

目次

緒論	1
本論	
第1章 加齢に伴う網膜神経節細胞死に対する内因性 apelin の影響	3
実験方法	5
実験結果	
1-1. 網膜における apelin および APJ の発現解析	8
1-2. 加齢に伴う網膜における apelin および APJ の発現変化	10
1-3. 老齢マウスにおける網膜神経節細胞数の減少に対する apelin 欠損の影響	11
1-4. 老齢マウスにおける網膜神経節細胞の光刺激応答低下に対する apelin 欠損の影響	12
考察	13
第2章 網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞死に対する内因性 apelin の保護作用	15
実験方法	16
実験結果	
2-1. 網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死の誘導と網膜の apelin および APJ の発現変化	19
2-2. 網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死に対する apelin 欠損の影響	20
2-3. 網膜虚血再灌流による網膜の光刺激応答の低下に対する apelin 欠損の影響	21
2-4. 網膜虚血再灌流による TNF- α 発現上昇に対する apelin 欠損の影響	22
考察	23
第3章 NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する apelin の保護作用	25
実験方法	26
実験結果	
3-1. NMDA の硝子体内投与による網膜神経細胞死の誘導と網膜の apelin および APJ の発現変化	28
3-2. NMDA 誘発網膜神経細胞死に対する apelin 欠損の影響	29
3-3. NMDA の硝子体内投与による網膜の光刺激応答の低下に対する apelin 欠損の影響	30

3-4. NMDA 誘発網膜神経細胞死に対する apelin の硝子体内投与による保護作用	31
3-5. NMDA の硝子体内投与による網膜の光刺激応答の低下に対する apelin の抑制作用	32
3-6. NMDA の硝子体内投与による網膜における TNF- α 発現上昇に対する apelin の抑制作用	33
3-7. NMDA 誘発網膜神経細胞死に対する Akt および ERK の活性化を介した apelin の保護作用	34
考察	36
総括	38
謝辞	40
引用文献	41

諸論

緑内障は、我が国における中途失明原因の第 1 位を占める眼疾患であり、視神経を構成する網膜神経節細胞の変性・脱落が不可逆的に進行することが知られている。本疾患は、眼圧の上昇により発症することが明らかにされているが、眼圧降下治療により十分に眼圧を降下させても、病態が進行する症例が数多く報告されている (Heijl A et al., 2002; Musch DC et al., 2009)。また、近年の臨床研究により、高眼圧を呈する緑内障患者よりも正常眼圧で緑内障症状を有する患者数が極めて多いことが示され (Iwase A et al., 2004)、眼圧上昇は、緑内障の危険因子の一つとして捉えられている。

一方、緑内障に関するこれまでの研究において、網膜神経節細胞死を引き起こす要因として、optineurin などの遺伝子変異 (Rezaie T et al., 2002)、眼循環の低下に伴う再灌流障害 (Shibuki H et al., 2000)、グルタミン酸 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体を介したグルタミン酸興奮毒性 (Harada T et al., 2007)、および炎症性サイトカインによる細胞障害 (Cueva Vargas JL et al., 2015) などが報告されており、これらの要因を標的とした緑内障の新たな治療法の開発が期待されている。しかし、眼圧降下剤が奏効しない症例や、近年の臨床研究において、NMDA 受容体アンタゴニストのメマンチンが有意な改善効果を示さなかったこと (Danesh-Meyer HV, 2011) に鑑みると、一つの危険因子に対する阻害薬では、緑内障の病態進行を抑制できない可能性も考えられる。これらのことから、病態機構のさらなる解明に加えて、網膜神経節細胞死を抑制する抜本的な治療法の開発が求められている。

現在、臨床応用されている医薬品の約半数が G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を標的としており、ヒトゲノム解析により新たに発見された GPCR とそのリガンドは、治療法が確立されていない疾患に対する新たな創薬標的としての可能性が期待されている。Apelin は、GPCR である APJ 受容体の内因性リガンドとして 1998 年に同定された 13 アミノ酸残基の構造をもつ生理活性ペプチドである (Tatemoto K et al., 1998)。これまでに、apelin/APJ システムは、angiotensin II/AT1 システムの血圧上昇作用を抑制する内因性の拮抗システムとして機能していること (Chun HJ et al., 2008)、生理的な血管形成作用を有すること (Cox CM et al., 2006; Zeng XX et al., 2007; Kasai A et al., 2008)、さらに、HIV の感染防御機構に関与すること (Zou MX et al., 2000; Choe W et al., 2000) 等が報告されている。一方、中枢神経系において、神経細胞に APJ の発現が確認され (Choe W et al., 2000; Puffer BA et al., 2000; Medhurst AD et al., 2003; Kasai A et al., 2011)、apelin/APJ システムは、神経細胞に対して生理作用を有する可能性が示唆されており、実際、脳虚血再灌流や外傷性脳障害により誘導される神経細胞死に対して保護作用を示すことが報告されている (Khaksari M et al., 2012; Bao HJ et al., 2016)。また、当研究室において、apelin 遺伝子を欠損させたマウスでは、筋萎縮性

側索硬化症の発症や進行が早まることや、海馬由来初代培養神経細胞における過酸化水素 (H_2O_2) 誘発神経細胞死に対して *apelin* が保護作用を示すことを明らかにしている (Kasai A et al., 2011)。さらに、*apelin* は、海馬および大脳皮質由来初代培養神経細胞において NMDA 受容体を介したグルタミン酸興奮毒性に対して保護作用を示すことや (O'Donnell LA et al., 2007; Zeng XJ et al., 2010)、神経細胞のアポトーシスを抑制すること (Khaksari M et al., 2012; Zeng XJ et al., 2010; Cook DR et al., 2011) が報告されている。このように、*apelin* は、神経細胞死に対して保護作用を有することが示されており、緑内障で生じる網膜神経節細胞死を抑制できる可能性が考えられる。

本研究では、緑内障治療薬としての *apelin* の有用性を明らかにする目的で、マウスを用いて網膜における *apelin*/APJ システムの生理的意義および網膜神経節細胞死に対する *apelin* の保護作用について検討した。

本論

第1章 加齢に伴う網膜神経節細胞死に対する内因性 apelin の影響

これまでに、発生期の網膜において apelin/APJ システムは、血管形成に関与するシステムであることが明らかにされているが (Kasai A et al., 2008; Sakimoto S et al., 2012)、成体の網膜における apelin/APJ システムの生理的意義については明らかにされていない。緒論で述べたように、apelin は神経保護作用を有すること (O'Donnell LA et al., 2007; Kasai A et al., 2011; Khaksari M et al., 2012; Yang Y et al., 2014) や、apelin 遺伝子を欠損させたマウスでは、加齢に伴い発症リスクが上昇する神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症の病態進行に伴う運動神経細胞の脱落・変性が促進すること (Kasai A et al., 2011) が報告されていることから、網膜においても神経保護的な役割を果たしている可能性が考えられる。

最近、日本緑内障学会が 2000 年～2002 年に行った大規模調査 (多治見スタディ) において、40 歳以上の日本人における緑内障の有病率は 5.0 % であり、有病率は年齢とともに増加していることが報告されている (Iwase A et al., 2004; Yamamoto T et al., 2005)。一方、加齢に伴い網膜神経節細胞の脱落がみられること (Harwerth RS et al., 2008) や、老齢マウスの網膜では、ミトコンドリアの軸索内輸送が低下することにより網膜神経節細胞の脆弱性が増加すること (Takahara Y et al., 2015)、および光刺激応答の低下がみられること (Chrysostomou V et al., 2016) が明らかにされている。これらのことから、加齢に伴い網膜神経節細胞が脱落し、緑内障が発症する可能性が考えられる。本章では、成体マウスの網膜において apelin/APJ システムが神経保護的な役割を有するか否かを明らかにするため、加齢に伴う網膜神経節細胞死に対する内因性 apelin の影響について検討を行った。

実験方法

1-1. 動物

C57BL/6N 系を遺伝子背景にもつ apelin-KO マウス (Kidoya H. et al., 2008) とその野生型 (WT) マウスを実験に用いた。マウスは、透明ケージ (24×17×12 cm) で飼育し、室温：22 ±1℃、照明時間：1 日 12 時間 (7:00 - 19:00) の飼育条件で、餌と水を自由に摂取させた。若齢マウスとして 2 ヶ月齢のマウスを、老齢マウスとして 12-18 ヶ月齢のマウスを用いた。動物実験の飼育、実験等はすべて日本薬理学会の動物実験に関する指針に基づき、摂南大学の動物実験に関する規定に従い実施した。

1-2. DNA 抽出と遺伝子型の判定

遺伝子型判定用の DNA は、マウスの尾から採取した血液より抽出した。2 µL の血液を 50 µL の 50 mM NaOH と室温で 30 分以上反応させ、5.5 µL の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加えて中和した。4℃で 10,000 rpm、5 分間の遠心により不溶性画分を沈殿させ、上清 2 µL を DNA サンプルとした。PCR 反応試薬には、KOD FX (TOYOBO; Osaka, Japan) を使用し、KOD FX 0.05 µL、2×PCR buffer 5 µL、0.5 µM primers 各 1 µL、2 mM dNTP 1 µL、deionized-distilled H₂O (ddH₂O) 1.55 µL の反応系で、98℃で 10 秒、70.3℃で 120 秒を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。PCR 反応終了後、サンプルを ethidium bromide (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) 含有 1.0% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、UV Transilluminator (UVP; Upland, USA) で可視化した。各プライマーの配列は Table 1 に示した。

Table 1. Primer pairs for mouse genotyping analysis

Gene	Sequence
Apelin-F	5'- GCA GGA GGA AAT TTC GCA GAC AGC -3'
Apelin-R	5'- ACC GGC ACC GGG AGG GCA CTT -3'
Neo-F	5'- ATC TCC TGT CAT CTC ACC TTG CTC CT -3'
Neo-R	5'- CCA AGC TCT TCA GCA ATA TCA CGG GTA G -3'

1-3. 免疫組織化学染色法

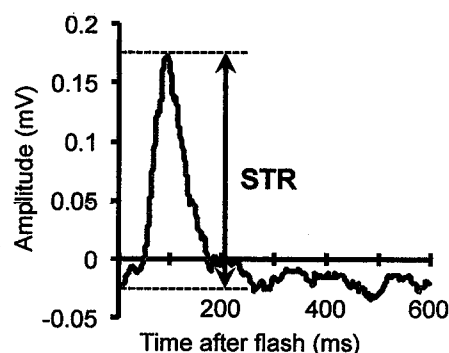
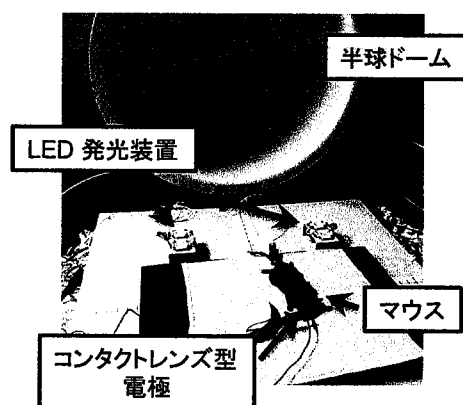
マウスを 50 mg/mL 抱水クロラル (500 mg/kg マウス体重) で腹腔内投与により麻酔後、左心室から生理食塩水を灌流して脱血させ、続いて Zinc fixative (BD Pharmingen; San Diego, CA, USA) で灌流固定を行った。眼球を摘出し、Zinc fixative (BD Pharmingen) で一晩浸漬固定を行った後、パラフィン包埋を行い、ミクロトームにより 5 μ m のパラフィン切片を作製した。パラフィン切片を xylene で脱パラフィン後、ethanol および水道水により水和化した。0.05% Tween-20 を含む Tris-EDTA buffer (pH 9.0) 中でマイクロウェーブ (500 W, 20 分間) による抗原賦活化処理を行った。0.1% Triton X-100 を含む tris-buffered saline (TBS-T, pH 7.4) で洗浄後、室温で 30 分間ブロッキングを行った (Blocking buffer : 0.5% skim milk in 0.5% TBS-T)。その後、1 次抗体 [rabbit anti-APJ polyclonal antibody (Kasai A et al., 2011)、mouse anti-Brn-3a monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA)、goat anti-Choline Acetyltransferase (ChAT) antibody (Chemicon Europe Ltd; UK) および mouse anti-Cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA)] を 4°C で一晩反応させた。二次抗体 [Alexa 568-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes Life Technologies; Eugene, OR, USA), biotinylated anti-mouse IgG (DAKO; Carpinteria, CA, USA) および CFTM 488A-conjugated donkey anti-goat IgG (Biotium; Hayward, CA, USA)] を室温で 1 時間反応させ、ビオチン化抗体を検出するため、streptavidin-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) を室温で 1 時間反応させた。Fluoromount (Diagnostic BioSystems; Pleasanton, CA, USA) を用いて封入し、蛍光顕微鏡 (AZ-100M, NIKON; Tokyo, Japan) で観察した。

1-4. 組織学的解析

マウスを麻酔後、左心室から生理食塩水を灌流して脱血させ、続いて Zinc fixative (BD Biosciences) で灌流固定を行った。眼球を摘出し、Zinc fixative で一晩浸漬固定を行った後、パラフィン包埋を行った。ミクロトームにより 5 μ m のパラフィン切片を作製した。パラフィン切片を xylene で脱パラフィン後、ethanol および水道水により水和化し、hematoxylin (Millipore; Bedford, MA, USA) 溶液中で 10 分間反応させ、水道水で 10 分間洗浄後、0.1% eosin Y ethanol 溶液中で 3 分間反応させた。Ethanol, xylene による透徹後、Softmount (Wako; Osaka, Japan) により封入を行った。眼球中央にある視神経乳頭部を含む 4 切片の網膜神経節細胞層の hematoxylin 陽性細胞数の平均値を、個体あたりの網膜神経節細胞数とした。

1-5. Electroretinography (ERG)

12 時間以上暗順応させたマウスを暗赤色灯下で麻酔後、ミドリン P (トロピカミド 5 mg/mL, フェニレフリン塩酸塩 5 mg/mL 参天製薬; Osaka, Japan) を点眼し、散瞳させた。その後、ベノキシール (オキシブプロカイン 4 mg/mL 参天製薬) を点眼し、角膜表面を麻酔した。コンタクトレンズ型関電極 (Mayo; Nagoya, Japan)、不関電極 (Mayo) および接地電極 (Mayo) をそれぞれマウスの角膜表面、口内および尾部に装着し、半球ドーム (小動物用全視野光刺激装置, Mayo) 内で発光ダイオード (LED) による光刺激を行った。光刺激は、LED 発光装置 (LS-100, Mayo) により 3.0×10^{-5} cd·s/m² の条件で、暗所閾値電位 (Scotopic Threshold Response : STR) を惹起した。光刺激を 5 秒間隔で 16 回行った結果を平均した。測定結果の記録および加算平均処理は、PowerLab データ収録・解析システム (AD Instruments; Mountain View, CA, USA) を用いて行った。測定中の麻酔による体温低下を防止するため、体温保持マット (BWT-100, バイオリサーチセンター; Nagoya, Japan) を半球ドーム内に設置して測定を行った。また、STR の定量化は、ベースラインから最大ピークまでの幅を計測することにより行った。



1-6. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

マウスを頸椎脱臼後、網膜を単離し、直ちに RNA later[®] solution (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA) に浸漬した。SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、網膜から total RNA を抽出した。Total RNA を吸光度測定により定量し、滅菌水で 1 µg RNA/8.8 µL になるように希釈した。そこに 0.1 g/L のランダムプライマー (dN6)、5 × 1st strand buffer、0.1 M DTT、5 mM dNTP を各 2 µL、4 µL、2 µL、2 µL 加え混合した。さらに、200 U/µL M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)、40 U/µL RNase inhibitor (TOYOBO) を各 1 µL、0.2 µL 加え、総量 20 µL の反応液中で逆転写反応を行った。

