

201128145A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞の  
アポトーシス抑制効果の評価

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 馬場 耕一

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞の  
アポトーシス抑制効果の評価

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 馬場 耕一

平成 24 (2012) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価	----- 1
馬場 耕一	
II. 分担研究報告	
1. カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製と評価	----- 6
馬場 耕一	
2. カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価	----- 10
西田 幸二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----14

# 総括・分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

研究代表者 馬場 耕一 （大阪大学医学系研究科眼科教室）

研究要旨

フックス角膜内皮変性症は、角膜内皮細胞のアポトーシス（細胞死）の進行により角膜内皮細胞の機能が障害され重篤な視力障害が生じる難治性疾患である。現在、本疾患に対し角膜移植のほかに良好な治療法はない。しかし角膜移植はドナー不足の問題や拒絶反応など患者への負担も大きく、角膜移植にかわる治療法に高い関心が寄せられている。我々は簡便な点眼液の使用により角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制する方向から本疾患の治療法を探索することに着目した。アポトーシスにカルパインの活動が関与することに注目しカルパインの活動を点眼液で抑制するため、第一にカルパイン阻害剤ナノ粒子からなる点眼液の新規作製に着手した。その結果、ナノスプレードライヤー法によりカルパイン阻害剤のナノ粒子の作製に成功した。薬剤粒子サイズは1  $\mu\text{m}$ 程度以下であった。ポリソルベート80等の界面活性剤を併用しナノ粒子を水に分散化させることで点眼液の作製を行った。第二にカルパイン阻害剤のアポトーシス抑制効果を培養角膜内皮細胞実験系で検証した。培養ウサギ角膜内皮細胞に対して酸化ストレス障害下における角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果が示唆された。ヒト角膜内皮セルライン（HCEC-B4G12）および培養ヒト角膜内皮細胞でも検証を進めている。第三に経角膜的にクライオ処置（凍結処置）により角膜内皮障害を施したウサギでカルパイン阻害剤点眼液による細胞死抑制効果を検証した。その結果、カルパイン阻害剤点眼液を使用した系ではコントロール群と比較して、角膜内皮細胞死により生じる角膜混濁の進行に遅れが観察されたため、カルパイン阻害剤点眼液による角膜内皮細胞死の抑制が示唆された。本研究課題では、将来的なトランスレーショナルリサーチも視野に入れ、カルパイン阻害剤ナノ粒子の点眼液の使用による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を検証し、フックス角膜内皮変性症の新しい治療法開発の可能性を検討した。

研究分担者

西田幸二 大阪大学医学系研究科 眼科教室 教授

A. 研究目的

眼難治性疾患であるフックス角膜内皮変性症は原発性に角膜内皮が障害されアポトーシスによって進行性に内皮細胞数の減少をきたし視力が低下する疾患であり、本邦での患者数は数千～数万人と推定される。本疾患は優性遺伝性疾患とされるが女性に多いなど優性遺伝では説明のつかない遺伝形式をとり原因遺伝子も十分に明らかでなく老

化や環境因子など多因子疾患である可能性も高い。主な症状として両眼性に角膜浮腫による混濁が進行し、最終的には水疱性角膜症に至り手動弁ないし光覚弁にまで視力が低下する。また角膜浮腫に伴い角膜上皮びらんを生じやすくなり眼痛を繰り返す。角膜上皮びらんが遷延化すると角膜感染症の合併を生じやすくなるなどの症状があげられる。フックス角膜内皮変性症の遺伝子レベルでの原因解明とその治療には今後も時間を要し、現在角膜移植以外に有効な治療法はない。しかし角膜移植は拒絶反応やドナー不足などの問題があり患者へ

の負担も大きく、より簡便な手段での本疾患の治療が強く望まれている。

我々は本疾患が角膜内皮細胞のアポトーシスに関与する点に着目し角膜移植に変わりアポトーシスを抑制することで疾患治療ないしは病気の進行を遅らせることを考えた。細胞のアポトーシスには様々な要因が関与しておりタンパク分解酵素カルパインの活動もその一つである。本研究ではカルパイン阻害剤を使用することでカルパインの活動を抑制しそれに伴う角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価を目的とした。これまでに多くのカルパイン阻害剤が合成されている(図1)。本研究課題で使用するカルパイン阻害剤は動物実験レベルで神経細胞に対するアポトーシス抑制効果の有効性が報告されている。

眼疾患治療法の第一選択として簡便な点眼治療が望ましいが、本カルパイン阻害剤は難水溶性であるため水に分散させることが難しく、点眼液には不向きであり、通常水に懸濁させた経口投与での使用が考えられる。しかしながら経口投与では薬剤が全身に分布するため疾患部に薬物を有効濃度で到達させるためには、それ以上の過剰な薬物投与が必要であり、それに伴う薬剤の全身暴露による副作用の懸念などが問題として挙げられる。

