

201317027B (1/2)

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23-25年度 総合研究報告書

研究代表者 阿部 俊明

平成26(2014)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. 重症眼疾患と神経保護治療 中澤 徹	-----	11
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	-----	18
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	-----	22
4. 網膜保護用デバイスの開発に関する研究 西澤松彦	-----	32
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	38
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	55

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）研究事業）
総合研究報告書

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

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。

23-24年度で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種類が網膜保護効果薬の可能性があると考えられた。この中で、負荷された細胞が薬剤を添加することで非負荷細胞と同等の細胞活性を示す薬剤クロチマゾールがあることが判明した。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。

24-25年度はラット移植用のデバイスでスクリーニングされた薬剤の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、コントロールのGGA (350Da)を徐放させた場合、網膜保護効果があるのを確認した。次にトリクロマゾールをデバイスから徐放させると、in vitroで持続性の徐放が確認でき、ラットに移植すると網膜光障害から網膜を保護することを網膜電図、網膜組織厚で証明した。また、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。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。

阿部俊明

東北大学大学院医学系研究科
教授

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我々の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。さらにスクリーニングされた薬剤をデバイスに包埋し、この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）に移植し、持続的に薬剤を投与して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。

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

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。新規薬剤のスクリーニングは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

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)

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ンヒピン、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)。

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。担当: 西澤、阿部、永井

4) 薬効検討システム (24-25 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も検討する。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、LC/MS/MS で定量を行う。

(2) 網膜変性ラットモデルを利用した複数薬剤の利用。

1 薬剤ずつデバイスに入れて効果を見るだけでなく、複数の薬剤 (2-3 薬剤) をそれぞれ別々に徐放させ、網膜変性抑制効果を確認する。コントロールは非移植眼だけでなく薬剤非徐放デバイス移植も利用する。複数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た薬剤をうまく利用できるように工夫する。時間の問題もあり短期間 (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、瞳孔反応等の検査を行うが、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。

(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 (23-25年度)

(1) 薬剤ライブラリーのスクリーニング

(23-24年度)

既存薬ライブラリー (2314 種) からのスクリーニングを終了した。

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 μ M 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)。本化合物はクロチマゾールとして知られる抗真菌剤であった。網膜神経節細胞を利用した負荷培養でも濃度依存的に保護効果

を示した。

一方、既存薬とは別に我々の研究グループで保持している薬剤候補物質の網膜細胞保護効果の確認も行った。まず、ProTa は、マウス ProTa 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。ProTa 活性フラグメントペプチドは、外注にて依頼合成した。本物質はラット 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で評価すると、ProTa の活性ドメイン (30 アミノ酸) が同定できた。さらに、30 アミノ酸のアラニンスキャニングを行い、活性重要アミノ酸を同定した。また、抗新生血管薬候補としてバゾヒビンを硝子体内に投与したが、光凝固誘導脈絡膜新生血管の発生を有意に抑制することが判明した。

(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。

① 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認できると考えて行われた。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。

②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 *in vitro* で確認し、*in vivo* 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。

③薬剤ライブラリーからスクリーニングされたクロチマゾールをデバイスにいれ徐放を確認した。クロチマゾールは PEG/TEG 比でバーストなしに徐放をコントロールすることができた。ラットにクロチマゾール徐放デバイスを移植後に光障害を行うと網膜電図と組織検査で有意に網膜保護効果があることが判明した。

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、強膜上から徐放することで網膜保護効果を確認した。すなわち薬剤ライブラリーからのスクリーニングで効率よく網膜保護効果のある臨床薬を見つけることが可能であったが、それをさらに強膜の上から局所的に徐放させることで網膜保護効果の確認がで

きた。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。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. 研究発表

