

主論文の要旨

**In Vitro Epiretinal Membrane Model and Antibody
Permeability: Relationship With Anti-VEGF
Resistance in Diabetic Macular Edema**

In vitro 黄斑上膜モデルと抗体透過性
~糖尿病黄斑浮腫における抗 VEGF 耐性との関連~

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 眼科学分野

(指導：寺崎 浩子 教授)

南波 里奈

【背景】

糖尿病黄斑浮腫（Diabetic macular edema; DME）は、糖尿病網膜症に関連する糖尿病の微小血管合併症で糖尿病網膜症のどの段階でも発生することがあり、糖尿病患者の視力障害の原因の一つとなっている。DME の病因において血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor; VEGF）は極めて重要な役割を果たしているため、抗 VEGF 薬の硝子体注射は現在 DME の標準的治療となっている。一方で、DME では黄斑上膜（Epiretinal membranes; ERM）を含む硝子体黄斑部境界面異常（Vitreomacular interface abnormalities; VMIA）の有病率が高いと報告されており、その存在が DME に対する抗 VEGF 薬の治療効果を低下させることを示唆する報告がある。しかし、大規模な臨床試験は行われておらず未だ抗 VEGF 薬による DME 治療に対する VMIA の影響は明らかになっていない。

本研究では抗 VEGF 薬のうちヒト化モノクローナル抗体の Fab 断片である Ranibizumab による治療を受けた DME 症例において、ERM が並存する症例とそうでない症例の間に臨床的差異が存在するかどうかを遡及的に調べた。また、ヒト ERM 標本で確認された培養細胞株を用いて *in vitro* ERM モデルを新規に構築し、その有無によって抗体透過性が異なるか評価した。

【方法】

臨床研究の対象は 2014 年 2 月から 2018 年 8 月に名古屋大学医学部附属病院眼科外来を受診した DME 患者の中で以下の基準(1)(2)を満たした 35 例 43 眼である。(1)Ranibizumab による治療を必要とする DME (CRT \geq 250 μ m) を有する症例。(2)12 か月間の抗 VEGF 治療中に予期せぬ合併症がなく、光干渉断層計 (OCT) のシグナル強度が基準以上で網膜を撮影できた症例。また、硝子体手術の既往歴や網膜の厚さに影響を及ぼし得るあらゆる眼または全身の障害を有する症例（例：緑内障・視神経疾患・加齢黄斑変性）や硝子体黄斑牽引を伴う症例、Ranibizumab 以外の他の抗 VEGF 薬を受けた症例は除外した。1 人の患者で両眼とも上記の基準を満たす場合は各眼を個別に数え、視力、中心網膜厚（Central retinal thickness; CRT）、硝子体注射回数を 12 か月間に渡り調べ、ERM の有無で 2 群間比較した。

基礎研究では Transwell を用い、基底膜として Matrigel、ERM として Matrigel 上に ARPE-19 細胞、MIO-M1 細胞、NTI-4 細胞の 3 種類の細胞を各 4.7×10^4 個/well、 1.56×10^4 個/well で培養 7 日間培養することで *in vitro* ERM モデルを作成した（Figure 1）。*In vitro* ERM モデルの上区画に Alexa Fluor 488 rabbit fragment（Alexa 488 Fab）もしくは FITC 標識した Ranibizumab を加え、24 時間後に Transwell の上下区画の蛍光量を測定した。

【結果】

臨床研究では ERM 並存群と非並存群の間で年齢や性別、糖尿病罹病期間、HbA1c、糖尿病網膜症の重症度、汎網膜光凝固術を含むレーザー治療の既往、高血圧や腎疾患、

後部硝子体剥離の有無に有意差は認めなかった (Table 1)。また、ERM 並存群では初回抗 VEGF 薬治療前後の CRT 変化率、12 か月後の CRT および視力が有意に改善しにくいという結果が得られた (Table 2)。

基礎研究では、ERM を伴う DME 患者から採取した ERM の観察および免疫染色において、標本内に色素性細胞の存在が確認され、GFAP 陽性細胞および α SMA 陽性細胞が観察された (Figure 2)。Transwell を用いた実験では、最初に Transwell 上に Matrigel を設置した [ECM (+)] 群において下区画の Alexa 488 Fab の蛍光強度の経時変化を測定した。蛍光強度は、48 時間の時点まで時間依存的に増加し、48 時間と 72 時間の間で減少した (Figure 3A)。さらに、24 時間の時点では Transwell のみの [ECM (-)] 群および ECM (+) 群の下区画における蛍光強度に有意差は認めなかった (86.67 vs. 80.83, $n = 6$, $P = 0.42$, Figure 3B)。これらの結果から、ECM 単独では Fab の透過性に影響を及ぼさないと考えられた。次に Transwell に ERM 組織で観察された各細胞の cell line である MIO-M1、ARPE-19、および NTI-4 細胞を播種すると [ERM(+)]、ヒト ERM 標本と同様にコラーゲン I が生成され (Figure 3C, 3D)、ヒト ERM 標本 (Figure 3E) と同様に多層構造を形成した (Figure 3F)。また、ECM (+) と ECM (+) ERM (+) の群間において、蛍光色素投与から 24 時間後の各区画における蛍光強度に有意差は認めなかった [上区画 (91.47 vs. 94.07, $n = 5$, $P = 0.63$) および下区画 (54.17 vs. 53.75, $n = 12$, $P = 0.88$), Figure 3G]。

