

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15626

研究課題名(和文) 眼球バイオ電池作成と局所活性酸素抑制への挑戦

研究課題名(英文) Creating eyeball bio-batteries and challenging to suppress local active oxygen

研究代表者

阿部 俊明 (Abe, Toshiaki)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90191858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ流路を利用して細胞反応評価・活性酸素測定を行い流路に組み込むバイオ電池や眼球を直接バイオエネルギーに利用できる可能性を検討した。27年度は10ミクロンの細孔のアレイを有するポラス化ポリジメチルシロキサン(PDMS)膜、および流路構造を有するPDMSモールドを作製し、ARPEをこの流路に培養できた。28年度はHUVECのARPEとの共培養が出来るようになり、HUVECは特に低グルコースなどの負荷でARPE側に移動した。負荷による細胞死はミトコンドリアがかかわる可能性が判明し、活性酸素の発生の変化がミトコンドリアで見られ、バイオ電池作製の第一歩になった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the feasibility of the production of bio-batteries using micro-channel or eye ball by measuring active oxygen. It was possible to fabricate a porous polydimethylsiloxane (PDMS) film having an array of 10 micron pores and a PDMS mold having a flow path structure and culture retinal pigment epithelial cells (ARPE) in FY2015. In FY 2016, we could co-cultivate ARPE with HUVEC and found HUVEC migrate to the ARPE side, especially in some stress conditions. It turned out the possibility that mitochondria was involved in cultured cell death. Since the change in the generation of active oxygen was seen in mitochondria, we think there is a possibility to create the bio-battery, our final objective of production.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素上皮細胞 マイクロ流路 活性酸素 低酸素 VEGF

1. 研究開始当初の背景

日本で失明原因の上位は網膜疾患であるが病態背景は複雑である。加齢、活性酸素、遺伝子など多因子が長期間に関与して発症するため治療法開発を難しくする。特に視機能に最も重要な黄斑部は慢性の光刺激を受容し続け、血流も多く、活性酸素発生の母体になりやすい。そこで我々は局所(特に黄斑部)の病態をモニタリングしながら、持続的に発生する活性酸素などを軽減できる方法を考えた。我々は流路内に網膜色素上皮細胞(RPE)を培養できることを確認し、マイクロ等組み合わせが可能であることを確認した。一方、水素は活性酸素の中和・除去に有用であるとされ、動物疾患モデル等で有効性が多数報告された(PLoS ONE;9,e99299,2014)。また、我々はグルコースを燃料にするバイオ燃料電池を開発したが(Energy Environ Sci, 4, 5008-5012, 2011)。このバイオ電池は酵素反応によるグルコース酸化と酸素還元を利用したもので、グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)等の酵素反応でグルコースを代謝するが、その過程で水素イオンを生じる。このバイオ電池で発生する水素イオンを特に黄斑部のような活性酸素産生が激しい局所で使用できれば有用と考えた。

2. 研究の目的

マイクロ流路を利用して共培養システムを作成し、培養細胞間負荷による発生する活性酸素などの発生を確認する。眼球への親和性が高いグルコース濃度感受性の眼球バイオ燃料電池の作製し酵素反応副生成物であるプロトンの活性酸素スカベンジャーとして網膜保護の可能性とその分子メカニズムを検討する。また、バイオ電流自体の網膜保護やイオントフォーシス利用の薬剤徐放システムへのハイブリット化の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1)マイクロ流路とバイオ燃料電池作製(梶、阿部、大学院生)平成27年度
 方法:10ミクロン程度の細孔のアレイを有するポラス化ポリジメチルシロキサン(PDMS)膜、および流路構造(100ミクロン~1ミリ程度の流路幅)を有するPDMSモールドを順に重ねて接着させることで、3層の流路構造を備えたデバイスを作製する。PDMS膜の上下あるいは別流路に網膜色素上皮細胞(RPE)の培養やヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の共培養を行う。マイクロ流路内はグルコースや低酸素負荷で細胞反応を確認しながら細胞を介した別流路内あるいは組織固定チャンバー内に設置したアノードからの燃料の供給の可能性の検討を行う。アノード/カソード針は我々の既報に従う(Energy Environ Sci, 4, 5008-5012, 2011)。
 付加の確認は hypoxia-inducible

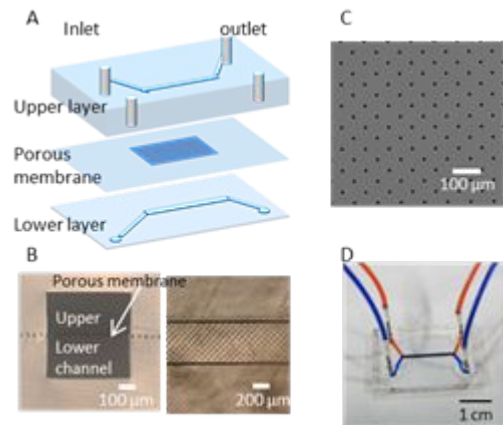
factor-1alpha (HIF)が作用する element の hypoxia response element (HRE)をリピートさせ GFP と結合させたベクター導入 RPE (HRE-GFP-RPE) を利用する。細胞活性(MTS)と細胞死率を評価し、ミトコンドリア膜電位、活性酸素発生は蛍光色素で定量する。

