

201317027A

別紙1

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に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 俊明

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	-----	1
阿部俊明		
II. 分担研究報告		
1. 重症眼疾患と神経保護治療	-----	8
中澤 徹		
(資料) 資料名		
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	-----	12
植田弘師		
(資料) 資料名		
3. 網膜保護用デバイスの開発と効果に関する研究	-----	16
永井展裕		
(資料) 資料名		
4. 網膜保護用デバイスの開発に関する研究	-----	20
西澤松彦		
(資料) 資料名		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	30

研究報告書

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

研究要旨

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うことと、同時に薬剤を持続的に徐放できるデバイスの開発発し網膜保護をめざすことが目標である。

既存薬ライブラリーからのスクリーニングを終了した結果、陽性コントロールと同等の効果を示す約200種類のなかでも特に保護効果が強いクロチマゾールがすく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り、薬剤濃度とともにデバイス作製の歩留まり率にも影響した。次にラット移植用のデバイスで薬剤の網膜保護効果を確認した。コントロールとして使用した GGA の徐放で網膜保護効果があるのを確認し、さらに高分子の代表としてバソヒビンがラット脈絡膜新生血管を抑制したが、今年度はライブラリースクリーニングで最も効果が見られたトリクロマゾールをデバイスから徐放させると、網膜光障害から網膜を保護することを網膜電図、網膜組織厚で証明できた。また、薬剤のペレット化に利用する PEG/TEG 比の変更で複数薬剤を異なるスピードでデバイスから徐放することが可能になった。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。

阿部俊明
東北大学大学院医学系研究科
教授

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ク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を再スクリーニングする（23-24 年度で終了）。さらに本デバイスを動物モデルの眼球表面（眼内操作はしないので上皮細胞のバリアー下）から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の検討をする。

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、実際に網膜保護のために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と推測した。すなわち Unmet Medical Needs にこたえられるのではないかと考える。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、アドヒアランス改善以外に、薬剤の使用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。我々のデバイスが創薬の革新に貢献できれば社会的・経済的メリットを生む。

B. 研究方法

1) 研究体制

我々はまず薬剤スクリーニングのために薬剤のライブラリーや独自の薬剤候補を持つ、東北大学眼科中澤教授、長崎医歯薬大学の植田教授、またデバイス作製を中心に行う、阿部、永井と工学研究科の西澤教授が基本の研究体制を作製した。さらに、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。

2) 候補薬剤スクリーニング (23-24 年度で終了)

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 (候補薬剤薬 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

3) デバイスの作製 (24-25 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。動物ごとに眼球の曲率に合わせた形状に作製する。デバイス移植時の目的に合わせてその都度作製する。特に薬剤の変更による徐放コントロールは注意して行う。担当:西澤、阿部、永井

4) 薬効検討システム (24-25 年度)

(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。候補になる薬剤のうち特に有効であると考えられるものはデバイスに包埋後、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、網膜保護の可能性を検討する。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 や LC/MS/MS など定量を行う。

(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する。対眼はコントロールに利用する。なるべく多くの薬剤の効果を確認するために行うが、そのために短期間 (3-6 カ月以内) で効果がみられないものは除外していく。

(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、瞳孔反応等を行うが、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。

(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。

(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。

C. 研究結果 (25年度)

(1) 薬剤ライブラリーのスクリーニング

23-24年度で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。

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)。本化合物はクロチマゾールとして知られる抗真菌剤であったが、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 (24年度)。25年度は本薬剤をデバイスから徐放させて網膜保護効果を確認した。

(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

上記で保護効果の見られた薬剤を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。

薬剤の網膜への移行可能性の確認

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日でも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。

低分子徐放による網膜保護効果の検討

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、網膜光障害に対して網膜電図でも網膜外顆粒層 (ONL) の厚さでも確認した。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。

高分子徐放による網膜保護効果の検討

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、ラット新生血管モデル (CNV) で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。以上は、だいたい平成 23-24年度で確認したが、一部 25年度に引き継いだ。

25年度は上記検討に一部を引き継いでその成果を確認して、一部を現在投稿中である。

クロチマゾールのデバイスからの徐放と網膜保護の検討

薬剤スクリーニングで最も効果が見られた薬剤であるクロチマゾール (特許申請中) をデバイスに包埋しデバイスからの徐放で網膜保護効果を確認した。まずデバイスから徐放されたクロチマゾールは濃度依存的に培養細胞の負荷に対して保護効果を示すことが示された。