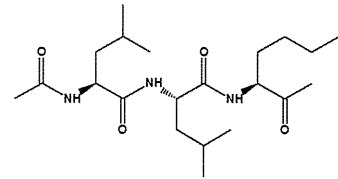
そのため患者に負担が少なく効果的に本疾患を治療するためには難水溶性カルパイン阻害剤の点眼液の開発が新たに必要である。

我々は長年ナノ粒子の研究に携わってきておりその基盤技術を用いて第一にカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液を作製し、第二に角膜内皮障害を施した培養ウサギ・ヒト角膜内皮細胞およびウサギ動物の実験系で点眼による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を検証した。

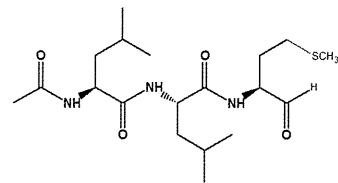
本研究課題の遂行によりカルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を明らかにし、かつナノ粒子点眼液によりカルパイン阻害剤を効果的に角膜内皮細胞に送達できれば、角膜移植によらない患者に負担の少ない新しい治療法への道筋をつけることになる。このように現在の眼科医療にカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液を取

り入れることは、難病フックス角膜内皮変性症の治療の安全性を向上させると共に治療効果の向上が期待でき、医学的・社会的貢献度は高いと考えている。

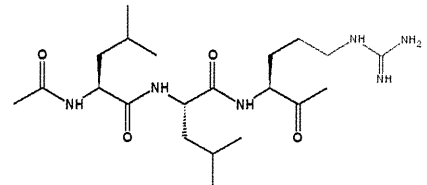
動物実験にあたり事前に動物実験専門委員会により実験計画書の審査が行われた。本研究課題遂行において動物愛護上の配慮は十分に行った。



カルパインインヒビター I



カルパインインヒビター II



ロイペテン

## B. 研究方法

研究項目1~3を本研究の遂行課題とした。

### 研究項目1: カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製と構造物性評価

ナノスプレードライヤーを用いて薬剤ナノ粒子を作製し、粒子サイズ制御及び水分散安定性が確保されたカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製と構造物性の評価を行った。分散化剤としてポリソルベート80等の界面活性剤を用いて検討を行った。

### 研究項目2: 培養ウサギ・ヒト角膜内皮細胞の障害モデル作製及びカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

カルパイン阻害剤の角膜内皮細胞に対するアポ

トーシス抑制効果を評価した。培養ウサギ角膜内皮細胞系に過酸化水素を添加し細胞に酸化ストレス障害を与えカルパイン阻害剤によるアポトーシス抑制効果を評価した。アポトーシス抑制効果の評価は TUNEL 法により行った。ヒト角膜内皮セルライン (HCEC-B4G12) および培養ヒト角膜内皮細胞についても同様の検証を行った。

### 研究項目 3：ウサギ動物実験の障害モデル作製及びカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

クライオ処置により経角膜的に角膜内皮に障害を施したウサギ動物実験系でカルパイン阻害剤点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を評価した。

## C. 研究結果

### 研究項目 1 について

ナノ粒子作製にナノスプレードライヤーを使用し、薬剤を溶解したエタノール溶液をスプレードライすることで、粒子サイズ 1  $\mu\text{m}$  以下程度の薬剤ナノ粒子を得ることに成功した。また同装置の機能・汎用性を検証する上で難水溶性のステロイド薬剤も使用したところ、同様の実験条件でデキサメタゾンやフルオロメトロンでナノ粒子の作製に成功した。薬剤は粉体で得られるため点眼液として使用するにあたり薬剤の水への再分散化を検討した結果、ポリソルベート 80 等の界面活性剤の使用により水への粒子分散化を認めたが、長期的な粒子安定分散のため粒子成長抑制など今後検討を進めていく予定である（結果詳細は分担者 馬場耕一 欄を参照）。

尚、ドラッグナノクリスタルの作製と物性評価 (Recent Patents on Nanomedicine, 1, 123-129, 2011) および蛍光性量子ドットを用いた単一分子イメージング法 (Theranostics, 2012, in press) のそれぞれについて難病疾患治療の方策の一助となることを期待し総説を著したことを付記する。

### 研究項目 2 について

過酸化水素添加により低酸化ストレスを与えた培養ウサギ角膜内皮細胞系で、カルパイン阻害剤の使用によるアポトーシス抑制効果が示唆された。ヒト角膜内皮セルラインおよび培養ヒト角膜内皮細胞系については最適な評価系の構築等を含め現在も薬理効果について検証を進めている。

### 研究項目 3 について

クライオ処理で経角膜的に障害を施したモデルウサギ実験系において、カルパイン阻害剤を点眼した系は、コントロール群と比較して角膜混濁の進行が遅れたことより角膜内皮細胞死の抑制が示唆された。（結果詳細は分担者 西田幸二 欄を参照）

