

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 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 俊明

平成26(2014)年 5月

## 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

## 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（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、invitro 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ピン(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

### 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 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

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。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  $\alpha$  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)。

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 薬剤づつデバイスに入れて効果を見るだけではなく、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  $\mu$ 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ンニングを行い、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ピ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。

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。

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。

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( $\gamma$ -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  $\square$  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 Kumasaka, 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 Kumasaka, 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、川島丈明、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、川島丈明、梶弘和、熊坂典浩、大浪英之、西澤松彦、阿部俊明：「多剤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ウムシノ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M P P Eから増殖性硝子体網膜症に至った1例 日本網膜硝子体学会 2012/11/30
- 3) 前川重人、阿部俊明、國方彦志、中澤徹 急性網膜壊死52眼に対する硝子体硝子体手術後成績 日本網膜硝子体学会 2012/11/30
- 4) 新田文彦、國方彦志、阿部俊明、中澤徹 ペガ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ウムシノロン後部テノン嚢下注射前後の眼血流変化の検討 日本臨床眼科学会 2012/10/25
- 7) 相澤奈帆子、國方彦志、目黒泰彦、阿部俊明、中澤徹 25G小切開硝子体手術での後嚢切開併施トーリック眼内レンズ挿入術の有用性 日本臨床眼科学会 2012/10/25
- 8) 國方彦志、相澤奈帆子、布施昇男、阿部

俊明、中澤徹 線維柱帯切除後眼に対する25G硝子体手術 日本臨床眼科学会 2012/10/25

- 9) 12. 雪田昌克、國方彦志、小林航、阿部俊明、中澤徹 強い角膜血染混濁を伴う硝子体出血に広角観察系25G手術が奏功した一例 日本臨床眼科学会 2012/10/25  
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 東北臨床超微形態懇話会
- 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 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  $\mu$ 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 . 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( $\gamma$ -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- $\alpha$  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

- 14 . 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.
- 15 . 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
- 16 . 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  
PGAナノ粒子による内眼炎ステロイド治療
- 10 . 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

- 11 . 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
- 12 . 第54回日本神経化学学会大会  
Neuroprotective treatment for glaucoma.
- 13 . 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
- 14 . 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.* Exp Eye Res ;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

## 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、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 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 Tabacco 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 ProTa 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。ProTa の効果を裏付けるために、1 μg ProTa 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 μg 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<sup>-</sup>、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/ $\mu$ l/eye で用量依存的であり、0.1 pmol/ $\mu$ 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/ $\mu$ l/eye、P9では10 pmol/ $\mu$ 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 の先制治療効果機構解明

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が大いに期待される。

#### F. 研究発表

##### 【平成23年度】

1. 論文発表  
該当なし

2. 学会発表

Third International Symposium on Thymosins in Health and Disease 'Prothymosin alpha: its mechanism for non-vesicular release and receptors in central nervous system' March 14-16, 2012, Washington, D.C.

##### 【平成24年度】

1. 論文発表

- 1) Halder SK, Ueda H, Regional distribution and cell type-specific subcellular localization of Prothymosin alpha in brain. *Cell Mol Neurobiol* 32:59-66, 2012.
- 2) Halder SK, Matsunaga H, Ueda H, Neuro-specific non-classical release of prothymosin alpha: a novel neuroprotective damage-associated molecular patterns. *J Neurochem* 123:262-275. 2012.
- 3) Ueda H, Matsunaga H, Halder SK, Prothymosin  $\alpha$  plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms. *Ann N Y Acad S*

ci 1269:34-43,2012.

2. 学会発表

Third International Symposium on Thymosins in Health and Disease 'Prothymosin alpha: its mechanism for non-vesicular release and receptors in central nervous system' March 14-16, 2012, Washington, D.C.

【平成 25 年度】

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

**知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む。)

【平成 23 - 25 年度】

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H23年度は、これまで我々が独自に効果を確認してきた、新規抗血管新生抑制剤Vasohibin-1および東北大学が特許を有する候補薬剤ライブラリーの中からPAI-1阻害薬を薬剤候補として選択し、DDS化を検討した。デバイスの基材となるポリエチレングリコールジメタクリレート（PEGDM）、トリエチレングリコールジメタクリレート（TEGDM）、コラーゲン微粒子の組成を適宜調節することによって、Vasohibin-1およびPAI-1阻害剤のゼロ次徐放化条件を確立した。また、レーザー誘発脈絡膜新生血管（CNV）モデルラットにデバイスを移植し従来の硝子体注射法と比較した結果、Vasohibin-1デバイスは注射群と同等にCNVを抑制する結果を得た。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（CLT）の徐放デバイス化を検討した。またCLTの薬効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。その結果、CLTの徐放化ではH23に報告したタンパク質等の高分子薬物の徐放制御に用いたPEGDM/コラーゲン粒子システムを改良したPEGDM/TEGDMシステムで徐放制御できることを見出した。また、CLTの薬効では10 $\mu$ Mから50 $\mu$ MにおいてDose-dependentに低酸素・低栄養培養に対して保護効果を示すことがわかった。また、メカニズムについてはReactive oxygen species（ROS）の産生がCLTによって抑制されていることがわかった。H25年度は、CLT-DDSの薬効を動物モデル（ラット網膜光障害）で評価することを目的とした。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。以上より、細胞培養によるスクリーニングによって見出した薬剤をDDS化し動物モデルで薬効を評価した結果、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H23年度は、これまで我々が独自に効果を確認してきた新規抗血管新生抑制剤Vasohibin-1（VASH）および東北大学が特許を有する候補薬剤ライブラリーの中からPAI-1阻害薬を薬剤候補として選択し、DDS化を検討した。

VASHはヒト臍帯静脈内皮細胞においてVEGFにより誘導される血管新生を抑制する性質を持つサイトカインである。難治性疾患の加齢黄斑変性症（AMD）は、網膜下に起こる脈絡膜新生血管（CNV）が主な病態である。CNVの発生には、血管新生促進因子である血管内皮増殖因子（VEGF）が深く関わっていることがわかっている。最近、AMD患者に対する抗VEGF療法が盛んに行われるようになり比較的良好な結果が報告されている。しかしながら、頻回の硝子体注射が必要なことやその合併症、そして重



要なVEGFの生理的作用の抑制や全ての患者に有効というわけではない、といった多くの課題を抱えている。従って、CNVを有するAMDの治療には、VEGF抑制に頼らない他のタイプの治療法が求められている。我々は最近、VASHがマウスおよびサルレーザー誘発CNVを抑制することを報告した【Invest Ophthalmol Vis Sci 52(2011) 3272-3280、Retina, in press, 2012】。今回の研究では、VASHをDDS化し、ラットレーザー誘発CNVモデルで、その効果をVASH硝子体注射と比較評価した。

PAI-1 ( plasminogen activator inhibitor-1 ) は血液の凝固線溶や組織線維化などに作用して心疾患と脳血管疾患等の血栓性疾患の病因に深く関わり、また各種の炎症性疾患の発症にも役割を担うことが知られている。PAI-1阻害薬TM5509は、PAI-1のX線結晶構造解析情報を基に最新のSBDD ( Structure-based drug design ) 技術を駆使して得たヒット化合物TM5007からリード化合物TM5275を経て新規合成された500以上の低分子化合物の中から最適化されたアカデミア発の臨床開発候補化合物である。PAI-1阻害薬は既存の抗血栓薬と同等以上の有効性を示す一方、既存薬とは異なり出血時間を延長しない事がサルを用いた実験で証明されている。また、PAI-1阻害薬TM5509はヒト血漿中での抗血栓作用のみならず、動物モデルで炎症性疾患にも効果があることも確かめられている。PAI-1阻害薬はこれまで開発されておらず、TM5509が臨床で使用できるようになるとPAI-1阻害を作用機序とする世界で初めての新薬となりうる。本研究では、この東北大発となる新規薬剤PAI-1阻害剤をDDS化し、眼疾患治療に応用することを検討した。

