

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの  
確立と網膜保護用デバイスの開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 俊明

平成24（2012）年 5月

（1 / 2冊）

## 研究報告書目次

## 目 次

I. 総括研究報告		
新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 阿部俊明	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 中澤 徹	-----	8
2. 新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 植田弘師	-----	12
3. 新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 永井展裕	-----	15
4. 新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 西澤松彦	-----	21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	33

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） （総括）研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究代表者 阿部俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授</p>	
<p>研究要旨： 今回の研究計画は安全性が担保された既存薬薬剤ライブラリー等を用いた網羅的薬剤スクリーニングを行い、網膜保護効果のある薬剤を探索し、同時に低分子から蛋白質まで幅広い用途にあわせた薬剤を持続的に徐放できるデバイスの開発を行うことが目標である。 今年度は既存薬ライブラリーからスクリーニングを行い、約 70%が終了したが、今年度半ばには終了すると推測できる。本スクリーニングは安全性が担保された薬剤の探索であり、最終的な目標は強膜上のデバイスから徐放される薬剤での網膜保護を目指すものであり、これまでに候補薬剤が行くつか見つかったが、今後はデバイスからの徐放効果の確認が必要である。また、薬剤徐放デバイスの作製も同時に行ったが、デバイスはラットからサル用まで作製できた。ラットは動物モデルを作製しやすく、サルはヒト用を前提に形状を作製した。ラット用はチャレンジングな試みではあったが、大型デバイスと同等の薬剤徐放力があることが判明した。すなわち薬剤は初期バーストがなく持続的に徐放できた。また一方向性の徐放も確認でき、ラット強膜上に移植で模擬薬剤の眼内移行も確認できたので、1年目終了時の研究目標に十分に到達することができた。次年度はラット網膜疾患動物モデルにおいて薬剤徐放の効果を確認し、非臨床 POC 取得に向けてデータを揃えたい。</p>	
<p><b>A. 研究目的</b> “比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドラッグデリバリーシステムを確立することを目的とする。” 視覚障害は高齢者に多く、超高齢化社会を迎えた日本では喫緊の課題であり早期に実現可能な治療法開発が必要とされる。また、視覚障害の上位はすべて網膜疾患であるために網膜保護に着目した。新規薬剤は①他疾患のために開発されたが全身投与が困難などで臨床応用されなかった薬剤や既存薬の薬剤ライブラリー、②既存の点眼薬で直接眼内投与により神経網膜保護効果が証明された薬剤で、点眼では十分な有効濃度を保持できないもの、③我々が各病態解析から有効性がみられた薬剤や東北大学に特許を有する薬剤のライブラリー（東北大学・宮田ら）を再スクリーニングする（23-24年度）。さらに本デバイスを動物モデル</p>	<p>の眼球表面に固定するか眼内インプラントで持続的に薬剤を投与する。全身の副作用を最低限に抑えながら局所で薬剤の効果と血液網膜バリアーの検討をする。 東北大学では早期探索型臨床研究を重点課題とし薬事や臨床開発の専門家によるチームを結成した。更にトランスレーショナルリサーチセンターを有している。その中で、既存の薬剤など早期に臨床応用実現可能なスクリーニングと具体的な投与方法の開発を同時に行うことは極めて特徴的で独創的だと言える。早期 POC 取得に有利であると考えられる。また本研究での神経保護薬の発見やデバイスの開発は、これまでに治療法のない疾患に広く適応できる可能性があり、点眼のできない高齢者や複数の薬剤が必要な疾患にも有用である。 失明疾患上位の網膜色素変性などは過去に全く治療法が報告されていないが、本デバイス使用で、持続的な網膜への薬剤徐放が可能になれば新しい治療法開発になりえる。さらに上記したが、難治性網膜疾患以外でも眼疾患は高齢者に多く、超高齢化社</p>

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） （総括）研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究代表者 阿部俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授</p>	
<p>会を迎えた日本においては、今後ますます医療経済を圧迫する大きい問題点になる可能性がある。新規デバイスで効果を示せば、本デバイスは新規の眼疾患治療デバイスとしてそのまま利用でき社会的・経済的メリットを生む。すなわちUnmet Medical Needsにこたえられるのではないかと考える。高齢者は点眼を忘れて、自分で点眼できない、複数の薬剤点眼による副作用などが改善される可能性がある。過去に報告のない本システムの開発は広く様々な疾患へ応用可能な手技となり、開発が進めば有用なデバイスになる。</p> <p><b>B. 研究方法</b></p> <p><b>1) デバイスの作製 (23年度)</b></p> <p>TEGDM (Mw283) でデバイス外側を作成する。薬剤は PEG/TEG 比を調整するか、コラーゲン・PEG 水溶液でペレット化し徐放膜で蓋をする。TEGDM 100%の膜は全く薬物を透過せず、逆に PEGDM 100%の膜は透過性が高いため PEGDM と TEGDM の組成比により透過性を制御する膜を作成する。蛋白質の徐放は PEG シートとコラーゲン微粒子 (粒径 1~10 μm) を混ぜた徐放膜を利用する。担当：西澤、阿部、永井</p> <p><b>2) 候補薬剤スクリーニング (23-24年度)</b></p> <p>利用予定の薬剤は以下の3種類の方法で検討される。①すでに臨床薬として承認されている既存薬ライブラリー (1274種：連携研究者の慶應義塾大学、佐谷秀行教授より提供を受ける)、および米国でヒト安全性は確立されたが最終的に製薬にならなかった薬剤ライブラリー (1040種) を用いて、網膜神経細胞の初代培養を利用して、低栄養・虚血負荷に対する保護効果スクリーニングを行う (23-24年度) (新規薬剤)。②東北大学に特許を有し、すでにアカデミア単独で前臨床治験段階に至っているプロリル水酸化酵素阻害薬 (TM6008, TM6089)、終末糖化産物AGE阻害剤 (R-147176)、PAI-1阻害薬 (TM-5275)、また我々がこれまでの研究成果として、動物実験レベルで網膜神経保護</p>	<p>効果を認めたバソヒビン、HSP誘導剤、抗活性酸素薬、カルシウムチャンネル阻害薬、カルパイン阻害剤、神経栄養因子を候補薬剤としてその効果を調べる。さらに、共同研究者の植田教授が個体網膜虚血モデルで活性を見出している海洋微生物ライブラリー由来産物、全身投与によっても効果を有する内在性保護因子Prothymosin αとその部分活性ペプチド群についても検証する。ペプチド性薬剤については、最適な設計と誘導化についても検証する (候補薬剤200種)。③眼疾患で点眼に利用されている抗緑内障薬、ステロイド、新生血管抑制因子でその低い移行性のために解析が困難であった薬剤 (各企業から譲渡されるか購入予定) を対象にする (既存薬剤)。担当：中澤、植田</p> <p><b>3) 薬効検討システム (23-25年度)</b></p> <p>(1) ウサギ遺伝子改変網膜変性モデルの利用。上記候補剤は神経網膜への確実な移行性を考慮してまずウサギ網膜変性モデルの硝子体内にデバイスをインプラントし薬効を確認する。1薬剤づつデバイスに入れて効果を見るのではなく、複数の薬剤 (1-2個のデバイスで3-6薬剤) をそれぞれ別々に徐放させ、網膜変性ウサギの右眼にインプラントし、左眼はコントロールに利用する。新規薬剤は24-25年度に候補薬剤と既存薬剤は23-24年度で行う。3種類の組み合わせはスクリーニングされる薬剤のすべてをうまく網羅できるように工夫する。同じ薬剤が複数回組み合わせるように工夫して、候補薬を絞り込む。短期間 (3-6カ月以内) で効果がみられないものは除外していく。</p> <p>(2) ラット網膜変性モデルで検討する。眼内インプラントよりも強膜上固定のほうがより臨床に利用しやすい。候補になる薬剤はすべて強膜上にデバイスを固定して血液網膜バリアー通過の検討をし、構造最適化も検討する (連携研究者の東北大学・宮</p>