## D. 考察

ナノスプレードライヤーを使用することで薬剤ナノ粒子の作製に成功した。本ナノスプレードライヤーは、ピエゾ式電圧ノズルを使用した全く新しいタイプのスプレードライヤー法であり、従来の二流体ノズル方式では得ることが困難であった微小サイズ液滴の形成によりその液滴サイズを反映したナノ粒子の作製に成功したと考えている。カルパイン阻害剤だけでなくステロイド薬剤においても同様のナノ粒子の作製に成功したため、本装置の使用は薬剤のナノ粒子化に有効な手段であると考えられる。得られた粉体は点眼液としての使用のため水に再分散させる手段が必要であり、ポリソルベート 80 等の界面活性剤の使用により粒子分散化が認められたが、長期的な粒子安定分散のためには粒子成長を抑制する方法等も今後とも検討したい。

酸化ストレスにより細胞のアポトーシスが進行することが知られるが、カルパイン阻害剤の使用により培養ウサギ角膜内皮細胞でのアポトーシスの抑制効果が示唆された。またフックス角膜内皮変性症は角膜内皮細胞の酸化ストレスにより症状が悪化することが報告されていることを鑑みれば、本手法による新しい治療法に期待が寄せられる。

クライオ処理で経角膜的に障害を施したウサギ

のモデル動物実験で、クライオ処置以前から点眼を開始し、処置後も直ちに点眼を続けた系では、コントロール群と比較して角膜混濁の進行に遅れが認められたため、カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞の細胞死抑制効果の可能性が示唆された。

以上の結果によりカルパイン阻害剤の使用はフックス角膜内皮変性症におけるアポトーシス抑制効果に寄与できると期待でき、新しい治療法の一つとして今後とも検証を進めていく価値があると考えている。

## E. 結論

ナノスプレードライヤーの使用により薬剤ナノ粒子粉体の作製に成功した。得られた粒子サイズは1  $\mu\text{m}$  程度以下であった。ポリソルベート 80 等の界面活性剤の使用により点眼液としての粒子分散化を行ったが、長期的な粒子安定水分散化の必要のため水中での薬剤の粒子成長を抑制する手段について今後とも検討を進めたい。また培養ウサギ角膜内皮実験系で酸化ストレス下におけるカルパイン阻害剤によるアポトーシス抑制効果の評価を行った。その結果、カルパイン阻害剤により培養ウサギ角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果が示唆された。ヒト角膜内皮セルラインおよび培養ヒト角膜内皮細胞において現在も検証を進めている。経角膜的にクライオ処置により角膜内皮障害を施したウサギ実験系においてクライオ処置直前より点眼を開始した系においては角膜内皮細胞死に伴う角膜混濁の遅延が認められたため角膜内皮細胞の細胞死の抑制が示唆された。組織学的評価やタネル染色評価等による薬理効果の詳細検証も現在進めている。本研究課題の成果によってカルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果が実証されれば、フックス角膜内皮変性症に対して新しいタイプの薬物治療法の可能性をもたらすことが期待できる。

## F. 健康危険情報 該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

① Koichi Baba, Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, Kohji Nishida: A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticles of hydrolyzable dye: J. Controlled Release, 2011, 153, 278-287.

② Koichi Baba, Hitoshi Kasai, Kohji Nishida, Hachiro Nakanishi: Functional Organic Nanocrystals: *in* Nanocrystal, Yoshitake Masuda ed., pp. 397-414, Chap. 15, Intec, Croatia, June 2011.

③ Koichi Baba, Kohji Nishida: Drug Nanocrystals: their physicochemical properties and production technologies, Recent Patents on Nanomedicine, 1, 123-129, 2011.

④ Koichi Baba, Kohji Nishida: Single molecule tracking in living cells using single quantum dot applications, Theranostics, 2012, in press.

### 2. 学会発表

① 国内招待講演) 馬場耕一, 「有機ナノ結晶の現在と製剤への応用」, 創薬フォーラム, 48回 薬剤学懇談会研究討論会プログラム: 先端科学技術と薬剤学の接点を探る, 山形県上山市 ホテル古窯, (2011年7月8日).

