

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 俊明

平成25（2013）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. 網膜神経保護治療のための新規薬剤開発に関する研究 中澤 徹 (資料) 資料名	-----	8
2. 網膜保護新規候補薬剤の設計と機能評価に関する研究 植田弘師 (資料) 資料名	-----	12
3. 網膜保護用デバイスの開発と効果に関する研究 永井展裕 (資料) 資料名	-----	16
4. 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 西澤松彦 (資料) 資料名	-----	22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	34

<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： 研究計画は安全性が担保された既存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うことと、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し網膜保護をめざすことが目標である。今年度は既存薬ライブラリーからのスクリーニングを終了した。陽性コントロールと同等の効果を含む約 200 種類がスクリーニングされた。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、ウサギ、サル用の作製を行い、実際にそれぞれの動物に移植した。それぞれ、デバイスのサイズのみでなく眼球曲率などに合わせた工夫が必要であった。デバイスの初期型はサルに移植した場合、一部で脱落するものが見られたが、形状を変えて移植しなおしたことで、脱落は無くなった。ラット移植用のデバイスで網膜保護効果を確認した。蛍光色素がデバイスから徐放されて網膜に達するのを確認し、さらに GGA (350Da) を徐放させた場合、網膜光障害から網膜を保護することを網膜電図、網膜組織厚で証明した。高分子の代表としてバソヒビン (42kDa) を利用したが、ラット脈絡膜新生血管を抑制した (PLoS One)。デバイスの強膜上移植で薬剤の効能に合わせた網膜保護効果が動物モデルで確認できた。本結果から我々の目指すものが、特に網膜疾患治療において創薬プロセス革新の一旦を担うことが可能であると考えられた。</p>	
<p>A. 研究目的 “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の眼球表面（眼内操作はしない）から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。</p>	<p>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。</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>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たり、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. 研究方法 1) 研究体制 我々はまず東北大学臨床研究推進センター内の薬事や臨床開発の専門家によるチームを結成した。臨床研究推進センターには治験コーディネーター、CRC等も配置されており、将来の臨床応用に備えた体制を整えた。</p> <p>2) 候補薬剤スクリーニング（23年度からの継続） スクリーニング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（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）。</p>	<p>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>3) デバイスの作製（24年度） TEGDM (Mw283) でデバイス外側を作成する。薬剤はPEG/TEG比を調整して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。担当：西澤、阿部、永井</p> <p>4) 薬効検討システム（24年度分） （1）ラット網膜変性モデルで検討する。網膜変性モデルは光障害モデル、遺伝性網膜変性モデルを利用する。遺伝性網膜変性は、視細胞に異常遺伝子が発現するモデルと網膜色素上皮細胞に異常遺伝子が存在するモデルを使用予定。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・宮田敏男教授の化合物デザインチームと共同研究）。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などで定量を行う。</p> <p>（2）ウサギ遺伝子改変網膜変性モデルの利用。1薬剤ず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、網膜変性ウサギへの効果をまとめて確認し、さらに複数薬剤投与の効果も確認</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>する。対眼はコントロールに利用する。3種類の薬剤を使用するときは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>（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>C. 研究結果（24年度）</p> <p><u>（1）薬剤ライブラリーのスクリーニング</u> 既存薬ライブラリー（2314 種）からのスクリーニングが終了した。 まず人網膜色素上皮細胞株（ARPE）を用いて低栄養・虚血負荷（血清、グルコース非含有培地、2% 酸素下）に各種薬剤を 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て保護薬のスクリーニングを終了した。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。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ートしたものをポジティブコントロールとした。その結果 285 種で GGA と同等かより効果が見られた。さらにポジティブコントロールと同等の効果が見られるヒット化合物を見出した（23 年度の報告書で 2 つと記載したが、実際は同一の化合物であった）。本化合物は網膜神経節細胞を利用した負荷培養でも濃度依存的に効果を示した。</p> <p><u>（2）スクリーニングされた化合物とデバイスを用いた神経保護薬の探索</u> 上記で保護効果の見られた薬剤を順次デバイスに包埋し網膜保護効果を確認することを目指した。まず薬剤徐放に先立って蛍光色素の網膜内への徐放を確認したが、移植 1 日で最低でも網膜色素上皮に達し、3 日では神経網膜内に広がるのが確認された。</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） （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>① 低分子徐放による網膜保護効果の検討</p> <p>デバイスからの徐放が網膜保護効果を示すか、まず低分子の代表として GGA を用いて、網膜光障害に対する効果について検討した。これは既報で GGA の硝子体内投与が光障害から網膜を保護することが報告されているために、本デバイスの効果を確かめたいと考えて行われた。その結果、網膜電図では GGA 徐放デバイス移植群で有意に網膜保護効果が確認された。さらに眼球摘出後、網膜外顆粒層（ONL）の厚さを視神経乳頭から網膜鋸状縁まで計測したが、デバイス移植側で有意に ONL の厚さが保たれることも確認した。徐放される GGA の量も徐放膜は PEG60% が最適であることが判明した。</p> <p>② 高分子徐放による網膜保護効果の検討</p> <p>高分子の代表としてバソヒビン（40 kDa）を徐放するデバイスを作製した。バソヒビンは上記負荷モデルで網膜色素上皮の保護効果があることが判明したが、まず本来ある新生血管抑制効果を確認するためにデバイスから徐放されるバソヒビンの新生血管抑制作用を <i>in vitro</i> で確認し、<i>in vivo</i> ではラットに新生血管モデル（CNV）を作製して検討した。デバイスから徐放されたバソヒビンは、培地中に直接投与のバソヒビンと同様の新生血管抑制作用が確認できた。さらにバソヒビン徐放デバイス強膜上移植群では有意に CNV 抑制効果があることが判明した。Flat mount を作製した標本の検討ではバソヒビン徐放量の多いデバイス移植でより効果が見られた。</p>	<p>D. 考察</p> <p>本研究では、安全性が担保されている薬剤ライブラリーから網膜細胞に保護効果のある薬剤をスクリーニングして、強膜上から徐放することで網膜保護効果を確認した。本方法は近年特に注目を集めている drug reprogramming strategy (DR) の 1 つになると考えられるが、今回の検討で注目されるのは、DR をさらに有効にする手段として局所で安全に薬剤徐放デバイスを機能させたことにある。創薬は化合物のスクリーニングのあとに構造最適化などの複雑なプロセスが含まれるが、我々が開発した強膜上薬剤徐放デバイスはこれまで検討した薬剤を十分に網膜に徐放していると考えられる。本研究は創薬プロセスの革新に眼科領域から取り組むことに成功していると言え、これからの行政施策にも貢献できると考える。</p> <p>E. 結論</p> <p>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、徐放薬剤の網膜保護効果も確認された。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>F. 健康危険情報</p> <p>該当なし</p>

