

論文内容の要旨

論文題目 プロスタグランジン E 受容体の眼圧への関与

指導教員 新家 眞 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 佐伯 忠賜朗

【目的】

現在臨床使用されているプロスタグランジン(PG)系眼圧下降薬は、すべて PGF₂α 誘導体であり、FP 受容体を介した眼圧下降が主な作用機序と考えられている¹が、動物実験に於いては PGD₂²、PGE₂³による眼圧下降等、FP 以外のプロスタノイド受容体刺激による眼圧下降も示唆されている。当研究では特に PGE₂ に注目し、その受容体の眼圧への関与を検討することで、新たな眼圧下降薬開発の基礎となる知見を得ることを目的とした。

【対象と方法】

FP ないし EP1-3 各受容体の単一遺伝子ホモ欠損(FPKO, EP1KO, EP2KO, EP3KO)マウス、およびバックグラウンドにあたる近交系の C57BL/6(WT)マウスを対象とした。①PGE₂ methyl ester (ME)点眼液の WT マウス眼圧に対する影響、②EP1KO, EP2KO, EP3KO マウスの日中及び夜間眼圧、③FPKO, EP1KO, EP2KO および EP3KO マウスに対する PGE₂ ME 点眼液の眼圧下降効果、④特異的 EP 受容体サブタイプ刺激薬 ONO-DI-004 (EP1 agonist), ONO-AE1-259-01 (EP2 agonist), ONO-AE-248 (EP3 agonist), ONO-AE1-329 (EP4 agonist) のマウス眼圧に対する影響、⑤ONO-AE1-259-01 (EP2 agonist), ONO-AE1-329 (EP4 agonist) の眼圧依存性房水流出率(C 値)への影響を検討した。①-④に関しては圧トランスデューサーによって眼球内圧を直接精密に測定するマイクロニードル法⁴によって測定し、眼圧変化量(ΔIOP)=処置眼眼圧-対照眼眼圧、眼圧変化率=ΔIOP/対照眼眼圧×100(%)として評価した。

⑤に関しては two-level constant pressure perfusion method⁵によって測定した。全ての眼圧、眼圧変化率、房水流出率データは平均 (mean) ± 標準誤差 (SEM) で表記した。各統計手法において危険率 5% 未満を有意差ありとした。

【結果】

- ① 0.1% PGE2 ME 点眼による眼圧変化率は、1 時間後で 22.9 ± 4.5 ($P=0.0051$) と眼圧上昇を来し、2 時間後で -25.5 ± 3.0 ($P=0.0051$)、3 時間後で -26.3 ± 2.0 ($P=0.0051$)、6 時間後で -18.3 ± 1.5 % ($P=0.0050$) と有意な眼圧下降を示した。点眼後 3 時間後に最大の眼圧下降効果が見られた。(Figure 1)

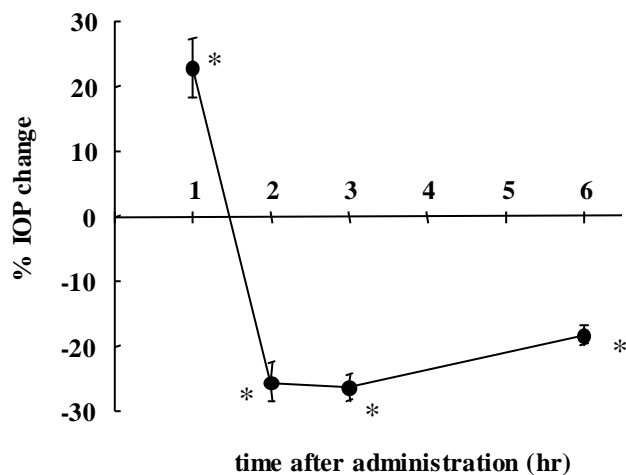


Fig. 1. Time course of 0.1% PGE2 ME-induced IOP reduction in WT mice

IOP was measured 1, 2, 3, and 6 hours after administration by a microneedle method. Data are expressed as mean ± SEM (n=10 for time point).

*: $P < 0.01$ for treated vs. contralateral carrier treated eye (Wilcoxon signed-rank test).