② 国際眼科フォーラム) Koichi Baba, Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, Kohji Nishida, Enhancing the ocular penetration of eye drops by using nanoparticles, Osaka University/The Chinese University of Hong Kong, Ophthalmology Forum 2011, Osaka, August 4, 2011



③ 国際招待講演) Koichi Baba, Nanoparticles of hydrolysable dye achieved the high ocular penetration by passing through the corneal barrier function, BIT' s 2nd Annual World Congress of NanoMedicine-2011, Shenzhen, China (3 Nov. 2011)

④ 国内招待講演) 馬場耕一, 有機ナノ結晶の新展開: 材料化学からバイオ分野へー作製技術とアプリケーション, 第六回 DDS 熊本シンポジウム, 熊本大学薬学部宮本記念館コンベンションホール, 熊本, (2012年3月6日)

⑤ 国際招待講演) Koichi Baba, A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticle formulation as a potential drug delivery system in ophthalmology, The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress April 15 (Sun), 2012; BEXCO, Busan, Korea.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

① 西田幸二, 馬場耕一, 笠井均, 田中佑治, 久保田亨, 横倉俊二, 「眼内移行性の高い点眼剤および蛍光イメージング剤ならびにそれらの製造方法」 (国際出願番号: PCT/JP2009/68851)

② 馬場耕一, 西田幸二, 橋田徳康, 特願 2012-99285 (出願日 H24. 4. 24)

2. 特許取得 なし

3. 実用新案登録 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製と評価

研究分担者 馬場 耕一（大阪大学医学系研究科眼科教室）

研究要旨

難水溶性のカルパイン阻害剤を点眼液として使用する場合、薬剤が水に溶けにくいため、薬剤形態は懸濁型となり、また懸濁液中の薬剤粒子サイズは数 $\mu\text{m}$ ～数十 $\mu\text{m}$ オーダー（マイクロ粒子）であるため、粒子サイズの要因から薬剤の溶解性および角膜への取り込み効率はきわめて低いことがこれまでの研究報告から推測される。一方で難水溶性の化合物類を点眼により眼内に効率よく移行させるためには、第一に薬剤粒子の微小化（ナノサイズ化）が効果的であることが最近の我々の研究により明らかになってきた。今回、薬剤の眼内移行性向上を目的としたカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製を行った。特にナノスプレードライヤーの使用により粒子サイズ1 $\mu\text{m}$ 以下のナノ粒子を作製することに成功した。また界面活性剤を使用することにより、粒子分散化を認めた。長期的な粒子安定分散系を得るためには、粒子成長抑制の観点からさらなる検討を進めていきたい。

A. 研究目的

ステロイドに代表される難水溶性の薬剤の点眼液は通常薬剤を水中に懸濁・分散させた状態で用いられる。懸濁液中の薬剤粒子の大きさはおよそ数 $\mu\text{m}$ ～数十 $\mu\text{m}$ 程度（マイクロ粒子）である。しかしながら、粒子サイズに起因した薬剤の水への低溶解性および大きな粒子サイズによる角膜への取り込みの悪さにより一般的に薬剤の眼内移行性は高くない。本研究課題で使用するカルパイン阻害剤もまた難水溶性であるため、効果的に薬剤の眼内移行性を確保するためには、薬剤のナノ粒子化による薬剤の溶解性向上及び角膜移行性向上が極めて有効であると考えている。本年度の研究課題では、ナノスプレードライヤーを用いた薬剤ナノ粒子作製について検証した。

B. 研究方法

研究項目1：カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製と構造物性評価

粒子サイズ制御及び水分散化されたカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の作製とその構造物性の評

価を行った。カルパイン阻害剤ナノ粒子を作製する手段としてナノスプレードライヤーを使用した。

ナノスプレードライヤーはピエゾ式電圧ノズルを使用した全く新しいタイプのスプレードライヤー法であり、従来の二流体ノズル方式では微細化の限界であった粒子径2 $\mu\text{m}$ を下回る微粒子を得ることができる。またナノスプレードライヤーには1回のナノ粒子化に数mg程度の薬剤が必要であり、最小限のサンプル量から効率よく微細粒子を回収（回収率90%）することが可能なため本装置は貴重な薬剤の取り扱いに向いている。1回の薬剤使用量が少ないことから多くの実験条件を検討可能で粒子サイズ制御され優れた眼内移行性を有するナノ粒子点眼液の作製に最適な装置である。薬剤が粉体として得られるため、水と任意の割合で混合させることができ、点眼液の濃度を低濃度から高濃度まで調整可能である。ナノ粒子のサイズ・構造は主に走査型電子顕微鏡観察により評価した。典型的な作製条件は、薬剤を溶解したエタノール溶液（50 mg/30 ml）をスプレードライヤーにかけ（ランニングタイム1-2h程）、粉体化

された薬剤を静電的に電極に吸着させゴム製のヘラにより回収し薬剤粉体を得た。これまでの我々の研究から薬剤が眼球内に効率よく移行するためには粒子サイズの制御が重要であると考えている。そのため効果的に角膜内皮細胞に薬剤が浸透可能な粒子サイズの目標値を粒子サイズ  $1 \mu\text{m}$  以下とした。

