

緑内障治療薬の探索ならびに防腐剤フリー点眼薬の
薬理学的研究

葛 西 洋 芳

目次	ページ
序論	1
第1章 ブタ由来線維柱帯細胞を用いた3次元コラーゲンゲル培養方法の 開発と緑内障治療薬の探索研究	7
第1節 緒言	
第2節 実験材料と方法	
第3節 実験結果	
第4節 考察	
第2章 ウサギ正常眼圧および網膜神経節細胞障害に対する cyclin 依存性 kinase 薬の roscovitine の薬理学的研究	31
第1節 緒言	
第2節 実験材料と方法	
第3節 実験結果	
第4節 考察	
第3章 ベンザルコニウム塩化物フリーラタノプロストを用いたウサギ およびヒトの正常眼圧に対する有効性と安全性に関する薬理学的研究	43
第1節 緒言	
第2節 実験材料と方法	
第3節 実験結果	
第4節 考察	
総括および結論	59
謝辞	62
引用文献	64
略語一覧表	83

序論

人間は、まず眼で外界の光の刺激を感じ、神経によって脳に情報を送り込み、脳で何色なのか、どんな形なのかを瞬時に判断するが、その経路は以下の通りである (Fig. 1)。その他にも、眼球は屈折と調節、眼球運動、両眼視などの視機能を担っている。

(入射) 光 → 角膜 → 眼房水 → 虹彩／瞳孔 → 水晶体 → 硝子体 → 網膜 (視細胞→水平細胞→双極細胞→アマクリン細胞→神経節細胞) → 視神経乳頭 → 視神経 → 脳

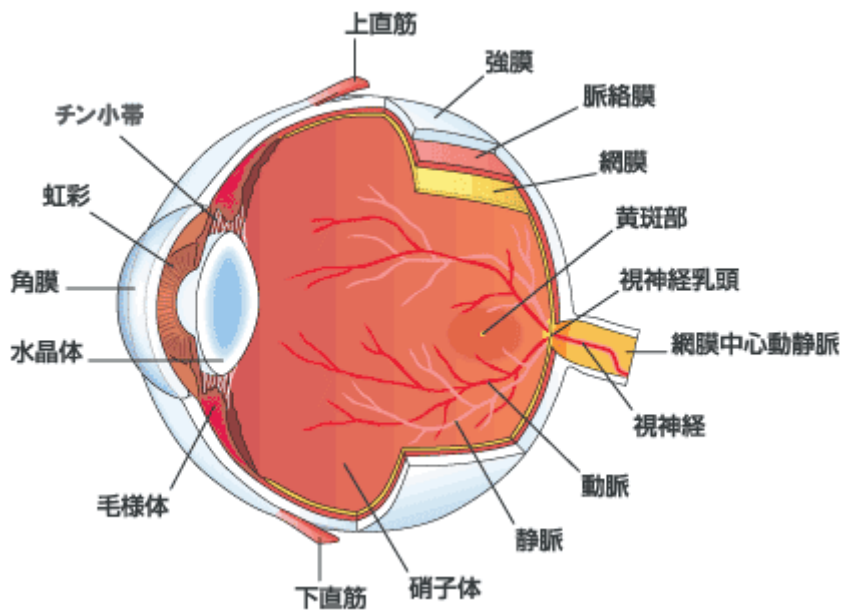


Fig. 1 眼の解剖図

<http://www.kinshi-lasik-clinic.jp/book/eye.html> より引用

人間は年齢を重ねる、すなわち加齢に伴い体の各組織・器官の機能が低下し病気に罹患する。眼球も同様に加齢に伴い変化を来し、病気に罹患する。代表的な疾患として老眼、白内障、緑内障、加齢黄斑変性症、網膜色素変性症などがある。

厚生労働省研究班の調査によると、緑内障は我が国における失明原因の第1位を占めており、日本において医学的、経済的、社会的に大きな問題として捉えられている。日本緑内障学会のガイドライン（第三版）によると、「視神経と視野に特徴的变化を有し、通常、眼圧を十分に下降させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患である。」と定義されている。同学会主導による大規模な調査（多治見スタディ）によれば、40歳以上の日本人における緑内障有病率は、5.0%であることが明らかとなった。すなわち、40歳以上の日本人には、20人に1人の割合で緑内障の患者がいることになる。また緑内障の有病率は、前述の通り加齢とともに増加していくことが明らかであり、日本の少子高齢化に伴って、今後ますます患者の数は増加することが予想される。しかも前述の調査で緑内障と診断された患者のうち、過去に緑内障と診断されていた数は、全体の1割に過ぎなかった。つまり、緑内障に罹患しているにも関わらず、これに気づかずに日常生活を過ごしている人が大勢いることも明らかとなった。最近の緑内障の診断と治療の進歩は目覚しく、以前のような「緑内障＝失明」という概念は古くなりつつある。現代医学を駆使しても失明から救えない極めて難治性の緑内障が存在することも事実だが、一般に早期発見・早期治療によって失明という危険性を少しでも減らすことが出来る病気の一つであることは間違いない。