Real-time RT-PCR は、逆転写反応産物を滅菌水で 20 倍希釈した後、希釈液 2 µL を用いた実験系で、Thermal Cycle Dice[®] Real Time System (Takara; Ohtsu, Japan) を用いて行った。PCR 反応試薬には、THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix (TOYOBO) を使用し、THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix 5 µL、0.5 µM primers を各 1 µL、ddH₂O 1 µL の反応系で、95°C 10 秒、60°C 20 秒、72°C 20 秒の反応を 40 サイクル行い、その後 Dissociation curve analysis により T_m 値を解析し、PCR 産物が単一であることを確認した。また、housekeeping gene として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて、サンプル間の鋳型量の標準化を行った。各プライマー配列は Table 2 に示した。

Table 2. Primer pairs for real-time RT-PCR analysis

Gene	Sequence
GAPDH-F	5'- CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC -3'
GAPDH-R	5'- CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC -3'
Apelin-F	5'- GTT GCA GCA TGA ATC TGA GG -3'
Apelin-R	5'- CTG CTT TAG AAA GGC ATG GG -3'

1-7. 統計学的解析

統計解析は student's *t*-test または two-way ANOVA を行い、post hoc test として、Tukey-Kramer test を行った。また、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

実験結果

1-1. 網膜における apelin および APJ の発現解析

はじめに、成体マウスの網膜における apelin の発現細胞を明らかにするため、WT マウスおよび apelin-KO マウスの眼球切片を用いて、apelin の免疫組織化学染色を行った。その結果、WT マウスの網膜において網膜神経節細胞層 (*GCL*, *ganglion cell layer*) および内顆粒層 (*INL*, *inner nuclear layer*) の細胞に apelin の発現がみられた (Figure 1A, left panel)。一方、apelin-KO マウスの網膜ではこの陽性反応はみられなかった (Figure 1A, right panel)。さらに、WT マウスの眼球切片を用いて、網膜特異的なグリア細胞の Müller 細胞のマーカーである CRALBP と apelin の二重蛍光免疫染色を行った結果、apelin の発現は CRALBP 陽性細胞にみられた (Figure 1B)。

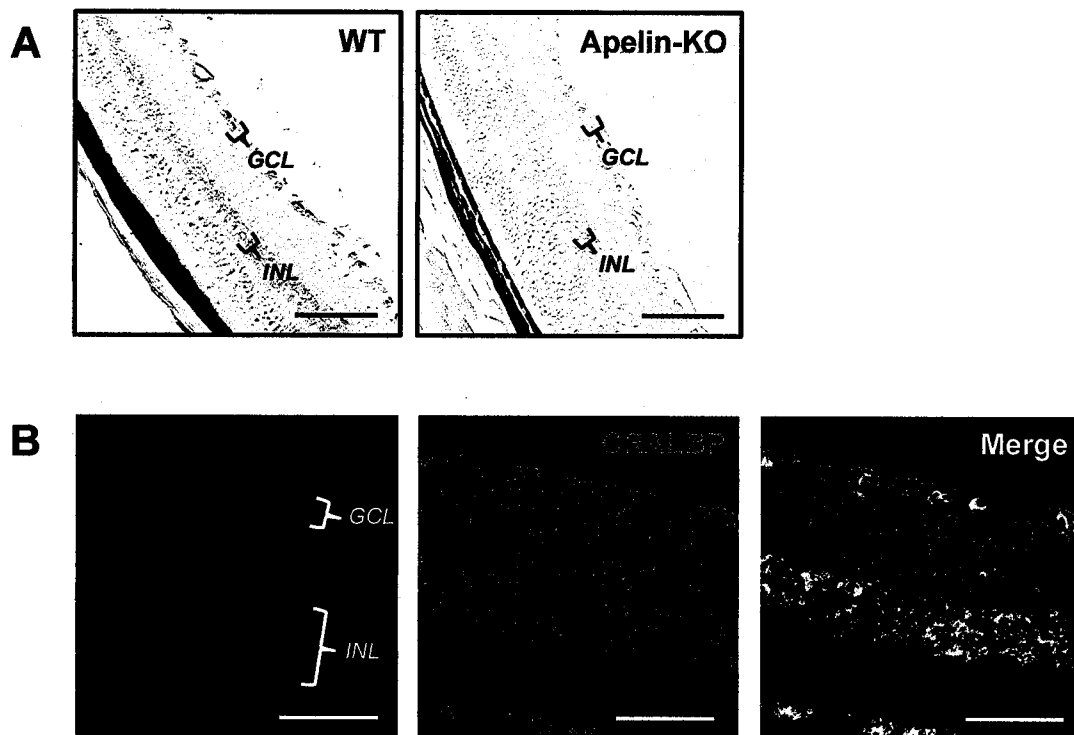


Figure 1. Apelin expression in the retinas of adult mice

(A) Representative pictures show an immunohistochemistry of apelin in retinal sections from WT mice and apelin-KO mice. *GCL*, ganglion cell layer; *INL*, inner nuclear layer. (B) Representative pictures show double immunofluorescence of apelin (red) and CRALBP (green) in retinal sections from WT mice. The bar indicates 50 μ m.

次に、apelin の標的細胞を同定するため、WT マウスの眼球切片を用いて、網膜における apelin 受容体 APJ の発現を解析した。その結果、*GCL* および *INL* の細胞に APJ 陽性反応がみられた (Figure 2A-C, left panel)。さらに、網膜神経節細胞のマーカーである Brn-3a、アマクリン細胞のマーカーである ChAT、および Müller 細胞のマーカーである CRALBP と APJ の二重免疫染色を行った。その結果、*GCL* の Brn-3 陽性細胞に、*GCL* および *INL* の ChAT 陽性細胞に、さらに、*INL* の CRALBP 陽性細胞に APJ 陽性反応が観察された (Figure 2A-C, right panel)。

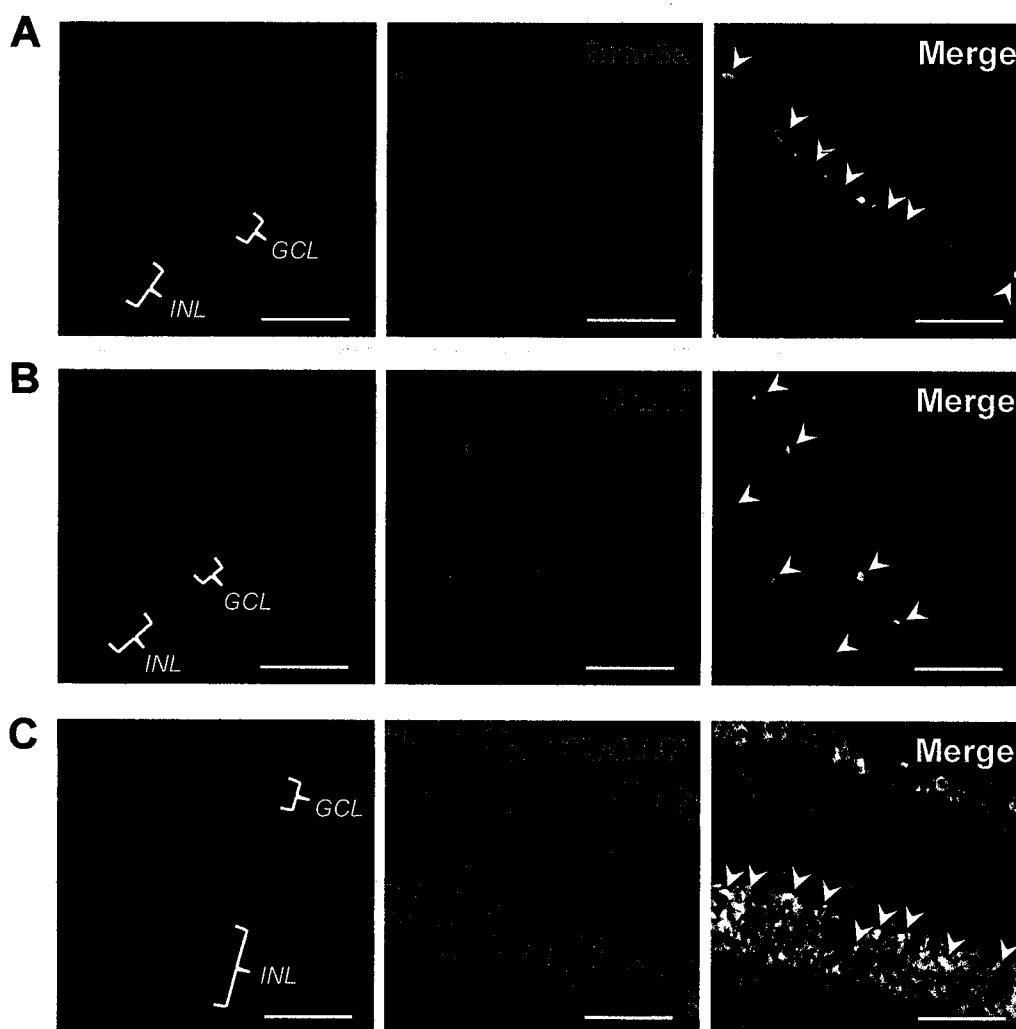


Figure 2. APJ expression in the retinas of WT adult mice

(A-C) Representative pictures show double immunofluorescence of APJ (red) and Brn-3a (A), ChAT (B) or CRALBP (C) (each green) in retinal sections from WT mice. Arrowheads indicate double positive cells. *GCL*, ganglion cell layer; *INL*, inner nuclear layer. The bar indicates 50 μ m.

1-2. 加齢に伴う網膜における apelin および APJ の発現変化

次に、加齢に伴い網膜の apelin および APJ 発現に変化がみられるか否かを明らかにするため、2 ヶ月齢 (若齢) および 12-18 ヶ月齢 (老齢) のマウスの網膜における apelin および APJ mRNA 発現を real-time RT-PCR 法により検討した。その結果、老齢マウスの網膜における apelin mRNA 発現は、若齢マウスと比較して有意に低下していた (Figure 3A)。一方、老齢マウスの網膜における APJ mRNA 発現は、若齢マウスと比較して有意に上昇していた (Figure 3B)。

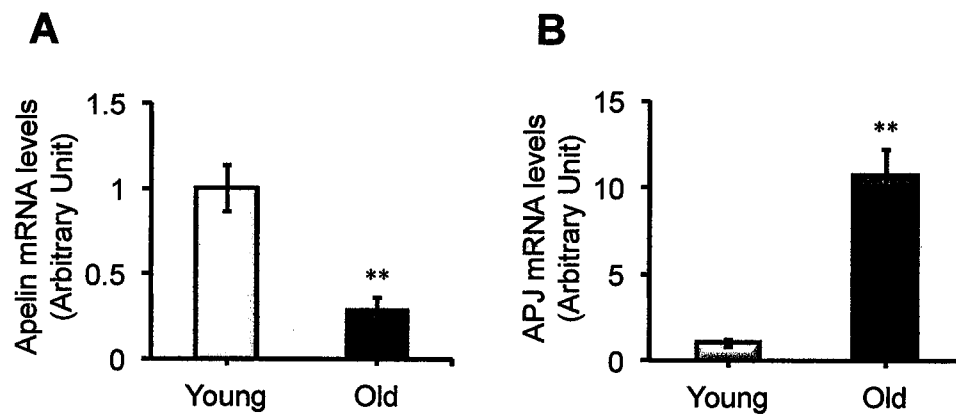


Figure 3. Effect of aging on apelin and APJ expression in retinas of mice

Apelin and APJ expression levels in the retinas of WT mice were examined by real-time RT-PCR (n = 12). Data represent mean ± SEM. ** $p < 0.01$ vs. Young.

1-3. 老齢マウスにおける網膜神経節細胞数の減少に対する apelin 欠損の影響

次に、加齢に伴う網膜神経節細胞数の減少に対する内因性 apelin の影響を明らかにするため、老齢の apelin-KO マウスを用いて検討した。その結果、若齢の apelin-KO マウスの網膜神経節細胞数は、WT マウスと比較して差はみられなかった。一方、老齢の WT マウスおよび apelin-KO マウスの網膜神経節細胞数は、若齢のマウスと比較して有意に減少していた。また、老齢の apelin-KO マウスの網膜神経節細胞数は、老齢の WT マウスと比較して有意な減少がみられた。

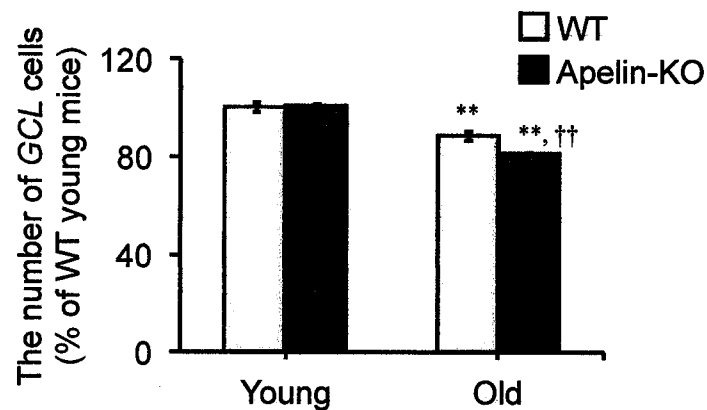


Figure 4. Apelin deficiency accelerates age-related loss of retinal ganglion cells in mice.

The number of cells in ganglion cell layer was counted in HE-stained retinal sections from WT old mice and apelin-KO old mice ($n = 3$). Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. Young, †† $p < 0.01$ vs. WT.

1-4. 老齢マウスにおける網膜神経節細胞の光刺激応答低下に対する apelin 欠損の影響

光刺激により惹起される STR は、網膜神経節細胞層の神経細胞由来の電位であることが知られている (Saszik SM et al., 2002)。そこで、加齢に伴う網膜神経節細胞の光刺激応答の変化を明らかにするため、老齢マウスにおける STR を解析した。その結果、若齢マウスと比較して、老齢マウスにおける STR の振幅は低下していた (Figure 5A and B)。そこで、加齢に伴う網膜神経節細胞の光刺激応答の低下に対する内因性 apelin の影響を明らかにするため、老齢の WT マウスおよび apelin-KO マウスの STR を比較した。その結果、老齢の WT マウスと比較して、老齢の apelin-KO マウスにおける STR は著明に低下していた (Figure 5A and B)。

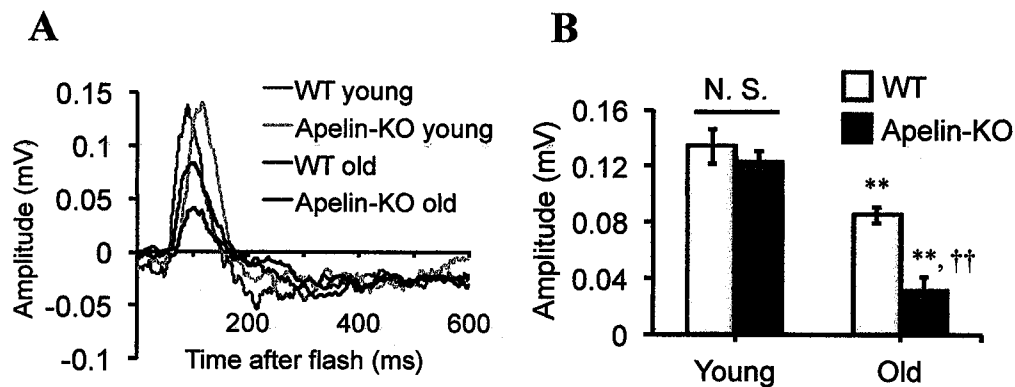


Figure 5. Effect of apelin deficiency on decrease in the STR in the electroretinogram in aged mice

(A) Representative waveforms show the STR derived from WT mice and apelin-KO mice stimulated with $1.0 \times 10^{-5} \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$. (B) The amplitudes of the STR in WT mice and apelin-KO mice were quantified by measuring from the baseline to the maximum peak ($n = 4-8$). Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. Young, †† $p < 0.01$ vs. WT.