【平成23年度】

1. 論文発表

1. 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)
2. Ryosuke Wakusawa, Toshiaki Abe, Hajime Sato, Hikaru Sonoda, Masaaki Sato, Yuuichi Mitsuda, Tomoaki Takakura, Tomi Fukushima, Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Yumi Ishikawa, Kohji Nishida, Yasufumi Sato. "Suppression of choroidal neovascularization by vasohibin-1, a vascular endothelium-derived angiogenic inhibitor" *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(6), 3272-3280 (2011).
3. Takeaki Kawashima, Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Norihiro Kumasaka, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Noriko Osumi, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe "A scalable

controlled-release device for transscleral drug delivery to the retina”

Biomaterials, 32(7), 1950-1956 (2011)

4. Nobuo Fuse, MingGe Mengkegale*, Akiko Miyazawa, Toshiaki Abe, Toru Nakazawa, Ryosuke Wakusawa and Kohji Nishida Polymorphisms in ARMS2 (LOC387715) and LOXL1 Genes in Japanese with Age-related Macular Degeneration. **AJO** 2011 Mar;151(3):550-556.e1. Epub 2011 Jan 13.
 5. Kayama M, Nakazawa T, Thanos A, Morizane Y, Murakami Y, Theodoropoulou S, Abe T, Vavvas D and Miller JW. Heat shock protein 70 (HSP70) is critical for the photoreceptor stress response after retinal detachment via modulating anti-apoptotic Akt kinase. **Am J Pathol** ;178(3):1080-1091, 2011.
 6. Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. Ryu M, Nakazawa T, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, Abe T, Akashi M, Nishida K. **J Control Release**. 2011;151(1):65-73.
 7. Preoperative factors predictive of postoperative decimal visual acuity □ 1.0 following surgical treatment for idiopathic epiretinal membrane. Hiroshi Kunikata, Toshiaki Abe, Jiro Kinukawa, Kohji Nishida **Clinical Ophthalmology** 2011;5 147-154
 8. Hiroshi Kunikata Nobuo Fuse, Toshiaki Abe Fixating Dislocated Intraocular Lens by 25-Gauge Vitrectomy. Ophthalmic Surgery, **Lasers & Imaging** 2011;42(4) 297-301
 9. Hiroshi Kunikata, Fumihiko Nitta, Yasuhiko Meguro, Naoko Aizawa, Takehiro Hariya, Naoki Chiba, Toshiaki Abe, Kohji Nishida Difficulty in Inserting 25- and 23-gauge Trocar-cannula during Vitrectomy **Ophthalmologica** 2011;226(4) 198-204.
 10. Hiroshi Kunikata, Toshiaki Abe, Kohji Nishida Successful outcomes of 25- and 23-gauge vitrectomies for giant retinal tear detachments. **Ophthalmic Surgery, Lasers**
- & Imaging** in press
1. 1. Takeo Miyake, Keigo Haneda, Nobuhiko Nagai, Yohei Yatagawa, Hideyuki Ohnami, Syuhei Yoshino, Toshiaki Abe and Matsuhiko Nishizawa Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms. **Energy & Environmental Science** 2011, 4, 5008-5012.
 1. 2. 生理活性物質と眼疾患の基本 各種眼疾患と生理活性物質のかかわり Behcet 病 阿部俊明 臨眼 65 : 1018-1020, 2011.
 1. 3. 大友孝昭, 阿部俊明, 劉孟林, 渡邊亮, 津田聡, 岡村知世子, 千葉真生, 布施昇男 東北大学病院におけるぶどう膜炎の臨床統計 臨床眼科 65 巻 6 号 Page891-894(2011. 06)
 1. 4. 新田文彦, 國方彦志, 中澤徹, 鬼怒川次郎, 安田正幸, 阿部俊明 レーザースペックルフローグラフィを用いた光線力学療法後の血流解析 臨床眼科 (0370-5579) 65 Page863-868(2011. 06)
 1. 5. 岡村知世子, 國方彦志, 阿部俊明, 中澤満, 布施昇男 強膜開窓術後 23 年経過し再発したぶどう膜滲出の 1 例 臨床眼科(0370-5579) 65 巻 6 号 Page895-900(2011. 06)
 1. 6. 岡村知世子, 大友孝昭, 布施昇男, 阿部俊明 Behcet 病ぶどう膜炎に対するインフリキシマブ療法の中間成績とその安全性の検討 新しい眼科 28 : 696-701, 2011.
2. 学会発表
(国際学会発表)
 1. Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe “Transscleral Sustained Drug Delivery by Novel Device” BIT’s 1st Annual Symposium of Drug Delivery System (SDDS-2011), Shenzhen, China (Nov 3-5, 2011), Oral
 2. Nobuhiro Nagai, Takeaki Kawashima, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaki, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe “Evaluation of Ocular Tissue Distribution of Drugs Delivered Transsclerally From A Non-biodegradable Polymeric Capsule Device” 2011 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida
 3. Toshiaki Abe, Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Norihiro Kumasaki, Ryosuke Wa

