

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ゲ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  $\mu$ M 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 (ProT) 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 (ProT) 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 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

ProTαはエンドトキシンの混入を極力避けるため、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。また、新規方法によるリコンビナントProTαの精製についても確立した（詳細は結果C-1に記載）。ProTα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 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 、部分欠損変異体による生存活性を評価することで、ProT 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。

#### 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 ProT 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<sup>+</sup> 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十分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 の調製法確立

マウスProT 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ProTα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。ProTαの効果を裏付けるために、1μg ProTα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50μg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 活性フラグメントペプチドの神経細胞死保護効果

ネクローシス保護を指標としたセルベースアッセイにて、ProT のGST融合部分欠損ProT、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 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 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。

### 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/μl/eye、P9では10 pmol/μl/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 の先制治療効果機構説明

ProT 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 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 $\alpha$ の活性ペプチドを見出した。ProT $\alpha$  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 $\alpha$ 、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 $\alpha$ 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、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  $\alpha$ -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 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 Phosphorylated 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) で鑄型の

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℃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/cm<sup>2</sup>、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/cm<sup>2</sup>、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/cm<sup>2</sup>、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、ミドリリンP点眼で散瞳後に、光障害用のチャンパー(NKシステム)にラットを移動し、22℃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/m<sup>2</sup>)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。