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業） （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	
G. 研究発表 1. 論文発表 1. Abe T, Tokita-Ishikawa Y, Onami H, Katsukura Y, Kaji H, Nishizawa M, Nagai N. Intra-scleral transplantation of collagen sheet with cultured brain-derived neurotrophic factor expressing cells partially rescued the retina from the damage of acute high intraocular pressure. Adv Exp Med Biol ;in press. 2. Onami H, Nagai N, Kaji H, Nishizawa M, Sato Y, Osumi N, Nakazawa T, Abe T. Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppressed experimentally-induced choroidal neovascularization. <i>PLoS One</i> . 2013;8(3):e58580 3. Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. Ahmed Y Shanab, Toru Nakazawa, Morin Ryu, Yuji Tanaka, Noriko Himori, Keiko Taguchi, Masayuki Yasuda, Ryo Watanabe, Jiro Takano; Saïdo Takaomi, Naoko Minegishi; Toshio Miyata, Toshiaki Abe, Masayuki, Yamamoto, <i>Neurobiol Dis</i> . 2012 Dec;48(3):556-67. 4. Intraocular Concentrations of Cytokines and Chemokines in Rhegmatogenous Retinal Detachment and the Effect of Intravitreal Triamcinolone Acetonide” Hiroshi Kunikata, Masayuki Yasuda, Naoko Aizawa, Yuji Tanaka, Toshiaki Abe, and Toru Nakazawa. <i>AJO</i> ,2013 Jun;155(6):1028-1037. 5. Efficacy of combined 25-gauge microincision vitrectomy, intraocular lens implantation, and posterior capsulotomy. Aizawa N, Kunikata H, Abe T, Nakazawa T. <i>J Cataract Refract Surg</i> . 2012 Sep;38(9):1602-7.	6. Choroidal excavation with polypoidal choroidal vasculopathy: a case report. Kobayashi W, Abe T, Tamai H, Nakazawa T. <i>Clin Ophthalmol</i> . 2012;6:1373-6. Epub 2012 Aug 27. 7. 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</i> . 2012 Jun;32(6):1204-13 8. Yumi Tokita-Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Hikaru Sonoda, Tomoaki Takakura, Yasufumi Sato, <u>Toshiaki Abe</u> . “Vasohibin and retinal pigment epithelium” Adv Exp Med Biol , 723, 305-310 (2012) 9. 浅野俊一郎、阿部俊明、國方彦志、今留尚人、高橋麻衣、中澤徹：右眼に急性網膜壊死を発症した16年後に左眼にも発症した1例。 10. 雪田昌克、國方彦志、小林航、小林直樹、阿部俊明、中澤徹：角膜染血を伴う硝子体出血に広角観察システム併用25G手術が奏功した一例。臨床眼科。2013。印刷中 11. 相澤奈帆子、國方彦志、岡村知世子、阿部俊明、中澤徹：25G硝子体手術中の脈絡膜剥離。眼科臨床紀要5(8)：792-796, 2012. 8. 12. 金澤紘子、國方彦志、安田正幸、新田文彦、鬼怒川次郎、阿部俊明、中澤徹：特発性黄斑円孔に対する硝子体手術成績とトリアムシノロンアセトニドの効果。臨床眼科66(8)：1219-1224, 2012. 8. 13. 黄斑円孔術後に発症した脈絡膜新生血管の一例 伊藤梓、國方彦志、阿部俊明、安田正幸、中澤徹 眼科臨床紀要2012:5(9)855-859.