kusawa, Yumi Ishikawa, Shigeki Machida, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato "Suppression of Choroidal Neovascularization By Vasohibin-1 in Monkey Eyes" 2011 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida

(国内学会発表)

1. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、佐藤真智子、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」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ（2011年11月21日～22日）
2. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、佐藤真智子、西澤松彦、阿部俊明：「網膜保護用のマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都テルサ（2011年11月21日～22日）
3. 永井展裕、阿部俊明：「経強膜ドラッグデリバリーシステムによる網膜保護」2011年度厚生労働省研究班キックオフミーティング、東北大学医学部（2011年8月25日）
4. 永井展裕、熊坂典浩、大浪英之、川島文明、梶弘和、西澤松彦、阿部俊明：「経強膜ドラッグデリバリーシステムによる網膜神経保護の試み」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス（2011年6月9日～10日）
5. 永井展裕、川島文明、梶弘和、熊坂典浩、大浪英之、西澤松彦、阿部俊明：「多動動態制御性に優れたマルチドラッグデリバリーシステムの作製」第27回日本DDS学会学術集会、東京大学本郷キャンパス（2011年6月9日～10日）
6. 大浪英之、永井展裕、熊坂典浩、石川有美、涌沢亮介、佐藤靖史、阿部俊明：「サル脈絡膜新生血管モデルに対するバソヒビンの抑制効果」第115回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2011年5月12日～15日）
7. 阿部俊明 仙台市眼科医会講演会仙台国際ホテル6F楓 2011年7月27日 特別講演「AMDならびにその関連疾患の診断と治療」
8. 阿部俊明 第6回Step Up セミナー 東北6大学眼科 7月31日 教育講演 AMDとその類縁疾患の診断と治療
9. 伊藤梓・新田文彦・國方彦志・阿部俊明 第14回東北黄斑研究会学術講演会 20

11年8月27日 黄斑円孔術後に発症した、近視性脈絡膜新生血管の一例

10. 阿部俊明 米沢市医師会学術講演会2011年10月19日 東京第一ホテル米沢 加齢黄斑変性の病態と治療
11. 阿部俊明、永井展裕、大浪英之、中澤徹、梶弘和、西澤松彦 第65回日本臨床眼科学会 東京国際フォーラム 2011年10月7-10日 専門別委員会 特別講演 経強膜ドラッグデリバリーデバイスの開発
12. 阿部俊明、永井展裕、大浪英之、梶弘和、嘉山真紀、西澤松彦、中澤徹 GGA研究会 2011年9月3日 丸ビルホールG GA徐放デバイスによる網膜保護

【平成 24 年度】

1. 論文発表
 1. 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
 2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
6. 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
 7. 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)
 8. 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.
 9. 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ロンアセトニドの効果. *臨床眼科* 66(8): 1219-1224, 2012. 8.
 10. 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
 - 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 ペガブ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囊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
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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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

【平成 25 年度】

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 卷 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 APMPE 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斑変性の一

例、第 67 回日本臨床眼科学会 横浜
2013/10/31-11/3.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

【平成23年度】

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

【平成24年度】

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

【平成25年度】

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
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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 μ 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. 研究発表

