平成２４年度厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究推進事業
（感覚器障害分野）

報　告　書

厚生労働省

実施機関：日本障害者リハビリテーション協会

目　　次

＊外国人研究者招へい事業

「ジョージ・エー・タバルキラーゼ教授　招へい報告」
加我　君孝（(独)国立病院機構　東京医療センター・臨床研究(感覚器)センター）
・・・・・・・・・・・・・・・・5

＊若手研究者育成活用事業

「緑内障のmultiple rare variantsの発現と病態機序の解明による予防・治療法の開発」
原田　綾乃（(独)国立病院機構　東京医療センター・臨床研究(感覚器)センター）
・・・・・・・・・・・・・・・・11
「網膜保護新規薬剤のスクリーニングと徐放デバイスの作製に関する研究」
Zhaleh KASHKOULI NEZHAD（東北大学大学院医学系研究科・細胞治療分野）
・・・・・・・・・・・・・・・・13

外国人研究者招へい事業

ジョージ・エー・タバルキラーゼ教授　招へい報告

加我 君孝
独立行政法人 国立病院機構 東京医療センター・臨床研究(感覚器)センター

１．学問的な面での貢献

①東京大学耳鼻咽喉科学教室で耳音響放射の外有毛細胞における生成機構について講演し、熱心な討論がなされた。

②東京医療センターの感覚器センターにおける第 3 回国際カンファランスにおいて、Auditory Neuropathy Spectrum Disorders とは何かを解説講演し、われわれとの意見交流をした。講演は学問的で、かつ教育的であった。

２．臨床面での貢献

①ロシアにおける新生児聴覚スクリーニングのしくみと問題点を解説し、大きな示唆を与えた。

②東京医療センターのカンファランスにおいて、人工内耳手術における他覚的検査法について講演し、電気 ABR やアブミ骨筋反射記録が客観的指標として重要であることを紹介した。これは東京医療センターの人工内耳グループに大いに参考になる内容であった。

３．国際交流の面

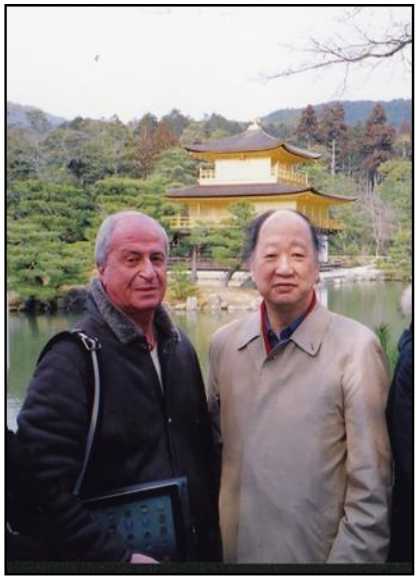
①東京医療センターにおける聴覚・言語外来、手術室、感覚器センターの医師と交流した。

②獨協医科大学の形成外科を訪問し、かつ小耳症・外耳道閉鎖症の手術を見学した。初めての海外の教授を迎え、形成外科との交流を深めた。

③目白大学クリニックを訪問し、新生児聴覚スクリーニングとその後の現状を学んだ。最後に 8 名のスタッフがレセプションを企画し交流した。

④京都大学の医師による京都見学、信州大学の耳鼻科での講演と温泉旅館での宴会で日本式のおもてなしを体験した。信州大学耳鼻科の教授の案内で、白馬でスキーを体験し、交流を深めた。

以上、Tavartkiladze 教授の招へいは大成功であり、実に多くのことを学んだ。患者の人工内耳手術にも貢献していただいた。このプログラムの招へいに感謝申し上げる。



2012.2.11(月) 京都「金閣寺」にて



2012.2.12(火) 国際医療福祉大学三田病院
にて高齢者(82歳)の人工内耳手術見学



2012.2.13(水)東京医療センターの
耳鼻科外来見学・参加



2012.2.14(木)東京大学医学部附属病院見学
及び耳鼻咽喉科学教室にて講演



2012.2.16日(土)信州大学医学部附属病院見学及び耳鼻咽喉科学教室にて講演
2012.2.17(日)市内観光後、信州大学宇佐美教授らと白馬にてスキーを楽しむ