次にクロチマゾール徐放デバイスをラット強膜上に移植し、光障害からの網膜保護効果を確認した。その結果、網膜電図も組織学的にもクロチマゾール徐放デバイス移植ラットは有意に網膜保護効果があることが判明した。

複数薬剤徐放の可能性

本デバイスはリザーバータイプのデバイスであるためにリザーバー内に複数の薬剤を包埋することが可能であった。デバイス内のそれぞれの薬剤は PEG/TEG でペレット化した。薬剤により PEG/TEG 比を変更することでそれぞれの薬剤を別々のスピードで徐放することが可能であった。

D. 考察

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、そのスクリーニングされた薬剤をデバイスを利用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 repositioning 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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kunikata H, Aizawa N, Abe T and Nakazawa T. Toric intraocular lens implantation with posterior capsulotomy during 25-gauge microincision vitrectomy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. in press.
- 2) Nagai N, Kaji H, Onami H, Katsukura Y, Ishikawa Y, Nezhad ZK, Sampei K, Iwata S, Ito S, Nishizawa M, Nakazawa T, Osumi N, Mashima Y, Abe T. A Platform for Controlled Dual-Drug Delivery to the Retina: Protective Effects against Light-Induced Retinal Damage in Rats. *Adv Healthc Mater*. 2014 Apr 19. doi: 10.1002/adhm.201400114. [Epub ahead of print]
- 3) Abe T, Tokita-Ishikawa Y, Onami H, Katsukura Y, Kaji H, Nishizawa M, Nagai N. Intrasceral Transplantation of a Collagen Sheet with Cultured Brain-Derived Neurotrophic Factor Expressing Cells Partially Rescues the Retina from Damage due to Acute High Intraocular Pressure. *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volume 801, 837-843. 2014
- 4) Nagai N, Kaji K, Onami H, Ishikawa Y, Nishizawa M, Osumi N, Nakazawa T, and Abe T, A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye. *Acta Biomaterialia* 10:680-687 2014.
- 5) Fujie T, Mori Y, Ito S, Nishizawa M, Bae

- H, Nagai N, Onami H, Abe T, Khademhosseini A, Kaji H. Micropatterned Polymeric Nanosheets for Local Delivery of an Engineered Epithelial Monolayer. *Adv Mater*, Volume 26, Issue 11, pages 1699–1705, March 19, 2014.
- 6) Kunikata H, Yasuda M, Aizawa N, Tanaka Y, Abe T, Nakazawa T. Intraocular concentrations of cytokines and chemokines in rhegmatogenous retinal detachment and the effect of intravitreal triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol*; **155**: 1028-37 e1. 2013.
- 7) Kunikata H, Aizawa N, Meguro Y, Abe T, Nakazawa T. Combined 25-gauge microincision vitrectomy and toric intraocular lens implantation with posterior capsulotomy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*; **44**: 145-54. 2013.
- 8) 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*. **8**(3): e58580. 2013.
- 9) 阿部俊明、眼科臨床薬理各論 2. 内眼炎 (ぶどう膜炎) 眼内炎症 ウイルス性ぶどう膜炎 (急性網膜壊死、サイトメガロウイルス網膜炎)、臨床眼科 **67** : 157-161 : 2013.
- 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. ISSN 0370-5579 (Print) ISSN 1882-1308 (Online) 67 巻 8 号 (2013.08) P.1331-1336 (ISID:1410104864) 2013.
- 11) 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. 眼科臨床紀要 **6**(9) : 729-733, 2013.
- 12) 浅野俊一郎、阿部俊明、國方彦志、今留尚人、高橋麻衣、中澤徹 : 発症 16 年後に僚眼に再発した急性網膜壊死の 1 例. 臨床眼科 **67**(5):663-667, 2013.
- (書籍)
- 1) Toshiaki Abe * Nobuhiro Nagai , Chapter 2 Neuroprotection for age-related macular degeneration (AMD) and retinal pigmentary degeneration 2.1 Neuroprotection for photoreceptors, Neuroprotection and Regeneration for Retinal Diseases, Editors: Toru Nakazawa, Yasushi Kitaoka, Takayuki Harada, ISBN 978-4-431-54964-2. in press.
2. 学会発表
(国際学会発表)
- 1) Nagai N, Kaji H, Onami H, Yamada T, Katsukura Y, Ishikawa Y, Nishizawa M, Mashima Y, Abe T. “Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Photoreceptor Cell Death in S334ter Rhodopsin Mutant Rats” 2013 ARVO annual meeting, Seattle, Washington (May 5-9, 2013)
- 2) Nagai N, Kaji H, Onami H, Yamada T, Katsukura Y, Ishikawa Y, Nishizawa M, Mashima Y, Abe T. “Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Photoreceptor Cell Death in S334ter Rhodopsin Mutant Rats” 2013 ARVO annual meeting, Seattle, Washington (May 5-9, 2013)
- (国内学会発表)
- 【口頭発表】
- 1) 永井展裕、梶弘和、大浪英之、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、西澤松彦、眞島行彦、中澤徹、阿部俊明 : ウノプロストン徐放デバイスの作製と網膜保護の効果、第 117 回日本眼科学会総会 (東京)

