

るいは副責任医師は、その事象の治療関連行為との関連性の有無の判定に関わらず、できるだけ速やかに、倫理委員会（委員長）に報告する。

#### 免疫学的評価

本臨床試験の secondary endpoints の一つであり、ワクチン療法後でペプチド特異的免疫反応が惹起できるかどうかを検討する。少なくともワクチンを3観察単位（3か月）投与した患者を対象とする。

#### ペプチド刺激による in vitro CTL 誘導能

末梢血単核球をワクチンしたペプチドにて5回刺激し、IFN- $\gamma$ 産生能を ELISA にて測定する。観察項目として、1.ワクチン前後での IFN- $\gamma$ 産生量・産生比の変化、2.CTL 前駆体の変化を解析する。HLA Tetramer による TCR の量的解析

ワクチン前後における CD8 陽性分画でのペンタマーによる CTL の量的解析を行う。

#### その他の免疫反応

上記で IFN- $\gamma$ 産生を認めた細胞から CTL ラインを樹立する。

#### 臨床的有効性の評価

これを行うための眼科学的検査には、矯正視力、精密眼底検査、眼底写真、蛍光眼底造影検査（フルオレスセイン、インドシアニンググリーン）、光干渉断層計（OCT）が含まれる。これらは、新生血管

黄斑症の経過観察において本院で通常行われている検査である。

黄斑部の滲出性病変の変化および解剖学的変化

少なくとも本プロトコールで定める1コースを終了した患者が対象となる。眼底写真および、蛍光眼底造影検査、光干渉断層計（OCT）により判定する。

#### 視力変化

試験前後の視力変化を検討する。

試験の完了、評価可能症例、試験中止基準

この試験は、各群共同研究施設を含め160例の評価可能症例を得た際に完了となる。評価可能症例とは、1コース終了した症例、及び、1コース終了前にワクチン投与に関連すると推定される有害事象により試験を中止した症例と、定義する。ただし、ワクチン投与に関連すると推定される有害事象が2例に認められた時点で試験は中止となる。

ヘルシンキ宣言、ICH-GCP ガイドラインにより、被試験者はいついかなる時でも、いかなる理由であっても、以降の医療処置等に影響を与えることなく自由意思で試験を中止する権利を有する。中止した場合においても被験者への安全性の配慮から出来るだけ長期間観察し、少なくとも30日に1回の間隔で観察する。観察期間の画像診断も同様の間隔で施行する。ワクチン投与の継続

有効性評価により患者の利益となる判定が得られた場合、患者の希望があれば、責任医師の判断によりその患者に対してさらなるコースを繰り返し実施しても良い。

#### C) 研究結果

新生血管黄斑症に対する VEGFR を標的とした HLA 拘束性エトープペプチドによる維持療法第 II 相臨床試験を本学医学部附属病院臨床試験部にプロトコルの倫理承認を申請した。

#### D) 考察

血管新生黄斑症の一つである加齢黄斑変性は先進諸国に多い難病である特定疾患で、本邦における高齢化、西欧化の影響で増加の一端をたどっている。この疾患に対しても有効治療が限られているが、その他の血管新生黄斑症においては罹病数も少なく、治療法についても未知である。また、これらは若年者に発症し進行すれば急激に社会的失明にいたることより、就労人口の低下、および、介護必要性の増加等より厚生労働問題において負の影響をきたす。これは本邦のみではなく西欧先進国においては共通の問題であり、この疾患に関する関心は非常に高い。よって、新規治療法の開発は臨床上の急務である。

類縁疾患である加齢黄斑変性に効果をみとめる抗 VEGF 療法等はこれらの疾患に対してもある程度の効果が報告されているが、加齢黄

斑変性に対してと同様、その効果は限定されたものである。また、これら治療薬は血管新生黄斑症に対しては保険が認められていないにもかかわらず、非常に高価である。本年認可されたルセンチス硝子体注は一回の薬価が 18 万円に相当し、長年に亘る繰り返しの投与が奨励されている。上記疾患の中には、網膜色素線条、網膜内血管増殖等、加齢黄斑変性に比しても明らかに再発率が高い疾患も含まれ、治療効果の面だけでなく、経済学的状況からも治療における抗 VEGF 療法のみでの解決は難しい。また、抗 VEGF 療法は知財を海外企業が有し、高齢化社会を迎えつつある本邦の医療経済において、医療費高騰による保険料負担増のみならず、海外へ資産流出は看過できない問題である。

以上より、新規治療の開発は国外で多く進められているが、やはり、VEGF を対象としたものが多く、(可溶化レセプターや siRNA による発現抑制) VEGFR を対象とするものも、レセプター以下のシグナル抑制剤 (PKC 阻害) などであり、本療法のように理論的に VEGFR を発現する新生血管内非細胞を除去できるような治療ではない。本研究により、従来の治療が無効であった症例にも治療の可能性が開けるだけでなく、眼科的に危険性の高い硝子体注入を回避し、安全な治療法が確立されるのは、大きな

意義を持つ。安価で副作用が少なく効果的な薬を、日本で開発することは、日本だけでなく世界の医療経済に大きく貢献するものと考ええる。

E) 健康危険情報

なし

F) 研究発表

(ア) 論文発表

1. Ayana Yamashita, Fumio

Shiraga, Chieko Shiragami,

Aoi Ono, Kaori Tenkumo.

One-Year Results of

Reduced-Fluence

Photodynamic Therapy for

Polypoidal Choroidal

Vasculopathy. Am J

Ophthalmol

2010;149(3):465-471

2. Masaaki Saito, Chieko

Shiragami, Fumio Shiraga,

Mariko Kano, Tomohiro Iida.

Comparison of Combined

Therapy between

Intravitreal Triamcinolone

Acetonide with

Photodynamic Therapy and

Intravitreal Bevacizumab

with Photodynamic Therapy

for Retinal Angiomatous

Proliferation. Am J

Ophthalmol

2010;149(3):472-481.

