

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07110

研究課題名(和文) アペリン受容体刺激薬による網膜神経保護作用を介した新規緑内障治療法の開発

研究課題名(英文) A study on apelin receptor agonists as a new medicine for the treatment of glaucoma

研究代表者

前田 定秋 (Maeda, Sadaaki)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：00135732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は、網膜神経節細胞の変性・脱落により不可逆的に視機能低下をきたす進行性の眼疾患である。現在のところ、緑内障における網膜神経節細胞死を効果的に抑える治療法は存在しない。本研究では、アペリン受容体刺激薬の経口投与が緑内障モデルマウスで生じる視機能低下および網膜神経節細胞死を抑制することを明らかにした。また、アペリン受容体刺激薬を全身投与すると、網膜において神経細胞の生存因子として機能するAktの活性化がみられることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では40歳以上の約5%が緑内障に罹患している。加齢に伴い発症率が増加することから、高齢化社会に伴い今後も益々患者数が増加することが予想される。唯一の緑内障治療法である眼圧降下療法は、良好な成果を上げている一方で、眼圧を十分に下げても病態が進行する症例や、正常眼圧にも関わらず緑内障の症状を呈する症例は少なくない。今回、緑内障モデルマウスを用いた検討から、アペリン受容体刺激薬が緑内障の進行によって障害される網膜神経節細胞を保護する作用を有することを見出した。このことは、アペリン受容体刺激薬が緑内障の病態進行を抑制する新たな治療薬となる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma is a progressive eye disease that causes irreversible loss of visual function due to degeneration of retinal ganglion cells. However, there is no effective treatment that prevent the neurodegeneration in glaucoma yet. In this study, we demonstrated that oral administration of an apelin receptor agonist prevented the reduction of electroretinogram and the loss of retinal ganglion cells in a mouse model of glaucoma. In addition, we found that systemic administration of the apelin receptor agonist increased the phosphorylation of Akt, a potent anti-apoptotic factor in neurons, in the retina.

研究分野：薬物治療学、分子薬理学

キーワード：緑内障 アペリン アペリン受容体刺激薬 網膜神経節細胞 APJ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は、中途失明原因の第一位の眼疾患であり、我が国では40歳以上の約5%が本疾患に罹患している。加齢に伴い発症率が増加する疾患であり、高齢化の背景から今後大きな社会問題となる可能性が極めて高い。緑内障眼では、視神経を構成する網膜神経節細胞が不可逆的に減少することが知られている。一般に緑内障における網膜神経節細胞死の原因は、眼圧の上昇であると考えられており、緑内障患者の病態進行を遅延させるために眼圧降下剤が用いられる。眼圧降下剤が効果不十分の場合には、侵襲性の高いレーザー治療や観血的手術が施される。しかしながら、これらの眼圧降下治療は良好な成果を上げている一方で、眼圧を十分に下げても緑内障性視野障害が進行する例は少なくない。加えて、特に日本人の緑内障患者では、正常眼圧緑内障患者が大半を占めている。したがって、緑内障患者の視野を保護するためには眼圧降下剤のみでは不十分であり、侵襲性の高い治療を行っても依然として緑内障による失明者が減少しないことを鑑みると、簡便で侵襲性の少ない方法により網膜神経節細胞死を抑制する治療法の開発が必要である。

これまでに研究代表者らは、網膜におけるアペリン-APJシグナルの生理/病態学的意義を明らかにする研究を行ってきた。具体的には、生理活性ペプチドであるアペリンの受容体 (APJ) が網膜神経節細胞に発現していること、緑内障の網膜神経節細胞死の原因の一つとして考えられているグルタミン酸興奮毒性をもたらす **N-methyl-D-aspartate (NMDA)** による網膜神経節細胞死に対して、アペリンの硝子体内投与が保護作用を示すこと、およびアペリン欠損マウスでは、**NMDA** 誘発網膜神経節細胞死が著明に増加することを見出した。

