

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592214

研究課題名（和文） 網膜保護用デバイスの開発

研究課題名（英文） Development of devices for retinal protection

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：90191858

研究成果の概要（和文）：

網膜保護や新生血管抑制のための新規デバイスの開発をめざした。まず神経栄養因子分泌細胞を作製し、コラーゲンスポンジに培養し強膜内移植を行ったところ、急性高眼圧ウサギモデルで一部網膜保護効果が見られた。さらにPolyethylene glycol dimethacrylateとtriethylene glycol dimethacrylate、コラーゲン粒子で薬剤徐放デバイスを作製した。血管内皮細胞増殖抑制機能のあるバソヒビン徐放したが *in vitro* で血管内皮細胞の増殖を抑制した。さらに脈絡膜新生血管（CNV）モデルラットでCNVが抑制された。

研究成果の概要（英文）：

We aimed the creation of a new device that secretes a drug for retinal protection and suppression of choroidal neovascularization (CNV). We also aimed the sustained delivery of the drug, safety of the device and easily to be taken out the devices.

The devices were made from a sustained-release film and the reservoir using triethylene glycol dimethacrylate (TEGDM), polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDM), and collagen particles with UV irradiation. When we used vasohibin-1 for the loaded drug in the devices, the released vasohibin-1 was found to inhibit the proliferation of endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. We put the device on rat sclera and examined for a rat model of CNV using intense photocoagulation, and the effect was considered significantly when compared to that of non-vasohibin releasing device by fluorescein photography and measurement of the CNV area. Fabrication of the device can make the results exactly the sustained release of drug. We may be able to use the device from transscleral drug delivery one for retinal diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：(1) 網膜保護、(2) デバイス、(3) ドラッグデリバリーシステム、(4) 新生血管、(5) コラーゲン、(6) PEG

1. 研究開始当初の背景

確立された治療法のない網膜疾患はたくさん存在する。加齢黄斑変性や網膜色素変性あるいは虚血性疾患が代表疾患であるが、これまでに幹細胞などの細胞移植、標的遺伝子を対象にした遺伝子治療、硝子体内への神経栄養因子投与など積極的な治療法の開発が進められてきたが、確立された治療法はまだない。硝子体内への各種薬剤の繰り返しの継続投与が試みられようとしているが、合併症や経済面などさまざまな問題点がある。我々は基礎的なデータを蓄積し以下に要約するような基礎的成果があり、新しい発想に基づく網膜疾患治療法開発の着想に至った。(1) 生体適合性のある各種人工膜（コラーゲン膜やゴアテックス膜など）はさまざまな病態に応用されている。この人工膜は培地中で同じ形状を保ちしかも長期間（最低6ヶ月以上）標的分子を発現し続けることが判明した。(2) これまでの我々の検討では、同じ視細胞保護因子でも、硝子体内への投与よりも網膜下や脈絡膜側からの分泌のほうがより視細胞保護効果が強いものがある可能性が示唆された。(3) カプセル化前の細胞を浸潤させたコラーゲン膜はウサギ強膜の半層切開、あるいは強膜切開後に脈絡膜を露出し脈絡膜下に視細胞周囲の微細環境を破壊しないで移植できることが判明し、さまざまな網膜疾患に応用できる可能性を証明した。(4) 網膜保護因子分泌細胞の作製（Tet-system）

は、細胞外から抗生物質を投与することで目的の網膜因子の発現をコントロールできることが判明した。(5) 上記した生体適合性のある各種人工膜はこれらをうまく組み合わせることで、薬剤徐放デバイス作製が可能であることが判明した。

2. 研究の目的

難治性網膜疾患治療法開発のために、効果のみでなく安全性も重視したデバイス作成を目指す。

3. 研究の方法

細胞の浸潤・培養が可能なコラーゲン膜の作製とそのカプセル化

方法：標的因子はプラスミドベクターに遺伝子の形で組み込み細胞に導入する。これまでの検討から網膜細胞保護因子として脳由来神経栄養因子（BDNF）、新生血管抑制として血管内皮細胞由来の内因性新生血管抑制因子（バゾヒビン）を利用する。これらの細胞が標的因子を発現することの確認は、ELISA、real-time PCR、ウエスタンなどを利用する。発現時間はコントロールとして導入するgreen fluorescein protein（GFP）の発現を追跡する。利用する細胞は本来我々が臨床応用経験のある自己の虹彩色素上皮細胞（IPE）やARPE細胞株（異種細胞の使用の可能性）、その他の細胞でも利用可能なものを順次用いる。