(イ) 学会発表

第 63 回日本臨床眼科学会

(2009 年 10 月 10 日福岡)

G) 知的財産権の出願・登録状況

なし

H) 参考文献

なし

分担研究報告

血管新生黄斑症に対するペプチドワクチン療法に関する研究

分担研究者 高橋 寛二

関西医科大学医学部眼科学教室 教授

【研究要旨】

血管新生黄斑症は黄斑部網膜下に脈絡膜新生血管の発生とそれに伴う浸出性の変化により、視細胞を中心とした網膜神経細胞が非可逆的に障害され高度の視力低下をきたす疾患群である。中でも加齢黄斑変性はわが国において患者数が急増し中途失明者の原因疾患の上位を占めるに至って早急な対策が望まれる。その他、近視性脈絡膜新生血管および特発性脈絡膜新生血管も黄斑下の脈絡膜血管新生により同様の視機能障害を来す。これらに対する標準療法としては現在のところ、抗 VEGF 療法が行われている。抗 VEGF 療法には本学で高度先進医療として行っている Bevacizumab と昨年市販された Rabinizumab (商品名ルセンチス) がある。しかし、抗 VEGF 薬は 2 年間に約 10 回の硝子体投与が必要であり、これが患者の身体的、経済的負担となっている。(硝子体投与においては一定の頻度での発生が避けられず、失明も十分に考えられる眼内感染といった重篤な眼合併症が存在する。) 我々は「新生血管黄斑症に対する VEGFR を標的とした HLA 拘束性エピトープペプチドによる維持療法第 II 相臨床試験」を本研究の内容として企画している。本試験は通常の抗 VEGF 薬による導入のち、VEGFR1 もしくは VEGFR2 由来の HLA 拘束性エピトープペプチドを Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) と混和して患者皮下に投与し、病的血管新生の阻害による浸出性変化の軽快を期待するペプチドワクチン療法を行うことにより、以後維持期に必要な抗 VEGF 薬の硝子体投与の回数を減らすことを目的とした試験である。本試験において使用するペプチドワクチン療法を用いた第 I 相試験（従来療法無効例に対するもの、大阪大学にて施行）において、16 例の症例に投与したが重篤な副作用を認めず、また、視力維持に関しては従来療法よりも有効性があると考えられた。現在、この「新生血管黄斑症に対する VEGFR を標的とした HLA 拘束性エピトープペプチドによる維持療法第 II 相臨床試験」について倫理委員会にプロトコール申請を行っている。

## A) 研究目的

新生血管黄斑症に対する VEGFR を標的とした HLA 拘束性エピトープペプチドによる維持療法第 II 相臨床試験をおこなうこと。

本臨床試験は加齢黄斑変性において標準療法となりつつある抗 VEGF 療法の欠点を補完することを目的として Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR1) および Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2/KDR) 由来の HLA-A\*0201 拘束性もしくは HLA-A\*2402 拘束性エピトープペプチドを Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) と混和して患者皮下に投与し、必要とされる抗 VEGF 療法の治療回数を軽減させ、ペプチドワクチンの有用性を検証する事を主目的とした第 II 相臨床試験である。

副次目的として、安全性の再確認、網膜の解剖学的、機能的変化、免疫学的変化を評価する。なお、本臨床試験は東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター、滋賀医科大学医学部眼科、香川大学医学部眼科、関西医科大学医学部眼科、大阪大学医学部眼科との共同研究で実施する。

目的及び評価項目

主要目的 (primary endpoint)

有用性

必要であった抗 VEGF 療

法の回数の検討。

副次的目的 (secondary endpoints)

安全性

臨床検査値異常変動を含むすべての有害事象

免疫反応

ペプチド刺激による in vitro CTL 誘導能

HLA Tetramer による TCR の量的解析

臨床的有効性

Fluorescent Angiograph による滲出性の変化、視力変化、光干渉断層計による網膜の解剖学的変化、有害事象を検討する。

## B) 研究方法

新生血管黄斑症に対する VEGFR を標的とした HLA 拘束性エピトープペプチドによる維持療法第 II 相臨床試験の概要は以下のとおりである。

対象

新生血管黄斑症で今後、標準的な抗 VEGF 療法の硝子体注による導入療法と維持療法が必要である患者。

同意取得時の年齢が 40 歳以上 85 歳以下。

新生血管について何らかの治療を受けている場合、もしくは他の疾患により何らかの手術を受けている場合は、これら処置による影響から回復していること。もしくは、前治療から 4 週間以上が経過していること。

全施設にて各群 40 症例数を予定している、この数字については、期間中抗 VEGF 療法の硝子体投与の回数、2 回分の減少を投与回数の標準偏差 3.0 と予測した場合、検出力 80%、有意水準 0.05 のもとで Wilcoxon 順位検定にて検出できる症例数である。

当施設の目標はしたがって A\*0201 群、A\*2402 群それぞれ、40 例とするが共同研究施設を合わせて 40 に到達した時点でエントリー中止とすることができる。

また、本施設において 1 群が 40 に到達したのちでも他群が到達するまでエントリー可能とする。

#### 方 法

文章にて同意取得後、HLA のタイピングのにより、患者を A\*2402 群、A\*0201 群、コントロール群に振り分ける。全患者に対して通常の抗 VEGF 薬ルセンティスの硝子体投与を 1 カ月ごと 3 回行う。A\*2402, A0201 群に対してはこれと同時に、ペプチドそれぞれを 1mg づつをそれぞれ不完全フロイントアジュバント 1mL と混合し、患者腋下またはソケイ部の皮下に投与するペプチド療法を開始する。ペプチドを投与間隔は 2 週間ごとにおこなう。(詳細は実施計画書に記載) 繰り返しとなるが、行われる抗 VEGF 療法は通常の臨床で行われるものと変わりがなく、これにより患者は不利益を得ない設計になっている。

