—Symposium Review—

網膜の病的血管新生に対する抗 VEGF 薬治療の展望と課題

中村信介,* 原　英彰

Prospects and Challenges of Anti-VEGF Drug Treatment for Pathological Angiogenesis of the Retina

Shinsuke Nakamura* and Hideaki Hara
Molecular Pharmacology, Department of Biofunctional Evaluation, Gifu Pharmaceutical University; 1–25–4 Daigaku-Nishi, Gifu 501–1196, Japan.

(Received July 29, 2021)

The number of patients with exudative age-related macular degeneration, diabetic retinopathy and retinal vein occlusion is expected to rise in proportion with the aging of the population and increasing diabetes patients. Also, they are the most common diseases caused by intraocular neovascularization and are often difficult to treat. Currently, anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) therapy has been developed and has demonstrated excellent results in treating macular edema, and many patients have avoided blindness. Unfortunately, there are problems with cases that do not respond to the anti-VEGF drugs and complications of administration. It is necessary to deepen the understanding of the physiological and pathological retinal roles of VEGF and to optimize the anti-VEGF therapy. There are also no drugs indicated for the regression of neovascularization itself. The solution to this problem is to develop novel therapies targeting other than VEGF. In this symposium review, we introduce the roles of VEGF in the ischemic retina and anti-angiogenic factors as promising therapeutic targets.

Key words——macular edema; neovascularization; retina; vascular endothelial growth factor

1. はじめに

血管新生は，既存の脈管構造から新しい血管が出芽し，新たな血管網を構築する現象を指し，生体にとって必要不可欠な“生理的血管新生”と各種病態の発症及び進展に係わる“病的血管新生”に分けて考察する必要がある．“生理的血管新生”は，創傷治癒，胚の発生，子宮内膜の発育や黄体形成，各種虚血性疾患において誘導されるなど，組織の形成と恒常性維持に重要な役割を担っている．一方，“病的血管新生”が係わる疾患には，固形腫瘍，関節リウマチ，乾癬，粥状動脈硬化などがある．1971 年に Folkman は，腫瘍の成長が酸素や栄養を運ぶ血管に依存することを突き止め,[1] 血管新生の抑制ががんを制御し得るという考え方を提唱し，血管新生の研究を大きく飛躍させた．がん細胞は自ら血管新生因子を放出し血管新生を促すことによって，がん自体が増殖するための栄養を得ているとした Folkman の仮説が起点となり，Ferrara and Henzel の血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）の発見につながった.[2] それまでに血管新生への関与が示唆される因子として basic FGF が見い出されていたが，血管特異的な作用を示す因子の発見には至っておらず，VEGF の発見は血管新生研究の新たな幕開けとなった．このあとも，Folkman が提唱した説が正しかったことを証明するように，1994 年にアンジオスタチン,[3] 1997 年にエンドスタチン[4]と血管新生関連因子が発見された．このように，血管新生を調節する機能分子が同定され，“病的血管新生”が発症及び進展に寄与する腫瘍を始めとする疾患に対して治療薬の開発が進められた．新たな血管が出芽する血管新生において，その主役を担うのが血管内皮細胞であり，一連の血管新生のプロセス（①基底膜の分解，②血管内皮細胞の遊走，③血管内皮細胞の増殖，④管腔形成）すべてに関与する因子が VEGF である．腫瘍における抗 VEGF 療法は腫瘍組織への酸素及び栄養を途絶させ，腫瘍の拡大抑制を目的としており，

岐阜薬科大学薬効解析学研究室(〒501–1196 岐阜市大学西 1–25–4)
*e-mail: nakamuras@gifu-pu.ac.jp
本総説は，日本薬学会第 141 年会シンポジウム S20 で発表した内容を中心に記述したものである．

実際にいくつかの抗 VEGF 薬が臨床応用されている．

眼内で“病的血管新生”が誘導される疾患として，滲出型加齢黄斑変性，糖尿病網膜症や血管新生緑内障などがある．眼内血管新生疾患はいずれも著しい視機能障害や視野欠損を引き起こし，QOL の低下に直結することから，眼科領域において眼内血管新生疾患に対する予防法及び治療法の確立が臨床的課題となっている．VEGF は vascular permeability factor として見い出された経緯もあり，[5] 血管透過性亢進作用を示す．眼科領域における抗 VEGF 薬は滲出性病変の改善を目的に使用され，視力改善・維持に有用であることが明らかになっている．[6–9] 現在，眼科領域で臨床応用されている抗 VEGF 薬は，いずれも治験で血管新生抑制作用は記載されていない点は押えておくべき重要な内容である．すなわち，眼科用抗 VEGF 薬は眼内の浮腫軽減を目的とした治療薬である．また，滲出型加齢黄斑変性を始め眼内血管新生疾患における VEGF の役割についてはいまだ不明な点も多く，眼内血管新生疾患の根治療法の確立には至っていない．そこで本稿では，主要な眼科用 VEGF 阻害薬及びその課題について概説し，VEGF 以外の新規治療標的になり得る因子を紹介する．

2. 眼科用 VEGF 阻害薬を取り巻く状況

眼科用 VEGF 阻害薬としてわが国で承認された薬剤は，核酸医薬の pegaptanib sodium（Macugen®，2020 年 2 月に販売中止），ヒト化抗 VEGF モノクローナル抗体 Fab 断片の ranibizumab（Lucentis®），ヒト VEGF 受容体 1 と受容体 2 の細胞外ドメインの一部をヒト IgG1 の Fc ドメインと融合させた遺伝子組換え融合タンパク質の aflibercept（Eylea®）に加え，2020 年に brolucizumab（Beovu®）が承認された（Fig. 1）．上記は開発順に記載したが，興味深いことに，pegaptanib から aflibercept まではトラップする因子の選択性は早期に開発された医薬品ほど高い．Pegaptanib は $VEGF_{165}$，ranibizumab は VEGF-A，aflibercept は VEGF 受容体 1 及び 2 に結合するファミリーすべてを標的に開発された．当初，pegaptanib が $VEGF_{165}$ という極めて限定的な因子のみを標的に開発されたのは，異常血管新生部位への関与が高い[10,11]といったエビデンスから有効性を高める目的と神経栄養因子の 1 つでもある

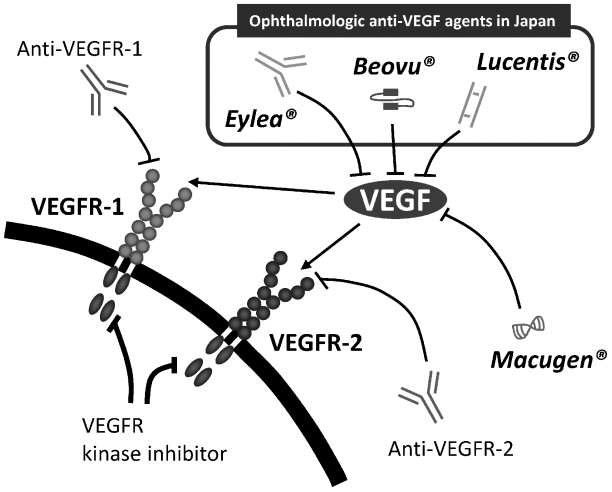

Fig. 1. Therapeutic Strategies Targeting VEGF

Anti-VEGF drugs in the field of ophthalmology in Japan include aflibercept (Eylea®), ranibizumab (Lucentis®), and brolucizumab (Beovu®).

