

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670230

研究課題名(和文) 抗アレルギー治療は滲出型加齢黄斑変性に対する新たな治療法になりえるのか？

研究課題名(英文) Therapeutic potential of anti-allergic drugs for the treatment of age-related macular degeneration

研究代表者

兼子 裕規 (Kaneko, Hiroki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20647458

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)：加齢黄斑変性(AMD)は中途失明の原因疾患として重要な疾患である。現在滲出型AMDに対して血管内皮増殖因子(VEGF)をターゲットとした抗VEGF抗体の投与が一定の治療効果をあげている一方、新たな治療法も待たれている。我々はHRH4受容体拮抗薬が脈絡膜新生血管(CNV)の発生に及ぼす影響を検討した。滲出型AMD患者から採取したCNVの組織切片を抗HRH4抗体で免疫染色したところ、HRH4の発現が確認された。Hrh4ノックアウトマウス・野生型マウスにHRH4受容体拮抗薬を投与した眼球では、laser誘発CNVが有意に減少していたことから、HRH4はAMDの新規治療ターゲットとなると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the therapeutic efficacy of reducing histamine receptor h4 (HRH4) expression in choroidal neovascularizations (CNVs) for the treatment of age-related macular degeneration (AMD). Human HRH4 was confirmed only in CNV samples from AMD patients and not in the other subretinal tissues. Mouse HRH4 was expressed in the retinal pigment epithelium (RPE) only after inducing laser-CNV in wild-type mice, and it was co-localized with the macrophage marker F4/80. Laser-CNV volume was reduced in Hrh4^{-/-} mice compared with that in wild-type mice, and JNJ777120 successfully suppressed laser-induced CNV volume and pathological CNV leakage in wild-type mice. The eyes injected with JNJ777120 did not show retinal degeneration. HRH4 was expressed in macrophages that accumulated around CNVs. Suppressing HRH4 expression led to the prevention of pathological vessel leakage without showing retinal toxicity, indicating that HRH4 has potential as a novel therapeutic target in AMD.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 ヒスタミン受容体 脈絡膜新生血管 抗血管新生 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration: AMD) は先進国の失明原因の第1位の疾患である。AMD は大きく滲出型 (wet AMD) と萎縮型 (dry AMD) に分けられ、特に日本では wet AMD が多い。Wet AMD の原因は脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization: CNV) である。この CNV が網膜下に侵入し神経網膜が障害を受けると視力が著しく低下する。私はこれまで AMD を主に専門として研究しており、AMD と DICER1 の関連 (Kaneko H, et al. Nature 2011) や炎症との関与 (Tallaro V, Kaneko H, et al. Cell, 2012) を報告してきた。現在は米国より帰国し、新たに自身の実験を遂行中である。以前より wet AMD の治療法として抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 薬の眼内注射が一定の治療成績をおさめている。しかし実際には、抗 VEGF 抗体は数ヵ月中にその効果を失い、その都度 CNV は再発する。

2. 研究の目的

今日、多くの研究者が、抗 VEGF 治療以外の新たな治療法を検索中である。興味深いことに過去に私の所属した研究チームは、アレルギーに関連するケモカイン受容体の一つである CCR3 が CNV に発現しており、この CCR3 を抑制することで CNV の増殖を抑えられるという報告をした。(Takeda A, Kaneko H, et al. Nature 2009) しかし抗 CCR3 治療は内服薬で結果を出すことが困難で臨床応用へ多くの課題が残っている。今回私が自身の予備実験で発見した AMD に対する抗ヒスタミン受容体 4 (H4R) 治療の可能性とそのメカニズムを明らかにし、未だ行われない内服での AMD 治療へ挑戦したいと考えた。

3. 研究の方法

人間の眼球内でも H4R の発現を確認するつもりであるが、日本では実験用の眼球を入手することは困難な状況である。そこで、人眼はアメリカのアイバンクから研究目的で購入する。Tampa Eye Bank はドナーの病歴を管理しており、特定の疾患を既往歴に含む眼球を提供することができる。そこで、Tampa Eye Bank から正常眼と AMD 眼を購入した。長時間輸送に伴うサンプルの劣化に関しては、保存液として RNA later (Qiagen) を使用すれば空輸でも眼球の RNA・タンパクが保存され、日本到着後の実験に使用した。