2012.2.19(火)獨協医科大学病院形成外科訪問．小耳症・外同閉鎖症例への耳鼻科（加我）との合同手術を見学



2012.2.19(火)夕方、目白大学クリニック（さいたま市）訪問．外来見学

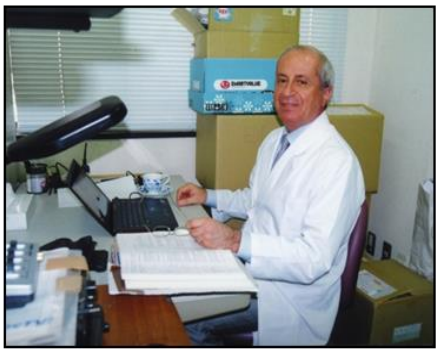


2012.2.20(水)東京医療センターにて3つの演題で講演

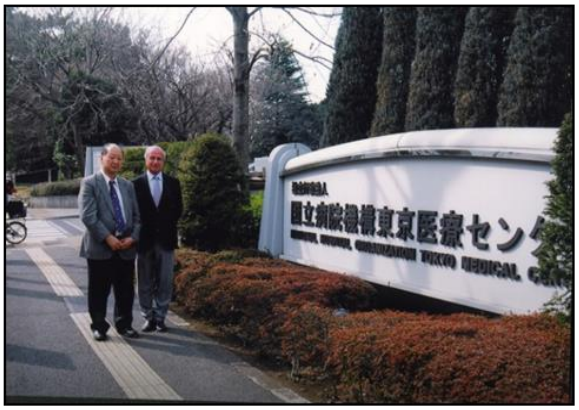


2012.2.22(金)東京医療センター近くの寿司店にて昼食

2012.2.22(金)東京医療センターにて



臨床研究（感覚器）センター研究室





若手研究者育成活用事業

緑内障の multiple rare variants の発現と病態機序の解明による予防・治療法の開発

原田 綾乃
独立行政法人 国立病院機構 東京医療センター・臨床研究(感覚器)センター

目的

開放隅角緑内障におけるエクソーム解析によって挙げられた候補遺伝子について変異を解析し緑内障の原因遺伝子を明らかにする。

方法

眼科外来を受診した緑内障、白内障、加齢黄斑変性、ポリープ状脈絡膜血管症の患者を対象とした。インフォドームコンセントの元に、患者から同意を得て全血採血を行ない収集された検体を用いて解析を行った。血液サンプルは、アルカリ法を用い DNA 抽出機器によりゲノム DNA を精製した。以下の１、２における遺伝子変異解析については、それぞれの候補遺伝子あるいは、geneG の各エクソン領域を増幅対象とした二種類のプライマーを合成し、PCR 法により増幅させ、精製された PCR 反応物を鋳型に用い、ダイレクトシークエンスを行った。

１．すでに、緑内障家系のエクソーム解析より、原因遺伝子の候補とそれらに変異を持つ一家系が挙げられており、家系外の緑内障サンプルにおいて原因遺伝子の変異解析を行った。
２．原因遺伝子の一つである geneG については、全エクソン領域についての網羅的な変異解析を行った。

結果及び考察

１． 緑内障原因遺伝子の解析

緑内障の原因遺伝子の候補として挙げられた以下の geneA から G に変異を持つ一家系が明らかになっており、それぞれの標的位置に対して、家系外の検体を用い、変異解析を行った（表１）。そして、緑内障検体の比較対照としては、control 群(表２）を用いた。その結果、家系外の緑内障検体では、以下の候補遺伝子における変異は検出されなかった。また、新たに入手した家系内の検体に対して、同様の解析を行ったが、変異が検出されなかったため、これら候補遺伝子の標的位置における変異に関しては、緑内障の原因である可能性が極めて低くなった。当研究室で所有している緑内障検体は、家系間のサンプルが少ないため、同じ変異を高い頻度で確認することが難しいという可能性が示唆された。しかし、以下の解析結果から、これら複数の候補遺伝子を除外することにより、新たな候補遺伝子解析への拡大が可能となったと考えている。

