

博士論文

眼組織におけるプロスタノイドFP受容体  
の機能解析と緑内障治療薬への応用

木村(山岸) 麗子

## 目次

## 要旨

### 第一章 序論および研究背景

### 第二章 FP 受容体の生理的機能

#### 通常眼圧および眼圧上昇時に対する各種プロスタノイド受容体の関与

##### 2-1 背景

##### 2-2 目的

##### 2-3 方法

##### 2-4 結果

##### 2-5 考察

### 第三章 FP 受容体アゴニストによる有害事象発症の機序解明

#### プロスタグランジン関連薬使用による上眼瞼溝深化に対する FP 受容体の関与

##### 3-1 背景

##### 3-2 目的

##### 3-3 方法

##### 3-4 結果

##### 3-5 考察

### 第四章 FP 受容体アゴニストの将来への展開

#### 4-1 プロスタグランジン関連薬の眼圧非依存的な視神経保護作用

##### 4-1-1 背景

4-1-2 目的

4-1-3 方法

4-1-4 結果

4-1-5 考察

4-2 FP 受容体刺激作用を有する新規眼圧下降薬の可能性

4-2-1 背景

4-2-2 目的

4-2-3 方法

4-2-4 結果

4-2-5 考察

第五章 総合討論

参考文献

謝辞

## 要旨

現在、緑内障治療における眼圧下降のターゲットである、プロスタノイド FP 受容体の眼圧制御に関わるメカニズムの解明を目的とし、本研究を行った。

まず、通常状態で各種プロスタノイド受容体を欠損させたマウスの眼圧と野生型マウスの眼圧を比較した場合、いずれの遺伝子欠損マウスにおいても変化が認められなかった。さらに、野生型マウスへ PGE<sub>2</sub> あるいは PGF<sub>2α</sub> 点眼することで一過性眼圧上昇が誘発されることが明らかになり、この一過性眼圧上昇に対して、FP 受容体を欠損させたマウスでは、野生型マウスに比べ顕著な眼圧上昇が認められた。このことから、通常状態で FP 受容体が眼圧を制御するために働いているというより、急激な眼圧上昇に対して何らかの要因で引き起こされる FP 受容体刺激が、眼圧を下げることで眼圧の恒常性を維持する働きを担っている可能性が示唆された。

次に、既存の眼圧下降薬である PG 製剤の副作用である上眼瞼深溝化 (DUES) に対する FP 受容体の関与について検討した結果、3T3-L1 細胞を用いた検討では、前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞へ脂肪分化誘導刺激を行った場合、脂肪分化誘導刺激で得られた分化脂肪細胞は明らかな脂肪滴産生を認めた。これに対し、**bimatoprost** および **latanoprost** などの既存のプロスタノイド受容体アゴニスト処置することで、分化脂肪細胞からの脂肪滴産生は抑制されることが明らかとなった。また、野生型マウスの腹部から得た初代前駆脂肪細胞へ、分化誘導刺激を行うことで得られた野生型マウス分化脂肪細胞において、FP 受容体アゴニスト処置により、3T3-L1 細胞と同様に脂肪滴産生抑制が認められたのに対し、FP 受容体遺伝子欠損マウスから得た分化脂肪細胞では、脂肪分化誘導刺激により脂肪滴産生は認められたものの、野生型マウスで得られた FP 受容体アゴニスト処置による脂肪滴産生抑制作用は認められな

かった。このことから、DUES 発症には分化脂肪細胞による脂肪滴産生抑制が関与し、また脂肪滴産生機序の一部に FP 受容体が関与することが示された。

さらに、緑内障治療に有用であると考えられる眼圧非依存的な視神経保護作用について、ラット初代網膜神経節細胞 (RGC) を用いて検討した結果、既存の FP 受容体アゴニストで顕著な apoptosis 抑制を介した RGC 細胞死抑制作用が認められた。このことから、眼圧非依存的な視神経保護作用を有する FP 受容体アゴニストは眼圧下降作用のみならず、眼圧に依存しない視神経保護作用を有することが、緑内障治療に重要な働きを担っていることが推察された。このように、眼圧下降作用のみならず、眼圧非依存的な視神経保護作用の有無を検討していくことが、より良い緑内障治療薬への開発に繋がると考えられる。

最後に、新規緑内障治療薬として開発が進められている FP/EP3 受容体デュアルアゴニストである sepetaprost のマウス眼圧および房水流出に対する作用について検討した。その結果、sepetaprost は既存の FP 受容体アゴニストに比べて顕著な眼圧下降持続時間の延長を示すことが明らかとなった。また、この眼圧下降持続時間の延長作用について、FP および EP3 受容体欠損マウスを用いて検討した結果、FP 受容体のみならず EP3 受容体への刺激が眼圧下降持続時間の延長に関与することが示された。さらに、sepetaprost は FP および EP3 受容体遺伝子欠損マウスを用いた検討から、FP および EP3 受容体刺激を介した房水流出量亢進作用を有することが示された。

以上、本研究により、プロスタノイド FP 受容体の眼圧制御や副作用発症に関わる機序について、一部解明することが出来、今後眼圧制御メカニズムを解明することは、緑内障治療のより良い薬剤開発に繋がると考えられる。

## 第一章 序論および研究背景

緑内障は、「視神経と視野に特徴的変化を有し、通常、眼圧を十分に低下させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患である」と緑内障診療ガイドラインにて定義されており<sup>1</sup>、緑内障の視神経障害および視野障害は、基本的に進行性かつ非可逆的である。我が国において、40歳以上の緑内障の有病率は5%であり、そのうち72%は眼圧が21mmHg以下と正常範囲内である正常眼圧緑内障であることが、本邦における大規模緑内障疫学研究である多治見スタディの結果より明らかになっている<sup>2-5</sup>。この緑内障における視神経障害および視野障害と深い関わりを持つ眼圧は、眼内を満たしている眼内液の圧力のことを指す。この眼内液は「房水」と呼ばれており、この房水は毛様体上皮で産生され、眼内を還流した後、抵抗の存在する流出路を通じて眼外へ排出されることで、眼球内圧を一定に保つ働きを担っている。この働きにより、網膜を一定に伸展し、正常な像を網膜に結像することを可能にしている。また、眼内を還流することで、有害物質の排出や免疫応答においても重要な役割を果たすことが明らかになっている<sup>6</sup>。毛様体上皮から産生された房水は、経シュレム管経路（主経路）と呼ばれる後房－瞳孔－隅角線維柱帯間隙－シュレム管－強膜上静脈を通るルート、および毛様体腔－上脈絡膜腔－強膜を通るぶどう膜強膜流出路（副経路）から眼外へ排出される（Figure 1）。

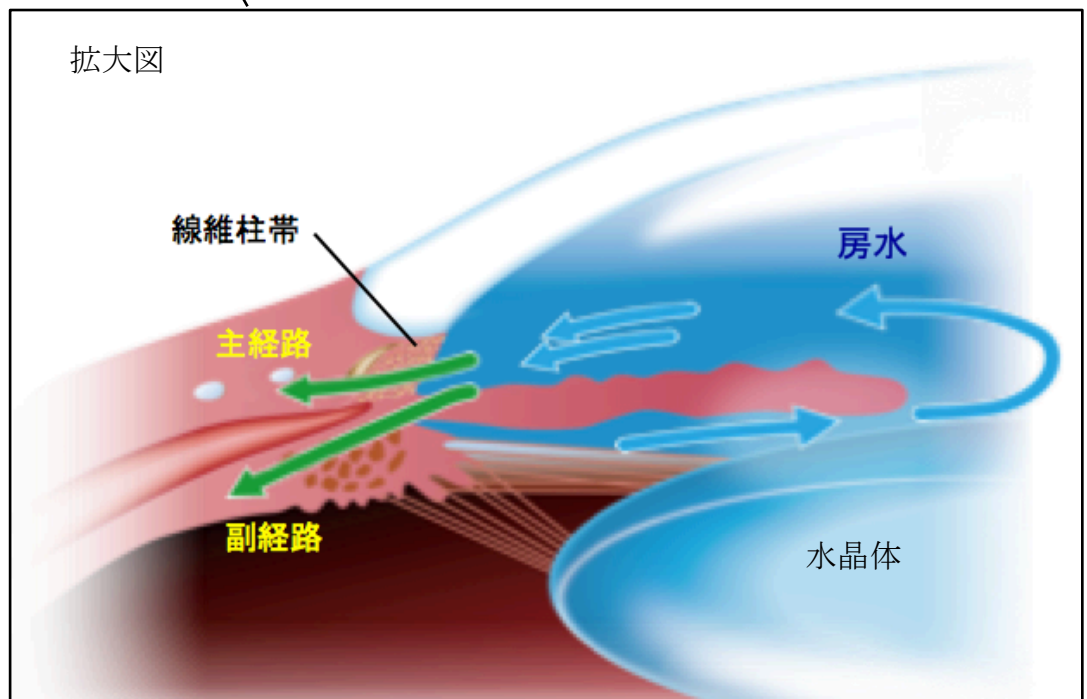
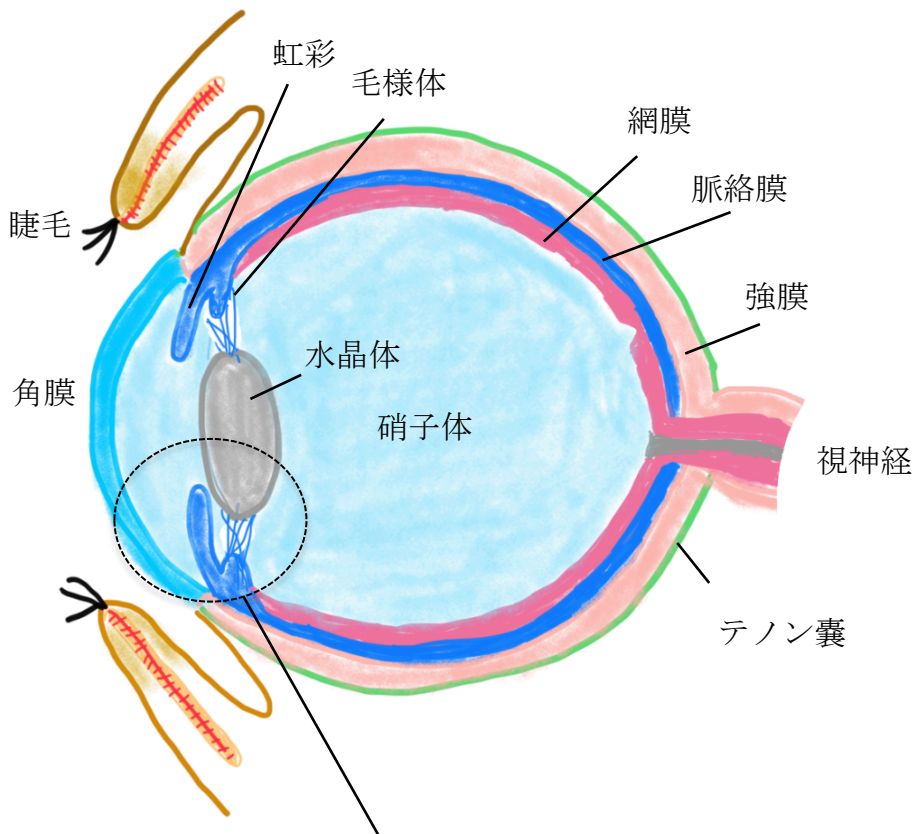


Figure 1 前房の構造と房水循環



このように眼圧は、房水産生とその排出のバランスで制御されており、日本人正常眼における眼圧の統計学的上限は 19.9 - 20.0 mmHg であると言われている<sup>3</sup>。この房水産生と排出のバランスが何らかの要因で崩れ、眼圧が高くなると視神経が圧迫され視神経障害が起こり、緑内障の発症・進行につながる。また、各眼の健常眼圧や視神経の脆弱性は異なっているため、眼圧が統計学的に正常範囲内であっても圧依存性の視神経障害が生じる。緑内障は自覚症状に乏しく、視野欠損などの自覚症状が出始めた頃には進行が進み、視力低下や失明に至ってしまうことがある。実際、我が国における成人の中途失明原因の第一位は緑内障となっており、2015 年に全都道府県を対象に行われた 2015 年度に新規に視覚障害認定を受けた 18 歳以上について、年齢や原因疾患、性別等を調査した結果において、視覚障害発生年齢の割合は 80 - 89 歳 (29.6%)、70 - 79 歳 (26.3%)、60 - 69 歳 (17.3%) の順に多く、原因疾患の第 1 位は緑内障 (28.6%)、第 2 位は網膜色素変性 (14.0%)、第 3 位は糖尿病網膜症 (12.8%)、第 4 位は黄斑変性 (8.0%) であった<sup>7</sup>。緑内障治療では早期発見および早期治療が、視覚障害進行リスクを遅らせることに繋がるが、特に我が国では眼圧が正常範囲内であるにもかかわらず視神経・視野障害が進行する正常眼圧緑内障に罹患する割合が欧米諸国に比較して高く、高眼圧によるスクリーニングが困難であるため、自覚のない有病者が数多く存在し、早期発見・早期治療が極めて難しいのが現状である。

緑内障の治療については、これまでの研究結果から、眼圧下降が唯一確実なエビデンスに基づいた治療であると考えられており、眼圧下降は緑内障発症や進行を抑制し、かつ緑内障の病型や病期に関わらず有用であると示されている<sup>8-13</sup>。このエビデンスを元に現在の緑内障の治療には、眼圧を下げる目的で眼圧下降剤の点眼治療、

レーザー手術、観血的手術など様々な手法が用いられている。

現在緑内障薬物治療として、様々な作用機序を有する点眼薬が使用されており、我が国では主なものとして、1981年に交感神経β遮断薬、1999年に炭酸脱水酵素阻害剤、2009年にプロスタグランジン関連薬、2012年交感神経α2作動薬、そして2014年Rhoキナーゼ阻害薬が発売され、現在に至る。

基本的に、緑内障治療の目的は、患者の視覚の質 (QOV) を改善することで得られる生活の質 (QOL) を維持していくことである<sup>14</sup>。また、緑内障が進行性疾患であることから、長きにわたる治療が必要となってくる。そのため、治療の際には単純に短期的に眼圧を下げるだけでなく、持続的な眼圧下降、長期的な眼圧下降剤の使用や外科的処置で得られる視神経あるいは視覚障害の進行抑制作用以外の副次的効果、副作用の発生率低下、アドヒアランスの向上など、様々な薬物や手術における単発的な眼圧下降以外の複合的要因についても、総合的、多角的に検討していくことが必要である。これらを踏まえた上で、上述の通り数多く存在する緑内障の治療の中で、第一選択として選択されるのは薬物治療であり、現時点ではプロスタグランジン (prostaglandin; PG) 関連薬が第一選択薬となっている。その理由として、点眼回数が1日1回であること、全身副作用がほとんどないこと、眼圧下降作用が現行の緑内障点眼薬の中で最も強力であることが挙げられ、有効性と使いやすさ・治療の継続性の両面から支持される治療法となっている<sup>15</sup>。

このPG関連薬は、PGF<sub>2α</sub>の骨格を利用して開発された化合物である。もともとPGは炎症惹起物質として知られていたが、1977年にPGE<sub>2</sub>およびPGF<sub>2α</sub>の低濃度点眼による眼圧下降作用が報告された<sup>16</sup>。しかしながらPGF<sub>2α</sub>点眼は結膜充血や刺激性などの局所的副作用が強く、医薬品として開発されることはなかった。そこで、PGF<sub>2α</sub>誘導

体の医療用点眼剤としての開発が進められ、高い眼圧下降作用を有し、かつ局所的副作用を軽減した化合物が開発された<sup>17</sup>。これが現在、広く使用されている latanoprost である (Figure 2)。Latanoprost は角膜中エステラーゼで加水分解されて角膜を透過し、眼内で遊離酸である活性型 latanoprost となって作用を示す。エステラーゼで分解されることで作用を発揮するようなプロドラッグ化を利用することで、眼表面で起こる結膜充血や刺激性を軽減している。また、latanoprost の主な作用点はプロスタノイド受容体の一つである FP 受容体への刺激作用であるが、これは C17 位に phenyl 基を導入させることで、構造が安定し FP 受容体への親和性が向上することが明らかになっている<sup>18</sup>。

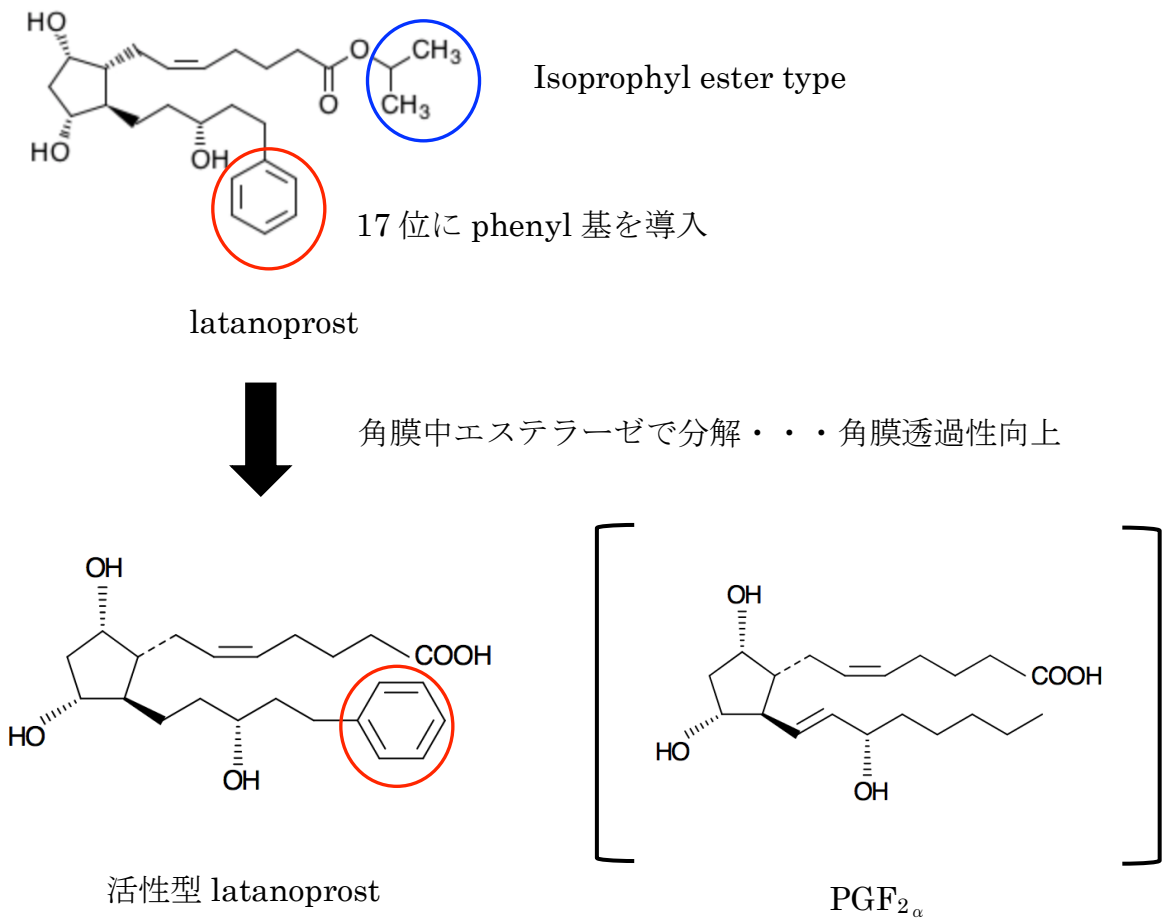


Figure 2 Latanoprost の化学的構造

Latanoprost の作用点であるプロスタノイド受容体は、EP1,2,3,4,FP、TP、DP、IP の 8 種類存在することがわかっている (Figure 3)。プロスタグランジンは 20 個の炭素鎖からなる生理活性脂質であり、構造が類似するトロンボキササンと合わせてプロスタノイドと称される。このプロスタグランジンはアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼの働きにより産生され、Figure 3 に示す各種受容体に作用し、様々な生体反応を引き起こす。<sup>19, 20</sup>

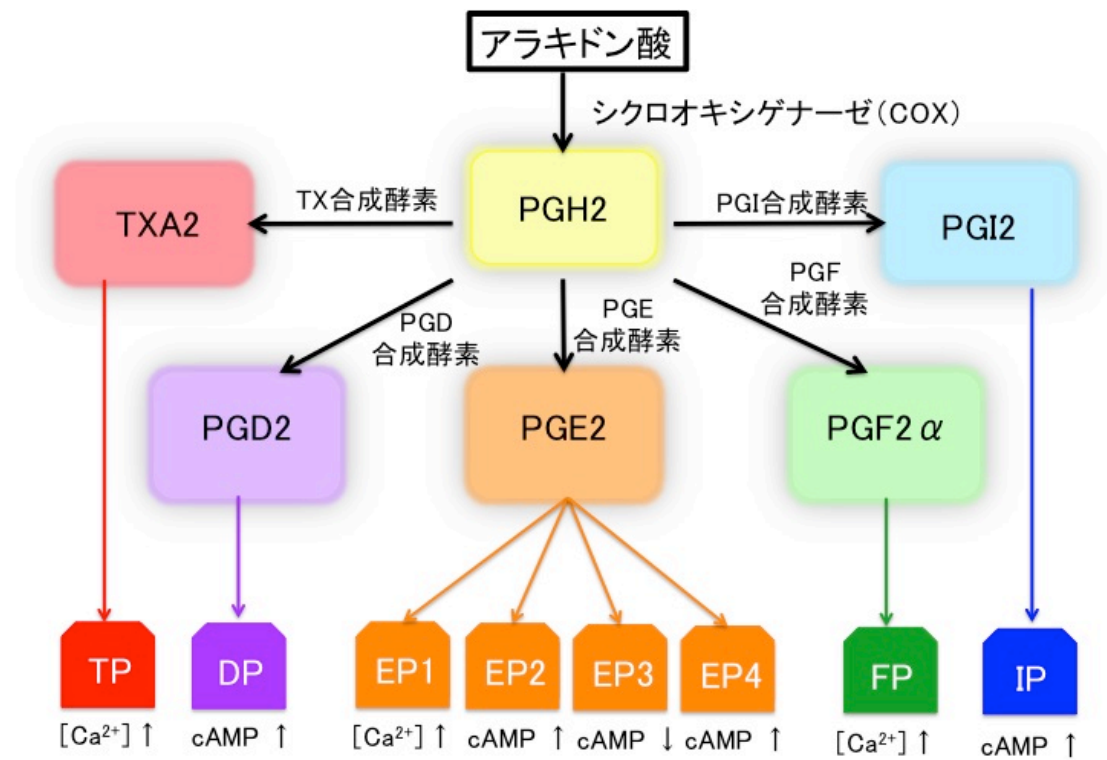


Figure 3 プロスタグランジン産生経路とプロスタノイド受容体について

この中で眼圧に影響を及ぼす受容体は、FP、EP2 および EP4 であることが、マウスを用いた実験より明らかになっており<sup>21</sup>、現在市販されている PG 関連薬は点眼などで FP 受容体に結合することで眼圧下降が起こると考えられている。PG 関連薬の眼圧下降機序の一つは、FP 受容体刺激作用によりコラーゲン分解酵素の一つである matrix metalloproteinase (MMP) を遊離させ、毛様体、虹彩根部および強膜などで細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲン分解を誘導することにより<sup>22, 23</sup>、房水流出の副経路と言われるぶどう膜強膜流出路からの房水流量を増加させることとされる<sup>22, 24, 25</sup>。興味深いことに、PG 関連薬点眼という、外的な作動薬による FP 受容体刺激が眼圧下降を示すことについては数多くの報告があるものの、通常状態において FP 受容体やその他プロスタノイド受容体が眼圧制御するメカニズムについての報告はまだない。つま

り、外的に刺激した場合によってのみ眼圧下降を示すことが明らかにされているだけで、受容体本来の生体内での役割については不明のままである。

本研究の目的をスキーム化して下記に示す。

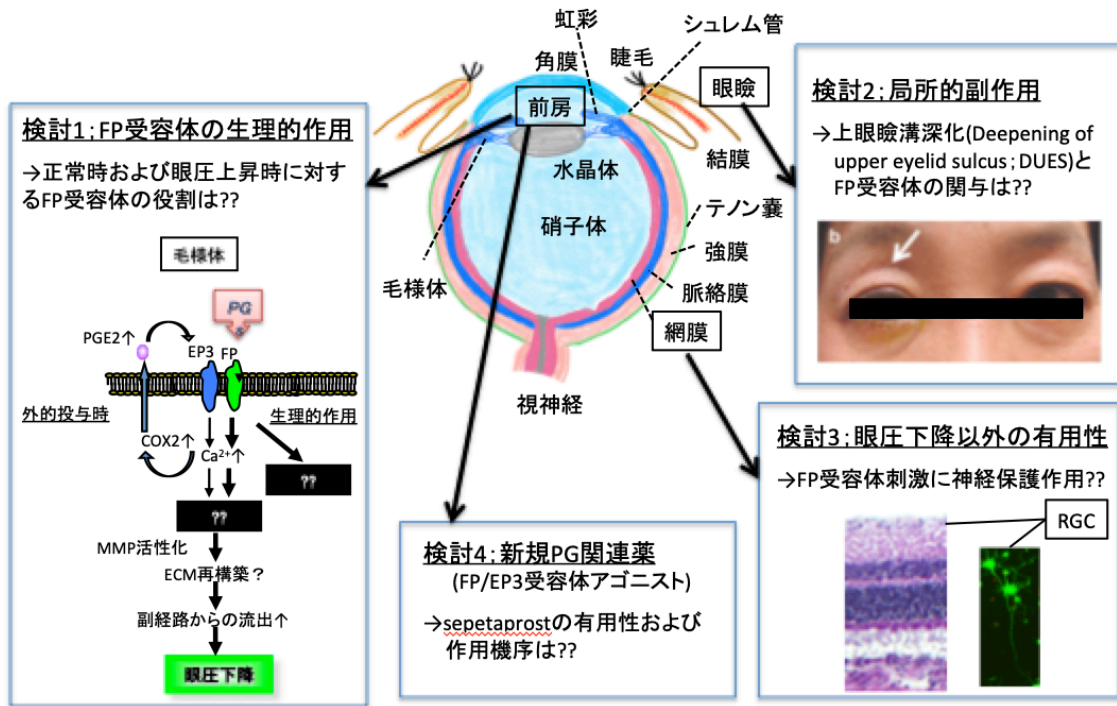


Figure 4 研究全体の目的

Figure 4 に示す通り、本研究ではまず、第二章として、プロスタノイド受容体が通常時の眼圧維持の生理機能に関与するかを検討することにした。プロスタノイド受容体関連の遺伝子改変マウスを用い、野生型 (wild type; WT) および遺伝子欠損 (knockout; KO) マウスでの通常時の眼圧への影響を検討した。また、外的に投与された場合に眼圧下降作用を示すプロスタノイド受容体の存在意義を探るため、眼圧が上昇する病態においても、各種プロスタノイド受容体の作用を検討した。

さらに、PG 関連薬の薬理作用として、眼圧下降以外の副作用に特徴があることが臨床での使用経験から明らかとなっている。第一選択薬になる理由として、安全性の高

さが重要であることは言うまでもないが、既存の PG 関連薬は、全身副作用がなく極めて安全性の高い治療法と言われているものの、局所的副作用については結膜充血<sup>26-31</sup>、睫毛伸長および乱生<sup>32,33</sup>、眼瞼および虹彩色素沈着<sup>26,28,31,33-36</sup>、眼周囲脂肪萎縮<sup>32,37-41</sup>等、従来の点眼薬に見られない特異的な作用を生じることが報告されている。結膜充血については、薬理作用の延長で生じる副作用と考えることが可能であるが、睫毛伸長や乱生、眼瞼および虹彩色素沈着、眼周囲脂肪萎縮などについてはその発生機序は不明である。これらの局所的副作用の一つである眼周囲脂肪萎縮により起こる上眼瞼溝深化 (Deepening of upper eyelid sulcus ;DUES) については、当研究室でも日本人を対象にした臨床試験からその発生率などを明らかにしているが、極めて高頻度であり<sup>38-40,42</sup>、緑内障手術成績にも影響する副作用であることが近年報告されている<sup>43,44</sup>。従って副作用の軽減の可能性を探るため、本研究では、DUES の発生原因と眼圧下降の主な作用点である FP 受容体との関連性について第三章にて詳細に検討した。

次に、緑内障治療では少しでも眼圧を下降させることが求められており、過去 20 年以上現在の FP 受容体作動薬より有効な眼圧下降薬が開発されていない状況を考えてみると、それ以上の眼圧下降の有効性を有する薬剤の開発が求められる。また、近年、緑内障性視神経障害の眼圧以外の危険因子も注目されており、薬物による視神経乳頭血流の改善や神経保護による治療の可能性が模索されてきている<sup>28,45</sup>。そのため、最終章第一節では既存の高い眼圧下降作用を示す FP 受容体作動薬をより良い薬剤へ発展させるために、その将来性について模索する目的のもと、緑内障により障害される網膜神経節細胞に対する神経保護作用と FP 受容体の関係性について検討した。さらに第二節で、FP 受容体作動薬以上の眼圧下降有効性を有する新規 PG 関連薬の

開発のため、FP 受容体以外のプロスタノイド受容体との関係に着目した。

以上、本研究の目的は、緑内障第一選択薬である、プロスタノイド FP 受容体の本来の眼内生理的機能の解明、眼圧下降以外の有害事象の発生機序や薬理作用による付加価値、更に他のプロスタノイド受容体との相互作用による新たな新規点眼薬開発の検討、を通して将来のより良い緑内障治療の開発を目指すことにある。



## 第二章 FP 受容体の生理的機能

-通常眼圧および眼圧上昇時に対する各種プロスタノイド受容体  
の関与-

## 2-1 背景

プロスタノイドは PG とトロンボキサンの総称であり、その受容体をプロスタノイド受容体と呼んでいる。プロスタノイドは、細胞膜から切り出されたアラキドン酸から合成される生理活性脂質であり、眼では炎症起因物質として、古くから“irin”と名付けられた物質が存在していると言われていたが、後にそれらが PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  を主とすることが明らかになっている<sup>46</sup>。現在、緑内障治療の第一選択薬は、PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  の化学構造を利用して開発された PG 関連薬であり、点眼投与において極めて強い眼圧下降作用を有することが知られているが、それらの作用機序である FP 受容体の生理的役割については明らかにされていない。

基本的に生体内に存在する PGE<sub>2</sub> は EP1, EP2, EP3, EP4 受容体の 4 種類の受容体に、PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  は FP 受容体に主に作用する。これについて、桐山ら<sup>47</sup> により、マウスプロスタノイド受容体に対する、各プロスタノイド受容体のリガンド特異性やプロスタノイドリガンドの受容体選択性が詳細に検討されている (Figure 5)。

リガンド	Ki 値							
	DP	IP	TP	FP	EP1	EP2	EP3	EP4
PGE <sub>2</sub>				100	20	1.2	0.85	1.9
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>				3.4	1300		75	

Figure 5 PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  のマウスプロスタノイド受容体に対する結合親和性

現在、プロスタノイド受容体の中で、眼圧下降には PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  が作用する FP 受容体が重

要な役割を有することが、受容体への親和性が異なる化合物を用いた実験や、各種遺伝子改変マウスを用いた実験から明らかになっている<sup>48-51</sup>。また、眼圧下降作用を示すのは、FP 受容体だけでなく、EP2 および EP4 受容体への刺激でも生じることが報告されている<sup>21</sup>。さらには、プロスタノイド受容体が刺激されることで二次的に産生される内因性 PG が眼圧下降に関与することや眼圧の恒常性の維持に対する論文についてもいくつか報告されている<sup>48, 52-56</sup> (Figure 6)。