マウス・人間の眼球で H4R 発現局在を確認する。

まず眼球内のどの細胞で H4R が発現しているか確認した。野生型マウスの無治療眼・laser CNV 作成眼から採取した組織を用いて Northern blotting を行い、RNA レベルでの H4R の存在を確認した。またマウス眼球を摘出後切片を作成し免疫染色を行い、眼球内の

どの細胞が H4R を発現しているか確認した。また予備実験では laser CNV 作成前後での H4R 発現を蛋白レベルまで確認しているの、更にリアルタイム PCR を施行し mRNA レベルでも発現の変化を確認した。

H4R ノックアウト (H4R^{-/-}) マウスに laser CNV を作成し新生血管抑制効果の有無を確認する。

予備実験では抗 H4R 薬投与眼での laser CNV の体積減少を確認した。しかしこれだけでは薬剤による二次的な影響があった可能性は否定できない。そこで Johnson & Johnson Inc. の許可を得て Jackson Laboratory で管理されている H4R^{-/-} マウスを名古屋大学医学部動物実験施設で飼育した。

H4R^{-/-} マウスと対照マウス (H4R^{+/+}) に laser CNV を作成し、得られた網膜サンプルを用いて血管新生関連因子がどのように関連しているか網羅的に解析する。

アレルギー関連因子と新生血管関連因子には大きな隔たりがあり、laser CNV から得られたサンプルから仮に一つの因子 (例えば VEGF など) のタンパクや mRNA を調べても、その因果関係は明らかにすることは到底できない。そこで、H4R^{-/-} マウスと H4R^{+/+} マウスに laser CNV を作成したのち網膜を採取して real-time PCR array を行い、血管新生に関連する多くの因子の発現の差を網羅的に解析した。

H4R^{-/-} マウスの網膜機能を分析し、H4R 抑制による毒性の有無を確認する。

抗 H4R 治療を臨床応用に進めるためには、その網膜毒性が無い事を確認する必要がある。そこで、H4R^{-/-} マウスもしくは抗 H4R 抗体を投与した野生型マウスの眼底写真を撮影し、網膜変性の有無を確認した。また網膜切片を作成し、網膜構造が正常であるか確認した。また我々は生きた動物の網膜機能を網膜電図で測定することが可能であるため、これらマウスの網膜電図を測定し、対照群と比較して視細胞から得られる波形が減少していないか確認した。

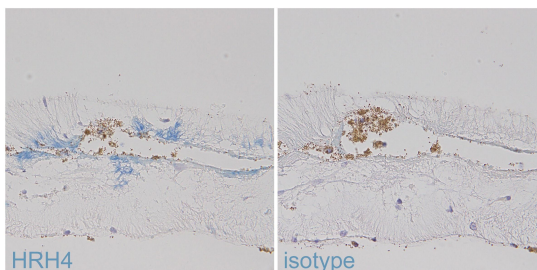
抗 H4R 薬を長期間内服させ、laser CNV の抑制が内服治療でも得られるか検討する。

臨床応用を考慮した場合、AMD 患者の痛みや負担の軽減は是非とも重要視すべき点である。そこで、痛みを伴う眼内注射に替わる治療法として内服治療の可能性を検討した。具体的にはマウス飲料水に抗 H4R 薬を溶解させ laser CNV を作成し、通常飲料水を飲んだマウスの CNV と体積を比較し、内服でも血管新生抑制効果が得られるか検討した。CNV の比較は体積測定だけでなく、造影剤を使用したマウス蛍光造影眼底検査を行い、作成された CNV からの蛍光色素の漏出をスコア化し比較した。これによって新生血管の透過性も比較