世界中で網膜神経節細胞死を抑える薬物の探索が行われているが、その多くが侵襲性の高い硝子体内投与によって保護作用を示した例であるため、患者自身が日常的に投与することは困難である。従って、より侵襲性かつ専門性の低い投与方法によって網膜神経保護効果を示す薬物を明らかにすることが新たな緑内障治療薬の開発に繋がることが考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、低分子アペリン受容体アゴニストの全身投与が緑内障モデルマウスでみられる網膜神経節細胞死を抑制するのか否かについて明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

8週齢の雄性 C57BL/6N マウスに NMDA を 10 nmol 硝子体内投与し、緑内障モデルマウスを作製した。対照群には、生理食塩水を硝子体内投与した。アペリン受容体刺激薬である ML233 は、NMDA 硝子体内投与 1 時間前に腹腔内投与または経口投与した。対照群には、ML233 を溶解するために用いた DMSO を投与した。網膜神経節細胞死の評価は、網膜電図の測定 (光強度:  $1 \times 10^{-3}$  cd·s/m<sup>2</sup>) および網膜神経節細胞マーカーである Brn-3a に対する抗体で眼球切片を免疫蛍光染色することにより行った。スペクトリン II およびリン酸化 Akt は、ウェスタンブロッティングにより検出した。

### 4. 研究成果

NMDA 硝子体内投与 24 時間後においてみられる網膜電図の低下および Brn-3a 陽性細胞数の減少は、アペリン受容体刺激薬である ML233 (5 mg/kg) を腹腔内投与することにより抑制された (図 1)。ML233 の効果がアペリン受容体を介するのか否かについて検討するため、ML233 投与 1 時間前にアペリン受容体遮断薬である ML221 (5 mg/kg) を投与した。その結果、NMDA 投与によって誘発される網膜電図の低下に対する ML233 の保護効果は、ML221 の投与により阻害された (図 2)。

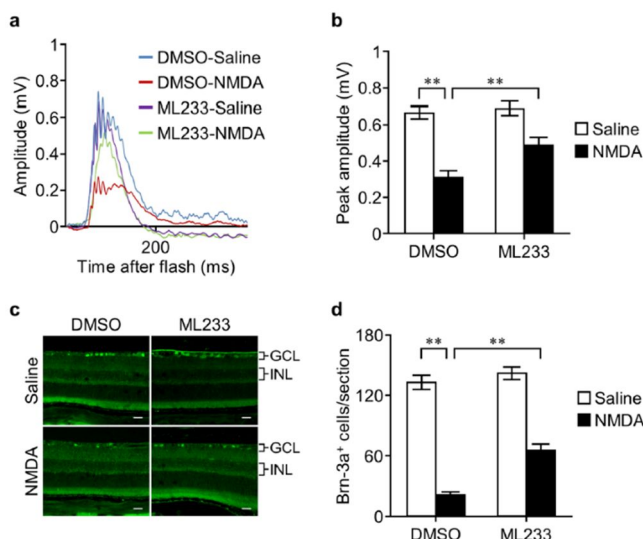


図 1 NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する ML233 腹腔内投与による保護作用

(a)各薬物投与群における網膜電図の代表的な波形 (b)網膜電図を定量化したグラフ (c)各薬物を投与したマウスの眼球切片を抗 Brn-3a 抗体で染色した免疫蛍光染色像 (GCL:網膜神経節細胞層、INL:内顆粒層、スケールバー: 20 μm) (d)眼球切片当たりの Brn-3a 陽性細胞数を計測したグラフ \*\*p<0.01

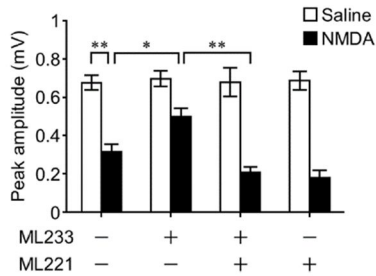


図 2 NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する ML233 の保護作用へのアペリン受容体遮断薬 ML221 の影響について網膜電図により検討した \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

NMDA はカルパインの活性化を介して網膜神経節細胞死を引き起こすことが報告されていることから、NMDA によって引き起こされるカルパインの活性化を ML233 が抑制するのかがかについて、カルパインの基質であるスペクトリン II の分解産物の量を測定することにより検討した。その結果、NMDA 硝子体内投与 6 時間後にみられるスペクトリン II の分解は、ML233 投与により抑制された (図 3)。

