

審査の結果の要旨

氏名 長野 哲道

本研究は、生理活性脂質産生酵素オートタキシン(Autotaxin:ATX)の眼圧制御機構に及ぼす影響を明らかにし、ATX を標的とした新規眼圧下降療法を開発するために行ったものである。下記の結果を得ている。

1. 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 阻害剤の開発を行った。その結果、点眼投与にて有効であり、非常に強い阻害活性 (IC₅₀ 5.9 nM) を有する新規 ATX 阻害低分子化合物(Aiprenon)を開発した。
2. 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% 低下した。
3. 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、ウェウタンブロットティングを行い、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、ウェウタンブロットティングでは、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。サルシユ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 を投与したサルシユ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、サルシユ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 を投与したサルシユ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 μ M 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。

4. 今後の臨床応用に向けての新規 ATX 阻害剤の安全性、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、サルシユ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 μ M まで細胞毒性を認めなかった。また、ヒト線維柱帯細胞、サルシユレム管内皮細胞では 10 μ M まで細胞毒性を認めなかった。また、臨床応用に向かう上で、代謝安定性、溶解性にも問題がないことを確認した。

以上、本論文は、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。本研究は、これまで未知であった眼圧制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士(医学)の学位請求論文として合格と認められる。