緑内障は眼圧上昇により視神経が慢性的に圧迫されることで、視神経障害（緑内障性視神経陥凹）を生じ、放置すれば視野欠損を生じ、重症例では失明す

る可能性のある疾病である。すなわち緑内障とは視神経の病気であり、その自覚症状は視野が欠けて視野狭窄に至る。この場合は原発開放隅角緑内障 (Primary Open-Angle Glaucoma ; POAG) に分類される。ごく一部の患者では急激に眼圧が上昇し、一時的に吐き気や頭痛、眼の痛み、目の霞を自覚する原発閉塞隅角緑内障 (Primary Angle-Closure Glaucoma ; PACG) を罹患する場合もある。また、前述の多治見スタディによれば、眼圧が正常にも関わらず、視神経障害の異常が見られる正常眼圧緑内障 (Normal Tension Glaucoma : NTG) の患者が多い事も明らかとなった。その他にも先天的、後天的に誘発される緑内障も散見されている。

前述の多治見スタディによれば、日本人の平均眼圧は 14.5 mmHg であり、ばらつきの程度 (標準偏差が 2.5 mmHg) を考慮すると、正常の眼圧は 10~20 mmHg である。また眼圧は、1 日の間でも時刻により変動する上に、どの時期に眼圧が高くなるのかというパターンには、個人差が大きい。さらに日本では、眼圧は冬季に高く、夏季には低くなりやすい。日常生活において眼圧に影響する因子としては、年齢、性別、屈折 (近視や遠視の程度)、人種、体位、運動、血圧なども明らかである。このように多くの因子が複雑に影響しあい、眼圧が決定されている。

房水の産生量と流出量のバランスが眼圧を規定する調節機能の一つを担っている。房水は毛様体で産生され、虹彩後部を経て前房に流れ、線維柱帯を経てシュレム管もしくはぶどう膜強膜から排出され、眼外の血管へ流れていくという定まった経路で循環している (Fig. 2)。房水の産生が促進される、もしくは流出が阻害され、バランスが破綻すれば、眼圧上昇に至る可能性が高い。そのため、緑内障の治療としては、薬物療法、レーザー療法、手術療法などが行わ