2013/04/04-04/07.

- 2)橋本清香、丸山和一、國方彦志、阿部俊明、
中澤徹：Vogt・小柳・原田病と類似した
APMPPE の 2 例、第 67 回日本臨床眼科学
会 横浜 2013/10/31-11/3.

【ポスター発表】

- 1)山田絵里香、新田文彦、國方彦志、阿部俊
明、中澤徹：25 ゲージ硝子体手術後に発
症し、治療に苦慮した彼硫黄班変性の一
例、第 67 回日本臨床眼科学会 横浜
2013/10/31-11/3.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1)中澤徹、阿部俊明、永井展裕 “網膜保護
薬剤”国立大学法人東北大学 P20130112
(平成25年7月11日)

- 2)Sustained drug delivery system 発明者
Toshiaki Abe, Nobuhiro Nagai, Hirokazu
Kaji, Takeaki Kawashima, Matsuhiko
Nishizawa, Koji Nishida, 2013/6/4 特許庁
US 申請番号 13/909,313

3)実用新案登録
なし

3.その他
なし

研究報告書

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

研究要旨：

本研究では、23-25年度で2つの化合物ライブラリー（約2400剤）からスクリーニングを行い、小胞体ストレスに有効で網膜保護機能の知られているグラニルゲラニルアセトン（GGA）と同等以上の保護効果を示す薬剤が約310剤スクリーニングされた。このうち最も効果があると考えられた薬剤はクロトリマゾールで、本薬剤を培地中に投与することで低酸素・低グルコース負荷後の細胞活性性を非負荷細胞とほぼ同程度に維持できた。

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。

B. 研究方法

ヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE-19）を用いて低酸素・低グルコース負荷に対する保護薬のスクリーニングを行った。薬剤スクリーニングには、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）の2種類の化合物ライブラリーを用いた。

既存薬ライブラリー、US Drug Collection
からの網膜色素上皮細胞保護薬の探索
(23-25年度)

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、既存薬ライブラリー、US Drug Collection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。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

既存薬ライブラリー、US Drug Collection
からの網膜色素上皮細胞保護薬の探索
(23-25年度)

低酸素・低グルコース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GGAを比較対象として用いた。その結果、23-24年度までに2つの化合物ライブ

ラリーのうち1617剤をスクリーニングし終え、約290剤がGGAと同等以上の保護効果を示すことを見出した。その中でも特に強い活性を示す化合物はクロトリマゾールであった。また、25年度では化合物ライブラリーの残り697剤のうち、29剤がGGAより高い活性を示すことを見出した。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。

D. 考察

2つの化合物ライブラリーを用いた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約310剤見出すことができた。この中でもクロトリマゾールは飛び抜けて高い活性を示し、これ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。