0.1% PGE2 ME が最大の眼圧下降効果を示した点眼 3 時間後において他の濃度の PGE2 ME が示した眼圧変化率は、0.01%で -15.7 ± 2.4 ($P=0.0117$)、0.001%で -6.1 ± 3.4 ($P=0.1614$)、0.0001%で -0.4 ± 2.3 % ($P > 0.90$)であり、0.1%および 0.01%の PGE2 ME で有意な眼圧下降が見られた。各濃度間の眼圧変化率の比較では 0.1%と他の濃度および 0.01%とより薄い濃度との間に有意差が見られ($P < 0.05$)、濃度依存的に眼圧下降を来す傾向が見られた。(Figure 2)

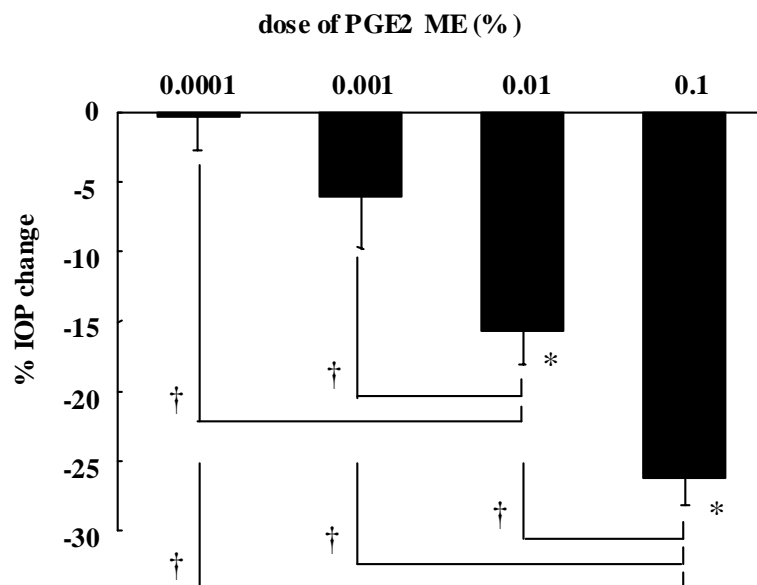


Fig. 2. Dose dependent tendency of IOP reduction by PGE2 ME in WT mice. PGE2 ME of each dose was instilled at 18:00 and IOP was measured 3 hours later. Data are expressed as mean \pm SEM (n=8 for each dose).

* : P<0.02 for treated vs. contralateral carrier treated eye (Wilcoxon signed rank test).
 † , P<0.05 between the two doses (Steel test)

- ② EP1KO、EP2KO、EP3KO および WT マウスの平均眼圧は日中(9:00)においてそれぞれ 14.4 \pm 0.2mmHg、14.7 \pm 0.2 mmHg、14.5 \pm 0.2mmHg および 14.3 \pm 0.3mmHg、夜間(21:00)においてそれぞれ 19.3 \pm 0.4、19.6 \pm 0.2 mmHg、19.5 \pm 0.4mmHg および 19.3 \pm 0.3 mmHg であった。各遺伝子型のマウスにおいて夜間眼圧は日中眼圧よりも高かったが、日中・夜間ともにマウス遺伝子型での眼圧の差は見られなかった (Table 1)。

	IOP (mmHg)			
	EP1KO	EP2KO	EP3KO	WT
Daytime	14.4 \pm 0.2 (21)	14.7 \pm 0.2 (23)	14.5 \pm 0.2 (25)	14.3 \pm 0.3 (22)
Nighttime	19.3 \pm 0.4 (23)	19.6 \pm 0.2 (22)	19.5 \pm 0.4 (21)	19.3 \pm 0.3 (24)

Table 1. Baseline IOP in EP1KO, EP2KO, EP3KO and WT mice.

Data are expressed as mean \pm SEM. Parenthetic numbers indicate numbers of animals. There was no significant difference in IOP among genotypes during the day and at night

($P > 0.05$, Kruskal Wallis test).