考察

本研究において、老齢マウスの網膜神経節細胞数の減少と光刺激応答の低下がみられ、これらの現象は、apelin-KO マウスにおいて顕著にみられた (Figure 4 and 5)。また、網膜神経節細胞に APJ の発現がみられ、APJ のリガンドである apelin の発現は加齢に伴い著しく低下していた (Figure 2 and 3)。これらの結果は、内因性 apelin が網膜神経節細胞に対して保護的な役割を果たしていることを示唆している。

一方、老齢の apelin-KO マウスの網膜でみられた網膜神経節細胞数の減少と光刺激応答の低下は、若齢の apelin-KO マウスではみられなかった (Figure 4)。これまでの報告から、脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子をヘテロ欠損させたマウスでは、加齢に伴う光刺激応答が低下していること (Chrysostomou V et al., 2016) や、神経保護作用を有する血管内皮増殖因子 (VEGF) の中和抗体を網膜に慢性的に暴露すると網膜神経節細胞死が引き起こされること (Nishijima K et al., 2007) が明らかにされている。これらのことは、網膜の神経保護因子の慢性的な欠如が網膜神経節細胞死を引き起こすことを示唆しており、加齢に伴う apelin の減少が、加齢による網膜神経節細胞死の原因の一つである可能性が考えられる。

また、老齢マウスの網膜において、網膜神経節細胞数の減少に加えて、網膜電図における STR の低下がみられた (Figure 5)。STR は、微弱な光刺激により惹起される網膜神経細胞の反応であり、網膜内層に位置する GCL の細胞由来であることが知られている (Saszik SM et al., 2002)。GCL に存在する神経細胞として、網膜神経節細胞および網膜神経節細胞に対して抑制性ニューロンとして機能するアマクリン細胞が知られており、最近の研究から、緑内障における網膜神経節細胞死には、アマクリン細胞の脱落が関与する可能性が示唆されている (Pang JJ et al., 2015; Casola C et al., 2016; Akopian A et al., 2016)。本研究において、網膜神経節細胞とアマクリン細胞に APJ の発現がみられ (Figure 2B)、加齢に伴う STR の減少は、apelin-KO マウスにおいて著明にみられた (Figure 5)。これらの結果は、apelin/APJ システムが網膜神経節細胞およびアマクリン細胞に対して保護作用を有する可能性を示唆しており、緑内障治療薬としての apelin の有用性を支持するものである。

本章において、加齢に伴い網膜の apelin 発現が著明に低下すること (Figure 3A) を明らかにしたが、その機構については不明である。一方、免疫組織化学染色の結果より、apelin は Müller 細胞に陽性反応を示した (Figure 1B)。この結果は、以前に報告されているラット網膜由来初代培養 Müller 細胞に apelin 発現がみられた結果と一致している (Wang XL et al., 2012)。Müller 細胞は、網膜最内層の内境界膜から最外層の視細胞層にかけて支柱をなすように存在する網膜特異的なグリア細胞であり、種々の神経栄養因子やラジカルスカベンジャーであるグルタチオンの産生を介して、網膜神経節細胞や視細胞の生存維持に重要な役

割を担うことが報告されている (Rattner A et al., 2005; Joly S et al., 2007; Unterlaufft JD et al., 2012)。また、老齢ブタ由来 Müller 細胞ではグルタチオン産生能が低下していることが報告されている (Paasche G et al., 1998)。これらのことから、加齢に伴う網膜の apelin 発現低下は、Müller 細胞の機能低下により引き起こされた可能性が考えられる。

本研究において、網膜神経節細胞、アマクリン細胞および Müller 細胞に APJ の発現がみられ、加齢に伴い網膜神経節細胞の減少および STR の低下がみられた (Figure 4 and 5)。これらの結果から、加齢に伴い網膜の APJ mRNA の発現は低下することが予想されたが、APJ の発現は、老齢マウスの網膜において著明に上昇していた (Figure 3B)。本現象の機序は不明であるが、リガンドである apelin の発現低下による APJ 受容体のアップレギュレーション、あるいは、加齢に伴う Müller 細胞のグリオーシスによる Müller 細胞の増殖に起因するかもしれない (Bringmann A et al., 2001)。

以上の結果より、apelin/APJ システムは、網膜神経節細胞に対して保護的な役割を果たしている可能性が示唆され、網膜神経節細胞死がみられる緑内障の治療標的として有用である可能性が考えられた。そこで、第 2 章では、緑内障モデルとして汎用されている網膜虚血再灌流モデルを用いて、網膜神経節細胞死に対する内因性 apelin の保護作用について検討を行った。

第 2 章 網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞死に対する内因性 apelin の保護作用

近年の疫学調査から、緑内障において網膜動静脈の狭小化が眼圧と独立して起きること (Amerasinghe N et al., 2008) や、網膜動静脈狭小化が緑内障性視野異常に先立って生じること (Kawasaki R et al., 2013) が報告され、緑内障病態への眼循環の関与が示唆されている。眼灌流圧 (=眼底血圧-眼圧) の低下は、網膜虚血に続く再灌流を介してミトコンドリア内で活性酸素種を発生させ、酸化ストレスを引き起こすことで網膜神経節細胞死を誘発すると考えられており、実際、基礎研究において、強力な血管収縮作用を有するエンドセリン-1 の硝子体内投与や、一過性高眼圧による網膜虚血処置を行うと、視神経乳頭の血流低下と網膜神経節細胞死が惹起されることが報告されている (Cioffi GA et al., 1995; Lau J et al., 2006; Junk AK et al., 2002)。これらのことから、緑内障における網膜神経節細胞死には、網膜虚血再灌流が関与する可能性が示唆される。

第 1 章において、内因性 apelin が、加齢に伴う網膜神経節細胞の脱落・変性に対して抑制作用を有することを明らかにした。また、apelin は、脳虚血再灌流により誘発される神経細胞死に対して保護作用を示すことが報告されている (Khaksari M et al., 2012; Yang Y et al., 2014)。これらのことから、apelin は、網膜虚血により誘発される網膜神経節細胞死に対して保護作用を示す可能性が考えられる。

そこで本章では、一過性高眼圧により引き起こされる網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞死に対する内因性 apelin の保護作用について検討した。

実験方法

2-1. 動物

1-1. に準ずる。

2-2. DNA 抽出と遺伝子型の判定

1-2. に準ずる。

2-3. 網膜虚血再灌流モデル

マウスを 50 mg/mL 抱水クロラル (500 mg/kg マウス体重) で腹腔内投与により麻酔した。麻酔による体温低下を防止するため、体温保持マット (BWT-100, バイオリサーチセンター) を用いて体温の保持を行った。ミドリン P (トロピカミド 5 mg/mL, フェニレフリン塩酸塩 5 mg/mL 参天製薬) の点眼により散瞳させ、ベノキシール (オキシブプロカイン 4 mg/mL 参天製薬) の点眼により角膜表面麻酔を行った。生理食塩水の入った点滴バッグを予め水面がマウスの眼球より 135.5 cm の高さになるように吊り下げておき、点滴バッグにチューブを介して連結した 33 G の注射針 (伊藤製作所; Shizuoka, Japan) をマウスの前眼房内へ刺入し、前眼房内に 100 mmHg の圧力を 60 分間負荷し、網膜虚血を惹起させた。60 分間負荷後、注射針を抜き網膜循環を再灌流させた。術後感染予防のためにノフロ (ノルフロキサシン 3 mg/mL 萬有製薬; Tokyo, Japan) を点眼した。

2-4. 硝子体内投与

マウスを麻酔後、ミドリン P (トロピカミド 5 mg/mL, フェニレフリン塩酸塩 5 mg/mL 参天製薬) を点眼し、散瞳させた。TNF- α 中和抗体 (1 μ g/eye, Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA) の硝子体内投与は、5- μ L マイクロシリンジ (注射針: 33 G 伊藤製作所) を用いて行った。術後感染予防のためにノフロ (ノルフロキサシン 3 mg/mL 萬有製薬) を点眼した。

2-5. 組織学的解析

1-3. に準ずる。ただし、固定溶液には 4% パラホルムアルデヒド (Wako) を用いた。

2-6. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色

マウスを灌流固定後、眼球を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで一晩浸漬固定を行った後、パラフィン包埋を行った。5 μ m のパラフィン切片を作製し、xylene で脱パラフィン後、ethanol および水道水により水和化した。TUNEL 染色は Apoptosis in situ Detection Kit (Wako) を用いて行った。Protein Digestion Enzyme により 37°C で 15 分間タンパク質分解処理を行い、洗浄後、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を 37°C で 15 分間反応させ、DNA の 3'-OH 末端をフルオレセイン-dUTP で標識した。3% H₂O₂ 溶液により内因性ペルオキシダーゼ POD の不活化を行い、POD 標識抗フルオレセイン抗体を 37°C で 20 分間反応させた。ImmPACT™ DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて 1 分間の POD-DAB 反応により POD 標識抗体を検出した。洗浄後、Methyl green (Dako) により対比染色を行い、ethanol、xylene による透徹後、Softmount (Wako) により封入を行った。

個体あたりの GCL、INL および外顆粒層 (ONL, outer nuclear layer) における TUNEL 陽性アポトーシス細胞数は、眼球切片の 4 切片の平均値を 1 個体の値とした。

2-7. Real-time RT-PCR 法

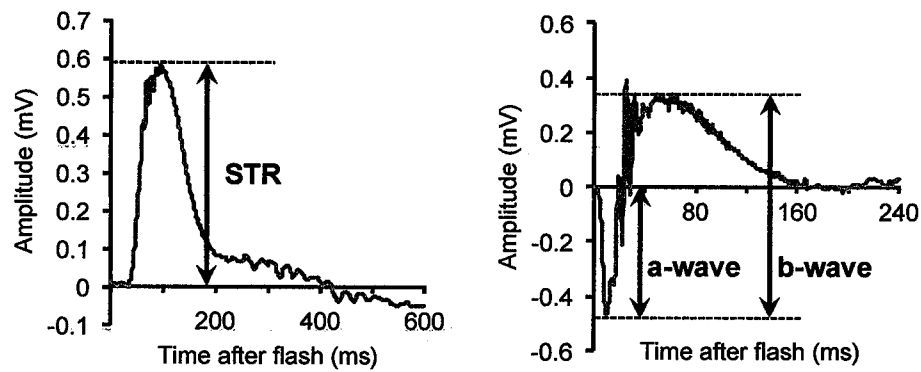
1-5. に準ずる。各プライマー配列は Table 3 に示した。

Table 3. Primer pairs for real-time RT-PCR analysis

Gene	Sequence
GAPDH-F	5'- CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC -3'
GAPDH-R	5'- CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC -3'
TNF- α -F	5'- CGG GGT GAT CGG TCC CCA AAG -3'
TNF- α -R	5'- GGA GGG CGT TGG CGC GCT GG -3'

2-8. Electroretinography (ERG)

1-4. に準ずる。光刺激は、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ の強さの光刺激を 5 秒間隔で 8 回行い、STR を測定した。また、 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ の強さの光刺激を 30 秒間隔で 2 回行い、a-wave および b-wave を惹起させた。a-wave は、光刺激直後にみられるベースラインからマイナス側に振れる最小値までの電位の振幅を、b-wave は、a-wave 直後にみられる最小値からプラス側に振れる最大値までの電位の振幅を測定することにより定量化した。



2-9. 統計学的解析

統計解析は student's *t*-test または two-way ANOVA を行い、post hoc test として、Tukey-Kramer test または Dunnett test を行った。また、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

実験結果

2-1. 網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死の誘導と網膜の apelin および APJ の発現変化

はじめに、一過性高眼圧による網膜虚血再灌流により誘導される網膜神経節細胞死について検討した。その結果、WT マウスにおいて、網膜虚血再灌流 1 日後において網膜神経節細胞数の減少がみられ、7 日後ではその減少が顕著にみられた (Figure 6A)。また、網膜虚血再灌流 1 日後に、*GCL*、*INL* および *ONL* において TUNEL 陽性アポトーシス細胞が観察された (Figure 6B)。さらに、網膜虚血再灌流 1 日後の網膜における apelin および APJ mRNA 発現を real-time RT-PCR 法により解析した結果、sham 処置した網膜と比較して、apelin mRNA 発現の減少傾向 (Figure 6C)、APJ mRNA 発現の上昇傾向 (Figure 6D) がみられた。

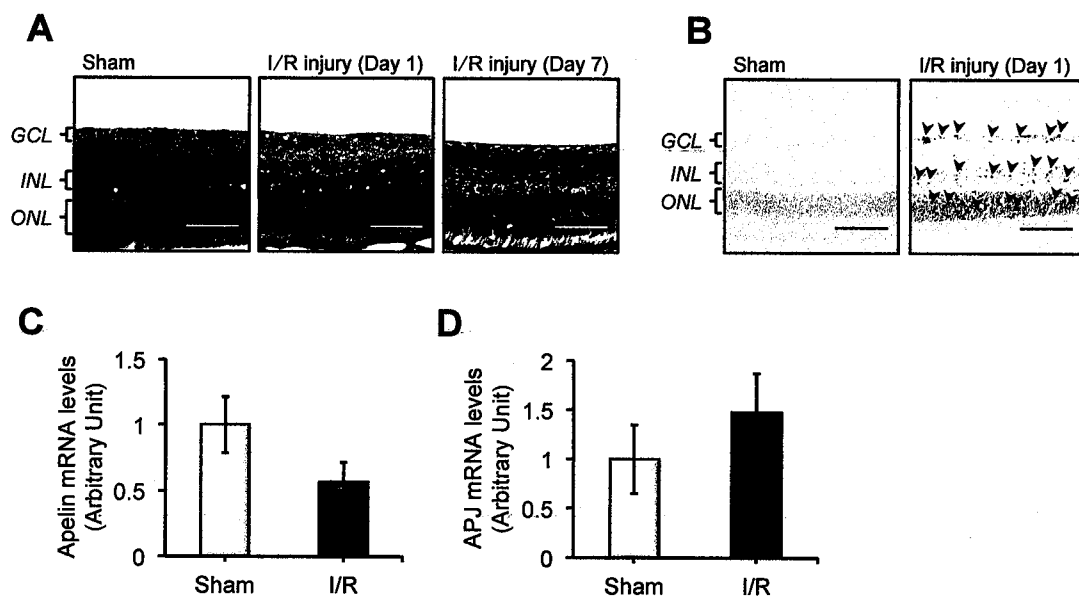


Figure 6. Loss of neuronal cells and alteration of apelin and APJ expression in the retina following retinal ischemia-reperfusion (I/R) injury

(A) Representative pictures show HE-stained retinal sections from WT mice at 1 day and 7 days after retinal ischemia-reperfusion injury or sham operation. *GCL*, ganglion cell layer; *INL*, inner nuclear layer; *ONL*, outer nuclear layer. The bar indicates 50 μ m. (B) Representative pictures show TUNEL-stained retinal sections from WT mice at 1 day after retinal ischemia-reperfusion injury. Arrowheads indicate TUNEL positive cells. The bar indicates 50 μ m. (C and D) Levels of apelin (C) and APJ (D) mRNA in the retinas at 24 hours after ischemia-reperfusion injury or sham operation were examined by real-time-RT-PCR. Data represent mean \pm SEM.