デバイス作製方法：架橋の条件を変えたコ

ラーゲン膜を利用して細胞浸潤培養用のデバイス作製を行う。今回はCO₂ bonding後のPLGAカプセル内での細胞の生存状態と目的因子の発現を確認する。

薬剤徐放デバイスの作製と動物モデルでの検討

方法：Polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDM)とtriethylene glycol dimethacrylate (TEGDM)、コラーゲン粒子を利用してUV照射によりデバイスの徐放膜とリザーバーを作製する。ラット用は強膜上に移植することで実験的脈絡膜新生血管膜 (CNV) の予防が可能かどうか確認する。

4. 研究成果

BDNFは培養上清に確認できた。またこの細胞は十分にわれわれの作製したコラーゲン内で培養可能であり、培地を交換しながらではあるが6カ月後でもBDNFやEGFPの分泌を確認できた。細胞を培養するためのコラーゲンの架橋は強度を強くすればするほど長期間（6か月以上）培地中で細胞培養可能であった。一方強くすると細胞がコラーゲン内部に侵入しにくいことも判明した。またコラーゲン内部の細胞は一部細胞死がみられるものも存在した。

一方、薬剤徐放検討も行った。まず FITC でラベルした 40 k Da のデキストラン (FD40) を PEG/TEG 比を調整してペレット化しデバイスに包埋することで、FD40 の分泌を 0 次徐放することができた。この量は徐放膜内に存在するコラーゲン量の変更で自由に調整可能であった。

次にデバイスにコラーゲンに含有した BDNF を充填し、その徐放性を調べた。FD40 と同様に徐放量が変化した。カプセルから徐放された BDNF は濃度依存的に MAPK のリン酸化を活性化させることが分かった。

BDNF も FD40 もデバイスからの徐放が可能であったが、低分子量 (sodium fluorescein; FL) のものも徐放制御も可能であった。

次に血管内皮細胞増殖抑制機能のあるバソヒビンを利用したデバイスを作製し、*in vivo* でバソヒビン徐放検討と新生血管抑制機能について検討した。バソヒビンも初期バーストなく徐放を確認でき、また *in vitro* で血管内皮細胞 (HUVEC) の増殖を抑制することが判明した。このデバイス移植後にバソヒビンの眼内分布を検討すると、強膜、脈絡膜、網膜色素上皮、神経網膜に分布していることが判明した。さらに強度光凝固を利用して脈絡膜新生血管モデルラットにおいて効果を確認したが、蛍光眼底撮影、CNV 面積測定においてもバソヒビン非徐放デバイス移植に比較して有意に CNV 抑制効果が確認された。この効果はバソヒビンを実際に硝子体内に注入する我々の過去の成績に比較してほぼ同等程度と考えられた。

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32件)

1. Kawashima T, Nagai N, Kaji H, Kumasaka N, Onami H, Ishikawa Y, Osumi N, Nishizawa M, and Abe T. A scalable controlled release device for transscleral drug delivery to the retina.

Biomaterials;32(7): 1950-1956, 2011. 査読あり

2. Kunikata H, Fuse N, Abe T Fixating Dislocated Intraocular Lens by 25-Gauge Vitrectomy. **Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging** 42(4):297-301, 2011 査読あり

3. Kunikata H, Abe T, Nishida K Successful outcomes of 25- and 23-gauge vitrectomies for giant retinal tear detachments. **Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging** 8:1-6, 2011. 査読あり

4. Kunikata H Nitta F, Meguro Y, Aizawa N, Hariya T, Chiba N, Abe T, Nishida K Difficulty in Inserting 25- and 23-gauge Trocar-cannula during Vitrectomy.

Ophthalmologica :198-204, Sep 2. 2011. 査読あり

5. Ishikawa Y, Nagai N, Onami H, Kumasaka N, Wakusawa R, Sonoda H, Sato Y, Abe T. Vasohibin-1 and retinal pigment epithelium. **Adv Med Exp Biol**, 2012, in press, 査読あり

6. Miyake T, Haneda K, Nagai N, Yatagawa Y, Ohnami H, Yoshino S, Abe T, and Nishizawa M Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms. **Energy & Environmental Science** :5008-5012, 2011, 査読あり

7. Onami H, Nagai N, Machida S, Kumasaka N, Wakusawa R, Ishikawa Y, Sonoda H, Sato Y, Abe T Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes. **RETINA** 2012 in press 査読あり

8. Wakusawa R, Abe T, Sato H, Sonoda H, Sato M, Mitsuda Y, Takakura T, Fukushima T, Onami H, Nagai N, Ishikawa Y, Nishida K, and Sato Y. Suppression of Choroidal Neovascularization by Vasohibin-1, Vascular Endothelium-derived Angiogenic Inhibitor **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 17;52(6):3272-3280, 2011 査読あり

9. Ryu M, Nakazawa T, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, Abe T, Akashi M, Nishida K. Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. **J Control Release**;151(1):65-73, 2011. 査読あり

