

令和元年6月1日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20288

研究課題名(和文) CCL3-CCR5ケモカイン経路に着目した網膜変性における新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) CCL3-CCR5 axis is potential therapeutic target in retinal degeneration.

研究代表者

神野 英生 (Kohno, Hideo)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60514536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：網膜変性疾患において重度の視力障害は網膜視細胞の障害によって引き起こされる。今研究において我々はHIV感染症分野において長期投与の実績があるマラビロクの網膜変性への治療応用の可能性について検討した。HIV侵入阻害薬であるマラビロクは長期投与することを前提として作成されたCCR5阻害剤である。我々の過去の検討により網膜変性時にはCCL3やCCL4といったケモカインが上昇しており、網膜変性における重要な働きをしていると考えられる。これらはCCR5を共通レセプターとして使用していることより、マラビロク投与はCCL3やCCL4の働きを抑制し、網膜変性への治療効果が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性(AMD)や網膜色素変性(RP)を含む網膜変性は視細胞死を生じ失明へと直結する疾患群である。近年AMDに対しては滲出性AMDにおける脈絡膜新生血管に対する抗新生血管療法が行われ、一定の治療効果を上げている。しかし脈絡膜新生血管に付随して生じる視細胞死や、脈絡膜新生血管を伴わない萎縮性AMDに対する治療法は依然として存在しない。またRPにおいては臨床使用されている治療法は存在しない。これらの網膜変性疾患群において失明へとつながる視細胞死を防ぐ、もしくは遅らせる治療法を開発することができれば網膜変性の患者に対する恩恵は大きなものになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Severe visual loss in retinal degeneration is caused by photoreceptor cell death. In this study, we investigated the treatment effect of Maraviroc, an antiretroviral drug in the CCR5 receptor antagonist class used in the treatment of HIV infection, in retinal degeneration. We revealed previously that CCL3 and CCL4 are upregulated in degenerated retina, which used CCR5 as common receptor. Maraviroc, an antagonist for CCR5, administration may suppress CCL3 and CCL4 efficacy in degenerated retina and show therapeutic effect for retinal degeneration.

研究分野：眼科学 網膜 炎症

キーワード：マイクログリア 網膜 加齢黄斑変性 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性や網膜色素変性など網膜変性疾患治療における現状と問題点

加齢黄斑変性 (Age related macular degeneration; AMD) や網膜色素変性 (Retinitis pigmentosa; RP) を含む網膜変性は視細胞死を生じ失明へと直結する疾患群である。近年 AMD に対しては滲出性 AMD における脈絡膜新生血管に対する抗新生血管療法が行われ、一定の治療効果を上げている。しかし脈絡膜新生血管に付随して生じる視細胞死や、脈絡膜新生血管を伴わない萎縮性 AMD に対する治療法は依然として存在しない。また RP においては臨床使用されている治療法は存在しない。これらの網膜変性疾患群において失明へとつながる視細胞死を防ぐ、もしくは遅らせる治療法を開発することができれば網膜変性の患者に対する恩恵は大きなものになると考えられる。

網膜局所炎症による視細胞死

我々のグループはこれまでに視細胞死が起こるメカニズムおよび網膜内局所炎症と視細胞死の関連につき研究を重ねてきた。網膜内層に存在するマイクログリアは視細胞由来の蛋白質を Toll-like receptor を介して認識し炎症を発生させることを我々は報告した。近年加齢個体の網膜内において準炎症 (Pala inflammation) と称される軽微な炎症が存在し網膜内より余剰な物質を除去するために有用に働いているが、その炎症が一定の閾値を超え古典的な炎症が発生すると視細胞死を誘導させるという学説が提唱されている (図1)。しかし、いったい何が準炎症と炎症を分けているのか、網膜にとって炎症は敵とも味方ともなりうるのかなど不明な点が多い。視細胞にとって有害な炎症を除去し有益な準炎症のみを存続させることができれば視細胞死を呈する疾患に対する新たな治療戦略となりうる。