【平成 23 年度】

1. 論文発表

1. Kayama M, **Nakazawa T***, Thanos A, Morizane Y, Murakami Y, Theodoropoulou S, Abe T, Vavvas M, Miller JW*. Heat Shock Protein 70 is critical for the photoreceptor stress response after retinal detachment via modulating anti-apoptotic Akt kinase. *Am J Pathol.* Mar;178(3): 1080-91. 2011.
2. Ryu M, **Nakazawa T***, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, Abe T, Akashi M, Nishida K. Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. *J Control Release.*;151(1):65-73. Apr 10 2011.
3. **Nakazawa T***, Kayama M, Ryu M, Kunikata H, Watanabe R, Yasuda M, Kinugawa J, Vavvas D, Miller JW. Tumor Necrosis Factor- α Mediates Photoreceptor Death in a Rodent Model of Retinal Detachment *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Mar 14;52(3):1384-91. 2011.
4. Fuse N, Mengkegale M, Miyazawa A, Abe T, **Nakazawa T**, Wakusawa R, Nishida K. Polymorphisms in ARMS2 (LOC387715) and LOXL1 Genes in Japanese with Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol.* Mar;151(3):550-6.2011.
5. Takayama S, Seki T, **Nakazawa T**, Takahashi S, Watanabe M, Izumi M, Kaneko S, Kamiya T, Matsuda A, Kikuchi A, Yambe T, Yoshizawa M, Nitta S, Yaegashi N, Aizawa N.

Short-term effects of acupuncture on open-angle glaucoma in retrobulbar circulation: Additional therapy to standard medication. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 157090. Epub Mar 7.2011.

6. Watanabe R, **Nakazawa T**, Fuse N. Observation of posterior corneal vesicles with *in vivo* confocal microscopy and anterior segment OCT. *Clin Ophthalmol.* 27;4:1243-7. doi: 10.2147/OPHTH.S14550.2010.
7. Kunikata H, Uematsu M, **Nakazawa T**, Fuse N. Successful Removal of Large Intraocular Foreign Body by 25-Gauge Microincision Vitrectomy Surgery. *J Ophthalmol.* :940323. Epub 2011 Apr 4. 2011.
8. **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. *J Glaucoma.* Feb 5.2012.
9. Ryu M, Yasuda M, Shi D, Shanab A. Y, Watanabe R, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Takano J, Saido T, **Nakazawa ***. The critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res.*;90(4):802-15. 2012.
10. Aizawa N, **Nakazawa T***, et al. Reproducibility of retinal circulation measurements obtained using laser speckle flowgraphy-NAVI in patients with glaucoma. *Clin Ophthalmol.*. 5. 1171-6. 2011.
11. Chiba N, **Nakazawa T***, et al. Association between optic nerve blood flow and objective examinations in glaucoma patients with generalized enlargement disc type. *Clin Ophthalmol.*. 2011;5:1549-56. Epub Oct 28. 2011.
12. Yokoyama Y, **Nakazawa T***, et al. Significant Correlations between Optic Nerve Head Microcirculation and Visual Field Defects and Nerve Fiber Layer Loss in Glaucoma Patients with Myopic Glaucomatous Disc. *Clin Ophthalmol.*;5:1721-7. Epub . 2011.
13. Otani T, Yasuda K, Aizawa N, Sakai F, **Nakazawa T***, Shimura M. Over 10 years follow-up of Coats' disease in adulthood. *Clin Ophthalmol.*;1729-32. Epub Dec

