

論文の内容の要旨

論文題目 生理活性脂質産生酵素オートタキシンを標的とした新規眼圧下降薬の開発と有効性の検討

氏名 長野 哲道

序論では、本研究の目的、特徴、背景について紹介した。眼圧上昇は、緑内障において視神経の軸索障害、網膜神経節細胞死を引き起こし、失明に繋がりうる重大なリスク因子である。眼内を循環する房水は毛様体無色素上皮にて常に産生され、後房、瞳孔、隅角を経て眼外へと排出される。抵抗ある流出路から眼外へと排出されることによって、眼圧は一定に維持されている。前房水の流出経路には、線維柱帯流出路、ぶどう膜強膜路の2つが存在するが、主な流出経路は、線維柱帯、シュレム管を介する線維柱帯流出路であり、ヒトの眼において前房水の約80%を排出する。線維柱帯流出路を介した前房水流出能の低下が緑内障患者における、眼圧上昇の主な原因と考えられている。房水流出抵抗は主に、線維柱帯、シュレム管内壁の傍管腔領域に生じる。組織学的検証では、細胞外マトリックスが蓄積し、線維柱帯流出路における流出抵抗の増大していることが示されている。

眼圧は現在、最も重要かつ唯一、臨床上で治療可能な緑内障のリスク因子であり、また同時に、眼圧は現在の緑内障治療において唯一のターゲットである。数多くの点眼薬が房水産生抑制もしくは房水流出率を増大させることで眼圧下降作用を示す。プロスタグランジン類似体、 β 遮断薬、炭酸脱水酵素阻害薬、 α_2 刺激薬、Rhoキナーゼ阻害薬など様々な点眼薬が緑内障における眼圧下降薬としてこれまでに承認されてきた。しかし、点眼薬の多剤併用療法であっても、十分に眼圧、緑内障の進行を制御することができず、失明に至る症例が存在する。

オートタキシン(Autotaxin:ATX)は、リゾフォスホリパーゼD活性を有する分泌酵素であり、リゾフォスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine :LPC)を、リゾフォスファチジン酸 (lysophosphatidic acid :LPA)に変換する。ATXは、細胞外LPAの大部分を産生する。LPAは、胚形成、血管形成、細胞骨格の変化を伴う組織改造、細胞外マトリックスの蓄積、創傷治癒において重要な役割を果たしている。我々の研究グループは、過去の研究において、緑内障患者のすべての病型において、ヒト前房水におけるATXとLPAの濃度が有意に高く、ヒト前房水ATXとLPA濃度は眼圧および緑内障病系に相関することを報告した。これは、様々な緑内障病型においてATX-LPA経路が活性化され、房水流出路における房水流出抵抗が増大していることを示唆している。したがって、ATX-LPA経路は、房水流出抵抗のメカニズムに基づいて、眼圧下降治療の有望なターゲットとなり得る。点眼薬として有効なATX阻害剤を開発するためには、前房内高ATX活性を有するモデル動物が必要不可欠である。しかし、眼圧上昇と同時に前房内高ATX活性を有するマウスにつ

いてはこれまでに報告がなかった。

第2章では、化合物ライブラリーにおける ATX を標的としたハイスループットスクリーニング(**high-throughput screening :HTS**)にて得られた2種類のヒット化合物を最適化することによって点眼薬として有効な新規 ATX 阻害剤を開発することにした。その結果、点眼投与にて有効であり、非常に強い阻害活性 (IC_{50} 5.9 nM) を有する新規 ATX 阻害低分子化合物(**Aiprenon**)を開発した。