## C. 研究結果

### 研究項目 1

ナノ粒子作製にナノスプレードライヤーを使用した実験系で、薬剤を溶解したエタノール溶液をスプレードライすることで、粒子サイズ  $1 \mu\text{m}$  以下程度の薬剤ナノ粒子を得ることに成功した(図 1)。また同装置の機能・汎用性を検証する上で難水溶性のステロイド薬剤も使用したところ、同様の実験条件でデキサメタゾンやフルオロメトロンでナノ粒子の作製に成功した。薬剤は粉体で得られるため点眼液として使用するにあたり薬剤の水への再分散化が今後の検討事項であったが、点眼液で使用可能な界面活性剤であるポリソルベート 80 等を使用することで薬剤粉体を水に再分散化させた。但し長期的に安定なナノ粒子水分散液を作製するために、今後とも水中での粒子成長を抑制させる条件の検討を進めていく。

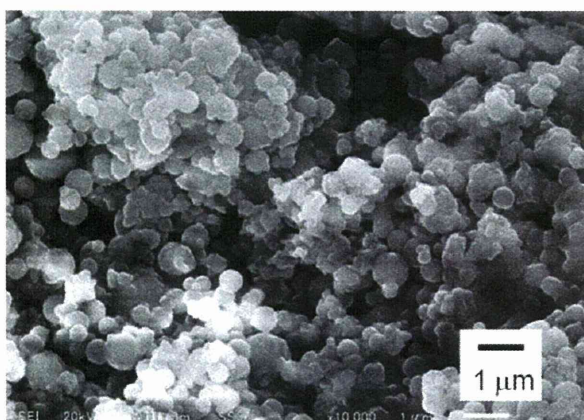


図 1 : ナノスプレードライヤーによるナノ粒子作製の一例

### ナノ粒子点眼剤の眼内移行性評価について

ナノ粒子点眼液を点眼投与した際、ナノ粒子の眼内移行性及びその眼内動態については他に知見

が少なく不明な点も多い。我々はカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液を用いた研究に先立ち、蛍光能を有するナノ粒子点眼液を用いて検証を行ったが、この度ナノ粒子の眼内移行性及びその眼内動態を蛍光分光法及び共焦点レーザー顕微鏡観察により明らかにすることに成功した(論文; K. Baba et al, Journal of Controlled Release, 153, 278-287, 2011)。結果、蛍光強度から定量するとナノ粒子点眼液の使用は同化合物のマイクロ粒子点眼液(粒子サイズ: 数~数十マイクロメートル)の使用より数十倍も眼内移行性を高めることが明らかとなった。また共焦点レーザー顕微鏡により眼球の蛍光観察を行ったところナノ粒子点眼後、ナノ粒子由来の化合物が角膜上皮、角膜実質を通過し角膜内皮にまで高濃度で浸透していることが明らかとなった。同マイクロ粒子点眼には観察されないナノ粒子特有の現象でありナノ粒子点眼液の眼内移行性に対する有効性を示している。また関連する国内特許及び PCT を出願済みであることも付記する(国際出願番号: PCT/JP2009/68851)。カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液の研究を遂行する上で参考となる重要な研究成果であると考えている。

## D. 考察

我々の研究から薬剤を眼内に効率よく移行させるためには粒子サイズの制御、特に薬剤のナノ粒子化が重要と考えている。ナノスプレードライヤーの使用は本薬剤のナノ粒子化に有益な手段であることが明らかとなった。ナノ粒子化に成功した要因は、薬剤を溶かした溶液のスプレー後の液滴サイズがナノ粒子を作製可能な程十分に小さく、液滴サイズを反映したナノ粒子の生成が生じたためと考えている。より最適化されたナノ粒子作製の詳細な実験条件は現在も検討中である。カルパイン阻害剤だけでなくステロイド薬剤においても同様にナノ粒子の作製に成功したため、本装置の使用は薬剤のナノ粒子化に有効な手段であると考えられる。

得られた粉体を点眼液として使用のため水に再分散させる手段を検討したが、点眼液で使用可能

なポリソルベート 80 等の界面活性剤を使用することで薬剤粉体を水に再分散化させた。但しナノ粒子を長期的に水に安定分散させるためには水中での粒子成長を抑制する手段を講じる必要があり、今後とも検証を進めていく。

## E. 結論

ナノスプレードライヤーの使用によりナノ粒子粉体の作製に成功した。得られた粒子サイズは 1  $\mu\text{m}$  程度以下であった。本粉体を点眼液として使用するためナノ粒子粉体の水分化を検討した結果、界面活性剤の使用で薬剤の水分散化を行った。但し長期的なナノ粒子の水分散安定性を確保するためには粒子成長を抑制する手段を講じることが求められると考えている。

## F. 健康危険情報 該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

① Koichi Baba, Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, Kohji Nishida: A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticles of hydrolyzable dye: J. Controlled Release, 2011, 153, 278-287.

② Koichi Baba, Hitoshi Kasai, Kohji Nishida, Hachiro Nakanishi: Functional Organic Nanocrystals: *in* Nanocrystal, Yoshitake Masuda ed., pp. 397-414, Chap. 15, Intec, Croatia, June 2011.