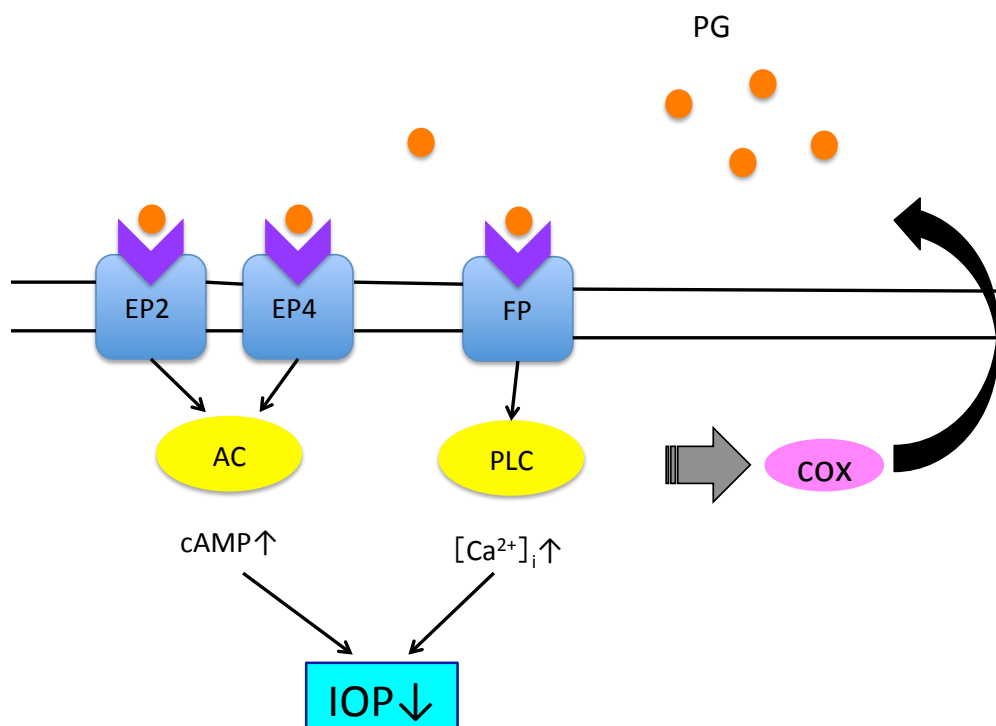


Figure 6 IOP 低下における EP 2、EP 4 および FP 受容体の関与

上述のように、FP 受容体は眼圧制御、特に眼圧下降に関係あることから、眼内環境に応じて何らかの機能を有する可能性がある。しかしながらその役割は、外的な FP 受容体刺激により眼圧下降に関係することが解明されただけで、本来の眼内での生理

的役割についてはこれまで明らかにされていなかった。過去には、FP 受容体欠損マウスでベースライン眼圧が変動している可能性を期待して検討したが、ベースライン眼圧は日中夜間ともに野生型と同様であったため<sup>51</sup>、FP 受容体が通常的眼圧の調整に関与している可能性は低いと考えられた。

そこで私は、FP 受容体の存在意義を解明するため、炎症など一時的に眼圧が上昇する場合に備えて FP 受容体が存在するのではないかと仮説を立てた。というのも、これまでの研究でぶどう膜炎など眼内炎症時には眼内 PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  量が増加することや<sup>46</sup>、PGE<sub>2</sub> や PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  をマウス<sup>21</sup>、サル<sup>25, 57, 58</sup>、ウサギ<sup>16</sup> に投与した際に一過性の眼圧上昇が起こることが知られているからである。本研究では、PGE<sub>2</sub> あるいは PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  投与によって生じる一過性眼圧上昇に対して、FP 受容体や内因性 PG が関与するかどうかについて、マウス眼を用いて検討することにした。

## 2-2 目的

一過性眼圧上昇時におけるプロスタノイド受容体の眼圧制御について解明することを目的とし、検討を行った。

## 2-3 方法

### 実験材料

Prostaglandin E<sub>2</sub> methyl ester (Cayman chemical) および prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (Cayman chemical) は、100 % dimethyl sulfoxide (DMSO) (シグマアルドリッチジャパン

ン) 中で-80 °C超低温フリーザーにて保存したものを、使用時にリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered salts; PBS) (Invitrogen) にて各濃度に希釈して実験に使用した。このとき含有する DMSO は、予め眼圧に影響しないと確認された 5 %未満とし、対照として用いた vehicle は 0.05 % DMSO とした。また、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase; cox) 阻害剤として使用した、ネバナック懸濁性点眼液 0.1 %<sup>®</sup> (ネパフェナク点眼液;アルコンファーマ株式会社) は室温遮光保存されたものを実験に使用した。

### 実験動物

東京実験動物株式会社より近交系 C57BL6/J 雌雄マウスを購入し、8-12 週齢で実験に用いた。また、マウスは、購入後、実験予定日の少なくとも 1 週間前から、本研究室の conventional 動物室にて飼育し、また、各種 KO マウスは同動物室内で繁殖および飼育し、十分な検疫および馴化期間を設け、8-10 週齢のものを試験に使用した。動物実験は、東京大学大学院新領域創成科学研究科の承認を受け、東京大学動物実験実施規則及び東京大学動物実験実施マニュアルを遵守して行った。

各 KO マウスは C57BL6/J をバックグラウンドとして用いて作製したものを使用した。EP1 受容体 KO (EP1 KO)マウスは雌雄 EP1<sup>-/-</sup>、EP2 受容体 KO (EP2 KO)マウスは雄 EP2<sup>-/-</sup>と雌 EP2<sup>+/-</sup>、EP3 受容体 KO (EP3 KO)マウスは雌雄 EP3<sup>-/-</sup>、および FP 受容体 KO (FP KO)マウスは雄 FP<sup>-/-</sup>と雌 FP<sup>+/-</sup>を交配して作製し、EP2 および FP KO マウスについてはホモ KO マウスのみ試験に使用した。

### 投与方法

各薬剤投与は点眼投与とした。マイクロピペット (Eppendorf) にて 3  $\mu$ L マウス片眼に各薬剤を左右眼および個体ごとにランダムに滴下し、10 秒間閉眼させた。また、僚眼は無処置 (control) とした。

## 測定方法

マウス眼圧 (IOP) の測定は、覚醒下における icare<sup>®</sup> TONOLAB tonometer (Tonolab) (Icare Finland Oy.)、あるいは麻酔下における microneedle 法、2つの方法で行った。Tonolab を用いた測定は、覚醒下のマウスに対し、非侵襲的に IOP を測定した。データは測定ごとに自動算出された IOP 平均値 5 回分の平均を各データとして記録した。また、microneedle 法を用いた測定には、直径 1mm ホウケイ酸ガラス製キャピラリー (World Precision Instruments) の先端を 75-100  $\mu$ m に研磨したガラスニードルを作製し、圧トランスデューサー (model BLPR; World Precision Instruments) に接続して得られた圧変化を powerLab (AD Instruments) にてモニターできる装置を使用した (Figure 7)。実際には、予めケタミン/キシラジン混合液の腹腔内投与にて麻酔を施したマウスの前房内へ、作製したガラスニードルを刺入し、そこで得られた前房内圧を IOP とした。いずれの測定方法についても、測定は両眼に対し 21:00-23:00 の夜間 IOP を測定した。

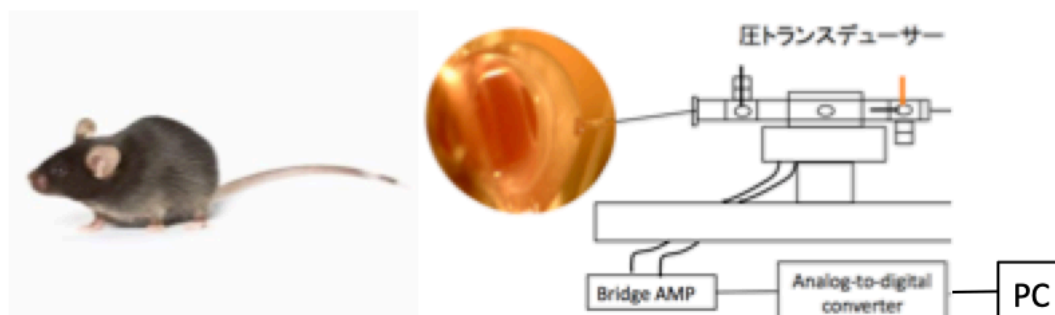


Figure 7 microneedle 法によるマウスの眼圧測定方法

## 解析方法

得られたデータは、IOP 値 (mmHg) あるいは  $100 \times (\text{薬剤投与眼 IOP 値} - \text{vehicle 投与眼 IOP 値}) / \text{vehicle 投与眼 IOP 値} (\%)$  で得られる IOP 増加率 (% IOP increase) で表した。

結果は平均値±標準偏差 (standard deviation; S.D.) で表記し、統計解析は JMP Pro 11 software (SAS Institute Inc.) にて行い、ANOVA および Student's t-test あるいは Mann-Whitney U test を用いて、p 値が 0.05 以下を有意とした。

## 2-4 結果

### 2-4-1 WT、FPKO、EP1-3KO マウスのベースライン眼圧の比較

通常状態の IOP に対してプロスタノイド受容体がどのように関与するかについては過去に報告が一つあるが<sup>51</sup>、海外の異なるコロニーと環境での研究であるため、再度入手したマウスで追試を行った。microneedle 法を用いて 10 週齢の各 EP 受容体および FP 受容体欠損マウスを用いて眼圧を測定した結果、以下のような値が得られた。WT、FPKO、EP1KO、EP2KO および EP3KO マウスのベースライン IOP はそれぞれ、 $10.2 \pm 1.4$ 、 $9.9 \pm 0.8$ 、 $10.6 \pm 0.9$ 、 $10.0 \pm 0.9$  および  $9.4 \pm 0.9$  (mmHg) であった。いずれのマウス型についても WT と比較して有意な差は認められなかった (Table 1)。

Table 1

	Wild type	FPKO	EP1KO	EP2KO	EP3KO
Mean IOP±S.D. (mmHg)	10.2±1.4	9.9±0.8 (N.S)	10.6±0.9 (N.S)	10.0±0.9 (N.S)	9.4±0.9 (N.S)

WT, FPKO, EP1KO, EP2KO および EP3KO のベースライン眼圧 (n=9-10)

#### 2-4-2 点眼する PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub> の濃度検討

上記 2-4-1 において、各 KO マウスについても WT と比較してベースライン IOP に変化が認められなかったため、FP 受容体は通常状態で活性化されて眼圧を制御しているのではなく、急な眼圧上昇が生じた時に反応して、眼圧を下げる方向へ防御的に働く作用を有するのではないかという仮説を立て、IOP 上昇モデルマウスを用いて検討することとした。IOP 上昇モデルマウスは、既報<sup>21</sup>を参考に PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  点眼により作製した。まず、各種薬剤の点眼条件について検討するため、WT マウスに 0.01 (約 0.28 mM) または 0.1 (約 2.8 mM) % の PGE<sub>2</sub> あるいは PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  を点眼し、0, 30, 60 および 120 分後の IOP を Tonolab にて測定し解析した。その結果、Figure 8A および B に示すように、0.01 および 0.1 % PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  はともに点眼 30 分後、無処置眼に比べて有意に高値を示した (p<0.01; ANOVA および Mann-Whitney U test)。さらに高濃度群 0.1 % PGE<sub>2</sub> あるいは PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  投与眼でも点眼 60 分後においても有意に高値を示した (p<0.01; ANOVA および Mann-Whitney U test) もの、0.01 % PGE<sub>2</sub> は眼圧上昇が減弱傾向あるいは PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  点眼では 0.1 % に比較して有意に減少していた (p<0.05; ANOVA および Student's t-test)。この結果から、次試験以降では PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ともに 0.1 % で使用することとした。



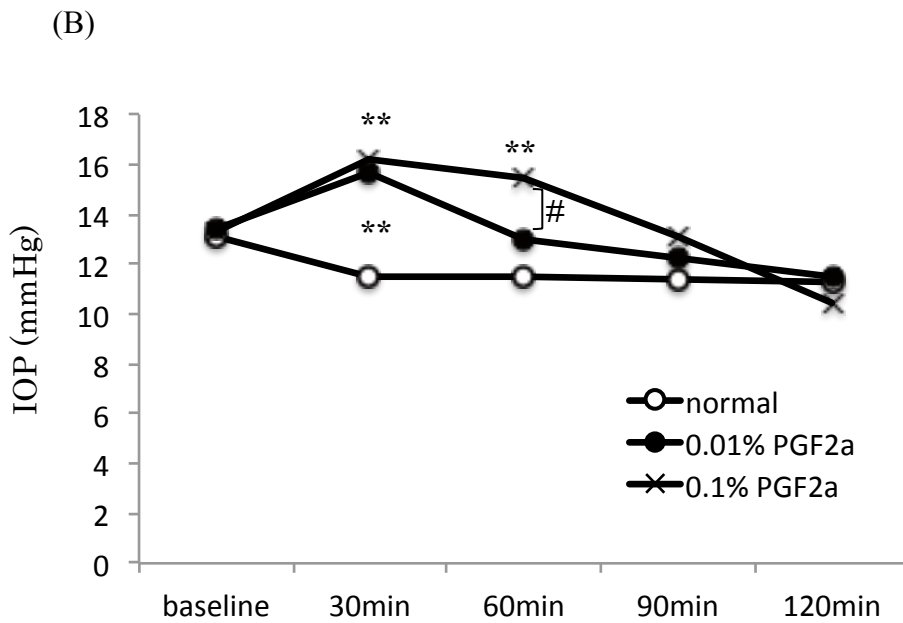
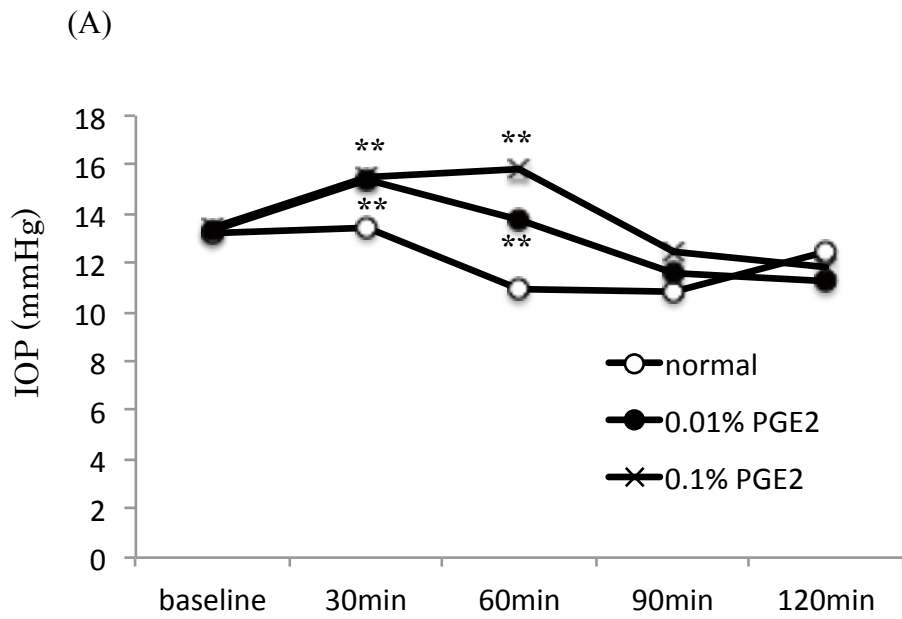


Figure 8 野生型マウス眼圧に対する PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> の濃度依存的な作用

(A) PGE<sub>2</sub> 点眼時の眼圧変化、(B) PGF<sub>2α</sub> 点眼時の眼圧変化

\*\* p<0.01; 無処置と各薬剤点眼の比較 (ANOVA および Mann-Whitney U test, n=6)

# p<0.05; 0.01% PGF<sub>2α</sub> 点眼と 0.1% PGF<sub>2α</sub> 点眼の比較 (ANOVA および Student's

t-test, n=6)

### 2-4-3 0.1 % PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 点眼時のマウス眼圧の変化

上記 Figure 8 で得られた結果をもとに、PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  の濃度をともに 0.1 % と決定し、点眼による眼圧変動をより詳細に検討するため、microneedle 法を用いて 0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼 30,60,90 および 120 分後のマウス IOP を測定した結果、以下のような値が得られた。点眼 30 分後のマウス IOP 値は vehicle 投与眼 12.8 $\pm$ 0.7 および 0.1 % PGE<sub>2</sub> 投与眼 15.7 $\pm$ 0.7 (mmHg) であった。点眼 30 分後における 0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼時の IOP は vehicle に比べ有意に高値を示した (p<0.01; ANOVA および Student's t-test) 。また、vehicle 眼および 0.1 % PGE<sub>2</sub> 投与眼の IOP はそれぞれ、点眼 60 分後 13.7 $\pm$ 1.6 および 14.8 $\pm$ 1.8 (mmHg) 、点眼 90 分後 11.2 $\pm$ 1.1 および 11.1 $\pm$ 0.8 (mmHg) 、点眼 120 分後 13.6 $\pm$ 1.3 および 11.2 $\pm$ 1.1 (mmHg) であった。点眼 30 分後において 0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼は vehicle に比べて有意に低い IOP 値を示した (p<0.05; ANOVA および Student's t-test) (Figure 9A) 。さらに、0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼 30,60,90 および 120 分後の IOP 増加率 (%) は、それぞれ 21.9 $\pm$ 5.7、6.8 $\pm$ 4.5、-0.9 $\pm$ 3.0 および -17.6 $\pm$ 7.1 (%) であり、IOP 増加率 (%) は経時的な減少傾向を示した (Figure 9B) 。

また、0.1 % PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  点眼 30,60,90 および 120 分後のマウス IOP を microneedle 法にて測定した結果、点眼 30 分後のマウス IOP 値はそれぞれ、vehicle 投与眼 11.2 $\pm$ 0.9 および 0.1 % PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  投与眼 12.9 $\pm$ 1.7 (mmHg) であった。点眼 30 分後における 0.1 % PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  点眼時の IOP は vehicle に比べ有意に高値を示した (p<0.05; ANOVA および Student's t-test) 。また、vehicle 眼および 0.1 % PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  投与眼の IOP はそれぞれ、点眼 60 分後 11.1 $\pm$ 1.3 および 12.2 $\pm$ 1.9 (mmHg) 、点眼 90 分後 11.2 $\pm$ 1.0 および 11.4 $\pm$ 1.3 (mmHg) 、点眼 120 分後 12.6 $\pm$ 1.5 および 11.1 $\pm$ 0.5 (mmHg) であり、いずれの

測定時間においても vehicle 投与眼に比較して 0.1 % PGF<sub>2α</sub> 点眼眼で有意な差は認められなかった (Figure 9C) 。さらに、0.1 % PGF<sub>2α</sub> 点眼 30,60,90 および 120 分後の IOP 増加率 (%) は、それぞれ 15.6±6.0、8.9±6.6、1.2±3.5 および -10.8±9.1 (%) であり、IOP 増加率 (%) は経時的な減少傾向を示した。また、2-3-2 で得られた 0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼時の IOP 増加率を 0.1% PGF<sub>2α</sub> 点眼時と比較した結果、点眼 30 分後において 0.1 % PGF<sub>2α</sub> 点眼は有意に IOP 増加率が低値を示した (p<0.05; ANOVA および Student's t-test) (Figure 9D) 。

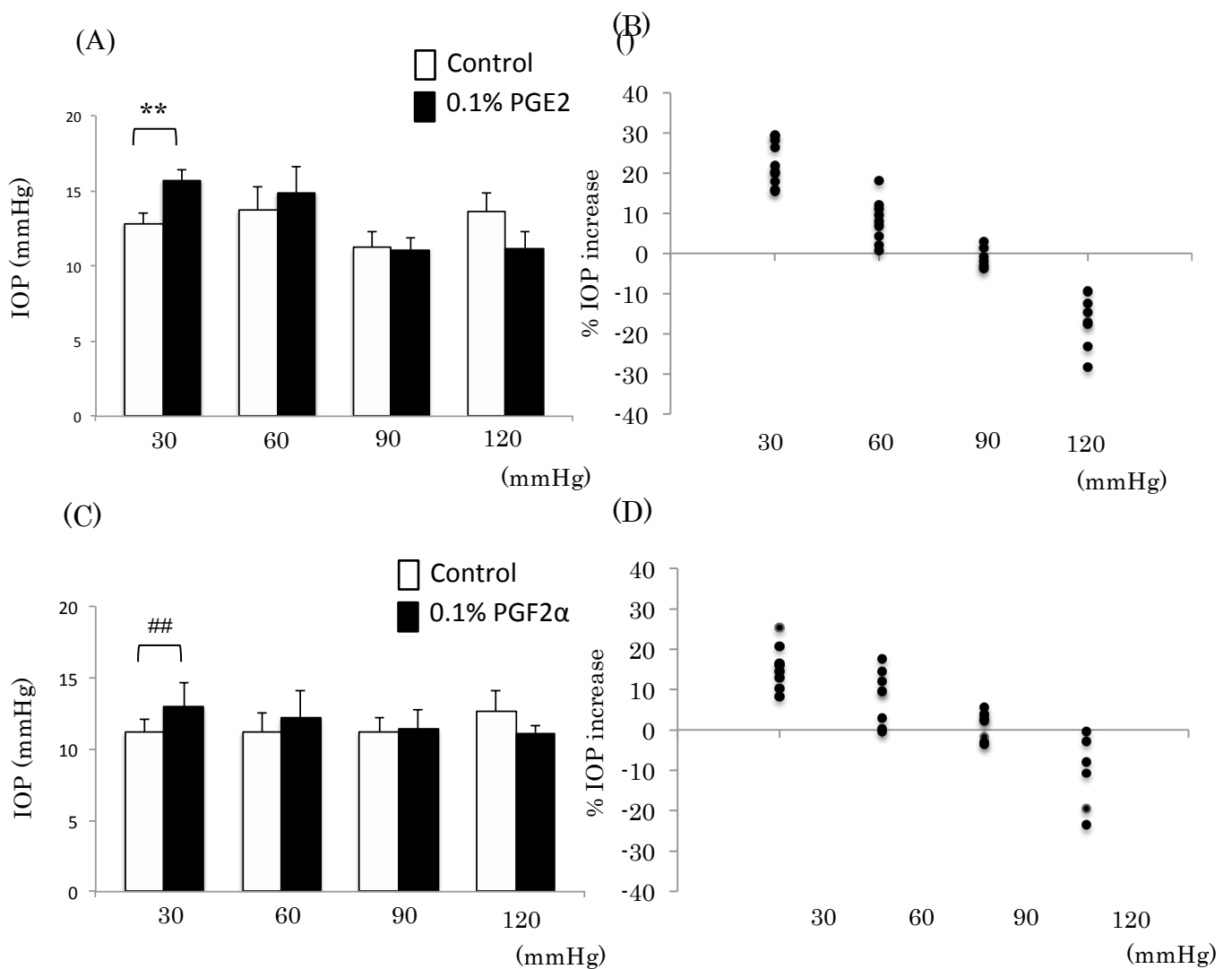


Figure 9 野生型マウスにおける 0.1 % PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> 点眼時の眼圧値 (mmHg)

と眼圧増加率 (%) の時間経過

(A) 0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼時の眼圧値 (mmHg) 、(B) 0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼時の眼圧増加率 (%) 、(C) 0.1 % PGF<sub>2α</sub> 点眼時の眼圧値 (mmHg) 、(D) 0.1 % PGF<sub>2α</sub> 点眼時の眼圧増加率 (%) .

\*\* p<0.01;0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼眼と対側眼 (vehicle 点眼眼) との比較 (ANOVA および Student's t-test, n=5-10)

## p<0.01;0.1 % PGF<sub>2α</sub> 点眼眼と対側眼 (vehicle 点眼眼) との比較 (ANOVA および Student's t-test, n=5-10)

#### 2-4-4 WT、FPKO、EP1-3KO マウスにおける PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> 点眼時 IOP の経時的変化

上記 Figure 9 の結果から、PGE<sub>2</sub> または PGF<sub>2α</sub> で一過性 IOP 上昇が認められることが明らかになった。その現象に対するプロスタノイド受容体の関与について検討するため、WT、FPKO、EP1-3KO マウスへ 0.1 % PGE<sub>2</sub> を点眼し、眼圧測定を行った結果、IOP 増加率 (%) は点眼 30 分後でそれぞれ、 $22.7 \pm 5.4$ 、 $34.2 \pm 1.9$ 、 $22.3 \pm 6.3$ 、 $20.7 \pm 8.7$  および  $23.5 \pm 10.9$  (%) であった。また、点眼 60 分後ではそれぞれ、 $7.7 \pm 5.6$ 、 $29.3 \pm 11.4$ 、 $6.4 \pm 5.0$ 、 $10.0 \pm 5.4$  および  $5.8 \pm 4.8$  (%) であった。0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼 30 および 60 分後の IOP 増加率は、WT マウスに比較して FPKO マウスで有意に増加していたが、EP1-3KO マウスでは有意ではなかった ( $p < 0.05$  あるいは  $0.01$ ; ANOVA および Turkey test)。一方、点眼 90 分後においていずれのマウス型についても有意な差は認められなかった (Figure 10A)。

同様に 0.1% PGF<sub>2α</sub> 点眼時についても検討した結果、点眼 30 分後の WT、FPKO、EP1-3KO マウスの IOP 増加率 (%) はそれぞれ、 $15.1 \pm 8.6$ 、 $24.6 \pm 11.1$ 、 $13.8 \pm 6.7$ 、 $16.2 \pm 10.8$  および  $8.6 \pm 6.7$  (%) であった。また、点眼 60 分後ではそれぞれ、 $8.9 \pm 6.6$ 、 $16.6 \pm 3.8$ 、 $1.7 \pm 9.8$ 、 $8.4 \pm 7.3$  および  $3.8 \pm 8.0$  (%) であった。0.1% PGF<sub>2α</sub> 点眼 30 および 60 分後の IOP 増加率は、WT マウスに比較して FPKO マウスで有意に増加していた ( $p < 0.05$  あるいは  $0.01$ ; ANOVA および Turkey test)。また、点眼 90 分後ではそれぞれ、 $1.2 \pm 3.5$ 、 $-0.78 \pm 5.3$ 、 $-0.19 \pm 5.3$ 、 $6.0 \pm 3.2$  および  $1.8 \pm 4.9$  (%) であり、WT マウスに比較して EP2KO マウスで IOP 増加率は高値を示した ( $p < 0.05$ ; ANOVA および Turkey test) (Figure 10B)。PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> ともにいずれのマウス型においても

点眼 30 分後で有意に IOP 増加率が高値を示したが、PGE<sub>2</sub> 点眼に比べ PGF<sub>2α</sub> 点眼では IOP 増加率が減弱傾向にあり、特に EP1KO および EP3KO マウスで顕著であった (p<0.05 あるいは 0.01 ; ANOVA および Turkey test) 。そして、PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> 点眼ともに、点眼 30 分後で IOP 増加率は最大値を示したが、WT マウスと FPKO マウスの間で比較した場合、PGE<sub>2</sub> 点眼時の IOP 増加率は点眼 30 分後で p=0.03、点眼 60 分後では p=0.0003、また PGF<sub>2α</sub> 点眼時の IOP 増加率は点眼 30 分後で p=0.045、点眼 60 分後では p=0.01 と、PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> ともに点眼 30 分後に比べ点眼 60 分後の方が顕著な差であった。

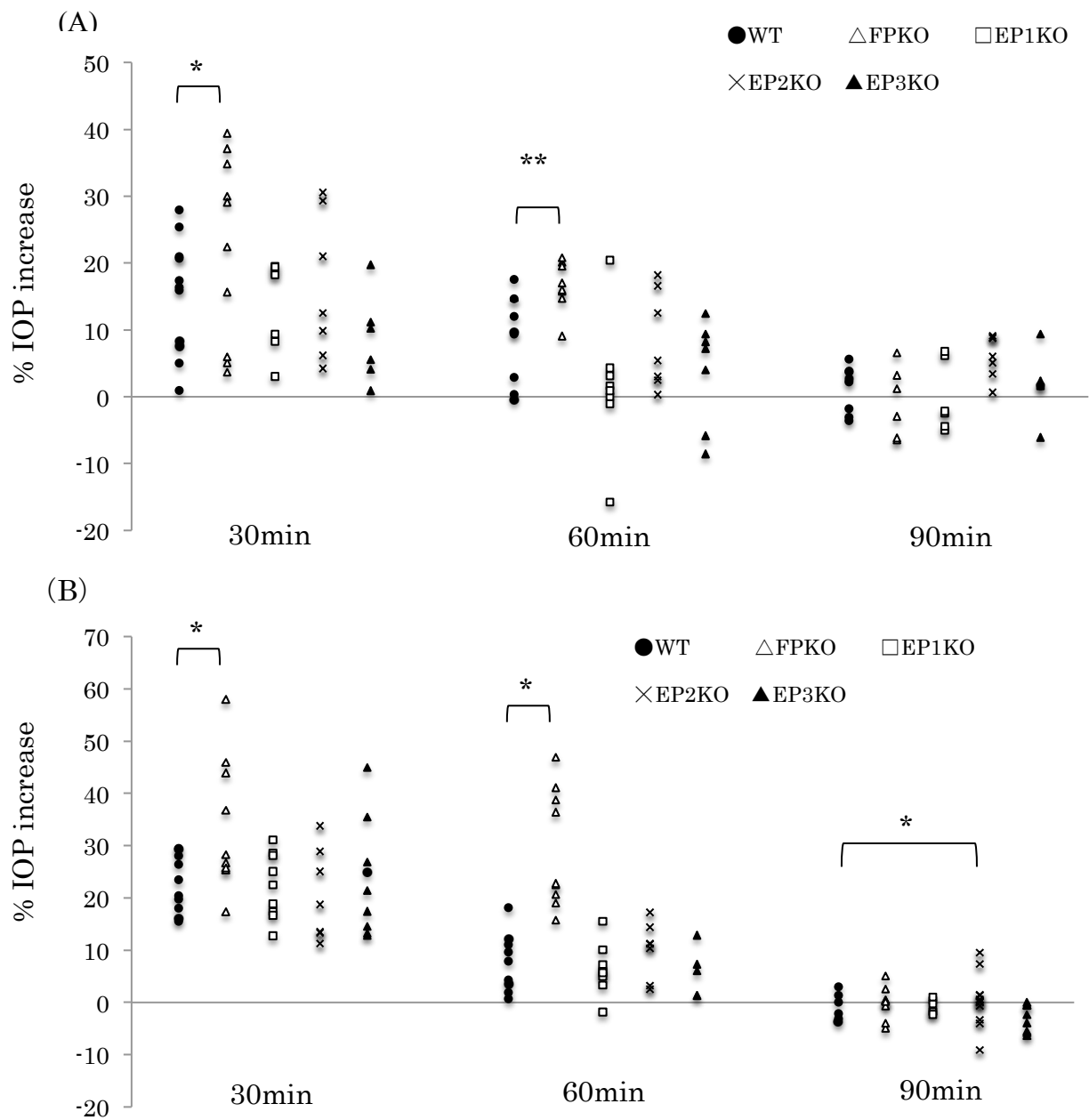


Figure 10 0.1 % PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  点眼時の WT, FPKO, EP1KO, EP2KO, および EP3KO マウスにおける眼圧上昇の時間経過

(A) 0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼時, (B) 0.1 % PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  点眼時

\*, \*\* p<0.05 または 0.01; WT と各 KO マウスとの比較 (ANOVA および Turkey test, n=5-10).