れているが、第一目標として眼圧を下げることで緑内障の悪化を防ぐことができるとされている。

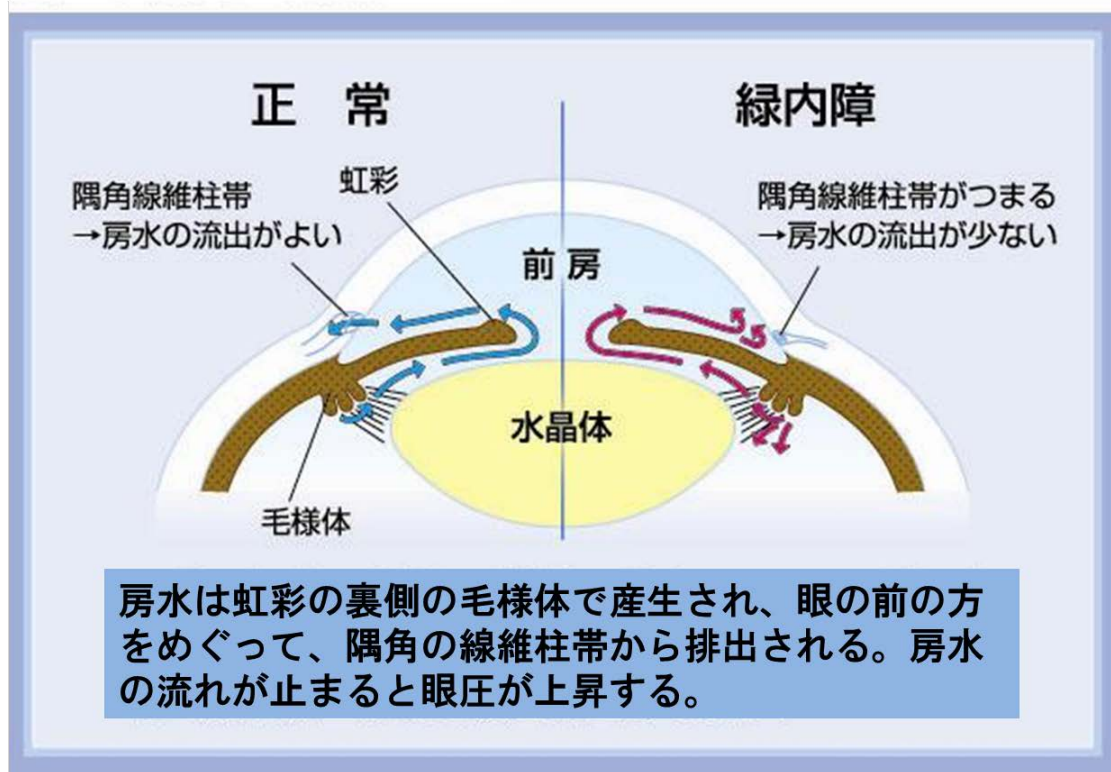


Fig. 2 房水の流れ

<http://www.hayashi.or.jp/disease/detail/c/2/i/72/>から改変引用

薬物療法に目を向けると、日本では多数の緑内障治療薬が今日臨床の現場で使用されている (Fig. 3)。

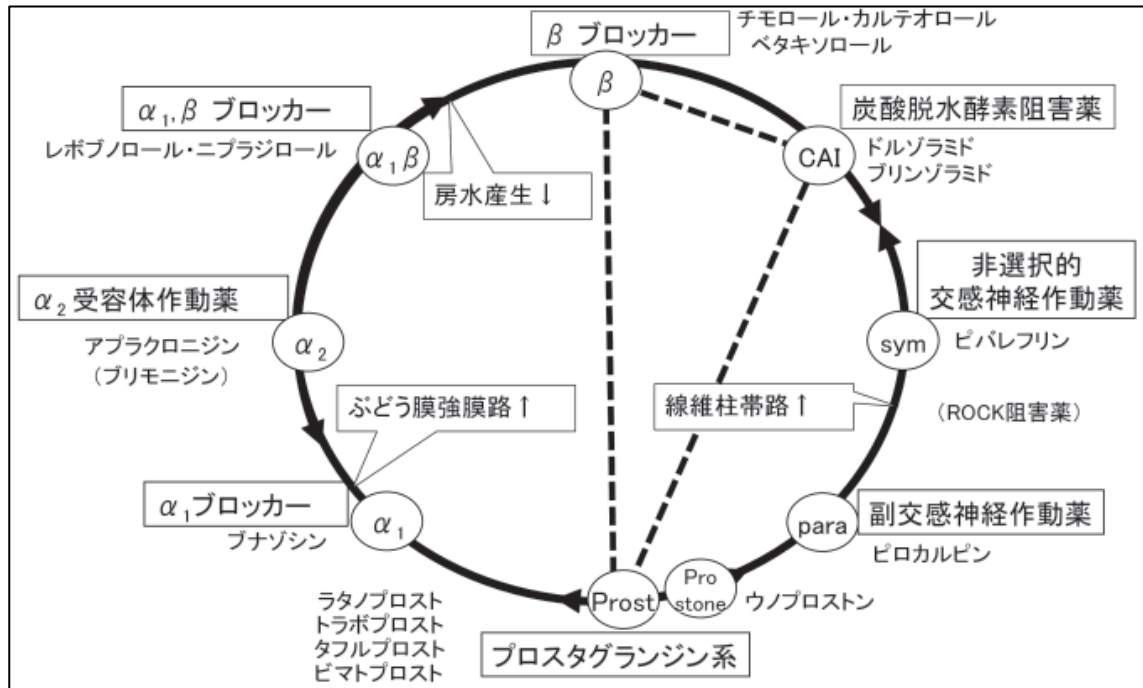


Fig. 3 現在の点眼による眼圧下降薬

房水産生を抑制する代表的な薬剤として、交感神経β遮断薬、交感神経α₂遮断薬、炭酸脱水酵素阻害薬、ぶどう膜強膜経路からの房水流出を促進させる代表的な薬剤としてプロスタグランジン関連薬に分類される。主経路からの房水流出を促進させる薬剤は現在のところピロカルピンとウノプロストンしかない。

日本の眼科薬市場は現在 2600 億円程度になっており、高齢化社会のせいもあり年々成長している。このうち緑内障治療薬が 940 億円程度で、3 割を占有している。今後の市場予測より緑内障治療薬は成長することが明らかであり、また臨床現場から見ても新しい治療薬の開発、販売が望まれている。緑内障治療薬は単剤の他に他剤との併用で使われる場合が多いため、Fig. 3 で示した緑内障治療薬と異なる作用機序の薬剤の開発が今後の製薬企業で求められている。

その一方で、一旦緑内障を罹患すると慢性疾患のため、眼圧を制御するため治療を続けなければならない。しかしながら、長期間の緑内障治療薬の点眼により、眼局所における副作用が問題となる場合がある。その要因の一つとして、主薬の他に配合される防腐剤がある。防腐剤は点眼液の製剤設計にあたっては必要な添加物であるが、前述の通り副作用発症の要因であり、多数の *in vitro* および *in vivo* の研究成果が報告されている。

本研究では、(1) 新しい作用機序を有する緑内障治療薬、特に主経路からの房水流出経路と線維柱帯の収縮弛緩に着目して、ブタ由来線維柱帯細胞を用いた3次元コラーゲンゲル培養方法を確立し、多種多様の薬剤を *in vitro* で簡便かつ探索的に検討した。(2) つぎに探索検討で得た薬剤の中より、*roscovitine* に着目して、動物を用いた眼圧下降作用を検討した。(3) 一方、緑内障治療薬が長期に使用されるため、副作用を軽減し眼に優しい製剤設計をする上で主薬とともに配合される防腐剤について着目し、防腐剤を含まない製剤設計の元、フィルター付の点眼容器を開発し、防腐剤を含む緑内障治療薬との比較を薬理的に検討した。