#### 評 価

##### 有用性の評価

評価は、少なくともペプチドを 12 回投与(6 観察単位(月)終了)した患者を対象とする。

A\*2402 群、A\*0201 群、において、CTL が導入されたことが期待できる 3 観察単位(月)後から全行程終了までのルセンティス投与回数を記録し、12 観察単位(1 年)当たりの投与回数を記録する。対照群においても導入療法終了後からのルセンティス当初回数を記録し、1 年あたりの投与回数を記録する。ただし、ルセンティス投与が必要と判断されたにもかかわらず、患者が以後のルセンティス投与を希望しなかった場合、投与回数 1 回を記録し、以後の検討は行わないものとする。各群におけるルセンティス投与回数の差を統計学的に検討する。

##### 安全性評価

安全性についてはワクチンを 1 回でも投与した患者を対象とする。有害事象の有無と程度を National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria,(NCI-CTC) (日本語訳 JCOG 版) version4 を基準に判定する。また、関連性の推測も同時に行う。試験中、最終投与後 14 日以内に Grade4 以上の有害事象及び死亡、生命の危機、永久的な後遺症の発生が予想される重篤な有害事象が生じた際、責任医師あ

るいは副責任医師は、その事象の治療関連行為との関連性の有無の判定に関わらず、できるだけ速やかに、倫理委員会（委員長）に報告する。

#### 免疫学的評価

本臨床試験の secondary endpoints の一つであり、ワクチン療法後でペプチド特異的免疫反応が惹起できるかどうかを検討する。少なくともワクチンを3観察単位（3 か月）投与した患者を対象とする。

#### ペプチド刺激による in vitro CTL 誘導能

末梢血単核球をワクチンしたペプチドにて5回刺激し、IFN- $\gamma$ 産生能を ELISA にて測定する。観察項目として、1.ワクチン前後での IFN- $\gamma$ 産生量・産生比の変化、2.CTL 前駆体の変化を解析する。HLA Tetramer による TCR の量的解析

ワクチン前後における CD8 陽性分画でのペンタマーによる CTL の量的解析を行う。

#### その他の免疫反応

上記で IFN- $\gamma$ 産生を認めた細胞から CTL ラインを樹立する。

#### 臨床的有効性の評価

これを行うための眼科学的検査には、矯正視力、精密眼底検査、眼底写真、蛍光眼底造影検査（フルオレスセイン、インドシアニングリーン）、光干渉断層計（OCT）が含まれる。これらは、新生血管

黄斑症の経過観察において本院で通常行われている検査である。

黄斑部の滲出性病変の変化および解剖学的変化

少なくとも本プロトコールで定める1コースを終了した患者が対象となる。眼底写真および、蛍光眼底造影検査、光干渉断層計（OCT）により判定する。

#### 視力変化

試験前後の視力変化を検討する。

試験の完了、評価可能症例、試験中止基準

この試験は、各群共同研究施設を含め160例の評価可能症例を得た際に完了となる。評価可能症例とは、1コース終了した症例、及び、1コース終了前にワクチン投与に関連すると推定される有害事象により試験を中止した症例と、定義する。ただし、ワクチン投与に関連すると推定される有害事象が2例に認められた時点で試験は中止となる。

ヘルシンキ宣言、ICH-GCP ガイドラインにより、被試験者はいついかなる時でも、いかなる理由であっても、以降の医療処置等に影響を与えることなく自由意思で試験を中止する権利を有する。中止した場合においても被験者への安全性の配慮から出来るだけ長期間観察し、少なくとも30日に1回の間隔で観察する。観察期間の画像診断も同様の間隔で施行する。

ワクチン投与の継続

有効性評価により患者の利益となる判定が得られた場合、患者の希望があれば、責任医師の判断によりその患者に対してさらなるコースを繰り返し実施しても良い。

#### C) 研究結果

新生血管黄斑症に対する VEGFR を標的とした HLA 拘束性エペトープペプチドによる維持療法第 II 相臨床試験を本学医学部附属病院臨床試験部にプロトコルの倫理承認を申請した。

#### D) 考察

血管新生黄斑症の一つである加齢黄斑変性は先進諸国に多い難病である特定疾患で、本邦における高齢化、西欧化の影響で増加の一途をたどっている。この疾患に対しても有効治療が限られているが、その他の血管新生黄斑症においては罹病数も少なく、治療法についても未知である。また、これらは若年者に発症し進行すれば急激に社会的失明にいたることより、就労人口の低下、および、介護必要性の増加等より厚生労働問題において負の影響をきたす。これは本邦のみではなく西欧先進国においては共通の問題であり、この疾患に関する関心は非常に高い。よって、新規治療法の開発は臨床上の急務である。

類縁疾患である加齢黄斑変性に効果をみとめる抗 VEGF 療法等はこれらの疾患に対してもある程度の効果が報告されているが、加齢黄

斑変性に対してと同様、その効果は限定されたものである。また、これら治療薬は血管新生黄斑症に対しては保険が認められていないにもかかわらず、非常に高価である。本年認可されたルセンチス硝子体注は一回の薬価が 18 万円に相当し、長年に亘る繰り返しの投与が奨励されている。上記疾患の中には、網膜色素線条、網膜内血管増殖等、加齢黄斑変性に比しても明らかに再発率が高い疾患も含まれ、治療効果の面だけでなく、経済学的状況からも治療における抗 VEGF 療法のみでの解決は難しい。また、抗 VEGF 療法は知財を海外企業が有し、高齢化社会を迎えつつある本邦の医療経済において、医療費高騰による保険料負担増のみならず、海外へ資産流出は看過できない問題である。

我々の研究班ではこの血管新生黄斑症の新規治療として、VEGFR に対するワクチン療法を開発している。すでに、共同研究者により、この療法の第 I 相試験が行われ、一定の効果を収めているが、この結果からワクチン療法の欠点も指摘されうる。ワクチン療法においては細胞障害性 T 細胞が誘導されるのに一定の月日が必要であるために療法開始から効果が得られるまで最低で 2 週間ほどかかる。