表１

候補遺伝子	exon 数	control	家系外サンプル	家系内サンプル
geneA	54	0/509	0/282	変異なし
geneB	3	0/171	0/356	変異なし
geneC	11	4/93	9/107	変異なし

geneD	5	0/179	0/356	変異なし
geneE	4	0/169	0/349	変異なし
geneF	27	未	未	変異なし
geneG	10	0/501	0/356	変異なし

表 2

Control 群

白内障
加齢黄斑変性
ポリープ状脈絡膜血管症

２． gene G のエクソン領域における変異解析

geneA から F は、前述したように候補遺伝子から除外されることとなったが、原因遺伝子の候補の中でも最も有力と考えられている gene G については、全エクソン領域について網羅的な変異解析を行った。現段階では、エクソン領域においては新規の変異は見つかっていない。

しかし、エクソン上にある SNP の頻度を、緑内障検体とすでに dbSNP に登録されている正常者の頻度情報と比較を行ったところ、exon4 において p-value=4.58e-11、p-value = 6.349e-10 という緑内障患者に有意な変異が検出された。この変異は、解析を行った緑内障検体の約 10%の検体で検出されており、geneG の緑内障原因遺伝子である可能性が高まったことを示唆していた。

今後の更なる解析における原因遺伝子の解明が期待される。

網膜保護新規薬剤のスクリーニングと徐放デバイスの作製に関する研究

Zhaleh KASHKOULI NEZHAD
東北大学大学院医学系研究科・細胞治療分野

１．研究要旨

臨床薬として承認されている既存薬ライブラリーを用いて、網膜神経節細胞の低栄養・低酸素負荷培養に対して細胞保護を示す薬剤のスクリーニングを行い、網膜保護新規薬剤候補として Clotrimazole（CLT）を発見した。CLT の細胞保護メカニズムとして、Reactive oxygen-species (ROS) assay と Western blot 法によるアポトーシス関連シグナル発現を評価した。その結果、CLT は負荷培養で上昇する ROS 産生を抑制し、アポトーシスに関わる MAPK family (p38, MAPK, JNK)のリン酸化や Caspase-3 の活性化を抑制していることが示唆された。また、我々が過去に報告している光硬化性ポリエチレングリコールジメタクリレート（PEGDM）で CLT の徐放デバイス化を検討した。その結果、一定放出量で長期間徐放するデバイスを作製した。徐放デバイス化によって CLT の副作用を低減し、経強膜投与によって局所的に眼内に徐放することで、全身性副作用を回避し網膜局所を保護できる　可能性がある。

２．研究目的

視覚は外部情報の 8 割を占めるといわれており、難治性網膜疾患による視覚障害は患者の QOL を著しく低下させる。これらの疾患は、原因は様々であるが、最終的には視覚を司る視細胞や網膜神経節細胞がアポトーシス（細胞死）を起こすことで視力が失われる。そのため、最近は網膜神経細胞の細胞死を抑制する網膜保護の概念が浸透してきている。本研究はこれまで薬剤として上市されなかった薬剤ライブラリーから In vitro 細胞培養によって網膜保護を示す薬剤の網羅的スクリーニングを行い、さらに光硬化性樹脂を用いた徐放デバイス化を検討することを目的とした。本研究の徐放デバイスは眼球後方の強膜上に留置し、強膜を介して持続的に眼内に徐放する経強膜投与システムである。従来の点眼法に比べて、前眼部（角膜、結膜）への薬剤移行がほとんどないため、従来の点眼で見られるような副作用は小さいことが期待され、副作用で使用が難しかった薬剤を使用できる可能性がある。また持続性があるため、煩わしい点眼をする必要がなくなる。細胞培養によって CLT の薬理作用を評価し、網膜変性動物モデルを用いて経強膜投与デバイスの効果を検証し、臨床応用につなげることを目標としている。