- ③ FPKO、EP1KO、EP2KO、EP3KO および WT マウスの 0.01%PGE2 ME 投与 3 時間後の眼圧変化率はそれぞれ $-16.7 \pm 3.6\%$ ($p=0.0117$), $-17.6 \pm 2.5\%$ ($p=0.0077$), $-18.3 \pm 1.4\%$ ($p=0.0117$), $-18.0 \pm 3.6\%$ ($p=0.0116$) および $-16.9 \pm 2.4\%$ ($p=0.0117$) であった。眼圧変化率に関して、各遺伝子型のマウス間での有意差は認められなかった (Figure 3)

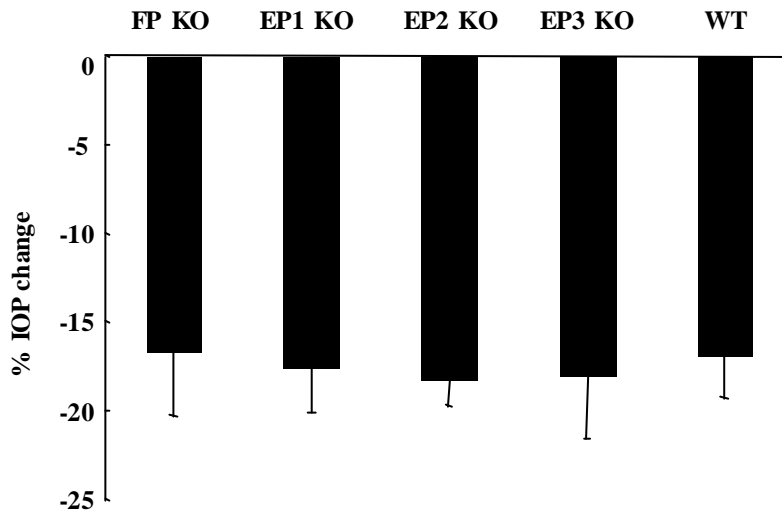


Fig. 3. IOP lowering effect of 0.01%PGE2 ME in FPKO, EP1-3KO and WT mice.

IOP was measured at 3 hrs after administration. Data are expressed as mean \pm SEM ($n=8$ for each genotype). In all genotypes 0.01%PGE2 ME showed statistically significant IOP reduction compared to the carrier ($P < 0.02$, Wilcoxon signed rank test). There was no significant difference in IOP reduction between the four types of knockout mice and WT mice. ($P=0.52$, Kruskal Wallis test).

- ④ 0.1%の各受容体刺激薬 (EP1 agonist, EP2 agonist, EP3 agonist, EP4 agonist) 投与 2 時間後の眼圧変化率はそれぞれ、 -0.5 ± 1.6 ($P=0.6121$), -21.1 ± 4.8 ($P=0.0173$), -0.1 ± 3.6 ($P=0.8886$) and $-17.5 \pm 2.9\%$ ($P=0.0117$) となり、EP2 agonist および EP4 agonist で有意な眼圧下降効果が見られたが、EP1 agonist および EP3 agonist では見られなかった。(Figure 4)

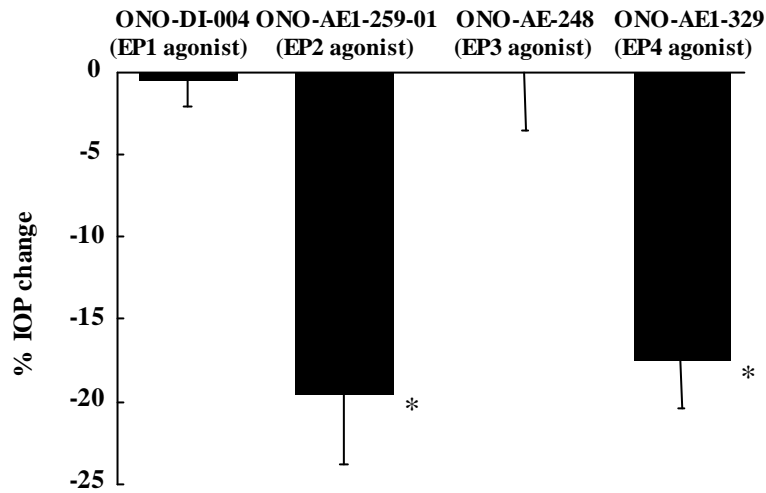


Fig. 4. IOP lowering effect of 0.1% ONO-DI-004 (EP1 agonist), ONO-AE1-259-01 (EP2 agonist), ONO-AE-248 (EP3 agonist) and ONO-AE1-329 (EP4 agonist).

Each drug was applied at 18:00 and IOP was measured at 2 hrs after the administration. Data are expressed as mean±SEM (n=8 for each agonist) *, P<0.02 for treated vs. contralateral carrier treated eye (Wilcoxon signed rank test).