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。今後は、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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagai N, Kaji H, Onami H, Ishikawa Y, Nishizawa M, Osumi N, Nakazawa T, Abe T. A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye. *Acta Biomater* 2014; 10: 680-7.
- 2) Hagiwara K, Obayashi T, Sakayori N, Yamanishi E, Hayashi R, Osumi N, Nakazawa T, Nishida K. Molecular and cellular features of murine craniofacial and trunk neural crest cells as stem cell-like cells. *PLoS One* 2014; 9: e84072.
- 3) Tsuda S, Yokoyama Y, Chiba N, Aizawa N, Shiga Y, Yasuda M, Yokokura S, Otomo T, Fuse N, Nakazawa T. Effect of topical tafluprost on optic nerve head blood flow in patients with myopic disc type. *J Glaucoma* 2013; 22: 398-403.
- 4) Takahashi M, Omodaka K, Maruyama K, Yamaguchi T, Himori N, Shiga Y, Ryu M, Kunikata H, Nakazawa T. Simulated Visual Fields Produced from Macular RNFLT Data in Patients with Glaucoma. *Curr Eye Res* 2013; 38: 1133-41.
- 5) 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. *Exp Eye Res* 2013; 108: 10-5.
- 6) Shimura M, Yasuda K, Yasuda M, Nakazawa T. Visual outcome after intravitreal bevacizumab depends on the optical coherence tomographic patterns of patients with diffuse diabetic macular edema. *Retina* 2013; 33: 740-7.
- 7) Shiga Y, Shimura M, Asano T, Tsuda S, Yokoyama Y, Aizawa N, Omodaka K, Ryu M, Yokokura S, Takeshita T, Nakazawa T. The influence of posture change on ocular blood flow in normal subjects, measured by laser speckle flowgraphy. *Curr Eye Res* 2013; 38: 691-8.

- 8) Shiga Y, Omodaka K, Kunikata H, Ryu M, Yokoyama Y, Tsuda S, Asano T, Maekawa S, Maruyama K, Nakazawa T. Waveform analysis of ocular blood flow and the early detection of normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54: 7699-706.
- 9) Shi D, Takano Y, Nakazawa T, Mengkegale M, Yokokura S, Nishida K, Fuse N. Molecular genetic analysis of primary open-angle glaucoma, normal tension glaucoma, and developmental glaucoma for the VAV2 and VAV3 gene variants in Japanese subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432: 509-12.
- 10) Shi D, Funayama T, Mashima Y, Takano Y, Shimizu A, Yamamoto K, Mengkegale M, Miyazawa A, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Nishida K, Nakazawa T, Richards JE, Fuse N. Association of HK2 and NCK2 with normal tension glaucoma in the Japanese population. *PLoS One* 2013; 8: e54115.
- 11) 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: e58580.
- 12) Omodaka K, Kunimatsu-Sanuki S, Morin R, Tsuda S, Yokoyama Y, Takahashi H, Maruyama K, Kunikata H, Nakazawa T. Development of a new strategy of visual field testing for macular dysfunction in patients with open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 2013; 57: 457-62.
- 13) Nagata K, Maruyama K, Sugita S, Fukuchi U, Terada Y, Ishizuka A, Nakazawa T, Mochizuki M, Kinoshita S. Age Differences in Sarcoidosis Patients with Posterior Ocular Lesions. *Ocul Immunol Inflamm* 2013.
- 14) Kunikata H, Yasuda M, Aizawa N, Tanaka Y, Abe T, Nakazawa T. Intraocular concentrations of cytokines and chemokines in rhegmatogenous retinal detachment and the effect of intravitreal triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol* 2013; 155: 1028-37 e1.
- 15) Kunikata H, Aizawa N, Meguro Y, Abe T, Nakazawa T. Combined 25-gauge microincision vitrectomy and toric intraocular lens implantation with posterior capsulotomy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2013; 44: 145-54.
- 16) Himori N, Yamamoto K, Maruyama K, Ryu M, Taguchi K, Yamamoto M, Nakazawa T. Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *J Neurochem* 2013; 127: 669-680.
- 17) Hayashi R, Himori N, Taguchi K, Ishikawa Y, Uesugi K, Ito M, Duncan T, Tsujikawa M, Nakazawa T, Yamamoto M, Nishida K. The role of the Nrf2-mediated defense system in corneal epithelial wound healing. *Free Radic Biol Med* 2013; 61: 333-342.
- 18) Aizawa N, Kunikata H, Yokoyama Y, Nakazawa T. Correlation between optic disc microcirculation in glaucoma measured with laser speckle flowgraphy and fluorescein angiography, and the correlation with mean deviation. *Clin Experiment Ophthalmol* 42(3):293-294.2014.
- 19) Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Maeda S, Liu F, Takahashi S, Kushida Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Nakazawa T, Uchiyama M, Morokuma K, Nagano T, Hanaoka K. Development of azo-based fluorescent probes to detect different levels of hypoxia. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52: 13028-32.
2. 学会発表
ARVO 2013 Seattle, USA 2013/5/5-9
- 1) Tanito M, Nitta K, Katai M, Kitaoka Y, Yokoyama Y, Omodaka K, Tsuda S, Nakagawa T, Nakazawa T: Comparisons of Optic Disc Morphology Parameters Among Different Optic Disc Appearances in Primary Open Angle Glaucoma-The Glaucoma Stereo Analysis