③ Koichi Baba, Kohji Nishida: Drug nanocrystals: their physicochemical properties and production technologies, Recent Patents on Nanomedicine, 1, 123-129, 2011.

④ Koichi Baba, Kohji Nishida: Single molecule tracking in living cells using single quantum dot applications, Theranostics, 2012, in press.

### 2. 学会発表

① 国内招待講演) 馬場耕一, 「有機ナノ結晶の現在と製剤への応用」, 創薬フォーラム, 48 回 薬剤学懇談会研究討論会プログラム: 先端科学技術と薬剤学の接点を探る, 山形県上山市 ホテル古窯, (2011 年 7 月 8 日).

② 国際眼科フォーラム) Koichi Baba, Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, Kohji Nishida, Enhancing the ocular penetration of eye drops by using nanoparticles, Osaka University/The Chinese University of Hong Kong, Ophthalmology Forum 2011, Osaka, August 4, 2011

③ 国際招待講演) Koichi Baba, Nanoparticles of hydrolysable dye achieved the high ocular penetration by passing through the corneal barrier function, BIT's 2nd Annual World Congress of NanoMedicine-2011, Shenzhen, China (3 Nov. 2011)

④ 国内招待講演) 馬場耕一, 有機ナノ結晶の新展開: 材料化学からバイオ分野へー作製技術とアプリケーション, 第六回 DDS 熊本シンポジウム, 熊本大学薬学部宮本記念館コンベンションホール, 熊本, (2012 年 3 月 6 日)

⑤ 国際招待講演) Koichi Baba, A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticle formulation as a potential drug delivery system in ophthalmology, The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress April 15 (Sun), 2012; BEXCO, Busan, Korea.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

① 西田幸二, 馬場耕一, 笠井均, 田中佑治, 久保田亨, 横倉俊二、「眼内移行性の高い点眼剤および蛍光イメージング剤ならびにそれらの製造方法」(国際出願番号:PCT/JP2009/68851)

② 馬場耕一, 西田幸二, 橋田徳康、特願 2012-99285 (出願日 H24. 4. 24)

2. 特許取得 なし

3. 実用新案登録 なし

カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

研究分担者 西田 幸二 （大阪大学医学系研究科眼科教室）

研究要旨

フックス角膜内皮変性症は疾患原因が遺伝子にあると考えられるが根治療法が確立されておらず、症状が悪化すると失明にいたる場合もある重篤疾患である。本研究課題ではフックス角膜内皮変性症の過程で生じる角膜内皮細胞のアポトーシスを薬剤により抑制させる方法から本疾患の治療法を探索しその有効性を検証した。薬剤にカルパイン阻害剤を使用した結果、培養ウサギ角膜内皮細胞を用いて酸化ストレスを加えた実験系でカルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果が示唆された。経角膜的にクライオ処置により角膜内皮細胞に障害を施したウサギ実験系において、カルパイン阻害剤の点眼を行った系はコントロール群と比較して、角膜内皮細胞死に伴う角膜混濁の進行の遅延が認められたため、カルパイン阻害剤による角膜内皮の細胞死抑制が示唆された。

A. 研究目的

眼難治性疾患であるフックス角膜内皮変性症は原発性に角膜内皮が障害されアポトーシスにより進行性に内皮細胞数の減少をきたし視力が低下する疾患であり、本邦での患者数は数千～数万人と推定される。フックス角膜内皮変性症について現在角膜移植以外に有効な治療法はない。しかし角膜移植は拒絶反応やドナー不足等の問題があり患者への負担も大きく、より簡便な手段による本疾患の治療が強く望まれている。

角膜移植に変わる治療法として我々は本疾患が角膜内皮細胞のアポトーシスによる点に着目しアポトーシスを防ぐことで疾患治療ないしは病気の進行を遅らせることができるのではと考えた。細胞のアポトーシスには様々な要因が関与しておりタンパク分解酵素カルパインの寄与もその一つである。本研究ではカルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を培養ウサギ角膜内皮細胞、ヒト角膜内皮セルラインおよび培養ヒト角膜内皮細胞系で検証することを目標とした。

B. 研究方法

研究項目2について

過酸化水素添加により低酸化ストレスを与えた培養ウサギ角膜内皮細胞系で、カルパイン阻害剤の使用によるアポトーシス抑制効果を検証した。ヒト角膜内皮セルライン (HCEC-B4G12) 及びヒト角膜内皮培養細胞を用いた系について同様の検証を行った。

研究項目3：ウサギ動物実験の障害モデル作製及びカルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果の評価