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） （総括）研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究代表者 阿部俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授</p>	
<p>田敏男教授の化合物デザインチームと共同研究)。ラットは遺伝性網膜変性モデルだけでなく様々な網膜変性モデルを作成しやすいために利用する。23-25年度で行う。眼内組織への薬物移行性の評価はラベルできる分子は蛍光色素で標識し組織学的に、直接蛍光色素を測定して評価する。ラベルできない分子については液体クロマトグラフィーや ELISA など定量を行う。</p> <p>(3) 網膜保護効果の測定 経時的に網膜電図、眼底検査、蛍光眼底撮影、瞳孔反応、さらに行動検査を行うが、必要に応じてより詳細な組織学的検査、アポトーシス検査、各種遺伝子発現検査を行う。</p> <p>(4) 保護作用の機序解明 網膜保護効果が見られたものは、薬剤の本来の機序を基本に経時的な網膜の解析を行い保護効果の機序を解明し、さらに新しい薬剤の開発の可能性を探る (25年度)。</p> <p>(倫理面への配慮) 動物実験に関しては、研究機関内の承認手続きを経てから国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定、ならびに動物の愛護及び管理に関する法律を遵守して厳格に動物実験を行う。今回の動物実験計画の一部は東北大学動物実験施設に計画書を提出し、東北大学総長より実験遂行の許可をうけていること、また申請者はこれまでにサル、ウサギ、マウス、ラットの実験に長年従事しており、自然科学研究機構生理学研究所から研究用ニホンザルの供給を受けたことなど、動物を扱う倫理面には問題ない。東北大学動物実験規定は毎年結果報告と再申請が義務付けられており、動物の扱いは厳格に監視されている。</p>	<p><b>C. 研究結果 (23年度)</b> (1) 既存薬ライブラリー (2314 種) からスクリーニングを行い、1617 種 (約 70%) が終了した。 方法は網膜色素上皮細胞と初代網膜培養を利用し、まず低栄養・虚血負荷を利用した。本負荷は小胞体ストレスが誘導されていると推測されるため、小胞体ストレスに有効とされているゲラニルゲラニルアセトン (GGA) を比較対象としたが、有効なものが 285 ヒットした。この内さらに負荷なし陽性コントロールと同等の効果がみられる化合物が 2 つヒットした。 (2) 本研究班で開発中の薬剤ライブラリーのうちプロサイモシン・は虚血再還流時の網膜細胞のアポトーシスを用量依存的に抑制することが網膜電図及び組織学的に見られ、またバソヒピンはラット実験的脈絡膜新生血管抑制が見られた。 (3) ラット移植用のデバイスの作製を行った。このデバイスはサイズを変更可能で培地中で安定に包埋薬剤を放出するのが確認された。 (4) コントロールに用いた GGA (350Da) と高分子バソヒピン (42kDa) がともに 0 次徐放制御可能であった。またデバイスの強膜上固定からの徐放で網膜にも薬剤が到達しているのが確認された。</p> <p><b>D. 考察</b> 今回の研究申請では安全性が担保された既存薬薬剤ライブラリー等を用いた網羅的薬剤スクリーニングを行い、網膜保護効果のある薬剤を探索し、同時に用途にあわせた薬剤を徐放できるデバイスの開発を行うことが目標であった。まず既存薬ライブラリーからスクリーニングを行い、約 70% が終了したが、ほぼ予定通りで今年度半ばには終了すると推測できる。今回は 2 つの薬剤がスクリーニングされた可能性があるが、デバイス徐放に有効であるかは次年度に確認したい。本スクリーニングは安全性が担保された薬剤の探索であり、最終的な目標は強膜上のデバイスから徐放される薬剤での網膜保護を目指すものであり、眼科製剤</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） （総括）研究報告書	
新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究  研究代表者 阿部俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授	
<p>以外でも使用価値のあるものが見出せると考えられる。</p> <p>本研究では薬剤徐放デバイスの作製も同時に行っているが、今回は動物モデルを作製しやすいラット用の薬剤徐放デバイスの作製を試みた。チャレンジングな試みではあったが、大型デバイスと同等の薬剤徐放力があるものができた。すなわち薬剤は初期バーストがなく持続的に徐放できた。</p> <p>また、一方向性の徐放も確認でき、20匹以上のラット強膜上に移植もできたので、1年目終了時の研究目標に十分に到達することができた。動物モデルはサルなどの霊長類よりは、ラットやマウスなどの小動物のほうが網膜疾患モデルを作製しやすいために、ラット用デバイスの作製が成功したことは、本研究を遂行するのに非常に有意義であったと判断できる。</p> <p>難治性網膜疾患以外でも眼疾患は高齢者に多く、本デバイスはアドヒアランスの問題も解決でき、これからの超高齢化社会を迎える日本で社会的・経済的メリットを生むと考えられる。</p> <p>次年度はラット動物モデルにおいて薬剤徐放の効果を確認し、医薬品医療機器総合機構（PMDA）にも今後の方針について相談し、早期非臨床POCを取得することを目指したい。</p> <p><b>E. 結論</b>            網膜細胞保護に役立つ薬剤がスクリーニングされた。我々のデバイスから徐放された薬剤は網膜まで徐放されているのが確認された。眼内注射に代わる眼内への安全な薬物投与方法として期待できる。</p> <p><b>F. 健康危険情報</b>            該当なし</p>	<p><b>G. 研究発表</b></p> <p>1. 論文発表</p> <p>1. Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Shigeki Machida, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Yumi Ishikawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, <u>Toshiaki Abe</u>. “Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes” <i>RETINA The Journal of Retinal and Vitreous Diseases</i>, in press.</p> <p>2. Yumi Tokita-Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Hikaru Sonoda, Tomoaki Takakura, Yasufumi Sato, <u>Toshiaki Abe</u>. “Vasohibin and retinal pigment epithelium” <i>Adv Exp Med Biol</i>, 723, 305-310 (2012)</p> <p>3. Ryosuke Wakusawa, <u>Toshiaki Abe</u>, Hajime Sato, Hikaru Sonoda, Masaaki Sato, Yuuichi Mitsuda, Tomoaki Takakura, Tomi Fukushima, Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Yumi Ishikawa, Kohji Nishida, Yasufumi Sato. “Suppression of choroidal neovascularization by vasohibin-1, a vascular endothelium-derived angiogenic inhibitor” <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i>, 52(6), 3272-3280 (2011).</p> <p>4. Takeaki Kawashima, Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Norihiro Kumasaka, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Noriko Osumi, Matsuhiko Nishizawa, <u>Toshiaki Abe</u> “A scalable controlled-release device for transscleral drug delivery to the retina” <i>Biomaterials</i>, 32(7), 1950-1956 (2011)</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） （総括）研究報告書	
新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究  研究代表者 阿部俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授	
<p>5. Nobuo Fuse, MingGe Mengkegale*, Akiko Miyazawa, <u>Toshiaki Abe</u>, Toru Nakazawa, Ryosuke Wakusawa and Kohji Nishida Polymorphisms in ARMS2 (LOC387715) and LOXL1 Genes in Japanese with Age-related Macular Degeneration. <i>AJO</i> 2011 Mar;151(3):550-556.e1. Epub 2011 Jan 13.</p> <p>6. Kayama M, Nakazawa T, Thanos A, Morizane Y, Murakami Y, Theodoropoulou S, <u>Abe T</u>, Vavvas D and Miller JW. Heat shock protein 70 (HSP70) is critical for the photoreceptor stress response after retinal detachment via modulating anti-apoptotic Akt kinase. <i>Am J Pathol</i> ;178(3):1080-1091, 2011.</p> <p>7. Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly(<math>\gamma</math>-glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. Ryu M, Nakazawa T, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, <u>Abe T</u>, Akashi M, Nishida K. <i>J Control Release</i>. 2011;151(1):65-73.</p> <p>8. Preoperative factors predictive of postoperative decimal visual acuity <math>\cdot</math> 1.0 following surgical treatment for idiopathic epiretinal membrane. Hiroshi Kunikata, <u>Toshiaki Abe</u>, Jiro Kinukawa, Kohji Nishida <i>Clinical Ophthalmology</i> 2011;5 147- 154</p> <p>9. Hiroshi Kunikata Nobuo Fuse, <u>Toshiaki Abe</u> Fixating Dislocated Intraocular Lens by 25-Gauge Vitrectomy. <i>Ophthalmic Surgery, Lasers &amp; Imaging</i> 2011;42(4) 297-301</p>	<p>10. Hiroshi Kunikata, Fumihiko Nitta, Yasuhiko Meguro, Naoko Aizawa, Takehiro Hariya, Naoki Chiba, <u>Toshiaki Abe</u>, Kohji Nishida Difficulty in Inserting 25- and 23-gauge Trocar-cannula during Vitrectomy <i>Ophthalmologica</i> 2011;226(4) 198-204.</p> <p>11. Hiroshi Kunikata, <u>Toshiaki Abe</u>, Kohji Nishida Successful outcomes of 25- and 23-gauge vitrectomies for giant retinal tear detachments. <i>Ophthalmic Surgery, Lasers &amp; Imaging</i> in press</p> <p>12. Takeo Miyake, Keigo Haneda, Nobuhiko Nagai, Yohei Yatagawa, Hideyuki Ohnami, Syuhei Yoshino, <u>Toshiaki Abe</u> and Matsuhiko Nishizawa Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms. <i>Energy &amp; Environmental Science</i> 2011, 4, 5008-5012.</p> <p>13. 生理活性物質と眼疾患の基本 各種眼疾患と生理活性物質のかかわり Behcet 病 <u>阿部俊明</u> 臨眼 65 : 1018-1020, 2011.</p> <p>14. 大友孝昭, <u>阿部俊明</u>, 劉孟林, 渡邊亮, 津田聡, 岡村知世子, 千葉真生, 布施昇男 東北大学病院におけるぶどう膜炎の臨床統計 臨床眼科 65 巻 6 号 Page891-894(2011.06)</p> <p>15. 新田文彦, 國方彦志, 中澤徹, 鬼怒川次郎, 安田正幸, <u>阿部俊明</u> レーザー スペックルフローグラフィを用いた光線力学療法後の血流解析 臨床眼科 (0370-5579)65 Page863-868(2011.06)</p> <p>16. 岡村知世子, 國方彦志, <u>阿部俊明</u>, 中澤満, 布施昇男 強膜開窓術後 23 年経過し再発したぶどう膜滲出の 1 例 臨床眼科(0370-5579)65 巻 6 号 Page895-900(2011.06)</p>