2-2. 網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死に対する apelin 欠損の影響

次に、網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死に対する apelin 欠損の影響について明らかにするため、apelin-KO マウスを用いて検討を行った。Sham 処置は、網膜神経節細胞数に影響を与えなかった (Figure 7A)。また、sham 処置した apelin-KO マウスの網膜神経節細胞数は、WT マウスと比較して差はみられなかった (Figure 7A)。一方、網膜虚血再灌流 1 日後および 7 日後の apelin-KO マウスの網膜では、WT マウスと比較して網膜神経節細胞数の有意な減少がみられた (Figure 7A)。また、網膜虚血再灌流 1 日後の apelin-KO マウスの *GCL*、*INL* および *ONL* におけるアポトーシス細胞数は、WT マウスと比較して増加していた (Figure 7B-D)。

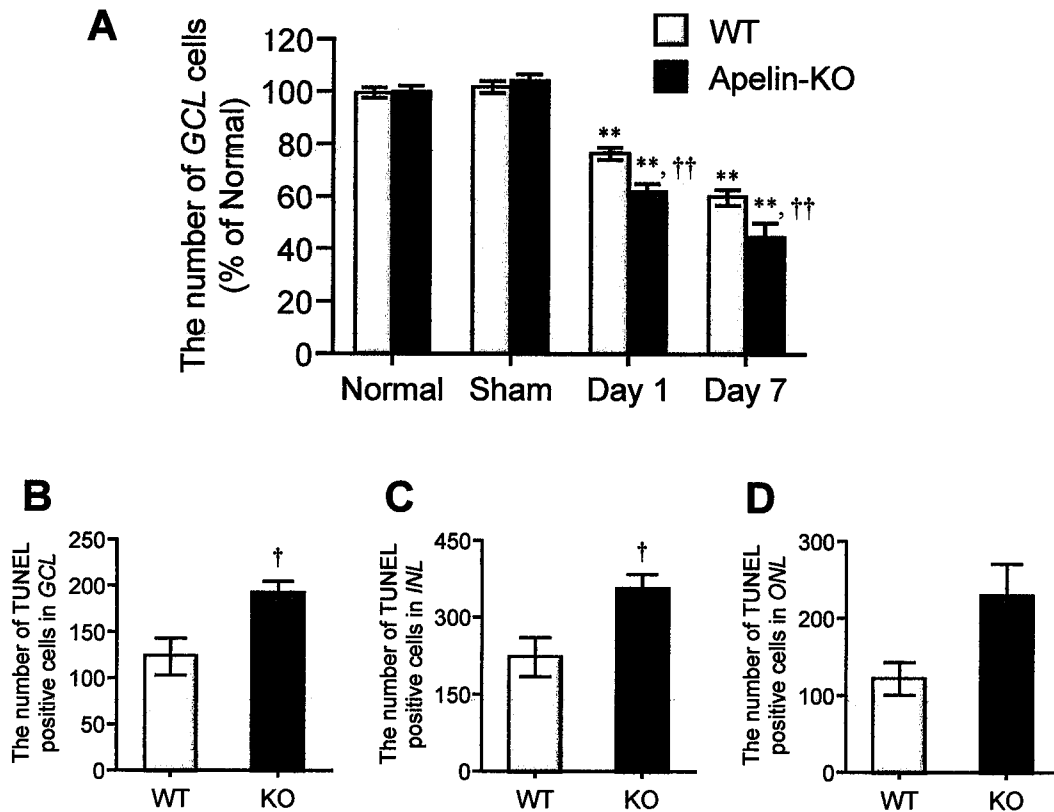


Figure 7. Apelin deficiency facilitates retinal neuronal cell death induced by retinal ischemia-reperfusion (I/R) injury in mice.

(A) The numbers of cells in *GCL* were counted in HE-stained retinal sections from WT mice and apelin-KO mice at 1 day and 7 days following ischemia-reperfusion injury ($n = 4-5$). (B-D) The numbers of TUNEL positive cells were counted in *GCL* (B), *INL* (C) and *ONL* (D) in retinal sections from WT mice and apelin-KO mice at 24 hours following retinal ischemia-reperfusion injury ($n = 4-5$). *GCL*, ganglion cell layer; *INL*, inner nuclear layer; *ONL*, outer nuclear layer. Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. Sham, † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ vs. WT

2-3. 網膜虚血再灌流による網膜の光刺激応答の低下に対する apelin 欠損の影響

次に、網膜の光刺激応答に対する網膜虚血再灌流の影響を明らかにするため、光刺激装置を用いて、網膜虚血再灌流後のマウスの網膜電図を測定した。その結果、網膜虚血再灌流1日後の網膜では、sham 処置した網膜と比較して、GCL 細胞由来の STR、ONL 細胞由来の a-wave および INL 細胞由来の b-wave の振幅の低下がみられた (Figure 8A and 8B)。この網膜虚血再灌流による網膜の光刺激応答低下に対する apelin 欠損の影響を明らかにするため、apelin-KO マウスを用いて解析を行った。Sham 処置した apelin-KO マウスでは、WT マウスと比較して、a-wave の振幅に有意な低下がみられたが (Figure 8D)、STR および b-wave の振幅にはほとんど差はみられなかった (Figure 8C and E)。一方、網膜虚血再灌流1日後の apelin-KO マウスでは、WT マウスと比較して、STR、a-wave および b-wave の著明な低下がみられた (Figure 8C-E)。

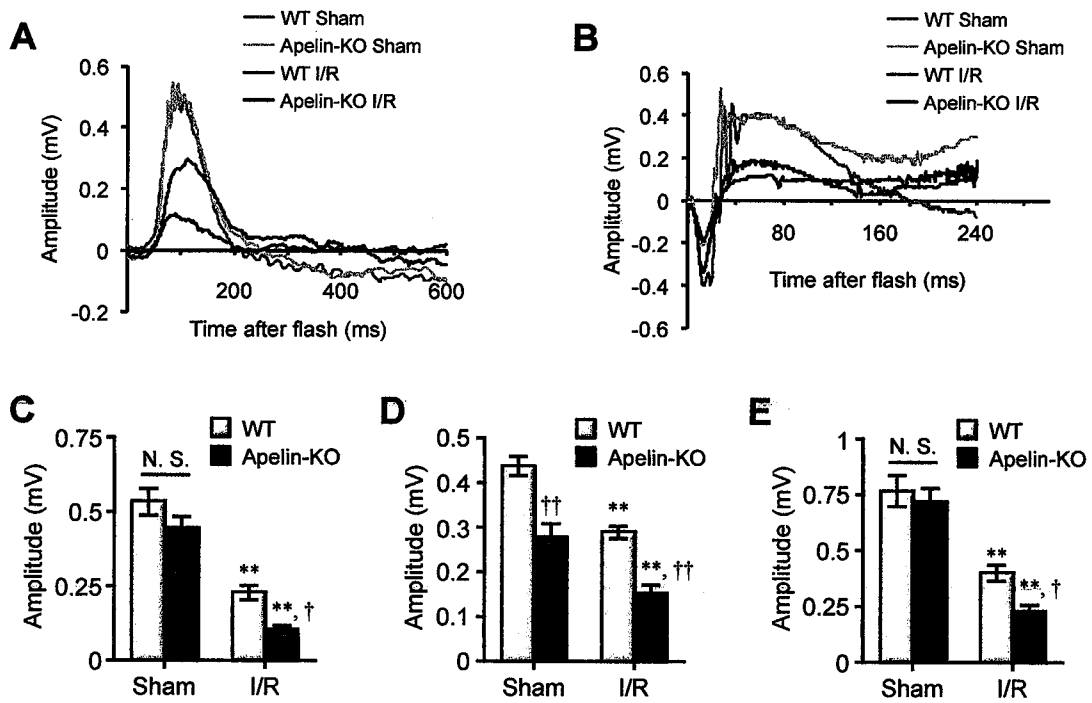


Figure 8. Effect of apelin deficiency on decrease in the STR, a-wave and b-wave in mice after retinal ischemia-reperfusion (I/R) injury

(A) Representative waveforms show STR amplitudes elicited by $1.0 \times 10^{-3} \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ in the eyes of WT mice and apelin-KO mice at 24 hours after ischemia-reperfusion injury or sham operation. (B) Representative waveforms show a-wave and b-wave amplitudes elicited by $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ in the eyes of WT mice and apelin-KO mice at 24 hours after ischemia-reperfusion injury or sham operation. (C-E) The STR (C), a-wave (D) and b-wave (E) amplitudes were quantified in WT mice and apelin-KO mice 24 hours after retinal ischemia-reperfusion injury or sham operation ($n = 4-5$). Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. Sham, † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ vs. WT.

2-4. 網膜虚血再灌流による TNF- α 発現上昇に対する apelin 欠損の影響

網膜虚血再灌流障害が、炎症性サイトカインの一つである TNF- α により促進されることが報告されている (Biermann J et al., 2010; Zhang Y et al., 2015)。また、apelin が炎症性サイトカインの発現抑制を介して、脳および腎虚血再灌流障害に対して保護作用を示すこと (Xin Q et al., 2015; Bircan B et al., 2016) が報告されている。そこで、apelin-KO マウスでみられる網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞死の促進に対する TNF- α の関与について検討を行った。まず、WT マウスの網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞死に対する TNF- α の関与について明らかにするため、TNF- α 中和抗体を硝子体内投与した WT マウスに網膜虚血再灌流を行い、網膜神経節細胞数を計測した。その結果、TNF- α 中和抗体の硝子体内投与により、網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞数の減少が有意に抑制された (Figure 9A)。次に、apelin-KO マウスの網膜における TNF- α 発現に対する網膜虚血再灌流の影響について real-time RT-PCR 法により解析した。その結果、sham 処置した apelin-KO マウスの網膜における TNF- α mRNA 発現は、WT マウスと比較してほとんど変化がみられなかった。一方、網膜虚血再灌流 1 日後のマウスの網膜における TNF- α mRNA は、sham 処置したマウスと比較して著明な発現上昇がみられた (Figure 9B)。この TNF- α の発現上昇に対する内因性 apelin の影響を明らかにするため、網膜虚血再灌流を行った apelin-KO マウスの網膜における TNF- α 発現を解析した結果、網膜虚血再灌流 1 日後にみられる網膜の TNF- α mRNA 発現は、WT マウスと比較して有意に上昇していた (Figure 9B)。

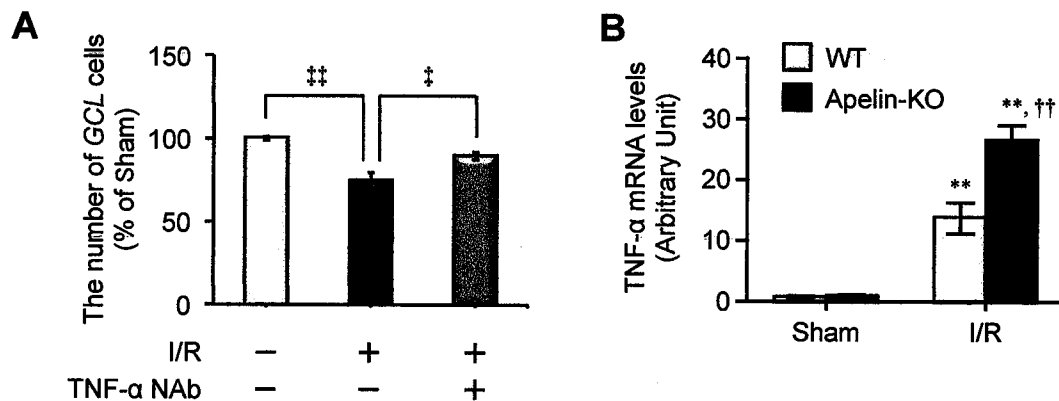


Figure 9. Apelin deficiency accelerates the upregulation of TNF- α expression induced by retinal ischemia-reperfusion (I/R) injury in the retina.

(A) The numbers of GCL cells were counted in HE-stained retinal sections from WT mice at 24 hours after ischemia-reperfusion injury 1 hour following an intravitreal injection of saline or TNF- α neutralizing antibody (NAb) (1 μ g). (B) TNF- α expression levels in the retinas of WT mice and apelin-KO mice at 24 hours following retinal ischemia-reperfusion injury were examined by real-time RT-PCR ($n = 4-5$). Data represent mean \pm SEM. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ** $p < 0.01$ vs. Sham, †† $p < 0.01$ vs. WT.

考察

本章では、網膜虚血再灌流により誘導される網膜神経節細胞死に対する内因性 apelin の保護作用について明らかにするため、apelin-KO マウスを用いて、網膜虚血再灌流モデルを作製した。組織学的解析および網膜電図測定の結果より、apelin-KO マウスでは、WT マウスと比較して網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死および光刺激応答低下の促進がみられた (Figure 7 and 8)。以上のことから、内因性 apelin は、網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死を抑制することが示唆された。

網膜虚血再灌流は、活性酸素種を発生させることにより網膜神経細胞死を誘導することが報告されている (Muller A et al., 1997; Bonne C et al., 1998; Osborne NN et al., 2004)。また、網膜虚血再灌流による GCL および INL における網膜神経細胞のアポトーシスは、フリーラジカルスカベンジャーにより抑制されること (Shibuki H et al., 2000) が報告されている。一方、apelin は、心虚血再灌流により誘発される活性酸素種の産生を阻害することにより心筋細胞死を抑制すること (Zeng XJ et al., 2009)、ラット心室筋細胞 H9C2 細胞における低酸素処置/再酸素負荷により誘導されるミトコンドリアのスーパーオキシドの産生を阻害すること (Pisarenko O et al., 2015) が報告されている。また、apelin は、スーパーオキシドジスムターゼをはじめとする抗酸化酵素量の増加と活性酸素を発生させる NADPH オキシダーゼ量の減少を介して脂肪細胞における活性酸素種の産生と分泌を抑制すること (Than A et al., 2014)、H₂O₂ 暴露により誘発される神経細胞死に対して保護作用を示すこと (Kasai A et al., 2011) など、酸化的ストレスにより誘導される種々の障害に対して apelin が抑制作用を有することが数多く報告されている。本研究では、apelin-KO マウスにおいて、網膜虚血再灌流により誘導される GCL、INL および ONL における網膜神経細胞死が増加していた (Figure 7)。さらに、網膜虚血再灌流による網膜神経細胞の光刺激応答の低下が、apelin の欠損により促進された (Figure 8)。これらの結果から、網膜において apelin は、酸化的ストレスの抑制を介して網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死に対して保護作用を示す可能性が示唆された。

これまでに緑内障患者の硝子体および眼房水において高濃度の TNF- α が検出されていること (El-Azab MF et al., 2014; Balaiya S et al., 2011) や、虚血を伴う種々の網膜疾患患者の硝子体および眼房水における TNF- α レベルが上昇していること (Kovacs K et al., 2015; Jung SH et al., 2014) が報告されている。また、網膜虚血再灌流障害が TNF- α により促進されること (Biermann J et al., 2010; Zhang Y et al., 2015) や、網膜虚血再灌流により誘導される網膜神経細胞死は、TNF- α 受容体の遺伝子欠損により抑制されること (Berger S et al., 2008) が報告されている。また、本研究において、TNF- α 中和抗体の硝子体内投与により網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞死が抑制されたこと (Figure 9A) や、網膜虚血再灌流により網膜の