10. Fuse N, MingGe Mengkegale, Miyazawa A, Abe T, Nakazawa T, Wakusawa R and Nishida K Polymorphisms in ARMS2 (LOC387715) and LOXL1 Genes in Japanese with Age-related Macular Degeneration. **Am J Ophthalmol**;151:550-556, 2011. 査読あり

11. 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. 査読あり

12. Kunikata H, Abe T, Kinukawa J, Nishida K Preoperative factors predictive of postoperative decimal visual acuity > 1.0 following surgical treatment for idiopathic epiretinal membrane. **Clinical Ophthalmology**; 5: 147-154, 2011. 査読あり

13. Seidi A, Kaji H, Annabi N, Ostrovidov S, Ramalingam M, Khademhosseini A, "A microfluidic-based neurotoxin concentration gradient for the generation of an in vitro model of Parkinson's disease" **Biomicrofluidics** 5, 022214, 2011. 査読あり

14. Yanagawa F, Kaji H, Jang YH, Bae H, Yanan D, Fukuda J, Qi H, Khademhosseini A, "Directed assembly of cell-laden microgels for building porous three-dimensional tissue constructs" **J. Biomed. Mater. Res. A** 97A, 93-102, 2011. 査読あり

15. Kaji H, Camci-Unal G, Langer R, Khademhosseini A, "Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions" **Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.** 1810, 239-250, 2011. 査読あり

16. Tokita-Ishikawa Y, Wakusawa R, Abe T. Evaluation of retinal degeneration in P27K1P1 null mice. **Adv Exp Med Biol**;664:467-471, 2010. 査読あり

17. Nagai N, Kumasaka N, Kawashima T, Kaji H, Nishizawa M, Abe T. Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF. **J Mater Sci Mater Med**. 21(6), 1891-1898, 2010 査読あり

18. Qi H, Du Y, Wang L, Kaji H, Bae H, Khademhosseini A, "Patterned differentiation of individual embryoid bodies in spatially organized 3D hybrid microgels" **Adv. Mater.** 22, 5276-5281, 2010. 査読あり

19. Ghenim L, Kaji H, Hoshino Y, Ishibashi T, Haguët V, Gidrol X, Nishizawa M, “Monitoring impedance changes associated with motility and mitosis of a single cell” *Lab Chip* 10, 2374–2379, 2010. 査読あり

20. Kaji H, Ishibashi T, Nagamine K, Kanzaki M, Nishizawa M, “Electrically induced contraction of C2C12 myotubes cultured on a porous membrane-based substrate with muscle tissue-like stiffness” *Biomaterials* 31, 6981–6986, 2010. 査読あり

21. Kaji H, Yokoi T, Kawashima T, Nishizawa M, “Directing the flow of medium in controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells with a microfluidic device” *Lab Chip* 10, 2374–2379, 2010. 査読あり

22. Sekine S, Nakanishi S, Miyake T, Nagamine K, Kaji H, Nishizawa M, “Electrodes combined with an agarose stamp for addressable micropatterning” *Langmuir* 26, 11526–11529, 2010. 査読あり

23. Nagamine K, Kawashima T, Ishibashi T, Kaji H, Kanzaki M, Nishizawa M, “Micropatterning Contractile C2C12 Myotubes Embedded in a Fibrin Gel”, *Biotechnol. Bioeng.* 105, 1161–1167, 2010. 査読あり

24. Kawashima T, Yokoi T, Kaji H, Nishizawa M, “Transfer of two-dimensional patterns of human umbilical vein endothelial cells into fibrin gels to facilitate vessel formation” *Chem. Commun.* 46, 2070–2072, 2010. 査読あり

25. Sato H, Abe T, Wakusawa R, Asai N, Kunikata H, Ohta Sonoda H, Sato Y, Nishida K: Vitreous Levels of Vasohibin-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Diabetologia* 52:359–361, 2009 査読あり

26. Saito T, Abe T, Wakusawa R, Sato H, Asai N, Tokita-Ishikawa Y, and Nishida K: TrkB-T1 Receptors on Muller Cells Play Critical Role in Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Photoreceptor Protection against Phototoxicity *CURRENT EYE RESEARCH*, 34(7):580–588, 2009 査読あり

27. Shimura M, Yasuda K, Nakazawa T, Abe T, (4/8). Panretinal photocoagulation induces pro-inflammatory cytokines and macular thickening in high-risk

proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009 ;247:1617–1624. 査読あり

28. Lima R, Oliveira M, Ishikawa T, Kaji H, Tanaka S, Nishizawa M, Yamaguchi M, “Axisymmetric polydimethylsiloxane microchannels for in vitro hemodynamic studies” *Biofabrication* 1, 035005, 2009. 査読あり

29. Kaji H, (2/3), “Spatiotemporal subcellular biopatterning using an AFM-assisted electrochemical system” *Electrochem. Commun.* 11, 1781–1784, 2009. 査読あり