VEGF[12] を阻害することによる神経網膜に及ぼす影響を最小限に抑える目的の両方を考慮したことが推察される．しかし，ranibizumab や aflibercept が視力改善の点で pegaptanib に勝ることは各種臨床試験の成績や研究報告からも周知の事実である．[13,14] 加えて，滲出型加齢黄斑を対象にした多くの臨床報告から，より広範な因子をトラップする aflibercept の方が ranibizumab より有効性が高いとの意見も散見されるが，この点については完全に一致した見解は得られておらず，議論の余地がある．滲出性眼疾患の病態形成並びに進展機序について，いまだ詳細は解明されておらず，VEGF ファミリーをより多くトラップすれば有効性が高くなるといった単純なものではないことが課題を複雑にしている．また，各薬剤の相違はトラップする因子の違い以外にも眼内への蓄積性や半減期にも及ぶため，それぞれの患者に対する有効性の違いがどの部分に起因するのかを判別することが極めて難しい．現状，眼科用 VEGF 阻害薬の国内市場では，投与期間が長く，確かな有効性を示す aflibercept が最大の売上を占める．こうした状況の中で，2020 年に市場導入された brolucizumab がどのようなポジションを獲得するかが注目されている．Brolucizumab は，分子量が小さく高濃度の投与が可能であり，また同時に，網膜下への浸透性も高いことから，既承認の抗 VEGF 薬と比べて治療間隔の延長と有効性の向上が期待されている（Table 1）．[15] Ranibizumab (48 kDa), aflibercept (115 kDa),

Table 1. Properties of Anti-VEGF Agents

	Ranibizumab (Lucentis®)	Aflibercept (Eylea®)	Brolucizumab (Beovu®)
Molecular weight	48 kDa	115 kDa	26 kDa
Molecular structure	Monoclonal antibody fragment	Recombinant fusion protein of VEGF receptors 1 and 2	Single-chain antibody fragment
Clinical dose	0.5 mg	2 mg	6 mg
Equivalent molar dose	Reference	1.7	22
Systemic elimination half-life ($t_{1/2}$)	～2 h[16]	4–5 d[17]	103 h[18]
Target molecules	VEGF-A	VEGF-A, VEGF-B, PlGF *etc.*	VEGF-A
Dosage and Administration for wet AMD	Initial 3 monthly injections, followed by *pro re nata* (PRN) retreatments	Initial 3 monthly injections, followed by bimonthly injections	Initial 3 monthly injections, followed by every 3 month injections

PRN means according to need.

brolucizumab (26 kDa)の臨床用量はそれぞれ 0.5 mg, 2 mg, 6 mg であることから，モル比に換算した brolucizumab の用量は ranibizumab（48 kDa）の約 22 倍，aflibercept（115 kDa）の約 13 倍と算出でき，極めて高用量に設定されていることが分かる．また，ranibizumab, aflibercept, brolucizumab のそれぞれの体内での半減期は 2 時間以内，4–5 日間，103 時間とされ，[16–18] これらは効果持続時間に影響すると考えられる．実際の臨床試験において，網膜下の浮腫に対して，brolucizumab は aflibercept よりも優れた改善効果を発揮した．[19] しかしながら，網膜血管炎や血管閉塞を含む眼内炎の報告もあり，[20] 現状，aflibercept のポジションを脅かすには至っていない．Brolucizumab でみられる眼内炎等の副作用の作用機序については明確になっておらず，患者選定が必要なのか，あるいは適切な投与レジメンの確立が必要なのか等については今後の臨床課題と言える．本項では，眼科用 VEGF 阻害薬の最適な投与を巡って多くの課題を記述したが ranibizumab, aflibercept, brolucizumab のそれぞれ特徴が異なる 3 種類の抗 VEGF 薬が臨床で使用できるようになったことは治療の選択肢が拡がった点でポジティブに評価すべきである．

加えて，ranibizumab のバイオシミラーが開発され 2021 年の上市が見込まれている．これは眼科用 VEGF 阻害薬初のバイオシミラーであるが，aflibercept のバイオシミラーの開発も進められており，眼科用 VEGF 阻害薬の動向はより複雑化している．眼科用 VEGF 阻害薬は，ranibizumab や aflibercept を中心とした多くの臨床研究のエビデンス及びリアルワールドエビデンスによって，確固たる有効性が実証されている．しかし，滲出性眼疾患の病態は個人差も大きいことから，個別化医療の必要性も指摘されている中，抗 VEGF 薬の治療レジメンの設定だけでなく，VEGF 以外を標的とした治療法の確立が求められている．すなわち，個々の患者によって，VEGF 以外の因子が病態形成に深く係わっている可能性が指摘されている．実際，2021 年には抗 VEGF / Angiopoietin2 バイスペシフィック抗体 faricimab が上市予定であり，その動向が注目されている．滲出性眼疾患の治療は，今後も VEGF 阻害薬が中心的役割を果たすことが予想されるが，既存薬との差別化及び併用効果に留意し，VEGF 以外をターゲットにした分子標的薬の開発を進める必要がある．

3. 網膜虚血における VEGF の役割

3-1. 網膜静脈閉塞症モデルマウスの網膜における VEGF の発現 眼科用 VEGF 阻害薬が臨床応用されるようになり 10 年以上が経過した．抗 VEGF 療法に関する様々な臨床研究から投与レジメンの最適化が進み，眼科用 VEGF 阻害薬を用いて滲出型加齢黄斑変性，糖尿病黄斑浮腫や網膜静脈閉塞症などの眼内血管疾患の滲出性病変は，ある程度コントロールできるようになってきた．しかし残念ながら，現状の抗 VEGF 療法は完全ではなく，奏功しない患者（ノンレスポンダー）や浮腫の再発を繰り返す患者が一定数存在する．[21,22] 一方，抗 VEGF 療法が奏功しても，数ヵ月にわたり抗 VEGF 薬の投与が必要な症例もみられ，継続投与による身体的・経済的負担や，眼内炎や網膜剥離の

副作用の危険性の増加が懸念されている.[23] こうした背景から，昨今の学会などでは抗 VEGF 薬の投与タイミングについて議論が続いている．病態発症後，自然に浮腫が減少する症例もみられ，発症初期は経過を観察し治療は行わない方がよい[24]という意見がある一方，自然寛解する患者の特定は困難であるため，早期に抗 VEGF 療法を開始すべきとの意見もある.[25] こうした議論は，眼内における VEGF の発現状況が不明であり，かつ臨床所見と既存の VEGF 研究の知見のみで考察せざるを得ないことから生じる．網膜浮腫や無灌流領域の形成など，臨床病態を反映した動物モデルを用いて，VEGF に関する病態研究から得た知見と臨床所見を照合させるトランスレーショナル研究が問題解決策の 1 つになり得ると考える.