Study

- 2) Hayashi R, Himori N, Taguchi K, Ishikawa Y, Usugi K, Tsujikawa M, Nakazawa T, Yamamoto M, Nishida K: The role of Nrf2-Mediated Defense System in Corneal Epithelial Wound
- 3) Kokubun T, Tsuda S, Shiga Y, Yokoyama Y, Omodaka K, Watanabe R, Morin R, Kunimatsu-Sanuki S, Takahashi H, Nakazawa T: Qualification of the filtering bleb's structure using Anterior segment optical coherence tomography
- 4) Shimura M, Watari S, Yasuda K, Muramatsu D, Goto H, Nakazawa T: Bevacizumab suppresses retinal blood flow to reduce macular thickness in diffuse diabetic macular edema.
- 5) Takahashi M, Omodaka K, Himori N, Ryu M, Maruyama K, Nakazawa T: Useful Diagnostic Tool for Progressive Visual Acuity Decrease in Glaucoma.
- 6) Yabana T, Omodaka K, Takahashi M, Himori N, Ryu M, Maruyama K, Nakazawa T: Useful Diagnostic Tool for Progressive Visual Acuity Decrease in Glaucoma.
- 7) Shiga Y, Yokoyama Y, Asano T, S Maekawa, Tsuda S, Aizawa N, Omodaka K, Ryu M, Nakazawa T: Association between waveform changes in optic nerve head circulation and retinal nerve fiber layer thickness in normal tension glaucoma patients compared to healthy subjects measured by laser speckle flowgraphy
- 8) Kobayashi W, Omodaka K, Togashi K, Ryu M, Yasuda T, Nakazawa T: Correlation between papillomacular bundle thickness (PMBT) and optic nerve blood flow in primary open angle, including normal-pressure, glaucoma.
- 9) Yokoyama Y, Tanito M, Nitta K, Katai M, Kitaoka Y, Omodaka K, Tsuda S, Nakagawa T, Nakazawa T: Optic disc morphology parameters in primary open

angle glaucoma in Japanese using a stereo fundus camera-The Glaucoma Stereo Analysis Study(GSAS)

- 10) Maruyama Y, Mori K, Ueno M, Ikeda Y, Maruyama K, Kinoshita S. Corneal Endothelial Cell Density and Filtration Surgery in Patients with Posner-Schlossman Syndrome.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 中澤徹：網膜保護薬剤 発明整理番号 P20130112
- 2) 田中佑治、安田正幸、面高宗子、中澤徹：(仮) 視神経障害モデル早期における網膜内発現変動RNAマーカー P20130273 申請中 (1/30入力)

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

研究報告書

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総合研究科 教授

研究要旨：

網膜保護の可能性のある薬剤スクリーニングの一部として、当教室が持ち合わせている Prothymosin α (ProT α)の可能性を 23-24 年度で検討した。マウス網膜虚血モデルにおいて、内在性神経保護因子 Prothymosin α (ProT α)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 α 受容体の 1 つである Toll-like Receptor-4 の関与も明らかとした。

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。

B. 研究方法

B-1. 網膜神経保護薬

ProT α はエンドトキシンの混入を極力避けるため、マウスProT α 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。また、新規方法によるリコンビナントProT α の精製についても確立した（詳細は結果C-1に記載）。ProT α 活性フラグメントペプチドは、外注にて依頼合成した。

B-2. ProT α 活性フラグメントペプチドの同定

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 α 、部分欠損変異体による生存活性を評価することで、ProT α 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ニングを行い、活性重要アミノ酸を同定した。

B-3. 個体における神経保護効果解析

B-3-1) 実験動物

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 ± 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。

