

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）研究事業）
（総括）研究報告書

ウノプロストンの徐放と薬効評価に関する研究

研究代表者 阿部 俊明 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

我々は分子量にかかわらず初期バーストなしに安全性が高く、長期間、網膜に薬剤徐放可能なデバイスを開発した。今回はこのデバイスに緑内障薬として点眼で使用されているウノプロストン（UNO）を組み込み、網膜色素変性治療の非臨床 POC 取得を目指す。UNO は BK チャンネル活性化と細胞内カルシウム濃度感知による神経保護が知られており、網膜変性の抑制が報告されている。まず網膜光障害と遺伝性網膜変性動物（S334ter ラット）での効果について検討した。網膜変性原因が異なるが、ともにコントロールに比較して有意に網膜保護効果が見られた。さらに薬剤の眼内移行について、ウサギで専用デバイスを作成して検討した。移植 1、4、8 日後のウサギ眼を摘出し、網膜と血漿から LC/MS/MS で UNO 含有量を測定した結果、UNO 活性体（M1）の網膜内量が測定でき、点眼より多い量が持続的に網膜で確認され、また血漿中の最大量はむしろ点眼より低い傾向であった。In vitro でのデバイス素材の細胞毒性は見られていない。また、局所刺激試験と毒性試験を行ったが、予定デバイスの最大徐放による局所の毒性と全身毒性は見られなかった。今年度の使用でデバイスの歩留まり率 100%の作製条件は、デバイスは TEG100%、薬剤徐放膜・薬剤ペレット化は PEG/TEG40%でウノプロストン濃度は最大 500mg/ml と考えられた。

A．研究目的

失明疾患の上位は網膜疾患が占める。網膜疾患は高齢者に多いため、超高齢化社会を迎えた日本では有効な治療法のない難治性網膜疾患が更に増加すると考えられる。近年、血管新生を伴う網膜疾患に対し薬剤の硝子体内注射が有効であることが判明し、網膜疾患も薬剤治療の対象に考えられるようになった。しかし頻回な硝子体内（眼内）注射は合併症や眼に注射を受け続けることへの心的負担、高い医療費等が問題となっている。仮に有効な薬剤が発見されても慢性の経過をとる網膜疾患に対して現状の眼内投与方法では実用化が難しい。点眼では網膜に薬物が十分に移行しない

ため網膜への薬剤徐放の工夫がこれまで報告されてきたが実用的なものはない。一方我々は分子量にかかわらず初期バーストなしに長期間、網膜に薬剤徐放可能なデバイスを開発した。デバイス移植は眼内ではなく結膜下（強膜上）であるため安全性も高く、問題が生じた場合はすぐに摘出できる。高齢者は点眼を忘れがちであるなどの問題点も解決し、適切な薬剤さえあれば様々な網膜疾患や眼疾患以外にも利用できる利点がある。特許公開中であり今回はこのデバイスに BK チャンネル活性化による網膜保護の可能性が報告された緑内障薬ウノプロストン（UNO）をデバイス化して、強膜上から安全に持続的に徐放し網膜色素変性の

進行抑制を目指す。網膜色素変性は厚生省特定疾患に指定されている難治性網膜疾患でいまだ治療法がないオーファン病であるが企業アライアンスで非臨床 POC 取得し、治験開始をめざす。

B . 研究方法

全体計画として 24 年度は毒性・局所刺激試験、ADME (吸収・分布・代謝) 試験を開始し網膜変性動物モデルで効果を確認し、デバイス規格を決定する。25 年度以降は 24 年度の継続をして非臨床 POC 取得めざし、27 年度は医師 (企業) 治験を開始する。東北大学内臨床研究推進センターと拠点内専門家、治験センター、倫理委員会、PMDA より評価を受ける。

まず 24 年度は研究機関、分担機関は企業、臨床研究推進センター内プロジェクトマネージャーと研究全体の打ち合わせを行って以下を開始した。

デバイス規格決定 (阿部、永井、西澤): デバイスからのウノプロストンの徐放量等はほぼ決定しているが、歩留まりを 100% にできる条件を探す。

毒性試験、局所刺激試験、ADME (吸収・分布・代謝) 試験: これらの一部は外部委託になり今回の研究費の申請の一部に組み入れた。

薬効試験、安全性試験は組織学的検査や網膜機能測定 (網膜電図、行動検査) などで評価した。網膜変性抑制の薬効は光障害網膜変性と遺伝子変異網膜変性モデル (S334terSD ラット) で検討した。網膜変性の機序はともに異なると考えられる。さら