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 ( CLT ) の徐放デバイス化を検討した。また、CLTの薬効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は低分子化合物であるため、H23年度に報告したタンパク質等の高分子化合物の徐放制御システム ( PEGDM/コラーゲン微粒子 ) では薬物透過が早く、別の制御システムを検討した。TEGDMが低分子化合物を透過させない性質を利用し、PEGDMとTEGDMの混合システムによって、低分子化合物を徐放制御する方法を検討した。

昨年度のスクリーニングによってCLTを見出したが、薬効は10 $\mu$ Mのみで検討していたため、薬効の詳細な検討を行った。細胞はラット不死化網膜神経節細胞 ( RGC5 ) とラット不死化網膜色素上皮細胞 ( RPE-J ) を使用した。さらにCLTの細胞保護メカニズムの検討として、Reactive oxygen species ( ROS ) の産生を評価した。ROS産生の増加は虚血性疾患に見られる細胞反応の1つである。酸化ストレスとして細胞を障害し、細胞をアポトーシスに誘導することが知られている。このROS産生を薬剤が抑制していれば、細胞保護のメカニズムとして評価できる。今回はROSの評価として、Taliシステムを利用した。TaliはIn vitro製Image-based cytometerである。ROS検出液で処理した細胞懸濁液を専用のスライドにキャストし、分散した細胞の画像を取得し、ROS-positiveの蛍光標識細胞数をHemocytometerの要領で自動的にカウントする。ROS-negativeの細胞数と比較して、ROS産生細胞の割合を測定した。

H25年度は、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、AMDモデルとして利用されている。この光障害モデルでは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

### 【H23年度研究】

#### 1 . Vasohibin-1 ( VASH ) のDDS化

##### 1 - 1 . VASHの調製

VASHは既報の方法でEscherichia coliからthioredoxin fusion proteinとして単離した【Am J Pathol 2010;176:1950-1958.】。Fusion proteinを透析し、血液凝固因子Xa(Novagen)を用いて消化した。VASHを溶出し、20mm glycine-HCl buffer(pH3.5)で透析した。VASHを50mM NaCl、5mM tris(2-carboxywthil) phosphine、0.5mM EDTA、5%glycerol、4.4% N-lauroylsarcosine (pH8.0)を含む50mM Tris-HCl bufferで再溶解し、pH8.0の20mM sodium phosphate bufferで透析した。このbufferはvehicleとしても以下の実験で使用した。蛋白濃度は、蛋白アッセイキット ( Bio-Rad

Laboratories, Alfred Nobel Drive  
Hercules, CA, USA ) を用いた Bradford 法で決めた。

## 1 - 2 . デバイスの作製

### 1 - 2 - 1 . コラーゲン微粒子の作製

1%(w/v)コラーゲン溶液10mlに、0.3%(v/v)界面活性剤を含んだ50mlの流動パラフィン混ぜて乳化させ、室温で5分間、600rpmで攪拌した。攪拌中に、水で溶かした架橋剤50%(v/v)WSCを1ml加え、コラーゲンを1時間架橋した。50%(v/v)エタノールを加えて、オイル層からコラーゲン微粒子を分離するために5分間混ぜ合わせた。混合物は5分間3500rpmで遠心分離し、コラーゲンペレットを残して上清を取り除いた。この作業を二回行った。それからリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え、コラーゲンペレットと混ぜ合わせ遠心分離した(3500rpm、5分間)。この作業を3回行いエタノールを取り除き、平均粒径8 $\mu$ mのコラーゲン微粒子を作成した。

### 1 - 2 - 2 . カプセルデバイスの作製

薬物リザーバーの作成は、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、アクリル樹脂に掘り込んだ。それからその型を、フルオロシアンでコートし実際に使用する鑄型とした。その鑄型に、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone (HMP) 10 $\mu$ lを混合したプレポリマーを流しUV架橋(25mW/cm<sup>2</sup>, 3min [SEN LIGHTS CORP])して作製した。作成したリザーバーのサイズは、ラット移植用が内径、縦1.5mm×横1.5mm×高さ0.6mm、薬剤充填部容量は1.2 $\mu$ lとし、in vitro徐放用が内径、縦7mm×横7mm×高さ2mm、薬剤充填部容量は9 $\mu$ lである。徐放制御膜の作成は、PEGDM 1mlにHMP 10 $\mu$ lを混合したPEGDMプレポリマーに、平均粒径8 $\mu$ mのコラーゲン微粒子を混合(500mg/ml)し、徐放膜用の鑄型へ流しUV架橋(25mW/cm<sup>2</sup>, 3min [SEN LIGHTS CORP])して作製した。薬物リザーバーに薬剤を充填後、PEGDMを接着面に塗布し徐放膜を被せUV架橋することによりカプセルを作製した。

### 1 - 2 - 3 . 充填薬物の調製

PEGDMが20%、薬剤が80%の容積比率となるように混合し90秒UV架橋しペレット化した。ラット移植用は、薬剤1.2 $\mu$ lにPEGDM0.3 $\mu$ lとなり、VASH含有量は、VASH原液 DDS (10VDD) では 683.2ng、

VASH1/10DDS (VDD) では68.3ng、PBS-DDSでは0ngである。In vitro徐放用は、薬剤4 $\mu$ lにPEGDM1 $\mu$ lとなり、VASH含有量は、VASH原液DDSでは2440ng、PBS-DDS (NVDD) では0ngである。

### 1 - 3 . ELISAによるVASH徐放量の定量

48well plate (IWAKI Non-treated MICRO PLATE)の中にアッセイバッファー(0.5%BSA (0.5g/100ml), 0.05% Tween80, 10 $\mu$ g/ml  $\gamma$ globulin および0.1% ProClin150を含む、100mM PBS, pH7.0)200 $\mu$ lを入れ、上記のVASH原液DDSあるいはPBS-DDSを入れた(各n=4)。徐放されたVASHを測定するため経時的にバッファーを回収した。回収したバッファーはVASH ELISA kitで測定した。

### 1 - 4 . 徐放VASHの生物活性(血管内皮細胞のTube formation評価)

24ウェルプレートにヒト繊維芽細胞(NHDF)を播種し、コンフルエントまで培養した後、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)をNHDF上に播種した。共培養後、HUVECがNHDF上に接着したことを確認したら、徐放VASHを含有する培地に交換した。この培地は、上述のデバイスを培地に3時間浸漬したものである。コントロールとして、2nM VEGFを含む培地にVASHを0~10nM添加した培地を使用した。徐放VASHを含む培地中のVASH濃度はELISAの結果から0.56nMであった。培養後、CD31の免疫染色を実施し、HUVECのTube formationを観察した。Tube長さをKURABO 血管定量ソフトウェアで定量した。

### 1 - 5 . 動物

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。200から250gの雄のBrown Norwayラットを使用した。すべての過程においてケタミン塩酸塩(90mg/kg)とキシラジン塩酸塩(10mg/kg)の腹腔内注射で麻酔をした。瞳孔は2.5%phenylephrinと1%tropicamideで拡大した。Oxybuprocaine hydrochloride(0.4%)を局所麻酔として使用した。

### 1 - 6 . 実験的CNVの作製

ブルッフ膜を貫通させるために、ラット角膜にカバーガラスを当て細隙灯(Ultima 2000SE;Luminus, Yokneam, Israel)に接続されたアルゴングリーンレーザーを使用した。光凝固の設定は、直径50 $\mu$ m、間隔0.1sec、強度200mWとした。6発の光凝固を視神経乳頭が

ら1から2乳頭径の部位に施行した。各光凝固に際して、ブルッフ膜を貫通したことを示す網膜下の気泡が出現したことを確認した。

#### 1 - 7 . 硝子体注射とデバイスの移植

光凝固後4日目に50ng/50 $\mu$ lのVASHを硝子体注射した。50 $\mu$ lのPBSをvehicleとして使用した。麻酔後実体顕微鏡で観察しながら、角膜輪部より約1mm後方で5 $\mu$ lのシリンジのついた32ゲージ針(Hamilton, Reno, NV)を用いて強膜を刺入し硝子体へ注射した。

