

主論文の要旨

**Suppression of Laser-Induced Choroidal  
Neovascularization by the Oral Medicine  
Targeting Histamine Receptor H4 in Mice**

〔 ヒスタミン受容体 H4 を標的とした内服薬による  
マウスレーザー誘発脈絡膜新生血管の抑制 〕

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

(指導：寺崎 浩子 教授)

伊島 亮

## 【緒言】

加齢黄斑変性 (AMD) は先進国の中途失明の原因として非常に重要な疾患である。現在、滲出型 AMD (wet-AMD) に対しては血管内皮増殖因子 (VEGF) を標的とした抗 VEGF 抗体の眼内投与が一定の治療効果をあげている一方、度重なる治療による感染の危険性や網脈絡膜の萎縮などの副作用も懸念され、新たな治療法が待たれている。

ヒスタミン受容体 H4 (HRH4) は 2000 年に新規同定された受容体で、血球系細胞、神経細胞や血管内皮細胞に発現しているとされる。そこで、本研究では HRH4 がマウスレーザー誘発脈絡膜新生血管 (レーザーCNV) に与える影響および HRH4 受容体拮抗薬内服によるレーザーCNV 抑制効果について実験を行った。

## 【対象および方法】

HRH4 ノックアウト (KO) マウスは Janssen Research & Development, LLC から譲り受けたものを使用した。野生型マウスは C57BL/6J を購入、いずれも週齢 6 から 8 週の雄を用いた。過去の数多くの報告と同様に wet-AMD モデルとしてレーザーCNV モデルを使用した (マウス眼底にレーザー照射し脈絡膜新生血管を誘導、7 日後のレーザーCNV のサイズを測定)。HRH4 のリガンドに関する実験ではレーザー照射後ヒスタミン (5, 10, 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) を day0, 1, 2, 3 でマウス硝子体内に注入し、1 週間後にレーザーCNV のサイズを計測した。

HRH4 を介した血管新生とマクロファージの関連を調べるため、マクロファージを無効化するクロドロン酸リポソームをマウスに腹腔内注射 (100  $\mu\text{l}$ , day-3, 0) し、レーザー照射直後と day3 に HRH4 アンタゴニスト JNJ7777120 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) または DMSO/PBS を硝子体内に投与した群のレーザーCNV のサイズを 1 週間後に計測、クロドロン酸リポソーム、JNJ7777120 いずれも投与していない対照群と比較した。さらに、レーザー後 3 日目の網膜色素上皮・脈絡膜組織の MCP-1 の発現を ELISA 法で、マクロファージ数を F4/80 抗体、CD11b 抗体を用いた flow cytometry で測定し野生型マウスおよび HRH4KO マウスで比較した。また野生型マウスおよび HRH4KO マウスに対するレーザー後 7 日目に HRH4 抗体と F4/80 抗体を用いてフラットマウントの免疫染色を行い、レーザーCNV 周辺の HRH4 とマクロファージの分布を比較した。

HRH4 受容体拮抗薬内服実験では長時間作用型 HRH4 アンタゴニストである JNJ28307474 を野生型マウスに 5 日間経口投与し (20 mg/kg/day) レーザーCNV サイズを対照群と比較した。

## 【結果】

複数の濃度でヒスタミンを眼内に投与したが、すべての群と対照群でレーザーCNV サイズに有意差はみられなかった。(対照群:  $1.00 \pm 0.09$  n=9 5  $\mu\text{g}$  投与群:  $1.05 \pm 0.07$  n=9 10  $\mu\text{g}$  投与群:  $1.00 \pm 0.09$  n=9 50  $\mu\text{g}$  投与群:  $1.06 \pm 0.12$  n=9) (P=0.91) (Fig 1)

クロドロン酸リポソームでマクロファージを無効化した群では、JNJ7777120 の投与の有無でレーザーCNV サイズに変化はみられなかった。(クロドロン酸リポソーム