麻酔を施した白色ウサギにクライオ処置により経角膜的に角膜内皮に障害を与えた。薬理効果の評価にあたり二つのモデルで検証した。一つの系はクライオ処置を施し角膜内皮にダメージを与え、角膜が混濁したことを確認後、点眼を開始し、角膜懸濁の進行抑制もしくは懸濁の消失が生じるかを観察した。もう一つの系は、クライオ処置前に事前に薬剤を点眼しておき、クライオ処置後からも直ちに点眼を続けた。点眼を施さないコントロール群と比較して角膜の混濁具合に差がみられるかを検証した。点眼は1日3回行った。前者の系は2週間点眼を続け、後者の系は1週間点眼を続けた。

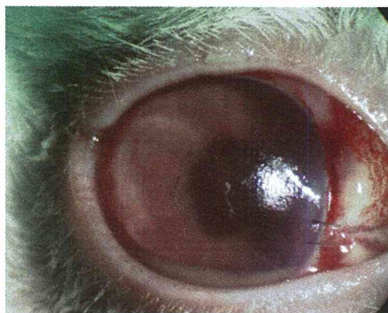
## C. 研究結果

### 研究項目2について

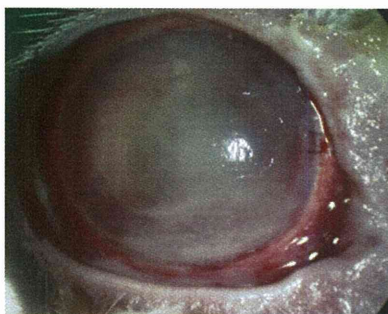
カルパイン阻害剤の使用により培養ウサギ角膜内皮細胞のアポトーシス抑制が示唆された。ヒト角膜内皮セルライン及びヒト角膜内皮培養細胞を用いた実験系については評価系の構築も含め詳細な検証を現在も進めている。

### 研究項目3について

クライオ処置を施し角膜が混濁したことを確認したのち点眼を開始した系では、ナノ粒子点眼、懸濁液点眼、コントロールで比較を行なったが、三者に優位差は見られず全ての角膜の混濁が経時的に進行した。一方、クライオ処置を施す直前から点眼を施し、処置後も直ちに点眼を続けた系では、特に高濃度点眼（5%）を3日続けた系で角膜の白濁の進行が遅延している様子が観察された。点眼を施さないコントロールの系では3日目には混濁が進行していた（図1）。



高濃度点眼



コントロール

図1：クライオ処置後の角膜の様子。  
（上）高濃度点眼、（下）点眼処置なし

また超音波診断により角膜の厚みを測定したところ、白濁したコントロールの系は内皮のポンプ機能が破壊されていることが推測され実質が膨潤しており平均膜厚が523 $\mu\text{m}$ であったが、高濃度点眼を施した系は平均膜厚が314 $\mu\text{m}$ であったため、点眼による細胞死抑制が示唆された（表1）。組織学的評価やタネル染色評価等による薬理効果の詳細を現在も検証中である。

表1：角膜の厚み測定の結果

	膜厚 ( $\mu\text{m}$ )					平均膜厚 ( $\mu\text{m}$ )
高濃度点眼	332	312	288	297	339	314
コントロール	525	539	520	536	495	523

## D. 考察

カルパイン阻害剤による細胞のアポトーシス抑制効果の研究報告が近年なされているが、角膜内皮細胞においても同様にカルパイン阻害剤を点眼液することで角膜内皮のアポトーシス抑制効果を得る可能性が期待できる。

酸化ストレスにより細胞のアポトーシスが進行することが知られるが、本カルパイン阻害剤の使用により培養ウサギ角膜内皮細胞でのアポトーシスの抑制効果が示唆された。フックス角膜内皮変性症は酸化ストレスにより病状が悪化する報告がなされているため、カルパイン阻害剤の使用はフックス角膜内皮変性症における酸化ストレスを介したアポトーシス抑制効果に寄与できると期待でき、新しい治療法の一つとして検証していく価値があると考えている。現在ヒト角膜内皮セルライン及び培養ヒト角膜内皮細胞においても検証を進めている。

クライオ処置を施した動物実験モデルにおいて角膜が混濁したのち点眼を施しても、すでに角膜内皮細胞が死滅しているため角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果を観ることができなかつたと推測している。一方でクライオ処置直前より点眼を続けた系では点眼を施さない系より角膜混濁の進行が遅れたため、角膜内皮細胞の細胞死抑制効果

に寄与があった可能性が示唆された。現在も詳細な検証を進めている。

## E. 結論

酸化ストレス下の培養ウサギ角膜内皮細胞系でカルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果が示唆された。ヒト角膜内皮セルライン及びヒト角膜内皮培養細胞において引き続き検証中である。

クライオ処置を施した動物モデルにおいてクライオ処置直前より点眼を開始した系においては角膜混濁進行の遅延が観察されたため角膜内皮細胞死の抑制が示唆された。現在も詳細検証を進めている。カルパイン阻害剤による角膜内皮細胞のアポトーシス抑制効果が実証できれば、フックス角膜内皮変性症に対して新しい薬剤治療の可能性が期待できる。

## F. 健康危険情報 該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

① Koichi Baba, Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, Kohji Nishida: A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticles of hydrolyzable dye: J. Controlled Release, 2011, 153, 278-287.