<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>2. 学会発表 (国際学会発表)</p> <p>1. Hirokazu Kaji, Nobuhiro Nagai, Takuya Yamada, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe. An Implantable Drug Delivery Device for Treating Retinal Disorders. 2012 IEEE-EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference</p> <p>2. Toshiaki Abe, Yumi Tokita-Ishikawa, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Nobuhiro Nagai. : Intra-scleral transplanation of collagen sheet with cultured brain-derived neurotrophic factor expressing cells partially rescued the retina from the damage of acute high intraocular pressure. XVth International Symposium on Retinal Degeneration. July 16-21, 2012. Bad Gögging, Bavaria, Germany</p> <p>3. Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Hirokazu Kaji, Takuya Yamada, Yuki Katsukura, Machiko Sato, Yumi Ishikawa, Toru Nakazawa, Matsuhiko Nishizawa, and Toshiaki Abe. Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Light-induced Retinal Damage in Rats. 2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida.</p> <p>4. Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe. Suppression of Rat Choroidal Neovascularization by Transscleral Vasohibin-1 Delivery Device. 2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida.</p>	<p>(国内学会発表)</p> <p>1. 相澤奈帆子、國方彦志、新田文彦、阿部俊明、中澤徹 トロピカミド・フェニレフリン塩酸塩点眼による眼底血流への影響 日本網膜硝子体学会 2012/11/30</p> <p>2. 高橋秀肇、阿部俊明、國方彦志、中澤徹 ぶどう膜炎を合併したMPPEから増殖性硝子体網膜症に至った1例 日本網膜硝子体学会 2012/11/30</p> <p>3. 前川重人、阿部俊明、國方彦志、中澤徹 急性網膜壊死52眼に対する硝子体硝子体手術後成績 日本網膜硝子体学会 2012/11/30</p> <p>4. 新田文彦、國方彦志、阿部俊明、中澤徹 ペガプタニブ硝子体投与の眼循環血流に与える影響 日本網膜硝子体学会 2012/11/30</p> <p>5. 萱場寛子、阿部俊明、國方彦志、新田文彦、中澤徹 無光覚に陥った加齢黄斑変性の背景に関する検討 日本網膜硝子体学会 2012/11/30</p> <p>6. 新田文彦、國方彦志、阿部俊明、中澤徹 糖尿病黄斑浮腫におけるトリアムシノロン後部テノン嚢下注射前後の眼血流変化の検討 日本臨床眼科学会 2012/10/25</p> <p>7. 相澤奈帆子、國方彦志、目黒泰彦、阿部俊明、中澤徹 2.5G小切開硝子体手術での後嚢切開併施トーリック眼内レンズ挿入術の有用性 日本臨床眼科学会 2012/10/25</p> <p>8. 國方彦志、相澤奈帆子、布施昇男、阿部俊明、中澤徹 線維柱帯切除後眼に対する2.5G硝子体手術 日本臨床眼科学会 2012/10/25</p> <p>9. 12. 雪田昌克、國方彦志、小林航、阿部俊明、中澤徹 強い角膜血染混濁を伴う硝子体出血に広角観察系25G手術が奏功した一例 日本臨床眼科学会 2012/10/25</p> <p>10. 浅野俊一郎、今留尚人、大友孝昭、阿部俊明、中澤徹 右眼にARNを発</p>
<p>- 6 -</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>症した 16 年後に左眼にも発症した 1 例 日本臨床眼科学会 2012/10/25</p> <p>1 1. 阿部俊明：加齢と眼～眼の病気を知りましょう～ 市民公開講座NTT病院 2012/7/25</p> <p>1 2. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、西澤松彦、中澤徹、阿部俊明 プロテインドラッグ眼内徐放デバイスによる加齢黄斑変性治療の試み 日本DDS学会 2012/7/4-5</p> <p>1 3. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、中澤徹、西澤松彦、阿部俊明 網膜光障害モデルに対する経強膜DDSの網膜保護効果 日本DDS学会 2012/7/4-5</p> <p>1 4. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明 分子徐放デバイスと神経保護 東北臨床超微形態話会</p> <p>1 5. 阿部俊明：加齢黄斑変性の予防と治療 元気健康フェア 2012/4/29</p> <p>1 6. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、涌澤亮介、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明：経強膜 vasohibin 徐放デバイスによるラット脈絡膜新生血管抑制 第 116 回日本眼科学会総会 2012/4/5-8</p> <p>1 7. 新田文彦、國方彦志、永富良一、牛凱軍、玉井洋、相澤奈帆子、志賀由己浩、阿部俊明、中澤徹 健常人でのレーザースペックル（無散瞳タイプ）の眼循環血流の波形解析と年齢の検討第 116 回日本眼科学会総会 2012/4/5-8</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>