第1章 ブタ由来線維柱帯細胞を用いた3次元コラーゲンゲル培養方法の開発と 緑内障治療薬の探索研究

第1節 緒言

緑内障は、自覚症状がなく視力が徐々に低下し、失明に至る危険性の高い眼における慢性疾患の一つであり、全世界で 7,000 万人以上が罹患している (Quigley, 1996)。緑内障発症の原因の一つは眼球内圧 (眼圧) が亢進することであり、眼底部にある視神経が物理的障害を受けて、視力が低下する。眼圧が 1 mmHg 高まれば、緑内障の進行が 10-19% 高まると言われている (Chauhan et al., 2008)。そのため、眼圧を下げることが緑内障治療の第一選択肢となる。

眼圧は、房水の産生率と流出率のバランスそして眼灌流圧で恒常的に維持されている。房水は眼内へ栄養素を運搬し、あるいは老廃物を排除しやすくするための毛様体より産生され、後房を経て前房へ流入し、眼外へ流出される。房水の流出系は 2 つ存在し、線維柱帯-シュレム管を介した主経路およびぶどう膜強膜を介した副経路が存在する。ヒトや脊椎動物では、房水の 80-90% は主経路を介して眼外へ排出される。

線維柱帯は幾つかのユニークな特徴を持っている。すなわち、(1) 細胞外マトリックス (I 型、III 型、IV 型、V 型、VI 型のコラーゲン) や糖タンパク質 (ラミニンやフィブロネクチン) の生合成や分泌機能を有する (Yun et al., 1989)、(2) マトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase : MMP) ファミリー (MMP-1、2、3、9) や MMP 阻害タンパク質 (tissue inhibitor of metalloproteinase : TIMP-1) を産生する (Alexander et al., 1991)、(3) マクロファージのようなファゴサイトーシス (Rohen et al., 1975) や平滑筋細胞の機能特性 (Coroneo et al., 1991) を有する事が報告されている。

前述の通り、眼圧は房水の産生量と流出量のバランスで制御されており、線維柱帯細胞の収縮弛緩の変化でこのバランスが調節されている。仮に房水流出量が減少すれば、眼圧は徐々に高まり、緑内障の発症危険率が高まる。現在国内外で販売されている殆どの薬剤は房水産生量を抑制するか、あるいはぶどう膜強膜流出量を促進させる薬理作用を有し、単独もしくは併用で使用されているが治療的満足度は決して高くはない。また、主経路の房水流出量を促進させる薬剤はピロカルピンやイソプロピルウノプロストンが使用されているに過ぎない。そのため、異なる作用機序を有する薬剤の早期開発が望まれている。

細胞骨格調節薬である ethacrynic acid (Wiederholt et al., 1997; Gills et al., 1998)、cytochalasin B もしくは cytochalasin D (Johnstone et al., 1980; Johnson et al., 1997)、latrunculin-A もしくは B (Liu et al., 2003) の他に、細胞内シグナル調節薬である H-7 (Tian et al., 1998)、Y-27632 (Honjo et al., 2001)、ML-9 (Honjo et al., 2002) のような各種キナーゼ阻害薬が細胞骨格を変化させることが報告されている。これら調節薬が房水流出量を促進し、眼圧下降させることがサルやウサギを用いた研究成果で明らかとなっている (Tian et al., 1998; Wiederholt et al., 1998)。したがって、細胞間収縮の調節に関する研究が房水の流出促進薬の創薬に繋がると考えられる。

細胞間収縮能を評価する方法として、3次元コラーゲンゲル培養法が広く普及している (Finesmith et al., 1990)。本法は簡易的に *in vitro* で細胞間収縮能を評価することが可能であり、線維芽細胞を用いた多数の研究報告がなされている。すなわち、線維芽細胞が (1) 結合組織由来の細胞外マトリックスの産生源である事、(2) 皮膚 (Finesmith et al., 1990)、肝臓 (Thimgan et al., 1999)、心臓 (Eschenhagen et al., 1997)、平滑筋 (Yamamoto et al., 1996) の創傷治癒、線維化促進に寄与している。さらに、角膜の実質細胞 (Mishima et al., 1998)、テノン嚢由

来の線維芽細胞 (Porter et al., 1998)、網膜色素細胞 (Raymond et al., 1990)、硝子体のヒアロサイト (Hirayama et al., 2004)、線維柱帯細胞 (Nakamura et al., 2002) を用いた研究でも 3 次元コラーゲンゲル培養法は利用されている。ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum : FBS) (Borderie et al., 1999) や形質転換増殖因子 (transforming growth factor : TGF) - β_1 、上皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor : EGF)、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor : PDGF) - BB、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF)、fibronectin および vitronectin といった多種の成長因子がコラーゲンゲル収縮を促進する (Assouline et al., 1992; Nakamura et al., 2003)。TGF- β_1 が Rho-associated protein kinase (Rho-associated kinase : ROCK) や myosin light chain kinase (MLCK) を活性化し、ウシ由来線維柱帯細胞間の収縮をコラーゲンゲル培養法にて評価出来る事を報告している (Nakamura et al., 2002)。さらには、細胞内シグナルに関わる因子がミオシン-アクチンによる収縮弛緩システムや細胞の進展や運動に寄与する事を示唆している。