0.1% EP2 agonist 点眼による眼圧変化率はそれぞれ、1 時間後で -2.1 ± 1.8 (p=0.2626)、2 時間後で -21.1 ± 4.8 (p=0.0173)、3 時間後で -16.4 ± 2.6 (p=0.0077)、6 時間後で -6.4 ± 4.6 % (p=0.1282) (薬剤投与眼 対 溶媒投与眼、Wilcoxon signed rank test)であった。0.1% EP4 agonist 点眼による眼圧変化率はそれぞれ、1 時間後で -17.2 ± 1.8 (p=0.0117)、2 時間後で -17.5 ± 2.9 (p=0.0117)、3 時間後で -15.9 ± 1.8 (p=0.0117)、6 時間後で -6.0 ± 1.7 % (p=0.0173)であった。EP2 agonist および EP4 agonist とともに、点眼 2 時間後に最大の眼圧下降効果を示した。(Figure 5)

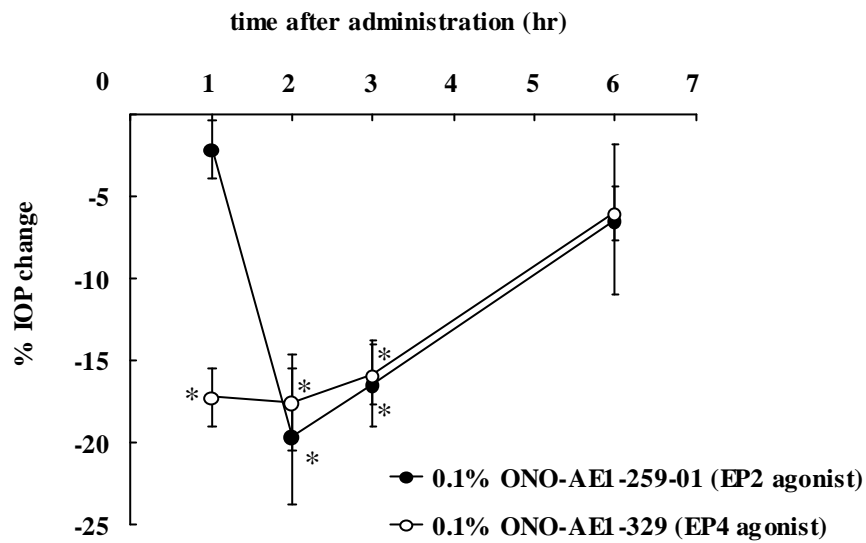


Fig. 5. Time course of 0.1% ONO-AE1-259-01 (EP2 agonist) and ONO-AE1-329 (EP4 agonist) agonist-induced IOP reduction in WT mice.

Data are expressed as mean \pm SEM (n=8). *, P<0.02 for treated vs. contralateral carrier treated eye (Wilcoxon signed rank test).

0.1%の EP2 agonist および EP4 agonist が最大の眼圧下降効果を示した点眼 2 時間後において他の濃度の各 agonist が示す眼圧変化率を測定した。EP2 agonist が示した眼圧変化率は、0.01%で -8.2 ± 4.4 (P=0.1235)、0.001%で -5.1 ± 3.4 (P=0.2626)、0.0001%で -3.3 ± 3.2 % (P=0.4838)であり、EP4 agonist が示した眼圧変化率は、0.01%で -6.7 ± 1.6 (P=0.0173)、0.001%で -3.1 ± 1.2 (P=0.0357)、0.0001%で -2.1 ± 0.8 % (P=0.0117)であった。各濃度間の眼圧変化率の比較では EP2 agonist、EP4 agonist ともに 0.1%による眼圧変化率が他の濃度による眼圧変化率より有意に大きかった (Figure 6)。