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） （総括）研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究代表者 阿部俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授</p>	
<p>17. 岡村知世子、大友孝昭、布施昇男、<u>阿部俊明</u> Behcet 病ぶどう膜炎に対するインフリキシマブ療法の間成績とその安全性の検討 新しい眼科 28 : 696-701, 2011.</p> <p>2. 学会発表 (国際学会発表)</p> <p>1. Nobuhiro Nagai, <u>Toshiaki Abe</u> “Transscleral Sustained Drug Delivery by Novel Device” BIT’s 1st Annual Symposium of Drug Delivery System (SDDS-2011), Shenzhen, China (Nov 3-5, 2011), Oral</p> <p>2. Nobuhiro Nagai, Takeaki Kawashima, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Matsuhiko Nishizawa, <u>Toshiaki Abe</u> “Evaluation of Ocular Tissue Distribution of Drugs Delivered Transsclerally From A Non-biodegradable Polymeric Capsule Device” 2011 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida</p> <p>3. <u>Toshiaki Abe</u>, Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Norihiro Kumasaka, Ryo-suke Wakusawa, Yumi Ishikawa, Shigeki Machida, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato “Suppression of Choroidal Neovascularization By Vasohibin-1 in Monkey Eyes” 2011 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida</p> <p>(国内学会発表)</p> <p>1. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、佐藤真智子、中澤徹、西澤松彦、<u>阿部俊明</u>：「網膜光障害モデルに対する経強膜DDSの網膜保護効果」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ（2011年11月21日～22日）</p> <p>2. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、佐藤真智子、西澤松彦、<u>阿部俊明</u>：「網膜保護用のマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ（2011年11月21日～22日）</p>	<p>3. 永井展裕、<u>阿部俊明</u>：「経強膜ドラッグデリバリーシステムによる網膜保護」2011年度厚生労働省研究班キックオフミーティング、東北大学医学部（2011年8月25日）</p> <p>4. 永井展裕、熊坂典浩、大浪英之、川島文明、梶弘和、西澤松彦、<u>阿部俊明</u>：「経強膜ドラッグデリバリーシステムによる網膜神経保護の試み」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス（2011年6月9日～10日）</p> <p>5. 永井展裕、川島文明、梶弘和、熊坂典浩、大浪英之、西澤松彦、<u>阿部俊明</u>：「多剤動態制御性に優れたマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス（2011年6月9日～10日）</p> <p>6. 大浪英之、永井展裕、熊坂典浩、石川有美、涌沢亮介、佐藤靖史、<u>阿部俊明</u>：「サル脈絡膜新生血管モデルに対するバソヒビンの抑制効果」第115回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2011年5月12日～15日）</p> <p>7. <u>阿部俊明</u> 仙台市眼科医会講演会仙台国際ホテル6F楓 2011年7月27日 特別講演「AMDならびにその関連疾患の診断と治療」</p> <p>8. <u>阿部俊明</u> 第6回Step Up セミナー 東北6大学眼科 7月31日 教育講演 AMDとその類縁疾患の診断と治療</p> <p>9. 伊藤梓・新田文彦・國方彦志・<u>阿部俊明</u>第14回東北黄斑研究会学術講演会 2011年8月27日 黄斑円孔術後に発症した、近視性脈絡膜新生血管の一例</p> <p>10. <u>阿部俊明</u> 米沢市医師会学術講演会2011年10月19日 東京第一ホテル 米沢 加齢黄斑変性の病態と治療</p> <p>11. <u>阿部俊明</u>、永井展裕、大浪英之、中澤徹、梶弘和、西澤松彦 第65回日本臨床眼科学会 東京国際フォーラム 2011年10月7-10日 専門別委員会 特別講演 経強膜ドラッグデリバリーデバイスの開発</p> <p>12. <u>阿部俊明</u>、永井展裕、大浪英之、梶弘和、嘉山真紀、西澤松彦、中澤徹 GG A研究会 2011年9月3日 丸ビルホールGGA徐放デバイスによる網膜保護</p>