当研究室において，網膜浮腫，無灌流領域，VEGF の遺伝子発現など網膜静脈閉塞症の臨床所見と酷似したマウスモデルを作製した.[26] このマウスモデルを用いた病態解明は，投与時期選定に有用な知見を与え，より効果的な抗 VEGF 薬の治療指針の提案に貢献できる可能性がある．マウス網膜静脈閉塞症モデルを作製し，網膜浮腫や無灌流領域の形成時における VEGF シグナル伝達因子の発現及び局在の変化を検討した．マウス網膜静脈閉塞症モデルの網膜において，VEGF の発現量は血管閉塞 1 日後にピークに達し正常群と比べ約 2 倍に増加した.[27] また，リン酸化 AKT, ERK1/2 及び eNOS といった各 VEGF シグナル伝達因子が VEGF の発現に同調して活性化することが明らかになった.[27] VEGF はオートクリン機構から VEGF の発現が過剰になると，血液網膜関門の調整に関与するリン酸化 AKT, ERK1/2 及び eNOS の発現増加を介し，血管透過性を亢進させることが知られ,[28–30] 本モデルの網膜においても既報と一致することが示された.

つづいて，虚血網膜における VEGF の役割に関する知見を深めるために，マウス網膜静脈閉塞症モデルの網膜伸展標本を作製し，無灌流領域の中心部，周辺部及び遠位部における VEGF の局在について検討した．血管閉塞 1 日後では，正常群と比較して網膜全部位で VEGF の局在を認め，無灌流領域の中心部よりも周辺部において VEGF の発現が増加した（Fig. 2）.[27] 虚血領域遠位部における VEGF の発現は，マウス中大脳動脈閉塞症モデルでもみられることから,[31] 神経組織の虚血に共通して生じる現象の可能性が考えられる．網膜静脈閉塞症患者において VEGF の発現が上昇した部位で，血液網膜関門の破綻及び無灌流領域の拡大が認められている.[32] 網膜疾患の VEGF 過剰発現については，1994 年に Aiello らが増殖糖尿病網膜症患者における硝子体液中 VEGF 濃度が他の網膜疾患に比較して高値を示すことを世界で初めて報告した.[33] 加えて，無灌流領域の面積と VEGF 量が正の相関を示す報告もあり,[34,35] 従来，網膜に虚血状態を生じさせる眼疾患では無灌流領域から VEGF が産生すると考えられている．黄斑浮腫の治療には，抗 VEGF 療法以前から行われてきた治療法に網膜光凝固術がある．疾患や病態によって様々なレーザー照射の施行法が提唱されているが，網膜光凝固術の主な照射法の 1 つに，網膜虚血部位にレーザーを照射する方法がある．これは虚血組織を焼灼することによって組織の酸素消費を減らし，永続的な抗 VEGF 効果を目的に実施される予防的治療である．今回の網膜静脈閉塞症モデルマウスにおける VEGF の局在に関する実験結果は，虚血部位すべてがかならずしも VEGF 過剰産生部位ではない可能性を示唆しており，「無灌流領域から VEGF が産生する」という定説と矛盾する．過去，これまでに VEGF 産生抑制を目的とした網膜光凝固術に関して，多くのレーザー施行法が提唱されてきたのは，VEGF 産生部位が虚血部位と相関しないことが要因の 1 つかもしれない．ただし，筆者らの結果は単一の疾患モデルマウスを用いた基礎研究の結果であり，網膜虚血における VEGF 産生部位の理解については，基礎研究及び臨床研究の更なる詳細な検討が必要である．こうした網膜における VEGF 研究が抗 VEGF 療法や網膜光凝固の最適化につながると考える.

血管閉塞 12 時間，1, 3 及び 7 日後のマウス網膜静脈閉塞症モデルの網膜薄切切片を用いて，VEGF の局在を検討した．血管閉塞 1 日後にマウス網膜静脈閉塞症モデルの網膜内浮腫は内顆粒層（inner nuclear layer; INL）で顕著に認められ,[26] 一方，VEGF の発現は網膜全層で増加し，網膜浮腫を認める内顆粒層においても VEGF は高発現していた［Fig. 3(A)］.[27] すなわち，VEGF の局在が一部で浮腫形成部位と一致することが明らかになった.