本章では、ブタ由来の線維柱帯細胞を用いた 3 次元コラーゲンゲル培養法を使って、多種多様の薬剤によるコラーゲンゲル収縮抑制を評価し、この収縮抑制作用が細胞障害に起因しているか検討した。すなわち、細胞障害 (副作用) の少ない収縮抑制作用 (主作用) を有する化合物の探索を行うことを目的とした。

第2節 実験材料および方法

2-1 材料

ダルベッコ改変培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium : DMEM)、アンホテリシン B、組み換えヒト由来の PDGF-BB、組み換えヒト由来の TGF- β_1 、ホルボ

ールミリスチレートアセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate : PMA)、roscovitine、tyrphostin (AG879、AG82、AG490、AG494、AG527、AG555、AG1296)、パパペリン塩酸塩、H-7、ビスインドールマレイミド (bisindolylmaleimide : BIM) I、chelerythrine chloride、ML-9、thapsigargin、LY294002、ouabain、BQ-123、BQ-788、N⁶-cyclohexyladenosine、metrifudil、N⁶-(2-amino-phenyl)ethyladenosine、CGS15943 および resazurin は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。Y-27632 は、Calbiochem Novabiochem (San Diego, CA, USA) から購入した。CP-55,940 は、Tocris Cookson (Bristol, UK) から購入した。FBS は、三光純薬株式会社 (現在、エーディア株式会社に改称) (Tokyo, Japan) より購入した。カナマイシン硫酸塩と cell dissociation buffer は、Invitrogen (Carlsbad, California, USA) から購入した。15-Deoxy prostaglandin J₂ は、BIOMOL (現在、Enzo Life Sciences に改称) (Plymouth Meeting, PA, USA) より購入した。1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)-acetyl LDL は、Biomedical Technologies (Stoughton, MA, USA) より購入した。N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride (W-7)、ethacrynic acid、itrendipine、sodium pravastatin、simvastatin、genistein、Hoechst 33258、クリスタルバイオレット、resazurin および 4%パラホルムアルデヒド溶液は、和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。Cellmatrix (ブタ腱由来酸可溶性の I 型コラーゲン) は、新田ゼラチン株式会社 (Yamagata, Japan) より購入した。ハンクス緩衝液 (Hank's Balanced Salt Solution : HBSS) は、日水製薬株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。ブタ眼球は、北海道畜産公社 (Hokkaido, Japan) より購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 ブタ眼から摘出した線維柱帯組織の器官培養と線維柱帯細胞の初代培養

ブタ眼球を赤道部に沿って半割後、前眼部から線維柱帯組織を切除した。同組織をハサミで数 mm 程度に細切後 6 ウェルのセルカルチャープレートに置き、10%の FBS、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のカナマイシン硫酸塩、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンホテリシン B を含む DMEM 培地の中で 37°C、95% 空気-5% 炭酸ガス、100% 湿度の条件下で器官培養した。培養開始してから数日後、同組織より線維柱帯由来の細胞 (porcine trabecular meshwork cells : pTM) が外生し、80-100% 程度のコンフルエントに達したら、cell dissociation buffer にて pTM をセルカルチャープレートから剥離させ、225 cm^2 のカルチャーフラスコで継代し続けた。今回の実験では、2~3 代の継代条件で得た pTM を使用した。pTM は、光学顕微鏡下による細胞形状と DiI-acetyl LDL による LDL 受容体の結合を蛍光顕微鏡下で確認、同定した。

2-2-2 ブタ線維柱帯由来細胞の確認と同定

pTM を 5.0×10^3 個/ウェルで 96 穴カルチャープレートに播種後、10% FBS と 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む DMEM の中で 37°C (95% 空気-5% 炭酸ガス、100% 湿度の条件下)、一晩培養した。DMEM を除去し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の蛍光色素 DiI で標識された Ac-LDL を含む DMEM で 5 時間、前述の条件下で培養した。培養後、pTM を HBSS で 2 度洗浄した。200 μM の Hoechst 33258 を含む DMEM で 5 分間、前述の条件下で再培養した。続けて、pTM を HBSS で 2 度洗浄し、4% のパラホルムアルデヒド溶液を使って室温下で固定した。DiI と Hoechst 33258 の両プローブをオリンパス株式会社製の蛍光顕微鏡 (Tokyo, Japan) で観察した。DiI による蛍光は励起波長 550 nm、蛍光波長 565 nm、Hoechst 33258 による蛍光は励起波