<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） （総括）研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究代表者 阿部俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授</p>	
<p>H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）</p> <p>1. 特許取得 なし</p> <p>2. 実用新案登録 なし</p> <p>3. その他 なし</p>	

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
重症眼疾患と神経保護治療 研究分担者 中澤徹 東北大学大学院医学系研究科 教授	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>研究要旨：            本研究では、ARPE-19 と初代培養網膜神経節細胞に対して 2 種類の化合物ライブラリーからスクリーニングを行い、RPE 保護薬クロトリマゾールを見出した。</p> </div>	
<p>A. 研究目的          本研究では、比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドラッグデリバリーシステムを確立することを目的とした。</p> <p>B. 研究方法          すでに臨床薬として承認されている既存薬ライブラリー（1274種：連携研究者の慶應義塾大学、佐谷秀行教授より提供）、および米国でヒト安全性は確立されたが最終的に製薬にならなかった薬剤ライブラリー（1040種：以下US Drug Collection）を用いて、初代培養網膜神経節細胞に対して神経保護効果を示す薬剤のスクリーニングを行った。また、ヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE-19）を用いて低栄養・虚血負荷に対する保護薬のスクリーニングを行った。</p> <p><u>低栄養・虚血負荷に対する網膜色素上皮細胞保護薬の探索</u>          血清、グルコース非含有培地で懸濁したARPE-19を96ウェルプレートへ播種し、各種薬剤ライブラリーを10 μMで投与し、2%酸素下でインキュベートした。24時間後にAlamarBlueを用いて細胞増殖アッセイを行った。また、血清、グルコース含有培地を用いて20%酸素下でインキュベ-</p>	<p>トしたものをポジティブコントロールとした。</p> <p><u>初代培養網膜神経節細胞を用いた神経保護薬の探索</u>          96ウェルプレートへ播種した野生型マウス（C57BL/6：9～11週齢）由来の初代培養網膜神経節細胞に各種薬剤ライブラリーを10 μMで投与し、24時間後にAlamarBlueを用いて細胞増殖アッセイを行った。薬剤非投与群の培地には神経細胞の増殖および長期生存に必要なB-27サプリメントまたは、B-27サプリメントから5種類の抗酸化剤を除いたものを添加した。以下、それぞれのサンプルをAO+、AO-とした。また、薬剤投与群にはすべてAO-を添加した。</p> <p>（倫理面への配慮）          本研究で動物実験行うときは、動物の痛みに関する科学的な研究からの認識に加えて倫理的な観点からの苦痛を十分に認識し、その軽減に配慮した。</p> <p>C. 研究結果  <u>低栄養・虚血負荷に対する網膜色素上皮細胞保護薬の探索</u>          低栄養・虚血負荷によって細胞内では小胞体ストレスが誘導されていると推測されるため、小胞体ストレスに有効とされているゲラニルゲラニルアセトン（GGA）を比較対象として用いた。その結果、既存薬ライブラリーのほとんどの化合物がGGAより高い活性を示したが、その中でも特に強い保護効果を示す2つのヒット化合物を見出した。これらヒット化合物はライブラリー内</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
重症眼疾患と神経保護治療  研究分担者 中澤徹 東北大学大学院医学系研究科 教授	
<p>で重複していた同一の薬剤であり、抗真菌薬クロトリマゾールであった。US Drug Collectionについては全1040化合物のスクリーニングが完了しており、その中にはGG Aを上回る保護効果を示す化合物はなかった。</p> <p><u>初代培養網膜神経細胞を用いた神経保護薬の探索</u> 既存薬ライブラリー、US Drug Collectionについては全化合物のスクリーニングが完了しているが、神経保護効果を示すヒット化合物を見出すことはできなかった</p> <p>D. 考察 Isaevらはクロトリマゾールが低栄養・虚血負荷された小脳顆粒細胞に対して保護効果を示す (Isaev NK., et al., <i>Neuroscience</i>, 2002) ことを報告していることから、網膜色素上皮細胞に対しても同様の保護メカニズムが考えられた。</p> <p>E. 結論 本研究では、2つの化合物ライブラリーから網膜色素上皮細胞保護薬クロトリマゾールを見出した。今後、この化合物による保護メカニズムの詳細な解明を進めることが重要であると考えられる。</p> <p>F. 健康危険情報 該当なし</p> <p>G. 研究発表 1. 論文発表 Kayama M, <b>Nakazawa T*</b>, Thanos A, Morizane Y, Murakami Y, Theodoropoulou S, Abe T, Vavvas M, Miller JW*. Heat Shock Protein 70 is critical for the photoreceptor stress response after retinal detachment via modulating anti-apoptotic Akt kinase <i>Am J Pathol.</i> Mar;178(3): 2011, 1080-91.</p>	<p>Ryu M, <b>Nakazawa T*</b>, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, Abe T, Akashi M, Nishida K. Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly(<math>\gamma</math>-glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone <i>J Control Release.</i> 2011 Apr 10;151(1): 65-73.</p> <p><b>Nakazawa T*</b>, Kayama M, Ryu M, Kunikata H, Watanabe R, Yasuda M, Kinugawa J, Vavvas D, Miller JW. Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math> Mediates Photoreceptor Death in a Rodent Model of Retinal Detachment <i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i> 2011 Mar 14;52(3):1384-91</p> <p>Fuse N, Mengkegale M, Miyazawa A, Abe T, <b>Nakazawa T</b>, Wakusawa R, Nishida K. Polymorphisms in ARMS2 (LOC387715) and LOXL1 Genes in Japanese with Age-related Macular Degeneration. <i>Ophthalmol.</i> 2011 Mar;151(3):550-6</p> <p>Takayama S, Seki T, <b>Nakazawa T</b>, Takahashi S, Watanabe M, Izumi M, Kaneko S, Kamiya T, Matsuda A, Kikuchi A, Yambe T, Yoshizawa M, Nitta S, Yaegashi N, Aizawa N. Short-term effects of acupuncture on open-angle glaucoma in retrobulbar circulation: Additional therapy to standard medication. <i>Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.</i> 157090. Epub 2011 Mar 7.</p> <p>Watanabe R, <b>Nakazawa T</b>, Fuse N. Observation of posterior corneal vesicles with <i>in vivo</i> confocal microscopy and anterior segment OCT. <i>Clin Ophthalmol.</i> 2011 in press.</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
分担研究報告書

重症眼疾患と神経保護治療

研究分担者 中澤徹 東北大学大学院医学系研究科 教授

Kunikata H, Uematsu M, **Nakazawa T**, Fuse N.  
Successful Removal of Large Intraocular Foreign Body by 25-Gauge Microincision Vitrectomy Surgery.  
*J Ophthalmol.* 2011;2011:940323.  
Epub 2011 Apr 4.

**Nakazawa T\***, Shimura M, Ryu M, Himori N, Nitta F, Omodaka K, Doi H, Yasui T, Fuse N, Nishida K.  
Progression of visual field defects in eyes with different optic disc appearances in patients with normal tension glaucoma.  
*J Glaucoma.* 2012 Feb 5.