検討することができた。

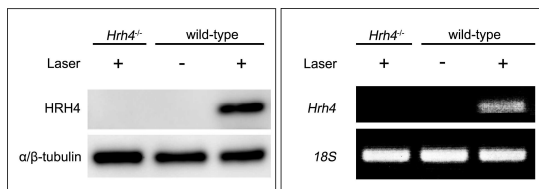
4. 研究成果

HRH4 は、wetAMD 患者から手術中に採取された組織の免疫染色で、脈絡膜新生血管(CNV)に発現していることが確認された。



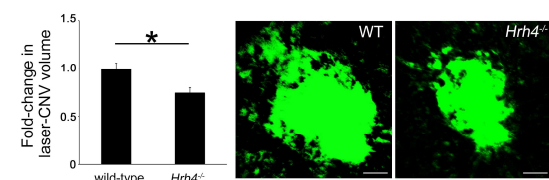
(図1)

また、マウス眼底にレーザー照射することによって人工的に作成されたCNV(laser-CNV)にも発現することが確認された。



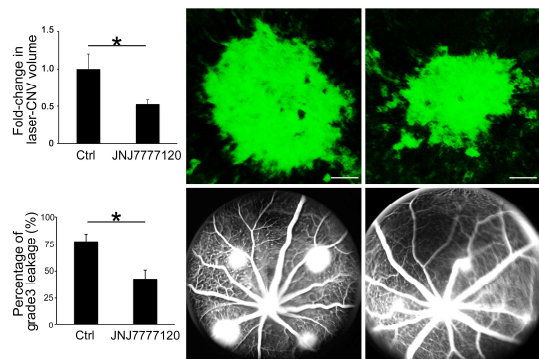
(図2)

HRH4 の遺伝子を欠損するマウス (*Hrh4*-KO マウス)では、laser-CNV が野生型マウスのそれに比べて有意に小さいことが確認された。



(図3)

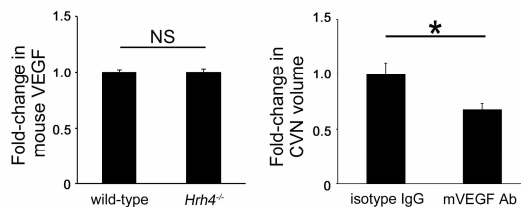
また、HRH4 受容体拮抗薬である JNJ777120 を眼内に投与しても、CNV が対照群に比べて有意に抑制され、さらに振る俺セイン蛍光眼底造影検査でも蛍光漏出が有意に抑制することが確認された。



(図4)

さらに、野生型マウスと *Hrh4*-KO マウスに laser-CNV を作成し、抗血管内皮増殖因

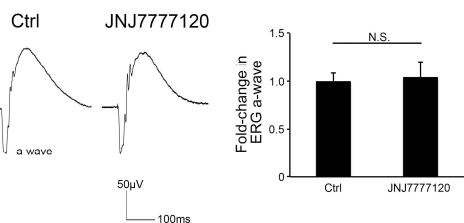
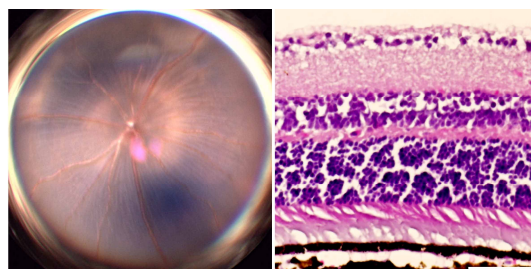
子(VEGF)発現量を調べたところ、両者には有意差がないことが確認された。



(図5)

これらのことから、HRH4 は VEGF を介さない機構によって CNV 産生に参与しており、この HRH4 を治療ターゲットとすることで、さらに CNV 抑制効果が期待できることが確認された。

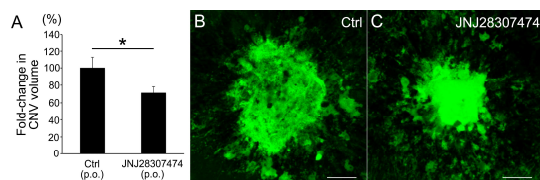
また、本研究で使用した HRH4 受容体拮抗薬を大量にマウス眼球内に投与しても、組織学的にも機能的も低下しないことが確認された。



(図6)