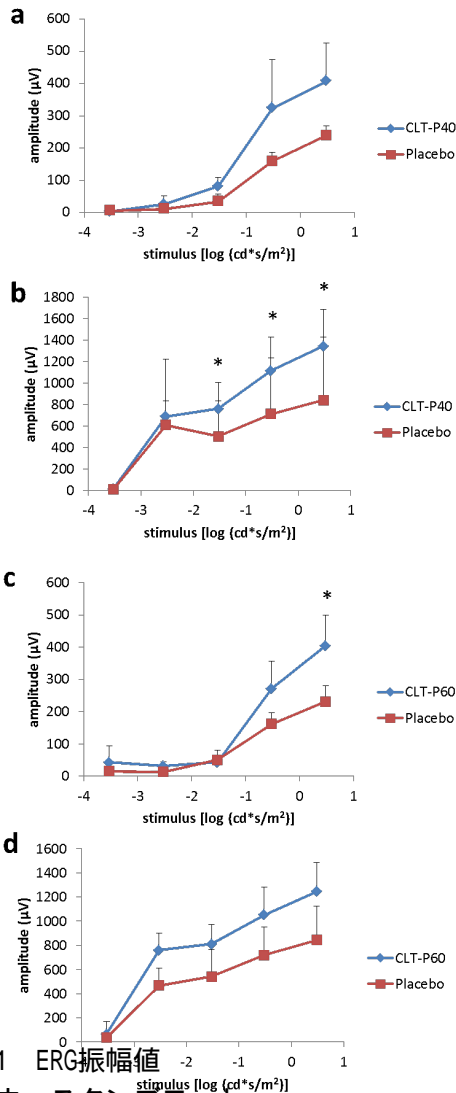


Fig.1 ERG振幅値  
2. ウェスタンブロット

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。

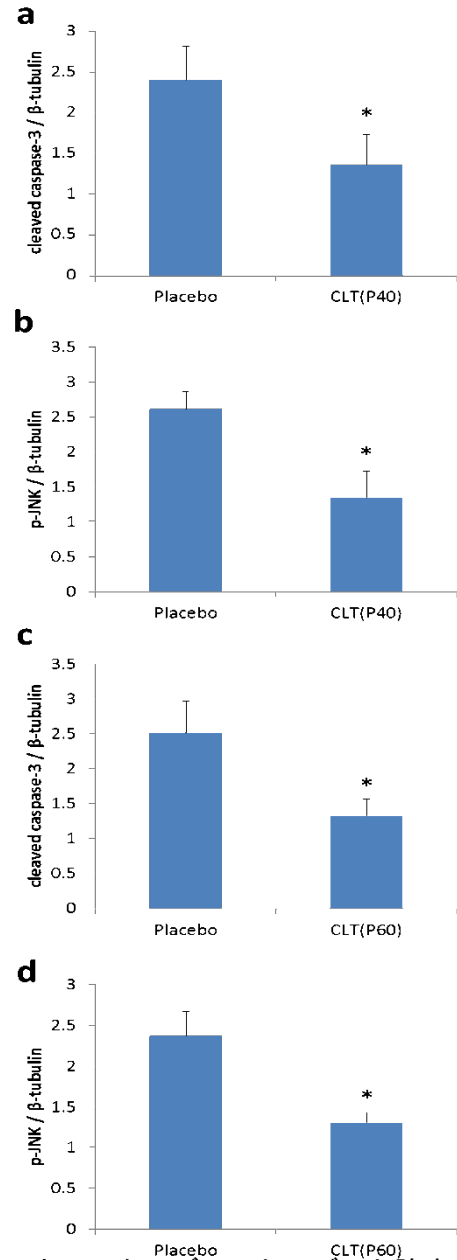


Fig.2 ウェスタンブロットのバンド強度

### D. 考察

H24年度の検討でCLTは網膜神経節細胞と網膜色素上皮細胞の低酸素・低栄養負荷培養に対して、細胞保護作用およびROS産生抑制作用が示唆されている。経強膜的に徐放されたCLTが神経網膜または網膜色素上皮細胞に到達し、光障害に伴う酸化ストレス障害を抑制したことが示唆される。

この結果はCLTの網膜保護剤としての新規薬効を示しており、さらに徐放デバイス化によって、投与量を調整して全身性の副作用を抑制しながら、網膜局所の治療ができる可能性を示している。

#### E . 結論

CLT-DDSの網膜保護剤としての可能性を示した。

#### 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 Biomaterialia*, **10**, 680-687, 2014.
2. **Nagai N**, Kaji H, Onami H, Katsukura Y, Ishikawa Y, Zhaleh KN, 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. *Advanced Healthcare Materials*, in press, DOI:10.1002/adhm.201400114. 2014.

#### 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. ARVO2013 annual meeting, Seattle, Washington (May 5-9, 2013)

(国内学会発表)

1. Zhaleh KN, **Nagai N**, Yamamoto K, Saya H, Kaji H, Nishizawa M, Nakazawa T, Abe T. Protective effects of sustained clotrimazole release against light-induced retinal degeneration in rats. 第35回バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀(2013年11月25日-26日)
2. Zhaleh KN, **Nagai N**, Yamamoto K, Saya H, Kaji H, Nishizawa M, Nakazawa T, Abe T. Protective effects of Clotrimazole against oxidative stress-induced cell death in RGC-5 cells and preparation of controlled release device. 第29回日本DDS学会学術集会、京都テルサ(2013年7月4日-5日)

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

## 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に関する研究

研究分担者 西澤松彦 東北大学大学院工学研究科 教授

#### 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 年度は前年度から引き続き、将来的に人に応用するための検討として、微細加工法によるデバイス形状の最適化方法を検討した。臨床データから平均的な眼球サイズを計算し、デバイス先端が黄斑部周辺に届く長さ、と、眼球の曲率にあったデバイスの設計を行った。また、デバイスに複数の溝をつけることで、縫合位置を限定せずに任意の部位に縫合できるデバイス設計を行った。

#### 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。将来的に人に応用するための検討として、微細加工法によってデバイス形状を最適化する方法を検討した。H25年度は、臨床データから平均的な眼球サイズを計算し、デバイス先端が黄斑部周辺に届く長さ、と、眼球の曲率にあったデバイスの設計を行った。また、デバイスに複数の溝をつけることで、縫合位置を限定せずに任意の部位に縫合できるデバイス設計を行った。

微細加工は切削装置のMicroMC-2（PMT Co.）を使用した。これはマイクロ単位でアクリル板上にCAD（Computer aided design）

でデザインした設計図を切削することができる。デバイスの形状をCADで作製し、アクリル板に掘って鋳型を作製し、これをもとにPDMS（ポリジメチルシロキサン）に鋳型を転写し、この2次鋳型を用いて、DDSの基材であるPEGDM（ポリエチレングリコールジメタクリレート）を光重合し、デバイスを作製している。