Ryu M, Yasuda M, Shi D, Shanab A. Y, Watanabe R, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Takano J, Saido T, **Nakazawa T\***.  
The critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death.  
*J Neurosci Res.* 2012 Apr;90(4):802-15.

Aizawa N, **Nakazawa T\***, et al.  
Reproducibility of retinal circulation measurements obtained using laser speckle flowgraphy-NAVI in patients with glaucoma.  
*Clin Ophthalmol.* 5. 1171-6. 2011.

Chiba N, **Nakazawa T\***, et al.  
Association between optic nerve blood flow and objective examinations in glaucoma patients with generalized enlargement disc type.  
*Clin Ophthalmol.* 2011;5:1549-56. Epub 2011 Oct 28.

Yokoyama Y, **Nakazawa T\***, et al.  
Significant Correlations between Optic Nerve Head Microcirculation and Visual Field Defects and Nerve Fiber Layer Loss in Glaucoma Patients with Myopic Glaucomatous Disc.  
*Clin Ophthalmol.* 2011;5:1721-7. Epub 2011 Dec 7.

Tsuda S, **Nakazawa T\***, et al.  
Effect of topical tafluprost on optic nerve head blood flow in patients with myopic disc type.  
*Journal of Glaucoma.* 2011 in press.

Otani T, Yasuda K, Aizawa N, Sakai F, **Nakazawa T\***, Shimura M.  
Over 10 years follow-up of Coats' disease in adulthood. *Clin Ophthalmol.* 2011;5:1729-32. Epub 2011 Dec 8

Tsubota K, Yoshida T, Kurosaka D, Lee KR, Alfonso CE, **Nakazawa T\***.  
Miami to Japan Eye-Care Rescue Mission: Vision Van Helps with Relief Efforts.  
*Am J Ophthalmol.* 2011 Nov;152(5):886-7.

Shimura M, Yasuda K, Miyazawa A, Otani T, Nakazawa T.  
Pre-seasonal treatment with topical olopatadine suppresses the clinical symptoms of seasonal allergic conjunctivitis.  
*Am J Ophthalmol.* 2011 Apr;151(4):697-702.

The Japanese Steroid-Induced Glaucoma Multicenter Study Group:  
Success Rates of Trabeculectomy for Steroid-Induced Glaucoma: a Comparative, Multicenter, Retrospective, Cohort Study.  
*Am J Ophthalmol.* 2011 Jun;151(6):1047-1056

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
重症眼疾患と神経保護治療 研究分担者 中澤徹 東北大学大学院医学系研究科 教授	
<p>2. 学会発表</p> <p><u>ARVO2011</u> Critical role of Nrf2 in the oxidative stress-induced retinal ganglion cell death.</p> <p><u>EGA2011</u> Neuroprotective treatment for glaucoma: Establish the drug delivery system for the suppression of phagocytic cells with nanoparticles.</p> <p><u>Santen Private Seminar</u> NTGにおける神経保護治療戦略.</p> <p><u>第8回 国際緑内障シンポジウム</u> NEUROPROTECTION AND APOPTOSIS OF RETINAL GANGLION CELLS RELATED TO GLAUCOMA</p> <p><u>第33回京滋緑内障カンファレンス</u> 緑内障における眼循環と神経保護治療.</p> <p><u>第11回日本抗加齢医学学会総会</u> 緑内障と酸化ストレス.</p> <p><u>第3回山梨県学術講演会</u> 緑内障にかかわる最新のトピックス.</p> <p><u>第54回コンタクトレンズ学会</u> 緊急座談会</p> <p><u>第31回日本眼薬理学会</u> γPGAナノ粒子による内眼炎ステロイド治療</p> <p><u>第24回日本緑内障学会</u> 軸索障害による網膜神経節細胞死の基礎的実験成果</p> <p><u>千寿製薬ランチョンセミナー</u> 神経（New論）保護治療の可能性について</p>	<p><u>第54回日本神経化学学会大会</u> Neuroprotective treatment for glaucoma.</p> <p><u>臨床眼科学会</u> 東日本大震災への宮城県における眼科支援</p> <p><u>室蘭眼科医会 学術講演会</u> 緑内障における役者たち、細胞レベルの考察</p> <p>H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 特許取得</li> <li>2. 実用新案登録</li> <li>3. その他</li> </ol>

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書</p>	
<p>網膜保護新規候補薬剤の設計と機能評価に関する研究</p> <p>研究分担者 植田 弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野 教授</p>	
<p>研究要旨：マウス個体網膜虚血モデルにおいて、内在性神経保護因子 Prothymosin <math>\alpha</math> (ProT<math>\alpha</math>)とその活性フラグメントペプチドの保護効果を組織化学・機能解析にて明らかとした。また、ProT<math>\alpha</math>受容体の1つである Toll-like Receptor-4 の関与も明らかとした。</p>	
<p><b>A. 研究目的</b>                  早期臨床応用を目指した網膜神経保護治療を開発のため、新規候補薬剤の探索を行い、機能評価とその機構を解明することで、新規創薬シーズを提示することを目的とする。</p> <p><b>B. 研究方法</b>  <b>B-1. 網膜神経保護薬</b>                  ProT<math>\alpha</math>は、マウスProT<math>\alpha</math>遺伝子由来組換えタンパク質を大腸菌株BL21 (DE3)に発現させ、酸性フェノール法で抽出した。抽出物をイオン交換クロマトグラフィーで精製し、大腸菌由来エンドトキシンを親和性クロマトグラフィーで除去した高純度品として調製した。ProT<math>\alpha</math>活性フラグメントペプチドP30は、外注にて依頼合成した。</p> <p><b>B-2. ProT<math>\alpha</math>活性フラグメントペプチド：P30の同定</b>                  ラット17日胚大脳皮質由来神経細胞の初代培養を無血清条件下で培養を行い、急速にネクローシスを誘発するセルベースアッセイを使用した。本モデル実験において、GST融合ラットProT<math>\alpha</math>、部分欠損変異体による生存活性を評価することで、ProT<math>\alpha</math>の活性ドメインを同定した。</p>	<p><b>B-3. 個体における神経保護効果解析</b>  <b>B-3-1) 実験動物</b>                  本実験で使用したC57/BL6J系雄性マウス6~9週齢 (19~28 g) は、恒温 (22 <math>\pm</math> 2°C) の部屋で12時間毎の昼夜自然管理下において飼育し、水道水及び一般動物用固形飼料を自由に摂取させた。以下に示す全ての実験は、長崎大学動物実験指針で定める方法に準じて行った。</p> <p><b>B-3-2) 網膜虚血モデルマウス作製</b>                  ペントバルビタール75 mg/kgをマウス腹腔内に投与し麻酔をかける。37°Cの恒温台の上にマウスを置き、体温を維持する。硝子体を1%の硫酸アトロピンで散瞳させ、無菌眼内灌流溶液の容器を予め水面がマウスの眼より135.5 cmの高さになるように取り付けおき (100 mmHg)、灌流溶液を小児用輸液セットに接続した33Gの注射針を針先から少し垂らしながら前眼房に刺入し固定する。前房に針を刺入した後、灌流系を解放することにより前眼房内に圧力 (100 mmHg) を45分間負荷する (マウス正常眼圧は15 mmHg程度)。これらの操作は実体顕微鏡下で行い、眼圧の上昇により網膜虚血が惹起されていることを網膜内血流の遮断を指標に目視にて確認する。虚血負荷終了後に注射針を抜き、眼圧を低下させることにより網膜を再灌流させる。本モデルは虚血-再灌流法を用いた一般的緑内障モデルである。</p>
<p>- 12 -</p>	