#### 2-4-5 PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> 点眼による一過性 IOP 上昇への内因性 PG の関与

Figure 10 より、PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> による一過性 IOP 上昇には FP 受容体が関与する可能性が示されたが、これまでの報告で FP 受容体刺激作用による眼圧下降には、cox を介した内因性 PG 産生が一部関与していることが示唆されている。そのため、本研究においても内因性 PG 産生の関与について検討するため、内因性 PG 産生を抑制すると考えられる非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti- Inflammatory Drugs; NSAIDs) であるネパフェナク点眼液 0.1 % を使用し、PGE<sub>2</sub> 点眼 60 分後の IOP 増加率を各マウス型について測定した。まず、各種マウスへネパフェナク点眼液 0.1 % を投与した結果、いずれのマウス型についても IOP 増加率に変化は認められなかった。続いて、WT マウスへ PGE<sub>2</sub> 点眼単独眼とネパフェナク点眼液 + PGE<sub>2</sub> 点眼眼の IOP 増加率 (%) はそれぞれ、7.5 ± 5.3 および 7.6 ± 11.6 (%) であった。WT マウスにおいて PGE<sub>2</sub> による一過性 IOP 上昇は NSAIDs の処置により変化しないことが明らかとなった。さらに EP1, EP2 および EP3KO マウスにおいても同様に、PGE<sub>2</sub> 点眼単独眼とネパフェナク点眼液 + PGE<sub>2</sub> 点眼眼の IOP 増加率 (%) はそれぞれ、7.9 ± 5.1 および 11.4 ± 8.3 (%)、8.7 ± 5.5 および 10.9 ± 10.0 (%)、6.2 ± 6.0 および 4.9 ± 4.5 (%) であった。EP1-3 マウスにおいても NSAIDs 処置により PGE<sub>2</sub> による一過性 IOP 上昇は変化しなかった。一方、FPKO マウスにおける PGE<sub>2</sub> 点眼単独眼とネパフェナク点眼液 + PGE<sub>2</sub> 点眼眼の IOP 増加率 (%) はそれぞれ、27.9 ± 11.6 および 7.4 ± 5.7 (%) であり、PGE<sub>2</sub> による一過性 IOP 上昇は NSAIDs 処置により有意に減弱された (p < 0.01; ANOVA および Mann-Whitney U test)。そして、WT マウスと FPKO マウスの間におけるネパフェナク点眼 + PGE<sub>2</sub> 点眼眼の IOP 増加率に大きな差は認められなかった。



(Figure 11A)。

同様にPGF<sub>2α</sub>点眼についても検討した結果、WTマウスへPGF<sub>2α</sub>点眼単独眼とネパフェナク点眼液+PGF<sub>2α</sub>点眼眼のIOP増加率(%)はそれぞれ、8.9±6.6および5.8±4.3(%)であった。WTマウスにおいてPGF<sub>2α</sub>による一過性IOP上昇はNSAIDsの処置により変化しないことが明らかとなった。さらにEP1,EP2およびEP3KOマウスにおいても同様に検討したところ、PGF<sub>2α</sub>点眼単独眼とネパフェナク点眼液+PGF<sub>2α</sub>点眼眼のIOP増加率(%)はそれぞれ、7.0±7.1および10.4±6.5(%)、8.4±7.3および7.3±6.9(%)、4.6±8.3および4.4±7.5(%)であった。EP1-3マウスにおいてもNSAIDs処置によりPGF<sub>2α</sub>による一過性IOP上昇は変化しなかった。一方、FPKOマウスにおけるPGF<sub>2α</sub>点眼単独眼とネパフェナク点眼液+PGF<sub>2α</sub>点眼眼のIOP増加率(%)はそれぞれ、17.7±2.4および1.7±3.3(%)であり、PGF<sub>2α</sub>による一過性IOP上昇はNSAIDs処置により有意に減弱された(p<0.01;ANOVAおよびMann-Whitney U test)。そして、WTマウスとFPKOマウスの間におけるネパフェナク点眼+PGF<sub>2α</sub>点眼眼のIOP増加率に大きな差は認められなかった(Figure 11B)。

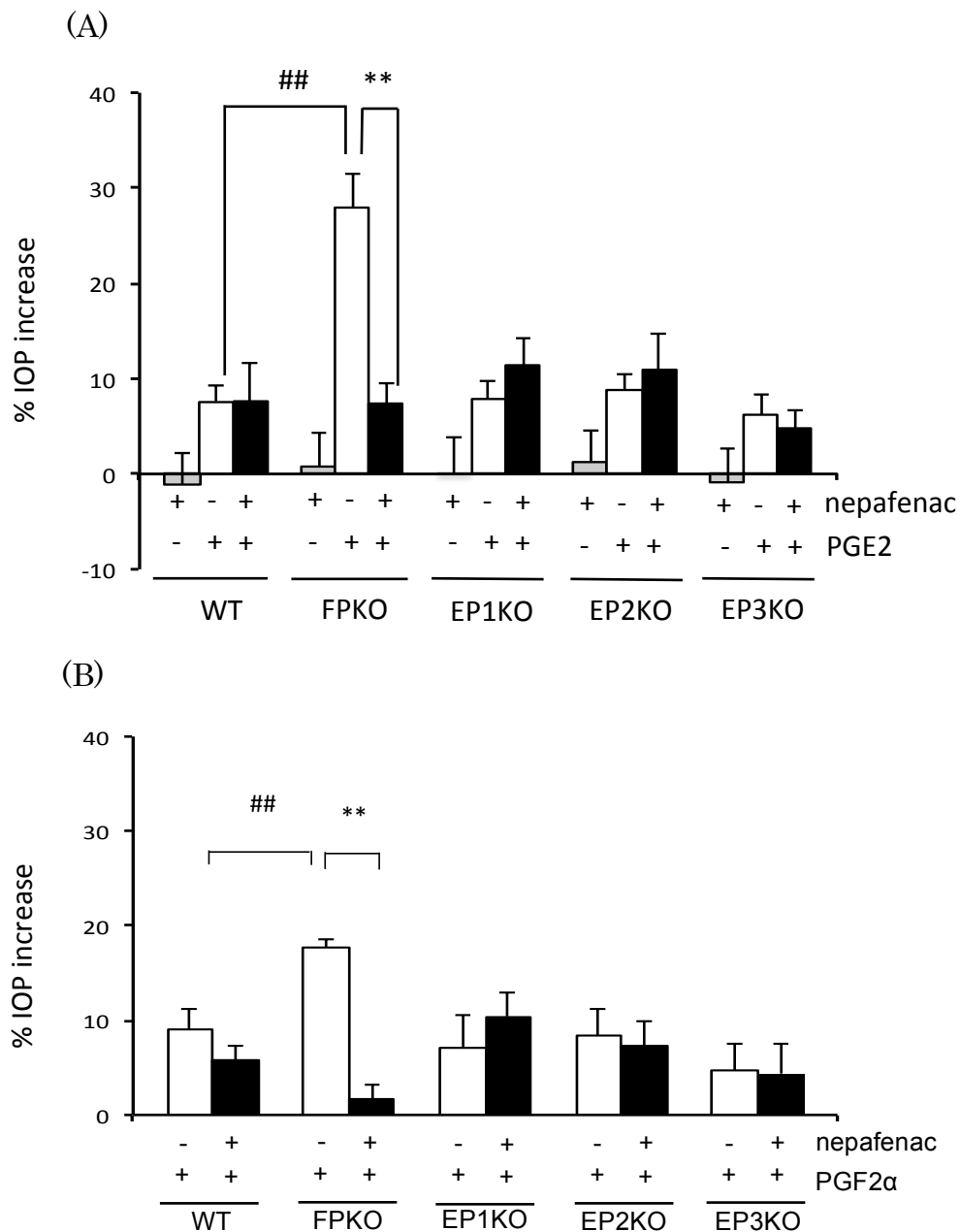


Figure 11 WT, FPKO, EP1KO, EP2KO および EP3KO を用いた PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  点眼による一過性眼圧上昇に対するネパフェナク (NSAIDs) の作用

(A) 0.1 % PGE<sub>2</sub> 点眼時、(B) 0.1 % PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  点眼時

##p < 0.01; WT と FPKO マウスの比較 (ANOVA および Mann-Whitney U test, n=6-8)

\*\*p < 0.01; NSAIDs 点眼なしと NSAIDs 点眼ありの比較 (ANOVA および Mann-Whitney U test, n=6-8)

## 2-5 考察

今回の結果から、PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> 点眼で誘発される一過性 IOP 上昇は FPKO マウスで増強することが明らかになった。このことは、PG が関与する一過性 IOP 上昇に対して FP 受容体が眼圧上昇を抑制する方向に働くこと示している。

これまで、PGE<sub>2</sub> あるいは PGF<sub>2α</sub> 点眼により眼圧が低下することについては数多く報告されているが、今回の報告のようにマウス眼を用いて投与後のごく初期の眼圧上昇を検討したことについては未だ報告されていない。今回得た結果は、PG 投与後ごく早い段階で生じる眼圧変動を、microneedle 法という検出感度の高い眼圧測定方法を用いたことで得られた結果である。そしてこれは、これまで報告のなかった、FP 受容体の眼圧上昇時に働く内因性機能についての新しい知見となり得ると考える。但し、本研究では、PGE<sub>2</sub> や PGF<sub>2α</sub> を外的に投与した状態で生じる一過性 IOP 上昇についての知見のみであるため、臨床的に見られるような内眼手術による眼物理的侵襲や炎症等でも生じる一過性眼圧上昇全般で生じる現象を再現していない。しかし、過去の報告で、物理的侵襲や炎症にも何らかの形で PGE<sub>2</sub> が関与することが示唆されており、それによって起こる眼圧変化は今回の結果 (Figure 8 および 9) と同様の傾向であった<sup>59-65</sup>。これらのことから考えて、炎症により生じる一過性 IOP 上昇は PGE<sub>2</sub> が主要な働きを担っていると推察できる。従って、本報告の一過性眼圧上昇モデルで見いだされた FP 受容体による眼圧上昇抑制作用は、临床上見られる病態での FP 受容体の生理的作用を反映している可能性が高い。今後この現象を解明するために、臨床的に房水サンプルを採取して、物理的侵襲や炎症時の眼圧上昇における PG の産生を検討する必要があると考える。

さらに、今回得られた結果で注目したいのは、一過性 IOP 上昇に PGE<sub>2</sub> が関与する

可能性が高いものの、KO マウスを用いた本研究では EP1,2 および 3 受容体は、関与しないという結果である (Figure 10)。既報によると、PGE<sub>2</sub> 誘発眼圧上昇は、環状アデノシン一リン酸 (Cyclic adenosine monophosphate; cAMP) 産生抑制作用を有するジピリダモールにより抑制されたとの報告がある<sup>66</sup>。このことから、G タンパク共役受容体である EP2 と EP4 を活性化して生じる cAMP 上昇が、PGE<sub>2</sub> 誘発眼圧上昇に一部関与する可能性が考えられた。しかしながら、本研究では FP, EP1,2 および 3KO マウスを用いた検討を行ったが、これら KO マウスは体重やその他のフェノタイプは WT と変わらないが、EP4KO マウスは胎生致死であるため<sup>67, 68</sup>、EP4 受容体の関与については検討できていない。これについては、conditional KO マウス、multiple KO マウス、あるいは点眼投与可能な EP4 受容体拮抗薬を用いて、EP4 が眼圧上昇に関与する可能性について検討することが今後の検討課題である。

また、PGF<sub>2α</sub> 点眼時にも、PGE<sub>2</sub> 点眼時よりは弱いものの、一過性 IOP 上昇が生じることが明らかとなった (Figure 8B, 9C および D)。基本的に PGF<sub>2α</sub> は FP 受容体に親和性が高く、既存の眼圧下降薬はその特徴が利用されている。しかしながら、PGF<sub>2α</sub> も FP 受容体のみならず各種 EP 受容体にも作用することが知られており<sup>69</sup>、これまでの検討でも、市販の PG 点眼薬投与後初期では一過性 IOP 上昇がマウス眼で認められている<sup>70</sup>。これと今回得られた Figure 10 の結果から、PGF<sub>2α</sub> による一過性 IOP 上昇は、一部 EP 受容体に作用することで生じている可能性を示唆するとも考えられる。

さらに、Figure 11 のように、PGE<sub>2</sub> や PGF<sub>2α</sub> による眼圧上昇が NSAIDs 投与により抑制されたことから、PG による刺激が cox を活性化することにより内因性の PG 産生がおこり、それが眼圧変動に関与しているのではないかと考えられた。この仮説は、FP 受容体刺激で cox が活性化されるという既報<sup>71</sup>からも支持され得るものである。

このことは、眼炎症により *cox* の活性化や酵素類の二次的産生が起こると、 $\text{PGE}_2$  が産生され EP 受容体に作用し、最終的に *cAMP* の増大あるいは何らかの機序により、結果的に眼圧の上昇につながることを示唆する。それと同時に、産生された  $\text{PGF}_2\alpha$  が FP 受容体に作用し、上昇した眼圧を抑える働きを有すると推察する。さらには、NSAIDs により抑制される *cox* の下流のトロンボキサンや PG 以外の因子も関与する可能性も考えられる。このように眼圧変動に関与する因子が多様であるがゆえに、原因を特定することは極めて困難である。しかしながら、本研究では少なくとも FP 受容体やそれ以外の刺激により起こる *cox* の活性化が、眼圧の恒常性維持に関与することを明らかにしている。これらの仮説を、スキーム化して Figure 12 に示した。

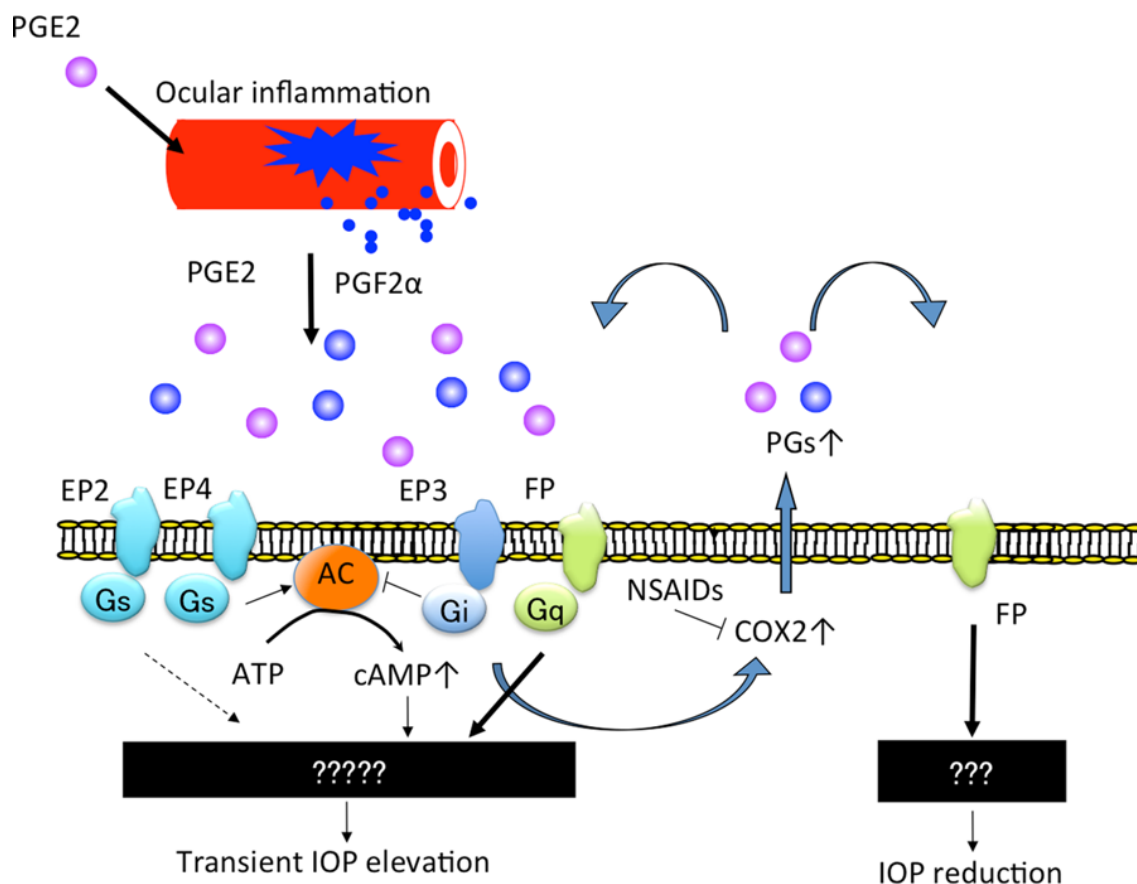


Figure 12 眼圧制御に関わる  $\text{PGE}_2$ 、 $\text{PGF}_2\alpha$  および FP 受容体の関与 (仮説)

もし、FP 受容体が炎症に対して効果的に働かなくなった場合、眼圧は上昇し続け、視神経乳頭に障害を与え、また眼血流低下を引き起こすことに繋がる。従って FP 受容体の眼内の役割は、生理的な生体防御反応かも知れない。しかしながらこの仮説は、現段階では NSAIDs 処置時あるいは EP 受容体欠損状態で PG 誘発性の眼圧上昇に限局したものであるため、PG がどのように房水動態に影響を及ぼすかについて、今後さらなる検討が必要である。

上述のような新たな知見が得られた一方で、本研究にはいくつか課題が残されている。まず 1 つ目として、眼圧測定方法と測定感度の問題である。今回私は微細な変化を検出できる、microneedle 法という方法を用いて眼圧測定を行った。本方法は前房内にガラスニードルを侵襲的に刺入する方法であり、直接前房内圧を測定できることで微細な変化も検出できる方法である一方で、侵襲的な測定方法であるがために、同一眼での経時的変化を検出することができない。反跳式眼圧計 (icare<sup>®</sup> TONOLAB tonometer; Icare Finland Oy.) を用いた非侵襲的な眼圧測定方法も存在するが、覚醒下のマウスに対して、今回の実験を遂行するには検出感度から考えると極めて困難である。今後は、非侵襲的な測定方法について検出感度を向上させることが検討課題である。二つ目として、今回用いた PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> の濃度についてである。今回使用した濃度は、Figure 8 で示した通り、0.1 % の点眼で十分な眼圧変動が認められている。しかしながら、実際の眼内動態は不明であり、炎症などで生じる眼内 PG 濃度と異なる可能性がある。今回の検討では、マウス眼を使用しており、各眼組織の容量がとても小さいため、現段階で眼内 PG 濃度を測定することができていない。今後は、PG の検出感度を向上させた測定方法を確立し、マウス眼における PG 動態を測定すること

が検討課題と考える。最後に、本研究により FP 受容体は眼圧の上昇に備えて存在し、眼圧を下げる方向に働くことが示唆されたものの、FP 受容体の役割をすべて明確にはできなかった。これについては各種プロスタノイド受容体の阻害剤を用いて検討すべき項目ではあるが、現段階では点眼において有効的に作用を示す阻害剤が存在しないため、今後の課題としたい。

以上より、本研究では PGE<sub>2</sub> および PGF<sub>2α</sub> が二次的 PG 産生を促すことで生じる一過性 IOP 上昇を引き起こし、その眼圧上昇は FP 受容体刺激により抑制されていることが明らかとなった。今回は外的に PG が投与された場合でのみ検討されている現象であるが、疾患、炎症、物理的刺激あるいは正常状態に至るまで、FP 受容体が二次的に産生された PG を介して、一過性 IOP 上昇などに対して眼圧を下げることで、眼圧変動を正常状態に調整する役割を担う可能性が示唆された。

### 第三章 FP 受容体アゴニストによる有害事象発症の機序解明

-PG 関連薬使用による上眼瞼溝深化に対する FP 受容体の関与-



### 3-1 背景

PG 関連薬は全身性副作用が少なく、安全性の高い薬剤として広く使用されている。しかしながら局所的副作用はいくつか報告されており、その中でも近年、bimatoprost, travoprost および latanoprost の使用により美容上の副作用である上眼瞼溝深化 (DUES) (Figure 13; 文献 37 より引用) の発症が報告されている<sup>34, 37-39, 41, 42, 72</sup>。

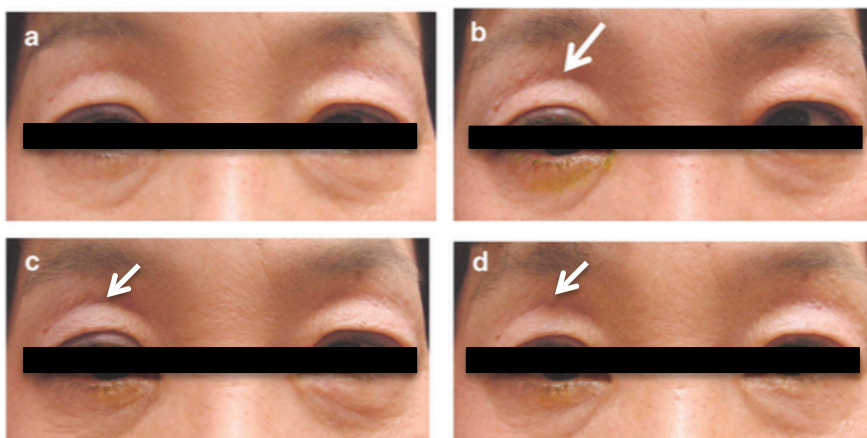


Figure 13 Latanoprost 点眼による DUES 発症例

58 歳女性、ラタノプロスト点眼液の投与を開始して 2 ヶ月後に右眼に DUES 発症 (b, の白矢印)。(a) Latanoprost 点眼治療前、(b) Latanoprost 点眼開始 2 ヶ月後、(c) Latanoprost 点眼開始 4 ヶ月後、(d) Latanoprost 点眼開始 6 ヶ月後、(文献 37 より引用)

私のグループは以前、日本人を対象にした臨床研究の結果から、latanoprost から bimatoprost に処方切り替えを行った際、切り替え後 3 ヶ月間での DUES 発生率は 60% であり<sup>38</sup>、発症した患者に対して再度 latanoprost へ切り替えた場合、DUES は治

まったという結果を得た<sup>42</sup>。また、Shahらの報告では、bimatoprost および travoprost 使用は皮膚弛緩症あるいは DUES 発症に関連しているが、latanoprost 使用は関与しないということと、bimatoprost の長期使用は他の眼周囲脂肪萎縮に関連があるとされている<sup>44</sup>。これらの報告から、古くからある latanoprost 使用による発症は少なく、bimatoprost や travoprost のような薬剤により発症率が高まるということから考えると、DUES 発症のメカニズムは FP 受容体に対する親和性に関連している可能性が示唆されるが、FP 受容体が関与する IOP 下降作用と DUES 発症とが別の機序で生じているかどうかは不明である。

磁気共鳴画像法を用いた最近の研究から、PG の長期適用後に眼窩脂肪組織の減少が示されている<sup>73</sup>。さらに、手術中に切除した上眼瞼脂肪組織の組織学的観察から、脂肪細胞密度が未治療の対側眼よりも travoprost および bimatoprost 使用眼でより低いことが示されているが、latanoprost 使用眼では差がなかったことが示されている<sup>74</sup>。これらの結果から、travoprost および bimatoprost 使用により眼瞼の脂肪細胞が減少し、これが DUES 発症に関与する可能性が考えられた。

脂肪細胞はエネルギー恒常性の調節に関与する細胞である<sup>75, 76</sup>。この脂肪細胞は、一年間に約 10% が入れ替わると報告されており<sup>77</sup>、細胞増殖と細胞サイズ変化が脂肪組織の変動を引き起こすと言われている<sup>78</sup>。脂肪組織量は様々な条件下で変動可能であり、脂肪細胞分化は脂質メディエーターを含む、色々な刺激に応じてホルモン感受性や遺伝子発現が協調的に変化する複雑な過程であることが示されている<sup>79</sup>。PG もまた脂質メディエーターの一つであり、脂肪細胞分化調節機能を有することが明らかになっている<sup>80</sup>。さらに、前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞を用いた研究から、PGF<sub>2α</sub> や FP 受容体アゴニストである fluprostenol が脂肪分化を抑制したことが明らか

になっている<sup>81</sup>。

これらのことを踏まえ、私は PG 製剤による点眼治療の副作用として脂肪細胞減少によって眼窩脂肪組織の萎縮が起こり、これが DUES 発症に寄与しているのではないかと仮説を立てた。PG 製剤による DUES 発症メカニズムを解明することは、より副作用の少ない眼圧下降薬の開発につながると考えられる。本研究では、市販されている PG 製剤について *in vitro* 試験にて脂肪分化能について検討することとした。これまで PG 製剤の脂肪分化能についていくつか報告があるものの<sup>82,83</sup>、FP 受容体との関連性を述べるには至っていないのが現状である。というのも、PG 製剤は加水分解を受け、活性体となって FP 受容体に結合すると言われているため、活性体を使用して初めて細胞での脂肪分化能と FP 受容体との関連性について検討することが可能となるが、そういった検討は存在しなかった。本研究ではプロドラッグ化された市販の PG 製剤そのものではなく、各種 PG 製剤の活性体を使用して検討を行うこととした。さらに、FP 受容体との関連性についてより詳細に調べるため、FPKO マウスを用いた脂肪分化能についての検討も併せて行うこととした。

### 3-2 目的

PG 関連薬 4 剤点眼治療における DUES 発症と FP 受容体の関連性について検討することを目的とした。

### 3-3 方法

## 実験材料

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) , high-glucose DMEM (HG-DMEM) , calcium pantothenate, d-biotin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (MIX) , insulin, dexamethasone, type 1A collagenase, and oil red O は Sigma-Aldrich より購入した。Fetal bovine serum (FBS) , calf serum (CS) , および insulin は Invitrogen より購入した。Penicillin/streptomycin (PS) および trypsin-EDTA は Gibco より購入した。Unoprostone (free acid-type isopropyl unoprostone, UNO) , latanoprost acid (LAT-A) , travoprost acid (TRA-A) , BIM, BIM acid (BIM-A) , and PGF<sub>2α</sub> は Cayman Chemical Co.より購入し、Tafluprost acid (TAF-A) は参天製薬株式会社から譲受したものを使用した。Pioglitazone は東京大学医学部附属病院糖尿病代謝内科より譲受したものを使用した。

## 3T3-L1 細胞 *in vitro* 培養実験方法

今回用いた 3T3-L1 細胞は、東京大学医学部附属病院糖尿病代謝内科より分与して頂いたものを使用した。3T3-L1 細胞を b.p. HG-DMEM 培地 (DMEM 培地に 8 mg/L d-biotin, 4 mg/L calcium pantothenate, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin および 10 % CS を含有した培地) 中でコンフルエントになるまで 37 °C インキュベーター内で培養した。コンフルエントになったのを確認した 2 日後、既報に従い<sup>84</sup>、脂肪分化誘導刺激を行った。なお、分化誘導開始より 7-10 日後を成熟脂肪細胞とした<sup>84</sup>。

## FPKO マウス脂肪細胞の培養系確立方法

東京実験動物株式会社より近交系 C57BL6/J 雌雄マウスを購入し、10 週齢で実験に用いた。また、マウスは、購入後、実験予定日の少なくとも 1 週間前から、本研究室の conventional 動物室にて飼育し、また、FPKO マウスは同動物室内で繁殖および飼育し、十分な検疫および馴化期間を設けた。動物実験は、東京大学大学院新領域創成科学研究科の承認を受け、東京大学動物実験実施規則及び東京大学動物実験実施マニュアルを遵守して行った。

マウス初代脂肪細胞培養については、既存の方法を改変した方法にて行った。まず前駆脂肪細胞を作製するため、マウス腹部より脂肪塊を摘出し、0.1 % collagenase 中にて細片化した。その後、37 °C インキュベーター内で 1 時間静置し、そこで得られた懸濁液を 1350 g で 3 分間遠心し、最上層に浮遊した脂肪細胞と下層に沈殿した細胞間質-血管成分を取り出し、洗浄後した。それを培養フラスコへ移し、10 % FBS 入 DMEM 培地を満たした状態で、上下逆さまにして 37 °C インキュベーター内で静置した。これにより浮遊した脂肪細胞を上層に集め、フラスコ底部に接着させた。線維芽細胞状の脂肪細胞がフラスコ底面に接着しているのを確認した後、上下逆さまにしておいたフラスコを通常状態に戻し、4 日おきに培地を交換しながら培養を続け、試験に用いた。前駆脂肪細胞はセミコンフルエントの状態まで培養し、その後脂肪細胞への分化誘導を開始した。

### 脂肪分化誘導

脂肪分化誘導刺激は 10 µg/mL insulin, 100 µL/mL MIX, および 1 µM dexamethasone (DEX), で行い、誘導開始日を day 0 と規定した。誘導開始より 2 日後 (day 2) 培地交換を行うと同時に 10 µg/mL insulin および 1 µM pioglitazone を添加し

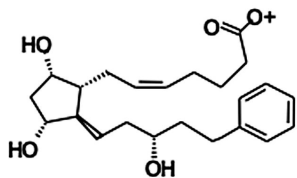
た。そこからさらに2日後 (day 4) 日後, 培地を b.p. HG-DMEM 培地に交換し、以降の培地交換は2日おきに実施した。脂肪分化誘導なしのものを control 群とした。

#### 試薬添加

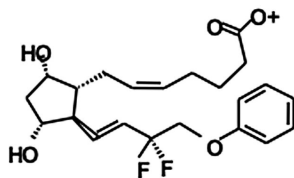
臨床で使用される点眼PG製剤は、角膜内のエステラーゼにより加水分解され、酸型の活性体となり眼内でFP受容体と結合するプロドラッグであるため、*in vitro*での培養細胞実験のためには眼内活性体を使用する必要がある。本研究ではFigure 14Aに示す通り、酸型のPG製剤 Latanoprost acid (LAT-A), travoprost acid (TRA-A), tafluprost acid (TAF-A), bimatoprost (BIM), bitmatoprost acid (BIM-A), isopropyl unoprostone (UNO) を使用した。また、プロスタマイド型としてFP受容体に直接結合できる bimatoprost とオリジナルの prostaglandin F<sub>2α</sub>を終濃度 1, 10, 100 および 1000 nM になるように添加した。さらに、これら薬剤の各種プロスタノイド受容体への親和性も既報<sup>18, 69, 85, 86</sup>を参考に、Figure 14Bに示した。試薬添加は day 0, day 2あるいはday 7に行い、vehicleとして0.01% DMSOを用いて検討した。試薬添加後は2日おきに各種PG製剤を含む培地を用いて培地交換を実施した。

(A)

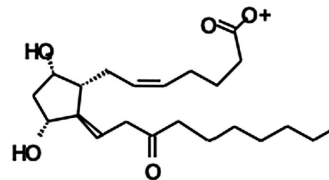
Latanoprost acid: LAT-A



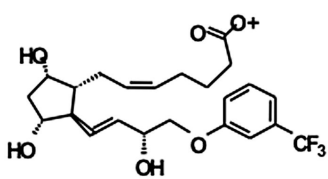
Tafluprost acid: TAF-A



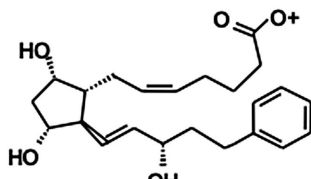
Unoprostone: UNO



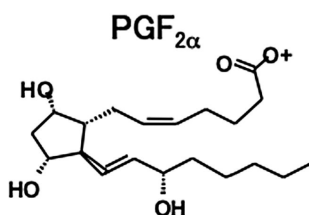
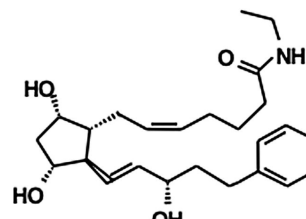
Travoprost acid: TRA-A



