

学位論文審査の要旨

申請者は、加齢、網膜虚血再還流および NMDA 硝子体内投与による網膜神経節細胞死に対して **apelin** が保護作用を有することを明らかにし、新規緑内障治療薬としての **apelin** の有用性を示した。以下に本学位論文の審査結果を示す。

緑内障は、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疾患であり、わが国において中途失明原因の第1位を占めている。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ことが報告されている。

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り、現在までに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、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、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** 欠損により促進されることが報告されている。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た。

申請者は、まず、ラット網膜における **apelin** とその受容体 **APJ** の発現について免疫組織学的手法を用いて検討し、**apelin** が網膜特異的なグリア細胞である **Müller** 細胞に存在すること、また、**APJ** が網膜神経節細胞、アマクリン細胞、および **Müller** 細胞に発現していることを明らかにした。次に加齢による網膜の **apelin** および **APJ** の発現変化を解析し、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** 発現は上昇していることを示した。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、老齢の野生型 (WT) マウスでみられた網膜神経節細胞数の減少および光刺激応答の低下が **apelin** 欠損により著明に促進されることを示した。これらの結果から、網膜の **apelin/APJ** システムが、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を示し、緑内障の治療標的として有用である可能性を示唆した。

次に申請者は、一過性高眼圧処置による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** の作用について、WT マウスおよび **apelin** 遺

伝子欠損 (apelin-KO) マウスを用いて検討した。網膜虚血再灌流により WT マウスの網膜でみられた網膜神経節細胞の減少および光刺激応答の低下は、apelin 欠損より著明に促進されることを示した。また、網膜虚血再灌流処置した apelin-KO マウスの網膜において、網膜虚血再灌流による細胞死を促進する TNF- α mRNA 発現が WT マウスと比較して著明に上昇していることも示した。これらの結果から、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を示唆した。

次に申請者は、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した。WT マウスにおいて NMDA の硝子体内投与により網膜神経節細胞死と光刺激応答の低下がみられ、これらの変化は apelin 欠損により促進された。また、WT マウスにおける NMDA 誘発網膜神経節細胞死および光刺激応答の低下は、apelin の同時投与により用量依存的に抑制された。さらに 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、WT マウスと比較して著明に上昇し、この TNF- α mRNA 発現上昇は、apelin の同時投与に抑制された。また、apelin の硝子体内投与は、網膜の Akt および ERK1/2 の活性化を引き起こし、これらの活性化は、APJ antagonist の ML221 の同時投与により抑制された。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 阻害剤および ERK1/2 阻害剤の同時投与により抑制された。これらの結果から、apelin が 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 の活性化を介した保護作用を有することを示唆した。

以上、本論文において、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 の欠損により促進されたことより、apelin が網膜神経節細胞に対して保護作用を有することを明らかにした。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を示した。これらの観点から、本論文は博士（薬学）の学位論文として十分にふさわしいものと認定した。