CNV と Type2CNV、dry 群と wet 群といった解剖学的な違いでは変化に差はなさそうであるとの仮説が生成された。今後、特定のサイトカインについて AMD の機序解明や新たな治療に繋がる可能性が出てくれば、そのサイトカイン濃度の治療による変化を確定させ、その機序を特定するする仮説検証研究を行っていきたいと考えている。

この研究にはいくつかの制限がある。まず、これは単一施設の研究であり、患者の選択にバイアスがある可能性がある。次に本研究に含まれる患者はすべて日本人であったこと。したがって、他の民族での結果を確認するには、さらなる

研究が必要である。第三に、すべてのケースで VEGF の濃度を測定できなかったため、相関研究にバイアスが生じた可能性がある。

今後の検討課題として、抗 VEGF 療法によるサイトカイン濃度の治療効果は抗 VEGF 薬導入期の短期では明らかではなかったため、治療後 1 年など長期にわたるサイトカイン濃度を調査して、治療効果との関連があるのか調べたい。

さらに、近年ブrolシズマブと呼ばれる新たな抗 VEGF 薬が滲出型 AMD に対する治療効果が示され[49・50]、本邦でも使用できるようになり治療の選択肢は増えた。しかし、治療効果に個人差があることには変わりなく、治療反応の指標の確立と個別化医療の確立がますます重要になっている。そして、ブrolシズマブでは投与後に虹彩炎やぶどう膜炎、網膜血管炎、網膜血管閉塞などを含む眼内炎症のリスクが高いことが分かっており、眼内炎の発症までの日数が他の薬剤と比べて長く、遅発性アレルギー反応の関与が示唆されているが、詳細な発症機序はまだ明らかではない[51]。そのため、発症機序の解明や、発症予測のために前房水中サイトカイン濃度の解明は非常に重要であると思われ、今後の研究を継続していきたいと考えている。

5. 結論

AMD で上昇したサイトカインである IP-10、CXCL12、CXCL13、IL-10 および MCP-1 の濃度は、抗 VEGF 療法後に減少した。AMD では上昇しなかった CXCL1、CCL11、IL-6 の濃度も、抗 VEGF 療法後に減少した。AMD で減少した MMP-9 の濃度は、抗 VEGF 療法後に増加した。典型 AMD と PCV の間でサイトカイン濃度に差はなかった。Type1CNV と Type2CNV の間でサイトカイン濃度に差はなかった。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、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、自治医科大学眼科学講座 非常勤講師 柳靖雄先生、自治医科大学眼科学講座 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 東京新宿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、JR 東京総合病院眼科 野村陽子先生、自治医科大学眼科学講座 新井悠介先生に厚く御礼を申し上げます。

7. 参考文献

- 1)高橋寛二, 石橋達朗, 小椋祐一郎, 湯澤美都子. 加齢黄斑変性の分類と診断基準. *日眼会誌*. 112 : 1076-84. 2008
- 2)Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong T Y : Age-related macular degeneration. *Lancet*, 392 : 1147-1159, 2018
- 3)Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C Y, Wong T Y : Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040 : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*, 2: 106-116, 2014
- 4)中江公裕、小暮文雄、長屋幸郎、三島濟一: わが国における視覚障害の現況. *厚生指標* 38: 13-22,1991.
- 5)山田昌和 : 本邦の視覚障害の現状と将来. *日本の眼科* 80:1005-1009,2009
- 6)Morizane Y, Morimoto N, Fujiwara A, Kawasaki R, Yamashita H, Ogura Y, Shiraga F: Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nationwide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn J Ophthalmol* 63: 26-33, 2019.
- 7)Maruko I, Iida T, Saito M, Nagayama D, Saito K : Clinical characteristics of exudative age-related macular degeneration in Japanese patients. *Am J*

Ophthalmol. 144 : 15-22. 2007

8)Gass JD : Biomicroscopic and histopathologic considerations regarding the feasibility of surgical excision of subfoveal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol.* 118: 285-298.1994

9)Green WR, Enger C : Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology.* 100 : 1519-1535. 1993

10)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

11)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

12)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

13)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

14) 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

15) 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

16) Funk M, Karl D, Georgopoulos M, Benesch T, Sacu S, Polak K, Zlabinger GJ, Erfurth US : Neovascular age-related macular degeneration: intraocular cytokines and growth factors and the influence of therapy with ranibizumab. *Ophthalmology* 116:2393-9. 2009

17) 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* 29:523-9. 2009

18) 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

19) 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 162:694–700. 1989

20) Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T : Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382:635–8. 1996

21) Steen B, Sejersen S, Berglin L, Seregard S, Kvanta A : Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2194–200. 1998

22) Rezar-Dreindl S, Sacu S, Eibenberger K, Pollreisz A, Bühl W, Georgopoulos M, Krall C, Wiegert G Erfurth US : The intraocular cytokine Profile and therapeutic response in persistent neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:4144–50. 2016