#### B．研究方法

##### 1．デバイス作製用PDMS鋳型の作製

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。このアクリル板にPDMSを乗せ、60℃でPDMSを硬化し、リザーバー形状をPDMSに転写した。こ

のPDMSをシラン化処理した。以下、シラン化処理を示す。PDMSをエタノール、蒸留水の順で10分間ずつ超音波洗浄し、オープンで乾燥した。プラズマアッシャー（YHS-R）で30秒間酸素プラズマ処理を施した。プラズマ処理したPDMSをシャーレに置き、ドラフト内でシラン（1H,1H,2H,2H-PERFLUOROOCYLTTRICHLOROSILANE、WAKO）を2ヶ所に2 μlずつPDMSに付かないように垂らし、ふたをして1時間以上静置した。

シラン化処理したPDMS上に別のPDMSを乗せて、60℃で硬化した。このPDMS鑄型が最終形である。

## 2．デバイス（リザーバー）の作製

PDMS鑄型に、Triethyleneglycoldimethacrylate（TEGDM、Adrich）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/cm<sup>2</sup>、40秒、LC8、浜松ホトニクス）してリザーバーを作製した。このPDMSをシラン化処理した。以下、シラン化処理を示す。PDMSをエタノール、蒸留水の順で10分間ずつ超音波洗浄し、オープンで乾燥した。プラズマアッシャー（YHS-R）で30秒間酸素プラズマ処理を施した。プラズマ処理したPDMSをシャーレに置き、ドラフト内でシラン（1H,1H,2H,2H-PERFLUOROOCYLTTRICHLOROSILANE、WAKO）を2ヶ所に2 μlずつPDMSに付かないように垂らし、ふたをして1時間以上静置した。

シラン化処理したPDMS上に別のPDMSを乗せて、60℃で硬化した。このPDMS鑄型が最終形である。

## 2．デバイス（リザーバー）の作製

PDMS鑄型に、Triethyleneglycoldimethacrylat

e（TEGDM、Adrich）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/cm<sup>2</sup>、40秒、LC8、浜松ホトニクス）してリザーバーを作製した。

## C．研究結果

### 1．デバイス鑄型の作製

角膜を入れた日本人眼軸長は平均23.8mmと計算された（Fig.1）。角膜を考慮し眼球中心から黄斑までを11mm、眼球中心から赤道部までを12mmとした。赤道部から黄斑部まで計算上18mmと考えられ、赤道部から角膜輪部までは10.8mmと計算した。デバイス先端が黄斑でデバイス後端が赤道部とするとデバイスサイズは18mmとなるが、強膜に糸をかける位置とデバイスの縫合糸溝の位置などを考慮するとデバイス長さは19mm、21mm、23mmの3種類が適切と判断した。臨床で使用されていた黄斑プロンベは長さが21-27mmで21mmは最短となるが、黄斑プロンベそのものが近視の網膜剥離に使用することが多いことを考慮すると妥当な値と考えた。デバイスの縫合溝がデバイス後端より1.4mmで、溝幅が0.3mmで、もうひとつの糸溝がそこから1.7mmになるので、デバイス後端から奥の縫合溝まで3.4mmになる。

眼球のカーブはこれまでのデータからまず眼球直径24mmを考えた。さらに角膜の突出、眼軸長分布、デバイスフィット状態を考慮して22mmも考慮した。したがってデバイス長

