

令和元年6月3日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11294

研究課題名(和文) ケモカイン受容体を標的にした眼内血管新生制御機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Chemokine receptor as therapeutic target in ocular angiogenesis

研究代表者

野崎 実穂 (Nozaki, Miho)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00295601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ケモカイン受容体の一つであるCCR3に着目してマウス酸素誘導網膜症(OIR)モデルを用いた。OIRマウス網膜でCCR3およびそのリガンドであるeotaxinが有意に増加しており、CCR3抗体の硝子体内投与により病的な血管新生が有意に抑制された。病的血管新生に關するVEGF164 mRNAはCCR3抗体投与により有意に減少していたが、生理的血管新生に關するVEGF120 mRNAは変化なかった。

また、手術時に摘出した増殖糖尿病網膜症症例の増殖膜には、CCR3およびeotaxinが血管内皮細胞に発現していた。以上のことからCCR3は病的網膜血管新生の治療ターゲットになると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症は成人の、未熟児網膜症は小児の失明原因となる疾患で社会的問題である。両者の病態は病的な網膜血管新生であり、現在血管内皮増殖因子(VEGF)を標的にした治療が主流となっているものの、網膜の恒常性維持にもVEGFは關与しているため、特に小児に対するVEGF阻害による長期の副作用など危惧される点が多い。本研究では、ケモカイン受容体CCR3およびそのリガンドが病的網膜血管新生に關与していること、CCR阻害により病的血管新生に關するVEGF164は阻害するが生理的VEGF120には影響がないことが明らかとなり、CCR3阻害治療が、より安全な病的血管新生薬になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the efficacy of anti-CCR3 treatment in mouse oxygen-induced retinopathy model. In OIR mouse retina, CCR3 and eotaxin were significantly up-regulated. And intravitreal injection of anti-CCR3 antibody suppressed retinal neovascularization, and VEGF 164 mRNA but not VEGF120 mRNA.

We also studied the fibrovascular membrane which was surgically excised during vitrectomy in proliferative diabetic retinopathy eyes. In vascular endothelial cells, CCR3 and eotaxin were found in the fibrovascular membrane, but not in epiretinal membrane.

From our studies, we demonstrated that CCR3-eotaxin pathway contributes to retinal angiogenesis, and that anti-CCR3 antibody treatment suppressed retinal neovascularization. Anti-CCR3 treatment may have potential as a new therapy for proliferative retinopathies such as diabetic retinopathy and retinopathy of prematurity.

研究分野：眼科学

キーワード：ケモカイン受容体 CCR3 増殖糖尿病網膜症 未熟児網膜症 eotaxin VEGF

1. 研究開始当初の背景

成人の主要な失明原因である糖尿病網膜症、(滲出型)加齢黄斑変性症(AMD)の本態は、眼内における病的な血管新生である。眼内血管新生には、血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)が関与しており、現在 VEGFを標的とした薬物療法が主流となっているが、治療効果が限定的な事に加えて、治療を行っても再発する。そのため、頻回の抗 VEGF硝子体注射が必要であり、注射にまつわる合併症の問題以外に、医療経済の圧迫も招くなど社会的な問題となっており、糖尿病網膜症、AMDに対する VEGFとは異なる標的に対する新たな治療法の開発が喫緊の課題となっている。VEGFは、生理的に眼内に存在し、神経保護作用を持っていることが知られており (Nishijima K et al, *Am J Pathol*, 2007)、網膜色素上皮細胞 (Retinal Pigment Epithelial cells, RPE)に存在する VEGFは正常な脈絡膜毛細血管板発生に関与している(Marneros AG et al, *Am J Pathol*, 2005)。最近の報告では、頻回の抗 VEGF治療により、網膜色素上皮細胞(RPE)の萎縮が引き起こされ、萎縮型 AMDに至る症例も多くみられ(Bhisitkul RB et al, *Am J Ophthalmol*, 2015)、長期にわたる VEGF抑制が、今まで考えられなかった眼副作用につながる事が明らかとなってきた。このような背景から、VEGF抑制とは別の観点からの新たな糖尿病網膜症・AMD治療法の開発が求められている。

我々は、今までに、マウスレーザー脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV)モデルを用い、CNV発症に接着分子、マクロファージが大きく関与していること、炎症細胞関連のケモカインに CNV促進作用があることを明らかにしてきた (Nozaki M et al: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006)。また炎症に関与するケモカイン受容体のひとつである CCR3はアレルギー性疾患の治療ターゲットとして今まで注目されてきたが、CCR3を抑制することにより、病巣に浸潤するマクロファージ数に変化はないものの CNVを抑制できること、その経路が VEGF抑制を伴わないことを明らかにした (Takeda A, Nozaki M et al, *Nature* 2009)。さらに、我々は CCR3阻害剤経口投与でも、CNVを抑制できること、CCR3阻害剤投与により血管内皮細胞増殖が抑制されること、さらに眼内の総 VEGF発現量には変化がみられないものの、VEGFアイソフォームの変化を誘導し、VEGF164の発現を抑制し、VEGF121の発現を増加させることを明らかにした(Mizutani T, Nozaki M et al, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013)。VEGF164は病的血管新生に関与する一方、VEGF120は神経保護や生理的な機能維持に関与すると言われている。現在臨床で主に用いられている抗 VEGF治療法は、VEGF全アイソフォームを抑制するものであり、そのために RPEの萎縮や脳梗塞、高血圧といった眼・全身副作用がおこると考えられている。この点からも、ケモカイン受容体抑制により、選択的に VEGFを抑制する CNV治療法開発は、臨床的にも有効であると思われる。さらに最近、我々は酸素誘導網膜症(Oxygen-Induced retinopathy, OIR)マウスを用いて、網膜における病的血管新生においても、CNVと同様にケモカイン受容体に関与していることをみいだした。これらの成果をふまえ、本研究では、CNVモデルのみならず網膜血管新生モデルも用い、ケモカイン受容体を標的にした眼内病的血管新生の制御機構を解明し新たな治療法の確立に挑む。

2. 研究の目的

抗血管内皮増殖因子(VEGF)治療が、眼内に病的血管新生を来す疾患 (加齢黄斑変性症、糖尿病網膜症) に対して主流となっているが、医療経済の圧迫、眼・全身副作用の点からも、新たな治療法の開発が社会的にも望まれている。我々は、脈絡膜新生血管マウスモデルを用いて、ケモカイン-ケモカイン受容体が血管新生発生に関与していること、ケモカイン制御による血管新生抑制では、VEGF発現量には変化はないものの、発現する VEGFアイソフォームの変化を誘導することを明らかにした。本研究では、眼内病的血管新生発症メカニズムにおけるケモカイン受容体の下流シグナルをさらに解明し、ケモカイン受容体制御を標的にした、生理的に必要な VEGFには影響のない新規眼内血管新生制御薬の開発をめざすものである。

3. 研究の方法

網膜病的血管新生をきたすモデルとして、マウス酸素誘導網膜症 (oxygen-induced retinopathy; OIR)モデルを用い、CCR3およびそのリガンド、VEGF120および VEGF164を経時的に RT-PCRおよび ELISAを用いて検討した。また、硝子体手術時に得られた増殖糖尿病網膜症患者の増殖膜、対照として網膜前膜手術時に得られた網膜前膜、絶対緑内障で眼球摘出した網膜を用いて、CCR3と eotaxinの発現を免疫染色で検討した。