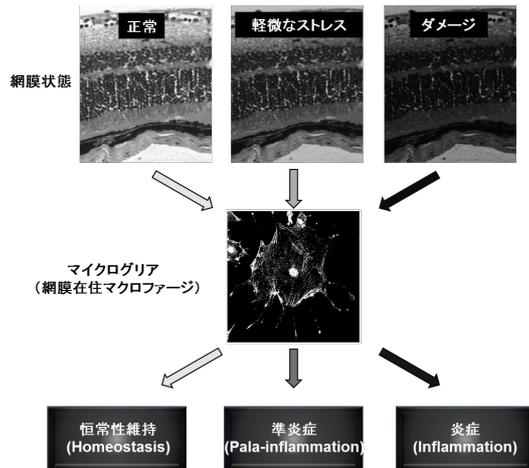


図1: 網膜は準炎症を用いることで効率的に酸化などによるストレスに伴う不純物やダメージを受けた細胞の除去を効率的に行う。しかし炎症の正負バランスが損なわれると視細胞障害を起す古典的炎症が生じる。

網膜変性時のマイクログリアの網膜下腔への遊走

マイクログリアは健常状態では網膜内層に位置し網膜内の恒常性維持に努めている網膜内在性マクロファージである。視細胞死を生じるような病態が発生するとマイクログリアは網膜下腔側へと遊走をはじめダメージを受けた視細胞を貪食除去する (図2)。ダメージを受けたり死亡した細胞が組織内に長期に存在することは発癌や自己免疫の発生に結びつくことが知られており、網膜における癌疾患や自己免疫の発生が比較的まれなのはマイクログリアによる迅速な貪食除去に依存することが大きいと推察される。

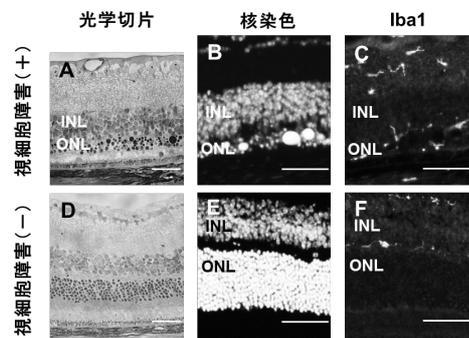


図2: 視細胞障害時の組織所見及びマイクログリアの網膜下腔への遊走。A-C; 光障害により誘導された視細胞障害。D-F; 正常網膜。B,CおよびE,Fは同一切片。Iba1: マイクログリア/マクロファージのマーカー。

しかし、貪食除去すべき不純物が一定の閾値を超えてしまうとマイクログリア由来の炎症が二次的に視細胞障害を引き起こし更なる視機能障害を起こしてしまうと考えられる。このような過大なマイクログリア由来の炎症を抑制する方法を開発することは網膜変性の

みならず視細胞障害を引き起こす疾患全般にわたり適応となる可能性がある。

網膜変性時の網膜内 MIP-1 ケモカイン (CCL3, CCL4) の他のケモカインに先行する上昇

ケモカインはマイクログリアを含む炎症性細胞を局所へと遊走させる働きを持つサイトカイン群である。我々の検討によると光障害誘導急性網膜変性において Macrophage inflammatory protein (MIP)-1 ケモカインに含まれる chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3) および chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4) は他のケモカインに先駆けて上昇した (図 3)。このことはこれら MIP-1 ケモカインが網膜内炎症カスケードの引き金となっている可能性を示唆している。

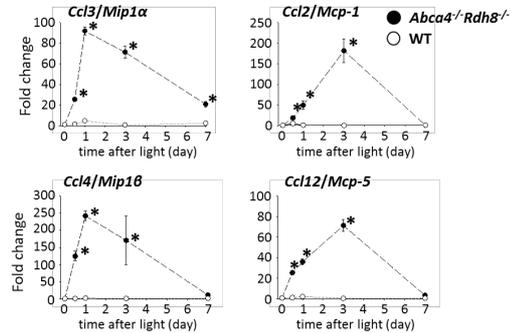


図3: *Abca4*^{-/-}*Rdh8*^{-/-}マウスにおける光照射誘導急性網膜変性時の網膜内ケモカイン発現。Mip-1ケモカインであるCcl3およびCcl4は他のケモカインに先行する上昇を示した。

2. 研究の目的

網膜変性の治療標的として CCL3 および CCL4 の共通レセプターである CCR5 に着目する

Chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5) は CCL3 および CCL4 の共有レセプターである。また、HIV (human immunodeficiency virus) 感染症において HIV に高度に暴露されているにもかかわらず、HIV に感染しないという特異な症例で CCR5 の遺伝子多型 (CCR5 32 欠失) が発見されたことから HIV 感染症治療の創薬ターゲットとして知られている。マラビロクは CCR5 を標的とする抗 HIV 薬である。米国食品医薬品局ならびに欧州医薬品庁にて 2007 年 8 月に世界初の CCR5 阻害薬・経口投与可能な HIV 侵入阻害薬として承認され、本邦においても 2008 年 12 月に CCR5 指向性 HIV-1 感染症に対する治療薬として承認された。我々は CCR5 をマラビロクを用い薬物的に阻害することが網膜変性疾患における治療戦略となりうるのかどうかを今研究にて検討していく。