(多くの症例は 3 カ月ほど) したがって機能の保持が重要である眼科領域においては効果が得られる



までに時間がかかりすぎる。一方、抗 VEGF 療法は即効性はあるものの、効果を維持するためには高価で危険な硝子体注射を繰り返す必要がある。先行する研究では平均 2 年間で 10 回程度の硝子体注射が必要であるといわれている。我々はこの二つの療法の欠点を相補する形での第 2 相臨床試験を準備している。この試験ではまず定法通り月に 1 回、3 か月の抗 VEGF 療法による導入と同時にワクチン療法の導入も開始する。その後の 2 年間において必要である抗 VEGF 療法の硝子体注射の回数を減らすことが目的である。現在、倫理委員会に申請をしており、来年度中の開始が見込まれている。本研究により、従来の治療が無効であった症例にも治癒の可能性が開けるだけでなく、眼科的に危険性の高い硝子体注入を回避し、安全な治療法が確立されるのは、大きな意義を持つ。安価で副作用が少なく効果的な薬を、日本で開発することは、日本だけでなく世界の医療経済に大きく貢献するものと考えている。

E) 健康危険情報  
なし

## F) 研究発表

### (ア) 論文発表

1. Nishikawa M, Matsunaga H, Takahashi K, Matsumura M Indocyanine green angiography in experimental choroidal circulatory disturbance Ophthalmic Research 2009 : 41,53-58
2. 杉山千晶、有澤章子、久保木香織、長央由里子、西川真生、永井由巳、高橋寛二 小児に認められた傍中心窩毛細血管拡張症の 2 例 臨床眼科 2009: 63 1163-1167
3. 高橋寛二 光線力学的療法 (PDT) ガイドライン あたらしい眼科 2009: 26 905-909
4. 高橋寛二 加齢黄斑変性の新しい分類と診断基準 眼科手術 2009: 22 333-336

### (イ) 学会発表

第 63 回日本臨床眼科学会  
(2009 年 10 月 10 日福岡)

G) 知的財産権の出願・登録状況  
なし

H) 参考文献

分担研究報告

血管新生黄斑症に対するペプチドワクチン療法に関する研究

分担研究者 中村 祐輔

東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター、センター長・教授

【研究要旨】

血管新生黄斑症は黄斑部網膜下に脈絡膜新生血管の発生とそれに伴う浸出性の変化により、視細胞を中心とした網膜神経細胞が非可逆的に障害され高度の視力低下をきたす疾患群である。中でも加齢黄斑変性はわが国において患者数が急増し中途失明者の原因疾患の上位を占めるに至って早急な対策が望まれる。その他、近視性脈絡膜新生血管および特発性脈絡膜新生血管も黄斑下の脈絡膜血管新生により同様の視機能障害を来す。これらの疾患においては病的新生血管が病態の中心である。

我々は腫瘍の抑制を目的としてこのような新生血管の退縮を導入することができ VEGFR を標的とした HLA 拘束性ワクチン療法を開発している。これは腫瘍ワクチン療法のスーパー特区課題「迅速な創薬化を目指したがんペプチドワクチン療法の開発」の一部をなすものでもある。

我々は当研究班の中で、これらのワクチンの開発、および、免疫学的解析の部分を担当している。

A) 研究目的

我々が腫瘍領域で開発した病的新生血管の退縮を目的とした VEGFR1, VEGFR2 に対するペプチドワクチン療法を眼科領域にも応用し、血管新生黄斑症に対する療法を確立すること。

B) 研究方法

実際のワクチン投与については他の分担報告書および総括報告書を参照のこと（当研究機関では行っていない）。

大阪大学で行われている「標準療法無効新生血管黄斑症に対する VEGFR を標的とした HLA-A 拘束性エピトープペプチドによる第 I 相臨床試験」において経過観察期間中採血を行った検体より細胞障害性 T 細胞 (CTL) ラインを作成しペプチド刺激による in vitro CTL 誘導能 HLA Tetramer による TCR の量的解析を定法に従って行った。

### C) 結果

「標準療法無効新生血管黄斑症に対する VEGFR を標的とした HLA-A 拘束性エピトープペプチドによる第 I 相臨床試験」において解剖学的改善が認められた 1 症例について VEGFR1 特異的 CTL が高度に誘導されていた (図)。

### D) 考察

血管新生黄斑症については、従来療法 (抗 VEGF 療法) には限界がある。本研究は同疾患に対して、VEGFR1 および R2 由来の HLA-A\*2402 または \*0201 拘束性エピトープペプチドを患者皮下に投与し、病的血管新生を阻害するペプチドワクチン療法の開発を目的とする。我々は VEGFR1 および 2 を特異的に認識し傷害する細胞障害性 T 細胞 (CTL) が健常人において存在することを証明し、これを誘導できる数種類の HLA-A\*2402 および HLA-A\*0201 拘束性のエピトープペプチドを同定した。国内で先行するペプチドワクチンの臨床研究では、主に標準療法が不応となった進行癌患者を対象に、腫瘍新生血管抑制を目的とした臨床研究を実施し、重篤な有害事象は認めず、安全に施行できることが示されつつある。一部の患者には腫瘍変化を認め、予後延長の可能性が示唆されている。一方、HLA-A\*0201 を発現するトランスジェニックマウスにおける実験

的脈絡膜新生血管において、VEGFR ペプチドにより眼内新生血管が抑制されることが示されている。他の分担研究者機関の大阪大学において、ワクチン療法の探索的臨床研究を開始しており、安全性の確認のみならず従来の抗 VEGF 療法においては改善が認められなかった患者において臨床所見の軽快を認めた。また、この患者においては予想通り、VEGFR 1 に対する CTL が高度に誘導されていた。我々は抗 VEGF 療法で治療導入の後、我々のワクチンを維持療法で使用するプロトコールを提案し臨床効果を検証する第 I I 相試験の実施を次年度においておこなう。次年度においては臨床研究機関を大阪大学から 4 大学に拡張し、倫理委員会への申請等の整備を進める。当研究は従来までの抗 VEGF の中和療法と異なり、免疫を用いて VEGFR を強く発現している病的血管内皮を直接駆逐できる点が優れていると考えられ、上記臨床試験はこの原理を用いた世界で最初の治療である。新生血管を直接の標的とする本研究での知見により、スーパー特区採択番号 16「迅速な創薬化を目指したがんペプチドワクチン療法の開発」へのフィードバックも期待でき、さらに、臨床調査研究分野の疾患である加齢黄斑変性にも直接応用できる。