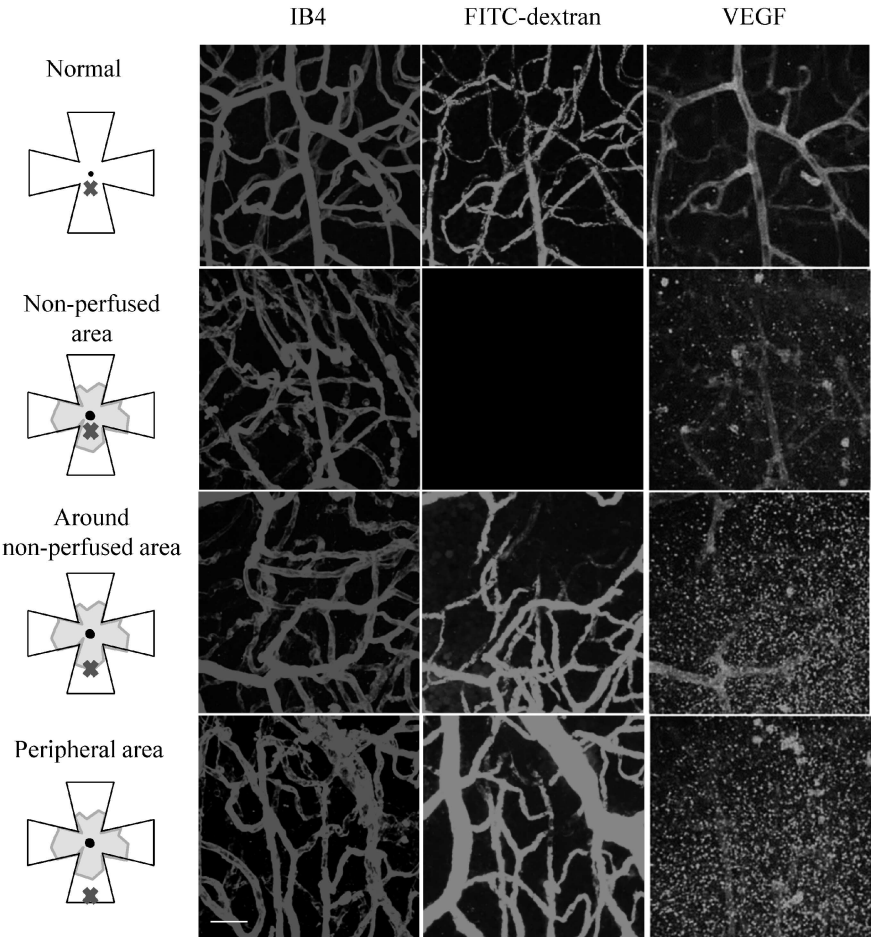

Fig. 2. Relationship between Retinal Ischemia and VEGF Expression

Representative images of retinal flatmounts of the RVO model mice stained for IB4 (endothelial cell marker) and VEGF. All mice were preperfused with fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran marker. VEGF expression was higher in the retinal peripheral side than around the optic nerve head in the RVO model mice. Scale bar: 50 μm. Modified from *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **59** (11), 4701–4713 (2018).

VEGF は，虚血状態において，血管内皮細胞，アマクリン細胞，網膜神経節細胞やミュラーグリア細胞など多くの網膜細胞から産生される.[36] 内顆粒層にはアマクリン細胞及びミュラーグリア細胞が存在し,[37,38] これらの細胞が VEGF 産生に関与している可能性が推察される．さらに，マウス網膜静脈閉塞症モデルの網膜における VEGF の産生源を特定するために，活性化アストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein（GFAP）と VEGF の共免染を行った．正常群と比べ vehicle 群の網膜では，GFAP 陽性活性化アストロサイトが網膜神経節細胞層及び内顆粒層で著明に発現しており，VEGF のシグナルと GFAP のシグナルが共局在していた［Fig. 3 (B)］.[27] この結果は，マウス網膜静脈閉塞症モデルにおける VEGF の産生細胞の 1 つがミュラーグリア細胞であることを示唆している.

3-2. 抗 VEGF 療法の投与タイミング つぎに，抗 VEGF 抗体の投与タイミングの違いが網膜層や眼内血流量に及ぼす影響を検証した．マウス網膜静脈閉塞症モデルにおいて，血管閉塞直後に抗 VEGF 抗体を投与すると浮腫や血流低下を顕著に抑制した［Figs. 4 (A) and (B)］.[27] 一方，血管閉塞 7 日後（網膜において VEGF 発現レベルが正常より減少した状態）に抗 VEGF 抗体を投与すると網膜層の菲薄化や血流低下を引き起こした［Figs. 4 (C) and (D)］.[27] 網膜静脈閉塞症患者において，発症直後の抗 VEGF 療法により，無灌流領域の面積の縮小及び視力低下の軽減を示し,[39,40] 一方，発症 6 ヵ月後の抗 VEGF 療法の実施が網膜虚血を進展させ，視力低下を助長させる可能性を示した臨床報告がある.[21] これらの結果は，抗 VEGF 療法は VEGF の発現レベルが高値を示す患者に適用すべ

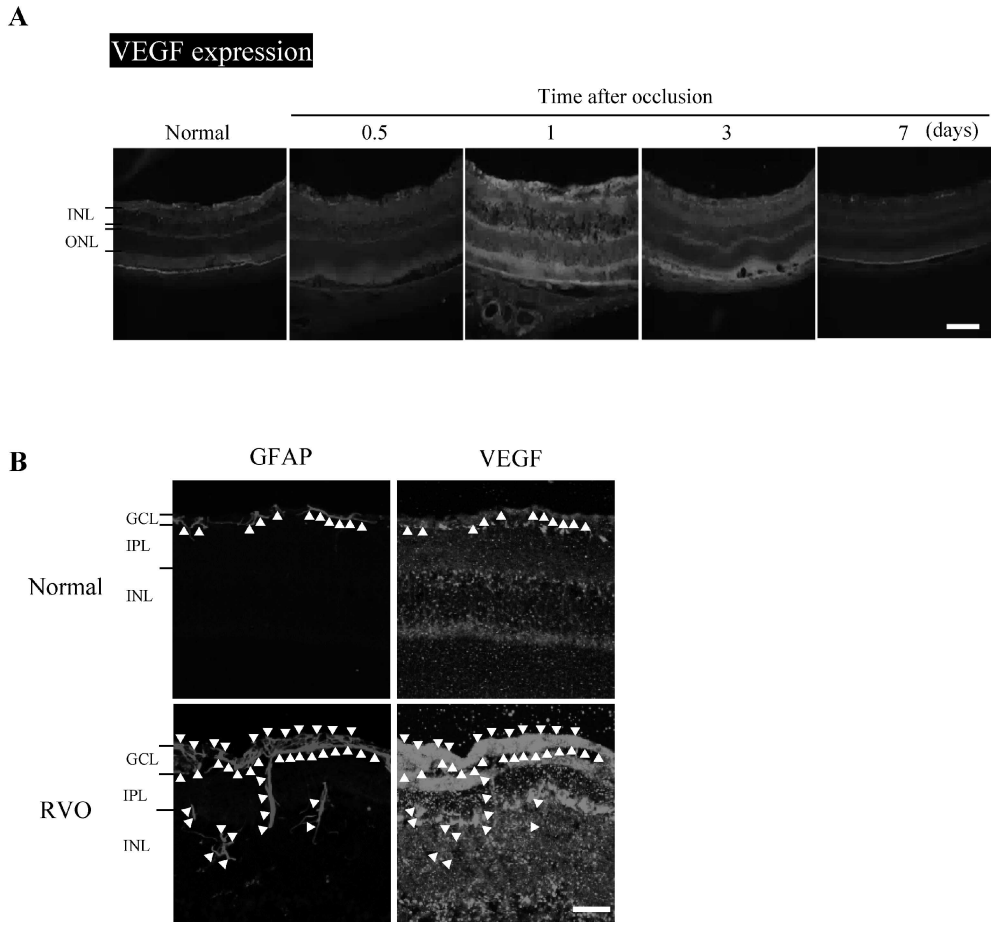

Fig. 3. Localization in the Retinal Layer and Cell Expression of VEGF in the RVO Model Mice

(A) Cross sections were stained with VEGF. These images showing VEGF expression in the retinas at 0.5, 1, 3, and 7 d after retinal vein occlusion. VEGF was expressed in all retinal layers and was most prominent 1 d after occlusion. (B) Representative images showing the immunostaining of GFAP and VEGF in the retinas of normal and RVO mice. The arrowheads indicate activated astrocytes. VEGF was partially overlapped with GFAP in the RVO mice. GCL, ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer. Scale bar: 50 μm. Modified from *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **59**(11), 4701–4713 (2018).