3. 研究の方法

1) 遺伝的な視細胞死を生じ、網膜色素変性症のモデルである *Mertk*^{-/-}マウスに CCR5 阻害薬であるマラビロクを投与し治療効果を判定する

2) マラビロク投与による網膜内マイクログリアおよび骨髄由来マクロファージへの影響を観察するために遺伝子改変によりマイクログリアに蛍光物質が発現している *Cx3cr1*^{GFP/GFP}マウスおよび末梢マクロファージに蛍光物質が発現している *Ccr2*^{RFP/RFP}マウスと *Mertk*^{-/-}マウスを配合させて *Mertk*^{-/-}*Cx3cr1*^{GFP/+}*Ccr2*^{RFP/+}マウスを作成する。

3) *Mertk*^{-/-}*Cx3cr1*^{GFP/+}*Ccr2*^{RFP/+}マウスにマラビロクを投与することにより CCR5 阻害によるマイクログリアおよびマクロファージに対する影響を *in vivo*にて観察する。

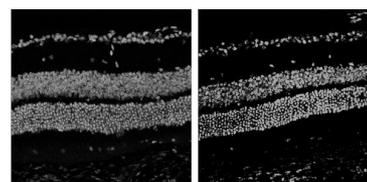
CCR5 阻害薬であるマラビロクを投与し阻害し CCL3-CCR5 ケモカイン経路を抑制することで網膜変性に対する治療効果を検討する

我々はこれまでにビジュアルサイクル関連遺伝子異常により網膜変性を生じる *Abca4*^{-/-}*Rdh8*^{-/-}マウスおよびファゴサイトーシス関連遺伝子異常により網膜変性を生じる *Mertk*^{-/-}マウスをもちいて網膜変性における CCL3 の役割を検討した。*Ccl3*^{-/-}マウスを用いた配合により *Ccl3*^{-/-}*Abca4*^{-/-}*Rdh8*^{-/-}マウスおよび *Ccl3*^{-/-}*Mertk*^{-/-}マウスを作成し網膜変性の表現型を比較した結果、慢性的な経過を示す加齢網膜変性においては *Ccl3*^{-/-}*Abca4*^{-/-}*Rdh8*^{-/-}マウスおよび *Ccl3*^{-/-}*Mertk*^{-/-}マウス双方においてそれぞれ *Abca4*^{-/-}*Rdh8*^{-/-}マウスおよび *Mertk*^{-/-}マウスより網膜変性は軽症化した。しかし、急性の経

過を示す光障害誘導網膜変性においては *Ccl3^{-/-}Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}* マウスは *Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}* マウスよりも重度の網膜変性を呈した。光照射後の *Ccl3^{-/-}Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}* マウスにおいて *Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}* マウスよりも高度な CCL4 の網膜内上昇を認めため、CCL4 の上昇が *Ccl3^{-/-}Abca4^{-/-}Rdh8^{-/-}* マウスにおける急性網膜変性を悪化させた原因であると考えられた。これらの結果より CCL3 を網膜変性の治療ターゲットとすることは病態によっては CCL3 と同様の作用を持つ MIP-1 ケモカインである CCL4 を代償性に上昇させてしまい網膜変性を悪化させてしまう危険性を内包することを示唆している。そこで今研究において我々は CCL3 および CCL4 の共有レセプターである CCR5 に着目した。CCR5 を阻害する方法は「研究目的」に上述したように HIV 感染症分野において深く検討されずすでに臨床応用されている。CCR5 阻害剤であるマラビロクを網膜変性マウスに投与することにより網膜変性に対する治療効果を検討していく。

