

別紙 1

## 博士論文要旨

論文題目 : Apelin 受容体アゴニストによる網膜神経保護作用を介した新規糖尿病網膜症治療法に関する研究

申請者 柴垣 郁弥 印

専攻分野 臨床薬学

研究指導分野 薬物療法学

指導教員 前田 定秋

糖尿病網膜症では、網膜の微小血管障害が進行することにより黄斑浮腫や牽引性網膜剥離が引き起こされて視力低下や失明に至ることから、現在では、この血管病変を鎮静化することを目的とした治療が行われている。しかし、網膜微小血管障害がみられない糖尿病患者の網膜において、網膜神経線維層の菲薄化や視神経細胞(網膜神経節細胞)・錐体細胞の神経活動の低下がみられること、また、網膜神経障害が血液網膜関門の破綻や血管退縮をもたらすこと等が報告されている。これらのことから、糖尿病網膜症では、網膜血管障害に先行して網膜神経障害が生じている可能性が示唆される。したがって、糖尿病網膜症の根本的な治療法を確立するためには、糖尿病網膜症による網膜神経障害の発症機構を明らかにすること、および網膜神経細胞を保護するための治療標的を同定することが重要であると考えられる。

Apelin は、オーファン G タンパク質共役型受容体の一つである APJ (apelin 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。当研究室では、これまでに、APJ が網膜神経節細胞を含めた種々の網膜神経細胞に発現していることや、加齢に伴う網膜神経節細胞の脱落に対して内因性 apelin が保護作用を示すことを明らかにしている。また糖尿病網膜症の網膜神経障害の原因の一つとして考えられているグルタミン酸による N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体を介した興奮毒性により引き起こされる網膜神経細胞死に対して、内因性 apelin および apelin の硝子体内投与が保護作用を示すことも報告している。これらのことから、apelin-APJ システムは、糖尿病

網膜症で生じる網膜神経障害を抑制するための新たな治療標的となる可能性が考えられる。

本研究では、血漿中での安定性が高く脂溶性の高い APJ アゴニストである ML233 を用いて、糖尿病網膜症の網膜神経障害に対する新規治療法としての APJ アゴニストの全身投与の有用性を明らかにすることを目的として、NMDA 誘発網膜神経障害および高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスの網膜神経障害に対する APJ アゴニストの保護作用について検討を行った。

## 第 1 章 NMDA の硝子体内投与により誘発される網膜神経障害に対する APJ アゴニストの保護作用

NMDA の硝子体内投与により誘発される網膜神経障害に対する APJ アゴニストの保護作用について明らかにするため、C57BL/6 系雄性マウスを用いて、種々の用量の ML233 を腹腔内投与し、網膜電図を測定することにより検討した。その結果、NMDA (10 nmol) の硝子体内投与 24 時間後の網膜において、網膜神経節細胞由来の活動電位である scotopic threshold response (STR) の低下がみられ、この低下は、ML233 (5 mg/kg) の腹腔内投与により有意に抑制された。この ML233 による保護効果は、APJ アンタゴニストである ML221 (5 mg/kg) の前投与によって著明に抑制された。ML233 の保護作用について網膜切片の免疫組織化学染色により検討した結果、NMDA 硝子体内投与 24 時間後に網膜神経節細胞およびアマクリン細胞の減少がみられ、これらの減少は、ML233 の腹腔内投与により抑制された。また、NMDA を硝子体内投与したマウスの網膜では、神経細胞のアポトーシスの指標である spectrin  $\alpha$ II (calpain の基質) の著明な分解がみられ、この spectrin  $\alpha$ II の分解は ML233 の腹腔内投与により有意に抑制された。また、ML233 の腹腔内投与は、網膜においてアポトーシスシグナル抑制因子である Akt を活性化させた。さらに、ML233 (5 - 10 mg/kg) は、経口投与によっても、用量依存的に STR の低下および網膜神経節細胞の減少を抑制した。

以上の結果から、APJ アゴニストである ML233 の全身投与は、網膜においてアポトーシスシグナルを抑制することにより、NMDA の硝子体内投与により誘発される網膜神経障害に対して保護作用を示す可能性が示唆された。

## 第 2 章 高脂肪食を負荷した糖尿病モデルマウスでみられる網膜神経障害に対する APJ アゴニストの保護作用

糖尿病網膜症の発症および進展に脂質異常が関与することが示唆されている。そこで本章では、自然発症糖尿病モデルマウスである雄性 Akita マウスに高脂肪食を与えることにより、網膜神経障害が惹起されるか否かについて検討を行った。Akita マウスは、生後 5 週目以降、全個体において 500 mg/dL 以上の高い血糖値の推移を示した。生後 5 週目から Akita マウスに高脂肪食を与え、1 週