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書</p>	
<p>網膜保護新規候補薬剤の設計と機能評価に関する研究</p> <p>研究分担者 植田 弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野 教授</p>	
<p><u>B-3-3) 視神経挫滅モデルマウス確立</u> 様々な網膜病態モデルにおいてProTαとその活性フラグメントペプチドの活性を評価することを目的として、視神経挫滅モデルの作製法を確立した。次年度以降に、本モデルにおける活性評価を行う。</p> <p><u>B-3-4) 組織化学的評価</u> 標本作製：ペントバルビタール50 mg/kgをマウス腹腔内に投与し麻酔をかける。心臓からのK<sup>+</sup> free PBS 40 ml灌流にて脱血し、4% PFA 30 ml灌流にて固定した。眼球を取り出し、室温で3時間、4% PFAで浸漬固定した後、25% スクロース溶液に置換を行った。OCTコンパウンドで包埋後、凍結ミクロトームで10 μM 切片を作成した。 ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色解析: 検体の細胞核をギルヘマトキシリン液にて染色し、組織をエオジン・フロキシン液にて対比染色を行った。染色網膜組織の厚みを指標として組織障害を評価した。</p> <p><u>B-3-5) 網膜機能評価</u> 網膜機能の評価は、網膜電位図 (Electroretinogram: ERG) の測定を用いた。マウスを暗室にて3時間暗順応させた後、ペントバルビタール50 mg/kgをマウス腹腔内に投与し麻酔をかける。1% アトロピン点眼にて瞳孔を開かせた後、コンタクト電極を角膜先端に設置し、鉄電極を眼近傍に設置した。皮下プラチナ針電極は、腹部に設置した。ERGは日本光電製のSLS-3100にて20 Jの閃光にて誘発させ、MEB-9104 (日本光電) にて2分ごとに30分間計測した。バックグラウンド補正は、通常時の明時における反応を2分ごとに20分間計測したものを使用した。計測されるα、β波の増幅は、Neuropack (日本光電) にて定量した。</p>	<p>(倫理面への配慮) 本申請研究は、その計画内に遺伝子組み換え実験、並びに動物実験を計画している。遺伝子組み換え実験においては、本研究の遂行に必要な十分な遺伝子封じ込めが可能な実験室 (P 1、P 2レベル) を有しており、安全対策は十分である。動物実験においても、実験動物の適切な飼育環境を整えると共に、逃亡防止措置など安全対策は万全である。これらの対応に基づき、本研究は、長崎大学組み換えDNA実験安全委員会、及び長崎大学動物実験委員会における承認を得ている。</p> <p><b>C. 研究結果</b></p> <p><u>C-1. ProTα活性フラグメントペプチド：P30の神経細胞死保護効果</u> ネクローシス保護を指標としたセルベースアッセイにて、ProTαのGST融合部分欠損ProTαの保護効果を検討したところ、活性ドメインを同定することに成功した。本ドメインの合成ペプチドでも同様に活性を有することを確認した。また、網膜虚血モデルにおいても効果を有することを明らかとした。</p> <p><u>C-2. ProTαの網膜虚血保護</u> 緑内障モデルである網膜虚血に対してProTαは虚血後24時間後の硝子体内単回投与で組織化学的、網膜機能保護効果を有していることを明らかとした。また、本保護効果は、0.01-1 pmol/μl/eyeで用量依存的であり、0.1 pmo/μl/eyeで十分な保護効果が認められた。</p> <p><u>C-3. P30の網膜虚血保護</u> P30も上記のC-2と同様に虚血後24時間後の硝子体内単回投与で保護効果を有していた。本効果も用量依存的であり、10 pmol/μl/eyeでProTα 0.1-1.0 pmol/μl/eye投与と同等の保護効果を有することを見出した。</p>

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書</p>	
<p>網膜保護新規候補薬剤の設計と機能評価に関する研究</p> <p>研究分担者 植田 弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子薬理学分野 教授</p>	
<p><u>C-4. ProTαの先制治療効果機構解明</u> ProTαの先制医療の活用を目的として、網膜虚血2日前単回投与による保護効果を検証した。虚血後投与と比較して部分的ではあるが、有意な保護効果を見出した。本保護効果は、ProTαの細胞膜受容体の1つであるToll-like Receptor-4 (TLR-4)を介することをTLR-4の抗体による機能吸収実験により明らかとした。</p> <p><b>D. 考察</b> マウス網膜虚血モデルにおいて 神経保護効果を有するProTαの活性ペプチドP30を見出した。ProTα は虚血処置の前投与でも部分的保護効果を有しており、標的受容体がTLR-4である可能性を明らかにした。網膜疾患の多くが加齢に伴い慢性の経過をとることから、本保護機構の応用は疾患の予防と慢性化を防ぐ先制医療に繋がると考える。一方、ProTα、並びにP30は虚血後の24時間投与で完全な保護効果を示した。本保護効果は、TLR-4とは異なる新たなProTα受容体を介する可能性がある。平成24年度からは、この詳細なメカニズム解析を行うとともに、ProTαによる神経新生との関連を検討し、併せて視神経挫滅モデルや細胞レベルでの加齢性黄斑変性症に関連したモデル実験を行い、効果が確認されたときには強膜への薬物送達デバイスを用いた研究に発展させる。</p>	<p><b>E. 結論</b> 本研究では、網膜保護新規候補分子としてProTα、並びに活性ペプチドP30の有効性を見出した。また、網膜虚血モデルにおける先制治療において、TLR-4が創薬標的となる可能性を提示した。これらの研究成果は、新規の網膜保護候補薬剤の開発に繋がることが大いに期待される。</p> <p><b>F. 健康危険情報</b> 該当なし</p> <p><b>G. 研究発表</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 論文発表 該当無し</li> <li>2. 学会発表 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ Third International Symposium on Thymosins in Health and Disease ‘Prothymosin alpha: its mechanism for non-vesicular release and receptors in central nervous system’ March 14-16, 2012, Washington, D.C. (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)</li> </ul> </li> </ol> <p><b>H. 知的財産権の出願・登録状況</b> (予定を含む。)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 特許取得 該当無し</li> <li>2. 実用新案登録 該当無し</li> <li>3. その他 該当無し</li> </ol>
<p>- 14 -</p>	