4. 研究成果

代表研究者神野が平成 25-26 年度科学研究費助成事業「研究課題名；網膜変性における炎症をターゲットとした新規治療戦略の解明」にて作成したマイクログリア/マクロファージ可視化網膜変性モデルマウスである *Mertk^{-/-}Cx3cr1^{GFP/+}Ccr2^{RFP/+}* マウスに CCR5 阻害薬であるマラビロクを投与し、その網膜表現型を観察した。現時点ではマラビロクの投与方法や、投与量、投与期間などを変えて検討を行っている最中である。4 週齢から 6 週齢までの 14 日間のマラビロク投与においては網膜下腔へ遊走するマイクログリアの細胞数には有意差を認めないものの、外顆粒層の核数がマラビロク投与群において保持されている傾向があり、マラビロク投与における網膜変性の軽症化の可能性が示唆された(図 4)。現在培養細胞に対するマラビロク投与など、マラビロクによるマイクログリアへの影響も検討している。



マラビロク投与 PBS投与
図4: マラビロク投与群とPBS投与群の比較。網膜下腔へ遊走するマイクログリアの細胞数は両群で同程度であったが、外顆粒層の核数はマラビロク投与群にて保持されており、網膜変性の軽症化が示唆された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. **Kohno H**, Koso H, Okano K, Sundermeier TR, Saito S, Watanabe S, Tsuneoka H, Sakai T. Expression pattern of *Ccr2* and *Cx3cr1* in inherited retinal degeneration. *J Neuroinflammation*. 2015;12:188.
2. Sakai T, Okano K, **Kohno H**, Tsuneoka H. Three-year visual outcomes of intravitreal ranibizumab with or without photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Acta Ophthalmol*. 2016;94:e765-e771.
3. 眼科医の手引・網膜におけるマイクログリアと変性疾患. **神野英生**. 日本の眼科 89:906-907;2018.
4. マイクログリアとマクロファージ 網膜変性にて炎症を引き起こし視細胞死を促進する2つの貪食細胞. 平成 28 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞総説論文. **神野英生**. 日本眼科学会雑誌 121:815-828;2017.
5. 網膜変性における炎症と視細胞-細胞死の関係. **神野英生**. 日本眼炎症学会誌. 18: 4-12;2016

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 後囊破損・核落下. 第 42 回日本眼科手術学会学術総会 インストラクションコース 19 白内障術中、術後合併症に対する硝子体手術(横浜 2019 年 2 月 3 日)
2. 硝子体内注射後感染. 第 42 回日本眼科手術学会学術総会 教育セミナー10 術後眼内炎のマネージメント(横浜 2019 年 2 月 2 日)
3. ぶどう膜炎診療における最近の動向 ~ 慈恵医大ぶどう膜炎外来での話題を中心に ~. 第 34 回慈恵医大柏病院症例検討会 特別講演(千葉 2018 年 6 月 21 日)

4. 慈恵医大本院での網膜・黄斑・ぶどう膜炎疾患の最近のトレンド. 第 26 回愛宕眼科臨床研究会 特別講演(東京 2018 年 3 月 14 日)
5. ぶどう膜炎、黄斑疾患分野の慈恵医大本院での最近の動向. 第 544 回慈眼会 教育講演(東京 2018 年 2 月 25 日)
6. 遺伝性網膜変性における Ccr2 および Cx3cr1 の発現様式. 第 121 回日本眼科学会総会 日本眼科学科学術奨励賞記念講演 (東京 2017 年 4 月 8 日)
7. 硝子体内注射. 第 40 回日本眼科手術学会学術総会 教育セミナー11 網膜硝子体の感染(東京 2017 年 1 月 28 日)
8. OCT angiography を用いた AMD 診療の検討. AMD Update Seminar (東京 2016 年 10 月 25 日)
9. 網膜変性疾患における炎症の関与～マイクログリアに関する話題を中心に～. 第 3 回大田網膜疾患セミナー(東京 2016 年 6 月 18 日)
10. 網膜変性疾患における炎症の関与. 第 120 回日本眼科学会総会 シンポジウム「眼炎症性疾患におけるトランスレーショナルリサーチ」(仙台 2016 年 4 月 7 日)
11. 網膜変性における炎症と視細胞細胞死の関係. 第 49 回日本眼炎症学会 学術奨励賞記念講演.(大阪,2015 年 7 月 11 日)

〔図書〕(計 2 件)

1. 突発性の炎症 / Posner-Schlossman 症候群. **神野英生**, 園田康平編. シリーズ総編集大鹿哲郎, 大橋裕一. 眼科診療ビジュアルラーニング 2 眼炎症. 中山書店: P.182-185; 2018.
2. 急性網膜壊死. **神野英生**, 飯田知弘, 近藤峰生, 石龍鉄樹編. 眼底疾患パーフェクトアトラス: 文光堂: P.230-231; 2017.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。