

氏 名	出 垣 昌 子
(ふりがな)	(いでがき まさこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 24 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Effects of All-Trans Retinoic Acid Nanoparticles on Corneal Epithelial Wound Healing (オールトランスレチノイン酸ナノ粒子の角膜上皮 創傷治癒に対する効果)
論文審査委員	(主) 教授 上 田 晃 一 教授 森 脇 真 一 教授 朝 日 通 雄 教授 芝 山 雄 老

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《緒 言》

ビタミン A の生理活性本体であるオールトランスレチノイン酸 (以下 atRA) は、眼表面において角結膜上皮細胞の増殖や分化に不可欠な物質であり、その欠乏により角結膜には重度の乾燥、角化が起こることが知られている。また atRA は、角膜の創傷治癒を促進し、さまざまな角結膜疾患に対して有効な治療薬になりうる可能性が過去に報告されているが、酸化されやすく不安定であること、脂溶性であるために眼軟膏としての使用は可能であるが、刺激が強く、眼瞼炎などの副作用もあることなどから臨床応用は難しかった。このためより安全かつ安定した状態で使用できる atRA 製剤の開発が望まれてきた。以前に我々は、atRA の表面に炭酸カルシウム薄膜を形成したナノカプセル化製剤 NANOEGG®-atRA を開発し、皮膚のシミ・シワ治療において従来の atRA 軟膏よりも安

定性が良いこと、上皮細胞により浸透することを報告した。今回、NANOEGG®-atRA が従来の atRA 製剤と比較して刺激が少なく、両親媒性であることから、点眼剤として使用できる可能性に着目した。本論文では、点眼投与した NANOEGG®-atRA 溶液の角膜上皮創傷治癒に対する効果を *in vivo* 及び *in vitro* で検討している。

《方 法》

白色家ウサギの片眼角膜中央に直径 6mm の円形の角膜上皮剥離を作製し、NANOEGG®-atRA 溶液あるいは対照液 50 μ l を剥離直後より 2 時間毎に 3 回点眼し、(1) 角膜上皮欠損面積の変化、(2) 再生した角膜上皮のバリア機能、(3) 再生した角膜上皮の組織学的検査、について検討し、角膜上皮創傷治癒効果を評価した。

(1) 0.05%、0.5%、1.0%、5.0% (各々 1.7、17、33、170mM) の NANOEGG®-atRA 溶液、あるいは対照として生理食塩水と atRA を含まない NANOEGG カプセル溶液を点眼し、フルオレセインで染色された角膜上皮欠損部を経時的に写真撮影し面積の変化について評価した。次に、上皮修復において最も効果があった 33mM NANOEGG®-atRA 溶液と 0.1%ヒアルロン酸ナトリウム (以下 HA) 溶液についても同様の比較検討を行った。

(2) 33mM NANOEGG®-atRA 溶液、生理食塩水、0.1%HA 点眼処置眼に対して、角膜上皮剥離 48 時間後に上皮が再生したことが確認した後、散瞳剤であるトロピカミドを 5 分毎に 2 回点眼し、30 分後の瞳孔径を測定した。トロピカミドは、角膜上皮のバリア機能が完全に修復されていない場合のみ点眼後に散瞳が確認できるように、正常角膜の家兎眼に点眼しても散瞳作用が出ない最大濃度を予備実験で確認し、 4.0×10^{-6} %に希釈して使用した。

(3) 33mM NANOEGG®-atRA 溶液、生理食塩水点眼処置眼に対して、角膜上皮剥離 48 時間後にフルオレセイン染色がされないことを確認し、眼球摘出後、H&E 染色、抗サイトケラチン 3/12 抗体免疫染色を行い観察した。

次に、継代培養した SV40-adenovirus 組換えベクターによる不死化ヒト角膜上皮細胞株 (以下 HCE-T) を用いて、NANOEGG®-atRA の効果を *in vitro* で検討した。

(4) HCE-T 2×10^5 cells/well を 6 well plate に播種後、ほぼ集密的な状態になるまで培養し、無血清培地に一晚静置した後に 200 μ l マイクロピペットチップを用いて線状の擦過を行った。各 well の培地を 330pM から 33 μ M の NANOEGG[®]-atRA あるいは対照液含有無血清培地と交換し、6 時間毎に顕微鏡撮影を行い、各薬剤濃度における擦過した無細胞領域の最大幅の変化を比較検討した。