に眼球や網膜構造が小動物とは異なる大型動物として遺ウサギでの検討を予定し本デバイスのヒトへの効果確認に近づける。ウサギは 25 年度に予定している網膜変性ウサギでの効果確認にも利用予定である (阿部、永井、大浪)。

(倫理面への配慮)

24 年度内にヒトへの応用はないが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。

C . 研究結果

デバイスの作製: デバイスはリザーバー、薬物ペレット、徐放膜から構成される。3DCAD システム、ポリジメチルシロキサンを利用した鋳型作製から、PEG/TEG を使用したデバイスの作製をおこなった。薬剤 UNO のペレット化は PEGTEG の混合プレポリマーに混合して作製した。これらの PEGTEG の割合は 0 - 100% まで変化させ、薬剤濃度も最大 1000 mg まで行った。それぞれの基材濃度、加熱率、薬剤濃度などを考慮・検討した結果、歩留まり率 100% の作製条件は、In vitro での測定であるが、最大徐放量は PEG/TEG40% で UNO 濃度は最大 500mg/ml であると考えられた (動物による違いも考慮して今後も微調整は続く)。

非臨床試験の推進:

1. デバイスの移植に特殊な手技は必要としなかった。移植後のデバイスは時にマイルドな Fibrosis で覆われていたが、周辺組織への著名な炎症や眼内への副作用は認められなかった。下記するが検眼鏡的異常や網膜電図での異常も見られなかった。デバイス除去後の強膜はネクロシス等の異常は見られなかった（ラット、ウサギ）。

2. 強膜上から UNO を徐放することによる網膜への影響を確認した。まず正常 SD ラットへの移植では移植 4 週間目まで定期的に網膜電図（ERG）を評価した。ERG 以外に、組織学的検査（光干渉断層）で確認した。その結果、未処理群やプラセボデバイス移植群と比較して、UNO 徐放デバイス群では ERG の a,b 波振幅値や潜時に変化はなく、網膜機能の変化はないと推定された。同様のことはウサギでも確認した。白色ウサギへの移植では移植 5 か月目まで評価したが、ラットと同様に未処理群やプラセボデバイス移植群と比較して、UNO 徐放デバイス群では ERG の a,b 波振幅値や潜時に変化はなく、網膜機能の変化はないと推定された。

3. UNO の細胞保護効果を培養細胞（RGC5 および RPEJ）の低酸素・低栄養負荷培養で検討した。細胞増殖検査（MTS）で検討すると、どちらの細胞も濃度依存性に細胞保護効果が見られた。この時、活性酸素（ROS）濃度測定を行うと有意に ROS 産生が抑制されていた。

4. 網膜光障害モデルでの検討。ERG、組織学的検査、アポトーシス検査で UNO 徐放デバイス移植は非治療群や UNO 非徐放群

と比較して有意に網膜保護効果が確認された。すなわちコントロールの UNO 非徐放デバイス移植群では、光障害によって a 波、b 波ともに 7 割以上低下した。一方、UNO デバイスでは、UNO 放出の多いデバイスで有意に波形値の低下が抑制されていた。また、UNO 放出の少ない徐放膜のデバイスでは波形値低下の抑制は見られなかった。また、ERG 後に摘出した眼球の組織標本を評価した結果、UNO デバイス群では ONL 厚みがコントロールと比較して維持されていた。また、TUNEL 染色の結果、UNO デバイス移植群では、TUNEL-positive（アポトーシス）細胞数が少なかった。

5. 遺伝性網膜障害（S334ter ラット）での網膜保護効果を確認した。光障害モデルと同様の評価項目で検討した。移植後 4 週まで毎週 ERG を測定したが、UNO 徐放デバイス移植群は非治療群や UNO 非徐放デバイス移植群と比較して有意に網膜保護効果が確認された。

すなわち 1 週、4 週後ともに後に、未処置群と比較して UNO デバイス移植群は有意に ERG 振幅値が維持されていた。また、UNO 硝子体注射群も維持されていた。一方、点眼群では保護効果は認めなかった。

ウサギ網膜へのウノプロストンの薬剤移行確認（7日間デバイス留置による検討で Day2,4,8 に網膜と血漿中の UNO を測定し、点眼最終日のものと比較した）。UNO は LS/MS/MS で網膜と血漿より活性体を直接測定した。網膜内濃度は点眼群で 30 分後が