(2)眼球バイオ電池の作成(阿部、梶、連携研究者西澤)平成28年度

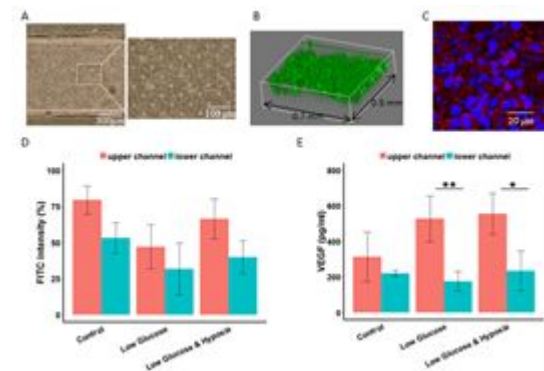
眼球は角膜が酸素の豊富な大気に接し、また後方端は血流の豊富な脈絡膜など特殊な環境になっている。コンタクトレンズにカーボンシートと BOD を基盤にした酸素還元型の電極を作成し、大気から取り込む酸素をもとに biocathode (カソード)とし、我々の既報の経強膜薬剤徐放デバイスを利用して強膜面側に金ワイヤーとアガロースを充填したアノード電極を作成する。

4. 研究成果

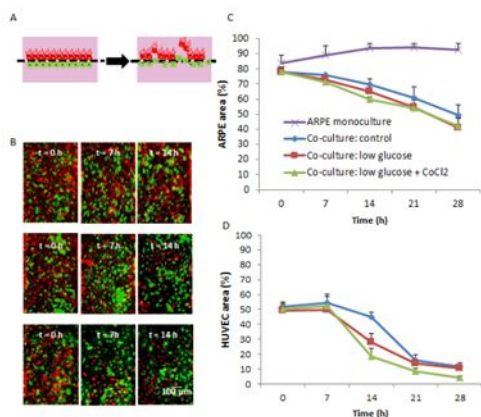
10 ミクロンの細孔のアレイを有するポラス化ポリジメチルシロキサン(PDMS)膜、および流路構造を有する PDMS モールドを作製することができた(下図)。



さらにこの流路には細胞を流し込むことによる ARPE の培養が可能になり、アウトレットからは細胞付加による VEGF の測定も可能であった(下図)。VEGF は負荷により有意にこの移動率が変化した。



この流路は複数のマイクロ流路が重ね合わさっているがそれぞれの流路にARPEとHUVECの共培養が可能であった。本研究の本題から少し外れるが、非常に意味のあることであるが、ARPEに付加を加えるとHUVECはARPE側の流路に移動した(下図)。この反応はRPEの障害の程度にも影響された。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

Zhaleh Kashkouli Nezhad, Nagai N, Yamamoto K, Kaji H, Nishizawa M, Saya H, Nakazawa T, Abe T. Application of clotrimazole via a novel controlled release device provides potent retinal protection. *J Mater Sci Mater Med*, 査読有、2015 ;26(9):5561-2015、doi: 10.1007/s10856-015-5561-9

Nagai N, Iwata S, Kaji H, Sampei K, Katsukura Y, Onami H, Nishizawa M, Nakazawa T, Mashima Y, and Abe T. Protective effects of sustained transscleral unoprostone delivery against retinal degeneration in S334ter rhodopsin mutant rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 査読有、2016;104(8):1730-1737、2016、doi: 10.1002/jbm.b.33522.

Nagai N, Kaji H, Nishizawa M, Nakazawa T, Abe T. Transscleral controlled delivery of geranylgeranylacetone using a polymeric device protects rat retina against light injury. *Adv Exp Med Biol*, 査読有、2016;854:471-7、2016、doi: 10.1007/978-3-319-17121-0_63.

Nagai N, Koyanagi E, Izumida Y, Liu J, Katsuyama A, Kaji H, Nishizawa M, Osumi N, Kondo M, Terasaki H, Mashima Y, Nakazawa T, Abe T. Long-term protection of genetically ablated

rabbit retinal degeneration by sustained transscleral Unoprostone delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有、1;57(15):6527-6538、2016、doi: 10.1167/iovs.16-20453.

PMID:27918826

Suzuki J, Nagai N, Nishizawa M, Abe T, Kaji H. Electrochemical manipulation of cell populations supported by biodegradable polymeric nanosheets for cell transplantation therapy. *Biomater Sci*, 査読有、2017 Jan 31;5(2):216-222、2017、doi: 10.1039/c6bm00852f.