Bimatoprost acid: BIM-A



Bimatoprost: BIM



(B)

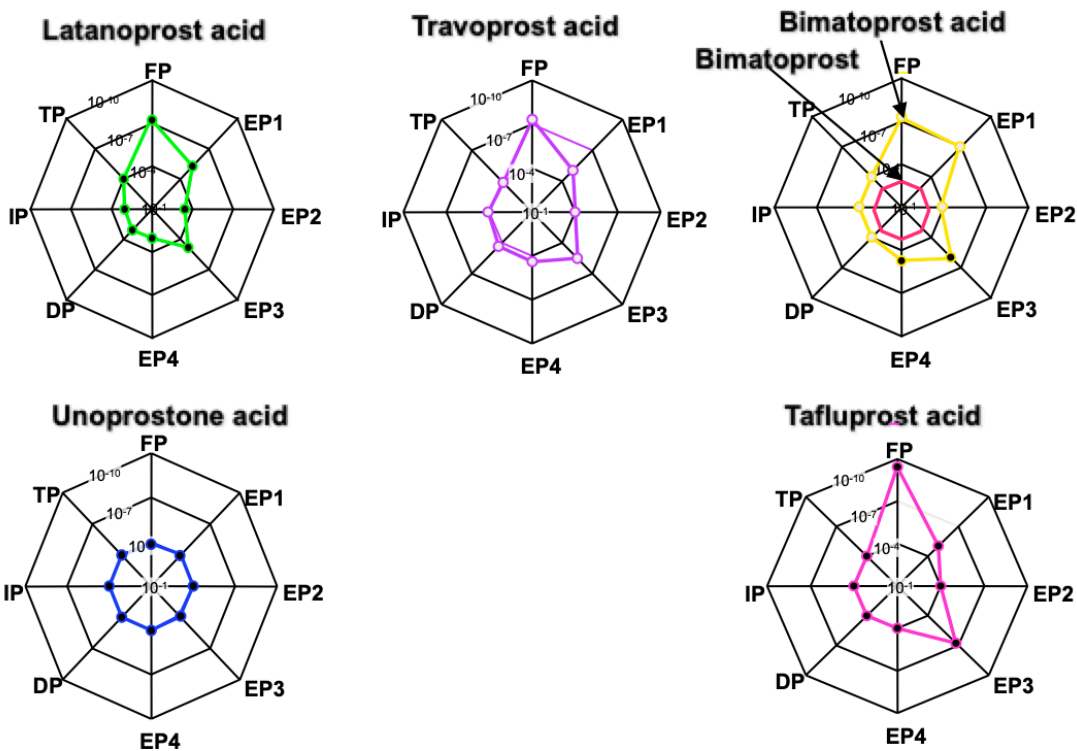


Figure 14 本検討で用いた PG 製剤の化学構造式 (A)と受容体への親和性 (B)

### 脂肪滴染色

脂肪細胞が産生する脂肪滴の大きさを評価に用いた。脂肪滴の染色は、Oil red O 染色を用い、day 10 に行った。培養終了後、PBS にて 2 回洗浄し、10 % formamide 中で 10 分間反応させ固定を行った。再度 PBS で洗浄し、100 % isopropyl alcohol に 1 分間接触させた。その後、Oil red O 染色液中で 20 分間反応させ、60 % isopropyl alcohol で 1 分間静置し、PBS 中で保存した。

### 脂肪滴面積測定

Oil red O にて染色された細胞を顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE) を用いて撮影した。撮影は各培養皿につき 30 箇所について行った。染色面積の測定は ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用い、control 群で染色された面積に対する各薬剤処置群の染色面積の割合を算出した。

### 統計解析

結果は平均値±標準偏差 (standard deviation; S.D.) で表記し、統計解析は JMP Pro 11 software (SAS Institute Inc.) にて行い、ANOVA および Dunnett's test を用いて、p 値が 0.05 以下を有意とした。

## 3-4 結果

### 3-4-1 脂肪前駆細胞である 3T3-1 細胞および分化脂肪細胞における PG 製剤の脂肪生成抑制作用



PG 製剤投与 2,5 および 7 日後投与時の day 10 において oil red O 染色による脂肪滴染色の代表例を Figure 15 に示した。

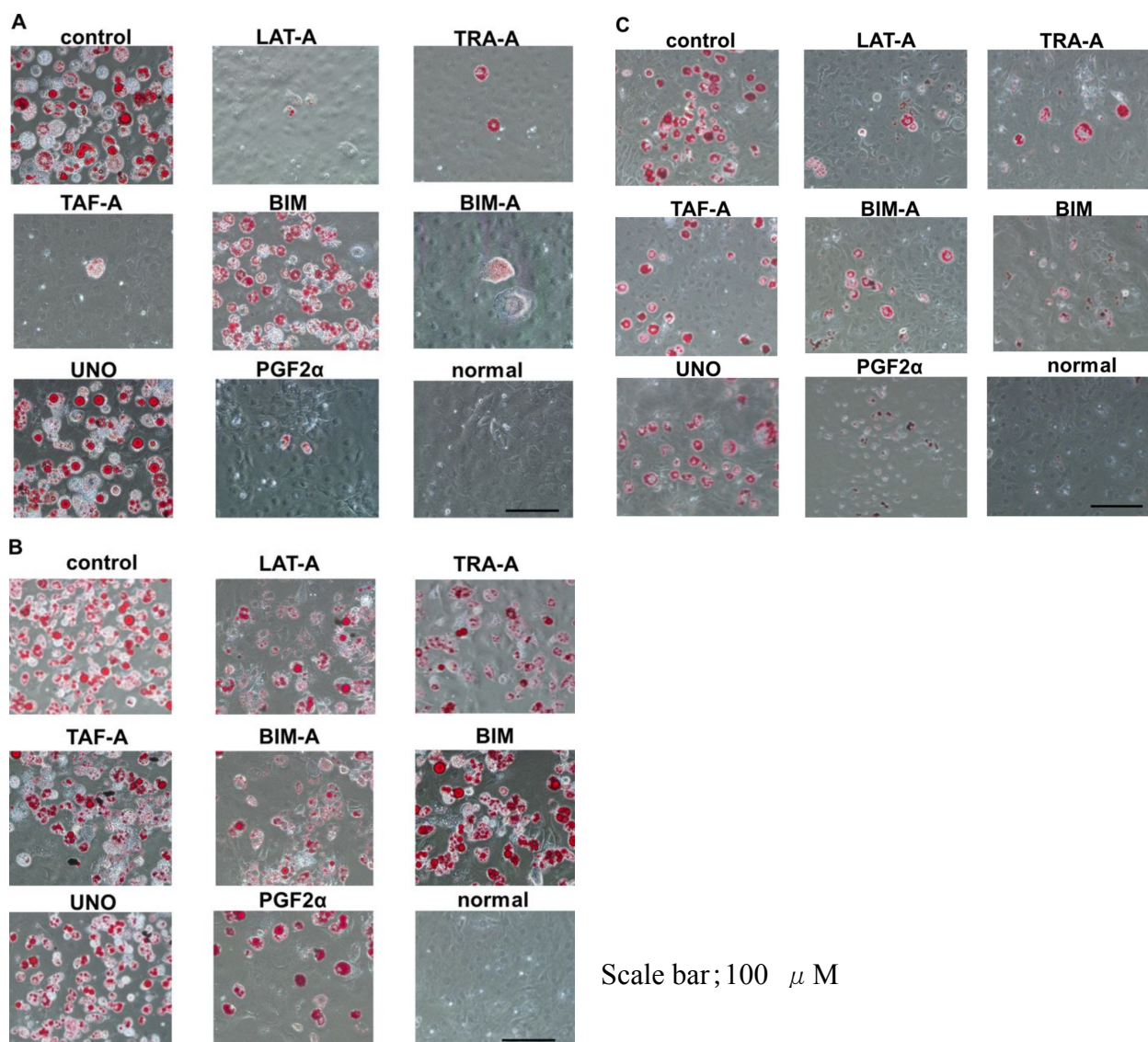


Figure 15 3T3-L1 細胞における分化開始 10 日後の Oil red O 染色画像

(A) 分化開始 0 日目に薬剤処置、(B) 分化開始 2 日目に薬剤処置、(C) 分化開始 7 日目に薬剤処置

上記結果を元に、day 0 で各薬剤を添加した場合の脂肪滴染色面積 (%) は、100

nM LAT-A, TRA-A, TAF-A, BIM, BIM-A, UNO および  $\text{PGF}_{2\alpha}$  でそれぞれ、 $1.2 \pm 0.9$ ,  $6.2 \pm 4.3$ ,  $0.9 \pm 0.9$ ,  $40.7 \pm 8.3$ ,  $0.4 \pm 0.4$ ,  $109.4 \pm 16.5$  および  $3.1 \pm 1.5$  (%) であった。また、day 2 で添加した場合はそれぞれ、 $31.6 \pm 13.2$ ,  $38.3 \pm 22.8$ ,  $28.8 \pm 14.6$ ,  $76.4 \pm 39.3$ ,  $23.6 \pm 12.4$ ,  $86.5 \pm 30.4$  および  $36.4 \pm 21.8$  (%) であった。day 7 で添加した場合はそれぞれ、 $26.8 \pm 4.2$ ,  $51.0 \pm 36.7$ ,  $35.1 \pm 17.1$ ,  $38.8 \pm 3.2$ ,  $25.2 \pm 1.1$ ,  $48.8 \pm 27.8$  および  $17.8 \pm 0.7$  (%) であった (Figure 16)。

前駆段階である day 0 あるいは day 2 で PG 製剤を添加した場合、LAT-A, TRA-A, TAF-A, BIM-A および  $\text{PGF}_{2\alpha}$  は脂肪生成を有意に抑制した ( $p < 0.05$ ; ANOVA および Dunnett's test)。また、試薬添加時を day 0 および day 2 で比較した場合、day 0 で試薬添加した方がより強く脂肪生成を抑制する傾向であった。また、脂肪細胞に分化した day 7 においても、LAT-A, BIM-A および  $\text{PGF}_{2\alpha}$  は脂肪生成を有意に抑制した ( $p < 0.05$ ; ANOVA および Dunnett's test)。

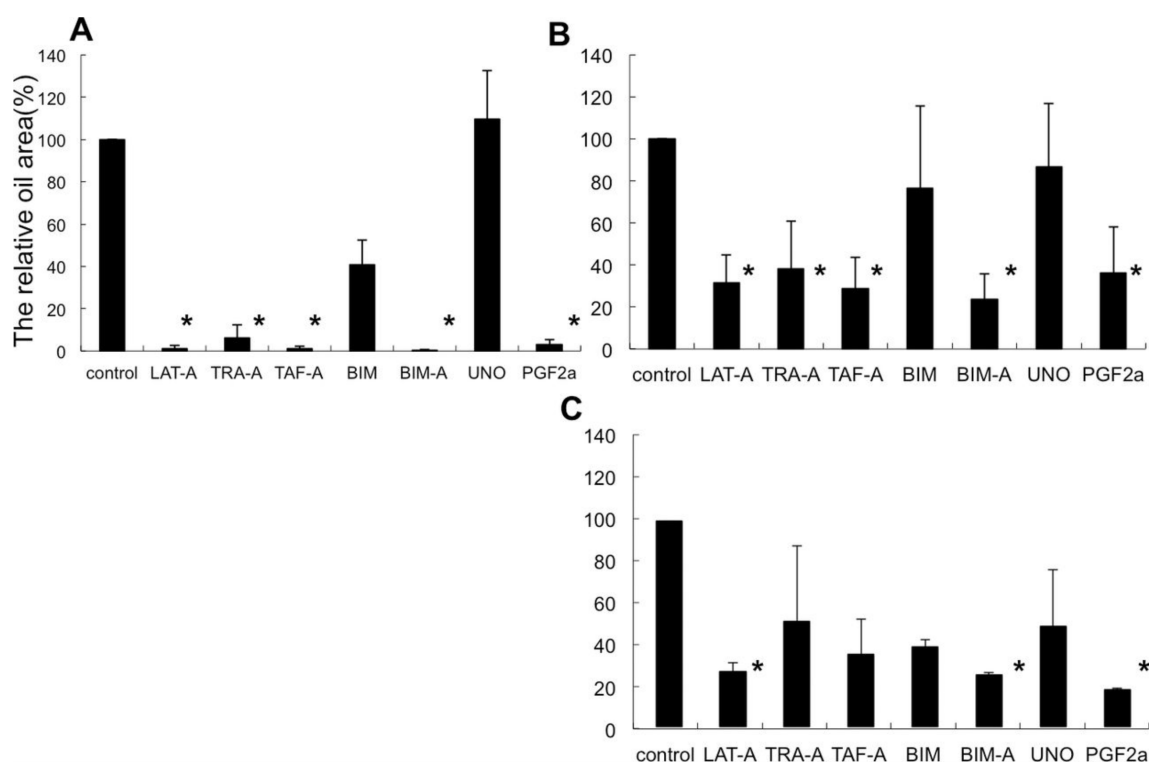


Figure 16 3T3-L1 細胞における分化開始 10 日後の Oil red O 染色面積

(A) 分化開始 0 日目に薬剤処置、(B) 分化開始 2 日目に薬剤処置、(C) 分化開始 7 日目に薬剤処置

\* $p < 0.05$ ; vehicle 処置 (control) と各薬剤処置の比較 (ANOVA-および Dunnett's test,  $n=10$ )

### 3-4-2 初代マウス細胞を用いた分化脂肪細胞における PG 製剤の脂肪生成抑制作用

次にマウス初代脂肪細胞を用いて、WT および FP KO マウスを用いて PG 製剤の脂肪滴生成に対する作用について検討した。その結果、WT マウス脂肪細胞での各種 PG 製剤を 100 nM 添加した場合の脂肪滴染色面積 (%) は、vehicle 添加群と比較して、LAT-A, TRA-A, TAF-A, BIM-A, PGF<sub>2α</sub>, BIM および UNO-A でそれぞれ、 $61.7 \pm 29.4$ ,  $69.8 \pm 32.3$ ,  $62.8 \pm 30.9$ ,  $52.5 \pm 31.5$ ,  $70.6 \pm 29.4$ ,  $93.4 \pm 29.1$  および  $96.2 \pm 22.9$  (%) であった (Figure 17)。Vehicle 群に対し、LAT-A, TAF-A, TRA-A, BIM-A およ

び  $\text{PGF}_{2\alpha}$  群で有意に脂肪滴生成を抑制した ( $p < 0.01$  あるいは  $0.05$ ; ANOVA および Dunnett's test)。

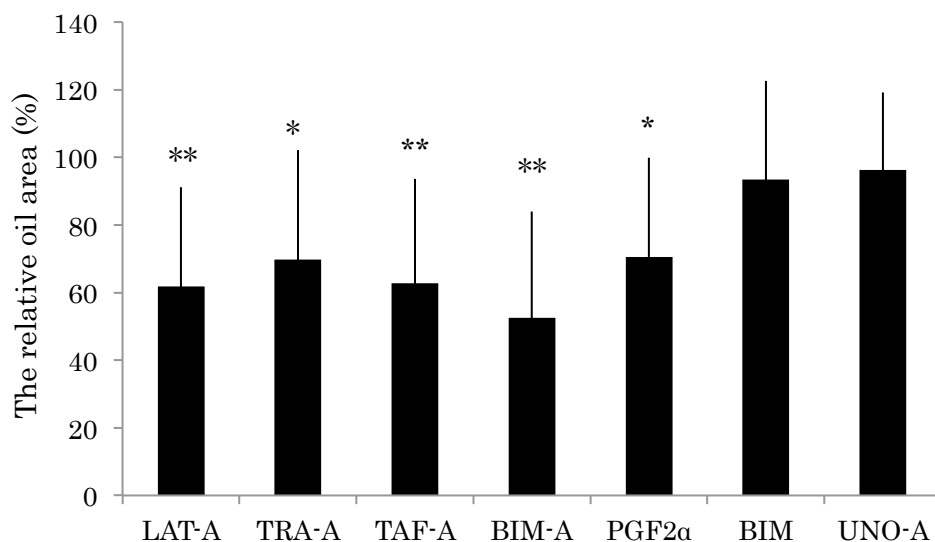


Figure 17 WT マウスの初代培養脂肪細胞における Oil red O 染色面積

\*, \*\*;  $p < 0.05$  または  $0.01$ ; vehicle 処置 (control) と各薬剤処置との比較 (ANOVA および Dunnett's test,  $n=12$ )

一方、FPKO マウスより単離したマウス脂肪細胞では、各種 PG 製剤を  $100 \text{ nM}$  添加した場合の脂肪滴染色面積 (%) は、vehicle 添加群と比較して、LAT-A, TAF-A, TRA-A, BIM-A,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , BIM および UNO-A でそれぞれ、 $97.0 \pm 15.4$ ,  $109.4 \pm 14.1$ ,  $100.9 \pm 16.2$ ,  $92.0 \pm 17.9$ ,  $109.1 \pm 17.3$ ,  $100.9 \pm 8.4$  および  $94.6 \pm 13.6$  (%) であった (Figure 18)。Vehicle 群に対し、いずれの薬剤処置群においても有意な差は認められなかった。

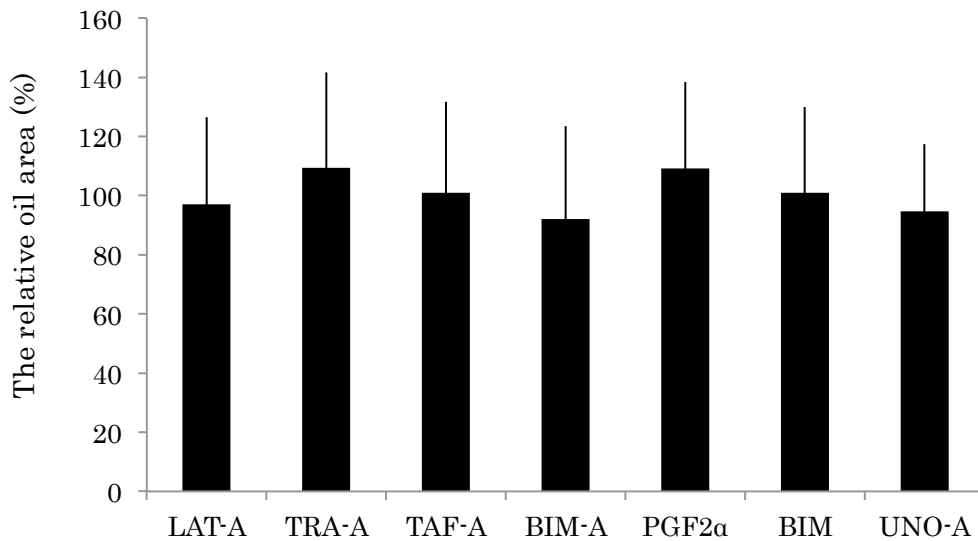


Figure 18 FPKO マウスの初代培養脂肪細胞における Oil red O 染色面積

\*,\*\*,  $p < 0.05$  または  $0.01$ ; vehicle 処置 (control) と各薬剤処置との比較 (ANOVA および Dunnett's test,  $n=12$ )

### 3-5 考察

DUES は PG 点眼薬、中でも bimatoprost 使用により高頻度に発生する、上部眼瞼部位が窪み瞼のしわが深くなってしまう有害反応である<sup>38-40, 42</sup>。既報によると、DUES は長期的な変化であるため患者自身では気づきにくいことも多いが、中には DUES 発症が理由で PG 関連薬使用を中止したケースもある。PG 製剤の長期点眼により DUES 以外にも、上眼瞼の硬化、眼球陥凹など prostaglandin associated periorbitopathy という副作用のカテゴリーが提唱されており、いずれも FP 受容体刺激によるものと考えられているが、整容的な問題以外にも、眼圧測定の困難さや最近緑内障手術成績不良の危険因子として報告されているため<sup>43, 44</sup>、DUES 発症原因を解明することは重要であ

ると考えた。

近年市販されている PG 製剤は、プロスト型、プロスタマイド型、プロストン型、3 つのタイプに分類される。プロスト型とは LAT-A, TRA-A, BIM-A, および TAF-A などのような酸型 PG 製剤である。プロスト型 PG は、PGF<sub>2α</sub> の derivative で炭素鎖 17 位の側鎖にフェニル基がついており、FP 受容体と結合するために重要な炭素鎖 15 位の側鎖の水酸基が保存されている。プロスタマイド型である bimatoprost は、PGF<sub>2α</sub> の C 末端にエチルアミンがアミド結合でつながっており、それ自身がプロスタマイド型として存在し、FP 受容体や FP 受容体のスプライズバリエーションの複合受容体であるプロスタマイド FP 受容体に直接結合すると言われている<sup>87</sup>。また、プロストン型としては、isopropyl unoprostone の酸型である unoprostone があり、FP 受容体への結合に重要な C-15 位の側鎖に結合する水酸基が酸化されてケト基になっており、FP 受容体への親和性が他に比べて低い<sup>69</sup>。最近ではプロストン型の unoprosotne は K<sup>+</sup>イオンチャネル作動薬としての機能が報告され<sup>88-90</sup>、PGF<sub>2α</sub> の機能は殆ど無いと考えられている。今回得られた結果では、プロスト型の PG 製剤と PGF<sub>2α</sub> は前駆脂肪細胞および分化脂肪細胞からの脂肪滴形成を抑制したが、プロストン型の unoprostone やプロスタマイド型の bimatoprost は、脂肪滴形成に作用を及ぼさなかった。このことは、分化脂肪細胞からの脂肪滴形成には FP 受容体刺激が深く関わることを示唆する結果となった。さらに、Figure 18 で示した通り、FPKO マウスから初代培養した分化脂肪細胞において、PG 製剤の脂肪滴形成抑制作用は消失していたことから、FP 受容体の関与が強く示唆される結果となった。つまり、PG 製剤使用時に起こる DUES は、上眼瞼に存在する脂肪組織へ PG 製剤が浸潤することで誘発される FP 受容体刺激作用が、脂肪滴形成を抑制することで起こる作用であると推察された。

脂肪細胞における PG 製剤の作用について複数の報告があるが<sup>82,83</sup>、Seiboldらは bimatoprost, travoprost, latanoprost および tafluprost は 前駆脂肪細胞増殖を抑制すること、緑内障治療薬として使用される  $\beta$  遮断薬の timolol および点眼液中に保存剤として含有される benzalkonium chloride も顕著に脂肪細胞増殖抑制または、脂肪細胞に対する細胞毒性を有することを報告している<sup>83</sup>。しかしながら、この研究ではプロドラッグ化された PG 製剤が使われており、眼内で働く酸型の化合物ではないため、眼内で活性を示す酸型の各種 PG 製剤を使用した本研究結果と異なる可能性がある。また、点眼薬および保存剤の脂肪細胞に対する細胞毒性は、短時間の薬剤接触における生細胞数測定であり、本研究で用いた脂肪滴形成を検討したものではない。そのため、既報の急性薬剤毒性で得られた結果は、臨床で長期使用した場合に生じる DUES 発症の現象と異なる可能性が高い。また、Choi らの報告も、ヒトの前駆脂肪細胞を用いた検討の結果であり、PG 製剤が脂肪細胞への分化を抑制していた<sup>82</sup>。しかしながら、この検討もプロドラッグ化された市販の PG 製剤を希釈して用いた検討結果であり、これら製剤では直接 FP 受容体に結合することができないため、FP 受容体の関与を解明することは難しい。これらのことから、今回の検討において、脂肪滴形成に FP 受容体が関与することを初めて証明したものといえる。

本研究の問題点の一つは、ライン化された 3T3L-1 細胞を用いたことである。3T3-L1 細胞は前駆脂肪細胞として広く知られるものであるが<sup>91</sup>、今回私の研究目的である、ヒトの眼瞼に存在する脂肪組織由来のものではない。従って、脂肪生成のメカニズムを明らかにするために、遺伝子改変マウスが使用できる初代培養マウス脂肪細胞を用いて検討することにした。残念ながらこれらの検討をヒトから単離した脂肪細胞で行うことは、ヒト眼窩脂肪細胞の切除を要するため倫理的に困難である。従って本研究ではマ

ウスを用いており、厳密にはヒトの細胞を用いていないため、臨床で生じる結果を完全に反映することは難しいが、脂肪滴形成における FP 受容体の関与を検討するには、十分と考えている。また、今回検討に用いたプロスト系 PG 製剤は臨床上の眼圧下降の有効性では差がないが、点眼液中の濃度は異なっているため<sup>92,93</sup>、点眼後の眼周囲組織濃度が異なる可能性が示唆される。また、点眼液中の主薬の濃度と活性型である酸型のそれぞれの化合物濃度も異なる可能性がある。これについては現在のところ、PG 製剤の眼窩中薬物濃度や眼球付随組織中のエステラーゼやアミラーゼ活性値が明らかにされていないため不明であることから、*in vitro* の研究では同一濃度を用いた。また、各 PG 製剤によって FP 受容体に対する親和性が異なり<sup>69,94</sup>、中でも tafluprost が FP 受容体に対する親和性が高く<sup>95</sup>、また、bimatoprost は FP 受容体とプロスタマイド型の FP 受容体ともに刺激することが明らかになっている<sup>96</sup>。従って、これらの PG 製剤は細胞内シグナルの機序が異なる可能性があるが、FP 受容体への親和性や同一条件下での PG 刺激で起こる細胞内シグナルや眼脂肪細胞で *in vitro* 試験で比較検討した報告はまだない。さらに、*in vivo* においても眼組織中への薬物移行は薬物で異なる場合や個人差などある可能性が高い。特に bimatoprost の使用濃度は 0.03 % であり、この濃度は他の PG 製剤と比較しても高濃度である。組織中エステラーゼで分解されて bimatoprost から BIM-A が産生されるが<sup>69,97,98</sup>、BIM-A の眼組織中濃度も高濃度である可能性が高く、DUES 発症が他の PG 製剤使用に比べ bimatoprost 使用患者に多い理由のひとつである可能性が考えられる。しかしながら現時点では各組織への薬物移行性や PG 受容体の分布については不明な点が多いため、今後さらなる検討が必要である。本研究から言えることは、臨床での発症頻度や個人差を説明することは困難であるが、少なくとも本研究から FP 受容体が脂肪滴形成



を抑制することで DUES 発生に関与することは明らかとなったということである。

本研究では、成熟脂肪細胞の段階によって、FP 受容体の発現や脂肪滴形成に至るシグナル伝達が異なる可能性を考慮し、脂肪細胞へ分化中の細胞に対して、添加する PG 製剤のタイミングを 3 点に設定して検討した。その結果、前駆脂肪細胞に対しては、全ての酸型 PG 製剤が脂肪滴形成を抑制したが、分化した脂肪細胞では LAT-A、BIM-A および PGF<sub>2α</sub> が脂肪滴形成を抑制する結果となった。現時点では、眼窩組織における脂肪細胞の細胞周期や代謝について研究の詳細については不明であるが、もし眼窩脂肪組織が分化した脂肪細胞から構成されている場合、bimatoprost 点眼により DUES が高頻度で発症する原因として、BIM-A が本研究で示した、前駆脂肪細胞および分化した脂肪細胞に対する脂肪滴形成抑制作用にあることが考えられる。

これら臨床データや動物実験の結果より、DUES はプロスタノイドやプロスタマイドの FP 受容体への親和性の差で左右される可能性が高い。さらに臨床の結果から、PG 製剤の分解、組織浸透性、組織中薬物濃度が DUES 発症に影響を及ぼすとも言える。今後は基礎的研究と臨床研究の間の相関について、今後さらに検討する必要があると考えている。

以上より本検討では、プロスト型の PG の製剤は FP 受容体を刺激することで脂肪滴形成を抑制し、このことが、眼窩脂肪が減ってしまうことで生じる DUES 発症という有害事象につながる可能性が示唆された。

## 第四章 FP 受容体アゴニストの将来への展開

### 4-1 プロスタグランジン関連薬の眼圧非依存的な視神経保護作用

#### 4-1-1 背景

プロスタグランジン関連薬は緑内障の病型に関わらず1日1回の点眼で高い眼圧下降効果を示し、かつ全身性副作用の少ない薬剤であるため、第一選択薬となっている。さらに、プロスタグランジン関連薬は眼圧非依存的な神経保護効果を示す可能性についても示唆されており、中でも *latanoprost* は *in vitro* におけるグルタミン酸による網膜神経節細胞 (RGC) 細胞死や、マウスやラットを用いた研究から、虚血性あるいは視神経挫滅による視神経障害を抑制する可能性がある<sup>99-102</sup>。神経保護作用を有する薬剤の臨床的効果を明らかにするためには、*in vivo* での評価が必要不可欠であるが、動物を用いた試験では眼圧因子、すなわち薬剤の眼圧下降による神経保護効果、を除外することが不可能であるため、薬剤の眼圧非依存的な神経保護作用について検討することが困難であることが課題となっている。このことから、プロスタグランジン関連薬の RGC 細胞死に対する直接的な作用を検討するためには、*in vitro* による検討が必須である。しかしながら、これまでの報告では不死化した RGC 細胞を用いており、実際の RGC 細胞の特徴と異なる挙動を示す可能性が高いことが問題であった。また、現在使用されている4種のプロスタグランジン関連薬を同一条件下で検討した報告も存在しない。

そのため本研究では、現在使用されているプロスタグランジン関連薬について初代培養でのラット RGC を用い、グルタミン酸および低酸素誘発 RGC 死に対する眼圧非依存的な細胞死抑制効果について検討することとした。また、アポトーシスおよびネクロトーシスの細胞死形態についても併せて検討することとした。

#### 4-1-2 目的

グルタミン酸及び低酸素ストレスによる RGC 細胞死に対するプロスタグランジン関連薬の神経保護作用について、初代培養 RGC を用いて眼圧非依存的に検討することを目的とした。

#### 4-1-3 方法

##### 実験材料

Poly-l-Lysine, bovine serum albumin, L-glutamine, human recombinant brain-derived neurotrophic factor (BDNF), rat recombinant ciliary neurotrophic factor (CNTF) は Sigma より購入したものを使用した。Papain dissociation system は Worthington Biochemical より、mouse anti-rat SIRP [CD172a] monoclonal antibody (MAB 1407P) および mouse anti-rat and mouse Thy1.1 monoclonal antibody (MAB 1406) は Chemicon International より購入した。Live/Dead viability cytotoxicity kit (L-3224) は Molecular Probes にて購入した。Latanoprost acid (LAT-A), travoprost acid (TRA-A), unoprostone (UNO; acid form of isopropyl unoprostone), bimatoprost acid (BIM-A), bimatoprost (BIM) および PGF<sub>2</sub> $\alpha$  は Cayman chemicals より購入したもの、Tafluprost acid (TAF-A) は参天製薬株式会社から譲受したものを使用した。

##### ラット網膜神経節細胞の単離

5-7 日齢の wistar ラットを東京実験動物より購入した。動物実験は、東京大学大学院新領域創成科学研究科の承認を受け、東京大学動物実験実施規則及び東京大学動

