

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580464

研究課題名(和文) ナノ粒子化点眼薬の眼内炎治療に関する研究：抗炎症効果とその機序について

研究課題名(英文) Study on endophthalmitis treatment of nano-particles of ophthalmic drugs:  
anti-inflammatory effect and its mechanism

研究代表者

金井 一享 (KANAI, KAZUTAKA)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50281598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：トランラストナノ分散点眼液(TLn)の抗炎症効果についてエンドトキシン誘発ぶどう膜炎(EIU)ラットモデルを用いて評価した。また、RAW264.7細胞を用いて抗炎症機序について検討した。TLnはEIUの臨床病態、組織病理学的ならびに免疫組織学的検索において抗炎症効果を示した。RAW264.7細胞を用いたTLnの抗炎症機序は、少なくともp-IKKの活性抑制とI $\beta$ 分解抑制およびHO-1の早期発現によるNF- $\kappa$ B経路とp-JNKの活性抑制を介するAP-1経路の両活性抑制によるものであることが示唆された。これらのことからTLnは眼科領域を含めた炎症治療物質として有望な薬となりうることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the anti-inflammatory effect of 0.5% tranilast nanoparticles (TLn) eyedrops on endotoxin-induced uveitis (EIU) in rats and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response and the underlying mechanisms in RAW264.7 cells. The present results demonstrate that the topical instillation of TLn eyedrops suppresses the inflammation in EIU. The possible mechanisms for the effect of TLn may dependent on the ability to inhibit the activation of NF- $\kappa$ B pathway through p-IKK and/or I $\beta$  degeneration and association of early HO-1 expression and activation protein (AP)-1 pathway through p-JNK and subsequent expression of proinflammatory mediators. These findings suggest that TLn may be promising agent for the management of inflammation including ophthalmologic field.

研究分野：獣医眼科学

キーワード：ナノ化物質 眼内炎 転写因子 抗炎症薬

1. 研究開始当初の背景

(1)点眼治療薬開発分野において最も期待されているひとつが、ナノテクノロジーの応用である。薬剤送達システム (Drug Delivery System: DDS) は、「必要な薬を、必要な時間に、必要な部位に、必要な量、作用させるためのしくみや技術」を目指すものであり、その目的は、薬剤による治療が可能な領域を広げ、薬剤の利用効果を高め、投薬量を減らし、副作用を抑えることである。しかしながら、経眼薬剤送達技術には、治療効果の面で固有の課題がある。それは、眼の保護機能のために、薬剤の生体利用率が低いことである。例えば、角膜上皮の不透過性、涙が出て流れることなどの複合的要因により、眼内に届くのは点眼した薬のうち、ほとんどの場合 1% - 5% 程度であった。ナノテクノロジーを応用した DDS は、これらの問題を解決する最新の技術であり、その研究開発が急速に進んでいる。

(2)トラニラストは、長年にわたり抗アレルギー点眼薬として、また硝子体手術時の可視化に利用され、安全性が高い薬剤であることがわかっている。近年、トラニラストが、抗アレルギー作用のみならず、炎症性サイトカインと炎症関連物質の発現を抑制することが証明されている。これらの因子は、ぶどう膜炎に重要な役割を演じている。よって、眼内炎におけるトラニラストの抗炎症効果が期待される。

2. 研究の目的

現在、ぶどう膜炎治療にはステロイドと非ステロイド系抗炎症薬のみが使用されているが、眼感染症や角膜疾患がある場合使用できない症例の治療に苦慮することが大変多い。“これらの問題を解決できる眼内炎点眼治療薬はないか?”という観点から、本研究は、ナノテクノロジーを応用した薬剤送達システム (ドラッグデリバリーシステム: DDS) による眼内炎治療につながるナノ化トラニラスト (nTL) 点眼薬の炎症抑制効果とその機序解明のための基礎研究を目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vivo 試験: ルイスラットに LPS を皮下接種するエンドキシン誘発ぶどう膜炎 (EIU) モデルを作成した。0.1%、0.25% と 0.5% nTL、市販の 0.5% トラニラスト (TL) と 0.05% デキサメサゾン (Dexa) の各点眼液を LPS 接種 3 時間前より 1 時間毎に計 6 回点眼した。LPS 接種後 24 時間で眼房水を採取し、房水中の浸潤細胞数と蛋白濃度ならびに炎症性サイトカインと炎症性関連物質 (TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO) 濃度を測定した。LPS 接種後 24 時間後の病理組織学的評価をおこなった。また免疫組織学的検索として LPS 接種後 3 時間後の虹彩毛様体 (ICB) の nuclear factor (NF)- $\kappa$ B、ヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 と