<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教</p>	
<p>研究要旨： 本研究は、比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドラックデリバリーシステム（DDS）を確立することが目的である。分担研究として H23 年度は、これまで我々が独自に効果を確認してきた、新規抗血管新生抑制剤 Vasohibin-1 および東北大学が特許を有する候補薬剤ライブラリーの中から PAI-1 阻害薬を薬剤候補として選択し、DDS 化を検討した。デバイスの基材となるポリエチレングリコール、トリエチレングリコール、コラーゲン微粒子の組成を適宜調節することによって、Vasohibin-1 および PAI-1 阻害剤のゼロ次徐放化条件を確立した。Vasohibin-1 は強膜、脈絡膜、網膜色素上皮、神経網膜で確認された。以上より、我々のデバイスは薬剤徐放による網膜保護に使用できる可能性が示された。</p>	
<p>A. 研究目的 本研究は、比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドラックデリバリーシステム（DDS）を確立することが目的である。分担研究として H23 年度は、これまで我々が独自に効果を確認してきた、新規抗血管新生抑制剤 Vasohibin-1 および東北大学が特許を有する候補薬剤ライブラリーの中から PAI-1 阻害薬を薬剤候補として選択し、DDS 化を検討した。 Vasohibin-1 は、ヒト臍帯静脈内皮細胞において VEGF により誘導される血管新生を抑制する性質を持つサイトカインである。難治性疾患の加齢黄斑変性症（AMD）は、網膜下に起こる脈絡膜新生血管（CNV）が主な病態である。CNV の発生には、血管新生促進因子である血管内皮増殖因子（VEGF）が深く関わっていることがわかっている。最近、AMD 患者に対する抗 VEGF 療法が盛んに行われるようになり比較的良好な結果が報告されている。しかしながら、頻回の</p>	<p>硝子体注射が必要なことやその合併症、そして重要な VEGF の生理的作用の抑制や全ての患者に有効というわけではない、といった多くの課題を抱えている。従って、CNV を有する AMD の治療には、VEGF 抑制に頼らない他のタイプの治療法が求められている。我々は最近、Vasohibin-1 がマウスおよびサルレーザー誘発 CNV を抑制することを報告した【Invest Ophthalmol Vis Sci 52 (2011) 3272-3280, Retina, in press, 2012】。今回の研究では、Vasohibin-1 を DDS 化し、ラットレーザー誘発 CNV モデルで、その効果を Vasohibin-1 硝子体注射と比較評価した。 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) は血液の凝固線溶や組織線維化などに作用して心疾患と脳血管疾患等の血栓性疾患の病因に深く関わり、また各種の炎症性疾患の発症にも役割を担うことが知られている。PAI-1 阻害薬 TM5509 は、PAI-1 の X 線結晶構造解析情報を基に最新の SBDD (Structure-based drug design) 技術を駆使して得たヒット化合物 TM5007 からリード化合物 TM5275 を経て新規合成された 500 以上の低分子化合物の中から最適化されたアカデミア発の臨床開発候補化合物である。PAI-1 阻害薬は既存の抗血栓薬と同等以上の有効性を示す一方、既存薬とは異なり出血時間を延</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書	
新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究	
研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教	
<p>長しない事がサルを用いた実験で証明されている。また、PAI-1阻害薬TM5509はヒト血漿中での抗血栓作用のみならず、動物モデルで炎症性疾患にも効果があることも確かめられている。PAI-1阻害薬はこれまで開発されておらず、TM5509が臨床で使用できるようにになるとPAI-1阻害を作用機序とする世界で初めての新薬となりうる。本研究では、この東北大学となる新規薬剤PAI-1阻害剤をDDS化し、眼疾患治療に応用することを検討した。</p> <p>B. 研究方法</p> <p>1. Vasohibin-1 (VASH) のDDS化</p> <p>1-1. VASHの調製</p> <p>VASHは既報の方法でEscherichia coliからthioredoxin fusion proteinとして単離した【Am J Pathol 2010;176:1950-1958.】。Fusion proteinを透析し、血液凝固因子Xa(Novagen)を用いて消化した。VASHを溶出し、20mM glycine-HCl buffer(pH3.5)で透析した。VASHを50mM NaCl、5mM tris(2-carboxyethyl)phosphine、0.5mM EDTA、5%glycerol、4.4%N-lauroylsarcosine(pH8.0)を含む50mM Tris-HCl bufferで再溶解し、pH8.0の20mM sodium phosphate bufferで透析した。このbufferはvehicleとしても以下の実験で使用した。蛋白濃度は、蛋白アッセイキット (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive Hercules, CA, USA) を用いたBradford法で決めた。</p> <p>1-2. デバイスの作製</p> <p>1-2-1. コラーゲン微粒子の作製</p> <p>1%(w/v)コラーゲン溶液10mlに、0.3%(v/v)界面活性剤を含んだ50mlの流動パラフィンを混ぜて乳化させ、室温で5分間、600rpmで攪拌した。攪拌中に、水で溶かした架橋剤50%(v/v)WSCを1ml加え、コラーゲンを1時間架橋した。50%(v/v)エタノールを加えて、オイル層からコラーゲン微粒子を分離するために5分間混ぜ合わせた。混合物は5分間3500rpmで遠心分離し、コラーゲンペレットを残して上清を取り除いた。この作業を二回行った。それからリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え、コラーゲンペレットと混ぜ合わせ遠心分離した(3500rpm、5分間)。</p>	<p>この作業を3回行いエタノールを取り除き、平均粒径8<math>\mu</math>mのコラーゲン微粒子を作成した。</p> <p>1-2-2. カプセルデバイスの作製</p> <p>薬物リザーバーの作成は、3D CAD(computer assisted drawing)で鋳型の設計図を作成し、それを「小型NC微細加工機Micro MC-2(株式会社PMT)」へ取り込み、アクリル樹脂に掘り込んだ。それからその型を、フルオロシアンでコートし実際に使用する鋳型とした。その鋳型に、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiofenone 10<math>\mu</math>lを混合したプレポリマーを流しUV架橋(25mW/cm<sup>2</sup> - 3min [SEN LIGHTS CORP])して作製した。作成したリザーバーのサイズは、ラット移植用が内径、縦1.5mm×横1.5mm×高さ0.6mm、薬剤充填部容量は1.2<math>\mu</math>lとし、in vitro徐放用が内径、縦7mm×横7mm×高さ2mm、薬剤充填部容量は9<math>\mu</math>lである。徐放制御膜の作成は、PEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiofenone 10<math>\mu</math>lを混合したPEGDMプレポリマーに、平均粒径8<math>\mu</math>mのコラーゲン微粒子を混合(500mg/ml)し、徐放膜用の鋳型へ流しUV架橋(25mW/cm<sup>2</sup> - 3min [SEN LIGHTS CORP])して作製した。薬物リザーバーに薬剤を充填後、PEGDMを接着面に塗布し徐放膜を被せUV架橋することによりカプセルを作製した(Fig.1)。</p> <p>1-2-3. 充填薬物の調製</p> <p>PEGDMが20%、薬剤が80%の容積比率となるように混合し90秒UV架橋しペレット化した。ラット移植用は、薬剤1.2<math>\mu</math>lにPEGDM0.3<math>\mu</math>lとなり、VASH含有量は、VASH原液DDS (10VDD) では683.2ng、VASH1/10DDS (VDD) では68.3ng、PBS-DDSでは0ngである。In vitro徐放用は、薬剤4<math>\mu</math>lにPEGDM1<math>\mu</math>lとなり、VASH含有量は、VASH原液DDSでは2440ng、PBS-DDS (NVDD) では0ngである。</p> <p>1-3. ELISAによるVASH徐放量の定量</p> <p>48well plate(IWAKI Non-treated MICROLATE)の中にアッセイバッファー(0.5%BSA (0.5g/100ml),0.05%Tween80,10<math>\mu</math>g/ml<math>\gamma</math>globulin および0.1%ProClin150を含む、100mMPBS,pH7.0)200<math>\mu</math>lを入れ、上記のVASH原液DDSあ</p>

