

## 審査の結果の要旨

氏名 中村奈津子

本研究では、緑内障治療の眼圧下降点眼薬における第一選択薬として19年振りに新たに加わった、世界初の選択的EP2受容体作動薬 **omidenepag isopropyl (OMDI)** について、眼内に与える影響を多角的に検討した。実験には **OMDI** の活性本体である **omidenepag (OMD)** を用い、使用濃度は **OMDI** 点眼後のサル眼での組織伝達濃度を参考に設定した。

### 1. 新規選択的EP2受容体作動薬OMDによる房水流出路における眼圧下降機序

緑内障治療に用いられるプロスタグランジン (PG) 関連薬のうち、従来の第一選択薬であったPGF<sub>2a</sub>受容体 (FP) 作動薬は、複数存在する房水流出路のうち、ぶどう膜強膜流出路 (副経路) に作用して眼圧降下作用を示す。これに対し、新たに登場したPGE<sub>2</sub>受容体 (EP<sub>2</sub>) 作動薬 **OMD** は、PG関連薬として初めてぶどう膜強膜流出路 (副経路) のみならず線維柱帯流出路 (主経路) にも作用することが *in vivo* での房水動態研究により明らかとなった画期的新薬であるが、詳細な眼圧下降機序は不明であった。

そこでまず、**OMD** が房水流出路に与える影響を検討した。ヒト線維柱帯細胞においては、緑内障眼の前房水で濃度上昇することが知られている **TGF-β<sub>2</sub>** によるアクチン細胞骨格・細胞外マトリクス関連マーカー、ミオシン軽鎖の発現とリン酸化、コラーゲンゲル収縮に対する **OMD** の作用について、定量RT-PCR、免疫染色、ウェスタンブロット、コラーゲンゲル収縮アッセイ等を用いて評価した。サルシュレム管内皮細胞においても同様に **TGF-β<sub>2</sub>** によるバリア関連タンパク質の発現およびバリア機能に対する **OMD** の作用を、免疫細胞染色と経内皮電気抵抗を用いて評価した。その結果、**OMD** は **TGF-β<sub>2</sub>** によるヒト線維柱帯細胞における細胞骨格や細胞外マトリクスの線維化、およびサルシュレム管内皮細胞におけるバリア関連蛋白再構成によるバリア機能上昇を、それぞれ抑制した。一方、**OMD** はブタ毛様体筋におけるカルバコール誘発筋収縮を組織伝達濃度より高い濃度で有意に抑制したが、単回点眼で毛様体筋に作用する可能性は低いと考えられた。以上より、**OMD** の眼圧下降効果は、房水流出主経路における線維柱帯細胞の線維化抑制とシュレム管内皮細胞の透過性上昇によって発揮されることが示唆された。

### 2. 新規選択的EP2受容体作動薬OMDによる血液網膜関門とミクログリアへの影響

**OMD** は房水流出主経路・副経路の両方に作用して眼圧改善効果を示す一方で、従来の緑内障の第一選択薬であるFP受容体作動薬と同様に白内障術後眼での嚢胞様黄斑浮腫や、FP受容体作動薬との併用により眼炎症を誘発すること、この副作用に対する治療として

Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs)が有用であることが報告されているが、詳細な機序は不明であった。そこで黄斑浮腫の機序に関わる外側・内側血液網膜関門 (BRB; blood-retinal barrier) の主要構成要素である網膜色素上皮細胞および網膜毛細血管内皮細胞、また網膜内の免疫細胞で BRB 調節に関与するミクログリアに対する、OMD または代表的 FP 受容体作動薬の活性体である latanoprost acid (LTA)の影響、ならびにそれに対する NSAIDs の効果を検討した。細胞生存率、炎症サイトカインの誘導、バリア関連タンパク質の発現とバリア機能、ミクログリア活性化マーカーの発現について、細胞増殖、定量的 RT-PCR、免疫染色、経内皮電気抵抗等により評価したところ、OMD と LTA の併用は、網膜色素上皮細胞においては炎症性サイトカインの発現増加、バリア関連タンパク質の発現減少とそれに伴うバリア機能の一時的な低下、ミクログリアにおいては炎症性サイトカイン及びミクログリア活性化マーカーの発現増加と細胞形態変化を引き起こした。一方、網膜毛細血管内皮細胞においては OMD と LTA の併用は炎症性サイトカインの発現に影響を与えず、バリア機能は強化された。また、cyclooxygenase (COX)を阻害して PG 合成を遮断する薬剤である NSAIDs は、網膜色素上皮細胞におけるバリア関連タンパク質発現低下とバリア機能低下、およびミクログリアにおける活性化を抑制した。以上より、OMD 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 の機能とミクログリアの活性化を強化すること、BRB の不均衡と COX を介したポジティブフィードバックによる内因性の PG 産生が OMD 関連の炎症や嚢胞様黄斑浮腫に関与することが示唆された。

### 3. 新規 EP2 受容体作動薬によるグルタミン酸依存性網膜神経障害における神経保護効果

最後に、OMD が網膜神経節細胞に直接的のみならず、グリアを介して間接的に神経保護効果を示す可能性について検討した。緑内障の危険因子には眼圧依存性因子と眼圧非依存性因子があり、正常眼圧緑内障が最多である本邦においては眼圧非依存性治療の確立が必要である。後者の代表的な因子で虚血疾患にも関与するのがグルタミン酸で、興奮性神経毒としての側面を有し、網膜神経節細胞死に関与することが知られている。そこで今回、グルタミン酸により誘発される網膜神経節細胞死に対する OMD の保護効果を検討した。ラット網膜神経節細胞、マウスミクログリアとアストロサイト、マウス網膜切片を用いて、神経栄養因子・抗炎症性・炎症性サイトカイン・アポトーシス関連タンパク質の発現ならびに細胞生存率を評価した。その結果、OMD はグルタミン酸誘発の神経栄養因子・抗炎症性サイトカインの発現低下、炎症性サイトカインやアポトーシス関連タンパク質発現上昇、グリア（ミュラー、アストロサイト、ミクログリア）の活性化を抑制した。今後さらにこれらの所見の定量的評価および下流シグナルの詳細の解明を通じて、EP2 受容体の眼内での作用の詳細を明らかにできれば、OMD は眼圧非依存的治療（神経保護治療）として緑内障のみならず虚血性網膜疾患を含む幅広い眼疾患への新規治療に寄与する可能性がある。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。