LPS 接種 24 時間後の iNOS、COX-2 と HO-1 の各蛋白発現について比較した。

(2) In vitro 試験: Raw 264.7 培養細胞に 1、5 と 25 $\mu$ M nTL 分散液を LPS 刺激 24 時間前に添加した。LPS 刺激 12 と 24 時間後の iNOS、PGE2 と HO-1 ならびに LPS 刺激後 30 分後における NF- $\kappa$ B (p65)、I $\kappa$ B、p-IKK ならびに AP-1 (p-c-Jun)、p-JNK、p-p38、p-ERK と HO-1 の蛋白発現をウエスタンブロットと免疫蛍光細胞染色により詳細な抗炎症機序について検討した。

4. 研究成果

(1) in vivo 試験: EIU ラットモデルにおける抗炎症効果と機序。

房水中の浸潤細胞数と蛋白濃度: nTL は、眼房水中の浸潤細胞数と蛋白濃度を用量依存的に抑制した (図 1)。

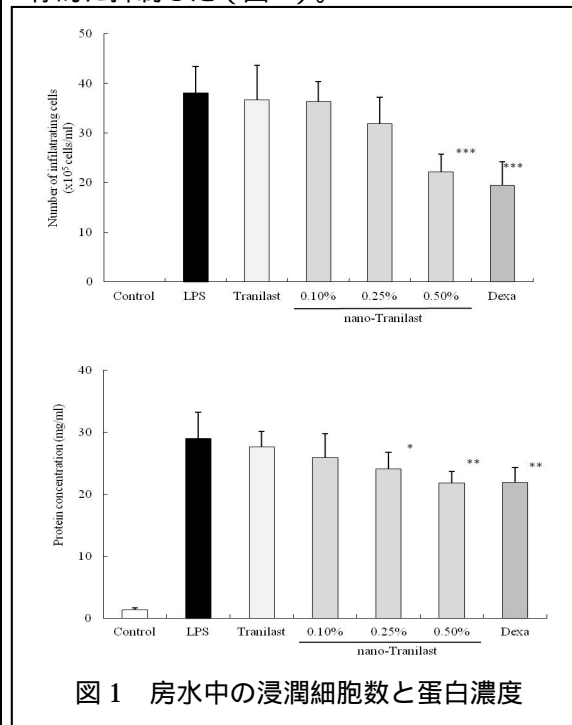


図 1 房水中の浸潤細胞数と蛋白濃度

房水中の TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO 濃度: 0.5% nTL は、眼房水中の TNF- $\alpha$ 、PGE2、NO 濃度を有意に抑制した (図 2)。

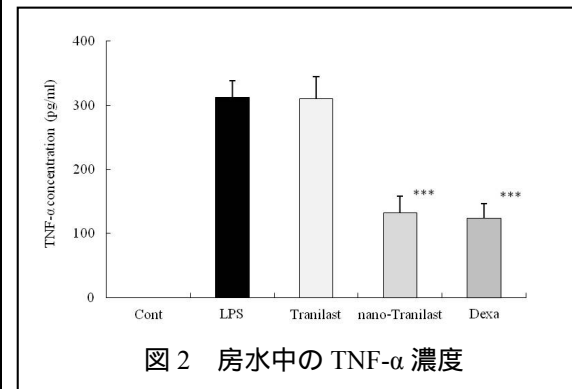
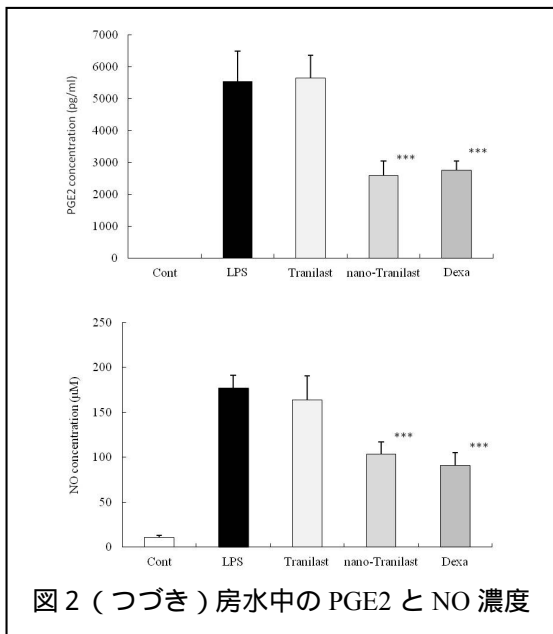
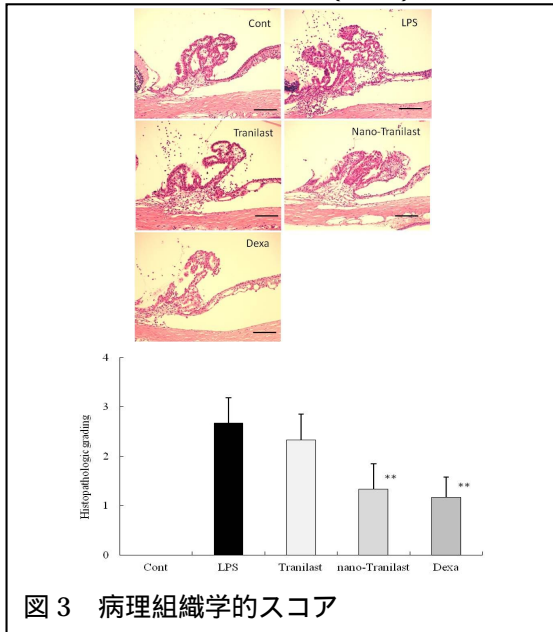