30. Hashimoto M, Kaji H, Nishizawa M, “Selective capture of a specific cell type from mixed leucocytes in an electrode-integrated microfluidic device” *Biosens. Bioelectron.* 24, 2892–2897, 2009. 査読あり

31. Kaji H, (1/4) “Controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells on detachable substrates” *Lab Chip* 9, 427–432, 2009. 査読あり

32. Ishibashi T, Hoshino Y, Kaji H, Kanzaki M, Sato M, Nishizawa M, “Localized electrical stimulation to C2C12 myotubes cultured on a porous membrane-based substrate” *Biomed. Microdevices* 11, 413–419, 2009. 査読あり

〔学会発表〕 (計16件)

- 1, 岡村知世子、國方彦志、阿部俊明、針谷威寛、中澤徹、PASCAL を用いた網膜光凝固後の重篤な將液性網膜剥離、第35回日本眼科手術学会、2012年1月27–29日、名古屋
- 2, 岡村知世子、國方彦志、新田文彦、阿部俊明、東北大学病院における突発性傍中心窩毛細血管拡張症の特徴、第50回日本網膜硝子体学会、2011年12月2–4日、東京
- 3, 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、2011年11月21–22日、京都 (以下4は同学会)
- 4, 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成第33回日本バイオマテリアル学会、2011年11月21–22日、京都
- 5, Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe, Transscleral sustained delivery by novel device. SDDS2011, 2011年11月3–5日, Chenzhen, China
- 6, 阿部俊明、永井展裕、大浪英之、中澤徹、梶弘和、西澤松彦、経強膜ドラッグデリバリー

ーデバイスの開発、第 65 回日本臨床眼科学会、2011 年 10 月 7-10 日、東京（以下 7~8 は同学会）

7, 安田正幸、金澤紘子、國方彦志、新田文彦、阿部俊明、宮田敏男、中澤徹、糖尿病網膜症における非侵襲的皮膚 AGE 測定の有効性

8, 金澤紘子、國方彦志、安田正幸、新田文彦、鬼怒川次郎、中澤徹、布施昇男、阿部俊明、突発性黄斑円孔に対する硝子体手術成績とトリアムシノロンアセトニドの影響

9, 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、2011 年 6 月 9-10 日、東京（以下 10 は同学会）

10, 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, ARVO2011, 2011 年 4 月 29 日-5 月 6 日, Fort Lauderdale, USA
11, Toshiaki Abe, Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Shigeki Machida, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Yumi Ishikawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Suppression of choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes. ARVO2011, 2011 年 4 月 29 日-5 月 6 日, Fort Lauderdale, USA

12, 永井展裕、川島丈明、梶弘和、熊坂典浩、西澤松彦、阿部俊明、網膜変性疾患治療を目指したコラーゲン微粒子/ポリエチレングリコール複合体からなる薬剤徐放カプセルの作製と評価、第 10 回日本再生医療学会総会、2011 年 3 月 1-2 日、東京

13, Nobuhiro Nagai, Takeaki Kawashima, Norihiro Kumasaka, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe. A novel membrane-based drug delivery capsule for retinal neuroprotection. Pacificchem2010, 2010 年 12 月 15-20 日, Hawaii, USA

14, 熊坂典浩、永井展裕、川島丈明、梶弘和、大浪英之、西澤松彦、阿部俊明、徐放制御性に優れた PEG カプセルの作成と網膜 DDS への応用、第 32 回日本バイオマテリアル学会、2010 年 11 月 29-30 日、広島（以下 15 は同学会）

15, 川島丈明、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、阿部俊明、コラーゲン微粒子/ポリエチレングリコール複合体を用いた薬剤徐放カプセルの作製と評価

16, Toshiaki Abe, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Yumi Tokita-Ishikawa, Hikaru Sonoda, Tomoaki Takakura, Yasufumi Sato, Nobuhiro Nagai. Vasohibin and retinal

pigment epithelium. RD2010, 2010 年 7 月 13-17 日, Mont-Tremblant, Canada

〔図書〕（計 1 件）

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.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：持続性ドラッグデリバリーシステム
発明者：阿部俊明、永井展裕、梶弘和、川島丈明、西澤松彦、西田幸二

権利者：

種類：PCT/JP2010

番号：63793

出願年月日：H22 年 8 月 10 日

国内外の別：日本、アメリカ、イギリス

○取得状況（計 1 件）

名称：持続性ドラッグデリバリーシステム
発明者：阿部俊明、永井展裕、梶弘和、川島丈明、西澤松彦、西田幸二

権利者：

種類：PCT/JP2010

番号：63793

出願年月日：H22 年 8 月 10 日

国内外の別：日本、アメリカ、

〔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：90191858

(2) 研究分担者

永井 展裕 (NAGAI NOBUHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30400039

梶 弘和 (KAJI KAZUHIRO)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70431525