② Koichi Baba, Hitoshi Kasai, Kohji Nishida, Hachiro Nakanishi: Functional Organic Nanocrystals: *in* Nanocrystal, Yoshitake Masuda ed., pp. 397-414, Chap. 15, Intec, Croatia, June 2011.

③ Koichi Baba, Kohji Nishida: Drug nanocrystals: their physicochemical properties and production technologies, Recent Patents on Nanomedicine, 1, 123-129, 2011.

④ Koichi Baba, Kohji Nishida: Single molecule tracking in living cells using single quantum dot applications, Theranostics, 2012, in press.

### 2. 学会発表

① 国際眼科フォーラム) Koichi Baba, Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, Kohji Nishida, Enhancing the ocular penetration of eye drops by using nanoparticles, Osaka University/The Chinese University of Hong Kong, Ophthalmology Forum 2011, Osaka, August 4, 2011

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

① 西田幸二, 馬場耕一, 笠井均, 田中佑治, 久保田亨, 横倉俊二、「眼内移行性の高い点眼剤および蛍光イメージング剤ならびにそれらの製造方法」(国際出願番号:PCT/JP2009/68851)

② 馬場耕一, 西田幸二, 橋田徳康、特願 2012-99285 (出願日 H24. 4. 24)

2. 特許取得 なし

3. 実用新案登録 なし



# 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Koichi Baba</u> , Hitoshi Kasai, <u>Kohji Nishida</u> , Hachiro Nakanishi	Functional Organic Nanocrystals	Yoshitake Masuda	Nanocrystal	INTECH	Croatia	2011	pp. 397-414 (Chap. 15)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号・ページ	出版年
<u>Koichi Baba</u> , Yuji Tanaka, Akira Kubota, Hitoshi Kasai, Shunji Yokokura, Hachiro Nakanishi, <u>Kohji Nishida</u>	A method for enhancing the ocular penetration of eye drops using nanoparticles of hydrolyzable dye	Journal of Controlled Release	153, 278-287	2011
<u>Koichi Baba</u> , <u>Kohji Nishida</u>	Drug nanocrystals: their physicochemical properties and production technologies	Recent Patents on Nanomedicine	1, 123-129	2011
<u>Koichi Baba</u> , <u>Kohji Nishida</u>	Single molecule tracking in living cells using single quantum dot applications	Theranostics	in press	2012

研究成果の刊行物・別刷

## Functional Organic Nanocrystals

Koichi Baba<sup>1</sup>, Hitoshi Kasai<sup>2,3</sup>, Kohji Nishida<sup>1</sup> and Hachiro Nakanishi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Osaka University*

<sup>2</sup>*Tohoku University*

<sup>3</sup>*PRESTO, Japan Science and Technology Agency  
Japan*

### 1. Introduction

The topic in this chapter concerns organic nanocrystals. Numerous scientific researches of nanocrystals are focusing on inorganic compounds such as a metal and a semiconductor. The research related to organic nanocrystals is relatively new compared to that of inorganic nanocrystals. Nearly two decades ago, our research team had developed a novel preparation method of organic nanocrystals, what we call the reprecipitation method. Since then, we have been leading the research area of organic nanocrystals. The reprecipitation method has bottom-up type with a wet process procedure to prepare organic nanocrystals, and organic nanocrystals are obtained as their water dispersion. Numerous numbers of organic compounds are allowed to be a candidate for a targeting of organic nanocrystals by means of using the reprecipitation method. Functional organic nanocrystals have been attracted in a scientific and technological area of materials. In this chapter, first we mention the research back ground of organic nanocrystals, and then introduce the preparation method of organic nanocrystals, i.e. the reprecipitation method, and their improved ones. Then, several kinds of functional organic nanocrystals relating to optoelectrical materials, nanomedicine, and biophotonics are mentioned. Recent topics of organic nanocrystals achieved by several groups are briefly introduced. In this chapter, the topics are proceeding as follows:

1. Back ground of the research of organic nanocrystals
2. Preparation method of organic nanocrystals
3. Several functional organic nanocrystals
4. Recent topics of organic nanocrystals achieved by several groups

### 2. Back ground of the research of organic nanocrystals

Fabrication of nanocrystals and their nanostructure has been investigated extensively for metals (Ung et al., 1997) and semiconductors (Murray et al., 1993), and many characteristic properties have already been shown. For example, a novel and unique optical property called the quantum size effect (Nakamura, 1992) was found for such inorganic nanocrystals in a size of a few nanometres (e.g. nonlinear optics, semiconductor lasing, and quantum dot applications).

For organic nanocrystals, however, nanocrystals fabrication has so far rarely been investigated, owing to their thermal instability, except for the thermally stable