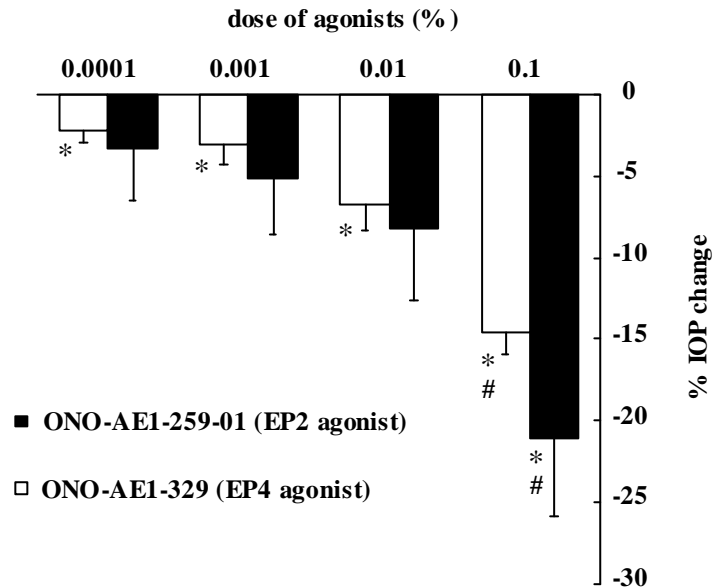


Fig.6. Dose-dependent IOP reduction by ONO-AE1-259-01 (EP2 agonist) and ONO-AE1-329 (EP4 agonist) in WT mice.

Data are expressed as mean \pm SEM (n=8 for each dose). IOP was measured at 2 hrs after administration. *: P<0.05 for contralateral vehicle carrier eye (Wilcoxon signed rank test) #: P<0.05 against 0.01% or lower concentrations of each agonist (Steel test).

FPKO、EP1KO、EP2KO および EP3KO マウスに 0.1%の EP2 agonist および EP4 agonist を点眼し、WT マウスに対して最大の眼圧下降効果を示した点眼 2 時間後において眼圧を測定し WT マウスに対する投与結果と比較した。EP2 agonist が FPKO、EP1KO、EP2KO、EP3KO、WT マウスに示した眼圧変化率はそれぞれ、 -17.4 ± 4.8 (P=0.0180)、 -17.9 ± 1.7 (P=0.0117)、 0.1 ± 3.8 (P=0.8658)、 -17.0 ± 4.3 (P=0.0173)、 -21.1 ± 4.8 % (P=0.0117) であり、EP2KO マウス以外では有意な眼圧下降を示した。EP2 agonist が EP2KO 以外の遺伝子欠損マウス群および WT マウスに及ぼした眼圧変化率に、群間有意差は見られなかった (Figure 7)。EP4 agonist が FPKO、EP1KO、EP2KO、EP3KO、WT マウスに示した眼圧変化率はそれぞれ、 -15.3 ± 4.3 (P=0.0077)、 -14.6 ± 2.1 (P=0.0117)、 -16.8 ± 2.7 (P=0.0180)、 -10.2 ± 3.4 (P=0.0180)、 -17.5 ± 2.9 % (P=0.0357)であり、EP4 agonist が遺伝子型の異なるマウス群に及ぼした眼圧変化率に、群間有意差は見られなかった(P>0.9、Kruskal Wallis test)(Figure 7)。

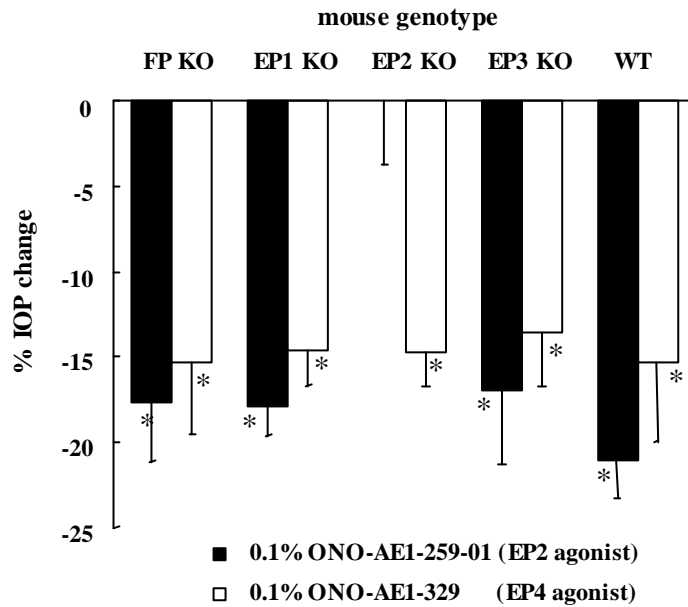


Fig.7. IOP reduction by 0.1% ONO-AE1-259-01 (EP2 agonist) and ONO-AE1-329 (EP4 agonist) in FPKO, EP1-3KO and WT mice.

