

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ピ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 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、 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、 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。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)。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)。

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などで定量を行う。

(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ピン (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ピ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