TNF- α mRNA レベルが著明に上昇すること (Figure 9B) を明らかにした。これらのことから、TNF- α が網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死において促進的に働いていることが示唆される。さらに、TNF- α を産生する Müller 細胞は、網膜虚血再灌流により活性化されること (Li SY et al., 2012) や、網膜虚血再灌流により誘導される TNF- α の発現上昇は、Müller 細胞でみられること (Gesslein B et al., 2010)、低酸素暴露によりラット Müller 細胞株 rMC-1 において TNF- α の産生増加がみられること (Li SY et al., 2012) が報告されている。一方、apelin は、脳虚血再灌流により誘導される TNF- α などの炎症性サイトカインの発現を抑制することにより神経細胞死を抑制することが報告されている (Xin Q et al., 2015)。本研究において、網膜虚血再灌流処置をした apelin-KO マウスの網膜における TNF- α mRNA レベルは、WT マウスと比較して著明な上昇がみられたこと (Figure 9B)、第 1 章で Müller 細胞に APJ の発現がみられたことから、内因性 apelin は、網膜虚血再灌流による網膜神経細胞死に対してオートクライン作用により Müller 細胞における TNF- α の発現抑制を介して保護作用を示す可能性が考えられた。

以上の結果より、内因性 apelin は、網膜虚血再灌流障害により引き起こされる緑内障の病態進行を抑制できる治療薬となる可能性が示唆された。第 3 章では、apelin が他の危険因子により誘発される網膜神経節細胞死に対して保護作用を有するか否かを明らかにするため、NMDA 誘発網膜神経障害モデルを用いて、グルタミン酸興奮毒性によって引き起こされる網膜神経節細胞死に対する apelin の保護作用について検討を行った。

第3章 NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する apelin の保護作用

グルタミン酸は、網膜神経節細胞を興奮させることが知られており、網膜神経節細胞に発現するグルタミン酸受容体として、NMDA 型受容体、カイニン酸型受容体および α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) 型受容体の3つのイオンチャネル型受容体と、G タンパク質と共役した代謝型受容体が確認されている (Atoji Y. 2015; Hartveit E et al., 1995)。その中でも特に、NMDA 型受容体は、 Ca^{2+} 透過性が高い受容体であることが知られており、過剰なグルタミン酸による NMDA 型受容体の刺激は、細胞内へ異常な Ca^{2+} 流入を引き起こし、カルパインなどの Ca^{2+} 依存性タンパク分解酵素の活性化を介して、網膜神経節細胞死を誘発することが知られている (Goll DE et al., 2003)。

緑内障患者の硝子体内において、高濃度のグルタミン酸が検出されていること (Dreyer EB et al., 1996; Vorwerk CK et al., 1999) や、緑内障患者の網膜では、細胞外グルタミン酸濃度を調節しているグルタミン酸トランスポーターの一つである excitatory amino acid transporter (EAAT-1) の発現が減少していることが報告されている (Naskar R et al., 2000)。さらに、EAAT-1 や他のグルタミン酸トランスポーター-glutamate-aspartate transporter (GLAST) を欠損させたマウスでは、正常眼圧であるにもかかわらず網膜神経節細胞死が著明に引き起こされることが、およびこの細胞死が NMDA 受容体アンタゴニストのメマンチンの投与により阻害されることが明らかにされている (Harada T et al., 2007)。これらのことから、緑内障における網膜神経節細胞死には、NMDA 受容体を介したグルタミン酸興奮毒性が関与すると考えられている。

第1章および第2章において、内因性 apelin は網膜神経節細胞死に対して保護作用を示すことを明らかにした。また、apelin は、海馬由来初代培養神経細胞において NMDA 受容体アゴニストであるキノリン酸により誘発される神経細胞死に対して保護作用を示すことが報告されている (O'Donnell LA et al., 2007)。これらのことから、apelin は、NMDA 受容体を介したグルタミン酸興奮毒性により誘発される網膜神経節細胞死に対して保護作用を示す可能性が考えられる。

そこで本章では、NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する apelin の保護作用について検討した。

実験方法

3-1. 動物

1-1. に準ずる。

3-2. DNA 抽出と遺伝子型の判定

1-2. に準ずる。

3-3. 硝子体内投与

2-4. に準ずる。NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニストである NMDA (40 nmol/eye, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)、[Pyr¹]-apelin-13 (apelin) (10 or 50 µg/eye, Peptide Institute; Osaka, Japan)、TNF-α 中和抗体 (1 µg/eye, Cell Signaling Technology)、ML221 (5 nmol/eye, Tocris Bioscience; Ellisville, MO, USA)、LY294002 (5 nmol/eye, Cell Signaling Technology) および PD98059 (5 nmol/eye, Cell Signaling Technology) をマウスの硝子体内へ 5-µL マイクロシリンジ (注射針: 33G 伊藤製作所) を用いて全量 1 µL 投与した。術後感染予防のためにノフロ (ノルフロキサシン 3 mg/mL 萬有製薬) を点眼した。

3-4. 組織学的解析

1-4. に準ずる。ただし、固定溶液には Zinc fixative (BD Pharmingen) を用いた。

3-5. TUNEL 染色

2-5. に準ずる。ただし、固定溶液には、Zinc fixative (BD Pharmingen) を用いた。対比染色には、hematoxylin (Millipore; Bedford, MA, USA) を用いた。

3-6. Real-time RT-PCR 法

1-6. に準ずる。

3-7. Western blotting

マウスを頸椎脱臼後、網膜を単離し、直ちに 50 μ L の lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 2% SDS, 10 mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , 100 μ M PMSF) に入れ、超音波により破碎し、100°Cで 10 分間の熱処理を行った。17,400 \times g で 10 分間遠心し、上清を試料とした。本試料に 5 \times Laemmli buffer (125 mM Tris-HCl, 25% glycerol, 5% SDS, 0.2% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol, pH 7.5) を加えて 10 分間熱処理を行い、蛋白質を変性させた。1 μ g の蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、immobilon-P transfer membrane (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) に転写した。その membrane を 1% skim milk と 0.05% Tween-20 を含む Tris-buffered saline (TBS; TBS-T) で blocking 後、TBS-T で membrane を洗浄し、一次抗体 [rabbit anti-phospho Akt、rabbit anti-Akt、rabbit anti-phospho extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、および rabbit anti-ERK1/2 antibodies (Cell Signaling Technology)] と反応させた (4°C、overnight)。その後、TBS-T で membrane を洗浄し、二次抗体 [anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology)] と反応させた (室温、2 時間)。TBS-T で洗浄した後、Enhanced Chemi-Luminescence (ECL) 法により蛋白質バンドを X 線フィルム (Fujifilm. Co. Ltd., Tokyo, Japan) に検出した。

3-8. Electroretinography

1-5. に準ずる。光刺激は、 1.0×10^{-3} cd \cdot s/m² の強さの光刺激を 5 秒間隔で 8 回行い、STR を測定した。

3-9. 統計学的解析

2-9. に準ずる。

実験結果

3-1. NMDA の硝子体内投与による網膜神経細胞死の誘導と網膜の apelin および APJ の発現変化

はじめに、NMDA を硝子体内投与した WT マウスの眼球切片を作製し、組織学的解析を行った。その結果、NMDA (40 nmol) の硝子体内投与 1 日後の網膜の HE 染色像において、GCL で細胞数の減少がみられ、3 日後の網膜ではさらに減少していた (Figure 13A)。また、NMDA の硝子体内投与 1 日後の網膜において、GCL および INL に TUNEL 陽性アポトーシス細胞が観察された (Figure 13B)。さらに、NMDA (40 nmol) の硝子体内投与 1 日後の網膜における apelin および APJ mRNA 発現を real-time RT-PCR 法により解析した結果、apelin および APJ mRNA 発現の著明な低下がみられた (Figure 13C and D)。

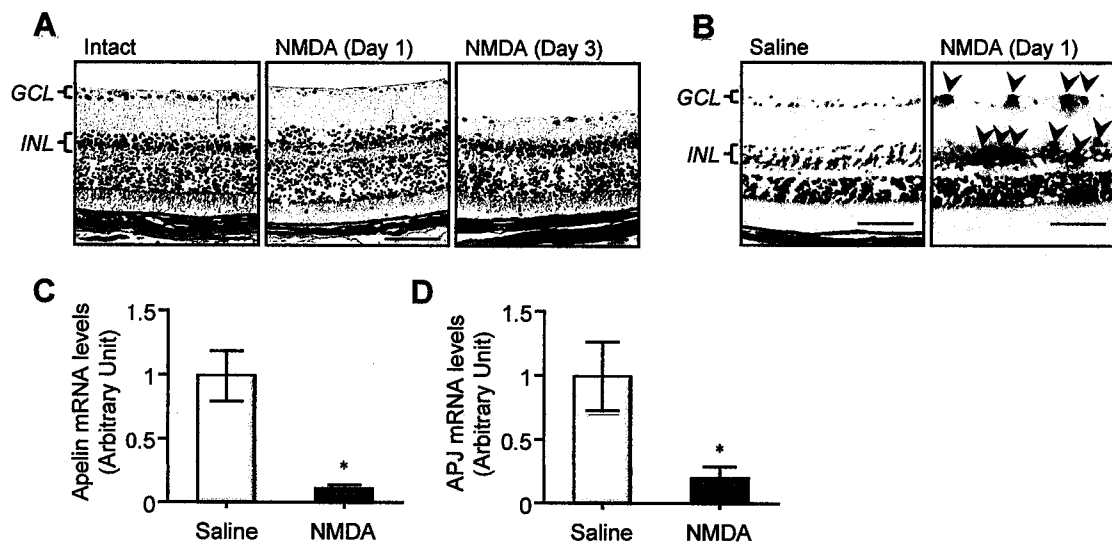


Figure 13. Intravitreal injection of NMDA causes to a loss of neuronal cells and reduces expression of apelin and APJ in the retina.

(A) Representative pictures show HE-stained retinal sections from non-treated WT mice or WT mice at 1 day and 3 days after intravitreal injection of NMDA (40 nmol). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer. The bar indicates 50 μ m. (B) Representative pictures show TUNEL-stained retinal sections from WT mice at 1 day after intravitreal injection of saline or NMDA (40 nmol). Arrowheads indicate TUNEL positive cells. The bar indicates 50 μ m. (C and D) Levels of apelin (C) and APJ (D) mRNA in the retinas at 24 hours after intravitreal injection of saline or NMDA (40 nmol) were examined by real-time-RT-PCR (n = 5-7). Data represent mean \pm SEM. * p < 0.05 vs. Saline.

3-2. NMDA 誘発網膜神経細胞死に対する apelin 欠損の影響

次に、NMDA の硝子体内投与により誘導される網膜神経細胞死に対する内因性 apelin の保護作用について明らかにするため、apelin-KO マウスを用いて検討を行った。無処置群における apelin-KO マウスの網膜神経節細胞数は、WT マウスと比較してほとんど差がみられなかった (Figure 1A)。一方、NMDA (40 nmol) を硝子体内投与した 1 日後および 3 日後の apelin-KO マウスの網膜では、WT マウスと比較して網膜神経節細胞数の有意な減少がみられた (Figure 16A)。また、NMDA (40 nmol) の硝子体内投与 1 日後の apelin-KO マウスの GCL および INL におけるアポトーシス細胞数は、WT マウスと比較して有意に増加した (Figure 16B and C)。この apelin-KO マウスの GCL および INL におけるアポトーシス細胞数の増加は、apelin (10 μ g) の硝子体内への同時投与により有意に抑制された (Figure 16D and E)。

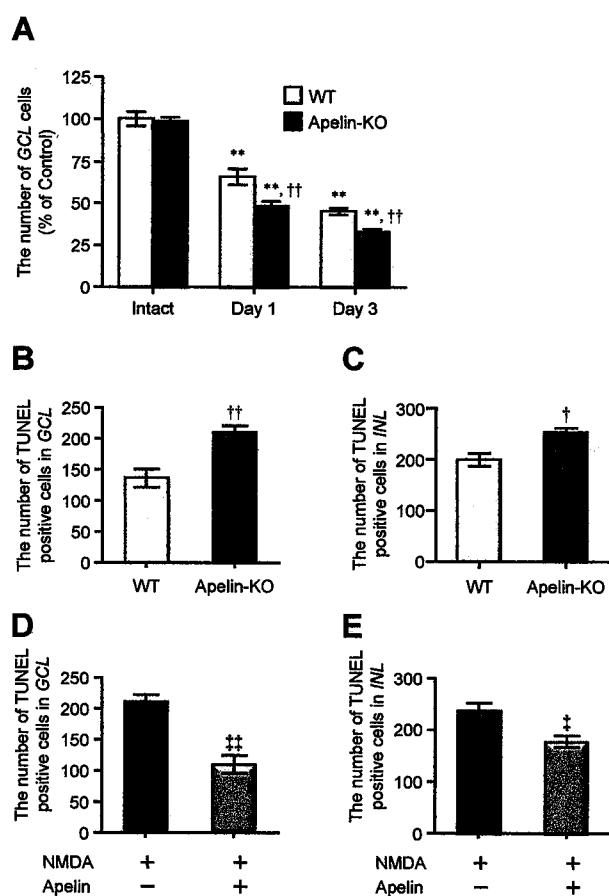


Figure 14. Apelin deficiency facilitates NMDA-induced retinal neuronal cell death.

(A) The numbers of GCL cells were counted in HE-stained retinal sections from WT mice and apelin-KO mice following an intravitreal injection of NMDA (40 nmol) or untreated-mice ($n = 3-4$). (B and C) The numbers of TUNEL positive cells were counted in GCL (B) and INL (C) in retinal sections from WT mice and apelin-KO mice at 1 day following an intravitreal injection of NMDA (40 nmol) ($n = 5$). (D and E) The numbers of TUNEL positive cells were counted in GCL (D) and INL (E) in retinal sections from apelin-KO mice at 1 day following an intravitreal injection of NMDA (40 nmol) alone or combined with apelin (10 μ g) ($n = 3$). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer. Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. intact, † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ vs. WT, ‡ $p < 0.05$ and ‡‡ $p < 0.01$ vs. NMDA alone.

3-3. NMDA の硝子体内投与による網膜の光刺激応答の低下に対する apelin 欠損の影響

次に、NMDA の硝子体内投与による網膜の光刺激応答低下に対する内因性 apelin の影響を検討した。Saline を硝子体内投与した apelin-KO マウスの STR の振幅は、WT マウスと比較して差はみられなかった (Figure 17A and B)。一方、NMDA (40 nmol) を硝子体内投与した apelin-KO マウスの STR の振幅は、NMDA を硝子体内投与した WT マウスと比較して著明な低下がみられた (Figure 17A and B)。

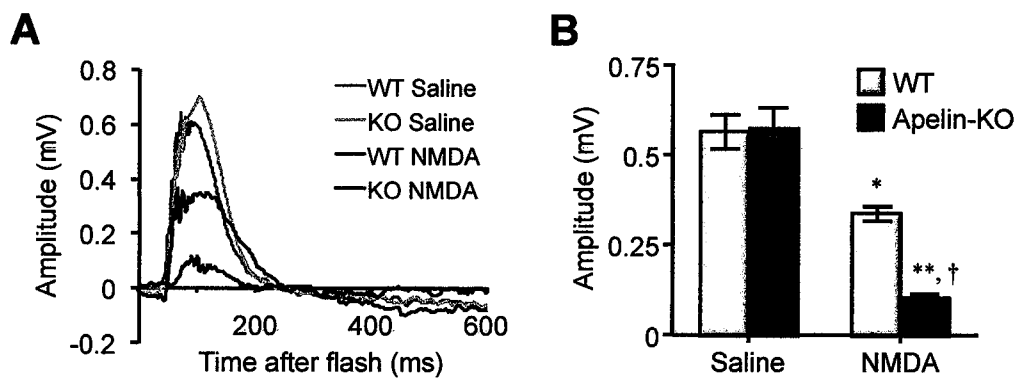


Figure 15. Apelin deficiency facilitates the STR reduction induced by NMDA.

(A) Representative waveforms show STR amplitudes elicited by $1.0 \times 10^{-3} \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ in the eyes of WT mice and apelin-KO mice at 1 day after intravitreal injection of saline or NMDA (40 nmol). (B) The STR amplitudes in WT mice and apelin-KO mice at 1 day following an intravitreal injection of saline or NMDA (40 nmol) were quantified by measuring from the baseline to the maximum peak ($n = 3-4$). Data represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. saline, † $p < 0.05$ vs. WT.

