

研究テーマ番号	IPSN214002
研究・発明のタイトル	アペリン受容体アゴニストによる網膜神経保護作用
研究分野	創薬、眼科領域
1) 研究・発明の概要	1) 近年、国内では糖尿病患者の約15%にあたる約140万人が糖尿病網膜症を患い、うち年間約3,000人が中途失明者となる。糖尿病網膜症の進行は緩徐に進行し、網膜の毛細血管が脆くなる単純網膜症から、血管障害が進行し増殖前網膜症を経て増殖網膜症に至り、網膜剥離などを引き起こしながら網膜神経を破壊し失明に至る。従って、網膜神経保護を行うことが出来れば、失明の回避が期待される。このように、糖尿病網膜症をはじめ、緑内障や網膜色素変性症などの網膜神経変性疾患においては、網膜神経細胞死により重度の視力障害に至るが、この細胞死を強力に抑える既存薬は存在しない。今回、発明者らは、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 誘発性網膜損傷マウス、糖尿病マウスを用いた糖尿病網膜症マウス、N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 腹腔内投与による網膜神経細胞死マウスにおいて、アペリン受容体アゴニストが網膜神経細胞死を顕著に抑制することを示した。同剤の網膜神経変性疾患治療薬としての開発が望まれる。
2) 成果概要	2) 【網膜神経変性疾患治療薬としてのアペリン受容体アゴニスト】 アペリンは G タンパク質共役受容体 APJ のリガンドである。アペリン-APJ システムは、生理学的プロセスの重要な調節因子として様々な組織で発現して、肝機能や腎機能の調整、体温調節、免疫性、糖代謝、血管新生、体液恒常性などに深く関与することが知られている。また、高血圧、心不全、アテローム性動脈硬化などの病態進行への関与も示唆されてきた。その一方で、アペリン及び APJ は中枢神経系でも発現するが、その役割については未だ不明な点が多い。発明者らは、成体マウス網膜の網膜神経節細胞やアマクリン細胞において APJ が発現すること、緑内障モデルマウスの網膜神経細胞死に対してアペリンが顕著な保護作用を有することを見出し、APJ アゴニストの網膜神経変性疾患治療薬としての可能性を示してきた。しかしながら、既存の APJ アゴニストは血液網膜関門を通過できず、末梢投与で網膜神経節細胞へ到達させることができなかった。 【NMDA 誘発性網膜損傷マウスにおける ML233 の投与効果】 ML233 (図 1) は、脂溶性の非ペプチド性 APJ アゴニストであり、末梢血管への投与により体循環を経由して、眼動脈から網膜に到達できる可能性が高い。そこで、NMDA を硝子体に注入することで網膜機能と網膜組織の変化を及ぼす NMDA 誘発性網膜損傷における ML233 の効果を調べるため、C57BL6N マウスに ML233 (5 mg/kg) を腹腔内投与し、その 1 時間後に NMDA (10 nmol/eye) をマウス硝子体に注入した。NMDA 投与 24 時間後に視機能解析を行ったところ、

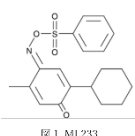
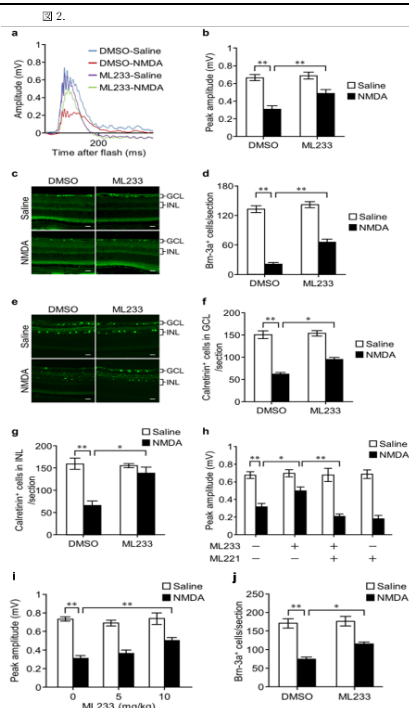


図 1. ML233

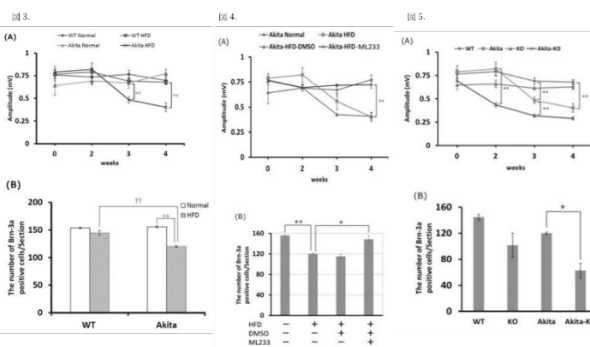


ML233 は NMDA による暗所視閾値反応 (STR) の振幅の減少に対して強い抑制効果を示すことがわかった(図 2 a, b)。また ML233 は網膜の Brn-3a (網膜神経節細胞マーカー) 陽性細胞数の減少を抑制した (図 2c, d)。網膜神経節細胞層に対する保護効果は、網膜神経節細胞及びアマクリン細胞マーカーであるカルレチニン染色によっても確認された (図 2e, f)。さらに内顆粒層内のアマクリン細胞に対しても顕著な保護効果を示した (図 2g)。一方、ML233 の薬効はモデルマウスを APJ 拮抗薬 ML221 で前処理することにより消失したことから、APJ を介した効果であることが確認された