IOP was measured at 2 hrs after administration. Data are expressed as mean \pm SEM (n=8 for each genotype). *: P<0.05 for contralateral carrier treated eye (Wilcoxon signed rank test).

- ⑤ WT マウスにおける 0.005%latanoprost 点眼 2 時間後の眼圧依存性房水流出率 (C 値) は $0.0086 \pm 0.0002 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mmHg}$ 、溶媒点眼 2 時間後の C 値は $0.0056 \pm 0.0005 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mmHg}$ であり、latanoprost 投与眼では有意に房水流出率の増大が見られた (P=0.0011) (Figure 8A)。0.1% EP2 agonist、0.1% EP4 agonist ないし、その溶媒を点眼した 2 時間後の C 値はそれぞれ 0.0066 ± 0.0003 、 0.0070 ± 0.0010 、 $0.0065 \pm 0.0003 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mmHg}$ であり、両 agonist とともに溶媒の C 値と有意差がなかった (P=0.539、Kruskal Wallis test) (Figure8B)。

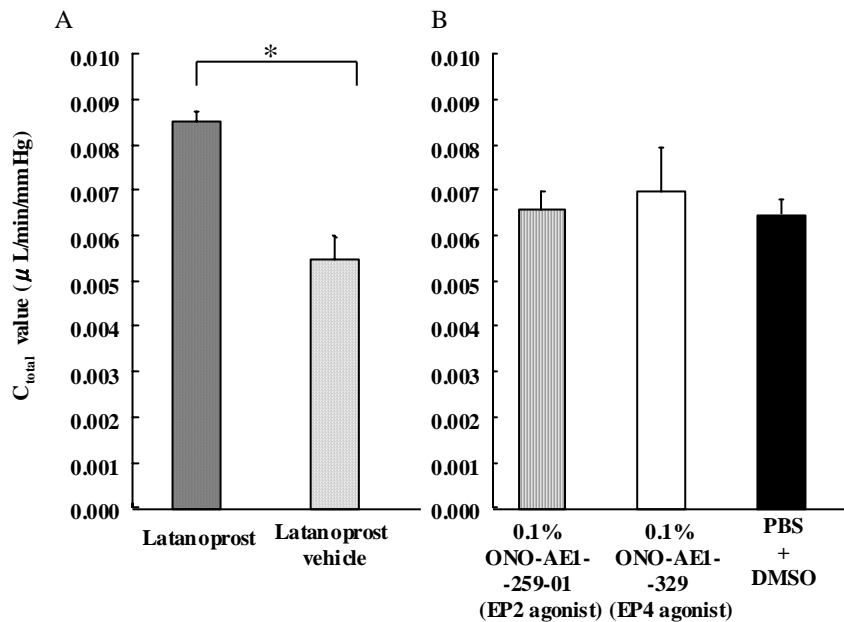


Fig.8. Effects of EP2 agonist, EP4 agonist and latanoprost on Outflow Facility.

C value indicates trabecular outflow facility.

A. C value by 0.005% latanoprost and its vehicle solution.

B. C value by 0.1% EP2 agonist, 0.1%EP4 agonist and its carrier solution. Data are expressed as mean \pm SEM (n=8 for each solution). *, P<0.01 by Mann Whitney U-test.

【考察】

当研究では 0.1%PGE2 ME 点眼 1 時間後において一旦眼圧が上昇し、その後に下降した (Figure 1)。兎眼において PGE2 点眼後、前房内炎症を伴った一過性の眼圧上昇後に眼圧下降を来すことが報告されており⁶、当実験における眼圧上昇も前房内の炎症惹起によると考えられた。PGE2 は FP, EP1, EP2, EP3, EP4, DP の各受容体に対して結合阻害定数 = 100, 20, 12, 1, 2 and 2.4 nM と幅広い親和性を持つことから、眼圧下降に関与する受容体サブタイプはこの結果のみでは特定されなかった。