第3章では、ATX が眼圧に与える作用を *in vivo* 検証を行った。レーザー誘導一過性高眼圧マウス、正常マウスにおける、**Aiprenon** 点眼投与による眼圧下降作用を検証した。レーザー周辺虹彩切開術(**laser peripheral iridotomy :LPI**)がもたらす一過性高眼圧を有するマウスを対象として、**Aiprenon** の眼圧下降作用を評価した。その結果、**control** 眼と比較して、レーザー周辺虹彩切開術は 25.2%有意に眼圧を上昇させた。一方で、**LPI** 眼と比較して **Aiprenon** の点眼投与によって眼圧は有意に 14.7%低下した。また同様に、正常マウス眼の眼圧に対する新規 ATX 阻害剤の作用も検証した。その結果、**control** 眼と比較して、**Aiprenon** の点眼投与によって、正常眼の眼圧も有意に 12.7%下降した。

第4章では、ヒト線維柱帯細胞、サルシュレム管内皮細胞を用いて線維柱帯流出路に及ぼす作用を *in vitro* で検証した。ATX および **Aiprenon** の線維柱帯流出路における影響を細胞レベルで検証するため、**filamentous actin (F-actin)**、 **α -smooth muscle actin (α SMA)**の免疫染色、ウェウタンブロッティングを行い、ヒト線維柱帯細胞の筋線維芽細胞への分化を評価した。その結果、免疫染色では、ATX は、ヒト線維柱帯細胞における **α SMA**、**phalloidin** の発現、アクチンストレスファイバーの重合をもたらした。しかし、10 μ M **Aiprenon** を投与すると、ATX によってもたらされた **α SMA**、**phalloidin** の発現やアクチンストレスファイバーの重合は、抑制された。また、ウェウタンブロッティングでは、ATX 投与群において、 **α SMA** の発現は、**control** 群と比較して有意に増加していることが示された。しかし、**Aiprenon** 投与によって ATX によって引き起こされた **α SMA** の発現増加は抑制された。

さらに、サルシュレム管内皮細胞の細胞間バリア機能を、免疫染色、経内皮電気抵抗 (**transendothelial electrical resistance :TEER**)測定、透過性試験 (**fluorescein permeability**)を行うことで検証した。サルシュレム管内皮細胞の細胞間接着に必要なタンパク質の流動性における ATX の関与を明らかにするため、タイトジャンクションに関与するタンパク質である **ZO-1** と、細胞間接着に関与するアダプタータンパク質である **β -catenin** の免疫染色を行った。その結果、**control** と比較して、ATX を投与したサルシュレム管内皮細胞の辺縁に **ZO-1**、 **β -catenin** の局在化を認めた。ATX 投与によって、サルシュレム管内皮細胞間に、強固なタイトジャンクションが形成されたことが示された。しかし、ATX と **Aiprenon** を投与したサルシュレム管内皮細胞では、**ZO-1**、 **β -catenin** の辺縁への局在は断片化し、細胞間隙は拡大していた。

経内皮電気抵抗測定では、**control** 群と比較して、ATX 投与群は、4, 6, 24 時間後で有意に高値を示した。しかし、10 μ M **Aiprenon** と ATX を投与した群の経内皮電気抵抗は、ATX

のみ投与した群と比較して、1, 4, 6, 24 時間後で有意に低かった。

また、透過性試験では、control 群と比較して、ATX 投与群で、6, 24 時間後、有意に透過性が低かった。しかし、ATX 投与群と比較して、10 μM Aiprenon と ATX を投与した群の透過性は、4, 6, 24 時間後、有意に高かった。

第 5 章では、今後の臨床応用に向けての新規 ATX 阻害剤の安全性、薬物動態(代謝安定性、溶解性)を検証した。ヒト角膜上皮細胞、ヒト角膜内皮細胞、ヒト線維柱帯細胞、サルシュレム管内皮細胞に対する細胞毒性の評価として、WST-1 アッセイを *in vitro* で行った。その結果、ヒト角膜上皮細胞、ヒト角膜内皮細胞では 100 μM まで細胞毒性を認めなかった。また、ヒト線維柱帯細胞、サルシュレム管内皮細胞では 10 μM まで細胞毒性を認めなかった。

本研究では、結論として、ATX を眼圧制御機構における標的タンパク質として見だし、さらに、新たに開発した ATX 阻害剤 Aiprenon は、新規眼圧下降治療の有望な候補化合物となりうることを示した。