物実験実施マニュアルを遵守して行った。

網膜神経節細胞 (retinal ganglion cells ;RGC) はラットより摘出した網膜から、two-step immuno-panning 法を用いて単離した<sup>103,104</sup>。摘出した網膜より papain dissociation system を用いて細胞懸濁液を調製した。そして、前日より 4 °C にて anti-rat macrophage antibody (1:50 希釈) および anti-rat and mouse Thy1.1 antibody (1:300 希釈) をコートしておいた 50 mL 遠沈管中の各抗体液を除去し、初めに anti-macrophage antibody をコートしておいた遠沈管内で 30 分室温にて静置し、マクロファージを除去した。続いて anti-rat and mouse Thy1.1 antibody をコートしておいた遠沈管中で 1 時間室温にて静置し、抗体にトラップされた細胞のみを単離し RGC とした。ここで得られた RGC は serum-free neurobasal medium (Gibco) に 2 % B27 supplement, L-glutamin (1 mM) , BDNF (40 ng/ml) , CNTF (40 ng/ml) , forskolin (10 μM) および gentamicin を添加した培地中を用いて、RGC 懸濁液を調製した。これを、前日から 0.05 mg/ml poly-l-lysine (Sigma) を 4 °C で、また、その後 1 μg/ml laminin (Gibco) を 2 時間以上室温でコートしておいた 24 well プレートに播種した。RGC は 72 時間通常培養条件下 (20 % O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 75% N<sub>2</sub>, 37 °C) にて培養を行い、実験に用いた。

#### グルタミン酸誘発ストレス負荷試験

72 時間の通常培養終了後、終濃度 25 μM glutamate を添加し、さらに 72 時間培養を続け、RGC 死を誘発した。なお、0 μM glutamate 添加群を normal 群とし、同様に 72 時間培養を続けた。

### 低酸素誘発ストレス負荷試験

72 時間の通常培養 (5 % CO<sub>2</sub>/95 % air) 終了後、プレートを低酸素条件下 (5 % CO<sub>2</sub>/5 % O<sub>2</sub>) で 24 時間培養を行った<sup>105</sup>。この時、72 時間の通常培養終了後に、24 時間通常培養条件で培養したものを normal 群とした。

### 試薬添加

市販の PG 製剤は、角膜内のエステラーゼにより加水分解され、酸型の活性体となり眼内で FP 受容体と結合するため、本研究では Figure 14 に示す通り、酸型の PG 製剤 LAT-A, TRA-A, TAF-A, BIM, BIM-A, および UNO を使用した。また、プロスタマイド型として FP 受容体に直接結合できる bimatoprost とオリジナルの prostaglandin F<sub>2α</sub>, そして vehicle として 0.01 % DMSO についても同時に検討した。各試薬は終濃度 1, 10 および 100 nM になるように各種ストレス負荷開始 1 時間前に添加した。

### RGC 生存率測定

RGC 生存率の測定には Live/Dead Viability/Cytotoxicity kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。生細胞の細胞体および軸索を calcein-AM (2 μM) で、死細胞を propidium iodide にて標識し、顕微鏡下 (10 x 対物レンズ使用) でそれぞれの細胞数 1 well あたり 8 視野について計測した。この時、calcein-AM 陽性、かつ標識された細胞体の少なくとも 3 倍の長さの軸索を有する細胞を生存 RGC とし計測を行った。これを元に生細胞率を、それぞれのストレス負荷について設定した normal 群で得られた生細胞数に対して算出した。

## Apoptosis/necrosis の測定

RGC の apoptosis の測定には Vybrant<sup>®</sup> Apoptosis Assay Kit (Invitrogen) を用いた。通常培養後の RGC に低酸素ストレスを負荷し、負荷 24 時間後の RGC に対して Alexa Fluor 488-conjugated annexin V /propidium iodide を用いて標識した。蛍光顕微鏡下 (200 倍) で標識した RGC を観察し、annexin V+/propidium iodide- のものを apoptosis、annexin V+/propidium iodide+ のものを necrosis と判断し<sup>106, 107</sup>、1 well あたり 8 視野について計測した。なお、核染色は 8  $\mu$ M Hoechst 33342 で行った。apoptotic RGC および necrotic RGC の割合は、annexin V+/propidium iodide- と annexin V+/propidium iodide+ の細胞数を Hoechst 33342-positive RGC を用いて算出した。

## 統計解析

結果は平均値±標準偏差 (standard deviation; S.D.) で表記し、統計解析は JMP Pro 11 software (SAS Institute Inc.) にて行い、ANOVA および Dunnett's test または Wilcoxon rank sum test を用いて、p 値が 0.05 以下を有意とした。

### 4-1-4 結果

#### 4-1-4-1 グルタミン酸ストレス負荷による RGC の細胞形態変化

グルタミン酸ストレス負荷に対する各 PG 製剤の作用について、生細胞を calcein AM で染色し、得られた代表的な細胞像は Figure 18 の通りである。グルタミン酸負荷なし群 (Figure 19A) に比較し、グルタミン酸負荷状態で 72 時間培養を続けた場合には、細胞体や軸索の萎縮が認められた (Figure 19I)。

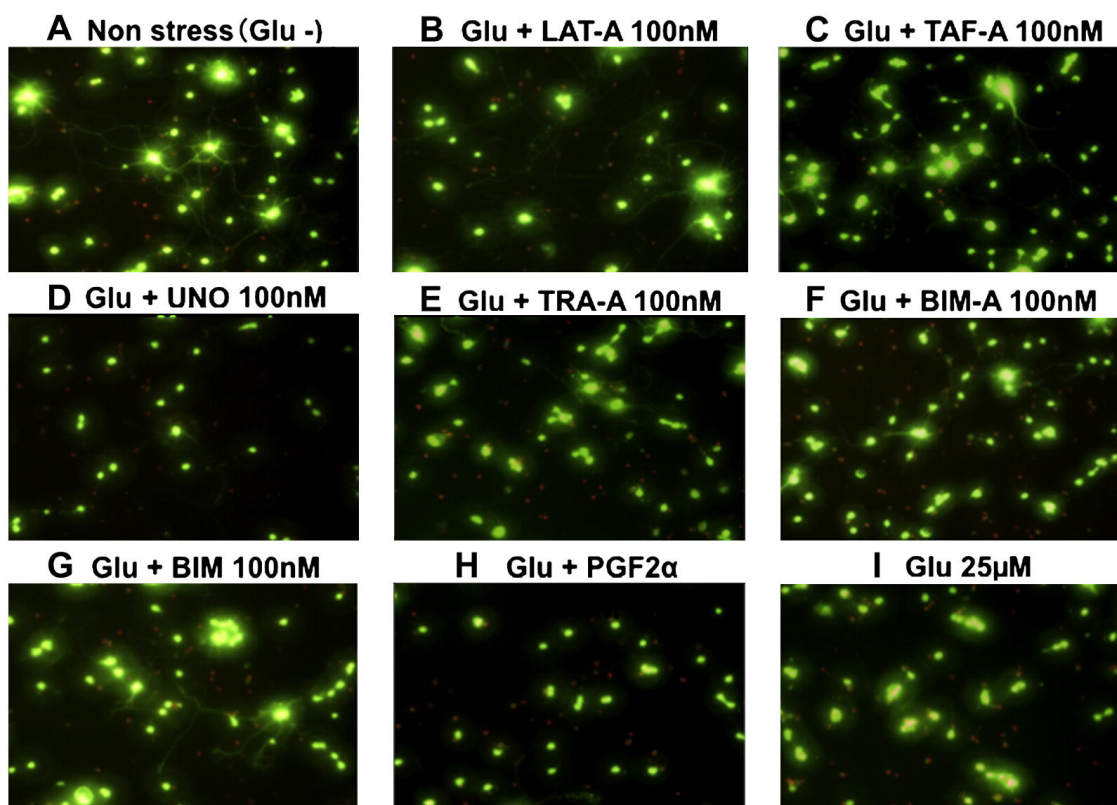


Figure 19 グルタミン誘発 RGC 細胞死に対する 7 種の PG 製剤を処置した際の培養像

#### 4-1-4-2 グルタミン酸ストレス負荷で誘発される RGC 死に対する PG 製剤の作用

グルタミン酸ストレス負荷時の無刺激時に対する細胞生存率 (%) は、 $60.5 \pm 7.6\%$  であり、グルタミン酸負荷により RGC 死が誘発されることが明らかとなった。これに対し、1, 10 および 100 nM LAT-A を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $60.9 \pm 4.5$ ,  $67.7 \pm 5.4$  および  $75.9 \pm 5.4$  (%) であった。1, 10 および 100 nM TAF-A を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $62.3 \pm 6.8$ ,  $72.1 \pm 4.1$  および  $84.9 \pm 3.8$  (%) であった。1, 10 および 100 nM UNO を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $61.7 \pm 4.9$ ,  $59.5 \pm 4.4$  および  $67.1 \pm 5.7$  (%) であった。1, 10 および 100 nM TRA-A を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $60.3 \pm 7.1$ ,  $63.3 \pm 5.4$  および  $68.6 \pm$



4.5 (%) であった。1, 10 および 100 nM BIM-A を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $60.5 \pm 6.1$ ,  $66.6 \pm 7.8$  および  $75.1 \pm 7.2$  (%) であった。1, 10 および 100 nM BIM を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $61.3 \pm 6.1$ ,  $67.7 \pm 6.5$  および  $76.6 \pm 7.5$  であった。1, 10 および 100 nM  $\text{PGF}_{2\alpha}$  を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $64.7 \pm 4.7$ ,  $66.4 \pm 4.3$  および  $68.2 \pm 3.6$  (%) であった。各種 PG 製剤を 100 nM 処置した場合、LAT-A, TAF-A, BIM-A および BIM はグルタミン酸ストレス負荷に対して有意に細胞生存率が高値を示した ( $p < 0.05$ ; ANOVA および Dunnett's test)。さらに、各種 PG 製剤を 10 nM 処置した場合、TAF-A でのみ有意に細胞生存率が高値を示していた ( $p < 0.05$ ; ANOVA および Dunnett's test) (Figure 20)。

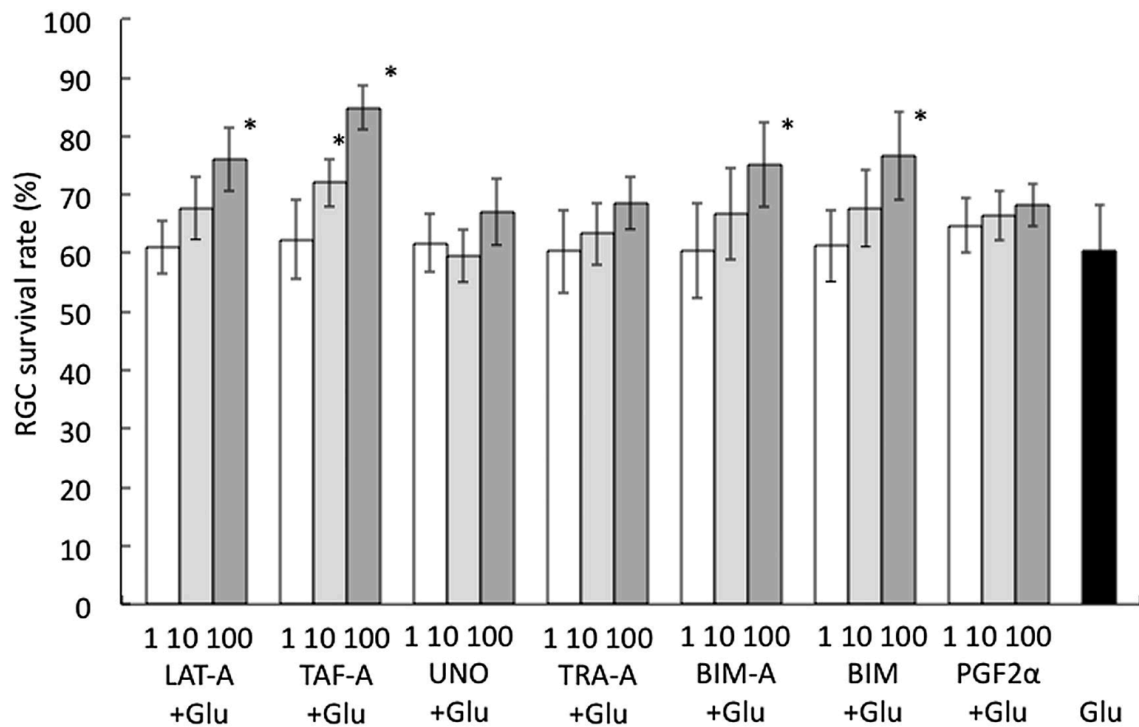


Figure 20 グルタミン酸処置後の RGC 生存率に対する PG 製剤の作用

\*;  $p < 0.05$ ; グルタミン酸負荷下での vehicle 処置と各 PG 製剤処置との比較 (ANOVA および Dunnett's test,  $n=15$ )

#### 4-1-4-3 低酸素ストレス負荷で誘発される RGC 死に対する PG 製剤の作用

24 時間の低酸素ストレス負荷時の無刺激時に対する細胞生存率 (%) は、 $61.0 \pm 6.1$  (%) であり、低酸素培養により RGC 死が誘発されることが明らかとなった。これに対し、1, 10 および 100 nM LAT-A を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $61.4 \pm 5.8$ ,  $70.0 \pm 8.8$  および  $86.3 \pm 6.9$  (%) であった。1, 10 および 100 nM TAF-A を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $61.9 \pm 5.7$ ,  $67.2 \pm 7.0$  および  $83.1 \pm 8.5$  (%) であった。1, 10 および 100 nM UNO を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $57.4 \pm 6.7$ ,  $59.9 \pm 6.9$  および  $65.5 \pm 7.4$  (%) であった。1, 10 および 100 nM TRA-A を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $58.7 \pm 5.2$ ,  $61.0 \pm 8.6$  および  $67.1 \pm 8.5$  (%) であった。1, 10 および 100 nM BIM-A を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $61.8 \pm 4.6$ ,  $66.5 \pm 6.1$  および  $83.6 \pm 9.8$  (%) であった。1, 10 および 100 nM BIM を処置した場合の細胞生存率 (%) は、それぞれ  $60.1 \pm 5.2$ ,  $66.9 \pm 5.9$  および  $83.4 \pm 11.3$  (%) であった。低酸素ストレス負荷培養に対し、100 nM の各種 PG 製剤を添加した場合、LAT-A, TAF-A, BIM-A および BIM は細胞生存率 (%) が有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ; ANOVA および Dunnett's test) (Figure 21)。

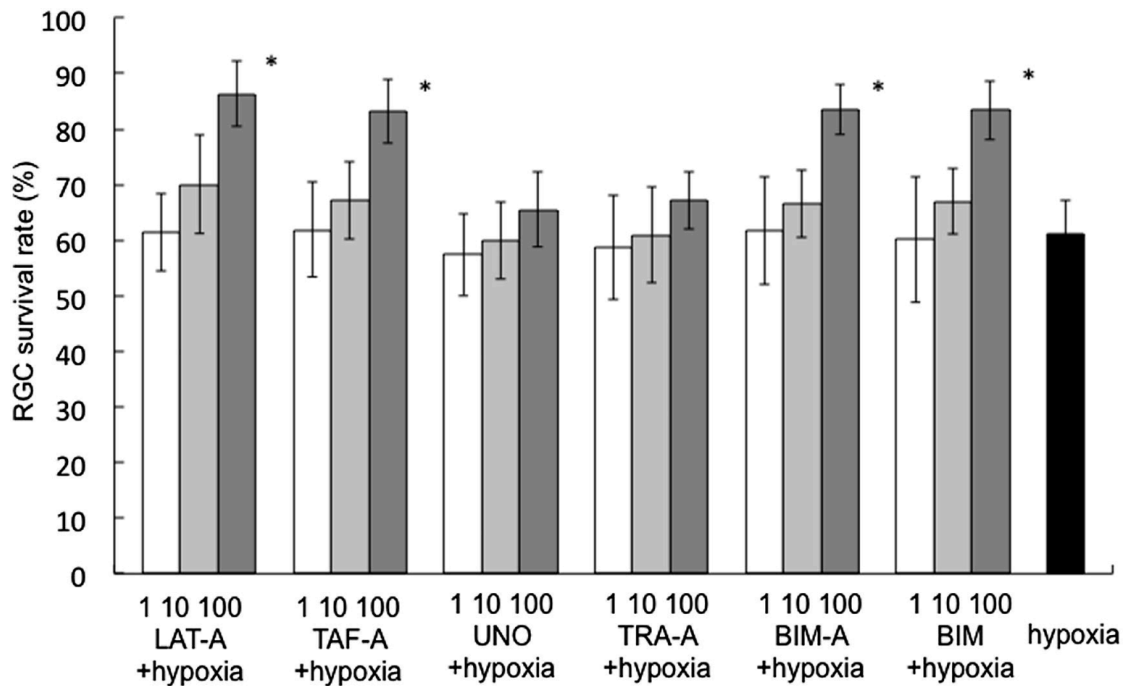


Figure 21 低酸素培養時の RGC 生存率に対する PG 製剤の作用

\*;  $p < 0.05$ ; 低酸素培養下での vehicle 処置と各 PG 製剤処置との比較 (ANOVA および Dunnett's test,  $n=15$ )

#### 4-1-4-4 グルタミン酸誘発 apoptosis および necrosis に対する各種 PG 製剤の作用

上記試験により、グルタミン酸ストレス負荷により RGC 死が誘発され、100 nM LAT-A, TAF-A, BIM-A および BIM 処置により RGC が抑制されることが明らかになった。グルタミン酸ストレス負荷で生じた RGC 死および各種 PG は製剤の RGC 死抑制作用について詳細に調べることを目的とし、apoptosis および necrosis の発生割合について、RGC 死抑制作用を示した 100 nM LAT-A, TAF-A, BIM-A および BIM を用いて検討した。その結果、apoptosis 発生率 (%) は無処置群およびグルタミン酸ストレス負荷群でそれぞれ  $8.6 \pm 2.9$  および  $27.3 \pm 6.0$  (%) であり、グルタミン酸ストレス負荷により有意に apoptosis の発生率が高値を示した ( $p < 0.01$ ; ANOVA および Wilcoxon rank

sum test)。一方、necrosis 発生率 (%) については、無処置群とグルタミン酸ストレス負荷群でそれぞれ  $18.1 \pm 3.0$  および  $27.3 \pm 7.9$  (%) であり、2 群間で差は認められなかった。これに対し、LAT-A, TAF-A, BIM-A および BIM 処置群ではそれぞれ  $16.6 \pm 2.0$ ,  $15.8 \pm 4.8$ ,  $11.5 \pm 3.1$  および  $16.4 \pm 6.2$  (%) であった。いずれの PG 製剤についても、グルタミン酸ストレス負荷により増加する apoptosis の発生を有意に抑制した ( $p < 0.05$ ; ANOVA および Steel test) (Figure 22)。

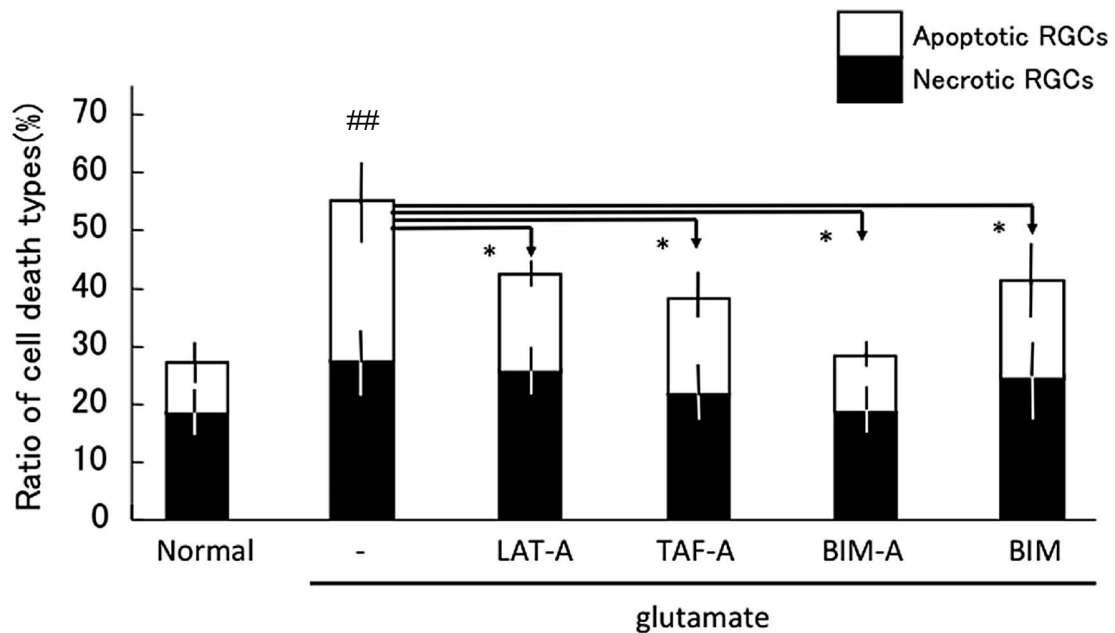


Figure 22 グルタミン酸負荷時のアポトーシスおよびネクローシスに対する PG 製剤の作用

##;  $p < 0.01$ ; 無処置とグルタミン酸処置との比較 (ANOVA および Wilcoxon rank sum test,  $n=8$ )

\*;  $p < 0.05$ ; グルタミン酸負荷下での vehicle 処置と PG 製剤処置との比較 (ANOVA および Steel test,  $n=8$ )

#### 4-1-4-5 低酸素培養誘発 apoptosis および necrosis に対する各種 PG 製剤の作用

上記のグルタミン酸ストレス負荷時と同様に、低酸素培養時についても apoptosis および necrosis 発生率について検討を行った。その結果、apoptosis 発生率 (%) は無処置群および低酸素ストレス負荷群でそれぞれ  $8.1 \pm 3.7$  および  $24.9 \pm 4.0$  (%) であり、低酸素ストレス負荷により apoptosis の発生は有意に上昇した ( $p < 0.01$ ; ANOVA および Wilcoxon rank sum test)。一方、necrosis 発生率 (%) はそれぞれ  $19.9 \pm 3.3$  および  $29.2 \pm 7.9$  (%) であり、2 群間に差は認められなかった。これに対し、LAT-A, TAF-A, BIM-A および BIM 処置群の apoptosis 発生率 (%) はそれぞれ  $14.9 \pm 6.5$ ,  $14.7 \pm 5.2$ ,  $12.6 \pm 5.5$  および  $15.5 \pm 5.2$  (%) であり、いずれの PG は製剤においても低酸素ストレスで増加する apoptosis を有意に抑制した ( $p < 0.05$ ; ANOVA および Steel test) (Figure 23)。

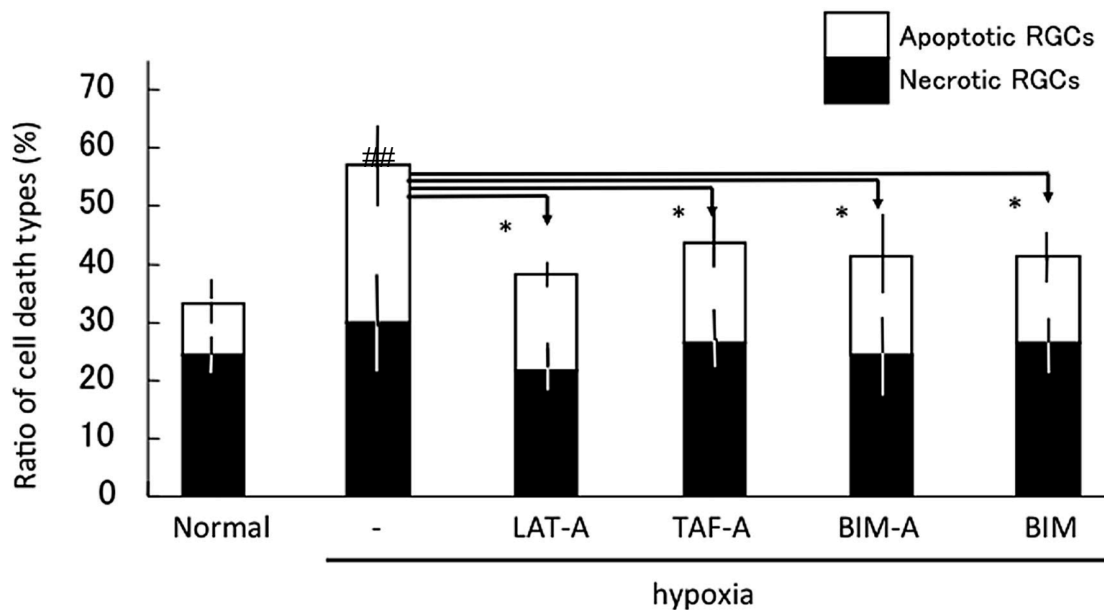


Figure 23 低酸素培養時のアポトーシスおよびネクローシスに対する PG 製剤の作用  
##;  $p < 0.01$ ; 無処置と低酸素培養下との比較 (ANOVA および Wilcoxon rank sum test,  $n=8$ )

\*;  $p < 0.05$ ; 低酸素培養下での vehicle 処置と PG 製剤処置との比較 (ANOVA および Steel test,  $n=8$ )

#### 4-1-5 考察

ラット初代培養細胞に対して、グルタミン酸および低酸素ストレス負荷という眼圧非依存的な条件負荷実験で、PG 関連薬のうち、LAT-A, TAF-A, BIM-A および BIM で RGC 保護作用が確認されたが、TRA-A および UNO では確認できなかった (Figure 20 および 21)。この RGC 保護作用と眼圧下降作用についての関連性について考察する。

今回使用した薬剤の中で、プロスタマイド受容体を刺激する bimatoprost 自体が、神

経保護作用を示したという結果は、本研究にて初めて明らかになったことである。

Bimatoprost は他の PG 関連薬と同様にプロドラッグタイプであるが、C 末端が他はイソプロピル基であるのに対し、エチルアミド基となっている。そのためその化学構造からプロスタノイドではなくプロスタマイドと分類され、アミド基がアミダーゼで代謝されなければ FP 受容体には親和性がないことがわかっている。従って、bimatoprost acid ならば FP 受容体に結合するので、今回の神経保護効果は予想通りの結果であった。しかし、興味深いことに bimatoprost 自身でも保護効果を呈した (Figure 20 および 21)。

Bimatoprost の結合する受容体の存在は 2008 年に漸く報告され、FP と FP のスプライズバリエーションの複合受容体である<sup>87</sup>ことが明らかにされており、今回 bimatoprost 自身が保護効果を示したのは、この FP 複合受容体を介したものであると考えられる。細胞内シグナルは明らかではないが、bimatoprost も含め、FP 受容体が虚血やグルタミン酸による細胞死に大きく関与している可能性が示唆された。

しかし、今回の実験においては、FP 受容体に親和性の高い travoprost は保護効果を示さなかった。Travoprost も他と同様の高い FP 受容体親和性を持つため、今回保護効果を示さなかったことは予想外であった。過去のウサギを用いた *in vivo* の結果から、虚血再灌流による網膜障害モデルに対して、FP 受容体アゴニストである

latanoprost, travoprost および bimatoprost は神経保護作用を示したという報告があり<sup>108</sup>、ウサギ眼に対して PG 製剤は IOP 下降作用を示さないことが明らかになっているため、FP 受容体アゴニストが IOP 非依存的な神経保護作用を示したと考えられる。もともと、このウサギを用いた研究では、PG 関連薬はヒトやサル、マウスと異なり IOP 下降作用はないものの、血流改善作用は示すため<sup>109, 110</sup>、純粋に RGC の FP 受容体を刺激する PG 関連薬の直接の神経保護作用を反映しているかはやや疑問が残る。

また、travoprost の神経保護効果がなかった理由として、今回使用した薬剤濃度が 1-100 nM の範囲であったことが考えられ、さらなる高濃度では神経保護効果を呈したかも知れない。今回の濃度は bimatoprost および latanoprost 前房内濃度が数 100 nM 以下であったという報告<sup>111</sup>を参考に設定した。仮に 100 nM 以上の濃度で神経保護作用を示したとしても、後眼部への薬物移行を考慮すると、実際の使用においてその効果が反映されないと考えたためである。しかし *in vivo* の各 PG 関連薬の網膜中薬物濃度は不明で、前房内濃度と異なる可能性があり、今回 *in vitro* では効果が認められなかった travoprost を含め、PG 関連薬の実臨床での神経保護作用の有無は今後の検討を要する。

また、一時 PG 関連薬と考えられていたため検討した Unoprostone も神経保護効果を示さなかったが、その理由は FP 受容体への親和性による。Unoprostone は発売後暫く、その骨格が PGF<sub>2α</sub> と類似していることから PG 関連薬とされており、C15 位が代謝されているためプロストン型に分類され、その他の C15 位の水酸基が保存されている。latanoprost, travoprost, bimatoprost, tafluprost をプロスト型と呼び区別されていた。薬理学的にこの水酸基が FP 受容体への親和性に非常に重要であり、実際にプロスト型のほうがプロストン型よりも FP 受容体への親和性が高いことが明らかになっている。これらの薬理的相違は臨床上での治療効果、つまり眼圧下降作用についても影響を及ぼすものであり、実際、プロスト型の薬剤に比較して unoprostone の眼圧下降作用は弱い傾向が示されていた<sup>27</sup>。現在では unoprostone は FP アゴニストとしてではなく、K<sup>+</sup>チャンネル開口薬として作用することが判明し<sup>88-90, 112</sup>、PG 関連薬とは分類されなくなった。本研究でも神経保護効果を示さなかったことは、unoprostone が異なる作用機序を持つ薬剤であることを支持する。



以上より、PG 関連薬の持つ視神経保護作用は、FP 受容体刺激による可能性が高いが、今回用いた PG 関連薬は、FP 受容体への親和性が高いものの、EP 受容体、特に EP3 受容体へも結合するため、本研究で得られた RGC 保護作用は、FP 受容体ではなく EP 受容体を刺激した結果である可能性も考えられる。これまでプロスタノイド受容体である EP2<sup>113-122</sup>、EP3<sup>123</sup> および EP4 受容体<sup>124-126</sup> が視神経保護作用を示す報告は数多い。その一方で、EP1 受容体は神経毒性を示すといった報告もある<sup>127-130</sup>。さらに、プロスタノイド受容体の神経細胞に及ぼす作用については、実験方法や使用細胞および動物によって異なる見解が多くまだ不明である。残念ながら、現時点では PG 関連薬の各種プロスタノイド受容体に対する親和性について、同一条件下で比較検討した報告はないため、詳細については不明である。今後、PG 関連薬の EP 受容体への親和性についての検討や、その他のプロスタノイド受容体への結合と神経保護作用について検討することが、より良い PG 関連薬の開発につながると考えられる。

続いて、今回得られた結果をもとに、より良い PG 関連薬の開発に向けて、直接的 RGC 保護作用を有する化合物の化学構造式の面から類推可能かどうかについて考察した。本検討で用いた PG 関連薬の化学構造は PGF<sub>2α</sub> と類似するものであり (Figure 14)、特に、プロスト型 (LAT-A, TAF-A, TRA-A, BIM-A) の PG の製剤は C13-14 位の二重結合、C15 位の側鎖、そして末端のフェニル基が異なるが構造的には類似した形となっている。これらの中で、神経保護作用を示すものと示さないものの化学構造式を比較した場合、末端のフェニル基の有無が関係する可能性が考えられる。UNO および PGF<sub>2α</sub> は末端にフェニル基を持たず、TRA は 16-m-trifluoromethylphenoxy 基がフッ素に置換されていることがわかる。一方、神経保護作用を示す PG の製剤 (LAT, TAF および BIM) は、全て末端にフェニル基を有

していた。これより、末端に存在するフェニル基が RGC 保護作用には重要である可能性が示唆された。このように今後、PG 製剤の化学構造と神経保護作用について詳細が検討されることで、将来、IOP 下降や血流改善以外の付加価値として、直接的な神経保護作用を有する化合物の開発がよりよい緑内障治療薬の開発につながる事が期待される。