<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>重症眼疾患と神経保護治療</p> <p>研究分担者 中澤徹 東北大学大学院医学系研究科 教授</p>	
<p>研究要旨： 本研究では、ARPE-19 に対して既存薬ライブラリーからスクリーニングを行い、GGA と同等以上の保護効果を示す薬剤がさらに 29 剤あると考えられた。</p>	
<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ートしたものをポジティブコントロールとした。</p>	<p>（倫理面への配慮） 本研究で動物実験を行う際は、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。また動物実験に関しては、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前年度の残り697剤のうち、29 剤がGGAより高い活性を示した。しかし、その中で前年度のヒット化合物であるクロトリマゾールと同等以上の保護効果を示す化合物は見出すことはできなかった。</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	
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>D. 考察 今年度は既存薬ライブラリーからのスクリーニングをすべて完了させ、GGAより強い活性を示す薬剤を29剤見出すことができた（昨年までに約200剤あることを報告した）。これらの薬剤の中には前年度のヒット化合物であるクロトリマゾールと同等以上の保護効果を示す化合物は含まれていなかったが、他の網膜細胞に対する毒性試験を行うことでより最適な薬剤が選択できると考えられる。</p> <p>E. 結論 本研究では、2つの化合物ライブラリー（2314剤）からGGAを上回るRPE保護薬を314剤見出した。次年度は、これら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 Takahashi H, Sugiyama T, Tokushige H, Maeno T, Nakazawa T, Ikeda T, Araie M Comparison of CCD-equipped laser speckle flowgraphy with hydrogen gas clearance method in the measurement of optic nerve head microcirculation in rabbits Experimental Eye Research. Exp Eye Res. 2013 ;108.</p> <p>Toshio Hisatomi, Shintaro Nakao, Yusuke Murakami, Kousuke Noda, Toru Nakazawa, Shoji Notomi, Edward Connolly, Haicheng She, Lama Almulki, Yasuhiro Ito, Demetrios G. Vavvas, Tatsuro Ishibashi, Joan W. Miller.: The Regulatory Roles of Apoptosis-Inducing Factor in the Formation and Regression Processes of Ocular Neovascularization. The American Journal of Pathology. 2012 ;181(1):53-61.</p>	<p>Shin Takayama, Masashi Watanabe, Hiroko Kusuyama, Satoru Nagase, Takashi Seki, Toru Nakazawa, Nobuo Yaegashi: Evaluation of the Effects of Acupuncture on Blood Flow in Humans with Ultrasound Color Doppler Imaging. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012:513638.</p> <p>Ai Shimizu, Yoshimasa Takano, Dong Shi, Shunji Yokokura, Yu Yokoyama, Xiaodong Zheng, Atsushi shiraishi, Yuichi Ohashi, Toru Nakazawa, Nobuo Fuse. Evaluation of CNTNAP2 gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese. Molecular Vision. 2012;18:1395-1401.</p> <p>Kobayashi W, Abe T, Tamai H, Nakazawa T. Choroidal excavation with polypoidal choroidal vasculopathy: a case report. Clin Ophthalmol. 2012;6:1373-1376.</p> <p>Shanab AY, Nakazawa T, Ryu M, Tanaka Y, Himori N, Taguchi K, Yasuda M, Watanabe R, Takano J, Saido T, Minegishi N, Miyata T, Abe T, Yamamoto M.. Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: The role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. Neurobiol Dis. 2012 Dec;48(3):556-567.</p> <p>Aizawa N, Kunikata H, Abe T, Nakazawa T. Efficacy of combined 25-gauge microincision vitrectomy, intraocular lens implantation, and posterior capsulotomy. J Cataract Refract Surg. 2012;38(9):1602-1607.</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>Takano Y, Shi D, Shimizu A, Funayama T, Mashima Y, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nishida K, Nakazawa T, Fuse N. Association of Toll-like Receptor 4 Gene Polymorphisms in Japanese Subjects With Primary Open-Angle, Normal-Tension, and Exfoliation Glaucoma. <i>Am J Ophthalmol.</i> 2012 ;154(5):825-832.</p> <p>Fuse N, Aizawa N, Yokoyama Y, Nakamura M, Omodaka K, Sado K, Nakazawa T. Analysis of retinal nerve fiber layer thickness in superior segmental optic hypoplasia (SSOH) <i>Nihon Ganka Gakkai Zasshi.