３．研究方法

前年度の研究で、臨床薬として承認されている既存薬ライブラリー（1274 種）、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、ヒト網膜色素上皮細胞株（ARPE-19）の低栄養・虚血負荷培養に対する細胞保護薬のスクリーニングを行った結果、Clotrimazole（CLT）を発見した。将来的に CLT 徐放デバイスを網膜変性モデルラットへ移植する計画であるため、今回はラット網膜神経節細胞株（RGC-5）、およびラット網膜色素上皮細胞株（RPE-J）の低酸素培養（Oxygen

deprivation: OD）、低酸素低栄養培養（Oxygen-glucose deprivation: OGD、oxygen deprivation with low gluocse: ODD）に対する細胞保護効果を細胞増殖アッセイ（MTS 法）で確認することにした。各細胞を 2 日間培養後、CLT を含有する培地（D-MEM）で 24 時間培養し、その後、CLT を含む OD、ODD、OGD 負荷培地（D-MEM with high glucose, low glucose, no-glucose）で 24 時間低酸素培養を行い、MTS 法によって細胞数を評価した。また、培養後の細胞を回収し、ROS assay キット（CellROX reagents、Promega）を用いて ROS 産生量を測定した。また、細胞死関連シグナル（p38、MAPK、JNK、Caspase-3）のリン酸化を Western blot 法で評価した。また、既報の方法（*Biomaterials, 32, 1950-56, 2011*）で CLT の徐放デバイス化を検討した。徐放量は高速液体クロマトグラフィー（HPLC、Prominence、島津）で測定した。

４．結果

（１）細胞増殖アッセイ

結果を Fig.1 に示す。MTS 法は、生細胞によって還元された MTS 代謝物を吸光度測定することで細胞数を間接的に測定する方法である。負荷培養によって細胞数（MTS 吸光度）は減少したが、CLT を添加することで細胞数の減少が抑制された。この細胞保護効果は RGC-5 および RPE-J のいずれにおいても、CLT が 5μM から 50μM の間で Dose-dependent に認められた。また、OD、ODD、OGD のいずれの負荷条件でも同様の細胞保護効果を認めた。

（２）ROS assay

結果を Fig.2 に示す。負荷培養によって細胞内に産生される ROS を CellROX reagent で標識し、Image-based cytometer Tali システムで標識細胞を検出することで評価した。負荷培養を行っていない細胞をコントロールとして測定し、それよりも標識（蛍光強度）が強い細胞を ROS-positive と評価した。負荷培養によって約 40%の細胞が ROS-positive であったが、CLT の添加によって ROS-positive 細胞の割合は減少した。この ROS 産生抑制効果は CLT の Dose-dependent に抑制することがわかった。

（３）Western blot 法による細胞死関連シグナル発現の定量

結果を Fig.3 に示す。細胞死（アポトーシス）に関わる MAPK family（p38、MAPK、JNK）のリン酸化および Caspase-3 の活性体（cleaved caspase-3）を Western blot 法で測定した。Tubulin 抗体でリプローブし、各活性体の発現量を標準化した。負荷培養によって、各アポトーシス関連シグナルはいずれも増加していた。一方、CLT を添加すると、各発現量は CLT の Dose-dependent に低下する傾向を認めた。

（４）CLT 徐放デバイス化

結果を Fig.4 に示す。デバイスはリザーバー、薬剤、徐放膜の３つから構成される。今回は 2 種類の徐放膜を作製し、徐放制御性を検討した。コントロールとして徐放膜のないデバイスを作製した。デバイスをリン酸バッファーに浸漬し、定期的に回収して HPLC で CLT 放出量を定量した。コントロールでは最初の数日で薬剤の大量放出（バースト）を認めた。一方、徐放膜をしたデバイスでは、バーストがなく、常に一定の放出を認めた。

また、徐放膜の違いによって放出量が異なった。

５．考察

今回の研究で、ラット網膜細胞（RGC-5、RPE-J）に対する CLT の細胞保護作用を新たに見出した。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広く使われている。CLT は真菌細胞膜に直接作用して殺菌するほか、真菌細胞膜の構造・機能の維持に重要なエルゴステロールの合成を阻害することで抗菌活性を発揮する。今回の研究で得られた網膜細胞保護の作用機序はいまだ詳細が不明ではあるが、今回の結果から低酸素・低栄養負荷によって生じる ROS 産生の上昇を抑制し、その結果、細胞死に関わるシグナルカスケードを一部抑制することによって細胞を保護している可能性が示唆された。今後は各シグナルのインヒビターを添加して主要な細胞死抑制経路を検討し、CLT の網膜細胞保護メカニズムの検討を行う予定である。