次に、MIO-M1 単独群、または MIO-M1、ARPE-19、および NTI-4 細胞の 3 種類の細胞を使用して *in vitro* ERM モデル [ERM (+)] 群の上下区画で Alexa 488 Fab の蛍光強度を測定した。その結果、ECM 群 (101.33) と比較して、MIO-M1 単独群 (61.72, $P = 4.45 \times 10^{-3}$) および ERM (+) 群 (54.00, $P = 2.18 \times 10^{-7}$) の下区画の蛍光強度は有意に減少した (Figure 4A)。さらに、ECM 群 (119.00) と比較して MIO-M1 単独群 (189.83) の上区画の蛍光強度は有意に高く ($P = 3.08 \times 10^{-3}$)、ERM (+) 群 (172.17) より有意に高い傾向を示した ($P = 1.31 \times 10^{-2}$, Figure 4A)。また、ECM (+) 群 (101.33) と比較して、3 種類の細胞併用群における下区画の蛍光強度は細胞数が増えるごとに有意に減少した (67.50, $P = 1.33 \times 10^{-6}$; 54.00, $P = 2.18 \times 10^{-7}$, Figure 4B)。一方で、ECM (+) 群 (119.00) と比較して、ERM (+) 群における上区画の蛍光強度は細胞数が増えるごとに有意に増加した (157.67, $P = 4.23 \times 10^{-2}$; 172.17, $P = 1.31 \times 10^{-2}$, Figure 4B)。同様に、FITC 標識した Ranibizumab を用いた実験においても ECM (+) 群 (68.79) と比較して、ERM (+) 群における下区画の蛍光強度は細胞数が増えるごとに有意に減少した (54.17, $P = 4.12 \times 10^{-5}$; 38.67, $P = 9.19 \times 10^{-8}$, Figure 4C)。一方で、ECM (+) 群 (200.79) と比較して、ERM (+) 群における上区画の蛍光強度は細胞数が増えるごとに有意に増加した (221.79, $P = 2.92 \times 10^{-2}$; 237.79, $P = 1.59 \times 10^{-3}$, Figure 4C)。

【考察】

Yoon らは、VMIA 併存 DME 症例では、VMIA 非併存症例よりも抗 VEGF 薬を 3

回注射した後の視力改善が不良であったと報告しており、Wong らは ERM の存在は DME の機能的（視覚）および解剖学的（CRT）の改善を制限すると報告している。本研究では、ERM 並存 DME 症例が ERM 非並存 DME 症例に比べ初回抗 VEGF 薬治療前後の CRT 変化率、12 か月後の CRT および視力が有意に改善しにくいという結果が得られ、これまでの報告と一致していた。また、糖尿病性網膜症臨床研究ネットワークでは Ranibizumab による治療は、若い患者、低いグレードの網膜症、および網膜のしわ、すなわち ERM 非並存 DME 症例に有効であると報告している。本研究では年齢や網膜症のグレードに有意差はなく、これらの要因は CRT と最終的な視力の違いに影響を及ぼさなかったと思われた。以上のことから、ERM の存在自体によって抗 VEGF 薬の治療効果が低下した可能性が考えられた。

さらに、今回の検討では臨床データの分析に加えて培養細胞を用いた細胞実験を通じて ERM と抗 VEGF 薬との関連性も調べた。ERM 併存 DME 症例から採取した ERM の免疫染色は GFAP 陽性、 α SMA 陽性、および色素性細胞を示し、各々 Müller 細胞、筋線維芽細胞または線維芽細胞、RPE 細胞の存在を示唆していた。これは既報の所見と矛盾しないものであり、この結果を踏まえて *in vitro* ERM モデルを構築した。さらに、本研究の *in vitro* ERM モデルはヒト ERM 標本と類似の様式で I 型コラーゲンを産生しており、ERM を研究するための新規 *in vitro* ERM モデルとして有用である可能性も示された。そして、MIO-M1、ARPE-19、および NTI-4 細胞を含む本研究の *in vitro* ERM モデルは、下区画の蛍光強度を有意に減少させると共に、細胞数が増加するにつれて上区画の蛍光強度の増加（残存）を引き起こした。使用した Alexa 488 Fab のサイズは Transwell フィルターの孔径より小さいため、Transwell は抗体の透過に影響を及ぼさなかったといえる。さらに、Alexa 488 Fab の蛍光強度は 24 時間で減弱する可能性が低く（Figure 3A）、ECM は抗体の透過を直接妨害する可能性が低い（Figure 3B）。したがって、本研究の *in vitro* ERM モデルでは抗体の透過性の低下は ERM 自体によって引き起こされたと考えられた。

【結論】

ERM の存在が DME に対する抗 VEGF 薬の治療効果を低下させる可能性が示唆された。その機序の一部として、ERM による抗体透過性の低下が一因であることが示唆された。