B-3-2) 網膜虚血モデルマウス作製

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。

B-3-3) 視神経挫滅モデルマウス確立

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。

B-3-4) 組織化学的評価

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、凍結マイクロトームで 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。この他、網膜神経節細胞層 (GCL) の Ganglion cell (顆粒細胞)、内顆粒層 (INL) の Bipolar cell (双極細胞)、内網状層 (IPL) のアマクリン細胞を特異的マーカーである NeuN、Chx10、Syntaxin-1 で免疫染色し、外顆粒層 (ONL) の視細胞については、核染色を行うことで、細胞特異的な保護効果について検討を行った。

B-3-5) 網膜機能評価

網膜機能の評価は、網膜電位図を用いた。

(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遺伝子封じ込めが可能な実験室 (P1、P2 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。

C. 研究結果

C-1. 新規方法によるProT α の調製法確立

マウスProT α はGlutathione-S-transferase (GST) 融合タンパク質として大腸菌株BL21 (DE3) で発現させ、GSTへの親和性を利用して抽出した。本タンパク質はGSTの下流にTobacco Etch Virus (TEV) プロテアーゼ認識部位をもつため、抽出物をTEVプロテアーゼで処理した後、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。さらに精製物を大腸菌由来エンドトキシン親和性クロマトグラフィーで処理し、高純度品として調製した。本リコンビナントタンパク質は細胞で調製されるProT α と同様、1stメチオニンを含まないことから、以前の方法よりも生体内挙動を模倣することが出来ると推測される。ProT α の効果を裏付けるために、1 μ g ProT α に対し、グルタミン酸とアスパラギン酸のカルボキシル基側を特異的に切断するV8プロテアーゼを50 μ g処置したのち硝子体投与を行うと、その保護活性は完全に消失した。

C-2 ProT α 活性フラグメントペプチドの神経細胞死保護効果

ネクロシス保護を指標としたセルベースアッセイにて、ProT α のGST融合部分欠損ProT α 、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。このペプチドP30の硝

子体内投与では1-10 pmolにより用量依存性の網膜細胞層の厚さと網膜電位図におけるa波、b波で評価した形態・機能的な保護活性を示し、10 pmol処置では虚血無しと同様であり、完全な保護を示した。P30は顆粒細胞の障害を完全に遮断したが、P30のアラニンスキャンニングから、より短鎖のペプチド (9アミノ酸) P9にも同様な網膜虚血保護活性が確認された。

C-3. ProT α の網膜虚血保護

緑内障モデルである網膜虚血に対してProT α 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/ μ l/eye で用量依存的であり、0.1 pmol/ μ l/eye で十分な保護効果が認められた。

C-4. 活性ペプチドの網膜虚血保護

活性ペプチドP30やP9も上記のC-3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た。ともに用量依存的であり、P30では3 pmol/ μ l/eye、P9では10 pmol/ μ l/eye投与により有意な保護効果を示す最小有効濃度であった。P30の保護効果について特異的マーカーにて細胞特異的な保護効果について検討したところ、顆粒細胞層の完全な保護が観察され、双極細胞層、アマクリン細胞層、視細胞層では50%程度の保護を示した。

C-5. ProT α の先制治療効果機構解明

ProT α 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、ProT α 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。

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ProT α の活性ペプチドを見出した。ProT α 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可能性もある。一方、ProT α 、並びに活性ペプチドは虚血後の24時間投与でほぼ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ProT α 受容体を介する可能性がある。

E. 結論

本研究では、網膜保護新規候補分子としてProT α 、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のが大いに期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Halder SK, Matsunaga H, Yamaguchi H, Ueda H (2013) Novel neuroprotective action of prothymosin α -derived peptide against retinal and brain ischemic damages. *J Neurochem* 125:713-723.
- 2) Halder SK, Sugimoto J, Matsunaga H, Ueda H (2013) Therapeutic benefits of 9-amino acid peptide derived from prothymosin alpha against ischemic damages. *Peptides* 43:68-75.