CLT の徐放化では、既報のデバイス作成方法によって約 1 か月にわたる持続徐放が可能であった。また、カバー条件によって、徐放速度を制御できることがわかった。今後はラットの眼球上に移植し、網膜保護作用の検討を行う予定である。この経強膜投与法は網膜への局所性が高く、全身への移行が少ないと期待される。今回得た徐放制御によって、CLT の投与量を厳密に制御できれば、全身性の副作用を減らし、網膜に局所的に持続徐放できる可能性がある。すなわち、眼科分野では適用が難しかった CLT を今回の持続投与デバイス化によって新たな網膜保護薬として使用できる可能性がある。

６．結論

本研究では、各種化合物ライブラリーから網膜細胞保護薬として CLT を見出した。保護メカニズムとして ROS 産生の抑制と細胞死関連シグナルの抑制が示唆された。また、CLT の徐放デバイスを作製した。今後は、ラット網膜変性モデルへ CLT 徐放デバイスを移植し、In vivo での網膜保護効果およびメカニズムを検討する。

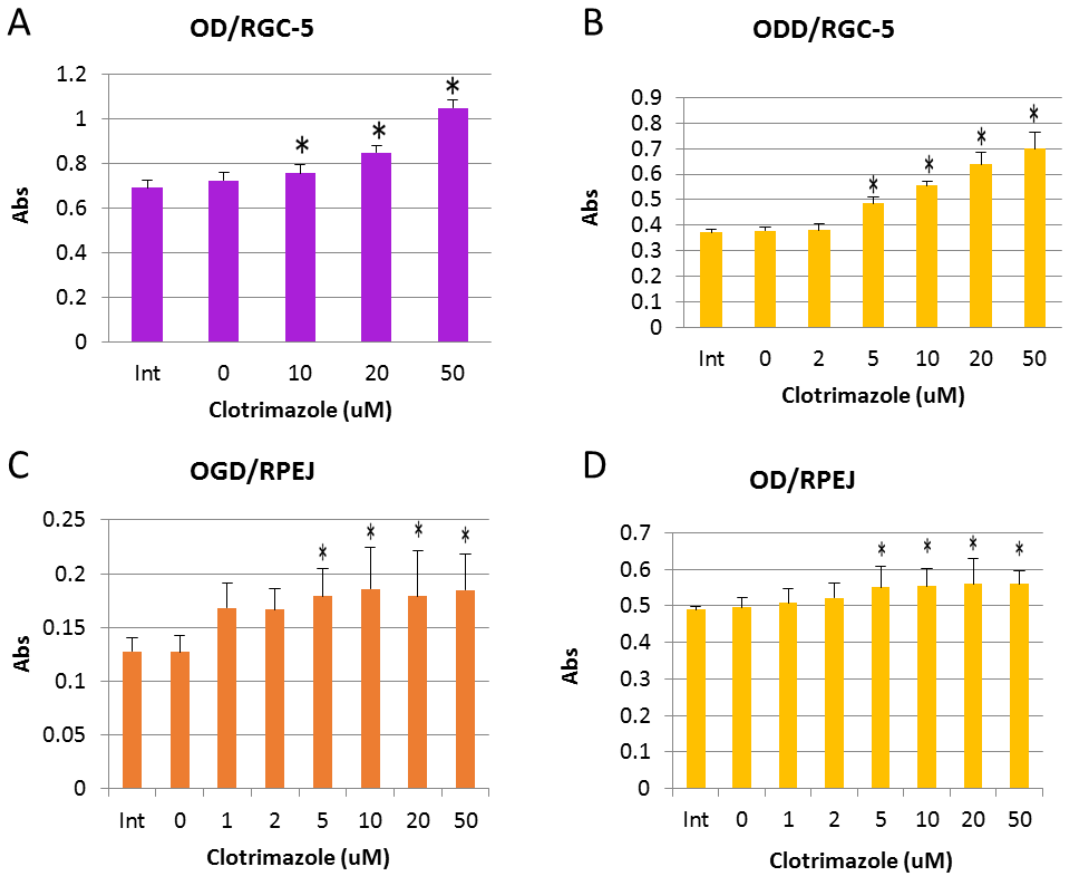