きであることを示している．VEGF は炎症細胞の走化因子として働き，炎症細胞の動員及び血管内皮細胞に対する炎症細胞の接着を促す機能も有している．すなわち，VEGF は広義の意味で炎症性サイトカインの一種とも言える．したがって，網膜静脈閉塞症の浮腫形成並びに網膜障害を誘導させる病期において，抗 VEGF 療法は血管透過性亢進抑制に加え，網膜神経保護の観点においても有用であることが示唆された．一方，VEGF は網膜血管の恒常性維持に重要な神経栄養因子の 1 つでもあり，[12] VEGF の発現が必要量以下になると生理活性に影響を及ぼすことが推察される．マウス網膜静脈閉塞症モデルの血管閉塞 7 日後における抗 VEGF 抗体の投与は，網膜における VEGF の発現量を正常以下に低下させた．[27] 眼内において VEGF 量が恒常性維持に必要な量よりも下回った場合，網膜虚血が進展する可能性が考えられる．

4. 眼内血管新生を対象にした治療薬

4-1. 抗 VEGF 薬の眼内血管新生抑制薬としての可能性 VEGF は血管新生促進因子として発見された経緯がある．また，VEGF 阻害薬 bevacizumab（Avastin®）が大腸がんに対する血管新生阻害剤として承認されたことからも（その後，肺がんに対する血管新生阻害剤の承認も得た），VEGF 阻害薬が眼内血管新生を退縮させるのではないかと考えられた．すなわち，眼科用 VEGF 阻害薬は，眼内血管新生疾患に対する根治療法の確立につながると期待されていた．一部の臨床研究や基礎研究において，VEGF 阻害薬が眼内の血管新生を退縮させる，あるいは抑制することを示唆する報告がある．[41,42] 滲出型加齢黄斑変性や糖尿病網膜症を対象にした大規模臨床試験において，抗 VEGF 薬の投与は病的新