最大で 16.8ng/g でそれ以外の時間ではほとんど測定できず、デバイス移植は平均最大で 461ng/g (43-1080) で 7 日間持続していた。血漿は点眼を使用した場合、最大 30 分後で 13.0ng/mL、デバイスで最大 8.39ng/mL であった。AUC の検討からウノプロストンの網膜移行 (網膜内 AUC/血漿 AUC : 38.0) は点眼 (0.68) に比較して血漿に対する比が約 56 倍であると考えられた。

non-GLP 局所刺激試験を行い、28 日間デバイス留置による眼局所毒性と全身毒性検査を行い、毒性のないことを確認した。UNO 徐放デバイスは 1 マイクロ/日(デバイス 1 群)、11 マイクロ/日徐放(デバイス 11 群)の 2 種類で UNO 徐放なしのデバイス移植 (0 群)、非治療群 (sham 群) と比較した。その結果、一般状態、体重、摂餌量、剖検及び器官重量では、それぞれの群とも差は認められなかった。眼科学的検査では、前眼部刺激症状において、Sham 群に留置後 1 週まで、薬物徐放デバイス-0 群及び薬物徐放デバイス-1 群に留置後 2 週まで、結膜の発赤など変化が認められた。一方、薬物徐放デバイス-11 群では、留置後 3 週以降も一部の例で結膜の発赤が認められた。しかし、点眼 (評点 10 点以上、以前に評価されたもの) に比較して軽微 (評点 0-2) であった。また、眼圧の変化は見られなかった。

試験推進センター、アールテックウエノ社とは頻回の連絡を取り(直接会談、電話会談、メール等)、研究機関は PMDA と薬事相談

を行い(2 回)申請に向けて議論を重ねてきた。

D. 考察

UNO は抗緑内障薬であるが、BK チャンネル活性化による神経保護が動物実験で報告されたために、本薬剤をうまく網膜に作用させることができれば、様々な網膜疾患や神経疾患に適応できると考える。本来点眼で使用されてきた本薬剤は、従来の点眼では十分な量の薬剤を網膜に到達させるのはなかなか困難で、また点眼ができない人がいることや、忘れるなどの問題点も指摘されてきたが、これらの問題を改善できるだけでなく、失明疾患の大部分を占める網膜疾患の新しい治療法になる可能性がある。すなわち本デバイスを使用してこれまで難治性と言われた網膜疾患の治療の選択肢が増え失明予防に貢献できる。また、汎用性のある本デバイスは抗がん剤を含め様々な薬剤の持続徐放が可能のために本研究の先には様々な疾患を対象に考えられる。まず疾患数は少ないが治療法のない網膜色素変性患者で効果を確認し、他疾患にも本デバイスの適応を広げる。

今年度の経過から考察すると、UNO を網膜に送達できれば、さまざまな網膜障害から網膜を保護できる可能性が示された。ADME も 28 日間デバイス留置で毒性が見られていない。デバイス移植後の血漿中濃度も点眼直後 (最も高値の 30 分後) の血漿中よりも低値であり、UNO 点眼のこれまでのデータからも安全性に関しては期待できると考える。今回の結果から臨床適応が広まれば、デバイ

スの作製のために新たな企業(ベンチャー含む)の立ち上げも期待できる。またデバイス移植は、高齢者は点眼を忘れることや、点眼などができない人への対応もできアドヒアランス向上につながる。

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もなり、行政施策にも貢献できると考える。

E. 結論

我々のデバイスは本来薬剤が持つ効果を局所で有効・安全に使用でき、これまで治療法のなかった網膜色素変性の新しい治療法開発になりえると改めて考えられた。すなわち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、行政施策にも貢献できると考える。

F. 健康危険情報

なし

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. *PLoS One*. 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; Saido Takaomi, Naoko Minegishi; Toshio Miyata, Toshiaki Abe, Masayuki, Yamamoto, *Neurobiol Dis*. 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. *AJO*, 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. *J Cataract Refract Surg*. 2012 Sep;38(9):1602-7.

6 . Choroidal excavation with polypoidal choroidal vasculopathy: a case report. Kobayashi W, Abe T, Tamai H, Nakazawa T. *Clin Ophthalmol*.

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, Toshiaki Abe. “ Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes ” Retina. 2012 Jun;32(6):1204-13

8 . Yumi Tokita-Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Hikaru Sonoda, Tomoaki Takakura, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. “ 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.

2. 学会発表
(国際学会発表)

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

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

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.

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.

(国内学会発表)

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

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MPP E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

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

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

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

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

7. 相澤奈帆子、國方彦志、目黒泰彦、

阿部俊明、中澤徹 25G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

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25G硝子体手術 日本臨床眼科学会 2012/10/25

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

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

11. 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

12. 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

13. 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

14. 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 東北臨床超微形懇話会

15. 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

16. 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

17. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし