

氏名	いしまる ゆうき 石丸 侑希
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	薬博乙 第34号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者
学位授与の年月日	平成30年3月23日
学位論文題目	虚血性網膜症の病的血管新生における apelin-APJ system の病態生理学的意義の解明と新規治療薬としての APJ 阻害薬の有用性
論文審査委員	（主査）奈邊 健 （副査）前田 定秋 （副査）松浦 哲郎 （副査）矢部 武士

別紙 1

博士論文要旨

論文題目 : 虚血性網膜症の病的血管新生における **apelin-APJ system** の病態生理学的意義の解明と新規治療薬としての **APJ** 阻害薬の有用性

申請者 石丸 侑希 印

研究分野 臨床薬学

紹介教授 前田 定秋

増殖性糖尿病網膜症や未熟児網膜症などの虚血性網膜症では、網膜虚血により誘発される病的血管新生が病態悪化に深く関与する。これらの疾患で形成される病的な新生血管は非常に脆弱であり、容易に破綻して出血し、失明をもたらすことから、現在行われている虚血性網膜症の治療は、この病的血管新生を阻害することを主眼としている。従来の治療法であるレーザー光により網膜虚血部位を凝固する方法に加えて、最近、血管内皮増殖因子 (VEGF) の中和抗体を用いた分子標的治療法が開発された。この VEGF 阻害薬は、優れた治療効果を示す一方で、奏功しない症例や、治療効果が得られても網膜虚血が改善されずに病的血管新生が再燃する症例が報告されている。また、VEGF は病的血管新生を伴わない眼疾患患者の硝子体内でも発現がみられることから、病的血管新生に特化した因子ではないことが推測される。したがって、虚血性網膜症で生じる病的血管新生に関与する新たな因子の同定とそれを選択的に抑制する治療薬の開発が求められている。

Apelin は、オーファン G タンパク質共役型受容体 **APJ** 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、最近、生理的な網膜血管形成を促進する因子であることが明らかにされた。**Apelin** および **APJ** は、網膜において血管形成期に一過性に発現誘導されることが明らかにされている。また、**apelin** は、低酸素により発現誘導されることから、虚血に関わる様々な病態に関与する可能性が示唆されている。これらのことから、**apelin-APJ system** が虚血性網膜症で生じる病的血管新生に関与すること、および本シグナルの阻害薬が虚血性網

膜症の病的血管新生を抑制できる可能性が考えられる。そこで本研究では、虚血性網膜症の病的血管新生における apelin-APJ system の病態生理学的意義と新規治療薬としての APJ 阻害薬の有用性を明らかにすることを目的として、虚血性網膜症モデルマウス、培養細胞、および虚血性網膜症患者の硝子体サンプルを用いて検討を行った。

第 1 章 虚血性網膜症の病的血管新生における apelin-APJ system の関与

虚血性網膜症で生じる病的血管新生への apelin-APJ system の関与を明らかにするため、野生型 (WT) マウスおよび apelin 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、虚血性網膜症モデルとして汎用されている Oxygen-Induced Retinopathy (OIR) モデルを作製した。生後 7 日目 (P7) の網膜血管形成途中のマウスを 75%酸素条件下で 5 日間飼育し、その後、P12 から通常酸素濃度で数日間飼育することにより OIR モデルを作製した。高酸素飼育直後の P12 の OIR モデルでは、網膜中心部分に広い無血管領域が観察され、その後、数日間、通常酸素濃度で飼育した P15 および P17 では、この無血管領域に向かって形成される多数の房状形態の異常血管がみられた。OIR モデルマウスの網膜における apelin mRNA の発現は、異常血管新生が生じる P15 および P17 に著明な上昇を示した。APJ mRNA の発現も網膜の異常血管新生に伴い有意に上昇した。P17 における APJ の発現分布を免疫組織化学染色法により検討した結果、房状形態を示す異常血管の内皮細胞に強い APJ 陽性反応がみられ、正常形態を示す血管の内皮細胞には、APJ 陽性反応はほとんどみられなかった。また、眼球パラフィン切片において網膜表面から硝子体内に逸脱する細胞に強い APJ 陽性反応がみられ、この APJ 陽性細胞には増殖細胞マーカーである BrdU 陽性反応が観察された。Apelin-KO マウスを用いた OIR モデルでは、P12 において、WT マウスの OIR モデルと同様に網膜に無血管領域がみられたが、P17 で異常な網膜血管はほとんど形成されず、網膜表面に検出される BrdU も少なかった。また、VEGF の発現上昇は、P15 および P17 の apelin-KO マウスの OIR モデルの網膜でもみられ、この発現上昇は、WT マウスの OIR モデルと比較して有意に高かった。

以上の結果から、虚血性網膜症で生じる病的血管新生では、apelin-APJ system の著明な活性化により引き起こされる血管内皮細胞の過増殖が関与する可能性が示唆された。