3-4. NMDA 誘発網膜神経細胞死に対する apelin の硝子体内投与による保護作用

次に、NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する apelin の硝子体内投与の影響を検討するため、NMDA と apelin を WT マウスの硝子体内へ同時投与した。その結果、NMDA (40 nmol) の硝子体内投与による GCL における細胞数の減少は、apelin (10 または 50 μ g) の同時投与により抑制され、その作用は用量依存的であった (Figure 14A)。また、NMDA の硝子体内投与により誘導される GCL および INL におけるアポトーシス細胞も、apelin の硝子体内投与により用量依存的に抑制された (Figure 14B and C)。この apelin の硝子体内投与によるアポトーシス抑制作用は、APJ アンタゴニストである ML221 (5 nmol) の同時投与により阻害された (Figure 14D and E)。また、GCL において、NMDA (40 nmol)、apelin (10 μ g)、および ML221 (5 nmol) の同時投与により誘導されたアポトーシス細胞数は、NMDA 単独投与と比較して有意に増加していた (Figure 14D)。

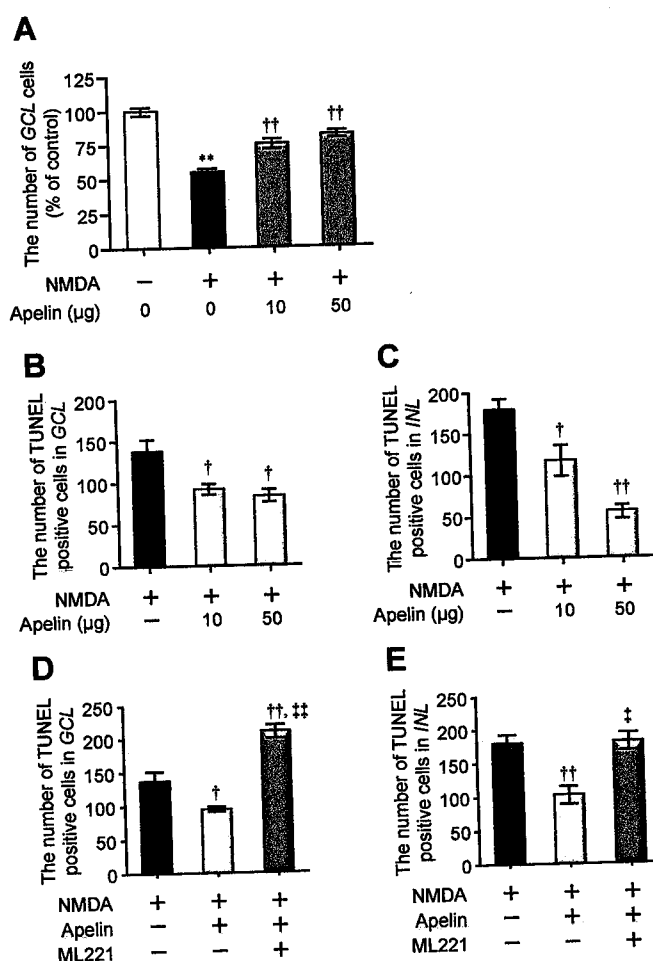


Figure 16. Intravitreal administration of apelin protects against NMDA-induced retinal neuronal cell death via APJ receptors.

(A) The numbers of GCL cells were counted in HE-stained retinal sections from WT mice at 1 day following an intravitreal administration of saline, NMDA (40 nmol) alone or NMDA (40 nmol) plus apelin (10 or 50 μ g) ($n = 3-8$). (B and C) The numbers of TUNEL positive cells were counted in GCL (B) and INL (C) in retinal sections from WT mice at 1 day following an intravitreal administration of NMDA (40 nmol) alone or combined with apelin (10 or 50 μ g) ($n = 5-8$). (D and E) The numbers of TUNEL positive cells were counted in GCL (D) and INL (E) in retinal sections from WT mice at 1 day following an intravitreal administration of NMDA (40 nmol) alone, NMDA (40 nmol) plus apelin (10 μ g), with or without ML221 (5 nmol) ($n = 3-8$). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer. Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. saline, † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ vs. NMDA alone, ‡ $p < 0.05$ and ‡‡ $p < 0.01$ vs. NMDA plus apelin.

3-5. NMDA の硝子体内投与による網膜の光刺激応答の低下に対する apelin の抑制作用

次に、光刺激装置を用いて、NMDA 硝子体内投与後の WT マウスにおける網膜電図を測定した。その結果、saline を投与したマウスの STR の振幅は、無処置のマウスと比較して差はみられなかったが (data not shown)、NMDA (40 nmol) の硝子体内投与 1 日後のマウスでは、STR の振幅の顕著な低下がみられた (Figure 15A and B)。この NMDA の硝子体内投与による STR の振幅の低下は、apelin (50 μ g) の同時投与により有意に抑制された (Figure 15A and B)。

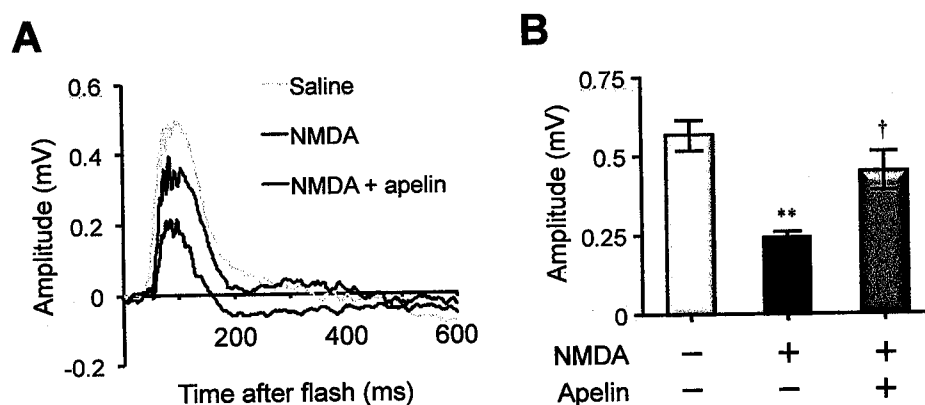


Figure 17. Intravitreal administration of apelin prevents the STR reduction induced by NMDA. (A) Representative waveforms show the STR amplitudes elicited by 1.0×10^{-3} cd·s/m² in the eyes of WT mice at 1 day after intravitreal injection of saline, NMDA (40 nmol) alone or NMDA (40 nmol) plus apelin (50 μ g). (B) The STR amplitudes in WT mice at 1 day following an intravitreal injection of saline, NMDA (40 nmol) alone or NMDA (40 nmol) plus apelin (50 μ g) were quantified by measuring from the baseline to the maximum peak ($n = 3-4$). Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. saline, † $p < 0.05$ vs. NMDA alone.

3-6. NMDA の硝子体内投与による網膜における TNF- α 発現上昇に対する apelin の抑制作用

NMDA 誘発網膜神経節細胞死は、炎症性サイトカインの一つである TNF- α により促進されることが報告されている (Lebrun-Julien F et al., 2009)。また、第2章において、内因性 apelin が TNF- α の発現抑制を介して、網膜虚血再灌流により誘発される網膜神経節細胞死に対して保護作用を示すことを明らかにした。そこで、NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する apelin の保護作用への TNF- α の関与について検討した。その結果、NMDA (40 nmol) の硝子体内投与による網膜神経節細胞数の減少は、TNF- α 中和抗体 (1 μ g) の同時投与により有意に抑制された (Figure 18A)。次に、網膜における TNF- α mRNA 発現に対する NMDA 硝子体内投与の影響を real-time RT-PCR 法により解析した結果、NMDA の硝子体内投与により WT マウスおよび apelin-KO マウスの網膜における TNF- α mRNA 発現の著明な上昇がみられた (Figure 18B)。この TNF- α mRNA 発現上昇は、WT マウスと比較して、apelin-KO マウスで著明にみられた (Figure 18B)。さらに、NMDA (40 nmol) による TNF- α 発現上昇は、apelin (10 μ g) の同時投与により有意に抑制された (Figure 18C)。

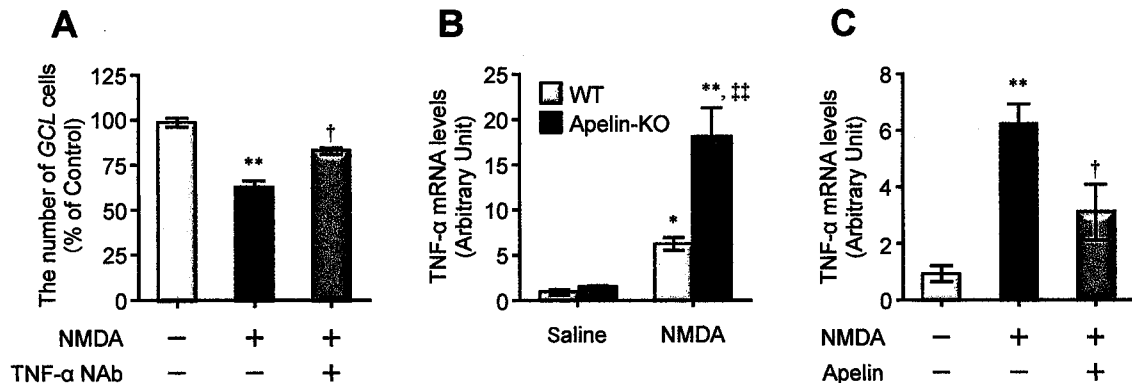


Figure 18. Apelin prevents the upregulation of TNF- α expression in the retina induced by intravitreal injection of NMDA.

(A) The numbers of GCL cells were counted in HE-stained retinal sections obtained from WT mice at 24 hours after intravitreal injection of saline, NMDA (40 nmol) or NMDA (40 nmol) plus mouse TNF- α neutralizing antibody (NAb) (1 μ g) (n = 3). GCL, ganglion cell layer. (B) TNF- α expression levels in the retinas of WT mice and apelin-KO mice at 24 hours following an intravitreal injection of saline or NMDA (40 nmol) were examined by real-time RT-PCR (n = 6-8). (C) TNF- α expression levels in the retinas of WT mice at 24 hours following an intravitreal injection of NMDA (40 nmol) alone or combined with apelin (10 μ g) were examined by real-time RT-PCR (n = 6-8). * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. saline, † p < 0.05 vs. NMDA alone, ‡ p < 0.01 vs. WT.

3-7. NMDA 誘発網膜神経細胞死に対する Akt および ERK の活性化を介した apelin の保護作用

NMDA による網膜神経節細胞のアポトーシスは、細胞生存シグナルとして知られる Akt および ERK1/2 の活性化により抑制されること (Levkovitch-Verbin H et al., 2007; Yang X et al., 2013)、また、apelin は Akt および ERK1/2 の活性化を介して、培養神経細胞におけるグルタミン酸誘発神経細胞死に対して保護作用を示すことが報告されている (O'Donnell LA et al., 2007)。そこで、NMDA 誘発網膜神経細胞死に対する apelin の保護作用への Akt および ERK1/2 シグナルの関与を検討する目的で、網膜のリン酸化 Akt (p-Akt) およびリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 量に対する apelin 硝子体内投与の影響について、western blotting により解析した。その結果、apelin (10 μ g) の硝子体内投与 1 時間後の網膜において、p-Akt および p-ERK1/2 量の有意な増加がみられた (Figure 19)。この apelin 投与による p-Akt および p-ERK1/2 量の増加は、ML221 (5 nmol) の同時投与により抑制された (Figure 19)。

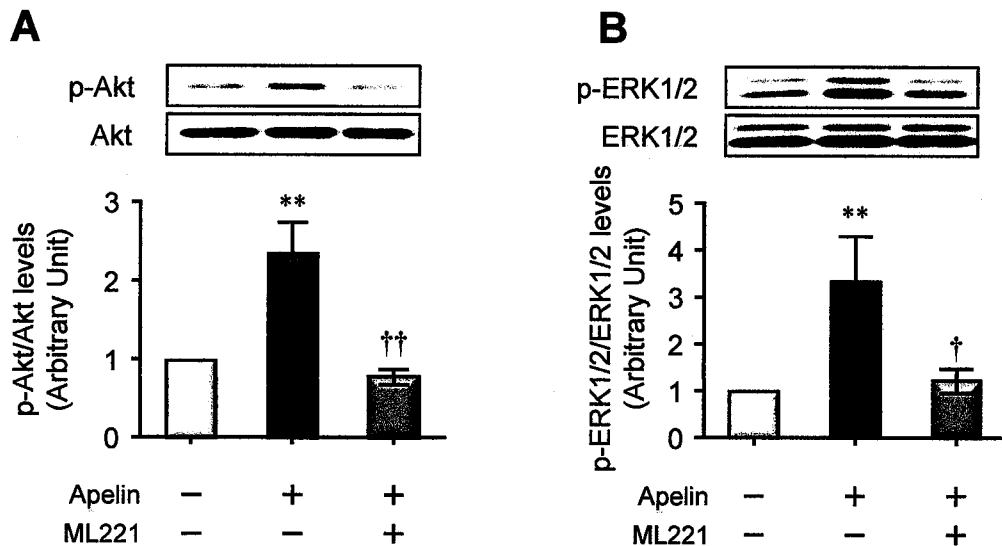


Figure 19. Apelin injection into the vitreous body induces the phosphorylation of Akt and ERK1/2 in the retina.

(A and B) Levels of phosphorylated-Akt (p-Akt) (A) and phosphorylated-ERK1/2 (p-ERK1/2) (B) in the retinas of WT mice at 1 hour following an intravitreal injection of saline, apelin (10 μ g) or apelin plus ML221 (5 nmol) were examined by western blotting (n = 5-9). ** p < 0.01 vs. saline, † p < 0.05 and †† p < 0.01 vs. apelin alone.

次に、NMDA 誘発網膜神経細胞死に対する apelin の保護作用が Akt および ERK1/2 の活性化を介するか否かを明らかにする目的で、Akt の活性化酵素である PI3 kinase の阻害剤 LY294002 および ERK1/2 の活性化酵素である MEK1 の阻害剤 PD98059 を用いて検討した。その結果、apelin (10 μ g) の硝子体内投与 1 時間後にみられる網膜の p-Akt および p-ERK1/2 量の増加は、LY294002 (5 nmol) または PD98059 (5 nmol) の同時投与により抑制された (Figure 20A and B)。さらに、NMDA 硝子体内投与 1 日後にみられる GCL および INL のアポトーシスに対する apelin の抑制作用は、LY294002 または PD98059 の同時投与により阻害された (Figure 20C and D)。

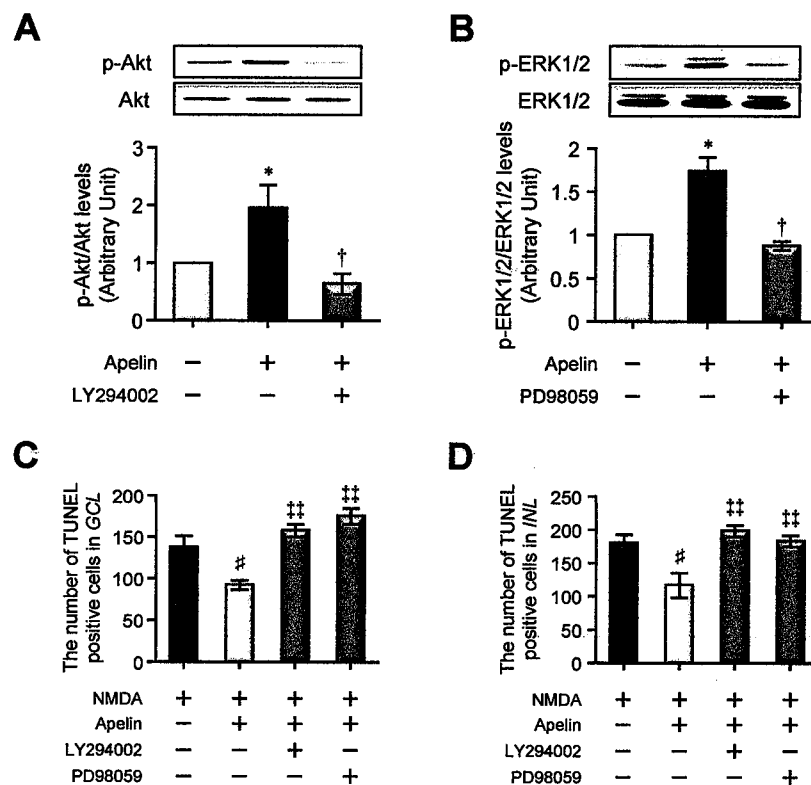


Figure 20. Intravitreal injection of apelin protects against NMDA-induced retinal neuronal cell death via the activation of Akt and ERK1/2.