+JNJ7777120 投与群:  $0.75 \pm 0.03$  n=10 クロドロン酸リポソーム+DMSO/PBS 投与群:  $0.78 \pm 0.03$  n=10 ) (P=0.68) (Fig 2)

一方でクロドロン酸リポソームと JNJ7777120 いずれも投与していない群と比較すると有意にレーザーCNV サイズは小さかった。(対照群:  $1.00 \pm 0.07$  n=12 クロドロン酸リポソーム+JNJ7777120 投与群:  $0.75 \pm 0.03$  n=10) (P=0.012) レーザー照射後の網膜色素上皮・脈絡膜組織における MCP-1 計測では HRH4KO マウス ( $1.42 \pm 0.08$  n=8) は野生型 ( $1.00 \pm 0.07$  n=8) (P=0.005) と比べて有意に高値を示した。レーザーCNV の周辺組織において野生型マウスで HRH4、F4/80 共陽性の細胞がみられる一方で HRH4 陰性、F4/80 陽性となる細胞もみられた。また flow cytometry では F4/80、CD11b 共陽性のマクロファージと考えられる細胞数は、対照群 ( $100 \pm 10\%$  n=7) と比べて HRH4KO マウス ( $51 \pm 5\%$  n=7) で有意に少なかった。(P=0.002)

JNJ28307474 内服群 ( $0.71 \pm 0.07$  n=23) のレーザーCNV サイズは対照群 ( $1.00 \pm 0.12$  n=23) と比較し有意に縮小していた。(P=0.018) (Fig 3)

### 【考察】

ヒスタミンはヒスタミン受容体のリガンドの一つであるが今回の研究ではレーザーCNV においてヒスタミンが HRH4 のリガンドであるという結果は出ず、脈絡膜血管新生を誘導するリガンドはヒスタミン以外の物質である可能性が示唆された。

以前、マウスレーザーCNV に発現する HRH4 陽性細胞は F4/80 と共陽性を示し、それらがマクロファージである可能性が高いと報告されている。また、過去の多くの報告でマクロファージが wet-AMD における血管新生に重要な役割を果たしている指摘されており、マクロファージを枯渇させるとマウスレーザーCNV は抑制されるという報告が複数みられる。

今回の実験ではクロドロン酸リポソームと JNJ7777120 いずれも投与していない対照群がもっとも CNV サイズは大きく、マクロファージ除去群間では JNJ7777120 を投与してもしなくてもレーザーCNV サイズに有意差はみられなかった。このことからマクロファージを除去した時点で新生血管発育は阻害されるが、それ以上は HRH4 を抑制しても結果は変わらないため HRH4 陽性細胞がマクロファージである可能性が示唆された。また AMD 患者では MCP-1 が上昇するといわれている。一方 HRH4 は単球、樹状細胞における MCP-1 の発現を減少させることにより単球の組織への移行を抑制する。しかし我々の実験ではレーザー照射後 HRH4KO マウスの網膜色素上皮・脈絡膜組織において対照群と比べ、MCP-1 は上昇したがマクロファージの総数は減少していた。またレーザー照射後の野生型マウスの網膜色素上皮のフラットマウントでは HRH4 陽性のマクロファージだけでなく HRH4 陰性マクロファージもみられ、すべてのマクロファージに HRH4 が発現しているわけではないと考えられた。これらの結果からも HRH4 が関わるマクロファージの遊走や血管新生メカニズムについてはさらなる研究が必要と考えられた。

また、長時間作用型の HRH4 アンタゴニスト JNJ28307474 を投与した群においてあき

らかなレーザーCNV抑制効果が確認されたことから、AMD治療目的の内服薬としてHRH4受容体拮抗薬の研究を継続する価値があると考えられた。

**【結論】**

HRH4陽性マクロファージがレーザーCNV形成に関与しており、ヒスタミン以外のリガンドが作用していると考えられた。HRH4受容体拮抗薬内服はマウスレーザーCNV発生を有意に抑制し、侵襲の少ないwet-AMD内服治療の可能性が示された。