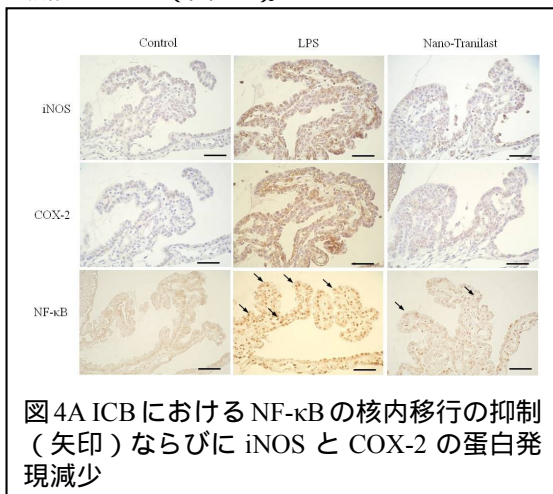
図 2 房水中の TNF- $\alpha$  濃度



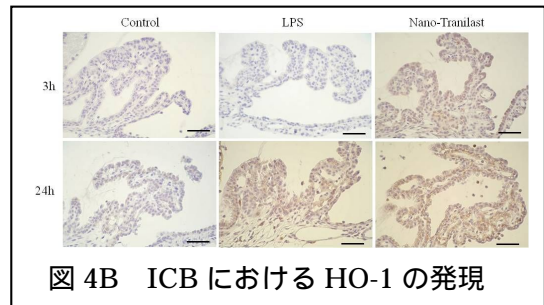
病理組織学的検索：nTL は EIU の病態スコアを有意に低下させた (図3)。



