

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18898

研究課題名（和文）アペリン受容体アゴニストによる新たな糖尿病網膜症治療法

研究課題名（英文）Apelin receptor agonists as a new therapeutic agent for diabetic retinopathy

研究代表者

石丸 侑希（Ishimaru, Yuki）

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：80611607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病網膜症では、病態初期から生じる網膜神経変性が病態悪化に関与することが明らかにされているが、網膜神経変性を抑制する治療法は現在のところ確立されていない。今回、生理活性ペプチドであるアペリンが網膜内のグリア細胞であるミュラー細胞に発現すること、アペリン受容体が網膜神経細胞に発現すること、および糖尿病モデルマウスで生じる網膜神経変性に対してアペリン受容体を活性化する薬物が抑制作用を有す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

現在の糖尿病網膜症治療法は、病態が進行してから適用されるものであり、それまでに失われた網膜神経細胞を元に戻すことはできない。本研究において、糖尿病モデルマウスで生じる網膜神経変性に対してアペリン受容体を活性化する薬物が抑制効果を示したことから、アペリン受容体刺激薬が糖尿病網膜症の進行を初期段階から抑制できる新たな治療薬として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Retinal neurodegeneration caused in the early diabetic retinopathy plays a significant role in the progression of diabetic retinopathy, but there is no treatment for retinal neurodegeneration in the early diabetic retinopathy yet. In this study, we found that apelin, an endogenous peptide ligand for APJ receptor, was expressed in Muller cells, a type of retinal glial cells, that APJ receptor was present in retinal neuronal cells, and that an APJ agonist prevented retinal neurodegeneration induced in a mouse model of diabetes. The results of this study suggest that apelin receptor agonists may be a candidate for preventing retinal neurodegeneration in the early diabetic retinopathy.

研究分野：薬物治療学、眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 網膜神経変性 アペリン アペリン受容体アゴニスト 神経保護 早期治療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は、成人における中途失明原因の上位を占める重篤な眼疾患である。糖尿病患者の網膜では、高血糖等の要因により、可逆的な微小血管障害が起こることが知られており、この障害が進行することによって失明をもたらす得る網膜血管新生や黄斑浮腫が生じる。そのため、網膜血管新生や黄斑浮腫が発生した場合には、レーザー光凝固術や抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 製剤の硝子体内注射による治療が行われる。しかし、これらの治療法は、病態が進行してから適用されるものであり、低下した視力を元に戻すことができないことや、侵襲性が高いといった問題点がある。一方、近年の研究から、網膜血管障害がみられない糖尿病患者の網膜において既に網膜神経変性が起こっていることや、この網膜神経変性が網膜血管障害の進行に関与していることが報告されている。従って、糖尿病患者の視野を保護するためには、血管病変に対する治療法に加えて、侵襲性の少ない方法により網膜神経変性を抑制する治療法の開発が必要であると考えられる。

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。その中で、糖尿病網膜症や緑内障での網膜神経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) による網膜神経細胞死に対して、生理活性ペプチドであるアペリンの硝子体内投与および内因性アペリンが保護作用を示すことを明らかにした。さらに最近、糖尿病モデルマウスに高脂肪食を負荷することによって早期に網膜神経変性が起こること、およびアペリンを欠損させることによってこの網膜神経変性の発症が早まることを明らかにした。これらのことから、アペリンが糖尿病網膜症における網膜神経変性を抑制できる新たな治療薬となる可能性が考えられる。これを実用化に繋げるためには、侵襲性が低く且つ臨床での使用頻度の高い投与方法でアペリン受容体刺激薬の網膜神経保護効果を明らかにすることが重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

アペリン受容体を活性化する薬物を経口投与することによって、糖尿病モデルマウスで生じる網膜神経変性が抑制される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

糖尿病モデルマウスとして雄性秋田マウスを用い、5 週齢から高脂肪食を負荷した。網膜神経障害は、網膜電図の測定および網膜切片を用いた網膜神経細胞の免疫染色により評価した。アペリン (Wako)、アペリン受容体である APJ (Kasai et al., 2010)、網膜神経節細胞マーカー Brn-3a (Santa Cruz)、およびミユラー細胞マーカー glutamine synthetase (Santa Cruz) は、免疫蛍光染色により検出した。血糖値は、グルテストミント (三和化学) を用いて測定した。Aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、lactate dehydrogenase (LDH)、total cholesterol (T-CHO)、triglyceride (TG)、non-esterified fatty acids (NEFA)、low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C)、および high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) は日立 7180 型自動分析装置 (日立ハイテクノロジーズ) により測定した。各因子の測定試薬として、L-type Wako AST J2 (Wako)、L-type Wako ALT J2 (Wako)、L-type Wako LD S (Wako)、L-type Wako CHO M (Wako)、L-type Wako TG M (Wako)、NEFA-HR (Wako)、Cholesterol LDL (Sekisui Medical Co. Ltd)、および Cholesterol N HDL (Sekisui Medical Co. Ltd) を用いた。