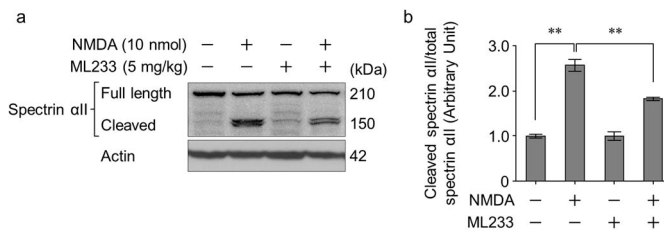


図 3 NMDA による 網膜のスペクトリン II 分解に対する ML233 投与の抑制作用 (a)スペクトリン II およびアクチンのウェスタンブロッティング画像 (b)総スペクトリン II 量に対する分解スペクトリン II 量を定量化した \*\* $p < 0.01$

さらに ML233 の網膜神経保護作用機構について明らかにするため、網膜神経節細胞の生存因子として機能する Akt の活性化に対する ML233 投与の影響について検討した結果、ML233 投与 1 時間後の網膜においてリン酸化 Akt 量の有意な増加がみられた (図 4)。

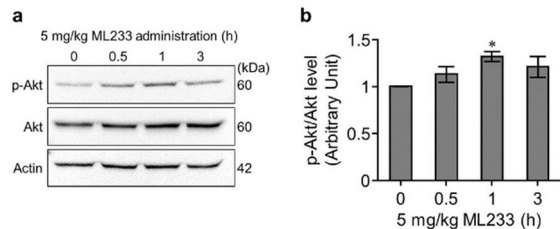


図 4 網膜のリン酸化 Akt 量に対する ML233 腹腔内投与の影響 (a)リン酸化 Akt、総 Akt およびアクチンのウェスタンブロッティング画像 (b)総 Akt 量に対するリン酸化 Akt 量を定量化した \* $p < 0.05$

ML233 が経口投与によって網膜神経保護作用を示すのかについて検討を行った。その結果、10 mg/kg の ML233 を経口投与することによって、NMDA によって誘発される網膜電図の低下および Brn-3a 陽性細胞数の減少が有意に抑制された (図 5)。

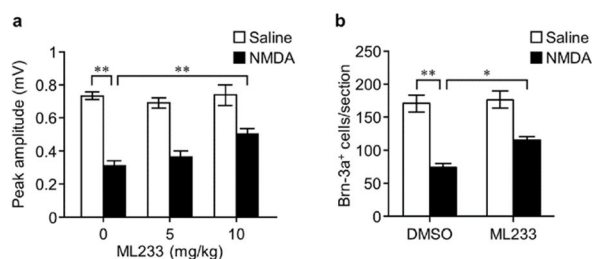


図 5 NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対する ML233 経口投与による保護作用 (a)網膜電図を定量化したグラフ (b)眼球切片当たりの Brn-3a 陽性細胞数を計測したグラフ \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