(A and B) Levels of p-Akt (A) and p-ERK1/2 (B) in the retinas of WT mice at 1 hour following an intravitreal injection of saline, apelin (10 μ g), apelin plus LY294002 (5 nmol) or PD98059 (5 nmol) were examined by western blotting (n = 3-7). (C and D) The numbers of TUNEL positive cells were counted in GCL (C) and INL (D) in retinal sections from WT mice at 1 day after intravitreal injection of NMDA (40 nmol) alone, NMDA (40 nmol) plus apelin (10 μ g) with or without LY294002 (5 nmol) or PD98059 (5 nmol) (n = 3-8). Data represent mean \pm SEM. * p < 0.05 vs. saline, † p < 0.05 vs. apelin alone, # p < 0.05 vs. NMDA alone, ‡ p < 0.01 vs. NMDA plus apelin.

考察

本章では、NMDA 受容体を介したグルタミン酸による網膜神経節細胞死および STR の振幅の低下に対する内因性 apelin 欠損および apelin の硝子体内投与の影響について検討した。その結果、NMDA の硝子体内投与により誘発された網膜神経節細胞死および STR の振幅の低下は、apelin の欠損により促進され (Figure 14 and 15)、apelin の硝子体内投与により抑制された (Figure 16 and 17)。この apelin 投与による NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する保護作用は、APJ アンタゴニスト ML221 の同時投与により抑制された (Figure 16D and E)。また、NMDA の硝子体内投与により誘導された網膜の TNF- α の発現上昇は、内因性 apelin および apelin の硝子体内投与により抑制され (Figure 18B and C)、NMDA 誘発網膜神経節細胞死は、TNF- α 中和抗体により抑制された (Figure 18A)。さらに、apelin の硝子体内投与による網膜神経保護作用は、Akt および ERK1/2 の阻害剤により抑制された (Figure 20C and D)。これらの結果より、apelin は、NMDA 受容体を介したグルタミン酸による網膜神経細胞死に対して TNF- α の発現抑制および Akt、ERK の活性化を介して保護作用を示すことが示唆された。

緑内障患者の硝子体内のグルタミン酸濃度が上昇していること (Dreyer EB et al., 1996; Vorwerk CK et al., 1999) や、グルタミン酸の代謝異常が網膜神経節細胞死を引き起こすこと (Harada T et al., 1998) が報告されている。本研究において、NMDA を硝子体内投与したマウスの網膜において apelin および APJ mRNA 発現が著明に低下することを見出した (Figure 13C and D)。この結果は、硝子体内のグルタミン酸濃度が高い緑内障患者の網膜では、apelin および APJ 発現量が低下していることを示唆しており、緑内障モデルラットの網膜神経節細胞において GPCR の発現が低下しているという報告に類似するものである (Wang DY et al., 2010)。さらに、apelin-KO マウスでは、NMDA 誘発網膜神経節細胞死が促進すること (Figure 14)、および NMDA 単独投与により誘発される網膜神経節細胞死は、APJ アンタゴニストと apelin の同時投与により有意に増加したこと (Figure 16D) から、内因性 apelin は NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対して保護作用を有することが示唆される。これらのことから、過剰なグルタミン酸による網膜の apelin および APJ 発現の低下が緑内障における網膜神経節細胞死に関与している可能性が考えられる。

NMDA 受容体アンタゴニストであるメマンチンは、様々な緑内障モデル動物において、網膜神経節細胞を保護すること (Vorwerk CK et al., 1996; Schuettauf F et al., 2002; Hare WA et al., 2004; Hare WA et al., 2004) が報告されており、緑内障の新たな治療薬として期待されてきた。しかしながら、臨床試験において、メマンチンは緑内障の病態進行に対して有意な抑制効果を示すことができなかったことが報告されている (Danesh-Meyer HV., 2011)。NMDA 受容体は、構成するサブユニットの組み合わせや発現する部位によって作用が異なる

り、細胞死あるいは細胞生存の両方に働くことが知られている (Hardingham GE et al., 2002; Liu Y et al., 2007)。また、apelin は興奮毒性を引き起こす NR2B サブユニットを含む NMDA 受容体の機能を阻害することが報告されている (Cook DR et al., 2011)。本研究において、内因性および外因性 apelin が NMDA 誘発網膜神経細胞死に対して保護作用を示したこと (Figure 14 and 16) から、apelin は、緑内障の治療薬としての有用性が期待できる。

本研究において、NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対して TNF- α 中和抗体が保護作用を示すこと (Figure 18A) を明らかにした。また、NMDA の硝子体内投与により誘導される TNF- α は、網膜における AMPA 型グルタミン酸受容体の発現上昇を介してグルタミン酸に対する感受性を増加させることが報告されている (Lebrun-Julien F et al., 2009)。これらのことは、グルタミン酸興奮毒性に対して TNF- α が促進的に働くことを示している。本研究において、NMDA の硝子体内投与により、網膜における TNF- α 発現上昇 (Figure 18B and C) と apelin および APJ 発現の低下 (Figure 13C and D) がみられた。この TNF- α の発現上昇は、apelin 遺伝子欠損により促進され、apelin の硝子体内投与により抑制された (Figure 18B and C)。これらのことから、apelin は、TNF- α の発現抑制を介してグルタミン酸興奮毒性を減弱する可能性が示唆された。

網膜神経節細胞の生存には、Akt および ERK の活性化が重要な役割を果たすことが報告されている (Kilic U et al., 2006; Zhou Y et al., 2005)。さらに、緑内障モデルラットの網膜神経節細胞において Akt のシグナル伝達経路に關与する遺伝子の発現低下がみられること (Wang DY et al., 2010) や、NMDA の硝子体内投与により網膜神経細胞におけるリン酸化 Akt の脱リン酸化が生じること (Nakazawa T et al., 2005) が報告されている。Apelin/APJ system の細胞内シグナル経路は、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase) の活性化を介して Akt を活性化すること (Masri B et al., 2004; Eyries M et al., 2008; O'Donnell LA et al., 2007) や、protein kinase C を活性化することにより MAPK/ERK kinase1/2 (MEK1/2) の活性化を介して ERK1/2 を活性化すること (Masri B. et al., 2002; O'Donnell LA. et al., 2007) が報告されている。本研究では、apelin の硝子体内投与により網膜における Akt および ERK1/2 の活性化がみられ、この作用は ML221 の同時投与により抑制された (Figure 19A and B)。さらに、NMDA 誘発網膜神経細胞死に対する apelin の硝子体内投与による保護作用は、PI3 kinase および MEK1 の阻害剤の同時投与により抑制された (Figure 20A and B)。これらのことから、apelin の硝子体内投与による網膜神経保護作用は、Akt および ERK1/2 シグナルの活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の結果より、apelin は、NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対して TNF- α の発現抑制および Akt、ERK1/2 の活性化を介して保護作用を示すことが示唆された。

総括

緑内障における新規治療薬としての *apelin* の有用性を見出すことを目指し、老齢マウス、網膜虚血再灌流モデルマウスおよび NMDA 誘発網膜神経障害モデルマウスを用いて解析を行い、以下に示す結論を得た。

1. 成体マウスの網膜において *apelin* は、Müller 細胞に発現がみられ、APJ は、網膜神経節細胞、アマクリン細胞および Müller 細胞に発現がみられることを明らかにし、*apelin*/APJ システムが神経グリア間で機能している可能性を見出した。さらに、加齢に伴う網膜神経節細胞の脱落が *apelin*-KO マウスの網膜において著明にみられたことから、内因性 *apelin* が成体マウスの網膜において、神経保護的な役割を有することを見出した。
2. 網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞死が *apelin*-KO マウスで促進していたことから、内因性 *apelin* が網膜虚血再灌流により誘導される網膜神経節細胞死に対して保護作用を有することを見出した。また、この *apelin* の保護作用は、網膜虚血再灌流により誘導される TNF- α 発現の抑制を介する可能性を見出した。
3. NMDA の硝子体内投与により誘導される網膜神経節細胞死は、*apelin*-KO マウスで促進がみられ、さらに、*apelin* の硝子体内投与により抑制されたことから、*apelin* が NMDA 受容体を介したグルタミン酸興奮毒性により誘導される網膜神経節細胞死に対して保護作用を示すことを明らかにした。また、この *apelin* の保護作用は、NMDA により誘導される TNF- α 発現上昇の抑制と、Akt および ERK1/2 シグナルを介する可能性を見出した。
4. マウスの網膜における *apelin* の発現は、加齢、網膜虚血再灌流、および過剰なグルタミン酸刺激により低下することを見出した。

以上、*apelin* は、網膜神経節細胞に対して保護的な役割を担う因子であることが明らかとなった。緑内障の危険因子として知られる加齢、網膜虚血再灌流および過剰なグルタミン酸刺激により網膜における *apelin* の発現量が低下したことは興味深い点であり、緑内障患者の網膜における *apelin* の発現が低下している可能性が示唆された。また、これらの危険因子による網膜神経節細胞死が *apelin* の欠損により促進したこと、さらに、過剰なグルタミン酸

刺激による網膜神経節細胞死に対して apelin の硝子体内投与が保護作用を示したことから、apelin が緑内障における網膜神経節細胞死に対して保護作用を示す可能性が示唆された。

本研究で得られた知見から、眼圧非依存的に病態が進行する緑内障に対して apelin が抑制効果を示す可能性や、既存の眼圧降下剤に加えて apelin を併用することにより、相加的に緑内障における網膜神経節細胞死を抑制できる可能性が期待できる。本研究では、apelin がペプチドであることから、網膜への薬物の到達が確実な方法である硝子体内投与を行った。しかしながら、硝子体内投与は、眼科臨床で一般的に行われているものの、侵襲性が高く、患者の精神面の負担が大きいこと、かつ感染症などの合併症の危険性があることなどの複数の問題を抱えている。したがって、より安全な投与経路である内服や点眼により神経保護作用を示すか否かを明らかにすることが重要である。本研究結果より、緑内障治療における apelin の有用性が示されたことから、apelin を網膜組織に到達させる Drug Delivery System の開発、および低分子 APJ 選択的アゴニストの開発が臨床応用に向けての大きな課題である。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師、摂南大学薬学部薬物治療学研究室教授、前田定秋先生に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、直接の御指導を賜りました摂南大学薬学部薬物治療学研究室助教、石丸侑希先生に深謝致します。

また、種々御討論、御指導戴きました摂南大学薬学部薬物治療学研究室准教授、吉岡靖啓先生、同助手、山室晶子先生に感謝致します。

さらに、本研究に多大なる御協力と御支援戴きました梶岡大暉学士、柴垣郁弥学士、山本祐基氏、藤本真由美氏、ならびに摂南大学薬学部、薬物治療学研究室の皆様へ感謝致します。

最後に、apelin-KO マウスを提供して頂きました武田薬品工業株式会社に心より御礼申し上げます。

引用文献

Akopian A, Kumar S, Ramakrishnan H, Viswanathan S, Bloomfield SA. Amacrine cells coupled to ganglion cells via gap junctions are highly vulnerable in glaucomatous mouse retinas. *J Comp Neurol.* (2016) doi: 10.1002/cne.24074. [Epub ahead of print]

Amerasinghe N, Aung T, Cheung N, Fong CW, Wang JJ, Mitchell P, Saw SM, Wong TY. Evidence of retinal vascular narrowing in glaucomatous eyes in an Asian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2008) **49**(12): 5397-402.

Atoji Y. Expression of ionotropic glutamate receptors, AMPA, kainite and NMDA, in the pigeon retina. *Exp Eye Res.* (2015) **136**: 72-7.

Balaiya S, Edwards J, Tillis T, Khetpal V, Chalam KV. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels in aqueous humor of primary open angle glaucoma. *Clin Ophthalmol.* (2011) **5**: 553-6.

Bao HJ, Qiu HY, Kuai JX, Song CJ, Wang SX, Wang CQ, Peng HB, Han WC, Wu YP. Apelin-13 as a novel target for intervention in secondary injury after traumatic brain injury. *Neural Regen Res.* (2016) **11**(7): 1128-33.

Berger S, Savitz SI, Nijhawan S, Singh M, David J, Rosenbaum PS, Rosenbaum DM. Deleterious role of TNF-alpha in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2008) **49**(8): 3605-10.

Biermann J, Lagrèze WA, Dimitriu C, Stoykow C, Goebel U. Preconditioning with inhalative carbon monoxide protects rat retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2010) **51**(7): 3784-91.

Bircan B, Çakır M, Kırbağ S, Gül HF. Effect of apelin hormone on renal ischemia/reperfusion induced oxidative damage in rats. *Ren Fail.* (2016) **38**(7): 1122-8.

Bonne C, Muller A, Villain M. Free radicals in retinal ischemia. *Gen Pharmacol.* (1998) **30**(3): 275-80.

Bringmann A, Reichenbach A. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* (2001) **6**: E72-92.

Brody BL, Gamst AC, Williams RA, Smith AR, Lau PW, Dolnak D, Rapaport MH, Kaplan RM, Brown SI. Depression, visual acuity, comorbidity, and disability associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* (2001) **108**(10): 1893-900

Casola C, Reinehr S, Kuehn S, Stute G, Spiess BM, Dick HB, Joachim SC. Specific Inner Retinal Layer Cell Damage in an Autoimmune Glaucoma Model Is Induced by GDNF With or Without HSP27. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2016) **57**(8): 3626-39.

Chen H, Weber AJ. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2001) **42**(5): 966-74.

Choe W, Albright A, Sulcove J, Jaffer S, Hesselgesser J, Lavi E, Crino P, Kolson DL. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol.* (2000) **Suppl 1**: S61-9.

Chrysostomou V, Galic S, van Wijngaarden P, Trounce IA, Steinberg GR, Crowston JG. Exercise reverses age-related vulnerability of the retina to injury by preventing complement-mediated synapse elimination via a BDNF-dependent pathway. *Aging Cell.* (2016) doi: 10.1111/acer.12512.

Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y, Kundu RK, Sheikh AY, Agrawal R, Zheng L, Leeper NJ, Pearl NE, Patterson AJ, Anderson JP, Tsao PS, Lenardo MJ, Ashley EA, Quertermous T. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest.* (2008) **118**(10): 3343-54.

Cioffi GA, Orgül S, Onda E, Bacon DR, Van Buskirk EM. An in vivo model of chronic optic nerve ischemia: the dose-dependent effects of endothelin-1 on the optic nerve microvasculature. *Curr Eye Res.* (1995) **14**(12): 1147-53.

Claudepierre T. Pigment epithelium-derived factor released by Müller glial cells exerts

neuroprotective effects on retinal ganglion cells. *Neurochem Res.* (2012) **37**(7): 1524-33.