2. 学会発表

松永隼人、Sebok Kumar Halder、植田弘師、プロサイモシン α 由来脳梗塞保護ペプチドの創薬研究、第66回日本薬理学会西南部会、2013年11月16日、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

研究報告書

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

網膜保護用デバイスの開発と効果に関する研究

研究分担者 永井展裕 東北大学大学院医学系研究科 助教

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グ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 H25 年度は、H24 年度にデバイス化したクロトリマゾール DDS（CLT-DDS）の薬効を動物モデルで評価することを目的とした。動物モデルとして、ラット網膜光障害モデルを使用した。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。CLT-DDS をラット強膜上に移植後、1 週間後に光障害（8000Lux、24 時間）を実施し、4 日間暗順応後に網膜電図（ERG）を評価した。その結果、CLT-DDS 移植群ではプラセボ移植群対比、ERG 振幅値の低下が抑制されていた。ERG 後 11 日目に眼球を摘出し、網膜のウェスタンブロットを実施した結果、CLT-DDS 移植群ではプラセボ移植群対比、Cleaved caspase-3 および Pshophorylated JNK の発現が抑制されていた。以上から、CLT-DDS は細胞死関連シグナルを抑制することによって網膜保護する可能性が示唆された。

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グ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（CLT-DDS）を報告した。H25 年度は、この CLT-DDS の網膜保護エビデンスを検証するために、ラット網膜光障害モデルを用いて検討した。光障害モデルは、過剰光（8000Lux）

下でラットを長時間飼育することで網膜に障害を与えるモデルであり、加齢黄斑変性（AMD）のモデルとして利用されている。この光障害モデルでは、Reactive oxygen species（ROS）による酸化ストレスが網膜内で生じている可能性があり、H24 年度に細胞培養で示唆された CLT の ROS 産生の抑制効果は網膜保護に有効であると期待できる。

B. 研究方法

1. クロトリマゾール徐放デバイスの作製
 - （1）薬物リザーバー鑄型の作製

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、CAMによってボールエンドミルを使用してアクリル樹脂を切削加工した。アクリル板にポリジメチルシロキサン (PDMS) をキャストし60°Cで効果して、鋳型形状をPDMSに転写した。PDMSをプラズマクリーナーで親水化した後にフルオロシランでコートし、鋳型を完成した。

(2) デバイスの作製

PDMS鋳型に、Triethyleneglycoldimethacrylate (TEGDM、Aldrich) 5mLに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenoneを0.1mL混合したプレポリマーを流し、UV架橋 (11.6mW/cm²、40秒、LC8、浜松ホトニクス) してリザーバーを作製した。作成したリザーバーのサイズは内径、縦1.5mm×横1.5mm×高さ0.5mm、薬剤充填部容量は1.2μLである。

徐放膜および薬物剤形として、Polyethyleneglycoldimethacrylate (PEGDM、Aldrich) 5mLに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenoneを0.1mL混合したPEGDMプレポリマーに、上記のTEGDMを混合(0~100%(v/v))したものを使用した。

CLTをPEGDM 40%/TEGDM 60% (P40) に250mg/mlで混合して、リザーバーにキャストし (1.2μL)、UV架橋 (11.6mW/cm²、40秒、LC8、浜松ホトニクス) した。

CLTペレット上に、P40もしくは60%/TEGDM 40% (P60)を1μLキャストし、ガラス板を乗せた状態でUV架橋 (11.6mW/cm²、4分、

LC8、浜松ホトニクス) した。P40でカバーしたものをCLT-P40、P60でカバーしたものをCLT-P60と略す。

剤形としてPBS (リン酸バッファー) を薬物として使用したものをPBS-DDS (Placebo) として使用した。

2. ラット網膜光障害モデル実験

(1) デバイスの移植

ラットの右眼の結膜を切開し、デバイスを強膜上に留置して、結膜を縫合して軟膏を塗って移植を終了した。左眼は未処理とした。

(2) 光障害

デバイス移植後1週間目に、ミドリンP点眼で散瞳後に、光障害用のチャンバー (NKシステム) にラットを移動し、22°Cで8000Luxの照度で24時間飼育した。

(3) 網膜電図 (ERG)

光障害後4日間暗順応した後、暗室下でミドリンP点眼で散瞳した。ラットに眼球に角膜電極を当てて固定し、-3.577、-2.577、-1.577、-0.577、0.477 (log cd*s/m²) の光刺激でERGを測定した (Mayo)。N=4。

(4) ウェスタンブロット

ERG測定後、11日目に眼球を摘出し、網膜を慎重に分離した。Lysis bufferで網膜ホモジネートを調製し、SDS-PAGE後、セミドライ式ブロットでPVDF膜に転写し、抗体 (Cell signaling) でCleaved caspase-3とPhosphorylated JNK (p-JNK) の検出を行った。