### E) 健康危険情報

なし  
F) 研究発表  
    (ア)論文発表  
        なし  
    (イ)学会発表  
        第 63 回日本臨床眼科学会

(2009年10月10日福岡  
G) 知的財産権の出願・登録状況  
    特許出願番号 特願 2009-140363  
    脈絡膜血管のワクチン療法  
H) 参考文献  
    なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sawada O, Kawamura H, Kakinoki M, Sawada T, Ohji M.	Vascular Endothelial Growth Factor in the aqueous humor in eyes with myopic choroidal neovascularization	Acta Ophthalmol		In press	2010
Sawada O, Miyake T, Kakinoki M, Sawada T, Kawamura H, Ohji M.	Aqueous Vascular Endothelial Growth Factor after Intravitreal Injection of Pegaptanib or Ranibizumab in Patients with Age-Related Macular Degeneration.	Retina		In press	2010
Tano Y and Ohji M	EXTEND-I: safety and efficacy of ranibizumab in Japanese patients with subfoveal choroidal neovascularisation secondary to age-related macular degeneration	Acta Ophthalmol		In press	2010
Miyake T, Sawada O, Kakinoki M, Sawada T, Kawamura H, Ogasawara K, Ohji M	Pharmacokinetics of bevacizumab and its effect on vascular endothelial growth factor after intravitreal injection of bevacizumab in Macaque eyes.	Invest Ophthalmol Vis Sci	51	1606-1608	2009
田野保雄、大路人、石橋達朗、白神史雄、所敬、湯澤美都子	ラニビズマブ(遺伝子組換え)の維持期における再投与ガイドライン	日本眼科学会雑誌	113	1098-1103	2009
Ayana Yamashita, Fumio Shiraga, Chieko Shiragami, Aoi Onoda, Kaori Tenkuthy	One-Year Results of Reduced-Fluence Photodynamic Therapy for Polypoidal Choroidal Vasculopathy	Am J Ophthalmol	149	456-471	2010
Masaaki Saito, Chieko Shiragami, Fumio Shiraga, Mariko Kano, Tomohiro Iida	Comparison of Combined Therapy between Intravitreal Triamcinolone Acetonide with Photodynamic Therapy and Intravitreal Bevacizumab with Photodynamic Therapy for Retinal Angiomatic Proliferation	Am J Ophthalmol	149	472-481	2010

Nishikawa M, Matsunaga H, Takahashi K, Matsumura M	Indocyanine green angiography in experimental choroidal circulatory disturbance	Ophthalmic Research	41	53-58	2009
杉山千晶、有澤章子、久保木香織、長央由里子、西川真生、永井由巳、高橋寛二	小児に認められた傍中心窩毛細血管拡張症の2例	臨床眼科	63	1163-1167	2009
高橋寛二	光線力学的療法 (PDT) ガイドライン	あたらしい眼科	26	905-909	2009
高橋寛二	加齢黄斑変性の新しい分類と診断基準	眼科手術	22	333-336	2009

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



# Vascular endothelial growth factor in the aqueous humour in eyes with myopic choroidal neovascularization

Osamu Sawada, Hajime Kawamura, Masashi Kakinoki, Tomoko Sawada and Masahito Ohji

Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science, Japan

## ABSTRACT.

**Purpose:** To determine the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the aqueous humour of eyes with myopic choroidal neovascularization (mCNV).

**Methods:** Aqueous humour samples were obtained from 21 eyes of 21 patients with mCNV and from 21 eyes of 21 patients with cataract without CNV or other ocular or systemic diseases (control group). The VEGF concentration in the aqueous humour was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results:** The VEGF concentrations in the aqueous humour of eyes with mCNV ranged from < 20.6 to 200 pg/ml (median 35 pg/ml). The concentrations in the control group ranged from 26 to 218 pg/ml (median 100 pg/ml). The difference between the two VEGF concentrations in the aqueous humour was significant ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney rank sum test).

**Conclusion:** The VEGF concentration in the aqueous humour of patients with mCNV is lower than in normal controls. VEGF might localize in or around the CNV in eyes with mCNV.

**Key words:** aqueous humour – bevacizumab – choroidal neovascularization – myopia – vascular endothelial growth factor

Acta Ophthalmol.

© 2010 The Authors

Journal compilation © 2010 Acta Ophthalmol

doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01717.x

## Introduction

Vascular endothelium growth factor (VEGF) is thought to play a key role in the progression of choroidal neovascularization (CNV) associated with age-related macular degeneration (AMD) (Ishibashi et al. 1997; Kwak et al. 2000). Several anti-VEGF drugs have been used to treat CNV associated with AMD, and favourable

results have been reported (Gragoudas et al. 2004; Avery et al. 2006; Rosenfeld et al. 2006).

VEGF also seems to play a key role in the progression of CNV secondary to pathological myopia. Anti-VEGF therapy has been reported to have a favourable effect on myopic CNV (mCNV). It was reported that intravitreal injection of bevacizumab (Avastin®; Genentech, South San

Francisco, California, USA), a recombinant humanized monoclonal antibody against all VEGF isoforms (Ferrara 2004), improved the visual acuity (VA) and decreased the angiographic leakage in eyes with mCNV (Chan et al. 2009; Gharbiya et al. 2009; Ikuno et al. 2009). Intravitreal injection of ranibizumab (Lucentis; Novartis, Basel, Switzerland), a humanized antigen-binding portion of a murine anti-VEGF monoclonal antibody that has a mature high affinity to all VEGF isoforms, improved the VA and reduced the retinal thickness in eyes with mCNV (Konstantinidis et al. 2009). Further understanding of the role of VEGF in the pathogenesis of mCNV may aid current anti-VEGF treatment and combination therapy with photodynamic therapy (PDT). To study the relation between VEGF and mCNV, we obtained aqueous humour samples and measured the VEGF concentrations in the aqueous humour of patients with mCNV.