(5) HCE-T 2×10^5 cells/well を、96 well plate に播種し 24 時間培養後、無血清培地に一晚静置し、各 well の培地を 330pM から 33 μ M の NANOEGG[®]-atRA あるいは対照液含有培地と交換し、24 時間培養後に生存細胞数と、細胞毒性を調べるために WST-8 アッセイと LDH アッセイを行った。

《結果と考察》

角膜上皮剥離 24 時間後において、上皮欠損面積は NANOEGG[®]-atRA 投与群で濃度依存性に改善傾向があり、特に 33mM NANOEGG[®]-atRA 溶液は対照、0.1%HA と比較して有意に改善していた。また、atRA を含まない NANOEGG カプセルのみでは創傷治癒促進効果は見られなかったことより、NANOEGG[®]-atRA が *in vivo* において、角膜上皮創傷治癒を促進していると考えられた。

次に、組織検討では 33mM NANOEGG[®]-atRA 投与群、対照ともに角膜実質は再生上皮で覆われていたが、NANOEGG[®]-atRA 投与群の方が角膜上皮の重層化が進んでいた。両群とも再生された角膜上皮は抗サイトケラチン 3/12 抗体免疫染色陽性であった。また、トロピカミド点眼投与前後での瞳孔径の変化は 33mM NANOEGG[®]-atRA 投与時は $107 \pm 0.3\%$ で、対照 $129 \pm 0.8\%$ 、0.1%HA $126 \pm 8.3\%$ のいずれと比較しても有意に抑制されていた。これらより、NANOEGG[®]-atRA は角膜上皮バリア機能を早期に修復している可能性があると考えられた。

HCE-T を用いた検討では、擦過 24 時間後の無細胞領域は 3.3nM と 33nM NANOEGG[®]-atRA 含有培地において対照と比較して有意に縮小していたが、HCE-T の増殖は NANOEGG[®]-atRA 存在下では促進せず、むしろ 33 μ M NANOEGG[®]-atRA 下では抑

制されていた。また、 $33\mu\text{M}$ NANOEGG®-atRA 下ではコントロールと比較して有意に細胞毒性が示されたが、それよりも低濃度では有意差はなかった。

角膜上皮細胞の移動・伸展および増殖は角膜創傷治癒に重要である。atRA は培養角膜上皮の分化を誘導するが、増殖は抑制するとの報告がある。我々の *in vitro* の結果では NANOEGG®-atRA は創傷治癒を早期に促したが、細胞増殖は抑制していた。種の違いを考慮する必要があるが、NANOEGG®-atRA は細胞の移動・伸展を促すことで角膜上皮の早期創傷治癒を促進したのではないかと考えられた。

以上により、NANOEGG®-atRA は角膜上皮創傷治癒を促進し、角膜上皮創傷治癒に有用な薬剤になり得るが、その機序については今後さらに研究が必要であると考えられた。

(様式 甲6)

論文審査結果の要旨

申請者は、オールトランスレチノイン酸(atRA)のナノカプセル化製剤 NANOEGG®-atRA が従来の atRA 製剤と比較して安定性がよく、刺激が少なく、両親媒性であるという特性から点眼剤として使用できる可能性があることに着目し、本剤の角膜上皮創傷治癒に対する効果を検討している。

白色家兎を用いて行った点眼試験では、角膜中央に作製した上皮糜爛に対する NANOEGG®-atRA、生理食塩水、および従来から角膜上皮障害の治療薬として臨床使用されている 0.1%ヒアルロン酸ナトリウム点眼液の効果を比較し、33mM NANOEGG®-atRA 溶液の点眼により、角膜上皮が早期に再生されることを示している。また本剤で再生した角膜上皮は重層化しており、抗サイトケラチン 3/12 抗体免疫染色陽性の正常な上皮形態であることを組織学的に示し、かつ上皮バリア機能も早期に修復していることをトロピカミド点眼試験で確認している。

次に、不死化ヒト角膜上皮細胞株 HCE-T をマイクロプレート内で培養し、底部を擦過して作製した無細胞領域が、NANOEGG®-atRA 添加培地内では早期に修復されることを確認している。また、WST-8 法では NANOEGG®-atRA による HCE-T の細胞増殖促進は確認できず、このことは、NANOEGG®-atRA の角膜上皮修復作用が上皮細胞の増殖促進ではなく移動・伸展を促すためであることを示している。

本研究は NANOEGG®-atRA によって、従来眼科領域において臨床応用が困難とされていた atRA を点眼薬として応用できることを示したものであり、今後、難治性角膜障害等の眼疾患に対する新たな治療薬の開発につながる可能性がある。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 2012

in press