上述のように、PG 関連薬により RGC 保護作用が認められたが、その作用機序説明の一つとして apoptosis および necrosis について検討した結果、グルタミン酸ストレスおよび低酸素ストレス負荷時ともに、apoptosis を増加させ、それに対し、LAT-A, TAF-A, BIM-A および BIM が顕著に apoptosis を抑制していた (Figure 22 および 23)。この結果より、RGC 保護作用は apoptosis 抑制に起因する結果であると考えられる。より詳細に検討するためには免疫染色以外の他の生物学的実験を行う必要があるが、私が用いた初代培養系は、網膜組織からの RGC 単離時の収率が低いためそれら検討に十分な細胞数を確保することが難しい。また、RGC-5 細胞などの cell line cell も存在するが、不死化させていることで本来の特性は失われている可能性が高いことが報告されており<sup>131</sup>、細胞死について検討する目的の本検討で使用しなかった。細胞内で生じている apoptosis の機序について詳細に検討するためには、より感度の高い試験系を用いる必要があると考えている。

最後に、PG 関連薬の視神経保護作用の臨床的応用について述べる。現在、プロスト型の PG 関連薬はその高い IOP 下降作用から、緑内障治療の第一選択薬となっている。また、これら薬剤には血流改善作用を有することも明らかになっている。例えば、ウサギにおいて、tafluprost, travoprost および latanoprost は有意な血流増加作用を示しており<sup>109, 110, 132</sup>、その作用機序として考えられるのは IOP 非依存的な endothelin-1 に

よる血管収縮を抑制することであると報告されている<sup>109</sup>。ヒトにおいても、latanoprost, travoprost および bimatoprost は顕著な IOP 下降作用とともに、血流増加作用も示していることが明らかになっている<sup>133-138</sup>。これらの報告から、PG 関連薬は薬剤が網膜まで到達し、IOP に依存しない血流増加作用を示す可能性が示唆されている。このことから、各薬剤における網膜到達濃度は不明であるが、本研究で得られた IOP 非依存的な RGC 保護作用は、臨床使用時においても眼圧下降作用だけでなく、直接 RGC に作用し、細胞死を抑制している可能性が示唆された。グルタミン酸および低酸素ストレス負荷は、確証は得られていないものの緑内障病態に関与すると考えられており、PG 製剤について臨床的な効果が期待できるが、さらに他の眼疾患として、虚血性視神経症や血管閉塞性網膜疾患にも応用できる可能性がある。今後、様々な動物モデルや *in vitro* 試験において、様々な刺激により生じる細胞死に対して、PG 製剤の IOP 非依存的な神経保護作用やその機序について、より詳細に検討する必要があると考えている。

以上より、本研究では既存の PG 関連薬は臨床使用時の前房内薬物濃度に相当する濃度域で、グルタミン酸および低酸素ストレス負荷による RGC 細胞死に対し、IOP 非依存的な視神経保護作用を有することが明らかとなった。また、その視神経保護作用は、眼圧下降作用に深く関わる FP 受容体の関与が高い可能性が示唆された。

## 第四章 FP 受容体アゴニストの将来への展開

### 4-2 FP 受容体刺激作用を有する新規眼圧下降薬の可能性

#### 4-2-1 背景

これまでの報告から、現在緑内障治療薬として広く使われている latanoprost などの PG 関連薬は、FP 受容体を刺激することで眼圧下降作用を示すことが明らかとなっている<sup>50, 51, 69</sup>。また、第 2 章で示した通り FP 受容体が通常状態での眼圧制御よりも眼圧が上昇した際に働くことで眼圧の恒常性維持に働く可能性が示唆されている。また、その作用の一部には内因性 PG 産生を介した EP3 受容体刺激作用も関与することも報告されているものの<sup>50-53</sup>、眼圧を制御する因子として重要な役割を担っているプロスタノイド受容体については不明なことも多い。さらに、これまで当研究室でも EP2 および 4 受容体が直接眼圧を下降させることについて、マウス眼を用いた検討から明らかにしている<sup>21</sup>。

現在、既存の PG 関連薬の眼圧下降のターゲットである FP 受容体のみならず、EP2 受容体を介した眼圧下降薬の研究も進められており<sup>139, 140</sup>、最近本邦でもエイベリス点眼液 0.002 %が開発され<sup>141-143</sup>、製造販売するに至っている。また、EP2 アゴニストだけでなく、1 化合物で FP 受容体および EP3 受容体両方を刺激する作用を有する FP 受容体/EP3 受容体のデュアルアゴニストである sepetaprost についても開発が進められている<sup>144-147</sup>。

Sepetaprost は、角膜内のエステラーゼで代謝されて眼内で作用を発揮するプロドラッグであり、その代謝物である ONO-AG-367 は FP および EP3 受容体へ高い親和性を有する化合物である。それぞれの受容体に対する親和性について FP 受容体では Chem-1 細胞を、EP3 受容体では CHO 細胞を用いて検討した結果、EC<sub>50</sub> 値は FP 受容体で 22.3 nM、EP3 受容体で 28.6 nM であった<sup>146</sup>。また、ヒトにおいて FP 受容体は脈絡膜以外の組織、EP3 受容体は線維柱帯細胞、シュレム管内皮細胞、集合管、房

水静脈、毛様体上皮細胞、毛様体筋、毛様体実質細胞などに存在することが明らかになっており<sup>148</sup>、房水動態を制御するような経ぶどう膜強膜流出路や主経路と呼ばれる経線維柱帯流出路に関係する組織に分布するため、眼圧を制御する房水動態へ影響を及ぼす可能性は高い。

Sepetaprost はこれまで緑内障治療薬として広く使われてきた PG 関連薬と比較して、サルにおいて latanoprost や travoprost よりも眼圧下降作用が強いと報告されている<sup>146</sup>。また、健常人ボランティアを対照にした単回投与試験では latanoprost よりも作用が強<sup>147</sup>、次いで OAG や OH 患者を対照にした 28 日間の連続投与試験でも濃度依存的な眼圧下降作用を有することが明らかとなった<sup>145</sup>。そしてその眼圧下降作用は latanoprost よりも高いことが報告され<sup>144</sup>、2017 年 7 月より本邦および米国にて phase II b 試験が開始されている。

これらのことから、sepetaprost は FP および EP3 受容体を同時に刺激することで既存の PG 関連薬よりも強く、持続的な眼圧下降作用を有する可能性が考えられるものの、両受容体が直接眼圧下降に関与するデータはまだない。また、ヒトやサル以外についての報告もまだないことから、今回我々は両受容体遺伝子欠損マウスを用いて sepetaprost の持つ眼圧下降作用に FP および EP3 受容体がどのように関与するかについて検討することとした。

#### 4-2-2 目的

新規 FP/EP3 受容体アゴニストである sepetaprost の眼圧下降作用について、FP および EP3 受容体の関与について、マウス眼を用いて検討する。

#### 4-2-3 方法

##### 実験材料

Sepetaprost および EP3 受容体 agonist である ONO-AE-248 は小野薬品工業株式会社に合成したものを分与いただき、使用した。(sepetaprost; Propan-2-yl 4-{ (3S,5aR,6R,7R,8aS) -6[ (1E,3R) -4- (2,5-difluorophenoxy) -3-hydroxybut-1-en-1-yl]-7-hydroxyoctahydro-2H-cyclopenta[b]oxepin-3-yl} butanoate) 。Latanoprost は市販のキサラタン点眼液 0.005 % (Xalatan Eye Drops 0.005 %;Pfizer) を使用した。

##### 実験動物

東京実験動物株式会社より近交系 C57BL6/J 雌雄マウスを購入し、8-12 週齢で実験に用いた。また、マウスは、購入後、実験予定日の少なくとも 1 週間前から、本研究室の conventional 動物室にて飼育し、また、各種 KO マウスは同動物室内で繁殖および飼育し、十分な検疫および馴化期間を設けた。動物実験は、東京大学大学院新領域創成科学研究科の承認を受け、東京大学動物実験実施規則及び東京大学動物実験実施マニュアルを遵守して行った。

##### 投与方法

各薬剤投与は点眼投与とした。マイクロピペットにて 3  $\mu$ L マウス片眼に各薬剤をランダムに滴下し、10 秒間閉眼させた。また、僚眼は無処置 (control) とした。

## 眼圧測定方法

マウス眼圧 (IOP) の測定は、microneedle 法を用いた。直径 1 mm ホウケイ酸ガラス製キャピラリー (World Precision Instruments) の先端を 75-100  $\mu\text{m}$  に研磨したガラスニードルを作製し、圧トランスデューサー (model BLPR; World Precision Instruments) に接続して得られた圧変化を powerLab (AD Instruments) にてモニターできる装置を使用した。実際には、予めケタミン/キシラジン混合液の腹腔内投与にて麻酔を施したマウスの前房内へ、作製したガラスニードルを刺入し、そこで得られた前房内圧を IOP とした。いずれの測定方法についても、測定は両眼に対し 21:00-23:00 の夜間 IOP を測定した。

## 房水流出量測定方法

総房水流出量 (C value) の測定は、既報を参考に two-level, constant-pressure perfusion 法を用いて行った<sup>21, 50, 149-151</sup>。トランスデューサーを介して、人工的な前房水 (BSS Plus; Alcon, Fort Worth, TX) を満たしたポリエチレン製チューブのリザーバー (0.35 mm inner diameter; Natsume Seisakujo, Tokyo, Japan) を接続したガラス製ニードルを、前房内へ刺入した。このリザーバーの高さを前房内圧が 25 または 35 mmHg になるように調整し ( $H_{25}$  および  $H_{35}$  (mm))、10 分間その眼圧を維持した。このときリザーバー内の面積 ( $S$  ( $\text{mm}^2$ )) を内径から算出した。眼内圧を 25 または 35 mmHg に維持した際の房水流出量を  $V_{25}$  または  $V_{35}$  と定義し、房水総排出量 ( $C_{\text{total}}$ ,  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mm Hg}$ ) を下記の式より算出した<sup>149-151</sup>。

$$C_{\text{total}} = (V_{35} - V_{25}) / 10 = [S (H_{35} - H_{25})] / 100$$



房水総流出量 ( $C_{total}$ ) は上記の two-level constant-pressure perfusion 法で算出され、経シュレム管経路流出路 ( $C_{conv}$ ) とぶどう膜強膜流出路 ( $C_{uveo}$ ) からの房水流出量の合計である。この経シュレム管経路からの房水流出は眼圧依存的で、ぶどう膜強膜流出路からの房水流出は眼圧非依存的である<sup>152, 153</sup>。

#### 解析方法

得られたデータは、IOP 値 (mmHg) あるいは  $100 \times (\text{薬剤投与眼 IOP 値} - \text{vehicle 投与眼 IOP 値}) / \text{vehicle 投与眼 IOP 値} (\%)$  で得られる IOP 増加率 (% IOP increase) で表した。

結果は平均値 ± 標準偏差 (S.D.) で表記し、統計解析は JMP Pro 11 software (SAS Institute Inc.) にて行い、ANOVA および Student's t-test または Dunnett's test を用いて、p 値が 0.05 以下を有意とした。

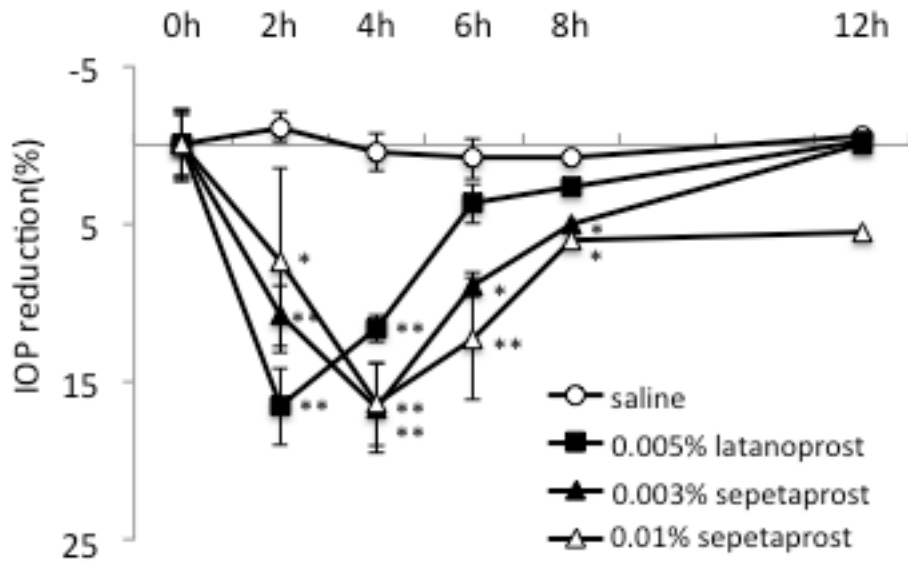
#### 4-2-4 結果

##### 4-2-4-1 野生型マウスにおける sepetaprost 投与時の眼圧経時的変化

まず、sepetaprost のマウス眼圧に対する作用について検討するため、sepetaprost 点眼 2,4,6,8, および 12h 後の野生型 (WT) マウス眼圧を測定した (n=6-8/各ポイント)。Saline 点眼群と各薬剤処置群との間で ANOVA および Student's t-test を用いて比較した。点眼 2 時間後の眼圧下降率 (%) は saline, 0.005 % latanoprost, 0.003 % sepetaprost および 0.01 % sepetaprost でそれぞれ、 $-1.1 \pm 1.9$ ,  $16.5 \pm 2.2$ ,  $10.8 \pm 2.3$  および  $7.3 \pm 2.1 (\%)$  であった。Saline 群と比較して 0.005 % latanoprost, 0.003 および

0.01 % sepetaprost 群で有意に高値を示した ( $p < 0.01$  あるいは  $0.05$ ; ANOVA および Student's t-test)。点眼 4 時間後ではそれぞれ、 $0.5 \pm 0.9$ ,  $11.6 \pm 2.4$ ,  $161.6 \pm 1.9$  および  $16.4 \pm 2.1$  (%) であった。Saline 群と比較して 0.005 % latanoprost, 0.003 および 0.01 % sepetaprost 群で有意に高値を示した ( $p < 0.01$  あるいは  $0.05$ ; ANOVA および Student's t-test)。点眼 6 時間後ではそれぞれ、 $0.8 \pm 1.2$ ,  $3.7 \pm 0.9$ ,  $8.8 \pm 2.8$  および  $12.2 \pm 1.1$  (%) であった。Saline 群と比較して 0.003 および 0.01 % sepetaprost 群で有意に高値を示した ( $p < 0.01$  あるいは  $0.05$ ; ANOVA および Student's t-test)。点眼 8 時間後ではそれぞれ  $0.8 \pm 1.3$ ,  $2.7 \pm 1.2$ ,  $5.0 \pm 0.7$  および  $6.1 \pm 1.4$  (%) であった。Saline 群と比較して 0.003 および 0.01 % sepetaprost 群で有意に高値であった ( $p < 0.01$  あるいは  $0.05$ ; ANOVA および Student's t-test)。続いて点眼 12 時間後ではそれぞれ  $-0.5 \pm 1.1$ ,  $-0.2 \pm 0.6$ ,  $0.0 \pm 1.2$  および  $5.6 \pm 2.4$  (%) でありいずれの薬剤処置群においても saline 群と差は認められなかった (Figure 24A)。また、AUC (% $\cdot$ hr) について算出した結果、saline、0.005 % latanoprost、0.003 % sepetaprost および 0.01 % sepetaprost でそれぞれ 1.37, 68.9, 82.5 および 89.6 であり、既存の 0.005 % latanoprost よりもいずれの濃度の sepetaprost は高値を示した (Figure 24B)。

A



B

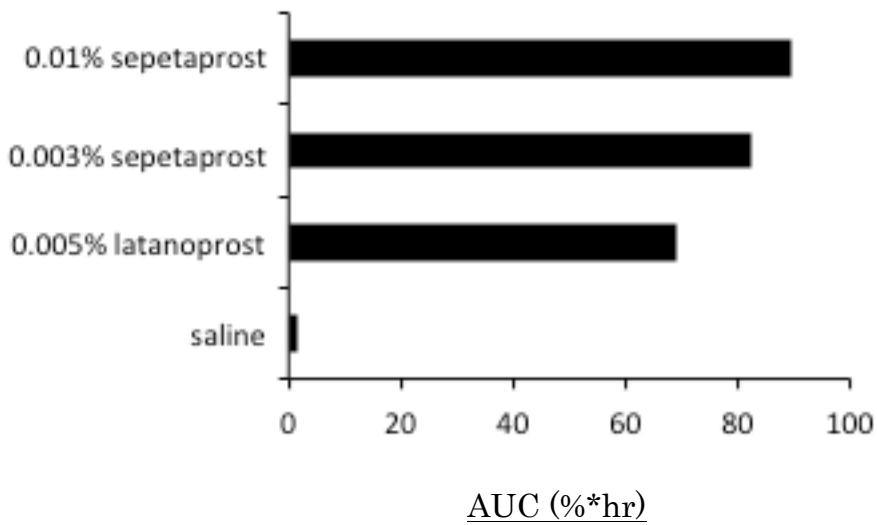


Figure 24 野生型マウス眼圧に対する 0.005 % latanoprost, 0.003 % sepetaprost および 0.01 % sepetaprost の作用

(A) IOP 下降率 (%) の経時的変化、(B) 各眼圧下降薬処置時の AUC 比較

\*,\*\*;  $p < 0.05$  または  $0.01$ ; saline 処置と各薬剤処置との比較 (ANOVA および Student's t-test,  $n=6-8$ )

#### 4-2-4-2 0.003 %sepetaprost の FPKO および EP3KO マウス眼圧に対する作用

上記試験より 0.003 % sepetaprost で latanoprost と同程度の眼圧下降作用が認められたため、sepetaprost の持つ眼圧下降作用に対して、FP および EP3 受容体の関与について検討した。眼圧は薬剤点眼の 2 および 6 時間後に行い、眼圧下降率を算出した (n=6-8/ 各遺伝子型マウス)。点眼 2 時間後について、saline 点眼での WT, FPKO および EP3KO マウスの眼圧下降率 (%) はそれぞれ  $0.7 \pm 0.9$ ,  $0.1 \pm 1.2$  および  $-0.8 \pm 2.1$  (%) であった。いずれの遺伝子タイプのマウスにおいても差は認められなかった。0.005 % latanoprost 点眼ではそれぞれ  $15.3 \pm 2.5$ ,  $1.8 \pm 2.0$  および  $12.3 \pm 2.4$  (%) であり、WT と比較して FPKO マウスで有意に低値を示した ( $p < 0.01$ ; ANOVA および Student's t-test, n=6-8)。また、0.003 % sepetaprost 点眼ではそれぞれ  $13.6 \pm 2.1$ ,  $5.9 \pm 2.7$  および  $6.6 \pm 2.6$  (%) であり、WT と比較して FP および EP3KO で有意に低値を示した ( $p < 0.05$ ; ANOVA および Student's t-test, n=6-8) (Figure 25)。

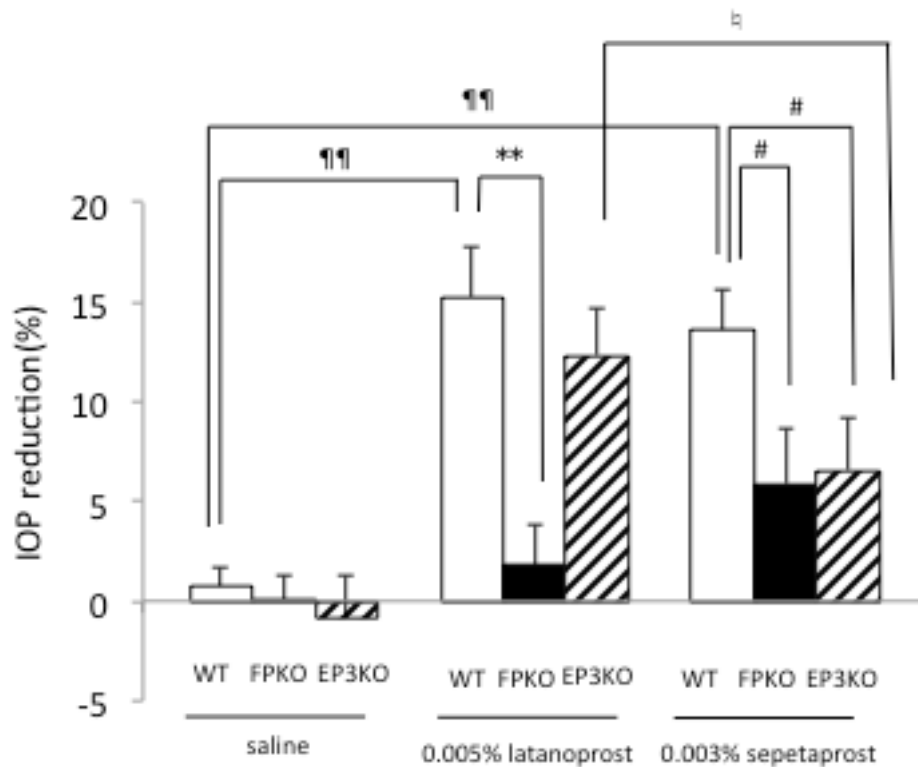


Figure 25 WT、FPKO および EP3KO マウスにおける 0.005 % latanoprost および 0.003 % sepetaprost 点眼 2 時間後の眼圧下降率の比較

¶¶  $p < 0.01$ ; WT マウスにおける saline 処置と各薬剤処置との比較 (ANOVA および Student's t-test,  $n=6-8$ )

\*\*  $p < 0.01$ ; 0.005% latanoprost 処置下での WT マウスと各遺伝子改変改変マウスとの眼圧下降率の比較 (ANOVA および Student's t-test,  $n=6-8$ )

#  $p < 0.05$ ; 0.003% sepetaprost 処置下での WT マウスと各遺伝子改変マウスとの眼圧下降率の比較 (ANOVA および Student's t-test,  $n=6-8$ )

†  $p < 0.05$ ; EP3KO マウスにおける 0.005% latanoprost 処置と 0.003% sepetaprost 処置との眼圧下降率の比較 (ANOVA および Student's t-test,  $n=6-8$ )

また点眼 6 時間後について、saline 点眼における WT、FPKO および EP3KO マウス

の眼圧下降率 (%) はそれぞれ $-0.7 \pm 0.9$ ,  $0.6 \pm 0.5$  および  $-0.8 \pm 1.7$  (%) であり、いずれの遺伝子型マウスについて差は認められなかった。0.005 % latanoprost 点眼ではそれぞれ  $3.7 \pm 0.9$ ,  $1.3 \pm 1.7$  および  $1.4 \pm 0.9$  (%) であり、いずれの遺伝子型マウスについて差は認められなかった。一方、0.003 % sepetaprost 点眼ではそれぞれ  $7.3 \pm 0.8$ ,  $3.5 \pm 1.1$  および  $3.3 \pm 0.7$  (%) であった。WT と比較して FP および EP3KO マウスで有意に低値を示した ( $p < 0.01$  あるいは  $0.05$ ; ANOVA および Student's t-test) (Figure 26)。

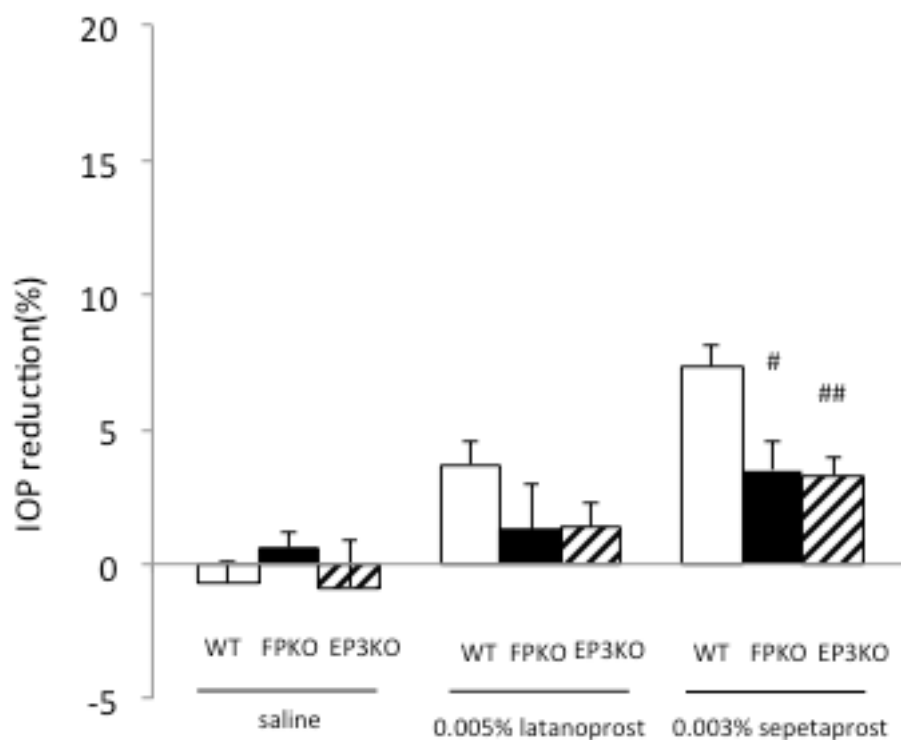


Figure 26 WT、FPKO および EP3KO マウスにおける 0.005 % latanoprost および

0.003 % sepetaprost 点眼 6 時間後の眼圧下降率の比較

#,## $p < 0.05$  または  $0.01$ ; 0.003 % sepetaprost 点眼における WT マウスと各遺伝子改変マウスとの眼圧下降率の比較 (ANOVA および Student's t-test,  $n = 6-8$ )

#### 4-2-4-3 選択的 EP3 受容体アゴニスト 0.1% ONO-AE-248 の WT マウス眼圧に対する作用

上記試験から、FP/EP3 受容体デュアルアゴニストの高い眼圧下降作用が示され、さらにその作用は FP および EP3 受容体が関与することがわかった。そのため、マウス眼圧に対する EP3 受容体単独刺激時の作用について検討するため、選択的 EP3 受容体アゴニストである ONO-AE-248 を用いて、マウス眼圧を測定した。眼圧は 0.1 % ONO-AE-248 点眼の 2 および 6 時間後に行った。点眼 2 時間後の眼圧は DMSO 群で無処置眼と処置眼はそれぞれ  $18.0 \pm 3.1$  および  $18.1 \pm 2.8$  (mmHg) であった。同様に 0.005 % latanoprost 群ではそれぞれ  $18.0 \pm 1.6$  および  $14.9 \pm 2.1$  (mmHg) であった。さらに 0.1 % ONO-AE-248 群ではそれぞれ  $18.0 \pm 1.6$  および  $18.1 \pm 1.9$  (mmHg) であり、0.005 % latanoprost 群において無処置眼と比較して処置眼で有意に低値を示したものの、ONO-AE-248 群では無処置群との差は認められなかった ( $p < 0.01$ ; ANOVA および Student's t-test) (Figure 27A)。また、DMSO 群、0.005 % latanoprost 群および 0.1 % ONO-AE-248 群の眼圧下降率 (%) を算出した結果、それぞれ  $-0.8 \pm 0.9$ ,  $17.3 \pm 2.6$  および  $-0.3 \pm 1.8$  (%) であった。DMSO 群と比較して 0.005 % latanoprost 群でのみ有意に低値を示した ( $p < 0.01$ ; ANOVA および Student's t-test) (Figure 27B)。

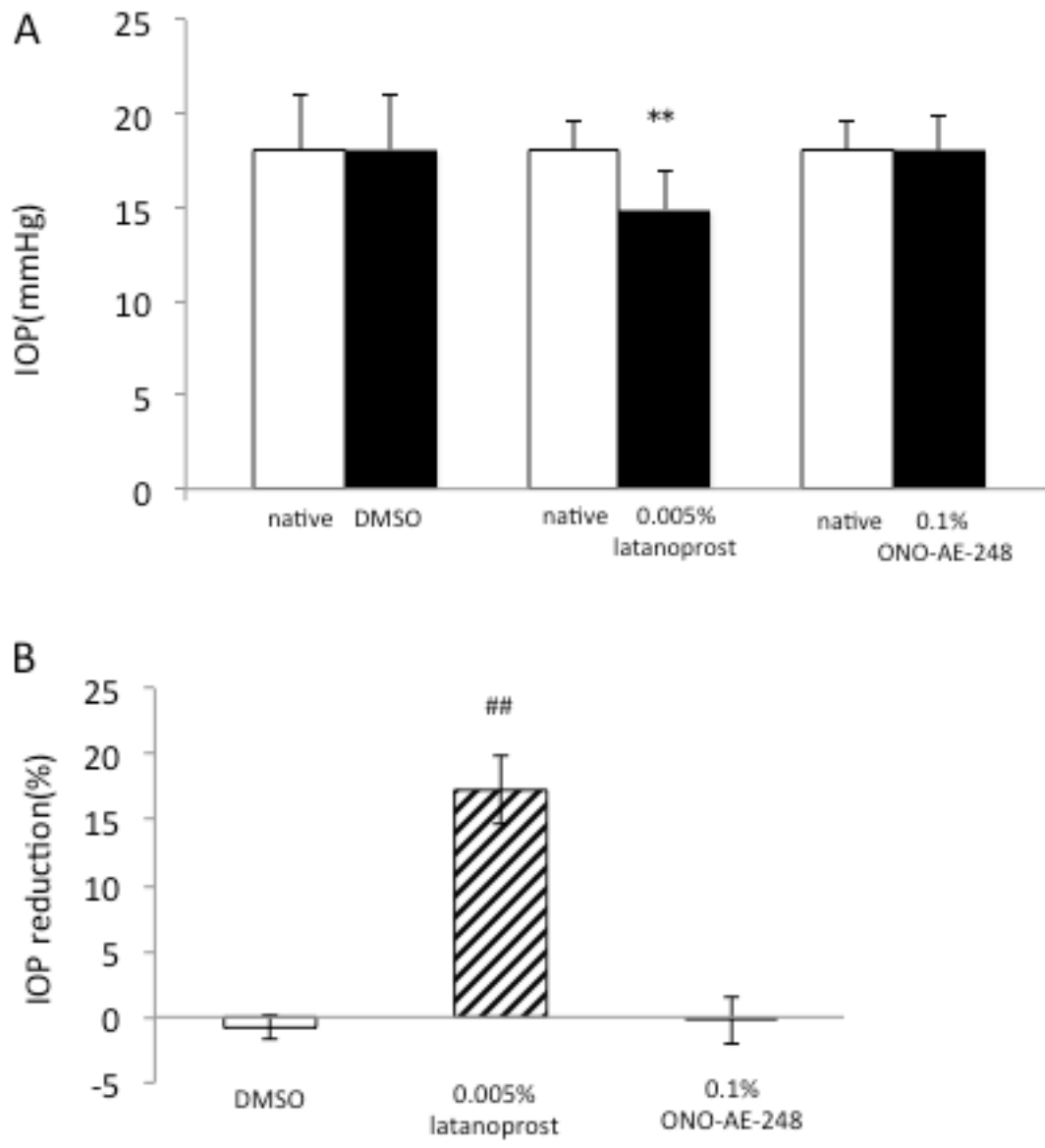


Figure 27 0.005 % latanoprost および 0.1 % ONO-AE-248 点眼 2 時間後の WT マウス 眼圧に対する作用

(A) 眼圧値 (mmHg)、(B) 眼圧変化率 (%)

\* $p < 0.05$ ; 対側眼と処置眼との比較 (ANOVA および Student's t-test,  $n = 9-11$ )