光凝固直後にVASH原液DDSあるいはVASH1/10DDSあるいはVASH-pelletあるいはPBS-DDSを強膜上に移植した。麻酔後実体顕微鏡で観察しながら、上方結膜を切開しテノン嚢を鈍的に剥離し強膜を露出させた。デバイスを挿入し強膜上に接着するように固定した。結膜を縫合し、タリビッド眼軟膏を点入し終了とした。

#### 1 - 8 . 免疫組織化学的検査

VASHの免疫組織化学的検査は光凝固後2週目に行った。ラットを頸椎脱臼後眼球を摘出し、余分な結膜や筋などの組織を除去した。デバイスを取り外し、同部強膜に目印として10-0ナイロンを縫合した。角膜輪部に切開を切開を入れ、4%PFAに一晩浸し固定した。翌日に角膜、水晶体を除去しスクロース置換(10%から30%)した。翌々日に組織をOCT液に包埋し液体窒素で冷却し凍結ブロックを作成した。凍結ブロックをクライオスタットで約10 $\mu$ mに薄切し凍結切片を作成した。

上記切片をImage-iT FX signal enhancer (Alexa Fluo 488 Goat Anti-Mouse SFX kit)で30分室温でブロッキング後、抗VASHマウス抗体(1:200)で4一晩静置した。翌日Alexa Fluo 488 Goat Anti-Mouse IgG (1:100, Alexa Fluo 488 Goat Anti-Mouse SFX kit)で室温30分静置した。各過程間はPBSで3回洗浄した。VECTASHIELD mounting medium for fluorescence with DAPI (VECTOR)で封入し、蛍光顕微鏡(model FW4000, ver.1.2.1; Leica Microsystems Japan, Tokyo, Japan)で観察した。

#### 1 - 9 . 蛍光眼底造影検査(FA)

CNVの活動性を調べるためFAを光凝固後1、2週目に行った。段階表を用いて盲目的に評価した。Grade1は過蛍光なし、Grade2は過蛍光はあるが漏出はなし、Grade3は早期、中期での過蛍光と後期の漏出、Grade4は経過中の著明な過蛍光と後期の治療域を越えた漏

出とした。

#### 1 - 10 . Choroidal Flat-Mount

CNV部位のサイズはchoroidal flat mount法を用いて評価した。光凝固後14日目に、麻酔後50mg/mlのfluorescein-labeled dextran (FITC-deztran; MW2 $\times$ 10<sup>6</sup>, Sigma Aldrich)を含む2ml PBSを心臓に注入し灌流させた。眼球を摘出し、4%PFAに30分浸し固定した。角膜、水晶体、網膜を眼球から除去し、辺縁から赤道部にかけて4から6か所放射状に切開を入れた。RPE-choroid-sclera complexをフラットに封入した(Permalfluor, Beckman Coulter, Fullerton, CA)。標本は蛍光顕微鏡(model FW4000)で観察した。CNV部位は、蛍光を欠く部位に囲まれた蛍光を示す血管の部位として同定した。CNV部位はimage Jを用いて面積を算出し評価した。

#### 1 - 11 . 統計学的解析

FAでのCNVからの漏出の相違とflat mountでのCNVの容積の相違はステューデントのtテストを用いて比較した。95%の信頼度( $p < 0.05$ )のときに統計学的に有意差があると判断した。

(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。

#### 2 . PAI-1阻害剤のDDS化

##### 2 - 1 . デバイスの作製

PAI-1阻害剤をVASHと同様の方法でデバイス化した。

##### 2 - 2 . In vitro徐放性

デバイスをPBSに浸漬し、定期的にPBSを回収・交換した。回収したPBSを高速液体クロマトグラフィーにかけ、PBS中に徐放されたPAI-1阻害剤を定量した。

#### 【H24年度研究】

##### 1 . CLTの徐放デバイス化

##### 1 - 1 . デバイスの作製

薬物リザーバーの鋳型は、1-2-2と同様の方法で設計した。鋳型にTEGDM 1mlにHMP 10 $\mu$ lを混合したプレポリマーを流しUV架橋して作製した。作成したリザーバーのサイズは内径、縦7mm $\times$ 横7mm $\times$ 高さ2mm、薬剤充填部容量は9 $\mu$ lである。徐放制御システムとして、PEGDM 1mlにHMP 10 $\mu$ lを混合したPEGDMプレポリマーに、TEGDMを混合(0~100%(v/v))したものを使用した。リザーバー

にCLTをPEGDM/TEGDMでペレット化したものを充填後、薬剤上にPEGDM/TEGDMをキャストし、UV架橋によって薬剤をカバーしてカプセルを作製した。

#### 1 - 2 . HPLCによる徐放量の測定

デバイスをPBSに浸漬し、37 でインキュベートした。定期的にPBSを回収し、新しいPBSに置換した。回収のタイミングはCLTがPBSに飽和しないように行った。HPLCは島津のProminenceシステムを用いた。あらかじめ検量線を作成し、PBSに放出されたCLT量を定量した。

#### 2 . CLTの薬効

##### 2 - 1 . 細胞培養

96ウェルプレートにRGC5およびRPE-Jを播種し、2日間培養した後、CLT含有培地(DMEM)に交換した。CLTはあらかじめ0.03% DMSOに溶解して培地に添加した。1日培養後、CLT含有の低酸素(2% O<sub>2</sub>)・低栄養(グルコース0~2.8mM)培地に交換し、低酸素インキュベーター(2% O<sub>2</sub>)で培養した。1日後、MTS法によって細胞数を評価した。

##### 2 - 2 . ROS assay

6センチ培養皿にRGC5を播種し、2日間培養した後、2 - 1と同様の低酸素負荷培養を行った。細胞をトリプシン処理で回収し、CellROX orange (In vitrogen)を添加し30分インキュベーションした。Taliシステム専用スライドプレートに10μLの細胞懸濁液をアプラインし、TaliシステムでROS-positive細胞の検出を行った。コントロールとして、低酸素負荷を行っていないRGC5を準備し、TaliシステムでROS-positive細胞のスレショールドラインを引いた。これより高い蛍光値を示した細胞をROS-positiveと決めた。

#### 【H25年度研究】

##### 1 . CLT徐放デバイスの作製

###### 1 - 1 . デバイスの作製

鋳型にTEGDM 5mLにHMP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PEGDM、Aldrich 5mLにHMP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)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)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

##### 2 - 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 - 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 で8000Luxの照度で24時間飼育した。

##### 2 - 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/m<sup>2</sup>)の光刺激でERGを測定した(Mayo)。N=4。

##### 2 - 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

#### 【H23年度研究】

##### 1 . VASH-DDS

###### 1 - 1 . In vitro徐放性

カプセル化していないVASH-pellet(Pellet)は試験開始直後から大量放出(初期バースト)が見られ、約1日で充填したVASHのほとんどが放出されていた。一方で、VASH原液DDS

(10VDD)からは、VASHが持続的に徐放され、初期バーストが抑制されていた。VASH1/10DDS (VDD)でも同様に初期バーストが抑制されていたが、VASH充填量が少ない分、放出量は少なかった。Negative controlのPBS-DDS (NVDD)からは、いずれの時期も値は観察されなかった。

過去に報告したモデルドラッグ FITC-dextran 40kDa (FD40)を薬剤として検討した結果では14日後に全体の約1/200徐放されていたが、今回の結果では14日後に充填したVASHの約1/72.5が徐放されており、ほぼ同様の徐放プロファイルを示している事が分かった。

#### 1 - 2 . 徐放VASHの生物活性

HUVECはVEGF濃度に比例して、Tube formationが細長くなることを確認した。徐放VASH培地では、コントロールの徐放PBS培地および2nM VEGFのみの培地と比較して、Tube formationの長さが短い、すなわち管腔形成が抑制されていることを確認した。Tube lengthの平均値も有意に抑制されていた。以上より、徐放VASHは生物活性を維持していることが示唆された。

#### 1 - 3 . 免疫組織化学的検査

10VDDでは、デバイス移植部位から視神経にかけてVASH陽性を示す蛍光が確認できた。拡大像からは蛍光が、強膜、脈絡膜、RPE、網膜内層に認め、VASHが眼内に移行していることが確認された。コントロールのNVDDでは蛍光は検出されなかった。