## 4. 研究成果

網膜において、アペリン-APJ システムがどの細胞間で機能しているのかについて調べるため、網膜におけるアペリンおよび APJ の発現を解析した。その結果、アペリンは、ミユラー細胞マーカーである glutamine synthetase の陽性細胞内に陽性反応がみられた。一方、APJ は、網膜神経節細胞マーカーである Brn-3a 陽性細胞と内顆粒層の細胞において強い陽性反応がみられ、外顆粒層の細胞においても陽性反応がみられた (図 1)。

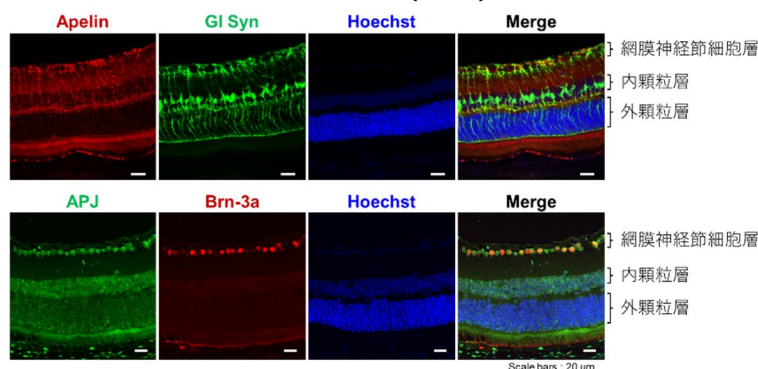


図 1 網膜におけるアペリンおよび APJ の発現細胞の同定

高脂肪食を負荷した秋田マウスの網膜機能について網膜電図測定器を用いて評価した結果、高脂肪食負荷 4 週間後において網膜電図の振幅の低下がみられた。また、この高脂肪食を 4 週間負荷した秋田マウスの網膜では網膜神経節細胞数および錐体細胞数の減少がみられことから、高脂肪食を負荷した秋田マウスでみられる網膜機能の低下は、網膜神経細胞の脱落によるものであることが示唆された。

高脂肪食を負荷した秋田マウスで生じる網膜神経変性に対するアペリン受容体アゴニスト ML233 の保護効果について検討した。ML233 (5 mg/kg) を 1 日おきに週 3 回、4 週間経口投与した結果、高脂肪食負荷 4 週間後にみられる網膜電図の低下および網膜神経細胞の脱落が抑制された。

ML233 の網膜神経保護作用が血糖値や血漿脂質パラメーターに影響を与えた結果によるものであるか否かを明らかにするため、ML233 を投与した高脂肪食負荷秋田マウスの血糖値および血漿脂質パラメーターについて解析した。その結果、秋田マウスでみられる血糖値の上昇、および高脂肪食摂取による T-CHO、TG、NEFA、LDL、および HDL 値の上昇に対して ML233 の投与は影響を与えなかった。これらの結果から、ML233 による網膜神経保護効果は、少なくとも血糖値や血漿脂質パラメーターに影響を与えることによって生じた結果ではないことが示された。

また、ML233 の安全性について検討するため、臓器障害マーカーである血漿中 ALT、AST、および LDH 値に対する ML233 の影響について解析した結果、ML233 を投与した高脂肪食負荷秋田マウスにおいて、これらの数値の上昇は認められなかった。この結果は、少なくとも 4 週間の ML233 の投与によって臓器障害はみられないことを示唆している。

以上の結果から、網膜においてアペリン-APJ システムは網膜神経細胞 - ミュラー細胞間で機能していること、また、アペリン受容体アゴニストである ML233 は、経口投与によって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変性を抑制できることが示唆された。これらのことから、アペリン受容体を活性化する薬物が糖尿病網膜症早期に生じる網膜神経変性を抑制できる新たな治療薬となる可能性が考えられた。

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 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 -

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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

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 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 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 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 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 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
研究協力者	柴垣 郁弥 (Shibagaki Fumiya)		

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
---------	---------