これらの報告をまとめ、British Journal of Pharmacology (2014)に報告した。

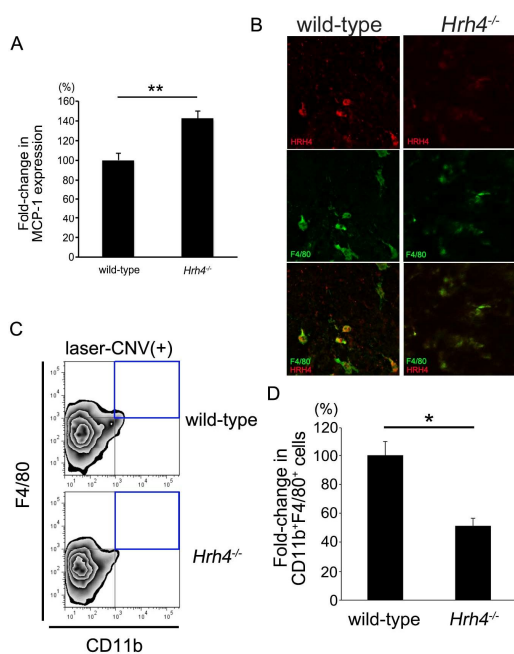
さらに、他疾患に対する研究として、HRH4 受容体拮抗薬を内服投与して効果を検討している報告があるため、我々も半減期の長い HRH4 受容体拮抗薬を用いてマウス laser-CNV が抑制されるかを検討した。その結果、HRH4 受容体拮抗薬によっても laser-CNV が有意に抑制されることが確認された。



(図7)

HRH4 を発現する細胞は主にマクロファージと考えられた。この考察は、フローサイトメトリーによる分析と網膜色素上皮の

フラットマウントを用いた免疫染色によって得られた。



(図8)

現時点での問題点は、マクロファージのみが HRH4 を発現するか。また、薬剤によって HRH4 受容体拮抗薬を内服投与した際に、体の他の臓器に悪影響を与えるか否かと考えられた。

これらの研究結果を Translational Vision Science & Technology (2015)に報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(全て査読あり)

1. Ijima R, Kaneko H, Ye F, Takayama K, Nagasaka Y, Kataoka K, Funahashi Y, Iwase T, Kachi S, Kato S, Terasaki H “Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by the oral medicine targeting histamine receptor h4 in mice” Transl Vis Sci Technol. 2015 Mar 10;4(2):6

2. Kaneko H, Ye F, Ijima R, Kachi S, Kato S, Nagaya M, Higuchi A, Terasaki H

“Histamine receptor h4 as a new therapeutic target for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration”

Br J Pharmacol, 2014 Aug;171(15):3754-63

〔学会発表〕(計 4 件)

1. “A new therapeutic target in age-related macular degeneration” Asia-ARVO 2015, Symposium, Molecular Mechanisms in Age-related Macular Degeneration

Speaker: Hiroki Kaneko

Yokohama, Japan, 2015/2/17

2. 第35回 日本炎症・再生医学会 第1回 日本骨免疫会議 沖縄県名護市 万国津梁館

兼子裕規、高山圭、叶福相、伊島亮、加地秀、加藤省一、長屋匡俊、樋口暁子、寺崎浩子：ヒスタミン H4 受容体をターゲットとした滲出型加齢黄斑変性の治療 (ポスター) 2014.7.2

3. Histamine Receptor H4 as a New Therapeutic Target for Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration

Fuxiang Ye, Hiroki Kaneko, Ryo Ijima, Shu Kachi, Seiichi Kato, Masatoshi Nagaya, Akiko Higuchi, Hiroko Terasaki.

ARVO Annual Meeting 2014, Orlando, FL, USA 2014/5/6

4. Anti-histamine receptor h4 treatment reduced choroidal neovascularization independent of vascular endothelial growth factor

Ryo Ijima, Hiroki Kaneko, Fuxiang Ye, Shu Kachi and Hiroko Terasaki

ARVO Annual Meeting 2014, Orlando, FL, USA 2014/5/4

6. 研究組織

(1)研究代表者

兼子 裕規 (Hiroki, KANEKO) 名古屋大学・大学院医学系研究科・助教 研究者番号：20647458

(2)研究分担者

加地 秀 (Shu, KACHI) 名古屋大学・医学部附属病院・講師 研究者番号：30345904