Figure 1. 細胞増殖アッセイの結果。（A）OD 負荷における CLT の RGC-5 細胞保護効果。（B）ODD 負荷における CLT の RGC-5 細胞保護効果。（C）OGD 負荷における CLT の RPE-J 細胞保護効果。（D）OD 負荷における CLT の RPE-J 細胞保護効果。CLT は 0.03% DMSO に溶解してから添加した。縦軸：MTS 吸光度（細胞数）。横軸：CLT 添加濃度。Int：CLT –／DMSO -。各実験は少なくとも 3 回実施し、再現性を確認した。アスタリスクは CLT 0 μM に対する unpaired t-test (P＜0.05)の結果。

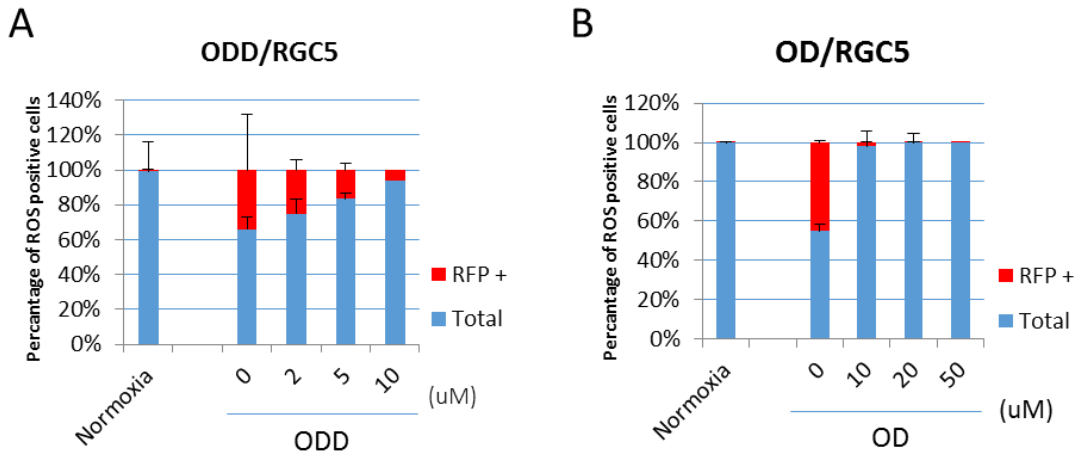


Figure 2. ROS アッセイの結果。（A）ODD 負荷における RGC-5 細胞の ROS-positive 細胞比率。（B）OD 負荷における RGC-5 細胞の ROS-positive 細胞比率。RFP+：ROS-positive 細胞比率。Total：ROS-negative 細胞比率。