</i> 2012 ;116(6):575-580</p> <p>Fukuda M, Yamada M, Kinoshita S, Inatomi T, Ohashi Y, Uno T, Shimazaki J, Satake Y, Maeda N, Hori Y, Nishida K, Kubota A, Nakazawa T, Shimomura Y. Comparison of corneal and aqueous humor penetration of moxifloxacin, gatifloxacin and levofloxacin during keratoplasty. <i>Adv Ther.</i> 2012;29(4):339-49.</p> <p>Maruyama K, Nakazawa T, Cursiefen C, Maruyama Y, Van Rooijen N, D'Amore PA, Kinoshita S.: The maintenance of lymphatic vessels in the cornea is dependent on the presence of macrophages. <i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i> 2012;53(6):3145-3153.</p> <p>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. <i>J Glaucoma.</i> 2012;21(6):426-430.</p>	<p>Ryu M, Yasuda M, Shi D, Shanab AY, Watanabe R, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Takano J, Saido T, Nakazawa T.: Critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death. <i>J Neurosci Res.</i> 2012 ;90(4):802-815.</p> <p>Kunikata H, Aizawa N, Meguro Y, Abe T and Nakazawa T. Combined 25-gauge microincision vitrectomy and toric intraocular lens implantation with posterior capsulotomy. <i>J Cataract Refract Surg.</i> 2012;38(9):1602-1607.</p> <p>Shimura M, Yasuda K, Yasuda M, Nakazawa T. Visual Outcome After Intravitreal bevacizumab depends on the optical coherence tomographic patterns of patterns with diffuse diabetic macular edema. <i>Retina.</i> 2012 Dec 5.</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>2. 学会発表</p> <p>IMFIA 2012 (International Forum on Medical Imaging in Asia) Fast Registration Algorithm of 3D Optical Coherence Tomography Images Based on En-Face Projection Image</p> <p>韓国老化学会(AACL) The molecular mechanism of glaucomatous optic neuropathy: learning from a mouse model of axonal damage-induced RGC death</p> <p>The 1st Asia-Pacific Glaucoma Congress (APGC2012) Advances in basic sciences: implications for clinical management of glaucoma</p> <p>Expectation of blood flow modification for the treatment of glaucoma: Increased effect of Tafluprost on the ocular circulation</p> <p><u>第116回日本眼科学会総会</u> ・宮城被災地での眼科医療～その後～ ・緑内障と活性酸素 ・眼虚血をターゲットにした緑内障神経保護治療 ・緑内障酸化ストレス仮説</p> <p><u>第29回日本眼循環学会</u> ・強度近視の眼循環 ・眼循環の新しい未来 ・網膜疾患と眼循環の検討</p> <p><u>第23回日本緑内障学会</u> ・The molecular mechanism of GON: learning from a mouse model of axonal damage-induced RGC death ・緑内障進行予測に役立つ基礎知識</p> <p><u>第66回日本臨床眼科学会</u> ・酸化ストレスと眼病態</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 ・眼疾患治療用ナノ粒子化製剤 特願2012-213621 出願日：2012年9月27日 ・眼疾患治療に使用する薬剤スクリーニング方法 特願2012-95693 出願日：2012年4月19日</p> <p>2. 実用新案登録 なし</p> <p>3. その他 なし</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>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <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 α (ProTα)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、ProTα 受容体の1つである Toll-like Receptor-4 の関与も明らかとした。</p> </div>	
<p>A. 研究目的 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. 研究方法 <u>B-1. 網膜神経保護薬</u> ProTαは、マウスProTα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。ProTα活性フラグメントペプチドは、外注にて依頼合成した。</p> <p><u>B-2. ProTα活性フラグメントペプチドの同定</u> 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ProTα、部分欠損変異体による生存活性を評価することで、ProTαの活性ドメイン (30アミノ酸) を同定した。さらに、30アミノ酸のアラニンスキャンニングを行い、活性重要アミノ酸を同定した。</p>	<p><u>B-3. 個体における神経保護効果解析</u> <u>B-3-1) 実験動物</u> 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 \pm 2$^{\circ}$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><u>B-3-2) 網膜虚血モデルマウス作製</u> 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$^{\circ}$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つり上げておき (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>

