

氏 名	す み の あ き ひ で 住 野 彰 英
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	薬博甲 第 3 0 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学位授与の年月日	平成 2 9 年 3 月 2 4 日
学 位 論 文 題 目	緑内障の新規治療薬としての apelin の有用性に 関する研究
論 文 審 査 委 員	（主査）荻田 喜代一 （副査）前田 定秋 （副査）吉岡 靖啓

論 文 内 容 の 要 旨

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。本疾患の網膜神経節細胞死は、眼圧の上昇により引き起こされると考えられてきたが、眼圧降下剤が奏効しない症例や、正常眼圧緑内障患者が数多く存在する。一方、眼圧非依存的に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、眼循環の低下に伴う再灌流障害、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、および炎症性サイトカインによる細胞障害などが報告され、緑内障における網膜神経節細胞死は、様々な危険因子により引き起こされることが明らかにされてきた。これらのことから、緑内障の病態進行を防ぐためには、網膜神経節細胞死を抑制する抜本的な治療法の開発が必要不可欠である。

Apelin は、オーファン G タンパク質共役型受容体である APJ 受容体の内因性リガンドとして同定された生理活性ペプチドである。これまでに、apelin は、脳虚血再灌流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、および海馬・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が報告されている。また、当研究室では、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける運動神経細胞の変性・脱落が apelin の遺伝子欠損により促進されることを明らかにした。これらのことから、apelin は、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。

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

はじめに、成体マウスの網膜における apelin/APJ システムの生理的意義について明らかにするため、apelin および APJ の発現を免疫組織学的手法により解析した。その結果、apelin の発現は、網膜特異的なグリア細胞である Müller 細胞にみられ、APJ の発現は、網膜神経節細胞、アマクリン細胞、および Müller 細胞にみられた。次に、加齢による網膜の apelin および APJ の発現変化を明らかにするため、real-time RT-PCR 法により解析した。その結果、若齢のマウスと比較して、老齢マウスの網膜における apelin mRNA 発現は著明に低下しており、一方、APJ mRNA 発現は著明に上昇していた。次に、加齢に伴う網膜神経節細胞死に対する apelin 欠損の影響を検討した結果、老齢の野生型 (WT) マウスでみられる網膜神経節細胞数の減少および光刺激応答の低下は、老齢の apelin 遺伝子欠損 (apelin-KO) マウスにおいて顕著にみられた。

以上の結果より、apelin/APJ システムは、成体マウスの網膜における網膜神経節細胞に対して神経保護的な役割を果たしている可能性が示され、緑内障の治療標的として有用である可能性が示唆された。

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

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する内因性 apelin の保護作用について明らかにするため、WT マウスおよび apelin-KO マウスに一過性高眼圧 (100 mmHg, 60 min) 処置により網膜虚血再灌流を引き起こした。その結果、網膜虚血再灌流 1 日後の WT マウスの網膜では、網膜神経節細胞の減少および光刺激応答の低下がみられた。また、網膜虚血再灌流 1 日後において網膜の apelin mRNA 発現の減少傾向と、APJ mRNA 発現の上昇傾向がみられた。Apelin-KO マウスでは、WT マウスよりも網膜虚血再灌流により誘導される網膜神経節細胞死および光刺激応答の低下が著しくみられた。この apelin-KO マウスにおける網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞死の促進の機構について明らかにするため、本細胞死を促進する炎症性サイトカインの一つである tumor necrosis factor- α (TNF- α) の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法により解析した。その結果、網膜虚血再灌流処置した apelin-KO マウスの網膜における TNF- α mRNA 発現は、網膜虚血再灌流処置した WT マウスと比較して著明に上昇していた。

以上の結果より、内因性 apelin は、網膜虚血再灌流による網膜神経節細胞死に対して、TNF- α の発現抑制を介して保護作用を示す可能性が示唆された。

第3章 NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する apelin の保護作用

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する apelin の保護作用について検討するため、WT マウスおよび apelin-KO マウスに NMDA を硝子体内投与した。その結果、NMDA を投与した 1 日後の WT マウスの網膜では、網膜神経節細胞死と光刺激応答の低下、および apelin と APJ の mRNA 発現の著明な低下がみられた。Apelin-KO マウスでは、WT マウスと比較して NMDA 誘発網膜神経節細胞死および光刺激応答低下が著明にみられた。また、WT マウスにおける NMDA 誘発網膜神経節細胞死は、apelin 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。この apelin の投与による保護作用は、APJ アンタゴニスト ML221 により抑制された。さらに、WT マウスにおける NMDA の硝子体内投与による光刺激応答の低下は、apelin の同時投与に抑制された。この NMDA 誘発網膜神経節細胞死および光刺激応答低下に対する apelin の保護作用機構を明らかにするため、NMDA 誘発網膜神経節細胞死を促進する TNF- α の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法により解析した。その結果、NMDA を硝子体内投与した apelin-KO マウスの網膜における TNF- α mRNA 発現は、NMDA を硝子体内投与した WT マウスと比較して著明に上昇していた。また、WT マウスにおける NMDA の硝子体内投与による TNF- α mRNA 発現上昇は、apelin の同時投与に抑制された。さらに、apelin の硝子体内投与は、細胞生存シグナルである網膜の Akt および ERK1/2 の活性化を引き起こした。これらの活性化は、ML221 の同時投与により抑制された。また、NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する apelin の保護作用は、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 の同時投与により抑制された。

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。

以上、緑内障の危険因子である加齢、網膜虚血再灌流および過剰なグルタミン酸刺激による網膜神経節細胞死が apelin の欠損により促進したことから、apelin は、網膜神経節細胞に対して保護作用を有することが明らかとなった。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 が緑内障の新たな治療薬となる可能性が示された。