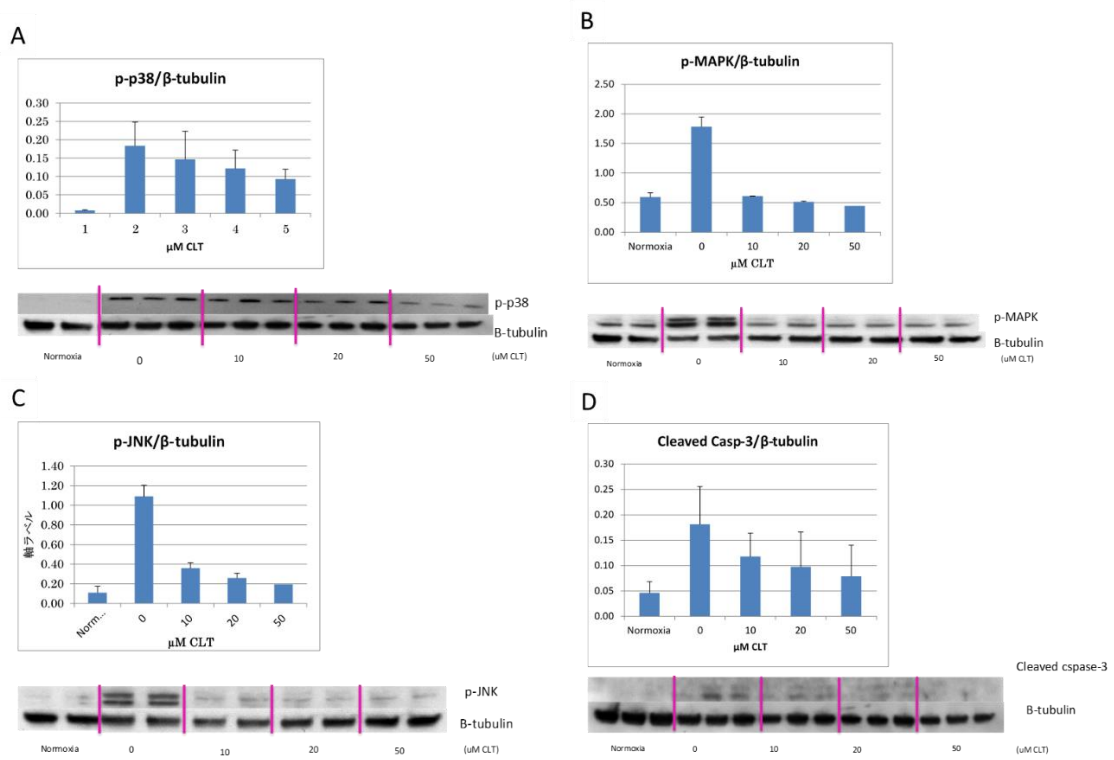


Figure 3. Western blot 法による細胞死関連シグナル発現の定量の結果。（A）OGD 負荷における RGC-5 細胞の p-38 リン酸化。（B）OGD 負荷における RGC-5 細胞の MAPK リン酸化。（C）OGD 負荷における RGC-5 細胞の JNK リン酸化。（D）OGD 負荷における RGC-5 細胞の Cleave caspase-3。各実験のタンパク質発現は Image-J を用いてバンド強度を定量し、β‐tubulin 発現量で標準化した。

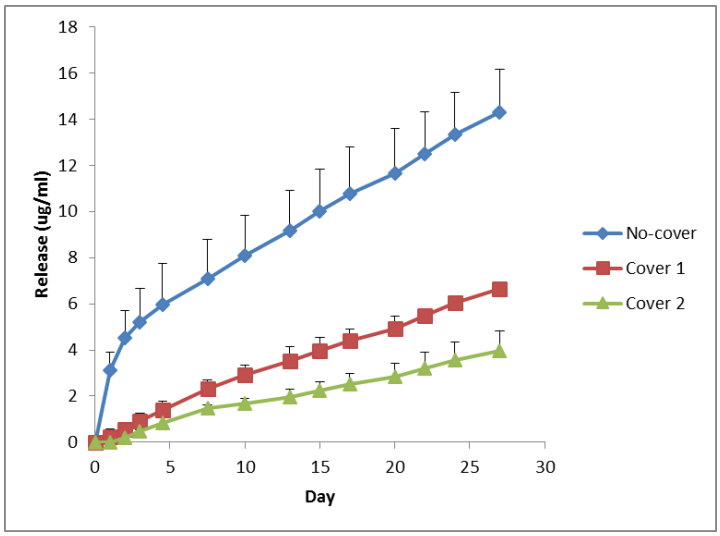


Figure 4. CLT 徐放デバイスからの CLT 放出量。デバイスを PBS に浸漬し、定期的に PBS を回収し、HPLC で CLT 濃度を測定した。

平成２４年度　障害者対策総合研究推進事業
（感覚器障害分野）

平成２５年３月　発行

発　行　　公益財団法人　日本障害者リハビリテーション協会
〒162-0052　東京都新宿区戸山１丁目 22 番１号
（戸山サンライズ内）
電　話　　(03) 5273-0601
ＦＡＸ　　(03) 5273-1523

印　刷　　株式会社　教文堂