

## 論文の内容の要旨

論文題目 眼内における EP2 受容体作動薬の影響

氏名 中村 奈津子

第1章では研究背景を紹介した。緑内障は不可逆的な網膜神経節細胞 (RGC) 障害を本態とする進行性の難治性神経変性疾患で、発症や進行における最大の危険因子は眼圧依存性因子 (眼圧上昇) だが、眼圧非依存性因子も関与することから、様々な病態が混在した症候群と考えられている。眼圧は毛様体で産生された房水が2つの経路、線維柱帯流出路 (主経路) またはぶどう膜強膜路 (副経路)、へと流出するバランスで規定され、本邦で最多の緑内障病型である開放隅角緑内障の眼圧上昇には、主経路 (房水総流出の 80-90% を占める) を構成する傍シュレム管結合組織 (JCT) における流出抵抗異常が大きく寄与する。房水に含まれる多くの生理活性物質 (TGF- $\beta$ 2 など) が JCT を構成する細胞 (線維柱帯やシュレム管内皮細胞) と相互作用した結果、線維柱帯細胞による細胞外マトリクスの異常沈着や再構成、シュレム管内皮細胞におけるバリアの透過性低下などを誘導し流出抵抗が増加すると理解されている。開放隅角緑内障において唯一エビデンスのある治療は眼圧下降療法のみで、最も強い眼圧下降効果を示すプロスタグランジン類似薬 (PGA) のうち FP 受容体作動薬の点眼が従来第一選択薬として用いられてきた。しかし FP 受容体作動薬は、眼圧上昇に大きく寄与する JCT が存在する主経路ではなく、副経路 (房水総流出の 10% 程度) からの房水流出を促すが、眼圧下降効果の乏しい症例や眼瞼周囲への副作用があり、新たな機序を有する治療薬が求められてきた。

そこで 2018 年に新しく承認されたのが世界初の EP2 受容体作動薬、オミデネパグイソプロピル (OMDI) 点眼で、PGA として初めて副経路だけでなく主経路にも作用することが認められた。角膜透過後に OMDI はオミデネパグ (OMD) に変換され、眼内に豊富に存在する EP2 受容体に作用する。しかし、OMD による特に主経路への眼圧下降機序、副作用として報告された従来の FP 受容体作動薬と同様の黄斑浮腫やその併用による眼炎症の機序など、詳細不明であった。そこで眼圧下降機序、副作用である黄斑浮腫の発症機序、今後期待される眼圧非依存性治療の確立のため神経保護効果を、各々検討した。

第2章では房水流出主経路における眼圧下降機序を検討した。OMD の濃度は点眼後の組織濃度データを基に設定した。ヒト線維柱帯 (HTM) 細胞およびサルシュレム管内皮 (SCE) 細胞を用い、緑内障モデルとして TGF- $\beta$ 2 を用いた線維化を誘導した。ブタ毛様体筋 (CM) では副交感神経作動薬カルバコールを用いて筋収縮を誘発した。その結果、HTM 細胞における TGF- $\beta$ 2 誘導の線維化、細胞骨格変化、および細胞外マトリクス (ECM) に関連する mRNA やタンパク質の発現、ならびにミオシン軽鎖 (MLC) リン酸化を、OMD は各々抑制した。また SCE 細胞においても TGF- $\beta$ 2 誘導のバリア関連タンパク質の発現増加および透過性低下を、OMD は抑制した。CM においては OMDI 点眼後の組織分布に基づく OMD

濃度ではカルバコール誘発 CM 収縮に対する有意な効果はなかったが、より高い OMD 濃度では筋収縮が抑制された。従って、OMD は TM の線維化と SCE の透過性を制御することで主経路からの房水流出を促し、眼圧下降効果を発揮する可能性が示唆された。

第3章では、OMDI 点眼後の副作用である黄斑浮腫と FP 受容体作動薬との併用による眼炎症の機序を検討した。黄斑浮腫には、血液網膜関門 (BRB) における体液の流入と流出のバランスが関与している。外側 BRB と内側 BRB は各々網膜色素上皮細胞と網膜微細血管内皮細胞のバリアで主に構成されるが、網膜における免疫細胞としての機能を有するミクログリアなどのグリア細胞も Neurovascular unit の一員として BRB 制御に関与する。そこで我々はヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19)、ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMEC)、およびマウスミクログリア (MG5) 細胞を用いて、EP2 受容体作動薬である OMD 単独または代表的 FP 受容体作動薬であるラタノプロスト酸 (LTA) との共刺激による影響を評価した。その結果、ARPE-19 細胞では、OMD と LTA の共刺激により炎症性サイトカインの mRNA およびタンパク質発現が増加し、バリア関連タンパク質の発現低下および透過性上昇が観察された。対照的に HRMEC では、炎症性サイトカインの発現に有意な変化はなかったが、バリア関連タンパク質の発現増加と透過性低下が観察された。MG5 細胞では、炎症性サイトカインの mRNA 発現およびミクログリアの活性化マーカータンパク質の発現が増加した。そしてシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害薬で非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) とも呼ばれるネパフェナクは、ARPE-19 細胞におけるバリア機能低下・関連タンパク質発現減少、および MG5 細胞の活性化を抑制した。つまり、EP2 と FP 受容体の共刺激は、炎症性サイトカインを介した外側 BRB 破綻を誘発し、内側 BRB とミクログリアの活性化を強化した。NSAID による抑制がみられたことから、炎症性サイトカインによる COX 経路を介したポジティブフィードバックが内因性プロスタグランジン産生を促すことで外側・内側 BRB の不均衡が誘発され、OMD による黄斑浮腫や眼炎症の発症機序に関与する可能性があると考えられた。

第4章では最後に、眼圧非依存的観点からの緑内障治療の可能性を探るため、グルタミン酸誘発 RGC 障害に対する、OMD の神経保護効果を検証した。グルタミン酸は N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介して RGC への直接的障害とグリア細胞を介した間接的障害を誘導することが報告されている。今回我々は、*in vivo* では NMDA 硝子体投与後のマウス網膜組織を、*in vitro* ではグルタミン酸刺激後のラット初代培養 RGC、マウスのミクログリアである MG5 細胞およびアストロサイトである A1 細胞を用いた。アストロサイトは RGC の軸索が集まる視神経乳頭に最も多く存在するグリア細胞である。その結果、*in vivo* では NMDA によるアポトーシス関連因子やグリア活性化マーカーのタンパク質発現を、OMD は各々抑制した。*in vitro* ではグルタミン酸誘発 RGC 障害を有意に抑制した。さらに MG5 細胞および A1 細胞では、グルタミン酸誘発によるグリア活性化マーカーおよび炎症性サイトカインの発現増加、抗炎症性サイトカインおよび神経栄養因子の発現低下を、OMD は各々抑制した。つまり、OMD はグルタミン酸誘発網膜神経障害から RGC を

直接的に保護するだけでなく、グリア細胞における炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカイン、および神経栄養因子を制御することにより間接的に神経保護効果を示す可能性が示唆された。

以上、本研究から、世界初の新規 EP2 受容体作動薬である OMD の房水流出主経路および BRB に対する影響を一部解明するとともに、RGC やグリア細胞を介した直接的・間接的網膜神経保護効果の可能性を見出した。眼内に広く存在する EP2 受容体は、眼圧依存性治療としてだけでなく、神経保護のような眼圧非依存性治療として、緑内障を含む様々な眼疾患の治療確立に今後応用できる可能性がある。