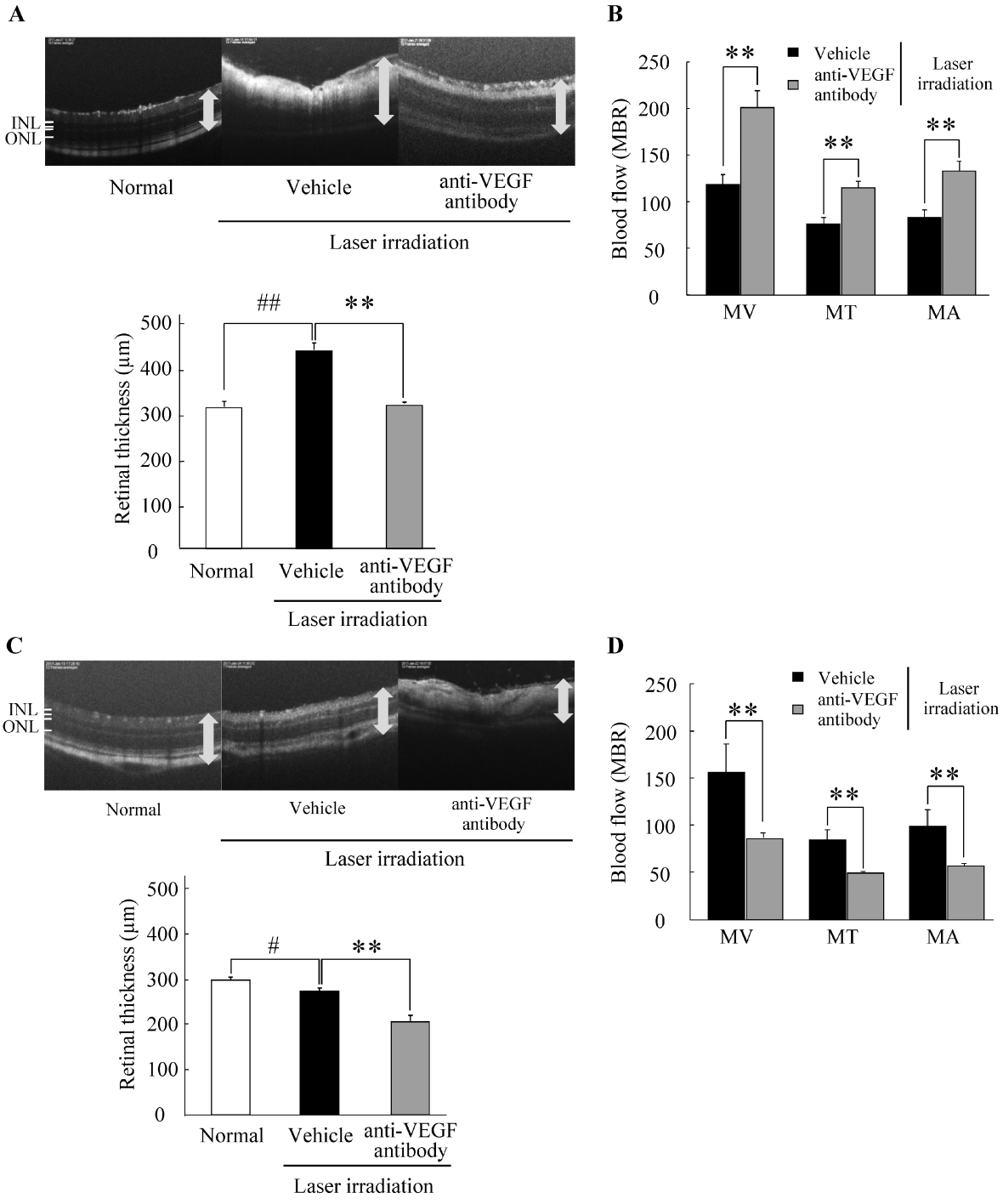

Fig. 4. Effects of anti-VEGF Neutralizing Antibody in the RVO Model Mice

(A, B) Retinal thickness were measured by using optical coherence tomography (OCT) images and the ocular blood flow were calculated by laser speckle flowgraphy after the intravitreal injection of anti-VEGF antibody 1 d after retinal vein occlusion. (A) The retinal thickness was increased in the RVO mice, and this thickening was significantly inhibited by the administration of the anti-VEGF antibody. (B) The graph shows the quantitative data of ocular blood flow analysis such as the mean blur rate (MBR) of the vessel region (MV), the MBR of the tissue region (MT), and the MBR of the total area (MA). The ocular blood flow was reduced in the vehicle group, and this decrease was significantly suppressed by anti-VEGF antibody. (C, D) Retinal thickness and blood flow were measured at 1 d after the administration of anti-VEGF antibody 7 d after retinal vein occlusion. (C) The retinal thickness was decreased in the vehicle group, and the anti-VEGF antibody led to a decrease in the retinal thickness. (D) The graph shows the quantitative data of ocular blood flow analysis including the MV, MT, and MA. The ocular blood flow was significantly decreased in the vehicle-treated group, and the administration of anti-VEGF antibody caused a further decrease. Data are the means ± S.E.M. ($n = 5$). $^{\sharp}p < 0.05$, $^{\sharp\sharp}p < 0.01$ *versus* normal, $^{**}p < 0.01$ *versus* vehicle. (Student's *t*-test) INL: inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer. Modified from *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **59**(11), 4701–4713 (2018).

生血管の活動性を抑えることが立証されたが，新生血管の退縮作用は明確には示されていない．開発対象疾患の選定において市場規模が大きく影響することもあり，眼科用 VEGF 阻害薬の多くが，滲出型加齢黄斑変性，糖尿病黄斑浮腫，網膜静脈閉塞症など滲出性変化を伴う疾患を中心に開発が進められた．これらの臨床試験の主要評価項目は視力の改善であり，副次項目においても血管透過性亢進の指標が選択された．眼科領域における臨床試験の主要評価項目は一般的に視力の改善程度であり，血管新生の抑制程度が視力に直接反映されないことから，VEGF 阻害薬を眼内血管新生抑制として開発するのは容易ではなかった．しかし，2019 年にアイリーアが血管新生緑内障の承認を取得する際，虹彩新生血管形成グレードの改善割合が副次評価項目と認められ，その項目を達成した．この結果は，抗 VEGF 薬が眼内血管新生阻害薬として初めて認められた画期的な成果といえる．今後，血管新生緑内障以外の眼内血管新生疾患においても，血管新生阻害療法の有効性が実証されることを期待したい．

4-2. 血管新生抑制因子を標的とした医薬品開発の可能性　血管新生は，健常な生体内では促進因子と抑制因子がバランスを取り，厳密に制御されている．血管新生に関する研究は現在に至るまで，VEGF を中心として，内皮細胞の活性化及び血管の発芽を促す促進因子の研究が盛んに行われてきた．VEGF 以外の代表的な血管新生促進因子に，basic fibroblast growth factor (bFGF),[43] placental growth factor (PlGF)[44]等がある．つまり，これら bFGF や PlGF の選択的阻害薬は眼内血管新生阻害療法として有用である可能性がある．一方，血管新生選択的に作用する抑制因子もいくつか発見されているが，現状，眼内血管新生疾患を対象にした Phase 3 以上の臨床試験において，血管新生抑制因子をターゲットにした候補医薬品は見当たらない．内因性の色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor; PEDF)[45]や可溶性 VEGF receptor-1 (soluble VEGF recepter-1; sVEGFR-1) は眼内での発現が認められ,[46] かつ病的血管新生選択的に作用することから，副作用の懸念が少ない分子標的薬として期待できる．とくに sVEGFR-1 は角膜に豊富に存在する因子として同定され,[46] VEGF が多量に存在しているにもかかわらず，角膜中に血管新生が生じない理由の 1 つと考えられている．そこで筆者らは，増殖糖尿病網膜症患者硝子体液を用いて，sVEGFR-1, VEGF 及び PEDF のそれぞれの濃度を測定した．増殖糖尿病網膜症患者硝子体液における sVEGFR-1 の濃度は 3949.4 ± 608.9 pg/mL (n = 27) であり，対照群として使用した黄斑円孔患者硝子体液 (1568.8 ± 595.0 pg/mL, n = 12) と比較して有意に高かった.[47] さらに，増殖糖尿病網膜症の硝子体液中に含まれる VEGF と sVEGFR-1 間には正の相関が認められた (r = 0.414, p = 0.032).[47] 増殖網膜症患者血清中の VEGF 量と sVEGFR-1 量間で正の相関を示すことが報告されており,[48] 筆者らの研究結果と一致する．さらに，ヒト微小血管内皮細胞への VEGF の添加は sVEGFR-1 の産生上昇を誘導することも示唆されている.[49] 以上より，増殖糖尿病網膜症患者硝子体液における sVEGFR-1 の発現増加は，おそらく網膜障害に対する代償機構の 1 つであると推察される．一方，PEDF 濃度は，増殖糖尿病網膜症では 2.1 ± 1.1 pg/mL (n = 27) であり，黄斑円孔 (41.6 ± 17.0 ng/mL, n = 12) と比較して有意に低かった (p = 0.041).[47] 硝子体液中の PEDF 濃度は，黄斑円孔に比べ増殖糖尿病網膜症で低いことが知られており,[45] 本検討結果と一致する．この結果は，硝子体内中の PEDF 量の減少は増殖糖尿病網膜症のリスクファクターとなり得ることを支持する．つぎに VEGF と PEDF の相関関係を調べたところ，VEGF と PEDF 間には明らかな相関性は認められなかった.[47] sVEGFR-1 と PEDF はともに血管新生抑制因子であるが，興味深いことにそれぞれの発現機構は独立している可能性が示唆された．また，*in vitro* 管腔形成モデルを用いて sVEGFR-1 の血管新生に及ぼす影響を検討した．sVEGFR-1 0.1−1000 ng/mL の添加は VEGF 誘発 HUVEC の管腔形成に対して濃度依存的に抑制作用を示した.[47] また，今回用いた sVEGFR-1 0.1−1000 ng/mL の濃度において細胞障害は認められなかった.[47] したがって，sVEGFR-1 そのものの硝子体内投与あるいは sVEGFR-1 の産生を促進する化合物の投与は，副作用の懸念が少ない血管新生抑制薬になり得る可能性が考えられる．

その他，血管新生抑制因子として，vasohibin,[50] thrombospondin,[51] maspin,[52] chondromodulin,[53] interferon-γ inducible protein 10 (IP-10),[54] 血小板