(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。

C. 研究結果

1. 網膜電図

ERG振幅値はCLT-P40のa波 (Fig1a)、b波 (Fig1b) およびCLT-P60のa波 (Fig1c)、b波 (Fig1d) のいずれにおいても、Placebo対比高い傾向を示した。*は有意差 (T-test、 $P < 0.05$) を示している。

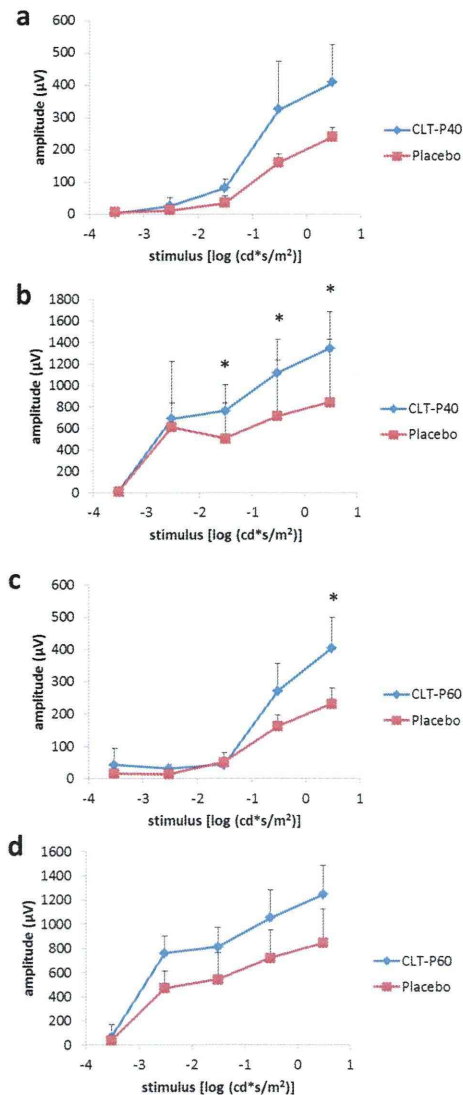


Fig. 1 ERG振幅値

2. ウェスタンブロット

CLT-P40およびCLT-P60移植群ではPlacebo対比、cleavedcaspase-3およびp-JNKの有意に低い発現を示した。

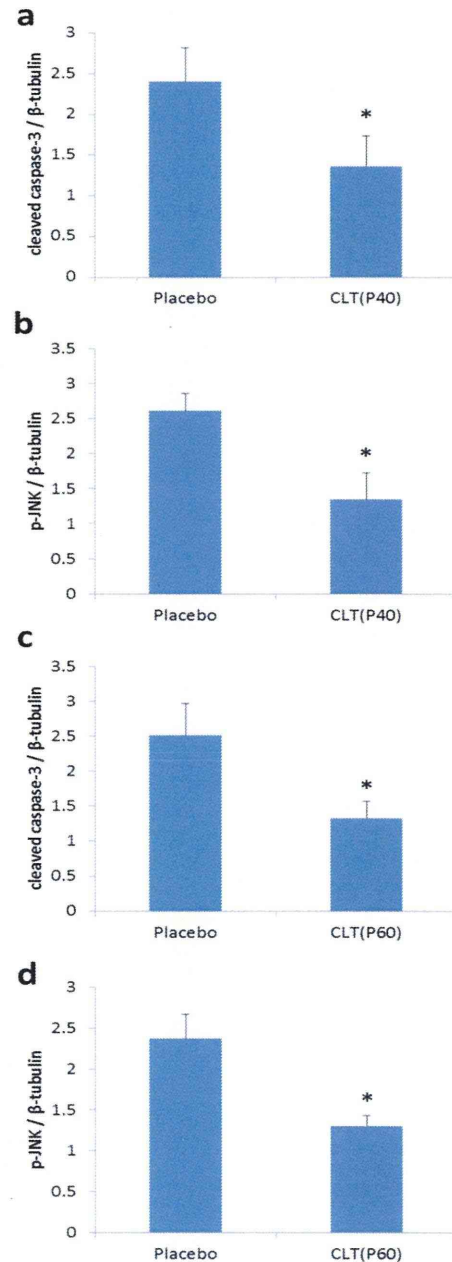


Fig.2 ウェスタンブロットのバンド強度