## Materials and Methods

In this prospective comparative study, we determined the VEGF concentration in the aqueous humour of 21 patients (five men, 16 women) with mCNV. The mean patient age was 64.7 years (range 31–79 years). Aqueous samples from 21 patients (eight men, 13 women) with cataract who did not have CNV or other ocular or systemic diseases comprised the

**Table 1.** Clinical characteristics of patients with myopic choroidal neovascularization (mCNV) and controls with cataract.

	mCNV	Control	p-value
No. of patients	21	21	
Gender (female/male)	16/5	13/8	0.504
Age (mean ± SD)	64.7 ± 12.4	66.3 ± 9.6	0.693
Axial length (mm, mean ± SD)	29.50 ± 1.47	24.55 ± 2.27	< 0.001

SD, standard deviation.

control group. The mean patient age in the control group was 66.3 years (range 44–79 years) (Table 1).

Undiluted aqueous humour samples were obtained from the eyes of patients with mCNV just before intravitreal injection of 1.25 mg bevacizumab. Anterior-chamber paracentesis was performed before the intravitreal injection, because aspiration of the aqueous humour samples prevents a spike in intraocular pressure after bevacizumab (1.25 mg/0.05 ml) is injected intravitreally.

Undiluted aqueous humour samples were also obtained from the control eyes of the patients with a cataract and no CNV or other ocular disorders immediately before cataract surgery. All injections and sample collections were performed using a standard sterilization procedure that included the use of topical povidone-iodine and levofloxacin drops. No steroids were administered to the cataract patients before cataract surgery. The samples were stored in a freezer at -80 °C until analysis.

The VEGF concentration in the aqueous humour was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for human VEGF (R&D System, Minneapolis, Minnesota, USA). The primary antibody against VEGF detected two (VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub>) of the four VEGF isoforms (Hyodo et al. 1998). The standard curve was plotted from the measurements taken with the standard solution (20.6–1000 pg/ml) and the VEGF concentration in the sample was determined. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. The limit of the detectable VEGF concentration was 20.6 pg/ml.

The size of the mCNV was measured on fluorescein angiography before treatment. The fluorescein angiography images were digitalized using ImageNet® (Topcon, Tokyo, Japan), and both the mCNV and the disc size were

measured using the ImageNet® software. The mCNV area was divided by the disc area and the mCNV size was expressed in disc areas. The axial length was measured using an IOL Master® (Carl Zeiss Meditec, Jena, Germany) in the patients with mCNV. The data were analysed using SIGMA-STAT software (version 3.1; Systat Software Inc., Richmond, California, USA) and expressed as the median value. The differences between the VEGF concentrations in the aqueous humour of patients with mCNV and the control patients were compared using the Mann–Whitney rank sum test. The Spearman rank-order correlation coefficient test was used to examine the correlation between the VEGF concentrations in the aqueous humour and the size of the CNV or the axial length. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

This study of the off-label use of bevacizumab was approved by the institutional review board of Shiga University of Medical Science Hospital. All patients provided written informed consent, including those with mCNV and cataract.

## Results

The VEGF concentrations in the aqueous humour in eyes with mCNV ranged from < 20.6 to 200 pg/ml

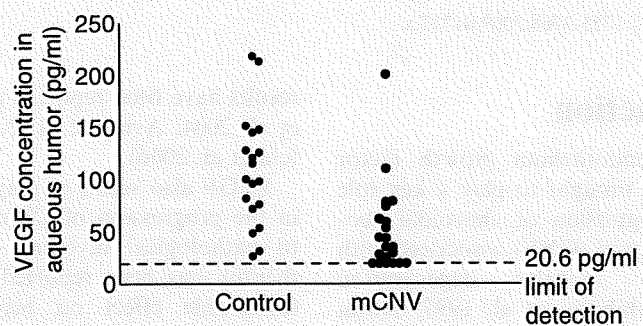
(median 35 pg/ml) before intravitreal injection of bevacizumab. VEGF concentrations in the aqueous humour were below 20.6 pg/ml – the lower limit of detection – in six of the 21 eyes with mCNV. The VEGF concentrations in the aqueous humour in the control eyes with cataract ranged from 26 to 218 pg/ml (median 100 pg/ml) (Fig. 1). The median concentration in the aqueous humour was significantly lower in eyes with mCNV than in the control group (Mann–Whitney rank sum test,  $p < 0.001$ ).

Correlations between VEGF concentration and CNV size or axial length were evaluated. A value of 19 pg/ml was assigned as the VEGF concentration in eyes with VEGF < 20.6 pg/ml and analysed. The CNV sizes ranged from 0.053 to 2.041 disc areas [mean ± standard deviation (SD) 0.664 ± 0.680 disc area] before treatment. No correlation was observed between the VEGF concentrations in the aqueous humour and the CNV size in mCNV (Spearman rank-order correlations coefficients test;  $\rho = 0.0946$ ;  $p = 0.678$ ) (Fig. 2).

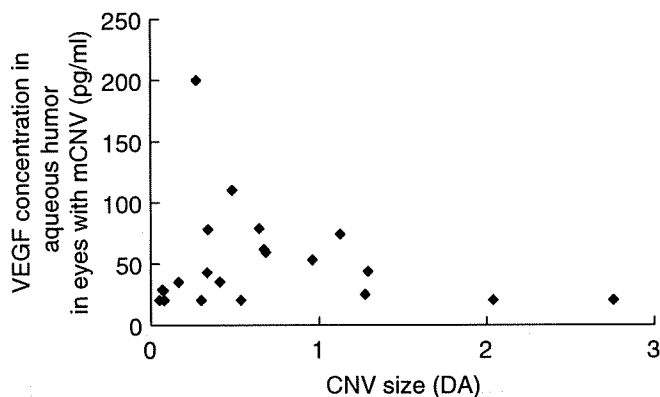
In the eyes with mCNV, axial length ranged from 26.90 to 32.55 mm (mean ± SD 29.50 ± 1.47 mm). The VEGF concentrations in the aqueous humour seemed to be correlated with the axial length in the eyes with mCNV (Spearman rank-order correlations coefficients test;  $\rho = -0.434$ ;  $p = 0.0488$ ) (Fig. 3). The axial length in the controls ranged from 20.98 to 31.95 mm (mean ± SD 24.55 ± 2.27 mm).