免疫組織学的検索：nTL は ICB での NF-κB の核内移行抑制と iNOS、COX-2 の発現抑制を減少させた (図4A)。

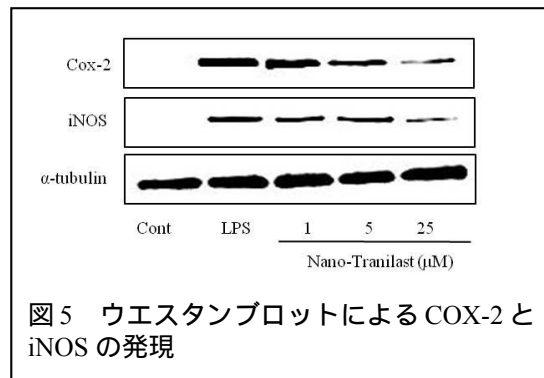


nTL は HO-1 の LPS 接種 3 時間後 LPS に比し、その発現が増加した (図4B)。

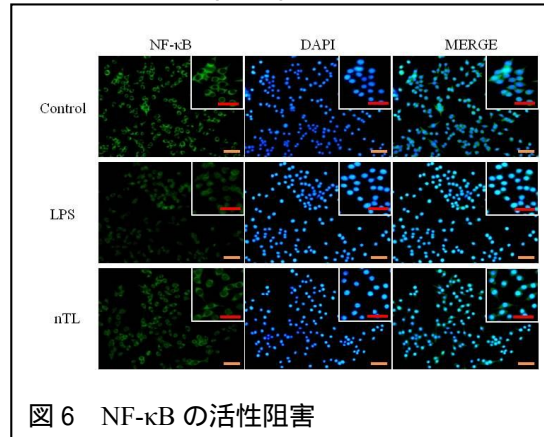


(2) in vitro 試験

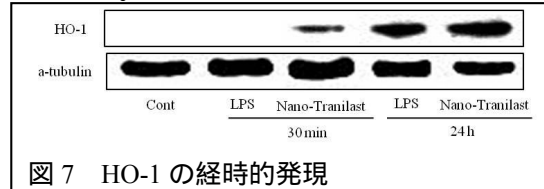
炎症メディエーターの発現：25µM nTL は有意にCOX-2とiNOS発現を抑制した (図5)。



NF-κB (p65) の核内移行：nTL は NF-κB 活性を抑制した (図6)。



HO-1 の発現：nTL は早期にHO-1発現が認められた。



p-IKK と I $\kappa$ B- $\alpha$  (NF- $\kappa$ B 経路) の発現: nTL は p-IKK の発現抑制と I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解抑制が認められた (図 8)。

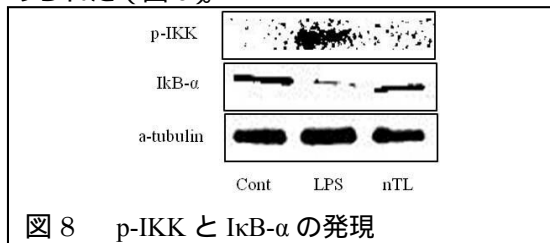


図 8 p-IKK と I $\kappa$ B- $\alpha$  の発現

p-c-Jun (AP-1) の発現: nTL は、p-c-Jun の発現を抑制した (図 9)。

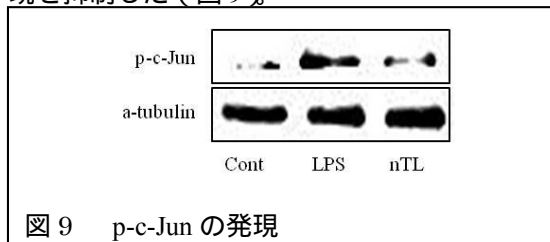


図 9 p-c-Jun の発現

p-JNK、p-p38 と p-ERK の発現: nTL は、p-JNK の活性を抑制したが、p-p38 と p-ERK の発現は抑制しなかった (図 10)。

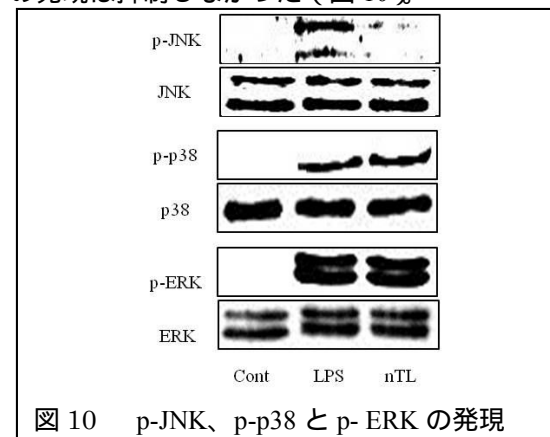


図 10 p-JNK、p-p38 と p-ERK の発現

以上の結果より、TLn は EIU の臨床病態、組織病理学的ならびに免疫組織学的検索において抗炎症効果を示した。RAW264.7 細胞を用いた TLn の抗炎症機序は、少なくとも p-IKK の活性抑制と I $\kappa$ B 分解抑制および HO-1 の早期発現による NF- $\kappa$ B 経路と p-JNK の活性抑制を介する AP-1 経路の両活性抑制によるものであることが示唆された。これらのことから TLn は眼科領域を含めた炎症治療物質として有望な薬となりうることが期待される。

以上、今回の研究事業で得られた成果は学術誌に投稿中である。

## 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)

[学会発表](計 1 件)

Kanai K, Nohmi K, Hayashi E, Ito Y, Nagai N, Tajima K, Itoh N, Chikazawa S, Hori Y, Hoshi F,

Higuchi S. Effects of Topical Tranilast-Nanosuspensions on Endotoxin-induced uveitis in rats. ACVO 2013. Nov 4-9. Puerto Rico.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金井 一享 (KANAI KAZUTAKA)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 50281598