Taro Kondo, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Jin Suzuki, Nobuhiro Nagai, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji. A self-deploying drug release device using polymeric films. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater*, 査読有、(Epub ahead of print)、doi:10.1002/jbm.b.33887

Jin Suzuki, Nobuhiro Nagai, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji. Electrochemical manipulation of cell populations supported by biodegradable polymeric nanosheets for cell transplantation therapy. *Biomater*, 査読有、*Sci*. 5, 216-222 (2017). (Back cover article) doi:10.1039/c6bm00852f

[学会発表](計 14件)

永井展裕、泉田泰子、梶弘和、勝山綾、西澤松彦、山田慎二、眞島行彦、阿部俊明、網膜色素変性治療を目指した薬剤徐放デバイスの開発、第16回再生医療学会総会、2017年3月7~9日、仙台国際センター(仙台)

Toshiaki Abe, Aya Katsuyama, Shinji Yamada, Yuki Katsukura, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Nobuhiro Nagai, Toru Nakazawa A non-histone nuclear protein enhances vascular endothelial growth factor expression and choroidal neovascularization、2016 ARVO Annual Meeting、May 1-5、2016、Seattle (USA)

Nobuhiro Nagai, Yasuko Izumida, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Aya Katsuyama, Shinji Yamada, Toru Nakazawa, Mineo Kondo, Hiroko Terasaki, Yukihiko Mashima, and Toshiaki Abe. Protective Effects of Sustained Unoprostone Release Device in Rhodopsin Pro347Leu Transgenic Rabbits、2016 ARVO Annual Meeting、May 1-5、2016、Seattle (USA)

永井展裕、梶弘和、泉田泰子、山田慎二、中澤徹、西澤松彦、眞島行彦、阿部俊明、

後眼部局所持続投与を指向した薬物徐放デバイスの開発、第32回日本DDS学会学術集会、2016年06月30日～2016年07月01日、静岡県コンベンションアーツセンター（静岡）

Toshiaki Abe, Yasuko Izumida, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Yukihiko Mashima, Toru Nakazawa, and Nobuhiro Nagai, Characterization of a novel drug releasing device for retinal diseases、XVIIth International Symposium on Retinal Degeneration、2016年09月19日～2016年09月24日、国立京都国際会館（京都）

Taro Kondo, Zhaleh Kashkouli Nezhad, Jin Suzuki, Nobuhiro Nagai, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji, Drug delivery system using injectable polymeric nanosheets、PRIME 2016、Oct. 2-7, 2016、Honolulu, Hawaii (USA)

Li-Jiun Chen, Nobuhiro Nagai, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji, In vitro angiogenesis: co-culture model of the retina in microfluidic devices、PRIME 2016、Oct. 2-7, 2016、Honolulu, Hawaii (USA)

Jin Suzuki, Taro Kondo, Nobuhiro Nagai, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, Hirokazu Kaji, Electrochemical manipulation of living cells supported by polymeric nanosheets、PRIME 2016、Oct. 2-7, 2016、Honolulu, Hawaii (USA)

Hirokazu Kaji, Jin Suzuki, Matsuhiko Nishizawa, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe, Injectable polymeric nanosheets for subretinal cell delivery、IEEE NANO 2016、Aug. 22-25, 2016、仙台国際センター（仙台）

Hirokazu Kaji, Taro Kondo, Jin Suzuki, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe, Cell delivery system using injectable polymeric films、10th World Biomaterials Congress、May 17-22, 2016、Montreal (Canada)

Toshiaki Abe, Aya Katsuyama, Hideyuki Onami, Toru Nakazawa, Nobuhiro Nagai, Transscleral Sustained Ranibizumab Delivery Device Using Polyethyleneglycol Dimethacrylates、ARV02015, May 3-7, Denver (USA)

Nobuhiro Nagai, Yasuko Izumida, Eri Koyanagi, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Takahito Imagawa, Akiko Moriwaka, Toru Nakazawa, Yukihiko Mashima, and Toshiaki Abe, Pharmacokinetic and Safety Evaluation of a Transscleral Sustained

Unoprostone Release Device, ARV02015, May 3-7, 2015, Denver (USA)

Toshiaki Abe, Shinji Yamada, Hirokazu Kaji, Aya Katsuyama, Matsuhiko Nishizawa, Nobuhiro Nagai, Sustained release system of ranibizumab for transscleral administration, 2015BMES Annual meeting, Oct. 7-10, 2015 Tampa (USA)

Shinji Yamada, Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Aya Katsuyama, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe, Controlled drug release device fabricated with PDMS mold-based UV curing of polyethyleneglycol dimethacrylates, 2015BMES Annual meeting, Oct. 7-10, 2015 Tampa (USA)

〔図書〕(計 3件)

阿部 俊明 他(57人中9番目) 医学書院、網膜変性疾患診療のすべて、2016、pp64-68、pp373-376

阿部 俊明 他、医学書院、今日の眼疾患治療指針 第3版、2016、pp570

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：細胞・薄膜複合体の製造技術
発明者：梶 弘和, 鈴木 仁, 永井展裕,
阿部俊明
権利者：国立大学法人東北大学
種類：特許
番号：2016-086455
出願年月日：2016年4月22日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.dcct.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 俊明 (ABE, Toshiaki)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：9019858

(2) 研究分担者

梶 弘和 (Kaji Hirokazu)
東北大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号：70431525

(3) 連携研究者

西澤 松彦 (Nishizawa Matsuhiko)
東北大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：20273592