8.2011

- 1 4. Tsubota K, Yoshida T, Kurosaka D, Lee KR, Alfonso CE, **Nakazawa T***. Miami to Japan Eye-Care Rescue Mission: Vision Van Helps with Relief Efforts. *Am J Ophthalmol.*;152(5):886-7.2011.
 - 1 5. Shimura M, Yasuda K, Miyazawa A, Otani T, Nakazawa T. Pre-seasonal treatment with topical olopatadine suppresses the clinical symptoms of seasonal allergic conjunctivitis. *Am J Ophthalmol.*;151(4):697-702.2011
 - 1 6. The Japanese Steroid-Induced Glaucoma Multicenter Study Group: Success Rates of Trabeculotomy for Steroid-Induced Glaucoma: a Comparative, Multicenter, Retrospective, Cohort Study. *Am J Ophthalmol.*;151(6):1047-1056.2011
2. 学会発表
 1. ARVO2011
Critical role of Nrf2 in the oxidative stress-induced retinal ganglion cell death.
 2. EGA2011
Neuroprotective treatment for glaucoma: Establish the drug delivery system for the suppression of phagocytic cells with nanoparticles.
 3. Santen Private Seminar
NTGにおける神経保護治療戦略.
 4. 第8回 国際緑内障シンポジウム
NEUROPROTECTION AND APOPTOSIS OF RETINAL GANGLION CELLS RELATED TO GLAUCOMA
 5. 第33回京滋緑内障カンファレンス
緑内障における眼循環と神経保護治療.
 6. 第11回日本抗加齢医学学会総会
緑内障と酸化ストレス.
 7. 第3回山梨県学術講演会
緑内障にかかわる最新のトピックス.
 8. 第54回コンタクトレンズ学会
緊急座談会
 9. 第31回日本眼薬理学会
γPGAナノ粒子による内眼炎ステロイド治療
 - 1 0. 第24回日本緑内障学会
軸索障害による網膜神経節細胞死の基

礎的実験成果

- 1 1. 千寿製薬ランチョンセミナー
神経 (New論) 保護治療の可能性について
- 1 2. 第54回日本神経化学会大会
Neuroprotective treatment for glaucoma.
- 1 3. 臨床眼科学会
東日本大震災への宮城県における眼科支援
- 1 4. 室蘭眼科医会 学術講演会
緑内障における役者たち、細胞レベルの考察

【平成 24 年度】

1. 論文発表
 1. 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.* 108. 2013
 2. 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.* ;181(1):53-61. 2012.
 3. 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.*:513638. 2012
 4. 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*.;18:1395-1401. 2012.
5. Kobayashi W, Abe T, Tamai H, Nakazawa T. Choroidal excavation with polypoidal choroidal vasculopathy: a case port. *Clin Ophthalmol*.;6:1373-1376. 2012.
 6. 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*.;48(3):556-567.2012.
 7. 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*. 38(9):1602-1607. 2012.
 8. 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. *AmJ Ophthalmol* .54(5):825-832. 2012 .
 9. 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) *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 116(6):575-580. 2012.
 10. 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. *Adv Ther*. 29(4):339-49. 2012.
 11. 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53(6):3145-3153. 2012.
 12. 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. *J Glaucoma*. 21(6):426-430. 2012.
 13. 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. *J Neurosci Res*. 90(4):802-815. 2012.
 14. Kunikata H, Aizawa N, Meguro Y, Abe T and Nakazawa T. Combined 25-gauge microincision vitrectomy and toric intraocular lens implantation with posterior capsulotomy. *J Cataract Refract Surg*. 38(9):1602-1607. 2012.
 15. 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. *Retina*. Dec 5. 2012.
2. 学会発表
 1. IMFIA 2012 (International Forum on Medical Imaging in Asia)
Fast Registration Algorithm of 3D Optical Coherence Tomography Images Based on En-Face Projection Image
 2. 韓国老化学会(AACL)
The molecular mechanism of glaucomatous optic neuropathy: learning from a mouse model of axonal damage

- e-induced RGC death
3. The 1st Asia-Pacific Glaucoma Congress (APGC2012)
Advances in basic sciences: implications for clinical management of glaucoma
 4. Expectation of blood flow modification for the treatment of glaucoma: Increased effect of Tafluprost on the ocular circulation
 5. 第116回日本眼科学会総会
 - ・ 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
 6. 第29回日本眼循環学会
 - ・ 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
 7. 第23回日本緑内障学会
 - ・ 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
 8. 第66回日本臨床眼科学会
 - ・ 酸化ストレスと眼病態

【平成 25 年度】

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, Uesugi 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

【平成23年度】

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

【平成24年度】

1. 特許取得
 1. 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
 2. 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
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

【平成25年度】

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

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