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	
網膜保護新規候補薬剤の設計と機能評価に関する研究 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><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ProTa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⁺ 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・フロキシリ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>C. 研究結果 <u>C-1. ProTa活性フラグメントペプチドの神経細胞死保護効果</u> ネクロシス保護を指標としたセルベースアッセイにて、ProTaのGST融合部分欠損ProTa、活性ペプチドの保護効果を検討したところ、活性ドメイン (30アミノ酸) を同定することに成功した。さらには、本活性が、より短鎖のペプチド (9アミノ酸) で保持されることを明らかとした。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. ProTa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ProTa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 pmol/μl/eyeで十分な保護効果が認められた。</p> <p><u>C-3. 活性ペプチドの網膜虚血保護</u> 活性ペプチドも上記の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ProTa 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>C-4. ProTαの先制治療効果機構解明 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>D. 考察 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、並びに活性ペプチドは虚血後の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>E. 結論 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>F. 健康危険情報 該当なし</p> <p>G. 研究発表 1. 論文発表 Halder SK, Matsunaga H, Yamaguchi H, Ueda H (2013) Novel neuroprotective action of prothymosin alpha-derived peptide against retinal and brain ischemic damages. <i>J Neurochem</i> in press.</p> <p>Halder SK, Sugimoto J, Matsunaga H, Ueda H (2013) Therapeutic benefits of 9-amino acid peptide derived from prothymosin alpha against ischemic damages. <i>Peptides</i> in press.</p> <p>Halder SK, Ueda H, Regional distribution and cell type-specific subcellular localization of Prothymosin alpha in brain. <i>Cell Mol Neurobiol</i> 32:59-66,2012.</p> <p>Halder SK, Matsunaga H, Ueda H, Neuron-specific non-classical release of prothymosin alpha: a novel neuroprotective damage-associated molecular patterns. <i>J Neurochem</i> 123:262-275,2012.</p> <p>Ueda H, Matsunaga H, Halder SK, Prothymosin α plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms. <i>Ann N Y Acad Sci</i> 1269:34-43,2012.</p>
<p>- 1 4 -</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>2. 学会発表 <u>Third International Symposium on Thymosins in Health and Disease</u> ‘Prothymosin alha: its mechanism for non-vesicular release and receptors in central nervous system’ March 14-16, 2012, Washington,D.C.</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 該当無し</p> <p>2. 