長 365 nm、蛍光波長 465 nm で確認した。

2-2-2 ブタ線維柱帯由来細胞を用いたコラーゲングル培養法と各種薬剤の収縮抑制効果

ブタ腱由来の I 型コラーゲンと pTM を低温下で混合 (1×10^5 個/mL) し、24 ウェルのセルカルチャープレートに 500 μ L ずつ播種し、37°C (95% 空気-5% 炭酸ガス、100% 湿度の条件下)、1 時間培養しゲル化させた。ゲル化させたコラーゲン層に 0.5% もしくは 2% の FBS 入り DMEM で 10^{-8} - 10^{-5} M に調製した各種薬剤を重層し、マイクロスパチュラ等を使ってカルチャーウェルに固着していたコラーゲングルを外して浮遊させた。浮遊させることで、培養時間に依存して FBS によるコラーゲングルの収縮が培養中に見られるようになる。37°C (5% 炭酸ガス、100% 湿度の条件下)、48 時間共培養後、DMEM を取り除き、収縮したコラーゲングルを 0.1% クリスタルバイオレット染色液で染色し、染色されたコラーゲングルを撮影し、NIH image1.6.2 で染色された面積を数値化し、各種薬剤によるコラーゲングルの収縮に対する抑制率を算出した。

2-2-3 コラーゲングル培養後の細胞毒性の評価

pTM を 5.0×10^3 個/ウェルで 96 ウェルのセルカルチャープレートに播種後、DMEM の中で 37°C (95% 空気-5% 炭酸ガス、100% 湿度の条件下)、一晚培養した。培養後 DMEM を取り除き、0.5% の FBS 入り DMEM で 10^{-8} - 10^{-5} M に調製した各種薬剤を同プレートに添加し、さらに 48 時間培養した。あらかじめ調製していた 20 μ M レサズリンを含む DMEM に置き換えて、2 時間インキュベート後、蛍光強度 (励起波長 560 nm、蛍光波長 590 nm) を蛍光測定用プレートリーダー (GEMINI EM) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) し、この蛍光強度を細胞

生存の指標として細胞障害率を算出した。

2-2-4 データの取扱いと統計学的解析

各種薬剤のコラーゲンゲルの収縮に対する 50%抑制率 (ID_{50}) および 50%細胞障害率 (LD_{50}) を各々算出し、3つのカテゴリーに分類した。すなわち、(1) 細胞毒性を示さず、各種薬剤がコラーゲンゲルの収縮を抑制した場合、(2) LD_{50} 値が $10.0 \mu\text{M}$ 以上であり、かつコラーゲンゲルの収縮を抑制した場合、(3) LD_{50} 値が $10.0 \mu\text{M}$ 以下であり、かつコラーゲンゲルの収縮を抑制した場合に分類した。

今回のデータはいずれも Student's の t -検定を行い、危険率 5%、1%、0.5% 水準で有意差ありと判定した。

第3節 実験結果

3-1 ブタ線維柱帯由来細胞の確認と同定

ブタ眼から摘出した線維柱帯組織の器官培養により遊走してきた細胞が線維柱帯細胞か否か、形態学的そして特定タンパクの発現を指標に確認した。外生してきた細胞は顕微鏡下、紡錘状の形状を示していた (Fig. 4A)。Hoechst 33258 により核は緑色蛍光で観察された (Fig. 4B)。pTM に LDL 受容体が発現しているか、DiI で標識された Ac-LDL を用いた結合実験を行った所、赤色の蛍光で検出された (Fig. 4C)。Fig. 4B と Fig. 4C の観察結果より、確かに培養で得られた細胞が pTM であることを確認出来た (Fig. 4D)。以下、この方法で得た pTM を用いて各種実験を行った。