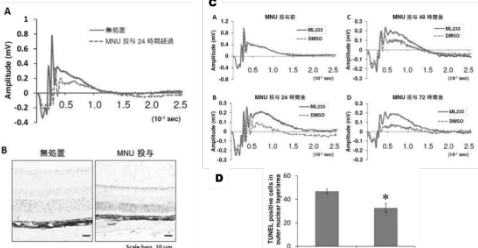
(図 2h)。ML233 の効果は、経口投与でも認められ、STR 振幅の低下と Brn-3a 陽性細胞の喪失を有意に抑制することが確認された (図 2i, j)。

【糖尿病モデルマウスを用いた糖尿病網膜症に対する ML233 の投与効果】

糖尿病網膜症に対する ML233 の投与効果を調べるため、C57BL/6N 系の遺伝子背景をもつ糖尿病モデルマウス Akita と野生型 (WT) マウスに高脂肪食または通常飼料を 4 週間摂取させ、網膜電図を調べたところ、Akita マウスにおいて高脂肪食摂取 3 週間後から STR 振幅の減弱と Brn-3a 陽性細胞数の減少を認めた (図 3A, B)。そこで、この高脂肪食摂取 Akita マウスに高脂肪食摂取開始時から ML233 (5 mg/kg) もしくは DMSO を 1 日おきに 1 回腹腔内投与したところ、STR 振幅と Brn-3a 陽性細胞数の減少を抑えることができた (図 4A, B)。図 5 は、アペリン遺伝子欠損 (KO) の影響を調べるため、Akita マウスとアペリン KO マウスを掛け合わせた Akita-KO マウスを作製し、この Akita-KO マウスの高脂肪食摂取による STR 振幅と Brn-3a 陽性細胞数の変化を調べたものであるが、Akita マウス



を上回る顕著で有意な STR 振幅と Brn-3a 陽性細胞数の減少を認めた (図 5A, B)。このことから、高脂肪食摂取 Akita マウスにおける網膜神経細胞死に対してアペリン-APJ システムが保護作用

3) 適用分野・目標	を有していることが示唆された。 【MNU 誘発の網膜神経細胞死マウスに対する ML233 の投与効果】 糖尿病網膜症モデルとして、MNU で誘発させた視細胞死に対する ML233 の投与効果を調べた。C57BL6N マウスに MNU (30mg/kg) を単回腹腔内投与した。ML233 は MNU 腹腔内投与 24 時間前、1 時間前及び MNU 投与後 24 時間毎に腹腔内投与した。MNU 投与 24 時間後の網膜では網膜電図の振幅の明らかな低下が認められ、視細胞が存在する外顆粒層において細胞死が検出されたが (図 6A、B)、ML233 を腹腔内投与したマウスの MNU 投与 24 時間後の STR 振幅では、その低下が抑制された。さらに 24 時間毎に ML233 を腹腔内投与した結果、振幅の低下に対する明らかな抑制を認めた (図 6C)。また、MNU 投与 24 時間後の外顆粒層の死細胞数も ML233 前投与により有意に減少した (図 6D)。  図 6. A: 網膜電図 (STR) の振幅 (mV) を示すグラフ。B: MNU 投与 24 時間後の STR 振幅 (mV) を示すグラフ。C: ML233 投与 24 時間後の STR 振幅 (mV) を示すグラフ。D: MNU 投与 24 時間後の外顆粒層の死細胞数 (個/mm²) を示す棒グラフ。
4) 今後の研究予定	3)・内因性ペプチドリガンドであるアペリンは細胞膜透過性および血漿中での安定性が低い、ML233 は低分子で脂溶性が高いことから末梢血管からの投与でも網膜神経保護効果が得られ、侵襲性の高い硝子体内投与を行う必要がない。また、ML233 は、APJ アゴニストとしての活性が高く、APJ と相同性の高いアンジオテンシン 1 型受容体 (AT1R) への親和性が低い、AT1R を介した血圧上昇などの副作用の懸念が少ない。さらに、ML233 は構造が単純であり、簡便かつ安価に合成することが可能である。 ・糖尿病網膜症や緑内障などの網膜変性疾患の患者数は、世界で 1 億人を超える。また、高齢化に伴い患者数の増加が必至の状況であり、糖尿病網膜症をはじめとする網膜神経変性疾患の予防・治療薬の開発が必須である。 4)・他の網膜変性モデルあるいは霊長類での ML233 投与効果の検討 ・筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの中枢神経変性疾患マウスに対する ML233 投与効果の検討
希望する提携の種類	提携形態には特にこだわらない。本件に係る医薬の研究開発に関心のある企業の参画を求める。
特許出願 (予定)	出願済
関連特許の出願の有無	無
学術発表 (予定)	有
共同研究の有無	無

註：本資料は知的財産戦略ネットワーク (株) が全ての権利を有しており、本目的外の使用を禁ずる。