光凝固後1週目のFAでは、VASH(50ng/5 $\mu$ l)硝子体注射群 (Vasohibin-1 iv) は、PBS硝子体注射群 (Vehicle iv) に比べて有意にCNVからの漏出が減少した ( $p=0.049$ )。10VDD群とVDD群では、NVDD群に比べてCNVからの漏出が少ない傾向はみられたが有意差はみられなかった。VASH-pellet (Pellet) 群ではNVDD群とCNVからの漏出は同程度であった。

光凝固後2週目のFAでは、1週目の結果と同様の傾向であったが、VASH(50ng/5 $\mu$ l)硝子体注射群 (Vasohibin-1 iv) がPBS硝子体注射群 (Vehicle iv) に比べて有意にCNVからの漏出が減少した ( $p=0.001$ )のに加え、10VDD群でもNVDD群に比べてCNVからの漏出が有意に減少した ( $p=0.027$ )。

#### 1 - 3 . Choroidal Flat-Mount

光凝固後2週目にChoroidal flat-mount法にてCNV面積を計測した。VASH(50ng/5 $\mu$ l)硝

子体注射群 (Vasohibin-1 iv) は、PBS硝子体注射群 (Vehicle iv) に比べて有意にCNVサイズが減少した ( $p<0.001$ )。Pellet群ではNVDD群に比べてCNVサイズに変化はみられなかったが、10VDD群とVDD群では濃度依存的にCNVサイズが縮小した。10VDD群ではNVDD群に比べて有意差を認めた ( $p<0.001$ )。Vasohibin-1 iv群のCNVサイズと10VDD群のCNVサイズを比較すると、Vasohibin-1 iv群で有意にCNVサイズが小さかった ( $p=0.009$ )。

#### 2 . PAI-1阻害剤-DDS

デバイスからPBSに放出されたPAI-1阻害剤の量を、高速液体クロマトグラフィー (島津) で測定した。その結果、初期バーストのない一定徐放を確認できた。

#### 【H24年度研究】

#### 1 . CLTのIn vitro徐放性

CLTをPEGDM/TEGDM = 60%/40% (P60と略す) でペレット化し、リザーバーに充填し、PEGDM/TEGDM=40%/60% (P40と略す) とP60の2種類でカバーをした。コントロールとして、カバーなしを作成した。カバーなしのサンプル (Pellet) は最初の数日でCLTが大量に放出され (初期バースト)、その後一定の放出を認めた。一方、カバーをしたサンプルは初期バーストが抑制され、常に一定の放出量を保っていた。また、1日当たりの放出量は、P60>P40となり、カバー中のPEGDM比の減少と対応して、放出量が減少していた。

#### 2 . CLTの薬効

#### 2 - 1 . 増殖アッセイ (MTS法)

RGC5への低酸素・低栄養培養として、2種類のグルコース濃度の培地 (4.5mM : Oxygen deprivation (OD)、2.8mM : Oxygen-glucose deprivation (ODD)) を使用した。RGC-5の増殖アッセイの結果、ODとODD条件でともにCLT添加による細胞保護効果を認めた。OD条件では、CLTが10 $\mu$ Mから50 $\mu$ MでDose-dependentに保護効果を示した。また、ODD条件では、5 $\mu$ Mから50 $\mu$ MでDose-dependentに保護効果を示した。

RPE-Jへの低酸素・低栄養培養として、2種類のグルコース濃度の培地 (4.5mM : Oxygen deprivation (OD)、0mM : Oxygen-glucose deprivation (OGD)) を使用した。RPE-Jの増殖アッセイの結果、RGC-5と同様にCLT添加による細胞保護効果を認めた。OD条件では、CLTが5 $\mu$ Mから50 $\mu$ MでDose-dependentに保護効果を示した。また、OGD条件では、5 $\mu$ Mか

ら50 $\mu$ MでDose-dependentに保護効果を示した。

## 2 - 2 . ROS assay

RGC5の低酸素・低栄養培養（ODDおよびOD）におけるROSアッセイを行った。その結果、ODD条件ではCLTの添加によってDose-dependentにROS-positive細胞の割合が減少した。また、OD条件においても同様に、CLTの添加によってDose-dependentにROS-positive細胞の割合が減少した。

### 【H25年度研究】

#### 1 . ERG

ERG振幅値はCLT-P40のa波、b波およびCLT-P60のa波、b波のいずれにおいても、Placebo対比高い傾向を示した。

#### 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。

## D . 考察

### 【H23年度研究】

#### 1 . VASH-DDS

AMD治療で行われる抗VEGF抗体の硝子体注射は、眼内への副作用が問題であり、安全な眼内への投与方法が望まれる。本研究では、眼内を操作することなく、強膜から網膜へVASHを持続投与できるデバイスの可能性を示した。この経強膜デバイスを用いれば、従来の眼内注射をすることなく、安全にタンパク製剤を投与できる可能性を示している。

タンパク質のような分子量の大きい物質の徐放化はこれまで報告例が少ない。我々のデバイスは、生物活性を維持したまま約1か月にわたってVASHを一定徐放することができる。臨床では、分子量の大きいタンパク製剤が最近利用されており、これらの薬剤の徐放化に寄与できる可能性がある。また、本研究はレーザー誘発CNV動物モデルを用いて、経強膜的にCNVを抑制できる可能性を示した。また、CNV抑制効果は比較対象の硝子体注射とほぼ同等であり、眼内注射に代わる安全な投与方法である可能性が示された。

### 【H24年度研究】

CLTはイミダゾール系の抗真菌薬であり、皮膚真菌症の治療に使われている。今回、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、10 $\mu$ Mから

50 $\mu$ Mの範囲でDose-dependentに細胞保護作用を示すことがわかった。さらにCLTは低酸素・低栄養負荷培養で産生するROSを抑制する可能性を示した。また、デバイス化によってCLTの徐放が可能であることを示した。これらの結果は、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、投与量を調整して副作用を抑制できる可能性があり、眼疾患への適用可能性を示している。

### 【H25年度研究】

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された。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

眼内注射に代わる眼内への安全な薬物投与方法として我々のデバイスが有効である可能性を、レーザー照射CNVモデルラットに対するVASH徐放デバイスの移植検討、および網膜光障害モデルラットに対するCLT徐放デバイスの移植検討によって示した。

## F. 研究発表

### 【平成23年度】

#### 1. 論文発表

1) 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).

2) 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)

#### 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)
- 2) **Nobuhiro Nagai**, Takeaki Kawashima, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, 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 (May 1-5, 2011)
- 3) Toshiaki Abe, Hideyuki Onami, **Nobuhiro Nagai**, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, 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 (May 1-5, 2011)

(国内発表)

- 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**：「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**：「網膜光障害モデルに対する経強膜DDSの網膜保護効果」2010年度東北大学視覚先端医療学講座報告会、勝山館(2011年7月15日)
- 5) **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)

- 6) **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：「多剤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)
- 7) 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)

【平成24年度】

1. 論文発表

- 1) Hideyuki Onami, † Nobuhiro Nagai, † Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Yasufumi Sato, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe. “Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppressed experimentally induced choroidal neovascularization” PLoS ONE, 8(3), e58580, (2013).
- 2) 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 The Journal of Retinal and Vitreous Diseases, 32(6), 1204-1213 (2012).
- 3) Yumi Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. “Vasohibin-1 and retinal pigment epithelium” Adv Exp Med Biol, 723, 305-310 (2012).