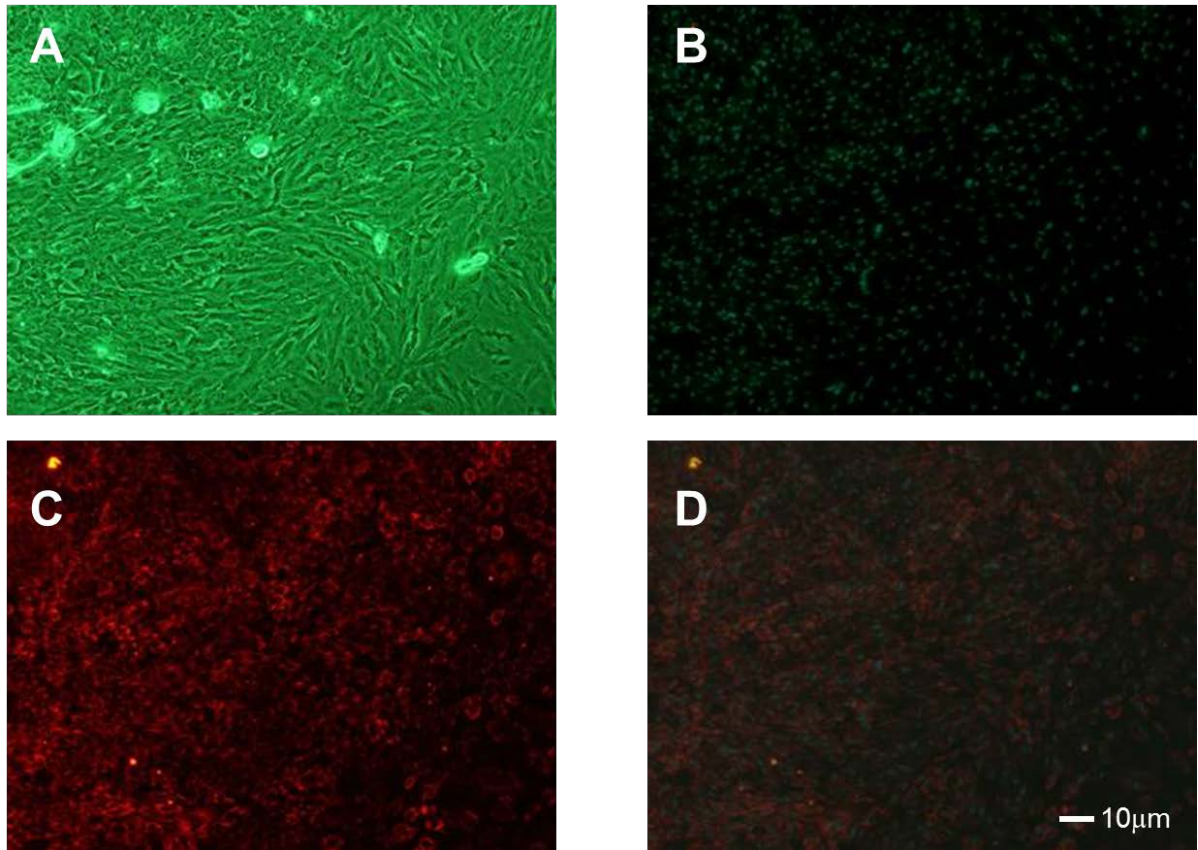


Fig. 4 Identification of Porcine Trabecular Meshwork Cells (pTM) by detection of acetyl Low Density Lipoprotein (LDL) receptors and nuclei ; pTM were cultured in multi-plate wells.

A showed spindle shapes by phase microscopy. B and C showed fluorescence micrographs of nuclei and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-*indocarbocyanine perchlorate* DiI-labeled LDL, respectively. D merged image of both fluorescence pictures.

3-2 ブタ線維柱帯由来細胞を用いたコラーゲンゲル培養法と各種薬剤の収縮抑制効果

各種薬剤によるコラーゲンゲル収縮抑制作用を検討する前に、コラーゲンゲルに包埋した線維柱帯細胞の FBS による収縮作用を確認し、使用する FBS の至適濃度を決定した。FBS 未添加の場合、コラーゲンゲル収縮作用が全く認められなかった (Fig. 5A と 5B)。一方、FBS を添加すると、濃度依存的なコラーゲンゲル収縮が認められた (Fig. 5A と 5B)。FBS と同様に、PDGF-BB を添加すると、濃度依存的なコラーゲンゲル収縮が認められた (Fig. 5A と 5B)。今回データは示していないが、TGF- β_1 や protein kinase C 活性化薬である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) も同様の作用が認められた。以下の実験では FBS 添加条件で行った。

0.5%の FBS 存在下 10^{-7} - 10^{-5} M の種々の protein kinase 阻害薬を使用して検討したところ、 10^{-6} - 10^{-5} M の範囲でコラーゲンゲル収縮を抑制した。しかしながら、2%の FBS 存在下では、この抑制作用が減弱した。例えば、ROCK 阻害薬の Y-27632 は 10^{-5} M でコラーゲンゲル収縮を抑制し、細胞毒性は認められなかった

(Fig. 6A)。Cyclin 依存性 kinase 阻害薬の roscovitine (Fig. 6B) や tyrosine kinase 阻害薬の tyrphostin AG879 (Fig. 6C) も Y-27632 と同様に細胞に対して毒性を示さず、コラーゲンゲル収縮を抑制した。PI3-K 阻害薬の wortmannin (Fig. 6D) および PKC 阻害薬の chelerythrine chloride もコラーゲンゲル収縮を抑制したが、細胞毒性を示した (Fig. 6E)。データは示していないが、MLCK 阻害薬の ML-9 や Ca^{2+} -calmodulin 依存性ホスホジエステラーゼ阻害薬の W-7 の protein kinase 阻害薬はコラーゲンゲル収縮を抑制しなかった。