に対してそれぞれ24mm、22mmの円を考慮したデバイスカーブを作製することで、

平均的な成人の眼球に適応可能なデバイスが準備できると考えられる。

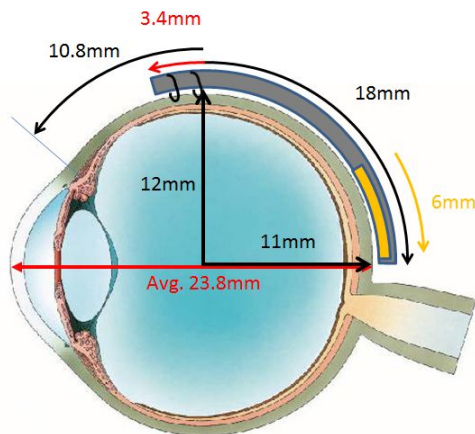


Fig.1 ヒトの平均的な眼球サイズとデバイスサイズ

## 2. 縫合溝の形状検討

デバイスを強膜に固定するための縫合糸を引掛ける溝として、デバイス後端部に側面にそれぞれ2か所の溝を設計した (Fig.2a)。しかし、眼球モデルにデバイスの固定を検討した結果、縫合で縛る力によって後端部が強膜に押し付けられ、逆に先端側が強膜から浮いてしまう可能性が指摘された。そこで、デバイスの先端部により近い部分に複数の溝を設計した (Fig.2b)。この形状によって縫合糸を掛ける位置がよりデバイス先端側に移動するため、デバイスの浮きがありを抑制できると期待できる。また、縫合糸のかけ方に自由度が増し、状況に応じて縫合部位を変えることができる。また別のパターンとして、横に溝をつけるのではなく、デバイス上面に横一直線の溝を設計した。突起物がなく

なるため、安全に縫合できる可能性がある。

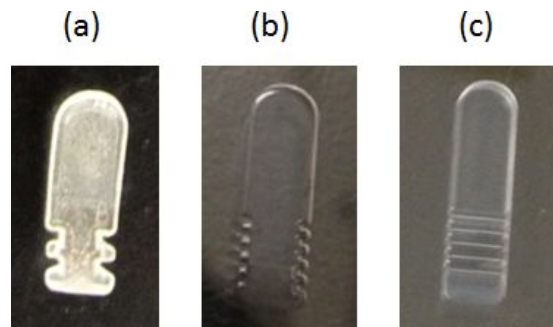


Fig.2 リザーバーの形状

## D. 考察

網膜疾患治療では、黄斑部周囲に薬剤を届ける必要があるため、できるだけ後眼部へデバイスのリザーバー部位を挿入する必要がある。また、徐放面が強膜に密着しなければ、Fibrosisが徐放面に侵入し薬剤が吸収されたり、デバイスと強膜の隙間から薬剤が逃げて結膜へ吸収され、薬剤送達効率が悪くなる可能性がある。今回のプロトタイプでは、縫合糸による強膜上への固定が可能となり、強膜への密着が強化された。

今後はモデルドラッグで眼内への移行性、薬物分布を評価し、移行が確認できたら、実際の薬物で網膜変性動物に移植し、治療効果を確認していく。

## E. 結論

ヒト眼用のデバイス形状を作成した。今後は治験用デバイスの作製のための準備をしていく。

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, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Nisizawa M, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe. "A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye" Acta Biomaterialia, 10, 680-687 (2014).

2. Nagai N, Kaji H, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Zhaleh KN, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Shuntaro Ito, Nisizawa M, Toru Nakazawa, Noriko Osumi, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe. "A Platform for Controlled Dual-Drug Delivery to the Retina: Protective Effects against Light-Induced Retinal Damage in Rats" Advanced Healthcare Materials, in press, DOI:10.1002/adhm.201400114 (2014).

2. 学会発表

(国際学会発表)

1. Nagai N, Kaji H, Onami H, Yamada T, Katsukura Y, Ishikawa Y, Nisizawa M, Mashima Y, Abe T. Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Photoreceptor Cell Death in S334ter Rhodopsin Mutant Rats. ARVO2013 annual meeting, Seattle, Washington (May 5-9, 2013)

(国内学会発表)

1. Zhaleh KN, Nagai N, Yamamoto K, Saya H, Kaji H, Nishizawa M, Nakazawa T, Abe T. Protective effects of sustained clotrimazole release against light-induced retinal degeneration in rats. 第35回バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀 (2013年11月25日-26日)

2. Zhaleh KN, Nagai N, Yamamoto K, Saya H, Kaji H, Nishizawa M, Nakazawa T, Abe T

Protective effects of Clotrimazole against oxidative stress-induced cell death in RGC-5 cells and preparation of controlled release device. 第29回日本DDS学会学術集会、京都テルサ (2013年7月4日-5日)

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