<p>厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） 分担研究報告書</p>	
<p>新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と 網膜保護用デバイスの開発に関する研究</p> <p>研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教</p>	
<p>るいはPBS-DDSを入れた（各n=4）。徐放されたVASHを測定するため経時的にバッファを回収した。回収したバッファはVASH ELISA kitで測定した。</p> <p>1-4. 徐放VASHの生物活性（血管内皮細胞のTube formation評価） 24ウェルプレートにヒト繊維芽細胞（NHDF）を播種し、コンフルエントまで培養した後、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）をNHDF上に播種した。共培養後、HUVECがNHDF上に接着したことを確認したら、徐放VASHを含有する培地に交換した。この培地は、上述のデバイスを培地に3時間浸漬したものである。コントロールとして、2 nM VEGFを含む培地にVASHを0~10nM添加した培地を使用した。徐放VASHを含む培地中のVASH濃度はELISAの結果から0.56nMであった。培養後、CD31の免疫染色を実施し、HUVECのTube formationを観察した。Tube長さをKURABO 血管定量ソフトウェアで定量した。</p> <p>1-5. 動物 動物実験操作は、ARVOの眼科研究の動物使用に関する声明のガイドラインに従い、東北大学大学院医学系研究科の動物管理委員会の承認を得た。200から250gの雄のBrown Norwayラットを使用した。すべての過程においてケタミン塩酸塩(90mg/kg)とキシラジン塩酸塩(10mg/kg)の腹腔内注射で麻酔をした。瞳孔は2.5%phenylephrinと1%tropicamideで拡大した。Oxybuprocaine hydrochloride(0.4%)を局所麻酔として使用した。</p> <p>1-6. 免疫組織化学的検査 VASHの免疫組織化学的検査は光凝固後2週目に行った。ラットを頸椎脱臼後眼球を摘出し、余分な結膜や筋などの組織を除去した。デバイスを取り外し、同部強膜に目印として10-0ナイロンを縫合した。角膜輪部に切開を切開を入れ、4%PFAに一晩浸し固定した。翌日に角膜、水晶体を除去しスクロース置換(10%から30%)した。翌々日に組織をOCT液に包埋し液体窒素で冷却し凍結ブロックを作成した。凍結ブロックをクライオスタットで約10µmに薄切し凍結</p>	<p>切片を作成した。 上記切片をImage-iT FX signal enhancer (Alexa Fluo 488 Goat Anti-Mouse SFX kit)で30分室温でブロッキング後、抗VASHマウス抗体(1:200)で4℃一晩静置した。翌日Alexa Fluo 488 Goat Anti-Mouse IgG(1:100,Alexa Fluo 488 Goat Anti-Mouse SFX kit)で室温30分静置した。各過程間はPBSで3回洗浄した。VECTASHIELD mounting medium for fluorescence with DAPI(VECTOR)で封入し、蛍光顕微鏡(model FW4000,ver. 1.2.1; Leica Microsystems Japan,Tokyo,Japan)で観察した。</p> <p>（倫理面への配慮） 動物実験操作は、ARVOの眼科研究の動物使用に関する声明のガイドラインに従い、東北大学大学院医学系研究科の動物管理委員会の承認を得た。</p> <p>2. PAI-1阻害剤のDDS化 2-1. デバイスの作製 PAI-1阻害剤をVASHと同様の方法でデバイス化した。</p> <p>2-2. In vitro徐放性 デバイスをPBSに浸漬し、定期的にPBSを回収・交換した。回収したPBSを高速液体クロマトグラフィーにかけ、PBS中に徐放されたPAI-1阻害剤を定量した。</p> <p>C. 研究結果 1. VASH-DDS 1-1. In vitro徐放性 カプセル化していないVASH-pellet (Pellet) は試験開始直後から大量放出（初期バースト）が見られ、約1日で充填したVASHのほとんどが放出されていた。一方で、VASH原液DDS (10VDD) からは、VASHが持続的に徐放され、初期バーストが抑制されていた。VASH1/10DDS (VDD) でも同様に初期バーストが抑制されていたが、VASH充填量が少ない分、放出量は少なかった。Negative controlのPBS-DDS (NVDD) からは、いずれの時期も値は観察されなかった。過去に報告したモデルドラッグFITC-dextran 40kDa(FD40)を薬剤として検討した</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
分担研究報告書

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と  
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究分担者 永井 展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教

結果では14日後に全体の約1/200徐放されていたが、今回の結果では14日後に充填したVASHの約1/72.5が徐放されており、ほぼ同様の徐放プロファイルを示している事が分かった。

1-2. 徐放VASHの生物活性

HUVECはVEGF濃度に比例して、Tube formationが細長くなることを確認した。徐放VASH培地では、コントロールの徐放PBS培地および2nM VEGFのみの培地と比較して、Tube formationの長さが短い、すなわち管腔形成が抑制されていることを確認した。Tube lengthの平均値は有意に抑制されていた。以上より、徐放VASHは生物活性を維持していることが示唆された。

1-3. 免疫組織化学的検査

10VDDでは、デバイス移植部位から視神経にかけてVASH陽性を示す蛍光が確認できた。拡大像からは蛍光が、強膜、脈絡膜、RPE、網膜内層に認め、VASHが眼内に移行していることが確認された。コントロールのNVDDでは蛍光は検出されなかった。現在この点については再検査中である。

2. PAI-1阻害剤-DDS

デバイスからPBSに放出されたPAI-1阻害剤の量を、高速液体クロマトグラフィー（島津）で測定した。その結果、初期バーストのない一定徐放を確認できた。

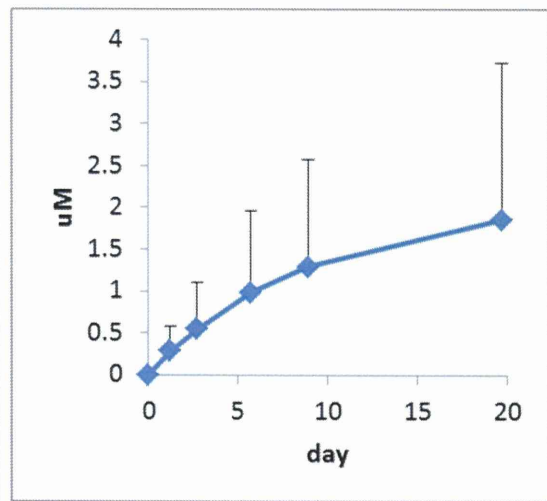


図. PAI-1阻害剤の徐放曲線

D. 考察

1. VASH-DDS

AMD治療で行われる抗VEGF抗体の硝子体注射は、眼内への副作用が問題であり、安全な眼内への投与方法が望まれる。本研究では、眼内を操作することなく、強膜から網膜へVASHを持続投与できるデバイスの可能性を示した。この経強膜デバイスを用いれば、従来の眼内注射をすることなく、安全にタンパク製剤を投与できる可能性を示している。

タンパク質のような分子量の大きい物質の徐放化はこれまで報告例が少ない。我々のデバイスは、生物活性を維持したまま約1か月にわたってVASHを一定徐放することができる。臨床では、分子量の大きいタンパク製剤が最近利用されており、これらの薬剤の徐放化に寄与できる可能性がある。また、本研究はレーザー誘発CNV動物モデルを用いて、経強膜的にCNVを抑制できる可能性を示した。また、CNV抑制効果は比較対象の硝子体注射とほぼ同等であり、眼内注射に代わる安全な投与方法である可能性が示された。

今後は、よりヒトに近いサルでの応用を検討する。また、他のスクリーニングされた薬