以上の結果から、ML233 は全身投与によって NMDA 誘発網膜神経節細胞死に対して保護作用を示すことが示唆された。また、上記の結果に加えて、マウスに網膜虚血再灌流を引き起こして作製した緑内障モデルにおいても ML233 の全身投与が保護作用を示す研究結果を得ている。以上のことからアペリン受容体刺激薬が新たな緑内障治療薬となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishimaru Yuki, Sumino Akihide, Shibagaki Fumiya, Yamamuro Akiko, Yoshioka Yasuhiro, Maeda Sadaaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Endogenous Apelin Is Protective Against Age-Associated Loss of Retinal Ganglion Cells in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnagi.2020.00058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shibagaki Fumiya, Ishimaru Yuki, Sumino Akihide, Yamamuro Akiko, Yoshioka Yasuhiro, Maeda Sadaaki	4. 巻 45
2. 論文標題 Systemic Administration of an Apelin Receptor Agonist Prevents NMDA-Induced Loss of Retinal Neuronal Cells in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 752-759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-019-02948-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 石丸侑希、吉岡靖啓、前田定秋	4. 巻 53
2. 論文標題 早期糖尿病網膜症の治療標的としてのアペリン-APJシステム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 313-316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 吉岡 靖啓, 山本 時駆, 吉澤 成宣, 山室 晶子, 石丸 侑希, 前田 定秋
2. 発表標題 血管内皮細胞株b.End3細胞の終末糖化産物(AGEs)誘発細胞死に対するアペリンの保護作用
3. 学会等名 第138回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石丸 侑希、柴垣 郁弥、栗山 徹、山室 晶子、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスにおける高脂肪食負荷による網膜神経障害とアペリン -APJ シグナルによる保護作用
3. 学会等名 第40回日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡 靖啓、山本 時駆、吉澤 成宣、山室 晶子、石丸 侑希、前田 定秋
2. 発表標題 血管内皮細胞株 bEnd.3 細胞におけるアペリンによる終末糖化産物誘発細胞死抑制作用
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石丸 侑希、三浦 鈴奈、谷村 映紀、山口 凱世、山室 晶子、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 培養神経細胞における酸化的ストレス誘発細胞死に対する高グルコースによる促進作用
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山室 晶子、安藝 千尋、谷口 広樹、角 茜音、石丸 侑希、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 アストロサイトにおけるペルオキシレドキシシン6の発現増加が炎症性サイトカイン産生および GLT-1 発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 凱世、石丸 侑希、三浦 鈴奈、谷村 映紀、山室 晶子、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 培養神経細胞における高グルコース負荷による酸化的ストレス誘発細胞死の促進
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石丸 侑希、住野 彰英、柴垣 郁弥、栗山 徹、三浦 鈴奈、千歳 ひかり、谷村 映紀、山室 晶子、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 加齢に伴う網膜神経節細胞死に対する内因性アペリンの保護作用
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤井喜一、石丸侑希、柴垣郁弥、徳田華奈、山室晶子、吉岡靖啓、前田定秋
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスにおける高脂肪食負荷による網膜神経細胞の脱落とアペリン受容体アゴニストによる保護作用
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山室 晶子、伊吹 美紗、川嶋 亮平、若林 崇、石丸 侑希、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 アストロサイトにおけるペルオキシレドキシニン6 の過剰発現が TNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石丸 侑希、住野 彰英、柴垣 郁弥、千歳 ひかり、三浦 鈴奈、谷村 映紀、山室 晶子、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 加齢に伴う網膜神経節細胞の脱落に対する内因性アペリンの保護効果
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴垣 郁弥、石丸 侑希、赤井 喜一、徳田 華奈、山室 晶子、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 高脂肪食を負荷した糖尿病モデルマウスで生じる網膜神経細胞の脱落に対するAPJアゴニストの保護作用
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山室 晶子、伊吹 美紗、川嶋 亮平、若林 崇、石丸 侑希、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 アストロサイトにおける peroxiredoxin 6の過剰発現が神経細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴垣 郁弥、石丸 侑希、赤井 喜一、徳田 華奈、山室 晶子、吉岡 靖啓、前田 定秋
2. 発表標題 高脂肪食を負荷した糖尿病モデルマウスで生じる網膜神経細胞の脱落に対するアペリン受容体アゴニストの保護作用
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Ishimaru, H. Konishi, T. Kuriyama, F. Shibagaki, A. Yamamuro, Y. Yoshioka, S. Maeda
2. 発表標題 An apelin receptor agonist protects against retinal neuronal cell death induced by N-methyl-D-aspartic acid in mice
3. 学会等名 2019 ISN-ASN meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 F. Shibagaki, Y. Ishimaru, M. Suzuki, A. Yamamuro, Y. Yoshioka, S. Maeda
2. 発表標題 Neuroprotective effect of the endogenous peptide apelin on the retinal ganglion cell death in diabetes model mouse
3. 学会等名 2019 ISN-ASN meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉岡 靖啓 (Yoshioka Yasuhiro)  (40330360)	摂南大学・薬学部・准教授  (34428)	
研究分担者	石丸 侑希 (Ishimaru Yuki)  (80611607)	摂南大学・薬学部・助教  (34428)	
研究分担者	山室 晶子 (Yamamuro Akiko)  (20340862)	摂南大学・薬学部・助手  (34428)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------