4. 研究成果

(1) OIRモデルにおける CCR3の発現

網膜における病的血管新生を促すモデルとして、酸素誘導網膜症(OIR)モデルを作成し使用した。具体的には、新生児マウスを日齢 7(p7)に、75%酸素ボックス内で5日間母マウスとともに保育し、日齢 12(p12)に通常酸素濃度に戻し、血管新生が最も旺盛となる日齢 17(p17)に眼球を摘出し評価を行い、通常酸素濃度の同日齢のマウスを対照とした。経時的に眼球から網膜を分離し、発現しているケモカインについて RT-PCRを用いて検討したところ、日齢 12で、OIRマウスの網膜で CCR3mRNAが有意に増加しており、日齢 14で、病的血管新生に関与すると考えられている VEGF164mRNAが有意に増加していた。いっぽうで、生理的血管新生に関与するといわれているVEGF120mRNAについては日齢

24で OIRマウスでやや増加傾向ではあったが、コントロールと比べてどの時点でも、有意な差はみられなかった。次に、CCR3のリガンドである、eotaxin(CCL11)と、RANTESについて ELISAで検討したところ、RANTESは ELISAの検出限界以下であった。VEGFタンパクと eotaxinは、ともに、日齢 10-12では OIRの網膜では有意に低下していたが、日齢 14-17では逆に有意に増加しており、同じ VEGFと eotaxinの発現動向は同じであり、同じ上流シグナルが関与していることが示唆された。

(2)CCR3抗体の血管新生抑制効果 OIRモデルマウスを用いてケモカイン受容体 CCR3抗体投与による治療効果について検討した。日齢 12および 14に CCR3抗体を硝子体内に投与することにより、病的な血管新生は有意に抑制されており、VEGF164mRNAも有意に抑制されていたが、VEGF120mRNAは有意な抑制はみられなかった。また炎症性サイトカイン MCP-1も、CCR3抗体により抑制されていなかった。

(3) 増殖糖尿病網膜症の増殖膜におけるCCR3 の発現

増殖糖尿病網膜症症例8例と網膜前膜症例4例について手術時の摘出組織に対して以下の免疫組織化学的検討を行った。増殖糖尿病網膜症症例の手術時に摘出した線維血管増殖膜におけるCCR3 の発現を免疫組織学的に検討したところ、血管内皮を染色するvon Willebrand factor (vWF) 抗体と共染色性を8例全例示した。対象として網膜前膜で同様の検討をしたところCCR3の発現は4例ともみられなかった。

次に糖尿病眼ではない対照眼として、絶対緑内障で眼球摘出を行った網膜でvWF およびCCR3抗体で二重染色をしたところ、非糖尿病眼ではCCR3 は網膜血管内皮に発現していなかった。Eotaxin-1 (CCL11)が、血管内皮のCCR3 に結合して血管内皮増殖を促進させるという報告があるため、eotaxin-1 (CCL11)の発現も、同様に増殖糖尿病網膜症の線維血管増殖膜で検討したところ、血管内皮に認められた。以上のことからCCR3 は正常網膜血管内皮には存在していないが、血管新生をきたした血管内皮には発現していたことから、CCR3 は正常網膜血管に対する副作用の恐れはなく、網膜血管新生の治療ターゲットになると考えられた。

CCR3拮抗剤は、現在アメリカで滲出型加齢黄斑変性に対する内服薬として治験(第II相)が始まっており、我々の研究から、加齢黄斑変性以外の増殖糖尿病網膜症、未熟児網膜症といった網膜血管新生疾患にも有効な可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Hirahara S, Nozaki M, Ohbayashi M, Hasegawa N, Ozone D, Ogura Y : Suppression of Retinal Neovascularization by Anti-CCR3 Treatment in an Oxygen-Induced Retinopathy Model in Mice. *Ophthalmic Res.* 2017; 58(1):56-66. 査読有り

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計 0件)

[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：小椋祐一郎

ローマ字氏名：Yuichiro Ogura

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70191963

研究分担者氏名：安川 力

ローマ字氏名：Tsutomu Yasukawa

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：00324632

研究分担者氏名：平原 修一郎
ローマ字氏名：Shuichiro Hirahara
所属研究機関名：名古屋市立大学
部局名：・大学院医学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：00723462

※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。