2. 学会発表

(国際学会発表)

- 1) Toshiaki Abe, Yumi Ishikawa, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, **Nobuhiro Nagai** “Intra-scleral transplantation of collagen sheet with cultured brain-derived neurotrophic factor expressing cells partially

rescued the retina from the damage of acute high intraocular pressure” *RD2012 XV International Symposium on Retinal Degeneration, Bad Gogging, Bavaria, Germany* (July 16-21, 2012)

- 2) **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* (May 6-10, 2012)
- 3) Hideyuki Onami, **Nobuhiro Nagai**, Ryosuke Wakusawa, Hirokazu Kaji, Takuya Yamada, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Yasufumi Sato, Toru Nakazawa, and Toshiaki Abe “Suppression of Rat Choroidal Neovascularization by Transscleral Vasohibin-1 Delivery Device” *2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida* (May 6-10, 2012)  
(国内学会発表)
- 1) **永井展裕**：「薬剤徐放デバイスの作製と経強膜投与による網膜保護」第5回RRM (Retina Research Meeting), 東京医療センター (2012年12月8日)
- 2) **永井展裕**、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、西澤松彦、阿部俊明：「経強膜マルチドラッグ徐放デバイスの作製と網膜保護効果の検討」日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、仙台国際センター (2012年11月26-27日)
- 3) **永井展裕**、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、西澤松彦、阿部俊明：「薬物徐放デバイスの作製と網膜光障害モデルに対する網膜保護効果の検討」第32回日本眼薬理学会学術集会、ピアザ淡海 (2012年9月15日~16日)
- 4) **永井展裕**、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、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28回日本DDS学会学術集会、札幌コンベンションセンター (2012年7月4日~5日)

- 5) 大浪英之、**永井展裕**、梶弘和、西澤松彦、涌沢亮介、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明：「分子徐放デバイス作製と網膜保護」第63回東北臨床超微形態懇話会、東北大学医学部 (2012年6月28日)
- 6) **永井展裕**：「経強膜ドラッグデリバリーによる網膜保護の試み」2011年度視覚先端医療学講座報告会 (2012年4月9日)
- 7) **永井展裕**、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、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ドラッグデリバリーデバイスの網膜保護効果」第16回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム (2012年4月5日~8日)
- 8) 大浪英之、**永井展裕**、梶弘和、西澤松彦、涌沢亮介、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16回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム (2012年4月5日~8日)

#### 【平成25年度】

1. 論文発表
- 1) **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, 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) **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Shuntaro Ito, Matsuhiko Nishizawa, Toru Nakazawa, Noriko Osumi, Yukihiro 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. **Nobuhiro Nagai**, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Takuya Yamada, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Matsuhiko Nishizawa, Yukihiro Mashima, Toshiaki Abe “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)

- 1) Zhaleh Kashkouli Nezhad 、 **Nagai Nobuhiro**、 Yamamoto Kotaro 、 Saya Hideyuki 、 Kaji Hirokazu 、 Nishizawa Matsuhiko 、 Nakazawa Toru 、 Abe Toshiaki : 「 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 Kashkouli Nezhad 、 **Nagai Nobuhiro**、 Yamamoto Kotaro 、 Saya Hideyuki 、 Kaji Hirokazu 、 Nishizawa Matsuhiko 、 Nakazawa Toru 、 Abe Toshiaki : 「 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)

F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

【平成23-25年度】

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

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H23年度は、将来的に人に応用するための検討として、DDSの形状を微細加工によって最適化し、サル眼に移植可能なデバイスを作製することを検討した。デバイスは眼球強膜上に移植するため、眼球面に密着する形状、強膜上に固定するための縫合用穴・溝、後眼まで挿入するためのデバイスの長さ、の検討を行った。その結果、直径2cmのボールにフィットするように湾曲させ、かつデバイス長さは約15mm、縫合用にデバイス側面に4つの溝を設けた形状が現状では最適という結果を得た。

H24年度は、網膜変性モデル動物としてウサギを使用するため、ウサギ眼用デバイスの作成を検討した。また、強膜上に固定するデザインを検討した。その結果、ウサギ眼に移植可能なデバイスを作成し、薬剤徐放部分が黄斑部まで届いていることを確認した。また、デバイスに溝をつけることで、縫合糸によって強膜上に固定できることがわかった。

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、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。H23年度は、将来的に人に応用するための検討として、DDSの形状を微細加工によって最適化し、サル眼に移植可能なデバイスを作製することを検討した。デバイスは眼球強膜上に移植するため、眼球面に密着する形状、強膜上に固定するための縫合用穴・溝、後眼部まで挿入するためのデバイスの長さ、の検討を行った。H24年度は、網膜変性モデル動物としてウサギを使用するため、ウサギ眼用デバイスの作成を検討した。また、強膜上へのデバイス固定方法を検討した。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、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。

今回は眼科医（共同研究者）の意見を機器ながらデバイスを試作し、サル眼への移植でデバイス形状を微修正しながら、ヒト眼に移植できるようなデバイスデザインを検討した。

#### B．研究方法

##### 【H23年度研究】

##### 1．デバイス作製用PDMS鋳型の作製

アクリル板にデバイスのリザーバー形状を切削した。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-PERFLUOROCTYLTRICHLOROSILANE、WAKO)を2ヶ所に2μl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鋳型が最終形である。

#### 2. デバイス(リザーバー)の作製

PDMS鋳型に、TEGDM 1mlに2-Hydroxy-2-methyl-propiophenone(HMP) 10μlを混合したプレポリマーを流し、UV架橋(25mW/cm<sup>2</sup>、3min [SEN LIGHTS CORP])した。

#### 3. 移植用デバイスの作製

TEGDMリザーバーにモデルドラッグフルオレセイン(50mg/ml)を充填し、PEGDM/TEGDMプレポリマーで蓋をした。

#### 4. サル眼への移植

ニホンサルの強膜上にデバイスを移植し縫合した。定期的に眼底検査を行い、眼内への副作用を検討した。

(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。

#### 【H24年度研究】

##### 1. デバイス作製用PDMS鋳型の作製

ウサギ用デバイスの形状をCADで設計した。アクリル板にウサギ用デバイスのリザーバー形状を切削した。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を2ヶ所に2μl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鋳型が最終形である。

##### 2. デバイス(リザーバー)の作製

PDMS鋳型にTEGDM 1mlにHMP 10μlを混合したプレポリマーを流し、UV架橋(25mW/cm<sup>2</sup>、3min)した。

##### 3. ウサギ眼への移植

白色ウサギの強膜上にデバイスを移植し縫合した。定期的に眼底検査を行い、眼内への副作用を検討した。

#### 【H25年度研究】

##### 1. デバイス作製用PDMS鋳型の作製

ヒト用デバイスの形状をCADで設計した。

以下、昨年度と同様の方法で鋳型を作成した。

##### 2. デバイス(リザーバー)の作製

PDMS鋳型にTEGDM 5mLにHMP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

#### 【H23年度研究】

##### 1. デバイス鋳型の作製

CADを利用して、サル眼用のデバイス(リザーバー)鋳型を作製した。直径2センチの球にフィットするようにデザインした。リザーバーは20μLの薬剤ペレットが詰めることができるようにデザインした。また、強膜上に挿入する際に周囲の組織に傷をつけないように、デバイス先端は角のないサークル形状にデザインした。プレポリマーをPDMS鋳型に流したあと、PDMS鋳型で蓋をしてUV照射することでリザーバーを作製することができる。

##### 2. デバイス形状の最適化

デバイス内のリザーバー(薬物搭載部分)が後眼部へ届く形状を目指した。デバイスの長さを変更したプロトタイプの写真を示す。デバイス後端の穴は縫合用の穴である。また、様座な眼球の局面に対応できるように、デバイスの湾曲角度の変更を検討した。

##### 3. サル眼への移植検討

サル眼へ移植した結果、後眼部に届く長さは約15mm、角度は直径2cmの球にフィットする角度が現状で最適と判断した。

縫合用の形状として、当初は穴を1つ設け

たが、1点で縫合した場合、デバイス先端が動いたり、浮いて強膜に密着しない、という課題があった。そこで、穴ではなく、デバイスの側面に4つの溝を掘り、4点で縫合する形状を採用した。これによって強膜に密着させることができた。密着によって、薬剤が周囲へ漏れることや、Fibrosisが徐放面に侵入することを防ぐ効果があると考えられる。サル眼結膜周囲には、移植直後は軽い炎症を伴うが、約1か月の移植では、眼底にも問題はなく、副作用はないと考えている。