間毎に網膜電図を測定した結果、高脂肪食負荷 3 週目から網膜電図における STR、視細胞由来の a-wave、および双極細胞とミュラー細胞由来の b-wave の著明な低下がみられ、高脂肪食負荷 4 週目ではさらに低下していた。高脂肪食負荷 4 週後の Akita マウスの網膜切片を用いて免疫組織化学染色により検討した結果、網膜神経節細胞、錐体細胞、および双極細胞の細胞数の有意な減少が認められた。

次に、Akita マウスへの高脂肪食負荷による網膜神経障害に対する apelin-APJ システムの関与について検討を行った。WT マウスおよび Akita マウスの網膜における APJ および apelin の発現分布を免疫組織化学染色により調べた結果、APJ は網膜神経節細胞および双極細胞等の介在神経が存在する内顆粒層の細胞に高い発現がみられ、視細胞の細胞体が存在する外顆粒層の細胞にも発現がみられた。また、apelin は、内顆粒層の内側に存在する細胞に発現がみられ、高脂肪食を 4 週間負荷した Akita マウスの網膜では、内顆粒層における apelin 陽性細胞数の著明な減少がみられた。次に、Akita マウスと apelin 欠損 (KO) マウスを交配して作製した apelin-KO Akita (KO-Akita) マウスに高脂肪食を与え、網膜電図を測定した。その結果、KO-Akita マウスでは、高脂肪食負荷 2 週目から著しい STR、a-wave、および b-wave の低下がみられた。この網膜電図の結果と一致して、高脂肪食を与えた 2 週目の KO-Akita マウスの網膜では、網膜神経節細胞、錐体細胞、および双極細胞の細胞数が減少していた。また、apelin 欠損は、血糖値および体重の変化にほとんど影響を与えなかった。

高脂肪食負荷による Akita マウスにおける網膜神経障害に対する ML233 の保護作用について明らかにするため、高脂肪食負荷開始日から 1 日おきに週 3 回 ML233 (5 mg/kg) を腹腔内投与し、網膜電図を測定した。その結果、高脂肪食負荷 4 週目においてみられる STR、a-wave、および b-wave の低下は、ML233 の投与によりほぼ完全に抑制された。さらに、ML233 を投与した Akita マウスでは、高脂肪食負荷による網膜神経節細胞、錐体細胞、および双極細胞の細胞数の減少がほとんどみられなかった。この Akita マウスへの高脂肪食負荷による STR、a-wave、および b-wave の低下に対する ML233 の保護効果は、APJ アンタゴニストである ML221 (5 mg/kg) の投与によって著明に抑制された。また、ML233 は、高脂肪食を与えた Akita マウスの血糖値、体重、および種々の血漿脂質パラメーターの値にほとんど影響を与えなかった。また、ML233 は、経口投与によっても高脂肪食負荷 Akita マウスで生じる STR、a-wave、および b-wave の低下を著明に抑制した。

以上の結果から、高脂肪食を与えた Akita マウスで生じる網膜神経障害に対して APJ アゴニストの全身投与および内因性 apelin が保護作用を示す可能性が示唆された。

以上、本研究において APJ アゴニストである ML233 を全身投与することにより、NMDA 硝子体内投与により誘発される網膜神経障害、および高脂肪食を負荷した Akita マウスで生じる網膜神経障害が抑制されることを明らかにした。この ML233 による網膜神経保護効果は、経口投与によっても示された。さらに、高脂肪食を負荷した Akita マウスで生じる網膜神経障害が **apelin** 欠損により増悪したことから、糖尿病網膜症における網膜神経障害の発症および進展に内因性 **apelin** が関与する可能性を示唆した。現在、糖尿病網膜症の治療に用いられているレーザー光凝固術や血管内皮増殖因子 (**Vascular endothelial growth factor: VEGF**) 阻害薬の硝子体内注射は、いずれも病態後期に生じる網膜虚血や黄斑浮腫に対して優れた効果を示すものの、侵襲性が高い治療法であり、失われた神経細胞を元に戻す治療法ではない。本研究で得られた結果から、APJ アゴニストは、低侵襲な投与経路を介して網膜神経細胞を保護し、糖尿病網膜症の病態進行を初期段階で阻止する新たな治療薬として期待される。今後、本研究成果が、**apelin-APJ** システムを標的とした新たな糖尿病網膜症治療法の開発に役立てられることを期待したい。