第4因子（platelet factor 4; PF-4），[55] LYPD1[56] 等が発見されており，いずれも血管新生阻害薬の治療標的になり得る．中でもvasohibinは血管内皮細胞に特異的であり，VEGFだけでなくFGF-2によっても誘導される因子として同定されたことから治療標的として注目されている．[47] さらに，vasohibinはマウスの角膜を用いた実験で血管新生抑制作用を有することが証明され，[50] 眼内血管新生疾患の治療標的として有用である可能性が示唆されている．

5. おわりに

腫瘍領域で発見，開発された抗VEGF薬は，現在，眼内血管新生疾患に対する治療の第一選択薬として使用されている．抗VEGF療法の普及に伴い，眼内血管新生疾患の滲出性変化をコントロールすることによって，視機能改善が見込めることが明らかになった．しかし，眼内の病態生理におけるVEGFの役割や個別化医療を見据えた抗VEGF薬の適切な使用などについて，依然として科学的エビデンスが乏しい．本研究では，網膜静脈閉塞症モデルマウスを用いた検討から，VEGFは網膜虚血領域の周辺部で強く発現することが示唆された．VEGFの産生部位については未知な部分が多く，この結果は網膜内のVEGF産生抑制を目的とした網膜光凝固術の施行において重要な基礎的知見を提供する．また，同モデルにおいて，網膜血管閉塞直後の抗VEGF抗体の投与は網膜内の浮腫を抑制し，閉塞7日後に抗VEGF抗体を投与すると，血流低下とともに網膜組織を菲薄化させた．この試験成績は，網膜静脈閉塞症においてVEGFが過剰な場合，抗VEGF療法は有効であるが，一方，眼内のVEGFを必要以上に阻害すると網膜において循環障害及び組織障害を引き起こす可能性を示唆している．また硝子体液を用いた研究では，代表的な眼内血管新生疾患の1つである増殖糖尿病網膜症患者でsVEGFR-1が高値を示し，顕著な管腔形成抑制作用を示した．生理的に眼内に存在するsVEGFR-1は副作用を示す可能性が低く，眼内血管新生疾患に対する治療標的として有望である．以上の知見を基にさらに研究を進め，眼内血管新生疾患の予防及び治療戦略の提言につなげていきたいと考えている．

上述した通り，眼内血管新生疾患の発症期間や重症度とVEGFの発現量はかならずしも相関せず，さらに，VEGFの局在についても一様ではない．加えて，眼内血管新生の出芽・進展メカニズムにVEGF以外の血管新生の促進因子と抑制因子の制御機構も関与しており，眼内血管新生疾患の病態生理は依然として不明な点が多い．病態解明及び創薬を実現するには，遺伝子や分子の探索及び新規分子の機能評価を網羅した基礎研究に加え，トランスレーショナル研究及びリバーストランスレーショナル研究を含む，多角的な研究アプローチが必要である．眼科領域における医療機器及び診断技術の進歩は目覚ましく，基礎研究との連携を活発にすることで，抗VEGF療法の最適化が実現できると期待している．

利益相反　開示すべき利益相反はない．

REFERENCES

1) Folkman J., *N. Engl. J. Med.*, **285**, 1182–1186 (1971).
2) Ferrara N., Henzel W. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 851–858 (1989).
3) O'Reilly M. S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R. A., Cao Y., Moses M., Lane W. S., Sage E. H., Folkman J., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **59**, 471–482 (1994).
4) O'Reilly M. S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W. S., Flynn E., Birkhead J. R., Olsen B. R., Folkman J., *Cell*, **88**, 277–285 (1997).
5) Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S., Dvorak H. F., *Science*, **219**, 983–985 (1983).
6) Rosenfeld P. J., Brown D. M., Heier J. S., Boyer D. S., Kaiser P. K., Chung C. Y., Kim R. Y., MARINA Study Group, *N. Engl. J. Med.*, **355**, 1419–1431 (2006).
7) Martin D. F., Maguire M. G., Ying G. S., Grunwald J. E., Fine S. L., Jaffe G. J., *N. Engl. J. Med.*, **364**, 1897–1908 (2011).
8) Heier J. S., Brown D. M., Chong V., *et al.*, VIEW 1 and VIEW Study Groups, *Ophthalmology*, **119**, 2537–2548 (2012).
9) Dugel P. U., Koh A., Ogura Y., Jaffe G. J., Schmidt-Erfurth U., Brown D. M., Gomes A. V., Warburton J., Weichselberger A., Holz F. G., HAWK and HARRIER Study Investiga-