実用新案登録 該当無し</p> <p>3. その他 該当無し</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 H24 年度は、既存薬ライブラリーで網膜保護効果の可能性を示したクロトリマゾールの徐放デバイス化を検討した。また、クロトリマゾールの薬効および細胞保護メカニズムをラット不死化網膜細胞の培養によって検討した。その結果、クロトリマゾールの徐放化では、昨年度報告したタンパク質等の高分子薬物の徐放制御に用いた PEGDM/コラーゲン粒子システムを改良した PEGDM/TEGDM システムで徐放制御できることを見出した。また、クロトリマゾールの薬効では、10 μM から 50 μM において Dose-dependent に低酸素・低栄養培養に対して保護効果を示すことがわかった。また、メカニズムについては、Reactive oxygen species（ROS）の産生がクロトリマゾールによって抑制されていることがわかった。</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H24年度は、既存薬ライブラリーで網膜保護効果の可能性を示したクロトリマゾールの徐放デバイス化を検討した。また、クロトリマゾールの薬効および細胞保護メカニズムをラット不死化網膜細胞の培養によって検討した。 クロトリマゾールは低分子化合物であるため、昨年度報告したタンパク質等の高分子化合物の徐放制御システム（PEGDM/コラーゲン微粒子）では薬物透過が早く、別の制御システムを検討した。TEGDMが低分子化合物を透過させない性質を利用し、PEGDMとTEGDMの混合システムによって、低分子化合物を徐放制御する方法を検討した。</p>	<p>昨年度のスクリーニングによってクロトリマゾールを見出したが、薬効は10 μMのみで検討していたため、薬効の詳細な検討を行った。細胞はラット不死化網膜神経節細胞（RGC5）とラット不死化網膜色素上皮細胞（RPE-J）を使用した。 さらにクロトリマゾールの細胞保護メカニズムの検討として、Reactive oxygen species（ROS）の産生を評価した。ROS産生の増加は虚血性疾患に見られる細胞反応の1つである。酸化ストレスとして細胞を障害し、細胞をアポトーシスに誘導することが知られている。このROS産生を薬剤が抑制していれば、細胞保護のメカニズムとして評価できる。今回はROSの評価として、Taliシステムを利用した。TaliはIn vitro製Imag e-based cytometerである。ROS検出液で処理した細胞懸濁液を専用のスライドにキャストし、分散した細胞の画像を取得し、ROS-positiveの蛍光標識細胞数をHemocytometerの要領で自動的にカウントする。ROS-negativeの細胞数と比較して、ROS産生細胞の割合を測定した。</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	
<p>B. 研究方法</p> <p>1. クロトリマゾールの徐放デバイス化</p> <p>1-1. 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 10μlを混合したプレポリマーを流しUV架橋(25mW/cm² - 3min [SEN LIGHTS CORP])して作製した。作成したリザーバーのサイズは内径、縦7mm×横7mm×高さ2mm、薬剤充填部容量は9μlである。徐放制御システムとして、PEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiofenone 10μlを混合したPEGDMプレポリマーに、TEGDMを混合(0~100%(v/v))したものを使用した。リザーバーにクロトリマゾールをPEGDM/TEGDMでペレット化したものを充填後、薬剤上にPEGDM/TEGDMをキャストし、UV架橋によって薬剤をカバーしてカプセルを作製した。</p> <p>1-2. HPLCによる徐放量の測定</p> <p>デバイスをPBSに浸漬し、37℃でインキュベートした。定期的にPBSを回収し、新しいPBSに置換した。回収のタイミングはクロトリマゾールがPBSに飽和しないように行った。HPLCは島津のProminenceシステムを用いた。あらかじめ検量線を作成し、PBSに放出されたクロトリマゾール量を定量した。</p>	<p>2. クロトリマゾールの薬効</p> <p>2-1. 細胞培養</p> <p>96ウェルプレートにRGC5およびRPE-Jを播種し、2日間培養した後、クロトリマゾール含有培地(DMEM)に交換した。クロトリマゾールはあらかじめ0.03%DMSOに溶解して培地に添加した。1日培養後、クロトリマゾール含有の低酸素(2%O₂)・低栄養(グルコース0~2.8mM)培地に交換し、低酸素インキュベーター(2%O₂)で培養した。1日後、MTS法によって細胞数を評価した。</p> <p>2-2. ROS assay</p> <p>6センチ培養皿にRGC5を播種し、2日間培養した後、2-1と同様の低酸素負荷培養を行った。細胞をトリプシン処理で回収し、CellROX orange (In vitrogen)を添加し30分インキュベーションした。Taliシステム専用スライドプレートに10μLの細胞懸濁液をアプライし、TaliシステムでROS-positive細胞の検出を行った。コントロールとして、低酸素負荷を行っていないRGC5を準備し、TaliシステムでROS-positive細胞のスレショールドラインを引いた。これより高い蛍光値を示した細胞をROS-positiveと決めた。</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