#### 【H24年度研究】

##### 1. デバイス鋳型の作製

デバイスを強膜上に固定するために、縫合糸を引っ掛けるための溝を設計した。昨年度からのデバイス形状の変更点として、眼球周囲組織により影響の少ない流線型デザインを設計した。これは、デバイス後端部が徐々に厚みが薄くなる形状を有している。また、縫合糸を引っ掛ける構造として、横に4つの溝を設けるデザインと、デバイス後端上方に2本の溝を設けるデザインを設計した。

##### 2. ウサギ眼への移植検討

ウサギ眼へ移植した結果、リザーバーの薬剤徐放部分は後眼部に届いていることがわかった。また、ウサギ眼の局面にしっかりフィットしていることを確認した。また、強膜への固定用にデザインした2本の溝に縫合糸がしっかり引っかかり、デバイスが強膜上に固定されていた。

#### 【H25年度研究】

##### 1. デバイス鋳型の作製

角膜を入れた日本人眼軸長は平均23.8mmと計算された。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系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。

##### 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。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。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。

#### D. 考察

##### 【H23年度研究】

加齢黄斑変性症では、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。最終プロトタイプでは、強膜への密着が強化され、徐放面が後眼部付近まで届くように設計されており、加齢黄斑変性症の治療に対して有効に働く可能性がある。

##### 【H24年度研究】

改良したデバイス形状は縫合糸による強膜上への固定が可能となり、ウサギ強膜への密着が強化された。

##### 【H25年度研究】

改良したデバイス形状は縫合糸による強膜上への固定が可能となり、ヒト強膜への密着

が強化されると推定される。

#### E. 結論

ウサギ眼、サル眼、ヒト眼の後眼部に薬剤をデリバリーできる形状のデバイスを開発した。実際の薬物で前臨床試験を評価する準備ができたと考えている。

#### F. 研究発表

##### 【平成23年度】

##### 1. 論文発表

1. Biofuel cell anode: NAD<sup>+</sup>/glucose dehydrogenase-coimmobilized ketjenblack electrode T. Miyake, M. Oike, S. Yoshino, Y. Yatagawa, K. Haneda, H. Kaji, M. Nishizawa, Chem. Phys. Lett., 480 (2009) 123-126..
2. Micropatterning Contractile C2C12 Myotubes Embedded in a Fibrin Gel K. Nagamine, T. Kawashima, T. Ishibashi, H. Kaji, M. Kanzaki, M. Nishizawa Biotechnol. Bioeng., 105 (2010) 1161-1167
3. Transfer of Two-Dimensional Patterns of Human Umbilical Vein Endothelial Cells into Fibrin Gels to Facilitate Vessel Formation T Kawashima, T Yokoi, H Kaji, M Nishizawa Chem. Commun., 46 (2010) 2070-2072
4. Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF N. Nagai, N. Kumasaka, T. Kawashima, H. Kaji, M. Nishizawa, T. Abe J Mater Sci: Mater Med., 21 (2010) 1891-1898
5. Electrodes Combined with an Agarose Stamp for Addressable Micropatterning S Sekine, S Nakanishi, T Miyake, K Nagamine, H Kaji, M Nishizawa Langmuir, 26 (2010) 11526-11529
6. Directing the flow of medium in controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells with a microfluidic device H. Kaji, T. Yokoi, T. Kawashima, M. Nishizawa Lab Chip, 10 (2010) 2374-2379.
7. Electrically Induced Contraction of C2C12 Myotubes Cultured on a Porous Membrane-Based Substrate with Muscle Tissue-Like Stiffness H. Kaji, T. Ishibashi,

K. Nagamine, M. Kanzaki, M. Nishizawa Biomaterials, 31 (2010) 6981-6986

8. Monitoring Impedance Changes Associated with Motility and Mitosis of a Single Cell L. Ghenim, H. Kaji, Y. Hoshino, T. Ishibashi, V. Haguët, X. Gidrol, M. Nishizawa, Lab Chip, 10 (2010) 2546-2550
9. Automatic, Sequential Power Generation for Prolonging the Net Lifetime of a Miniature Biofuel Cell Stack T. Miyake, M. Oike, S. Yoshino, Y. Yatagawa, K. Haneda, M. Nishizawa Lab Chip, 10 (2010) 2574-2578
10. Conducting Polymer Electrodes Printed on Hydrogel S. Sekine, Y. Ido, T. Miyake, K. Nagamine, M. Nishizawa J. Am. Chem. Soc., 132 (2010) 13174-13175
11. Spatiotemporally Controlled Contraction of Micropatterned Skeletal Muscle Cells on a Hydrogel Sheet K. Nagamine, T. Kawashima, S. Sekine, Y. Ido, M. Kanzaki, M. Nishizawa Lab Chip, 11 (2011) 513-517
12. A Scalable Controlled-release Device for Transscleral Drug Delivery to the Retina T. Kawashima, N. Nagai, H. Kaji, N. Kumasaka, H. Onami, N. Osumi, M. Nishizawa, T. Abe, Biomaterials, 32 (2011) 1950-1956
13. Self-Regulating Enzyme-Nanotube Ensemble Films and Their Application as Flexible Electrodes for Biofuel Cells T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, M. Nishizawa J. Am. Chem. Soc., 133 (2011) 5129-5134

##### 2. 学会発表

(国際学会発表)

該当なし

(国内学会発表)

該当なし

##### 【平成24年度】

##### 1. 論文発表

- 1) Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Yasufumi Sato, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe (†equal contribution). “Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppressed experimentally induced choroidal neovascularization” **PLoS**

- ONE, 8(3)**, e58580, (2013).
- 2) Takeo Miyake, Keigo Haneda, Syuhei Yoshino and Matsuhiko Nishizawa, Flexible, Layered Biofuel Cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 40 (2013) 45-49.
  - 3) Syuhei Yoshino, Takeo Miyake, Takeo Yamada, Kenji Hata and Matsuhiko Nishizawa. Molecularly Ordered Bioelectrocatalytic Composite inside a Film of Aligned Carbon Nanotubes *Advanced Energy Materials*, 3 (2013) 60-64.
  - 4) Nagamine K, Kawashima T, Sekine S, Ido Y, Kanzaki M, **Nishizawa M**. Spatiotemporally Controlled Contraction of Micropatterned Skeletal Muscle Cells on a Hydrogel Sheet. *Lab Chip*;11:513-517, 2012.
  - 5) Ido Y, Takahashi D, Sasaki M, Nagamine K, Miyake T, Jasinski P, **Nishizawa M**. Conducting Polymer Microelectrodes Anchored to Hydrogel Films. *ACS Macro Let*;1:400-403, 2012.
  - 6) Haneda K, Yoshino S, Ofuji T, Miyake T, **Nishizawa M**. Sheet-Shaped Biofuel Cell Constructed from Enzyme-Modified Nanoengineered Carbon Fabric. *Electrochim. Acta*;82:175-178, 2012.
  - 7) Nagamine K, Ito K, Takeda M, Otani S, **Nishizawa M**. An Oxygen Responsive Microparticles Patterned Hydrogel Sheet for Enzyme Activity Imaging. *Electrochemistry*;80:318-320, 2012.