##  $p < 0.01$ ; DMSO 処置と薬剤処置との比較 (ANOVA および Student's t-test,  $n = 9-11$ )

点眼 6 時間後の眼圧は、DMSO 群で無処置眼と処置眼はそれぞれ  $20.4 \pm 2.8$  およ



び  $20.6 \pm 2.5$  (mmHg) であった。同様に 0.005 % latanoprost 群ではそれぞれ  $18.8 \pm 1.7$  および  $18.6 \pm 1.6$  (mmHg) であった。さらに 0.1 % ONO-AE-248 群ではそれぞれ  $20.1 \pm 1.3$  および  $19.9 \pm 1.0$  (mmHg) であり、いずれの薬剤処置においても無処置眼と比較して差は認められなかった (Figure 28A)。また、DMSO 群、0.005 % latanoprost 群および 0.1 % ONO-AE-248 群の眼圧下降率 (%) を算出した結果、それぞれ  $1.5 \pm 1.2$ ,  $1.0 \pm 0.2$  および  $3.4 \pm 1.8$  (%) であった。DMSO 群と比較して、ONO-AE-248 群で眼圧下降傾向が認められたものの、いずれの薬剤処置群で有意な差は認められなかった (Figure 28B)。

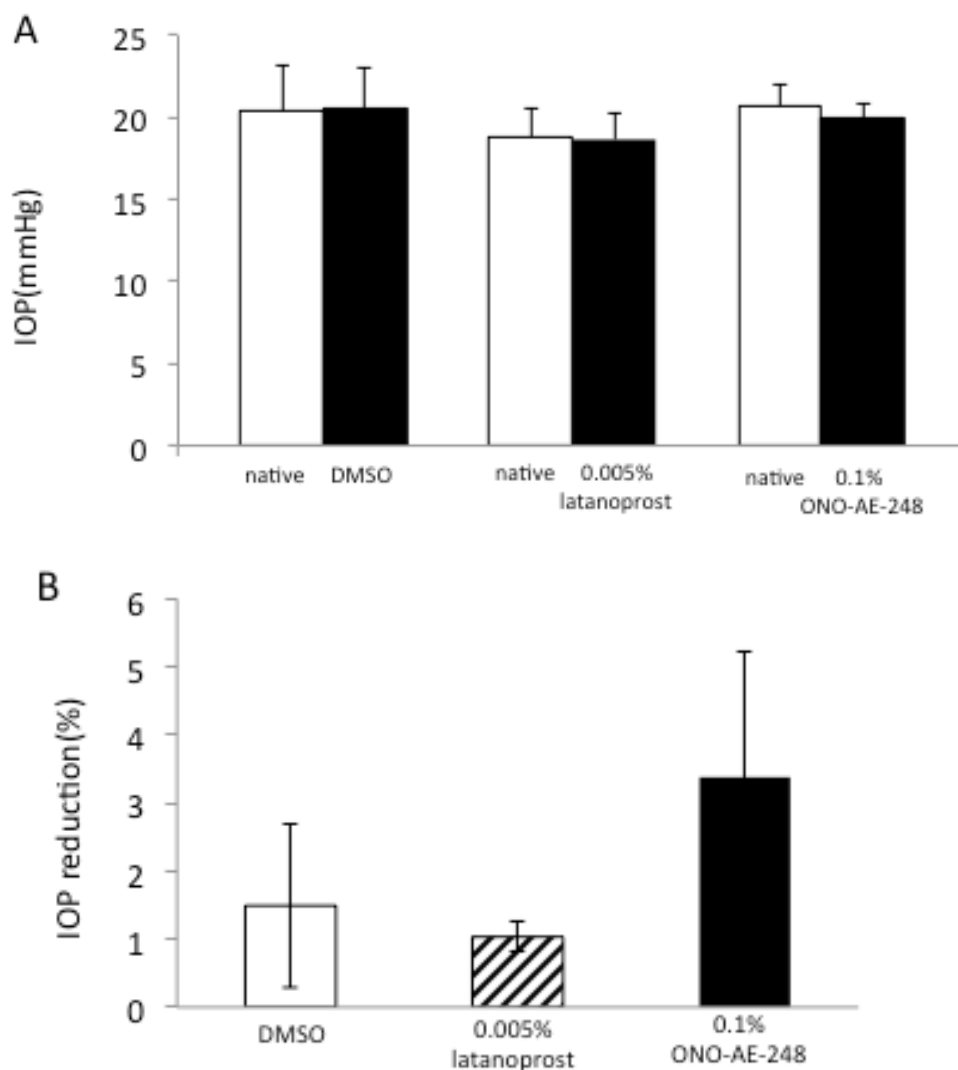


Figure 28 0.005 % latanoprost および 0.1 % ONO-AE-248 点眼 6 時間後の WT マウス眼圧に対する作用

(A) 眼圧値 (mmHg)、(B) 眼圧変化率 (%)

#### 4-2-4-4 野生型マウス眼房水流出量に対する sepetaprost の作用

上記検討の結果、sepetaprost は FP および EP3 受容体を介する高い眼圧下降作用を示すことが明らかになった。眼圧下降機序として、房水産生抑制と房水流出促進の 2 つの機序があるが、FP および EP3 受容体の局在を踏まえ、房水流出量に変化する

可能性について検討することとした。なお、薬剤の点眼はそれぞれの薬剤の眼圧下降のピーク時に合わせ、房水流出量の測定は latanoprost では点眼より 2 時間、sepetaprost では点眼より 4 時間後に行った。WT マウスにおける vehicle, 0.005 % latanoprost, 0.003 % sepetaprost および 0.01 % sepetaprost 点眼時の房水流出量は、それぞれ  $0.0027 \pm 0.0007$ ,  $0.0036 \pm 0.0008$ ,  $0.0034 \pm 0.0006$  および  $0.0040 \pm 0.0010$  ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mmHg}$ ) であり、vehicle 群に比較し、いずれの薬剤点眼群においても有意に高値を示した。なお、各薬剤間については差が認められなかった (Figure 29)。

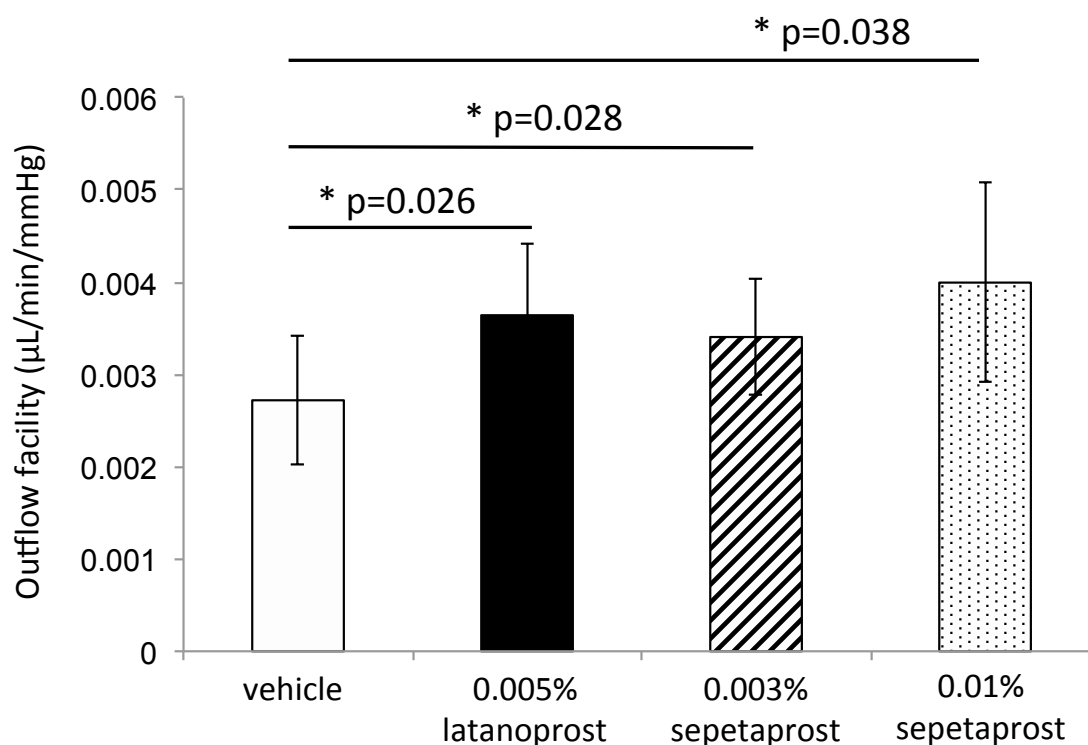


Figure 29 WT マウスにおける 0.005 % latanoprost、0.003 % および 0.01 % sepetaprost 点眼時の房水流出に対する作用

\* $p < 0.05$ ; vehicle 処置と薬剤処置との比較 (ANOVA および Dunnett's test,  $n=6-11$ )

#### 4-2-4-5 FP および EP3 受容体 KO マウス眼房水流出量に対する sepetaprost の作用

上記検討の結果、latanoprost および sepetaprost は WT マウスの房水流出量を増大させることが明らかになった。前述の通り sepetaprost は FP および EP3 受容体を介して眼圧下降させる可能性が示唆されたため、FP および EP3 受容体がマウス房水流出に及ぼす作用について受容体欠損マウスを用いて検討することとした。

まず FP 受容体 KO マウスに vehicle, 0.005 % latanoprost, 0.003 % sepetaprost および 0.01 % sepetaprost を点眼した 2 または 4 時間後の房水流出量は、vehicle, 0.005 % latanoprost, 0.003 % sepetaprost および 0.01 % sepetaprost でそれぞれ  $0.0032 \pm 0.0007$ ,  $0.0032 \pm 0.0006$ ,  $0.0031 \pm 0.0001$  および  $0.0030 \pm 0.0002$  ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mmHg}$ ) であり、vehicle 群に比べていずれの薬剤処置群においても差は認められなかった (Figure 30A) 。また、EP3 受容体 KO マウスに vehicle, 0.005% latanoprost, 0.003% sepetaprost および 0.01% sepetaprost を点眼した 2 または 4 時間後の房水流出量は、vehicle, 0.005 % latanoprost, 0.003 % sepetaprost および 0.01 % sepetaprost でそれぞれ  $0.0031 \pm 0.0011$ ,  $0.0038 \pm 0.0010$ ,  $0.0033 \pm 0.0010$  および  $0.0032 \pm 0.0010$  ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mmHg}$ ) であり、vehicle 群に比べていずれの薬剤処置群においても差は認められなかった (Figure 30B) 。

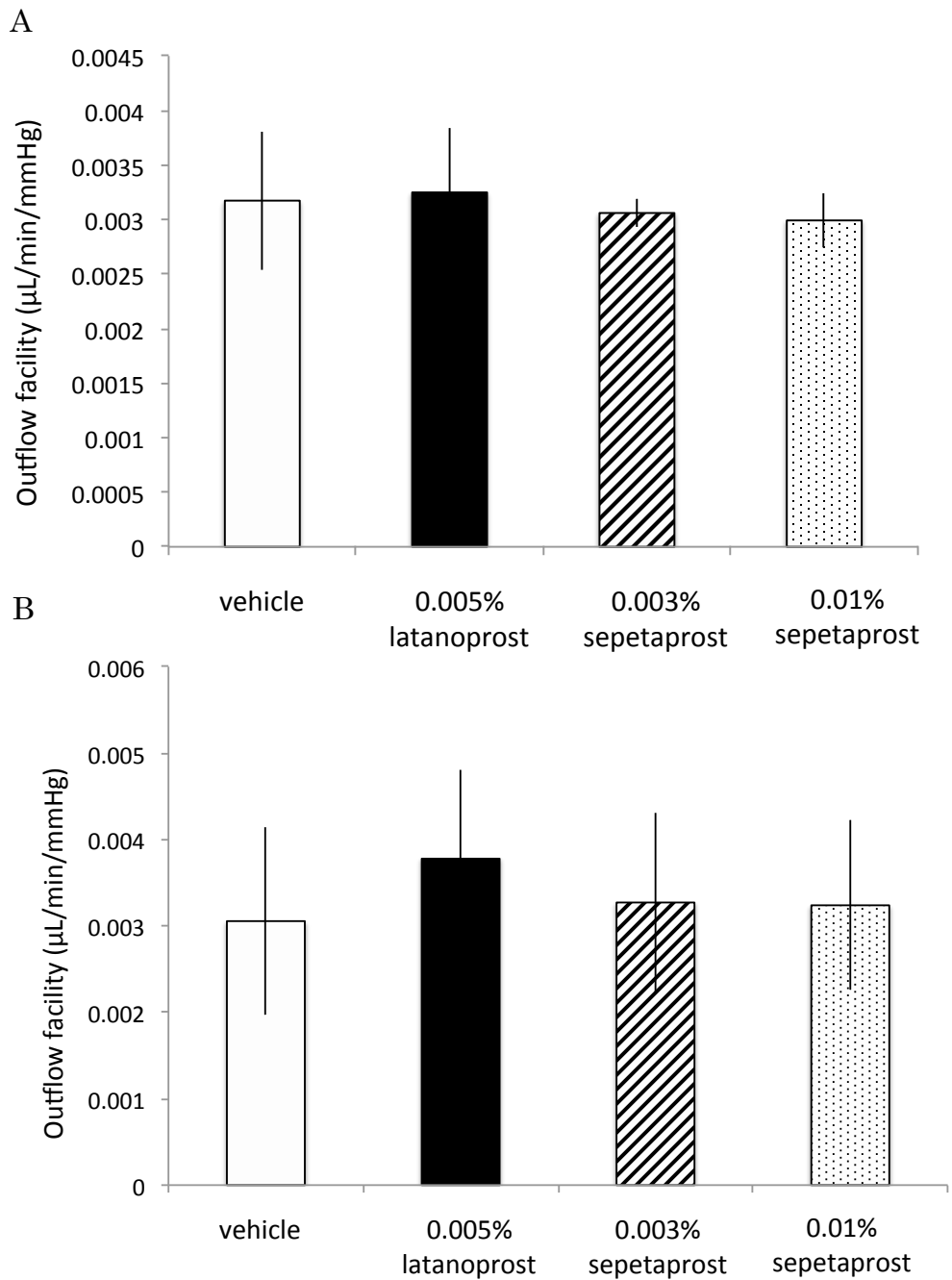


Figure 30 FP および EP3KO マウスにおける 0.005 % latanoprost、0.003 % および 0.01 % sepetaprost 点眼時の房水流出に対する作用

(A) FPKO マウスにおける各薬剤の房水流出量に対する作用 (n=6-11)、(B) EP3KO マウスにおける各薬剤の房水流出量に対する作用 (n=6-11)

#### 4-2-5 考察

本研究で、新規 FP/EP3 デュアルアゴニストである sepetaprost が顕著にマウス眼圧を下降させ、その作用は latanoprost と比較して作用持続時間が長いことが明らかになった (Figure 24)。また、既報によると、FP および EP3 受容体への親和性は  $K_i$  値で表すと、latanoprost でそれぞれ 98 および 7519 nM であり<sup>69</sup>、sepetaprost の活性代謝物ではそれぞれ 0.727 および 25 nM であった<sup>146</sup>。つまり、latanoprost よりも sepetaprost で FP 受容体への親和性が高いことが示されている。以上より、今回認められた 2 剤間での眼圧下降作用時間の差は、FP 受容体への親和性の違いに起因する可能性がある。現在まで、FP 受容体親和性と眼圧下降作用時間の関連性についての報告はないが、FP 受容体アゴニストに関連する興味深い報告があるので以下に示す。既報によると tafluprost は latanoprost に比べて FP および EP3 受容体への親和性が 10 倍程度高い化合物であり<sup>69, 95, 154</sup>、またマウス眼におけるピーク時の眼圧下降作用は latanoprost と同程度であったものの、眼圧下降作用時間の延長が認められており、tafluprost の AUC (IOP reduction %\*hr) の値は latanoprost より 2 倍程度高くなった<sup>155</sup>。また、travoprost も FP 受容体への親和性は latanoprost より高く<sup>69</sup>、マウス眼圧に対しても持続的な眼圧下降作用を示していた<sup>155</sup>。さらに、ヒトへ 14 日間 travoprost あるいは latanoprost を連続点眼した結果、travoprost の方が高い眼圧下降作用を示していた<sup>156</sup>。これらのことと Figure 24 で得られた結果を合わせて考えると、sepetaprost の持続的な眼圧下降作用は FP 受容体への高い親和性に起因する可能性が高いと推察した。しかしながら、FP 受容体への親和性と持続的な眼圧下降作用の機序や関連性について確かな結果は得られていないため、これらを明らかにすることは今後の検討課題と考えている。

一方、Figure 25 および 26 で示した通り、latanoprost の点眼 2h 後における眼圧下降作用は FPKO マウスで消失し、sepetaprost の点眼 2 および 6h 後における眼圧下降作用は FP および EP3 KO マウスで減弱していた。このことから、sepetaprost の持つ眼圧下降作用には、FP 受容体のみならず、EP3 受容体も関与していることが示唆された。これについては、既報によると latanoprost の持つ眼圧下降作用には二次的に内因性に産生された PG による EP3 受容体への刺激作用も関与するとの報告がいくつかされている。これは、NSAIDs 投与中患者へ latanoprost を投与するとその眼圧下降作用が弱まる<sup>53, 55, 56, 157</sup>、あるいはマウスへ NSAIDs を投与し各種 PG 関連薬を投与するとその眼圧下降作用が弱まり、また EP3KO マウスに投与すると WT より減弱するという結果に基づく<sup>48, 158</sup>。また、sepetaprost のピーク時および持続的な眼圧下降作用は FP および EP3 受容体 KO マウスで減弱したことから (Figure 25 および 26)、FP 受容体のみならず EP3 受容体も sepetaprost の眼圧下降作用に重要な役割を担うことが示唆された。これまで EP3 受容体が眼圧下降に寄与する直接的な報告はないため、本研究により初めて EP3 受容体が眼圧下降に関与する、ということが明らかにされた。しかしながら今回の結果では、EP3 受容体刺激 2h 後では単独刺激でマウス眼圧を変化させず (Figure 27)、刺激 6h 後では単独刺激で若干眼圧下降傾向が認められたものの、有意な変化は認められなかった (Figure 28)。このことから、EP3 受容体を単独刺激した場合においては、マウス眼圧に有意な変化を及ぼす可能性が低いと考えられる。つまり上記結果を合わせて考えると、EP3 単独刺激ではマウス眼圧を変化させず、FP 受容体と同時に刺激した場合にマウス眼圧に影響を及ぼすと推察された。

さらに sepetaprost の示す眼圧下降作用が、眼圧を制御する房水流出に作用するかについて検討した結果、latanoprost 同様に sepetaprost でも房水流出量を増大させるこ

とが明らかになった (Figure 29)。また、その作用はFP およびEP3KO マウスで消失することも合わせて明らかになっている (Figure 30)。この結果より、マウス眼の房水流出制御にFP およびEP3 受容体が作用することが初めて示された。加えて、latanorpsot および sepeteprost が、FP あるいは EP3 受容体を介して房水流出量を増大させている直接的な証拠を初めて示した報告となった。

FP およびEP3 受容体が房水動態に及ぼす作用については、これまで詳細な検討がなされていなかった。というのも、マウス眼での各受容体の局在について統一した見解がなされていないためである。既報によると、マウス眼での FP 受容体の局在は脈絡膜以外に眼内組織で存在することが一報でのみ示されており、EP3 受容体の局在については実験方法によって結果がまちまちであるのが現状である。例えば、*in situ hybridization* での結果では毛様体に EP3 受容体は存在しないという報告や<sup>159</sup>、免疫染色の結果から毛様体非色素上皮細胞にわずかに存在するという報告があり<sup>160</sup>、統一した見解が存在しない。いずれにしても、マウスの眼球が小さいが故、各眼組織での受容体局在を証明することが極めて困難であり、現時点では明確な見解は得られていない。従って、眼圧下降のターゲットとして開発されてきていない EP3 受容体が、単独で房水動態へどのように関与しているかは不明であった。しかしながら今回の研究より、EP3 受容体単独ではなく、FP 受容体と同時に刺激した場合については、眼圧下降作用を持続、言い換えれば増強する方向に働くという結果が得られた。このことについて、既報によると FP 受容体刺激は Gq タンパクと共役する G タンパク共役型受容体を介して、ホスホリパーゼ C の活性化によるイノシトール三リン酸 (Inositol trisphosphate; IP3) およびジアシルグリセロール上昇の結果、細胞内  $Ca^{2+}$  を上昇させる<sup>161</sup>。また、EP3 受容体刺激は、Gi タンパクと共役し cAMP 産生を抑制することがわか



っている<sup>162</sup>。さらに、ヒトやマウスにおいて EP3 受容体には C 末端側のスプライシングの違いにより isoform が複数存在することが報告されている<sup>162-165</sup>。マウスの場合には EP3  $\alpha$ - $\gamma$  の isoform が確認されており<sup>162, 165</sup>、受容体に共役する G タンパクは Gi/G12 あるいは Gs ということがわかっている<sup>166</sup>。また、その作用を示すシグナルは EP3  $\alpha$  と  $\beta$  に関しては cAMP 抑制、IP3/Ca<sup>2+</sup> の上昇、Rho 活性であるのに対して<sup>167, 168</sup>、EP3  $\gamma$  では cAMP 抑制、IP3/Ca<sup>2+</sup> の上昇、cAMP 上昇ということが明らかになっている<sup>169</sup>。これらに加えて別の報告では、CHO 細胞に EP3 受容体のみを発現させた場合、cAMP 産生を抑制するが、COS-7 細胞や P-815 細胞に Gs タンパクを介して cAMP 産生増大作用をもつ EP2 または EP4 にそれぞれ EP3 受容体を共発現させた実験の結果、cAMP 産生が EP2 または EP4 単独の場合より強くなる結果が報告されている<sup>170, 171</sup>。このように基本的には EP3 受容体が刺激を受けると Gi を介して cAMP 産生抑制作用を発揮するが、EP3 受容体が存在する環境に応じて異なる isoform が作用することにより、種々の刺激により活性を示すシグナルが変化する可能性が考えられ、今後さらなる検討が必要である。

以上より、私はマウス眼において sepetaprost は既存薬の主として FP アゴニストとして働く PG 関連薬に比較して強力、かつ持続的な眼圧下降作用を発揮することを明らかにした。また、その眼圧下降作用には、FP 受容体および EP3 受容体が関与することもわかった。今後、FP/EP3 受容体 dual アゴニストである sepetaprost は緑内障治療において有用な薬剤になる可能性が示唆された。

## 第五章 総合討論

緑内障は重篤かつ不可逆的な視機能障害をもたらす疾患であり、40歳以上の5%前後が罹患しているとされ、推定患者数は460万人にも上り、失明原因の第一位となっている（緑内障診療ガイドライン）。また、発症初期においては自覚症状が乏しいため、未治療の患者が多数存在すると考えられている。緑内障は死に至る疾患ではないものの、人間の生命活動のために外界から得ている情報のおよそ80%は視覚を介するため、視野を失うことはQOLに著しい影響を及ぼすと考えられる。このことから、緑内障の進行を止めることは患者のQOL維持に直結することとなる。

緑内障治療において、緑内障は進行性疾患であることから、継続可能な長期治療や定期的観察が必須であるが、自覚症状が乏しいためアドヒアランスの維持が課題となっている<sup>172-178</sup>。さらに、このアドヒアランスの維持が、緑内障治療の成否を左右するが、現状アドヒアランスは医療者側が考えるよりはるかに悪いことが報告されている<sup>172</sup>。このアドヒアランス不良の要因としては、患者の生活上の問題や不規則な生活スタイルなど、患者側の生活および環境上の問題、医療費や薬剤の副作用、複雑な治療など治療上の問題、さらに他疾患の合併や患者の理解不足など患者側の問題、そして患者とのコミュニケーション不足など医療者側の問題などが挙げられる。そのため、治療には単発的な眼圧下降のみならず、副作用や使用感なども含め、総合的、多角的に捉えた治療方針が求められる。

上記を踏まえ、本研究ではよりよい緑内障治療薬の開発を目指すため、まずこれまで詳細が不明であったFP受容体を介した眼圧制御のメカニズム解明を目的に、既存のPG製剤の持つ眼圧下降作用機序を足がかりとするための検討を行った。その結果、野生型とFPKOマウスの間で、通常状態の眼圧に差が認められなかったものの、PG投与により惹起した一過性眼圧上昇は、野生型に比較してFPKOマウスで上昇の程

度が高いことが明らかになった。また、FPKO マウスで増大した眼圧上昇は、NSAIDs の前処置により減弱することも併せて明らかになった。このことから PG 製剤の作用点である FP 受容体は、眼圧の異常な上昇に対し、眼圧を下げる方向へ働く可能性を示した。さらに、その作用は cox を介する作用であることが示唆されており、PG 刺激により内因性 PG 産生が眼圧調節に寄与することも併せて明らかになった。これらの結果により、これまで外的に投与した場合でのみ作用を示すとされていた FP 受容体の、通常状態における働きの一部を解明するに至った。しかしながら、FP 受容体以外のプロスタノイド受容体の関与については、今回の検討では結論付けることができなかったため、今後は PG の FP 受容体以外の作用点である各 EP 受容体やプロスタノイド受容体以外の眼圧制御に関わる因子について、検討することが必須であると考えている。それと併せて、通常状態での眼圧制御のメカニズムを解明することが、緑内障の病態を理解する上で極めて重要であり、その結果、新しい治療薬の発見および開発に繋がると考えている。

続いて、より良い緑内障治療薬の開発を目的として、副作用の面から PG 製剤について検討した。長期使用が必須である緑内障治療には、治療を続けることが重要な役割を果たす。治療を継続するにあたり、眼圧下降効果が高い薬剤であっても、使用によって生じる副作用や使用感の不良が治療継続を阻む要因となりうる。PG 製剤による有害事象発生を減らすことができれば、新たな緑内障治療薬の開発のブレークスルーにつながると考えられる。現行の PG 製剤は、点眼使用時の全身性への副作用が極めて低いものの、局所的かつ特異的な副作用発生が報告されている。今回はその中でも DUES 発生に焦点を当て、脂肪細胞を用いて検討した。その結果、DUES 発症は脂肪細胞が産生する脂肪滴の大きさが関与する可能性が高く、その産生には FP 受容

体の刺激作用の寄与が大きいことが示された。さらに、FPKO マウスから単離した脂肪細胞を用いた検討により、FPKO マウスからの脂肪細胞は、FP 受容体を刺激しても明らかな脂肪滴産生が認められなかったことから、脂肪細胞による脂肪滴産生には FP 受容体刺激作用が深く関わるということが明らかにされた。このように、FP 受容体は刺激を受けることで高い眼圧下降作用を示すと同時に、DUES をも発症する可能性が示唆された。これには FP 受容体への親和性が関与することが示唆されたが、現時点では、薬剤の分解、組織浸透性、組織中薬物濃度についても解明されていないことが残っているため、単純に化合物の FP 受容体への親和性のみで、基礎研究と臨床研究との相関を結論付けることは困難である。今後は、化合物の FP 受容体への親和性と併せて、組織中薬物濃度や組織への浸透性や分解についても検討し、総合的に DUES 発症原因を突き止め、使用し続けやすい治療薬の開発に繋げることが患者 QOL を守ることになるだろうと考えている。

次に、PG 製剤の眼圧下降作用以外の副次的な効能として、緑内障発症や進行に影響を及ぼす RGC 細胞死に対する保護作用について検討した。その結果、現行の PG 製剤は、様々なストレス負荷下で生じる RGC 細胞死および apoptosis を抑制する効果を示した。この細胞死抑制作用は、FP 受容体刺激を介する可能性が高いと考えているが、本研究では、FP 受容体刺激作用の強さと RGC 細胞死抑制効果との相関は認められなかった。このことは、PG 製剤の持つ FP 受容体以外のプロスタノイド受容体に対する作用からくる結果であるのか、それとも、PG 製剤の FP 受容体刺激作用以外の構造活性相関から生じる結果なのか、現段階では不明である。今後は、RGC 細胞死抑制効果と様々な FP 受容体アゴニストとの構造活性相関について検討することで、眼圧非依存的な神経保護作用を有する、治療効果の高い緑内障治療薬の開発につ

ながると考えている。また、EP 受容体についても RGC 細胞死保護作用について詳細に検討することで、FP 受容体への親和性が高い現行の PG 製剤だけでなく、EP 受容体刺激作用を併せ持つ薬剤の開発の可能性について示唆することができると考えている。

最後に、FP/EP3 受容体刺激作用を有する *sepetaprost* の新規緑内障治療薬としての可能性についてマウス眼を用いて検討した結果、最大眼圧下降は既存の FP 受容体アゴニストである *latanoprost* と同程度であり、眼圧下降持続時間は延長することが明らかとなった。この持続的な眼圧下降作用は、長期安定した低値の眼圧の維持、あるいは点眼回数の低減に繋げることが出来、より安定した眼圧下降作用を示し、点眼回数が少なくなることで患者の負担の少ない治療薬の開発に繋げることが可能になると考える。さらに今回の検討から、*sepetaprost* の示す持続的な眼圧下降、そして房水流出量増大作用には、FP および EP3 受容体が関与する可能性が示された。このことは、眼圧下降あるいは房水流出に、EP3 受容体が関与することを初めて示す結果となった。EP3 受容体の眼圧に及ぼすメカニズムについては、受容体の局在含め、詳細については不明な点が多いため、今後 EP3 受容体の眼圧作用機序に及ぼす作用について、引き続き検討していく必要があると考えている。いずれにせよ、*sepetaprost* のように、FP 受容体以外に対する作用を併せ持つことが、新たな眼圧下降薬として有用である可能性が示唆されたため、今後は強力な眼圧下降作用を示す FP 受容体刺激だけでなく、眼圧下降に関与する他の因子についても検討していくことで、より眼圧下降効果の高い、かつ患者負担の少ない治療薬の開発に繋がるだろうと考えている。

本研究により、プロスタノイド FP 受容体の眼圧制御に及ぼす作用についての一部を解明することが出来た。また、局所的副作用である DUES や眼圧非依存的な神経保

護作用に FP 受容体が関与することが明らかとなった。このように、眼圧制御メカニズムを解明することは、緑内障治療の新たな薬剤開発に繋がると考えられる。また、より副作用が少ない、かつ眼圧因子以外からの観点での治療薬開発を進めることが、既存の緑内障治療をより良いものへと発展させることができるといえる。このように、より良い緑内障治療薬の開発が、将来の失明者を減らし、患者 QOL の飛躍的な改善に繋がると考えているため、今後も引き続き検討を続け、より良い医療の提供を目指したい。

## 参考文献

1. The Japan Glaucoma Society Guidelines for Glaucoma (4th Edition). *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2018;122:3-51.
2. Suzuki Y, Yamamoto T, Araie M, et al. [Tajimi Study review]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2008;112:1039-1058.
3. Iwase A, Suzuki Y, Araie M, et al. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology* 2004;111:1641-1648.
4. Suzuki Y, Iwase A, Araie M, et al. Risk factors for open-angle glaucoma in a Japanese population: the Tajimi Study. *Ophthalmology* 2006;113:1613-1617.
5. Yamamoto T, Iwase A, Araie M, et al. The Tajimi Study report 2: prevalence of primary angle closure and secondary glaucoma in a Japanese population. *Ophthalmology* 2005;112:1661-1669.
6. Krupin T. Physiologic basis of aqueous humor formation. *The Glaucomas* 1996;251-280.
7. Morizane Y, Morimoto N, Fujiwara A, et al. Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn J Ophthalmol* 2018.
8. Ismail R, Azuara-Blanco A, Ramsay CR. Variation of clinical outcomes used in glaucoma randomised controlled trials: a systematic review. *Br J Ophthalmol* 2014;98:464-468.
9. De Moraes CG, Liebmann JM, Levin LA. Detection and measurement of clinically meaningful visual field progression in clinical trials for glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2017;56:107-147.
10. The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 1998;126:498-505.
11. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal-Tension



- Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol* 1998;126:487-497.
12. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am J Ophthalmol* 2000;130:429-440.
  13. Chauhan BC, Mikelberg FS, Balaszi AG, et al. Canadian Glaucoma Study: 2. risk factors for the progression of open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2008;126:1030-1036.
  14. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA* 2014;311:1901-1911.
  15. 坂田 礼. 緑内障薬物治療の進歩-過去、現在、そして未来へ: 医歯薬出版株式会社; 2017.
  16. Camras CB, Bito LZ, Eakins KE. Reduction of intraocular pressure by prostaglandins applied topically to the eyes of conscious rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:1125-1134.
  17. Resul B, Stjernschantz J, No K, et al. Phenyl-substituted prostaglandins: potent and selective antiglaucoma agents. *J Med Chem* 1993;36:243-248.
  18. Nomura S, Hashimoto M. [Pharmacological profiles of latanoprost (Xalatan), a novel anti-glaucoma drug]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2000;115:280-286.
  19. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1978;30:293-331.
  20. Narumiya S, Furuyashiki T. Fever, inflammation, pain and beyond: prostanoid receptor research during these 25 years. *FASEB J* 2011;25:813-818.
  21. Saeki T, Ota T, Aihara M, Araie M. Effects of prostanoid EP agonists on mouse intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2201-2208.
  22. Ocklind A. Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections. *Exp Eye Res* 1998;67:179-191.
  23. Weinreb RN. Enhancement of scleral macromolecular permeability

- with prostaglandins. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2001;99:319-343.
24. Mishima HK, Kiuchi Y, Takamatsu M, Rácz P, Bito LZ. Circadian intraocular pressure management with latanoprost: diurnal and nocturnal intraocular pressure reduction and increased uveoscleral outflow. *Surv Ophthalmol* 1997;41 Suppl 2:S139-144.
  25. Nilsson SF, Samuelsson M, Bill A, Stjernschantz J. Increased uveoscleral outflow as a possible mechanism of ocular hypotension caused by prostaglandin F<sub>2</sub> alpha-1-isopropylester in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* 1989;48:707-716.
  26. Alm A, Stjernschantz J. Effects on intraocular pressure and side effects of 0.005% latanoprost applied once daily, evening or morning. A comparison with timolol. Scandinavian Latanoprost Study Group. *Ophthalmology* 1995;102:1743-1752.
  27. Aptel F, Cucherat M, Denis P. Efficacy and tolerability of prostaglandin analogs: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J Glaucoma* 2008;17:667-673.
  28. Alm A. Latanoprost in the treatment of glaucoma. *Clin Ophthalmol* 2014;8:1967-1985.
  29. Rácz P, Ruzsonyi MR, Nagy ZT, Bito LZ. Maintained intraocular pressure reduction with once-a-day application of a new prostaglandin F<sub>2</sub> alpha analogue (PhXA41). An in-hospital, placebo-controlled study. *Arch Ophthalmol* 1993;111:657-661.
  30. Camras CB, Siebold EC, Lustgarten JS, et al. Maintained reduction of intraocular pressure by prostaglandin F<sub>2</sub> alpha-1-isopropyl ester applied in multiple doses in ocular hypertensive and glaucoma patients. *Ophthalmology* 1989;96:1329-1336; discussion 1336-1327.
  31. Alm A. Prostaglandin derivatives as ocular hypotensive agents. *Prog Retin Eye Res* 1998;17:291-312.
  32. Custer PL, Kent TL. Observations on prostaglandin orbitopathy. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2016;32:102-105.
  33. Bearden W, Anderson R. Trichiasis associated with prostaglandin analog use. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2004;20:320-322.
  34. Sharpe ED, Reynolds AC, Skuta GL, Jenkins JN, Stewart WC. The clinical impact and incidence of periocular pigmentation associated

- with either latanoprost or bimatoprost therapy. *Curr Eye Res* 2007;32:1037-1043.
35. Wistrand PJ, Stjernschantz J, Olsson K. The incidence and time-course of latanoprost-induced iridial pigmentation as a function of eye color. *Surv Ophthalmol* 1997;41 Suppl 2:S129-138.
  36. Stjernschantz J, Alm A. Latanoprost as a new horizon in the medical management of glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 1996;7:11-17.
  37. Inoue K, Shiokawa M, Wakakura M, Tomita G. Deepening of the upper eyelid sulcus caused by 5 types of prostaglandin analogs. *J Glaucoma* 2013;22:626-631.
  38. Aihara M, Shirato S, Sakata R. Incidence of deepening of the upper eyelid sulcus after switching from latanoprost to bimatoprost. *Jpn J Ophthalmol* 2011;55:600-604.
  39. Sakata R, Shirato S, Miyata K, Aihara M. Incidence of deepening of the upper eyelid sulcus in prostaglandin-associated periorbitopathy with a latanoprost ophthalmic solution. *Eye (Lond)* 2014;28:1446-1451.
  40. Sakata R, Shirato S, Miyata K, Aihara M. Incidence of deepening of the upper eyelid sulcus on treatment with a tafluprost ophthalmic solution. *Jpn J Ophthalmol* 2014;58:212-217.
  41. Filippopoulos T, Paula JS, Torun N, Hatton MP, Pasquale LR, Grosskreutz CL. Periorbital changes associated with topical bimatoprost. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2008;24:302-307.
  42. Sakata R, Shirato S, Miyata K, Aihara M. Recovery from deepening of the upper eyelid sulcus after switching from bimatoprost to latanoprost. *Jpn J Ophthalmol* 2013;57:179-184.
  43. Miki T, Naito T, Fujiwara M, et al. Effects of pre-surgical administration of prostaglandin analogs on the outcome of trabeculectomy. *PLoS One* 2017;12:e0181550.
  44. Shah M, Lee G, Lefebvre DR, et al. A cross-sectional survey of the association between bilateral topical prostaglandin analogue use and ocular adnexal features. *PLoS One* 2013;8:e61638.
  45. Krupin T, Liebmann JM, Greenfield DS, Ritch R, Gardiner S, Group L-PGS. A randomized trial of brimonidine versus timolol in preserving

- visual function: results from the Low-Pressure Glaucoma Treatment Study. *Am J Ophthalmol* 2011;151:671-681.
46. Anggard E, Samuelsson B. Smooth muscle stimulationg lipids in sheep iris. The identification of prostaglandin F2a. Prostaglandins and related factors 21. *Biochem Pharmacol* 1964;13:281-283.
  47. Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, Narumiya S. Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* 1997;122:217-224.
  48. Ota T, Aihara M, Saeki T, Narumiya S, Araie M. The IOP-lowering effects and mechanism of action of tafluprost in prostanoid receptor-deficient mice. *Br J Ophthalmol* 2007;91:673-676.
  49. Crowston JG, Lindsey JD, Morris CA, Wheeler L, Medeiros FA, Weinreb RN. Effect of bimatoprost on intraocular pressure in prostaglandin FP receptor knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4571-4577.
  50. Crowston JG, Lindsey JD, Aihara M, Weinreb RN. Effect of latanoprost on intraocular pressure in mice lacking the prostaglandin FP receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3555-3559.
  51. Ota T, Aihara M, Narumiya S, Araie M. The effects of prostaglandin analogues on IOP in prostanoid FP-receptor-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4159-4163.
  52. Camras CB, Podos SM. The role of endogenous prostaglandins in clinically-used and investigational glaucoma therapy. *Prog Clin Biol Res* 1989;312:459-475.
  53. Turan-Vural E, Torun-Acar B, Acar S. Effect of ketorolac add-on treatment on intra-ocular pressure in glaucoma patients receiving prostaglandin analogues. *Ophthalmologica* 2012;227:205-209.
  54. Yousufzai SY, Ye Z, Abdel-Latif AA. Prostaglandin F2 alpha and its analogs induce release of endogenous prostaglandins in iris and ciliary muscles isolated from cat and other mammalian species. *Exp Eye Res* 1996;63:305-310.
  55. Chiba T, Kashiwagi K, Chiba N, Tsukahara S. Effect of non-steroidal anti-inflammatory ophthalmic solution on intraocular pressure

- reduction by latanoprost in patients with primary open angle glaucoma or ocular hypertension. *Br J Ophthalmol* 2006;90:314-317.
56. Kashiwagi K, Tsukahara S. Effect of non-steroidal anti-inflammatory ophthalmic solution on intraocular pressure reduction by latanoprost. *Br J Ophthalmol* 2003;87:297-301.
  57. Crawford KS, Kaufman PL. Dose-related effects of prostaglandin F2 alpha isopropylester on intraocular pressure, refraction, and pupil diameter in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:510-519.
  58. Gabelt BT, Kaufman PL. Prostaglandin F2 alpha increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* 1989;49:389-402.
  59. Acar U, Yıldız EH, Ergintürk Acar D, et al. Posttraumatic intraocular pressure elevation and associated factors in patients with zone I open globe injuries. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2013;19:115-118.
  60. Mao Z, Chen XB, Zhong YM, Guo XX, Liu X. Damage to the blood-aqueous barrier in ocular blunt trauma and its association with intraocular pressure elevation. *Ophthalmic Res* 2016;56:92-97.
  61. Paterson CA, Eakins KE, Paterson E, Jenkins RM, Ishikawa R. The ocular hypertensive response following experimental acid burns in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:67-74.
  62. Perkins ES. Prostaglandins and ocular trauma. *Adv Ophthalmol* 1977;34:149-152.
  63. Hayashi K, Yoshida M, Manabe SI, Yoshimura K. Prophylactic effect of oral acetazolamide against intraocular pressure elevation after cataract surgery in eyes with glaucoma. *Ophthalmology* 2017;124:701-708.
  64. Lu J, English R, Nadelstein B, et al. Comparison of topically applied flurbiprofen or bromfenac ophthalmic solution on post-operative ocular hypertension in canine patients following cataract surgery. *Vet Ophthalmol* 2017;20:107-113.
  65. Matusow RB, Herring IP, Pickett JP, Henao-Guerrero N, Werre SR. Effects of perioperative topical dorzolamide hydrochloride-timolol maleate administration on incidence and severity of postoperative ocular hypertension in dogs undergoing cataract extraction by

- phacoemulsification. *J Am Vet Med Assoc* 2016;249:1040-1052.
66. Podos SM. Effect of dipyridamole on prostaglandin-induced ocular hypertension in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:646-648.
67. Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, et al. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 1997;277:681-683.
68. Ushikubi F, Sugimoto Y, Ichikawa A, Narumiya S. Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors. *Jpn J Pharmacol* 2000;83:279-285.
69. Sharif NA, Kelly CR, Crider JY, Williams GW, Xu SX. Ocular hypotensive FP prostaglandin (PG) analogs: PG receptor subtype binding affinities and selectivities, and agonist potencies at FP and other PG receptors in cultured cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003;19:501-515.
70. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Reduction of intraocular pressure in mouse eyes treated with latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:146-150.
71. Tsuboi K, Sugimoto Y, Iwane A, Yamamoto K, Yamamoto S, Ichikawa A. Uterine expression of prostaglandin H2 synthase in late pregnancy and during parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice. *Endocrinology* 2000;141:315-324.
72. Yam JC, Yuen NS, Chan CW. Bilateral deepening of upper lid sulcus from topical bimatoprost therapy. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25:471-472.
73. Jayaprakasam A, Ghazi-Nouri S. Periorbital fat atrophy - an unfamiliar side effect of prostaglandin analogues. *Orbit* 2010;29:357-359.
74. Park J, Cho HK, Moon JI. Changes to upper eyelid orbital fat from use of topical bimatoprost, travoprost, and latanoprost. *Jpn J Ophthalmol* 2011;55:22-27.
75. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;104:531-543.
76. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548-2556.
77. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell

- turnover in humans. *Nature* 2008;453:783-787.
78. Arner P. Fat tissue growth and development in humans. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2018;89:37-45.
  79. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 2004;10:355-361.
  80. Fujimori K, Aritake K, Urade Y. A novel pathway to enhance adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by up-regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase mediated by liver X receptor-activated sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 2007;282:18458-18466.
  81. Miller CW, Casimir DA, Ntambi JM. The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F<sub>2</sub>alpha. *Endocrinology* 1996;137:5641-5650.
  82. Choi HY, Lee JE, Lee JW, Park HJ, Jung JH. In vitro study of antiadipogenic profile of latanoprost, travoprost, bimatoprost, and tafluprost in human orbital preadipocytes. *J Ocul Pharmacol Ther* 2012;28:146-152.
  83. Seibold LK, Ammar DA, Kahook MY. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity in vitro. *Curr Eye Res* 2013;38:70-74.
  84. Reed BC, Lane MD. Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:285-289.
  85. Woodward DF, Krauss AH, Chen J, et al. The pharmacology of bimatoprost (Lumigan). *Surv Ophthalmol* 2001;45 Suppl 4:S337-345.
  86. Hellberg MR, Sallee VL, McLaughlin MA, et al. Preclinical efficacy of travoprost, a potent and selective FP prostaglandin receptor agonist. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001;17:421-432.
  87. Liang Y, Woodward DF, Guzman VM, et al. Identification and pharmacological characterization of the prostaglandin FP receptor and FP receptor variant complexes. *Br J Pharmacol* 2008;154:1079-1093.
  88. Tsuruma K, Tanaka Y, Shimazawa M, Mashima Y, Hara H. Unoprostone reduces oxidative stress- and light-induced retinal cell

- death, and phagocytotic dysfunction, by activating BK channels. *Mol Vis* 2011;17:3556-3565.
89. Yu L, Eaton AF, Yue Q, et al. Unoprostone activation of BK (KCa1.1) channel splice variants. *Biochim Biophys Acta* 2015;1848:2859-2867.
  90. Cuppoletti J, Malinowska DH, Tewari KP, Chakrabarti J, Ueno R. Unoprostone isopropyl and metabolite M1 activate BK channels and prevent ET-1-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increases in human trabecular meshwork and smooth muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:5178-5189.
  91. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975;5:19-27.
  92. Cheng JW, Cai JP, Wei RL. Meta-analysis of medical intervention for normal tension glaucoma. *Ophthalmology* 2009;116:1243-1249.
  93. van der Valk R, Webers CA, Lumley T, Hendrikse F, Prins MH, Schouten JS. A network meta-analysis combined direct and indirect comparisons between glaucoma drugs to rank effectiveness in lowering intraocular pressure. *J Clin Epidemiol* 2009;62:1279-1283.
  94. Sharif NA, Crider JY, Husain S, Kaddour-Djebbar I, Ansari HR, Abdel-Latif AA. Human ciliary muscle cell responses to FP-class prostaglandin analogs: phosphoinositide hydrolysis, intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization and MAP kinase activation. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003;19:437-455.
  95. Takagi Y, Nakajima T, Shimazaki A, et al. Pharmacological characteristics of AFP-168 (tafluprost), a new prostanoid FP receptor agonist, as an ocular hypotensive drug. *Exp Eye Res* 2004;78:767-776.
  96. Smid SD. Role of prostaglandins and specific place in therapy of bimatoprost in the treatment of elevated intraocular pressure and ocular hypertension: A closer look at the agonist properties of bimatoprost and the prostamides. *Clin Ophthalmol* 2009;3:663-670.
  97. Faulkner R, Sharif NA, Orr S, et al. Aqueous humor concentrations of bimatoprost free acid, bimatoprost and travoprost free acid in cataract surgical patients administered multiple topical ocular doses of LUMIGAN or TRAVATAN. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010;26:147-156.



98. Hellberg MR, Ke TL, Haggard K, Klimko PG, Dean TR, Graff G. The hydrolysis of the prostaglandin analog prodrug bimatoprost to 17-phenyl-trinor PGF<sub>2</sub>α by human and rabbit ocular tissue. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003;19:97-103.
99. Kanamori A, Naka M, Fukuda M, Nakamura M, Negi A. Latanoprost protects rat retinal ganglion cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Exp Eye Res* 2009;88:535-541.
100. Kudo H, Nakazawa T, Shimura M, et al. Neuroprotective effect of latanoprost on rat retinal ganglion cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:1003-1009.
101. Vidal L, Díaz F, Villena A, Moreno M, Campos JG, Pérez de Vargas I. Reaction of Müller cells in an experimental rat model of increased intraocular pressure following timolol, latanoprost and brimonidine. *Brain Res Bull* 2010;82:18-24.
102. Hernández M, Urcola JH, Vecino E. Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine, latanoprost or combined treatments. *Exp Eye Res* 2008;86:798-806.
103. Uchida S, Suzuki Y, Araie M, Kashiwagi K, Otori Y, Sakuragawa N. Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells. *Neurosci Lett* 2003;341:1-4.
104. Otori Y, Wei JY, Barnstable CJ. Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:972-981.
105. Chen YN, Yamada H, Mao W, Matsuyama S, Aihara M, Araie M. Hypoxia-induced retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of beta-adrenergic antagonists. *Brain Res* 2007;1148:28-37. Epub 2007 Feb 22.
106. Schutte B, Nuydens R, Geerts H, Ramaekers F. Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J Neurosci Methods* 1998;86:63-69.
107. Tezel G, Yang X. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4049-4059.
108. Emre S, Gul M, Ates B, et al. Comparison of the protective effects of prostaglandin analogues in the ischemia and reperfusion model of

- rabbit eyes. *Exp Anim* 2009;58:505-513.
109. Kurashima H, Watabe H, Sato N, Abe S, Ishida N, Yoshitomi T. Effects of prostaglandin F(2 $\alpha$ ) analogues on endothelin-1-induced impairment of rabbit ocular blood flow: comparison among tafluprost, travoprost, and latanoprost. *Exp Eye Res* 2010;91:853-859.
110. Akaishi T, Kurashima H, Odani-Kawabata N, Ishida N, Nakamura M. Effects of repeated administrations of tafluprost, latanoprost, and travoprost on optic nerve head blood flow in conscious normal rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010;26:181-186.
111. Cantor LB, Hoop J, Wudunn D, et al. Levels of bimatoprost acid in the aqueous humour after bimatoprost treatment of patients with cataract. *Br J Ophthalmol* 2007;91:629-632.
112. Cuppoletti J, Malinowska DH, Tewari KP, Chakrabarti J, Ueno R. Cellular and molecular effects of unoprostone as a BK channel activator. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:1083-1092.
113. Hutchinson AJ, Chou CL, Israel DD, Xu W, Regan JW. Activation of EP2 prostanoid receptors in human glial cell lines stimulates the secretion of BDNF. *Neurochem Int* 2009;54:439-446.
114. Lee EO, Shin YJ, Chong YH. Mechanisms involved in prostaglandin E2-mediated neuroprotection against TNF- $\alpha$ : possible involvement of multiple signal transduction and beta-catenin/T-cell factor. *J Neuroimmunol* 2004;155:21-31.
115. Jiang J, Ganesh T, Du Y, et al. Neuroprotection by selective allosteric potentiators of the EP2 prostaglandin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:2307-2312.
116. Liu D, Wu L, Breyer R, Mattson MP, Andreasson K. Neuroprotection by the PGE2 EP2 receptor in permanent focal cerebral ischemia. *Ann Neurol* 2005;57:758-761.
117. McCullough L, Wu L, Haughey N, et al. Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci* 2004;24:257-268.
118. Mohan S, Narumiya S, Doré S. Neuroprotective role of prostaglandin PGE2 EP2 receptor in hemin-mediated toxicity. *Neurotoxicology* 2015;46:53-59.

119. Bilak M, Wu L, Wang Q, et al. PGE<sub>2</sub> receptors rescue motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2004;56:240-248.
120. Jiang J, Dingledine R. Prostaglandin receptor EP<sub>2</sub> in the crosshairs of anti-inflammation, anti-cancer, and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci* 2013;34:413-423.
121. Echeverria V, Clerman A, Doré S. Stimulation of PGE receptors EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following beta-amyloid exposure. *Eur J Neurosci* 2005;22:2199-2206.
122. Ahmad AS, Zhuang H, Echeverria V, Doré S. Stimulation of prostaglandin EP<sub>2</sub> receptors prevents NMDA-induced excitotoxicity. *J Neurotrauma* 2006;23:1895-1903.
123. Tian X, Ji C, Luo Y, et al. PGE<sub>2</sub>-EP<sub>3</sub> signaling pathway contributes to protective effects of misoprostol on cerebral injury in APP/PS1 mice. *Oncotarget* 2016;7:25304-25314.
124. Pradhan SS, Salinas K, Garduno AC, et al. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of PGE. *J Neuroimmune Pharmacol* 2017;12:292-304.
125. Akram A, Gibson CL, Grubb BD. Neuroprotection mediated by the EP<sub>4</sub> receptor avoids the detrimental side effects of COX-2 inhibitors following ischaemic injury. *Neuropharmacology* 2013;65:165-172.
126. Ahmad AS, Ahmad M, de Brum-Fernandes AJ, Doré S. Prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor agonist protects against acute neurotoxicity. *Brain Res* 2005;1066:71-77.
127. Zhao X, Wu T, Chang CF, et al. Toxic role of prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>1</sub> after intracerebral hemorrhage in mice. *Brain Behav Immun* 2015;46:293-310.
128. Carlson NG, Rojas MA, Black JD, et al. Microglial inhibition of neuroprotection by antagonists of the EP<sub>1</sub> prostaglandin E<sub>2</sub> receptor. *J Neuroinflammation* 2009;6:5.
129. Zhen G, Kim YT, Li RC, et al. PGE<sub>2</sub> EP<sub>1</sub> receptor exacerbated neurotoxicity in a mouse model of cerebral ischemia and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2012;33:2215-2219.

130. Kawano T, Anrather J, Zhou P, et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med* 2006;12:225-229.
131. Van Bergen NJ, Wood JP, Chidlow G, et al. Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:4267-4272. Epub 2009 May 4214.
132. Ohashi M, Mayama C, Ishii K, Araie M. Effects of topical travoprost and unoprostone on optic nerve head circulation in normal rabbits. *Curr Eye Res* 2007;32:743-749.
133. Alagoz G, Gürel K, Bayer A, Serin D, Celebi S, Kukner S. A comparative study of bimatoprost and travoprost: effect on intraocular pressure and ocular circulation in newly diagnosed glaucoma patients. *Ophthalmologica* 2008;222:88-95.
134. Koz OG, Ozsoy A, Yarangumeli A, Kose SK, Kural G. Comparison of the effects of travoprost, latanoprost and bimatoprost on ocular circulation: a 6-month clinical trial. *Acta Ophthalmol Scand* 2007;85:838-843.
135. Harris A, Garzozzi HJ, McCranor L, Rechtman E, Yung CW, Siesky B. The effect of latanoprost on ocular blood flow. *Int Ophthalmol* 2009;29:19-26.
136. Inan UU, Ermis SS, Yücel A, Oztürk F. The effects of latanoprost and brimonidine on blood flow velocity of the retrobulbar vessels: a 3-month clinical trial. *Acta Ophthalmol Scand* 2003;81:155-160.
137. Gherghel D, Hosking SL, Cunliffe IA, Armstrong RA. First-line therapy with latanoprost 0.005% results in improved ocular circulation in newly diagnosed primary open-angle glaucoma patients: a prospective, 6-month, open-label study. *Eye (Lond)* 2008;22:363-369.
138. Akarsu C, Bilgili YK, Taner P, Unal B, Ergin A. Short-term effect of latanoprost on ocular circulation in ocular hypertension. *Clin Exp Ophthalmol* 2004;32:373-377.
139. Prasanna G, Carreiro S, Anderson S, et al. Effect of PF-04217329 a prodrug of a selective prostaglandin EP(2) agonist on intraocular pressure in preclinical models of glaucoma. *Exp Eye Res* 2011;93:256-264.

140. Schachar RA, Raber S, Courtney R, Zhang M. A phase 2, randomized, dose-response trial of taprenepag isopropyl (PF-04217329) versus latanoprost 0.005% in open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Curr Eye Res* 2011;36:809-817.
141. Fuwa M, Toris CB, Fan S, et al. Effects of a novel selective EP2 receptor agonist, omidenepag isopropyl, on aqueous humor dynamics in laser-induced ocular hypertensive monkeys. *J Ocul Pharmacol Ther* 2018;34:531-537.
142. Iwamura R, Tanaka M, Okanari E, et al. Identification of a selective, non-prostanoid EP2 receptor agonist for the treatment of glaucoma: omidenepag and its prodrug omidenepag isopropyl. *J Med Chem* 2018;61:6869-6891.
143. Kirihara T, Taniguchi T, Yamamura K, et al. Pharmacologic characterization of omidenepag isopropyl, a novel selective EP2 receptor agonist, as an ocular hypotensive agent. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59:145-153.
144. Berlin MS, Rowe-Rendleman C, Ahmed I, et al. EP3/FP dual receptor agonist ONO-9054 administered morning or evening to patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension: results of a randomised crossover study. *Br J Ophthalmol* 2016;100:843-847.
145. Harris A, Ward CL, Rowe-Rendleman CL, et al. Ocular hypotensive effect of ONO-9054, an EP3/FP receptor agonist: Results of a randomized, placebo-controlled, dose escalation study. *J Glaucoma* 2016;25:e826-e833.
146. Yamane S, Karakawa T, Nakayama S, et al. IOP-lowering effect of ONO-9054, a novel dual agonist of prostanoid EP3 and FP receptors, in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:2547-2552.
147. Suto F, Rowe-Rendleman CL, Ouchi T, Jamil A, Wood A, Ward CL. A novel dual agonist of EP3 and FP receptors for OAG and OHT: Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ONO-9054 in healthy volunteers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:7963-7970.
148. Schlötzer-Schrehardt U, Zenkel M, Nüsing RM. Expression and localization of FP and EP prostanoid receptor subtypes in human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1475-1487.

149. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5168-5173.
150. Barany EH. Simultaneous measurement of changing intraocular pressure and outflow facility in the vervet monkey by constant pressure infusion. *Invest Ophthalmol* 1964;3:135-143.
151. Crowston JG, Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Effect of latanoprost on outflow facility in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2240-2245.
152. Bill A. Conventional and uveo-scleral drainage of aqueous humour in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) at normal and high intraocular pressures. *Exp Eye Res* 1966;5:45-54.
153. Pederson JE, Gaasterland DE, MacLellan HM. Uveoscleral aqueous outflow in the rhesus monkey: importance of uveal reabsorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16:1008-1007.
154. Nakajima T, Matsugi T, Goto W, et al. New fluoroprostaglandin F(2alpha) derivatives with prostanoid FP-receptor agonistic activity as potent ocular-hypotensive agents. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1691-1695.
155. Ota T, Murata H, Sugimoto E, Aihara M, Araie M. Prostaglandin analogues and mouse intraocular pressure: effects of tafluprost, latanoprost, travoprost, and unoprostone, considering 24-hour variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2006-2011.
156. Dubiner HB, Sircy MD, Landry T, et al. Comparison of the diurnal ocular hypotensive efficacy of travoprost and latanoprost over a 44-hour period in patients with elevated intraocular pressure. *Clin Ther* 2004;26:84-91.
157. Özyol P, Özyol E, Erdoğan BD. The Interaction of Nepafenac and Prostaglandin Analogs in Primary Open-angle Glaucoma Patients. *J Glaucoma* 2016;25:e145-149.
158. Ota T, Aihara M, Saeki T, Narumiya S, Araie M. The effects of prostaglandin analogues on prostanoid EP1, EP2, and EP3 receptor-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3395-3399.
159. Takamatsu M, Hotehama Y, Goh Y, Mishima HK. Localization of prostaglandin E receptor subtypes in the ciliary body of mouse eye.

- Exp Eye Res* 2000;70:623-628.
160. Biswas S, Bhattacharjee P, Paterson CA. Prostaglandin E2 receptor subtypes, EP1, EP2, EP3 and EP4 in human and mouse ocular tissues--a comparative immunohistochemical study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;71:277-288.
  161. Ito S, Sakamoto K, Mochizuki-Oda N, et al. Prostaglandin F2 alpha receptor is coupled to Gq in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:756-762.
  162. Sugimoto Y, Namba T, Honda A, et al. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem* 1992;267:6463-6466.
  163. Jin J, Mao GF, Ashby B. Constitutive activity of human prostaglandin E receptor EP3 isoforms. *Br J Pharmacol* 1997;121:317-323.
  164. Hasegawa H, Negishi M, Ichikawa A. Two isoforms of the prostaglandin E receptor EP3 subtype different in agonist-independent constitutive activity. *J Biol Chem* 1996;271:1857-1860.
  165. Irie A, Sugimoto Y, Namba T, et al. Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem* 1993;217:313-318.
  166. Ichikawa A, Negishi M, Hasegawa H. Three isoforms of the prostaglandin E receptor EP3 subtype different in agonist-independent constitutive Gi activity and agonist-dependent Gs activity. *Adv Exp Med Biol* 1997;433:239-242.
  167. Katoh H, Negishi M, Ichikawa A. Prostaglandin E receptor EP3 subtype induces neurite retraction via small GTPase Rho. *J Biol Chem* 1996;271:29780-29784.
  168. Hasegawa H, Negishi M, Katoh H, Ichikawa A. Two isoforms of prostaglandin EP3 receptor exhibiting constitutive activity and agonist-dependent activity in Rho-mediated stress fiber formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:631-636.
  169. Negishi M, Hasegawa H, Ichikawa A. Prostaglandin E receptor EP3gamma isoform, with mostly full constitutive Gi activity and

- agonist-dependent Gs activity. *FEBS Lett* 1996;386:165-168.
170. Hatae N, Yamaoka K, Sugimoto Y, Negishi M, Ichikawa A. Augmentation of receptor-mediated adenylyl cyclase activity by Gi-coupled prostaglandin receptor subtype EP3 in a Gbetagamma subunit-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:162-168.
171. Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR. Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* 1992;356:159-161.
172. Tsai JC, McClure CA, Ramos SE, Schlundt DG, Pichert JW. Compliance barriers in glaucoma: a systematic classification. *J Glaucoma* 2003;12:393-398.
173. Lusthaus JA, Goldberg I. Emerging drugs to treat glaucoma: targeting prostaglandin F and E receptors. *Expert Opin Emerg Drugs* 2016;21:117-128.
174. Quigley HA, Friedman DS, Hahn SR. Evaluation of practice patterns for the care of open-angle glaucoma compared with claims data: the Glaucoma Adherence and Persistency Study. *Ophthalmology* 2007;114:1599-1606.
175. Gray TA, Fenerty C, Harper R, et al. Individualised patient care as an adjunct to standard care for promoting adherence to ocular hypotensive therapy: an exploratory randomised controlled trial. *Eye (Lond)* 2012;26:407-417.
176. Gray TA, Orton LC, Henson D, Harper R, Waterman H. Interventions for improving adherence to ocular hypotensive therapy. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;CD006132.
177. Waterman H, Evans JR, Gray TA, Henson D, Harper R. Interventions for improving adherence to ocular hypotensive therapy. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;CD006132.
178. Tsai JC. Medication adherence in glaucoma: approaches for optimizing patient compliance. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17:190-195.



## 謝辞

研究の機会を与えてくださり、長きに渡り終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜った東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚運動機能医学講座眼科学 相原一教授に心より御礼申し上げます。

実験は主に、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座眼科学教室で行いました。本研究において、同眼科学 本庄 恵准教授には、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜り、厚く御礼を申し上げます。

最後に、本研究に際して数々の御助言、御協力を頂きました皆様に厚く御礼申し上げます。