## Discussion

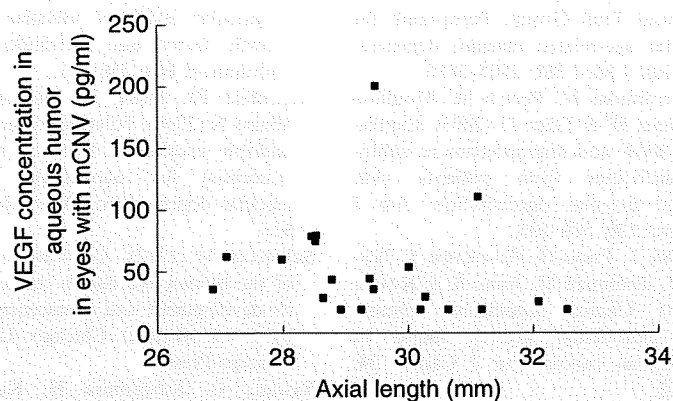
mCNV, a cause of visual loss and legal blindness in young and middle-aged patients, is associated with a poor prognosis (Avia et al. 1984;



**Fig. 1.** Vascular endothelial growth factor concentrations in the aqueous humour in eyes with myopic choroidal neovascularization and control eyes.



**Fig. 2** The correlation between the size of the choroidal neovascularization (CNV) and the aqueous levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in eyes with myopic CNV (mCNV). The aqueous levels of VEGF are not significantly correlated with the size of the CNV ( $\rho = 0.0946$ ;  $p = 0.678$ ) (DA, disc area).



**Fig. 3.** The correlation between the axial length and aqueous levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in eyes with myopic choroidal neovascularization. The aqueous levels of VEGF are not significantly correlated with the axial length ( $\rho = -0.434$ ;  $p = 0.0488$ ).

Yoshida et al. 2003). PDT with verteporfin reduces the risk of visual impairment (Blinder et al. 2003; Ergun et al. 2004; Lam et al. 2004). Currently, PDT or the combination of PDT and intravitreal triamcinolone acetonide is suboptimal for treating mCNV (Degenring & Jonas 2005).

Recent studies have reported that intravitreal injection of an anti-VEGF drug, bevacizumab, seems to be effective for treating mCNV (Chan et al. 2009; Gharbiya et al. 2009; Ikuno et al. 2009). Therefore, VEGF may play a key role in the development of mCNV.

The VEGF concentration in the aqueous humour is higher in patients with diabetic retinopathy and retinal vein occlusion than in healthy individuals (Aiello et al. 1994; Sawada et al. 2007). However, it is controversial whether the VEGF concentration is high in AMD and mCNV. Tong et al. (2006) reported that the VEGF concentrations in the aqueous humour increased markedly in patients with

polypoidal choroidal vasculopathy, CNV associated with AMD and CNV associated with myopia compared with control patients. In contrast, Jonas & Neumaier (2007) reported that the VEGF concentrations in the aqueous humour of patients with AMD did not vary significantly compared with controls. The VEGF concentration in eyes with mCNV is also controversial. Chan et al. (2008) reported that the VEGF concentration in the aqueous humour of patients with mCNV was  $20.1 \pm 28.9$  pg/ml, which is similar to the value in the current study, while Tong et al. (2006) reported elevated levels of aqueous VEGF in eyes with mCNV.

In the current study, the VEGF concentrations in the aqueous humour in patients with mCNV were significantly lower than in the controls. In this study, the VEGF concentration in the control eyes (100 pg/ml) was similar to that reported by Noma et al. (2005), who used the same measurement system.

There are several possible explanations for the lower VEGF concentration in the aqueous humour in patients with mCNV compared with controls. VEGF is expressed strongly in subfoveal membranes excised surgically from patients with AMD (Kvanta et al. 1996; Lopez et al. 1996; Hera et al. 2005). However, to the best of our knowledge, the presence of VEGF in the retina and the choroid in mCNV has not been reported. We speculated that VEGF might be localized to a small subfoveal area and might cause mCNV and AMD. If the VEGF is localized to the retina and the choroid and the quantity of VEGF is small, there might not be sufficient VEGF distributed throughout the vitreous cavity and penetrating the anterior chamber. Therefore, it is reasonable that there is no correlation between the VEGF concentration in the aqueous humour and the size of the CNV in mCNV. Another possible explanation is that the VEGF in the anterior chamber and vitreous cavity might be diluted, because the axial length is longer and therefore the intraocular volume is large in patients with high myopia. We observed a negative correlation between the VEGF concentration in the aqueous humour and the axial length in mCNV. However, any VEGF concentration below 20.6 pg/ml was not measured precisely because of the lower limit of the ELISA used in the current study. This correlation might not be definitive. To evaluate this, we compared the adjusted VEGF concentrations in the aqueous humour between the patients with mCNV and the control patients by adjusting for the difference in axial length. The circumferential length of eyes is similar despite differences in the axial length between myopic eyes and non-myopic eyes (Salzmann 1912). Assuming the intraocular volume was linear to the axial length, the adjusted VEGF concentration in the control eyes was 88 pg/ml, which is still higher than in myopic eyes. Therefore, the lower VEGF concentration in mCNV does not seem to be explained solely by the difference in axial length.