## 2. 学会発表

### (国際学会発表)

1. M. Nishizawa, K. Nagamine, T. Miyake and H. Kaji “Microfabricated Miniature Biofuel Cells with Nanoengineered Enzyme Electrodes” IUMRS-International Conference on Electronic Materials, Yokohama (Sept.24.2012)
2. 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* (May 6-10, 2012)
3. Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Ryosuke Wakusawa, Hirokazu Kaji, Takuya Yamada, Yumi Ishikawa, **Matsuhiko Nishizawa**, Yasufumi Sato, Toru Nakazawa, and Toshiaki Abe “Suppression of Rat Choroidal Neovascularization by Transscleral Vasohibin-1 Delivery Device” *2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida* (May 6-10, 2012)
4. M. Nishizawa, S. Yoshino and T. Miyake, “Enzyme-CNT Ensemble Films for Miniature Biological Fuel Cells” *Biosensors 2012, Mexico* (May 18.2012)
5. M. Nishizawa, Y. Ido, D. Takahashi, T. Miyake and K. Nagamine, “Conducting Polymer Microelectrodes Printed on Soft, Moist Hydrogels for Effective Stimulation of Muscular and Neuronal Cells” *2012 MRS Spring Meeting, San Francisco* (April 11, 2012)
6. M. Nishizawa, S. Yoshino, T. Miyake, T. Yamada and K. Hata, “Enzyme-Carbon Nanotube Ensemble Films for Biofuel Cells”, *2012 MRS Spring Meeting, San Francisco* (April 10, 2012)

### (国内学会発表)

1. **西澤松彦**:「シート状バイオ発電システム」日本化学会 93 春季年会 (京都) 平成 25 年 3 月 22 日
2. **西澤松彦**:「ハイドロゲルへの電極形成と応用」第 27 回エレクトロニクス実装学会 (仙台) 平成 25 年 3 月 15 日
3. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、**西澤松彦**、阿部俊明:「経強膜マルチドラッグ徐放デバイスの作製と網膜保護効果の検討」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台国際センター (2012 年 11 月 26-27 日)
4. **西澤松彦**、長峯 邦明、梶 弘和、神崎展:「マイクロ電極システムによる培養細胞運動アッセイ」第 29 回医用高分子研究会 (つくば) 平成 24 年 11 月 20 日
5. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、**西澤松彦**、阿部俊明:「薬物徐放デバイスの作製と網膜光障害モデルに対する網膜保護効果の検討」

第 32 回日本眼薬理学会学術集会、ピアザ淡海（2012 年 9 月 15 日～16 日）

6. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、**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 28 回日本 DDS 学会学術集会、札幌コンベンションセンター（2012 年 7 月 4 日～5 日）
7. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、**西澤松彦**、涌沢亮介、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明：「分子徐放デバイス作製と網膜保護」第 63 回東北臨床超微形態懇話会、東北大学医学部（2012 年 6 月 28 日）
8. 永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、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ドラッグデリバリーデバイスの網膜保護効果」第 16 回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2012 年 4 月 5 日～8 日）
9. 大浪英之、永井展裕、梶弘和、**西澤松彦**、涌沢亮介、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 16 回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（2012 年 4 月 5 日～8 日）

【平成 25 年度】

1. 論文発表
- 1) Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, **Matsuhiko Nishizawa**, 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) Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Kaori Sampei, Satoru Iwata, Shuntaro Ito, **Matsuhiko Nishizawa**, 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. Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Hideyuki Onami, Takuya Yamada, Yuki Katsukura, Yumi Ishikawa, **Matsuhiko Nishizawa**, Yukihiko Mashima, Toshiaki Abe “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)

- 1) Zhaleh Kashkouli Nezhad, Nagai Nobuhiro, Yamamoto Kotaro, Saya Hideyuki, Kaji Hirokazu, **Nishizawa Matsuhiko**, Nakazawa Toru, Abe Toshiaki : 「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 Kashkouli Nezhad, Nagai Nobuhiro, Yamamoto Kotaro, Saya Hideyuki, Kaji Hirokazu, **Nishizawa Matsuhiko**, Nakazawa Toru, Abe Toshiaki : 「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）

G . 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

【平成 23-25 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23年度】研究成果の刊行に関する一覧表（阿部俊明）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kunikata H, Nitta F, Meguro Y, Aizawa N, Hariya T, Chiba N, <u>Abe T</u> , Nishida K	Difficulty in Inserting 25- and 23-gauge Trocar-cannula during Vitrectomy	Ophthalmologic	226(4)	198-204	2011
Kunikata H, <u>Abe T</u> , Nishida K	Successful outcomes of 25- and 23-gauge vitrectomies for giant retinal tear detachments	Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging	4	12-14	2010
Miyake T, Haneda K, Nagai N, Yatagawa Y, Ohnami H, Yoshino S, <u>Abe T</u> and Nishizawa M	Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms.	Energy & Environmental Science	4	5008-5012	2011



【平成23年度】研究成果の刊行に関する一覧表（中澤徹）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ryu M, <b>Nakazawa T*</b> , 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( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone	J Control Release	Apr 10;151(1)	65-73	2011
<b>Nakazawa T*</b> , Kayama M, Ryu M, Kunikata H, Watanabe R, Yasuda M, Kinugawa J, Vavvas D, Miller JW.	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Mediates Photoreceptor Death in a Rodent Model of Retinal Detachment	Invest Ophthalmol Vis Sci	Mar 14;52(3)	1384-91	2011
Fuse N, Mengkegale M, Miyazawa A, Abe T, <b>Nakazawa T</b> , 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
Takayama S, Seki T, <b>Nakazawa T</b> , 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	2011
Watanabe R, <b>Nakazawa T</b> , Fuse N.	Observation of posterior corneal vesicles with <i>in vivo</i> confocal microscopy and anterior segment OCT	Clin Ophthalmol	in press.	1243-1247	2011
Kunikata H, Uematsu M, <b>Nakazawa T</b> , Fuse N.	Successful Removal of Large Intraocular Foreign Body by 25-Gauge Microincision Vitrectomy Surgery.	J Ophthalmol	2011;940323.	Epub 2011 Apr 4.	2011

【平成23年度】研究成果の刊行に関する一覧表（中澤徹）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ryu M, Yasuda M, Shi D, Shanab A. Y, Watanabe R, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Takano J, Saido T, <b>Nakazawa T*</b> .	The critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death.	<i>J Neurosci Res.</i>	Apr;90(4)	802-15	2012
Aizawa N, <b>Nakazawa T*</b> , et al.	Reproducibility of retinal circulation measurements obtained using laser speckle flowgraphy-NAVI in patients with glaucoma.	<i>Clin Ophthalmol.</i>	5	1171-6	2011
Chiba N, <b>Nakazawa T*</b> , et al.	Association between optic nerve blood flow and objective examinations in glaucoma patients with generalized enlargement disc type.	<i>Clin Ophthalmol.</i>	5	1549-56 Epub 2011 Oct 28.	2011
Otani T, Yasuda K, Aizawa N, Sakai F, <b>Nakazawa T*</b> , Shimura M.	Over 10 years follow-up of Coats' in adulthood.	<i>Clin Ophthalmol.</i>	5	1729-32. Epub 2011 Dec 8	2011
Tsubota K, Yoshida T, Kurosaka D, Lee KR, Alfonso CE, <b>Nakazawa T*</b> .	Miami to Japan Eye-Care Rescue Mission: Vision Van Helps with Relief Efforts.	<i>Am J Ophthalmol.</i>	Nov;152(5)	886-7	2011
The Japanese Steroid-Induced Glaucoma Multicenter Study Group	Success Rates of Trabeculotomy for Steroid-Induced Glaucoma: a Comparative, Multicenter, Retrospective, Cohort Study.	<i>Am J Ophthalmol.</i>	Jun;151(6)	1047-1056	2011

【平成23年度】研究成果の刊行に関する一覧表（永井展裕）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H Onami, <b>N Nagai</b> , S Machida, N Kumasaka, R Wakusawa, Y Ishikawa, H Sonoda, Y Sato, T Abe	Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes	RETINA The Journal of Retinal and Vitreous Diseases	32 (6)	1204-1213	2012
R Wakusawa, T Abe, H Sato, H Sonoda, M Sato, Y Mitsuda, T Takakura, T Fukushima, H Onami, <b>N Nagai</b> , Y Ishikawa, K Nishida, Y Sato.	Suppression of choroidal neovascularization by vasohibin-1, a vascular endothelium-derived angiogenic inhibitor	Invest Ophthalmol Vis Sci	52(6)	3272-3280	2012
T Kawashima, <b>N Nagai</b> , H Kaji, N Kumasaka, H Onami, Y Ishikawa, N Osumi, M Nishizawa, T Abe	A scalable controlled-release device for transscleral drug delivery to the retina	Biomaterials	32(7)	1950-1956	2011