第 2 章 Apelin 発現抑制による網膜血管成熟化の促進と虚血性網膜症患者の硝子体における apelin 量の解析

虚血性網膜症で生じる病的網膜血管の脆弱性は、血管内皮細胞の過増殖により引き起こされることから、網膜の apelin-APJ シグナルを阻害することにより脆弱な血管の形成を抑制できるか否か、すなわち血管成熟化を誘導できるか否

かについて、培養細胞および OIR モデルマウスを用いて検討した。Apelin 遺伝子を標的とした small interfering RNA (siRNA) を導入したマウス培養血管内皮細胞株 bEnd.3 細胞では、apelin mRNA の著明な発現低下と血管壁細胞の遊走作用を有する monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現上昇が mRNA およびタンパク質レベルでみられた。また、apelin siRNA は、bEnd.3 細胞において、転写因子の Smad3 のリン酸化を引き起こし、Smad3 阻害剤は、apelin siRNA による MCP-1 タンパク質の発現誘導を抑制した。さらに、apelin siRNA 導入細胞では、Smad3 のリン酸化を阻害する Akt のリン酸化の低下がみられた。Apelin siRNA を導入した bEnd.3 細胞の培養上清は、マウス血管平滑筋細胞株 p53LMAC01 細胞の遊走促進作用を示し、この作用は、MCP-1 受容体である CCR2 の遮断薬により抑制された。OIR モデルマウスの硝子体内への apelin siRNA の投与は、網膜の apelin mRNA の発現抑制と MCP-1 mRNA の発現誘導を引き起こした。さらに、apelin siRNA を投与した OIR モデルマウスの P17 の網膜では、新生血管内皮細胞の周囲への周皮細胞の増加と房状形態を示す異常血管の減少がみられた。

以上の結果から、apelin-APJ シグナルの阻害により、血管内皮細胞の過増殖の抑制による血管壁細胞の動員促進を介して成熟血管の形成を誘導できる可能性が示唆された。

増殖性糖尿病網膜症患者と未熟児網膜症患者の硝子体内の apelin 量を解析した。その結果、対照群の血管新生を伴わない眼疾患患者の硝子体では、ほとんど apelin が検出されなかったが、増殖性糖尿病網膜症患者の硝子体では、apelin が検出され、対照群と比べて有意に高値を示した。また、未熟児網膜症患者の硝子体では、高濃度の apelin が検出された。このことから、虚血性網膜症患者の網膜において apelin-APJ system が亢進していることが示唆され、apelin-APJ system が虚血性網膜症の新規創薬標的分子となる可能性が示された。

第 3 章 虚血性網膜症の新規治療薬としての APJ アンタゴニストの有用性

虚血性網膜症の病的血管新生に対する APJ 阻害剤の効果を明らかにするため、OIR モデルマウスに APJ アンタゴニストである ML221 (10 mg/kg/day) を P12 から P16 まで腹腔内投与した。その結果、ML221 を投与した OIR モデルマウスの P17 の網膜では、房状形態の異常血管領域の著明な減少と無血管領域の減少がみられた。一方、VEGF 受容体阻害剤 SU1498 (9 mg/kg/day) の P12 から P16 までの腹腔内投与は、P17 の OIR モデルマウスの網膜の異常血管新生を抑制したが、無血管領域に対してはまったく影響を与えなかった。これらの結果から、APJ アンタゴニストは、VEGF 受容体阻害剤と比較して、虚血性網膜症でみられる病的血管新生を選択的に抑制できることが示唆され、虚血性網膜症の新規治療薬としての APJ アンタゴニストの有用性が示された。

以上、本研究において、OIR モデルマウスでは、**apelin-APJ system** の著明な活性化が起こり、血管内皮細胞の過増殖が誘導され、異常網膜血管新生が引き起こされることを明らかにした。また、虚血性網膜症患者の網膜においても同様の機構が生じている可能性を示した。さらに、**APJ** 阻害薬が血管内皮細胞の過増殖の抑制を介して正常血管の形成を誘導できること、および異常血管新生を選択的に抑制できることを示した。現在、虚血性網膜症治療法として用いられているレーザー光凝固術や抗 **VEGF** 抗体の硝子体内投与は、優れた治療効果を示すものの、根本的に虚血を解消できない。また、虚血性網膜症の中には、抗 **VEGF** 抗体の効果が得られない症例や、治療後に病的血管新生が再燃する症例が存在する。本研究で得られた結果より、**APJ** 阻害薬は、これら既存の治療法の問題点を解消できる新たな虚血性網膜症治療薬として期待される。今後、本研究成果が、**apelin-APJ system** を標的とした新たな虚血性網膜症治療法の開発に役立てられることを期待する。