Other possible explanations are that VEGF production might decrease because the retina is thin in pathological myopia (Lam et al. 2007) or that retinal thinning might cause relatively increased choroidal perfusion and decreased retinal hypoxia, resulting in

decreased VEGF production. In addition, VEGF isoforms other than VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> might play a key role in mCNV. The antibody we used can detect free VEGF<sub>121</sub> and free VEGF<sub>165</sub>. Therefore, we cannot deny the possibility that bound VEGF or other VEGF isoforms might play a key role in mCNV.

In the current study, we found a significantly lower mean VEGF concentration in the aqueous humour in patients with mCNV. To determine the pathogenesis of VEGF in mCNV, further studies are warranted of the local presence and intraretinal expression of VEGF in eyes with mCNV and a comparison of VEGF concentrations in the aqueous humour in patients with high myopia without mCNV.

## Acknowledgements

This study was supported in part by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (#21592255) and a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

## References

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG et al. (1994): Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* **331**: 1480–1487.

Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA & Giust MJ (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **113**: 363–372.

Avia MP, Weiter JJ, Jalkh AE, Trempe CL, Prueitt RC & Schepens CL (1984): Natural history of choroidal neovascularization in degenerative myopia. *Ophthalmology* **91**: 1573–1581.

Blinder KJ, Blumenkranz MS, Bressler NM et al. (2003): Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia: 2-year results of a randomized clinical trial – VIP report no 3. *Ophthalmology* **110**: 667–673.

Chan WM, Lai TY, Chan KP, Li H, Liu DT, Lam DS & Pang CP (2008): Changes in aqueous vascular endothelial growth factor and pigment epithelial-derived factor levels following intravitreal bevacizumab injections for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration or pathologic myopia. *Retina* **28**: 1308–1313.

Chan WM, Lai TY, Liu DT & Lam DS (2009): Intravitreal bevacizumab (Avastin) for myopic choroidal neovascularization: 1-year results of a prospective pilot study. *Br J Ophthalmol* **93**: 150–154.

Degenring RF & Jonas JB (2005): Photodynamic therapy in combination with intravitreal triamcinolone for myopic choroidal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* **83**: 621.

Ergun E, Heinzl H & Stur M (2004): Prognostic factors influencing visual outcome of photodynamic therapy for subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia. *Am J Ophthalmol* **138**: 434–438.

Ferrara N (2004): Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* **25**: 581–611.

Gharbiya M, Allievi F, Mazzeo L & Gabrieli CB (2009): Intravitreal bevacizumab treatment for choroidal neovascularization in pathologic myopia: 12-month results. *Am J Ophthalmol* **147**: 84–93.

Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M & Guyer DR (2004): VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **351**: 2805–2816.

Hera R, Keramidas M, Peoc'h M, Mouillon M, Romanet JP & Feige JJ (2005): Expression of VEGF and angiopoietins in subfoveal membranes from patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* **139**: 589–596.

Hyodo I, Doi T, Endo H, Hosokawa Y, Nishikawa Y, Tanimizu M, Jinno K & Kotani Y (1998): Clinical significance plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer* **34**: 2041–2045.

Ikuno Y, Sayanagi K, Soga K, Sawada M, Tsujikawa M, Gomi F & Tano Y (2009): Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization attributable to pathological myopia: one-year results. *Am J Ophthalmol* **147**: 94–100.

Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, Nakagawa K, Sueishi K & Inomata H (1997): Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **235**: 159–167.

Jonas JB & Neumaier M (2007): Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in exudative age-related macular degeneration and diffuse diabetic macular edema. *Ophthalmic Res* **39**: 139–142.

Konstantinidis L, Mantel I, Pournaras JA, Zografos L & Ambresin A (2009): Intravitreal ranibizumab (Lucentis) for the treatment of myopic choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **247**: 311–318.

Kvanta A, Algvere PV, Berglin L & Seregard S (1996): Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**: 1929–1934.

Kwak N, Okamoto N, Wood JM & Campochiaro PA (2000): VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 3158–3164.

Lam DS, Chan WM, Liu DT, Fan DS, Lai WW & Chong KK (2004): Photodynamic

therapy with verteporfin for subfoveal choroidal neovascularisation of pathologic myopia in Chinese eyes: a prospective series of 1 and 2 year follow up. *Br J Ophthalmol* **88**: 1315–1319.

Lam DS, Leung KS, Mohamed S et al. (2007): Regional variations in the relationship between macular thickness measurements and myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**: 376–382.

Lopez PF, Sippy BD, Lamber HM, Thach AB & Hinton DR (1996): Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**: 855–868.

Noma H, Funatsu H, Yamasaki M et al. (2005): Pathogenesis of macular edema with branch retinal vein occlusion and intraocular levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6. *Am J Ophthalmol* **140**: 256–261.

Rosenfeld PJ, Heier JS, Hantsbager G & Shams N (2006): Tolerability and efficacy of multiple escalating doses of ranibizumab (Lucentis) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **113**: 623.

Salzmann M (1912): Anatomy and histology of the human eye ball in the normal state, its development and senescence (translated by E.V.L. Brown). Chicago: University of Chicago Press.

Sawada O, Kawamura H, Kakinoki M, Sawada T & Ohji M (2007): Vascular endothelial growth factor in aqueous humor before and after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* **125**: 1363–1366.

Tong JP, Chan WM, Liu DT, Lai TY, Choy KW, Pang CP & Lam DS (2006): Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in polypoidal choroidal vasculopathy and choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* **141**: 456–462.

Yoshida T, Ohno-Matsui K, Yasuzumi K, Kojima A, Shimada N, Futagami S, Tokoro T & Mochizuki M (2003): Myopic choroidal neovascularization: a 10 years follow-up. *Ophthalmology* **110**: 1297–1305.

Received on February 24th, 2009.  
Accepted on July 10th, 2009.

*Correspondence:*  
Osamu Sawada  
Department of Ophthalmology  
Shiga University of Medical Science  
Seta Tukiowacho  
Otsu  
Shiga 520-2192  
Japan  
Tel: + 81 775 482 276  
Fax: + 81 775 482 279  
Email: osawada@belle.shiga-med.ac.jp