23) Agawa T, Usui Y, Wakabayashi Y, Okunuki Y, Juan M, Umazume K, Kezuka

- T, Takeuchi M, Yamauchi Y : Profile of intraocular immune mediators in patients with age-related macular degeneration and the effect of intravitreal bevacizumab injection. *Retina* 34:1811–8. 2014
- 24) 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–e388. 2012;
- 25) Chalam KV, Grover S, Sambhav K, Balaiya S , Murthy RK : Aqueous interleukin-6 levels are superior to vascular endothelial growth factor in predicting therapeutic response to Bevacizumab in age-related macular degeneration. *J Ophthalmol* 2014:1–6. 2014
- 26) Ziemssen F, Eter N, Fauser S, Bopp S, Radermacher M, Hasanbasic Z, Holz FG : [Retrospective investigation of anti-VEGF treatment reality and effectiveness in patients with neovascular age-related macular degeneration (AMD) in Germany: treatment reality of ranibizumab for neovascular AMD in Germany]. *Ophthalmologe* 112:246–54. 2015
- 27) Salnikov AV, Heldin NE, Stuhr LB, Wiig H, Gerber H, Reed RK, Rubin K : Inhibition of carcinoma cell-derived VEGF reduces inflammatory characteristics in xenograft carcinoma. *Int J Cancer* 119:2795–802. 2006

- 28) Takahashi H, Nomura Y, Nishida J, Fujino Y, Yanagi Y Kawashima H :
Vascular endothelial growth factor (VEGF) Concentration is underestimated by
Enzyme-Linked Immunosorbent assay in the presence of Anti-VEGF drugs.
Invest Ophthalmol Vis Sci 57:462–6. 2016
- 29) Fujimura S, Takahashi H, Yuda K, Ueta T, Iriyama A, Inoue T, Kaburaki T,
Tamaki Y, Matsushima K, Yanagi Y : Angiostatic effect of CXCR3 expressed on
choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:1999–2006. 2012
- 30) 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* 99:1065–9. 2015
- 31) 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* 36:192–8. 2016;
- 32) Ebos JM, Lee CR, Christensen JG, Mutsaers AJ, Kerbel RS : Multiple
circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-
independent and correlate with antitumor efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*
104:17069–74. 2007
- 33) Hanrahan EO, Lin HY, Kim ES, Yan S, Du DZ, Mckee KS, Tran HT, Lee JJ,

RyanAJ, Langmuir P, Johnson BE, Heymach JV : Distinct patterns of cytokine and angiogenic factor modulation and markers of benefit for vandetanib and/or chemotherapy in patients with non-small-cell lung Cancer. *J Clin Oncol* 28:193–201. 2010

34) Miao H, Tao Y, Li XX, Xx L : Inflammatory cytokines in aqueous humor of patients with choroidal neovascularization. *Molecular Vision* 18:574–80. 2012

35) Mo FM, Proia AD, Johnson WH, Cyr D, Lasbkari K : Interferon gamma-inducible protein-10 (IP-10) and eotaxin as biomarkers in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4226–36. 2010

36) Takeda A, Baffi JZ, Kleinman ME, Cho WG, Nozaki M, Yamada K, Kaneko H, Albuwuerque RJC, Dridi S, Saito K, Raisler BJ, Budd SJ, Geisen P, Munitz A, Ambati BK , Green MG, Ishibashi T, Wright JD, Humbles AA, Gerard CJ, Ogawa Y, Pan Y, Smith JR, Grisanti S, Hartnett ME, Rothenberg ME, Ambati J : CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature* 460:225–30. 2009

37) Silveira AC, Morrison MA, Ji F, Xu H, Reinecke JB, Adams SM, Arneberg TM, Janssian M, Lee JE, Yuan Y, Schaumberg DA, Kotoula MG, Tsironi EE, Tsiloulis AN, Chatzoulis DZ, Miller JW, Kim IK, Hageman GH, Farrer LA, Haider NB,

Deangelis MM : Convergence of linkage, gene expression and association data demonstrates the influence of the RAR-related orphan receptor alpha (RORA) gene on Neovascular AMD: a systems biology based approach. *Vision Res* 50:698–715. 2010

38) Spinetti G, Camarda G, Bernardini G, Peppe SRD, Capogrossi MC, Napolitano M : The chemokine CXCL13 (BCA-1) inhibits FGF-2 effects on endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289:19–24. 2001

39) Yamada K, Sakurai E, Itaya M, Yamasaki S, Ogura Y : Inhibition of laser-induced choroidal neovascularization by atorvastatin by downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:1839–43. 2007

40) 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

41) Kiefer F, Siekmann AF: The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 68:2811-2830, 2011

42) 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

43) 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

44) Nielsen MK, 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

45) 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. *Progress in Retinal and Eye Research* 20:705–32. 2001

46) Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D : Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 87:3336–3343. 1996

47) Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M : Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor-1, is a novel cell surface marker for the

lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 97:785–791. 2001

48) Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Ahmed E, Carrasquillo KG, Amano S, Hida T, Oguchi Y, Adamis AP : VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:2155-2162.2003

49)Dugel PU, Koh A, Ogura Y, Jaffe GJ, Schmidt-Erfurth U, Brown DM, Gomes AV, Warburton J, Weichselberger A, Holz FG : HAWK and HARRIER: Phase 3, Multicenter, Randomized, Double-Masked Trials of Brolucizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 127 : 72-84. 2020

50) Dugel PU, Singh RP, Koh A, Ogura Y, Weissgerber G, Gedif K, Jaffe GJ, Tadayoni R, Schmidt-Erfurth U, Holz FG : HAWK and HARRIER: Ninety-Six-Week Outcomes from the Phase 3 Trials of Brolucizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 128 : 88-89.2021

51)Witkin AJ, Hahn P, Muray TG, Arevalo JF, Blinder KJ, Choudhry Netan, Emerson GG, Goldberg RA, Kim SJ, Pearlman J, Schneider EW, Tabandeh H, Wong RW : Occlusive Retinal Vasculitis Following Intravitreal Brolucizumab. *J Vitreoretin Dis* 4: 269-279. 2020