C. 研究結果

1. クロトリマゾールのIn vitro徐放性

クロトリマゾールをPEGDM/TEGDM=60%/40% (P60と略す) でペレット化し、リザーバーに充填し、PEGDM/TEGDM=40%/60% (P40と略す) とP60の2種類でカバーをした。コントロールとして、カバーなしを作成した。放出量を累積したグラフをFig. 1に示す。カバーなしのサンプル (Pellet) は最初の数日でクロトリマゾールが大量に放出され (初期バースト)、その後一定の放出を認めた。一方、カバーをしたサンプルは初期バーストが抑制され、常に一定の放出量を保っていた。また、1日当たりの放出量は、P60>P40となり、カバー中のPEGDM比の減少と対応して、放出量が減少していた。

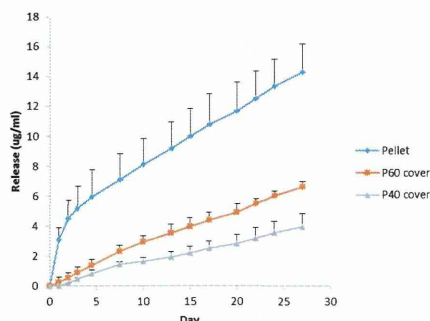


Fig.1 クロトリマゾールの放出曲線

2. クロトリマゾールの薬効

2-1. 増殖アッセイ (MTS法)

RGC5への低酸素・低栄養培養として、2種類のグルコース濃度の培地 (4.5mM : Oxygen deprivation (OD) 、2.8mM : Oxygen-glucose deprivation (ODD)) を使用した。RGC-5の増殖アッセイの結果、ODとODD条件とともに、クロトリマゾール添加による細胞保護効果を認めた。OD条件では、クロトリマゾールが10 μMから50 μMでDose-dependentに保護効果を示した。また、ODD条件では、5 μMから50 μMでDose-dependentに保護効果を示した。

RPE-Jへの低酸素・低栄養培養として、2種類のグルコース濃度の培地 (4.5mM : Oxygen deprivation (OD) 、0mM : Oxygen-glucose deprivation (OGD)) を使用した。RPE-Jの増殖アッセイの結果、RGC-5と同様にクロトリマゾール添加による細胞保護効果を認めた。OD条件では、クロトリマゾールが5 μMから50 μMでDose-dependentに保護効果を示した。また、OGD条件では、5 μMから50 μMでDose-dependentに保護効果を示した。

2-2. ROS assay

RGC-5の低酸素・低栄養培養 (ODDおよびOD) におけるROSアッセイを行った。その結果、ODD条件では、クロトリマゾールの添加によってDose-dependentにROS-positive細胞の割合が減少した (Fig2A)。また、OD条件においても同様に、クロトリマゾールの添加によってDose-dependentにROS-positive細胞の割合が減少した (Fig2B)。

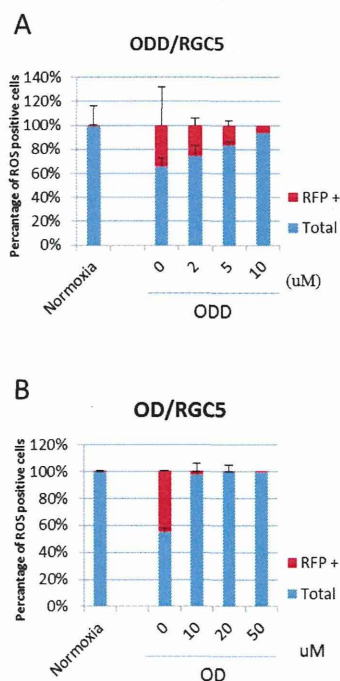


Fig.2 ROS assay