【平成23年度】研究成果の刊行に関する一覧表（西澤松彦）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
N. Nagai, N. Kumasaka, T. Kawashima, H. Kaji, M. Nishizawa, T. Abe	Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF	J Mater Sci: Mater Med.	21	1891-1898	2010
T. Kawashima, N. Nagai, H. Kaji, N. Kumasaka, H. Onami, N. Osumi, M. Nishizawa, T. Abe	A Scalable Controlled-release Device for Transscleral Drug Delivery to the Retina	Biomaterials	32	1950-1956	2011
T. Miyake, K. Haneda, N. Nagai, Y. Yatagawa, H. Ohnami, S. Yoshino, T. Abe, M. Nishizawa	Enzymatic Biofuel Cells Designed for Direct Power Generation from Biofluids in Living Organisms	Energy & Environmental Science	4	5008-5012	2011

【平成24年度】研究成果の刊行に関する一覧表（阿部 俊明）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Ahmed Y Shanab, Toru Nakazawa, Morin Ryuu, Yuji Tanaka, Noriko Himori, Keiko Taguchi, Masayuki Yasuda, Ryo Watanabe, Jiro Takano; Saïdo Takaomi, Naoko Minegishi; Toshio Miyata, Toshiaki Abe, Masayuki, Yamamoto	Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: The role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor	Neurobiol Dis	48(3)	556-67	2012 Dec
Hiroshi Kunikata, Masayuki Yasuda, Naoko Aizawa, Yuji Tanaka, Toshiaki Abe, and Toru Nakazawa	Intraocular Concentrations of Cytokines and Chemokines in Rhegmatogenous Retinal Detachment and the Effect of Intravitreal Triamcinolone Acetonide	Am J Ophthalmol	155(6)	1028-1037	2013 Jun;
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)	1602-7	2012 Sep
Kobayashi W, Abe T, Tamai H, Nakazawa T.	Choroidal excavation with polypoidal choroidal vasculopathy: a case report.	Clin Ophthalmol	6	1373-6	2012
Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Shigeki Machida, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Yumi Ishikawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, <u>Toshiaki Abe</u>	Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes	Retina	32(6)	1204-13	2012 Jun
Yumi Tokita-Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Hikaru Sonoda, Tomoaki Takakura, Yasufumi Sato, <u>Toshiaki Abe</u>	Vasohibin and retinal pigment epithelium	Adv Exp Med Biol	723	305-310	2012

【平成24年度】研究成果の刊行に関する一覧表（中澤 徹）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	Exp Eye Res		108	2013
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.
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
Ai Shimizu, Yoshimasa Takano, Dong Shi, Shunji Yokokura, Yu Yokoyama, Xiaodong Zheng, Atsushi Shiraiishi, Yuichi Ohashi, Toru Nakazawa, Nobuo Fuse	Evaluation of CNTNAP2 gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese	Molecular Vision	18	1395-1401	2012
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 Dec
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

【平成24年度】研究成果の刊行に関する一覧表（中澤 徹）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	Am J Ophthalmol.	154(5)	825-832	2012

【平成24年度】研究成果の刊行に関する一覧表（植田 弘師）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Halder SK, Ueda H	Regional distribution and cell type-specific subcellular localization of Prothymosin $\alpha$ in brain	Cell Mol Neurobiol	32	59-66	2012
Halder SK, Matsunaga H, Ueda H	Neuron-specific non-classical release of prothymosin $\alpha$ : a novel neuroprotective damage-associated molecular patterns	J Neurochem	123	262-275	2012
Ueda H, Matsunaga H, Halder SK	Prothymosin $\alpha$ plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms	Ann N Y Acad Sci	1269	34-43	2012



【平成24年度】研究成果の刊行に関する一覧表（永井 展裕）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hideyuki Onami,† Nobuhiro Nagai,† Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Yasufumi Sato, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe (†equal contribution).	Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppresses experimentally induced choroidal neovascularization	PLoS ONE,	8(3)	e58580	2013
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 The Journal of Retinal and Vitreous Diseases	32(6)	1204-1213	2012
Yumi Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe	Vasohibin-1 and retinal pigment epithelium	Adv Exp Med Biol	723	305-310	2012

【平成24年度】研究成果の刊行に関する一覧表（西澤 松彦）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hideyuki Onami,† Nobuhiro Nagai,† Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Yasufumi Satoh, Noriko Osumi, Toru Nakazawa, Toshiaki Abe (†equal contribution).	Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppresses experimentally induced choroidal neovascularization	PLoS ONE,	8(3)	e58580	2013
Takeo Miyake, Keigo Haneda, Syuhei Yoshino and Matsuhiko Nishizawa	Flexible, Layered Biofuel Cells.	Biosensors and Bioelectronics	40	45-49	2013
Syuhei Yoshino, Takeo Miyake, Takeo Yamada, Kenji Hata and Matsuhiko Nishizawa	Molecularly Ordered Bioelectrocatalytic Composite inside a Film of Aligned Carbon Nanotubes	Advanced Energy Materials	3	60-64	2013
Nagamine K, Kawashima T, Sekine S, Ido Y, Kanzaki M, Nishizawa M	Spatiotemporally Controlled Contraction of Micropatterned Skeletal Muscle Cells on a Hydrogel Sheet	Lab Chip	11	513-517	2012
Ido Y, Takahashi D, Sasaki M, Nagamine K, Miyake T, Jasinski P, Nishizawa M	Conducting Polymer Microelectrodes Anchored to Hydrogel Films	ACS Macro Letters	1	400-403	2012
Haneda K, Yoshino S, Ofuji T, Miyake T, Nishizawa M	Sheet-Shaped Biofuel Cell Constructed from Enzyme-Modified Nanoengineered Carbon Fabric	Electrochim. Acta	82	175-178	2012
Nagamine K, Ito K, Takahashi M, Otani S, Nishizawa M	An Oxygen Responsive Microparticles Patterned Hydrogel Sheet for Enzyme Activity Imaging	Electrochim. Acta	80	318-320	2012

【平成25年度】研究成果の刊行に関する一覧表（阿部 俊明）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Abe T</u>	A Platform for Controlled Dual-Drug Delivery to the Retina: Protective Effects against Light-Induced Retinal Damage in Rats	Adv Healthc Mater	doi: 10.1002/adhm.201400114. [Epub ahead of print]		2014
AbeT, Tokita-Ishikawa Y, Onami H, Katsukura Y, Kaji H, Nishizawa M, Nagai N	Intrascleral 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. Retinal Degenerative Diseases	Advances in Experimental Medicine and Biology	Volume 801	837-843	2014
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	10	680-7	2014
Kunikata H, Aizawa N, Meguro Y, <u>Abe T</u> , Nakazawa T.	Combined 25-gauge microincision vitrectomy and toric intraocular lens implantation with posterior capsulotomy.	Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina	44	145-54	2013
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	2013

【平成25年度】研究成果の刊行に関する一覧表（中澤 徹）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	9	e84072	2014
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	38	1133-1141	2013
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	108	10-15	2013
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	38	691-698	2013
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	432	509-512	2013
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	8	e54115	2013

【平成25年度】研究成果の刊行に関する一覧表（中澤 徹）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 Ophthalmol	57	457-462	2013
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	127	669-680	2013
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	61	333-342	2013

【平成25年度】研究成果の刊行に関する一覧表（植田 弘師）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Halder SK, Matsunaga H, Yamaguchi H, Ueda H	Novel neuroprotective action of prothymosin $\alpha$ -derived peptide against retinal and brain ischemic damages	J Neurochem	125	713-723	2013
Halder SK, Sugimoto J, Matsunaga H, Ueda H	Therapeutic benefits of 9-amino acid peptide derived from prothymosin alpha against ischemic damages	Peptide	43	68-75	2013

【平成25年度】研究成果の刊行に関する一覧表（永井 展裕）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<b>Nagai N</b> , 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	A c t a Biomateriali a	10	680-687	2014

【平成25年度】研究成果の刊行に関する一覧表（西澤 松彦）

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<b>Nagai N</b> , 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	A c t a Biomateriali a	10	680-687	2014