tors, *Ophthalmology*, **127**, 72–84 (2020).
10) Ishida S., Usui T., Yamashiro K., Kaji Y., Amano S., Ogura Y., Hida T., Oguchi Y., Ambati J., Miller J. W., Gragoudas E. S., Ng Y. S., D'Amore P. A., Shima D. T., Adamis A. P., *J. Exp. Med.*, **198**, 483–489 (2003).
11) Shima D. T., Adamis A. P., Ferrara N., Yeo K. T., Yeo T. K., Allende R., Folkman J., D'Amore P. A., *Mol. Med.*, **1**, 182–193 (1995).
12) Böcker-Meffert S., Rosenstiel P., Röhl C., Warneke N., Held-Feindt J., Sievers J., Lucius R., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 2021–2026 (2002).
13) Takeda A. L., Colquitt J., Clegg A. J., Jones J., *Br. J. Ophthalmol.*, **91**, 1177–1182 (2007).
14) Ye L., Jiaqi Z., Jianchao W., Zhaohui F., Liang Y., Xiaohui Z., *Ther. Adv. Chronic Dis.*, **11**, 2040622320953349 (2020).
15) Dugel P. U., Singh R. P., Koh A., Ogura Y., Weissgerber G., Gedif K., Jaffe G. J., Tadayoni R., Schmidt-Erfurth U., Holz F. G., *Ophthalmology*, **128**, 89–99 (2021).
16) Xu L., Lu T., Tuomi L., Jumbe N., Lu J., Eppler S., Kuebler P., Damico-Beyer L. A., Joshi A., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **54**, 1616–1624 (2013).
17) Dixon J. A., Oliver S. C. N., Olson J. L., Mandava N., *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **18**, 1573–1580 (2009).
18) Beovu® kit for intravitreal injection 120 mg/mL, package insert, Novartis Pharma K. K., 2020: ⟨https://pins.japic.or.jp/pdf/newPINS/00068690.pdf⟩, cited 11 June, 2020.
19) Nguyen Q. D., Das A., Do D. V., Dugel P. U., Gomes A., Holz F. G., Koh A., Pan C. K., Sepah Y. J., Patel N., MacLeod H., Maurer P., *Ophthalmology*, **127**, 963–976 (2020).
20) Enríquez A. B., Baumal C. R., Crane A. M., Witkin A. J., Lally D. R., Liang M. C., Enríquez J. R., Eichenbaum D. A., *JAMA Ophthalmol.*, **139**, 441–448 (2021).
21) Sophie R., Hafiz G., Scott A. W., Zimmer-Galler I., Nguyen Q. D., Ying H., Do D. V., Solomon S., Sodhi A., Gehlbach P., Duh E., Baranano D., Campochiaro P. A., *Am. J. Ophthalmol.*, **156**, 693–705 (2013).
22) Isola V., Pece A., Massironi C., Reposi S., Dimastrogiovanni F., *Clin. Ophthalmol.*, **7**, 455–460 (2013).
23) Brown D. M., Campochiaro P. A., Singh R. P., Li Z., Gray S., Saroj N., Rundle A. C., Rubio R. G., Murahashi W. Y., CRUISE Investigators, *Ophthalmology*, **117**, 1124–1133.e1 (2010).
24) *Arch. Ophthalmol.*, **115**, 486–491 (1997).
25) Rensch F., Jonas J. B., Spandau U. H. M., *Acta Ophthalmol.*, **87**, 77–81 (2009).
26) Fuma S., Nishinaka A., Inoue Y., Tsuruma K., Shimazawa M., Kondo M., Hara H., *Sci. Rep.*, **7**, 43509 (2017).
27) Nishinaka A., Inoue Y., Fuma S., Hida Y., Nakamura S., Shimazawa M., Hara H., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **59**, 4701–4713 (2018).
28) Masood R., Cai J., Zheng T., Smith D. L., Hinton D. R., Gill P. S., *Blood*, **98**, 1904–1913 (2001).
29) Hood J. D., Meininger C. J., Ziche M., Granger H. J., *Am. J. Physiol.*, **274**, H1054–H1058 (1998).
30) Shiojima I., Walsh K., *Circ. Res.*, **90**, 1243–1250 (2002).
31) Plate K. H., Beck H., Danner S., Allegrini P. R., Wiessner C., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **58**, 654–666 (1999).
32) Abri Aghdam K., Reznicek L., Soltan Sanjari M., Klingenstein A., Kernt M., Seidensticker F., *Clin. Ophthalmol.*, **11**, 331–336 (2017).
33) Aiello L. P., Avery R. L., Arrigg P. G., Keyt B. A., Jampel H. D., Shah S. T., Pasquale L. R., Thieme H., Iwamoto M. A., Park J. E., Nguyen H. V., Aiello L. M., Ferrara N., King G. L., *N. Engl. J. Med.*, **331**, 1480–1487 (1994).
34) Ra H., Park J. H., Baek J. U., Baek J., *J. Clin. Med.*, **9**, 1462 (2020).
35) Fujikawa M., Sawada O., Miyake T., Kakinoki M., Sawada T., Kawamura H., Ohji M., *Clin. Ophthalmol.*, **7**, 1497–1501 (2013).
36) Kida T., Oku H., Horie T., Fukumoto M., Okuda Y., Morishita S., Ikeda T., *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **255**, 1149–1157 (2017).
37) Coughlin B. A., Feenstra D. J., Mohr S., *Vis. Res.*, **139**, 93–100 (2017).
38) Grosche A., Pannicke T., Karl A., Iandiev I., Francke M., Wiedemann P., Reichenbach A.,

Bringmann A., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**, 4170–4176 (2012).
39) Pham B., Thomas S. M., Lillie E., Lee T., Hamid J., Richter T., Janoudi G., Agarwal A., Sharpe J. P., Scott A., Warren R., Brahmbhatt R., Macdonald E., Straus S. E., Tricco A. C., *BMJ Open*, **9**, e022031 (2019).
40) Mir T. A., Kherani S., Hafiz G., Scott A. W., Zimmer-Galler I., Wenick A. S., Solomon S., Han I., Poon D., He L., Shah S. M., Brady C. J., Meyerle C., Sodhi A., Linz M. O., Sophie R., Campochiaro P. A., *Ophthalmology*, **123**, 625–634.e1 (2016).
41) Campa C., Kasman I., Ye W., Lee W. P., Fuh G., Ferrara N., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 1178–1183 (2008).
42) McClintic S. M., Gao S., Wang J., Hagag A., Lauer A. K., Flaxel C. J., Bhavsar K., Hwang T. S., Huang D., Jia Y., Bailey S. T., *Ophthalmol. Retina*, **2**, 931–941 (2018).
43) Gospodarowicz D., Cheng J., Lirette M., *J. Cell Biol.*, **97**, 1677–1685 (1983).
44) Takahashi A., Sasaki H., Kim S. J., Kakizoe T., Miyao N., Sugimura T., Terada M., Tsukamoto T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 855–859 (1999).
45) Ogata N., Wada M., Otsuji T., Jo N., Tombran-Tink J., Matsumura M., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 1168–1175 (2002).
46) Ambati B. K., Nozaki M., Singh N., *et al.*, *Nature*, **443**, 993–997 (2006).
47) Matsunaga N., Chikaraishi Y., Izuta H., Ogata N., Shimazawa M., Matsumura M., Hara H., *Ophthalmology*, **115**, 1916–1922 (2008).
48) Lip P. L., Belgore F., Blann A. D., Hope-Ross M. W., Gibson J. M., Lip G. Y., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 2115–2119 (2000).
49) Chen H., Ikeda U., Shimpo M., Maeda Y., Shibuya M., Ozawa K., Shimada K., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **36**, 498–502 (2000).
50) Watanabe K., Hasegawa Y., Yamashita H., Shimizu K., Ding Y., Abe M., Ohta H., Imagawa K., Hojo K., Maki H., Sonoda H., Sato Y., *J. Clin. Invest.*, **114**, 898–907 (2004).
51) Zajchowski D. A., Band V., Trask D. K., Kling D., Connolly J. L., Sager R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2314–2318 (1990).
52) Barsky S. H., Sternlicht M. D., Safarians S., Nguyen M., Chin K., Stewart S. D., Hiti A. L., Gray J. W., *Oncogene*, **15**, 2077–2091 (1997).
53) Hiraki Y., Kono T., Sato M., Shukunami C., Kondo J., *FEBS Lett.*, **415**, 321–324 (1997).
54) Strieter R. M., Kunkel S. L., Arenberg D. A., Burdick M. D., Polverini P. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 51–57 (1995).
55) Soncin F., Shapiro R., Fett J. W., *J. Biol. Chem.*, **269**, 8999–9005 (1994).
56) Masuda S., Matsuura K., Shimizu T., *Biomaterials*, **166**, 109–121 (2018).