続いて EP1KO, EP2KO, EP3KO マウスの眼圧測定を行った。EP4KO マウスに関しては、動脈管開存による新生児致死性の為検討を行わなかった。日中および夜間において各ノックアウト(KO)マウスの眼圧は WT マウスと差が無く (Table 1)、EP1-3 受容体はマウス正常眼の眼圧恒常性に関与していないか、単一受容体の KO では他の受容体が代償的に機能し、眼圧恒常性が維持されたと考えた。

更に KO マウスを用いて、PGE2 の眼圧下降効果に関与する受容体を検討した。しかし 0.01%PGE2 ME 投与 3 時間後の眼圧変化率に関しては、各 KO マウス間に明らかな差は見られず (Figure 3)、PGE2 の眼圧下降効果に関与する受容体サブタイプの同定は出来なかった。

従って EP1-4 の各受容体 agonist 点眼後の眼圧変化を検討することで、眼圧下降に関与する

EP 受容体サブタイプの検出を試みた。結果、EP2 agonist および EP4 agonist によって眼圧下降が見られたことで、EP2 および EP4 受容体を介した眼圧下降作用が初めて示された (Figure 4)。眼内での EP 受容体の分布はマウスとヒトにおいて類似していることが報告されており⁷、眼内房水の流出や産生に関与する部位である虹彩の括約筋、線維柱帯、シュレム管、毛様体無色素上皮に於いては EP2 受容体が最も多く発現し、それに次いで EP4 受容体の発現が見られ、EP1 および EP3 受容体の発現は比較的少ないことが示されている。眼圧下降への関与が見られなかった EP3 受容体は主に共役する 3 量体 G タンパク質が Gi でありセカンドメッセンジャーである cAMP の減少を来し、EP1 は主に Ca²⁺の増加を来す⁸が、眼圧下降への関与が見られた EP2 受容体と EP4 受容体は共に Gs と共役してセカンドメッセンジャーである cAMP の増加を来すことが知られている⁹。更に血管や毛様体平滑筋において EP2¹⁰ および EP4¹¹ 受容体刺激による cAMP 産生増大が平滑筋弛緩を来すことが示唆されており、毛様体平滑筋弛緩等による房水流出増大が、眼圧下降機序の一つとして考えられた。

次に、EP2 agonist 及び EP4 agonist の眼圧下降機序を検討する為に、点眼後の房水流出率(C 値)を測定した。また陽性コントロールとして、マウスにおける FP 受容体を介した眼圧下降と C 値の増大が報告されている¹² 0.005% latanoprost 点眼後の C 値を測定した。当研究でも latanoprost では C 値の増大が見られ、EP2 agonist 及び EP4 agonist では見られなかった。房水流出路には経シュレム管路と経ブドウ膜強膜流出路があり、ブドウ膜強膜流出は眼圧依存性が低い¹³ ことから、C 値は主に経シュレム管路の房水流出率を示すと考えられる⁵。従って EP2 agonist 及び EP4 agonist の眼圧下降機序は、マウスにおいては既存の PG 系眼圧下降薬である latanoprost と異なり、主に経ブドウ膜強膜流出路の抵抗減少ないしは房水産生抑制であることが推察された。

【結論】

本研究において著者らは、PGE₂ の眼圧に対する影響をマウスに対するものとしては初めて示した。更に EP 受容体に特異的な刺激薬を用いることで、EP2 受容体と EP4 受容体が PGE₂ の眼圧下降作用に関与することを明らかにした。EP2 受容体と EP4 受容体を介した眼圧下降は、マウスにおいては FP 受容体を介した眼圧下降とは異なることを示し、経ブドウ膜強膜流出路の房水流出促進ないしは房水産生抑制機序によることを示唆した。

【参考文献】

1. 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.
2. Woodward DF, Hawley SB, Williams LS, et al. Studies on the ocular pharmacology of prostaglandin D₂. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:138-146.
3. Wang RF, Lee PY, Mittag TW, Podos SM, Serle JB, Becker B. Effect of 8-iso prostaglandin E₂ on aqueous humor dynamics in monkeys. *Arch Ophthalmol* 1998;116:1213-1216.
4. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Reduction of intraocular pressure in mouse eyes treated with latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:146-150.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1995;1259:109-119.
9. Regan JW. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci* 2003;74:143-153.
10. Nilsson SF, Dreccoll E, Lutjen-Dreccoll E, et al. The prostanoid EP2 receptor agonist butaprost increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4042-4049.
11. 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.
12. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5168-5173.
13. 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.