Cook DR, Gleichman AJ, Cross SA, Doshi S, Ho W, Jordan-Sciutto KL, Lynch DR, Kolson DL. NMDA receptor modulation by the neuropeptide apelin: implications for excitotoxic injury. *J Neurochem.* (2011) **118**(6): 1113-23.

Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol.* (2006) **296**(1): 177-89.

Cueva Vargas JL, Osswald IK, Unsain N, Aourousseau MR, Barker PA, Bowie D, Di Polo A. Soluble Tumor Necrosis Factor Alpha Promotes Retinal Ganglion Cell Death in Glaucoma via Calcium-Permeable AMPA Receptor Activation. *J Neurosci.* (2015) **35**(35): 12088-102.

Danesh-Meyer HV. Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions. *Curr Opin Ophthalmol.* (2011) **22**(2): 78-86.

Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol.* (1996) **114**(3): 299-305.

El-Azab MF, Baldowski BR, Mysona BA, Shanab AY, Mohamed IN, Abdelsaid MA, Matragoon S, Bollinger KE, Saul A, El-Remessy AB. Deletion of thioredoxin-interacting protein preserves retinal neuronal function by preventing inflammation and vascular injury. *Br J Pharmacol.* (2014) **171**(5): 1299-313.

Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, Soubrier F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res.* (2008) **103**(4): 432-40.

Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, Parini A, Kunduzova O. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett.* (2010) **584**(11): 2363-70.

Gesslein B, Håkansson G, Gustafsson L, Ekström P, Malmjö M. Tumor necrosis factor and its receptors in the neuroretina and retinal vasculature after ischemia-reperfusion injury in the pig retina. *Mol Vis.* (2010) **16**: 2317-27.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* (2003) **83**(3): 731-801.

Gupta V, You Y, Li J, Gupta V, Golzan M, Klistorner A, van den Buuse M, Graham S. BDNF impairment is associated with age-related changes in the inner retina and exacerbates experimental glaucoma. *Biochim Biophys Acta.* (2014) **1842**(9): 1567-78

Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HM, Okumura A, Namekata K, Saeki T, Aihara M, Yoshida H, Mitani A, Tanaka K. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest.* (2007) **117**(7): 1763-70.

Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N, Sasaki S, Okuyama S, Watase K, Wada K, Tanaka K. Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998) **95**(8): 4663-6.

Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci.* (2002) **5**(5): 405-14.

Hare WA, WoldeMussie E, Lai RK, Ton H, Ruiz G, Chun T, Wheeler L. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, I: Functional measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2004) **45**(8): 2625-39.

Hare WA, WoldeMussie E, Weinreb RN, Ton H, Ruiz G, Wijono M, Feldmann B, Zangwill L, Wheeler L. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, II: Structural measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2004) **45**(8): 2640-51.

Hartveit E, Brandstätter JH, Enz R, Wässle H. Expression of the mRNA of seven metabotropic glutamate receptors (mGluR1 to 7) in the rat retina. An in situ hybridization study on tissue sections

and isolated cells. *Eur J Neurosci.* (1995) **7**(7): 1472-83.

Harwerth RS, Wheat JL, Rangaswamy NV. Age-related losses of retinal ganglion cells and axons. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2008) **49**(10):4437-43.

Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M; Early Manifest Glaucoma Trial Group. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol.* (2002) **120**(10): 1268-79.

Huang L, Shen X, Fan N, He J. Clinical application of photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open-angle Glaucoma. *Eye Sci.* (2012) **27**(3): 113-8.

Ivers RQ, Cumming RG, Mitchell P, Simpson JM, Peduto AJ. Visual risk factors for hip fracture in older people. *J Am Geriatr Soc.* (2003) **51**(3): 356-63.

Iwase A, Suzuki Y, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S, Kuwayama Y, Mishima HK, Shimizu H, Tomita G, Inoue Y, Kitazawa Y; Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology.* (2004) **111**(9): 1641-8.

Joly S, Pernet V, Chemtob S, Di Polo A, Lachapelle P. Neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy: evidence suggesting a role for FGF-2 and CNTF. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2007) **48**(5): 2311-20.

Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002) **99**(16): 10659-64.

Jung SH, Kim KA, Sohn SW, Yang SJ. Association of aqueous humor cytokines with the development of retinal ischemia and recurrent macular edema in retinal vein occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2014) **55**(4): 2290-6.

Kasai A, Ishimaru Y, Kinjo T, Satooka T, Matsumoto N, Yoshioka Y, Yamamuro A, Gomi F,

Shintani N, Baba A, Maeda S. Apelin is a crucial factor for hypoxia-induced retinal angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2010) **30(11)**: 2182-7.

Kasai A, Kinjo T, Ishihara R, Sakai I, Ishimaru Y, Yoshioka Y, Yamamuro A, Ishige K, Ito Y, Maeda S. Apelin deficiency accelerates the progression of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* (2011) **6(8)**: e23968.

Kasai A, Shintani N, Kato H, Matsuda S, Gomi F, Haba R, Hashimoto H, Kakuda M, Tano Y, Baba A. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2008) **28(10)**: 1717-22.

Kawasaki R, Wang JJ, Rochtchina E, Lee AJ, Wong TY, Mitchell P. Retinal vessel caliber is associated with the 10-year incidence of glaucoma: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology.* (2013) **120(1)**: 84-90.

Khaksari M, Aboutaleb N, Nasirinezhad F, Vakili A, Madjd Z. Apelin-13 protects the brain against ischemic reperfusion injury and cerebral edema in a transient model of focal cerebral ischemia. *J Mol Neurosci.* (2012) **48(1)**: 201-8.

Kido N, Tanihara H, Honjo M, Inatani M, Tatsuno T, Nakayama C, Honda Y. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Res.* (2000) **884(1--2)**: 59-67.

Kilic U, Kilic E, Järve A, Guo Z, Spudich A, Bieber K, Barzena U, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci.* (2006) **26(48)**: 12439-46.

Kirkiewicz M, Lubiński W, Penkala K. Photopic negative response of full-field electroretinography in patients with different stages of glaucomatous optic neuropathy. *Doc Ophthalmol.* (2016) **132(1)**: 57-65.

Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC, Chen CF. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci Lett.* (2001)

305(2): 139-42.

Kovacs K, Marra KV, Yu G, Wagley S, Ma J, Teague GC, Nandakumar N, Lashkari K, Arroyo JG. Angiogenic and Inflammatory Vitreous Biomarkers Associated With Increasing Levels of Retinal Ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2015) **56(11): 6523-30.**

Lau J, Dang M, Hockmann K, Ball AK. Effects of acute delivery of endothelin-1 on retinal ganglion cell loss in the rat. *Exp Eye Res.* (2006) **82(1): 132-45.**

Lebrun-Julien F, Duplan L, Pernet V, Osswald I, Sapieha P, Bourgeois P, Dickson K, Bowie D, Barker PA, Di Polo A. Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *J Neurosci.* (2009) **29(17): 5536-45.**

Levkovitch-Verbin H, Harizman N, Dardik R, Nisgav Y, Vander S, Melamed S. Regulation of cell death and survival pathways in experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* (2007) **85(2): 250-8.**

Li SY, Fung FK, Fu ZJ, Wong D, Chan HH, Lo AC. Anti-inflammatory effects of lutein in retinal ischemic/hypoxic injury: in vivo and in vitro studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2012) **53(10): 5976-84.**

Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci.* (2007) **27(11): 2846-57.**

Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun.* (2002) **290(1): 539-45.**

Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J.* (2004) **18(15): 1909-11.**

Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, Lawrie KW, Hervieu G, Riley G, Bolaky JE, Herrity NC, Murdock P, Darker JG. Pharmacological and immunohistochemical

characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem.* (2003) **84**(5): 1162-72.

Mitchell P, Leung H, Wang JJ, Rochtchina E, Lee AJ, Wong TY, Klein R. Retinal vessel diameter and open-angle glaucoma: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology.* (2005) **112**(2): 245-50.

Muller A, Pietri S, Villain M, Frejaville C, Bonne C, Culcas M. Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Exp Eye Res.* (1997) **64**(4): 637-43.

Musch DC, Gillespie BW, Lichter PR, Niziol LM, Janz NK; CIGTS Study Investigators. Visual field progression in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study the impact of treatment and other baseline factors. *Ophthalmology.* (2009) **116**(2): 200-7.

Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Michaud N, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Benowitz LI. Tumor necrosis factor- α mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci.* (2006) **26**(49): 12633-41.

Nakazawa T, Shimura M, Endo S, Takahashi H, Mori N, Tamai M. N-Methyl-D-Aspartic acid suppresses Akt activity through protein phosphatase in retinal ganglion cells. *Mol Vis.* (2005) **11**: 1173-82.

Naskar R, Vorwerk CK, Dreyer EB. Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2000) **41**(7): 1940-4.

Nishijima K, Ng YS, Zhong L, Bradley J, Schubert W, Jo N, Akita J, Samuelsson SJ, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol.* (2007) **171**(1): 53-67.

Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* (2004) **23**(1): 91-147.

O'Donnell LA1, Agrawal A, Sabnekar P, Dichter MA, Lynch DR, Kolson DL. Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *J Neurochem.* (2007) **102(6)**: 1905-17.

Paasche G, Huster D, Reichenbach A. The glutathione content of retinal Müller (glial) cells: the effects of aging and of application of free-radical scavengers. *Ophthalmic Res.* (1998) **30(6)**: 351-60.

Pang JJ, Frankfort BJ, Gross RL, Wu SM. Elevated intraocular pressure decreases response sensitivity of inner retinal neurons in experimental glaucoma mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2015) **112(8)**: 2593-8.

Pisarenko O, Shulzhenko V, Studneva I, Pelogeykina Y, Timoshin A, Anesia R, Valet P, Parini A, Kunduzova O. Structural apelin analogues: mitochondrial ROS inhibition and cardiometabolic protection in myocardial ischaemia reperfusion injury. *Br J Pharmacol.* (2015) **172(12)**: 2933-45.

Puffer BA, Sharron M, Coughlan CM, Baribaud F, McManus CM, Lee B, David J, Price K, Horuk R, Tsang M, Doms RW. Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses. *Virology.* (2000) **276(2)**: 435-44.

Rattner A, Nathans J. The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *J Neurosci.* (2005) **25(18)**: 4540-9.

Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Héon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Crick RP, Sarfarazi M. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science.* (2002) **295(5557)**: 1077-9.

Sakimoto S, Kidoya H, Naito H, Kamei M, Sakaguchi H, Goda N, Fukamizu A, Nishida K, Takakura N. A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice. *Development.* (2012) **139(7)**: 1327-35.

Saszik SM, Robson JG, Frishman LJ. The scotopic threshold response of the dark-adapted electroretinogram of the mouse. *J Physiol.* (2002) **543(Pt 3)**: 899-916.

Schuettauf F, Quinto K, Naskar R, Zurakowski D. Effects of anti-glaucoma medications on ganglion cell survival: the DBA/2J mouse model. *Vision Res.* (2002) **42(20)**: 2333-7.

Shibuki H, Katai N, Yodoi J, Uchida K, Yoshimura N. Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2000) **41(11)**: 3607-14.

Takahara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagaya M, Nakanishi A, Iwao K, Takamura Y, Sakamoto H, Satoh K, Kondo M, Sakamoto T, Goldberg JL, Nabekura J, Tanihara H. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2015) **112(33)**: 10515-20.

Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* (1998) **251(2)**: 471-6.

Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res.* (2006) **25(5)**: 490-513.

Than A, Zhang X, Leow MK, Poh CL, Chong SK, Chen P. Apelin attenuates oxidative stress in human adipocytes. *J Biol Chem.* (2014) **289(6)**: 3763-74.

Tobe LA, Harris A, Hussain RM, Eckert G, Huck A, Park J, Kim NJ, Siesky B. The role of retrobulbar and retinal circulation on optic nerve head and retinal nerve fibre layer structure in patients with open-angle glaucoma over an 18-month period. *Br J Ophthalmol.* (2015) **99(5)**: 609-12.

Unterlauff JD, Eichler W, Kuhne K, Yang XM, Yafai Y, Wiedemann P, Reichenbach A, Löffler K, Schäfer P, Völkner M, Holdt T, Karl MO. Age-dependent Müller glia neurogenic competence in the mouse retina. *Glia.* (2015) **63(10)**: 1809-24.

Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG, Walters JW. The photopic negative response of the flash

electroretinogram in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2001) **42(2)**: 514-22.

Vorwerk CK, Gorla MS, Dreyer EB. An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol.* (1999) **43 Suppl 1**: S142-50.

Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, Hyman BT, Sabel BA, Dreyer EB. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (1996) **37(8)**: 1618-24.

Wang C, Chen K, Xia Y, Dai W, Wang F, Shen M, Cheng P, Wang J, Lu J, Zhang Y, Yang J, Zhu R, Zhang H, Li J, Zheng Y, Zhou Y, Guo C. N-acetylcysteine attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and autophagy in mouse liver via regulation of the ROS/JNK/Bcl-2 pathway. *PLoS One.* (2014) **9(9)**: e108855.

Wang DY, Ray A, Rodgers K, Ergorul C, Hyman BT, Huang W, Grosskreutz CL. Global gene expression changes in rat retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2010) **51(8)**: 4084-95.

Wang XL, Tao Y, Lu Q, Jiang YR. Apelin supports primary rat retinal Müller cells under chemical hypoxia and glucose deprivation. *Peptides.* (2012) **33(2)**: 298-306.

Xin Q, Cheng B, Pan Y, Lui H, Yang C, Chen J, Bai B. Neuroprotective effects of apelin-13 on experimental ischemic stroke through suppression of inflammation. *Peptides.* (2015) **63**: 55-62.

Yamada M, Hiratsuka Y, Roberts CB, Pezzullo ML, Yates K, Takano S, Miyake K, Taylor HR. Prevalence of visual impairment in the adult Japanese population by cause and severity and future projections. *Ophthalmic Epidemiol.* (2010) **17(1)**: 50-7.

Yamamoto T, Iwase A, Araie M, Suzuki Y, Abe H, Shirato S, Kuwayama Y, Mishima HK, Shimizu H, Tomita G, Inoue Y, Kitazawa Y; Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society. The Tajimi Study report 2: prevalence of primary angle closure and secondary glaucoma in a Japanese population. *Ophthalmology.* (2005) **112(10)**: 1661-9.

Yang X, Wei A, Liu Y, He G, Zhou Z, Yu Z. IGF-1 protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis by activating the Erk-1/2 and Akt pathways. *Mol Vis.* (2013) **19**: 1901-12.

Yang Y, Zhang X, Cui H, Zhang C, Zhu C, Li L. Apelin-13 protects the brain against ischemia/reperfusion injury through activating PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Neurosci Lett.* (2014) **568**: 44-9.

Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, Wei L. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons. *Exp Cell Res.* (2010) **316(11)**: 1773-83.

Zeng XJ, Zhang LK, Wang HX, Lu LQ, Ma LQ, Tang CS. Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides.* (2009) **30(6)**: 1144-52.

Zeng XX, Wilm TP, Sepich DS, Solnica-Krezel L. Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrulation. *Dev Cell.* (2007) **12(3)**: 391-402.

Zhang Y, Zhang Z, Yan H. Simvastatin inhibits ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis of retinal cells via downregulation of the tumor necrosis factor- α /nuclear factor- κ B pathway. *Int J Mol Med.* (2015) **36(2)**: 399-405.

Zhou Y, Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A. Activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by AAV gene transfer protects retinal ganglion cells in glaucoma. *Mol Ther.* (2005) **12(3)**: 402-12.

Zou MX, Liu HY, Haraguchi Y, Soda Y, Tatemoto K, Hoshino H. Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS Lett.* (2000) **473(1)**: 15-8.