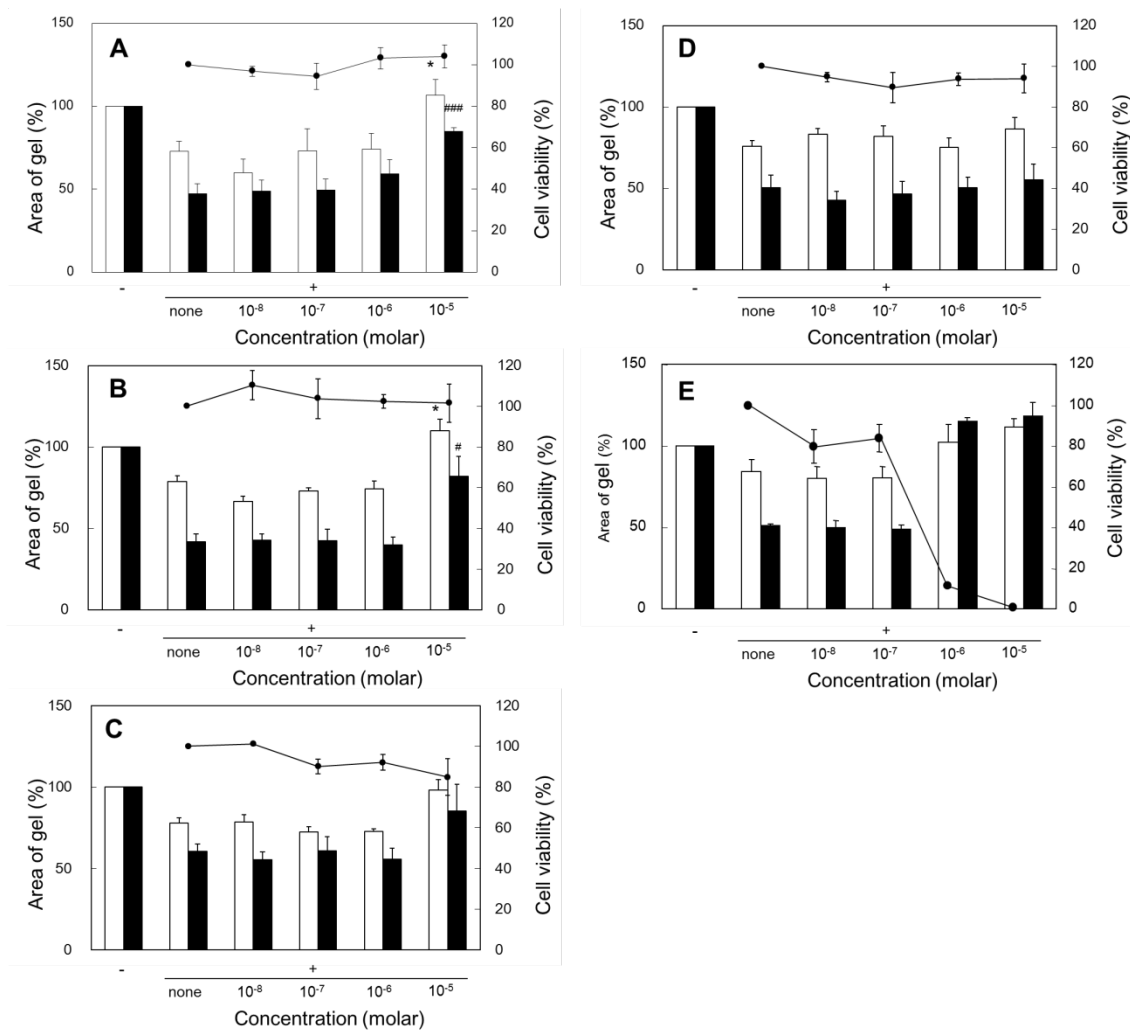


Fig. 6 Effects of Y-27632 (A), roscovitine (B), tyrphostin AG879 (C), wortmannin (D) and chelerythrine chloride (E) on collagen gel contraction induced by 0.5% and 2% FBS and viable cells.

Various concentrations of inhibitors were added and cells were cultured on collagen gels in the presence of FBS at a concentration of 0.5% or 2%. The areas of collagen gels were measured and data were shown as % of collagen gel's area without FBS. Open columns were 0.5% FBS-stimulated contraction and solid columns were 2% FBS. Symbols, "-" or "+" indicated with or without FBS. Solid line was shown as cell viability (%). Data were the mean \pm SE of triplicate. * $P < 0.05$ versus 0.5% FBS alone, # $P < 0.05$, ### $P < 0.005$ versus 2% FBS alone.

Na⁺, K⁺-ATPase 阻害薬でかつて利尿薬として臨床使用されていた ethacrynic acid も 10⁻⁵ M でコラーゲンゲル収縮を抑制した (Fig. 7A)。Ca²⁺-ATPase 阻害薬の thapsigargin (Fig. 7B) や 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA) 阻害薬で高脂血症治療薬の simvastatin (Fig. 7C) も濃度依存的にコラーゲンゲル収縮を抑制した。しかしながら、データは示していないが、前述の chelerythrine chloride と同様、強い細胞毒性を示した。データは示していないが、ホスホジエステラーゼ阻害薬で鎮痙薬の papaverine はコラーゲンゲル収縮を抑制しなかった。

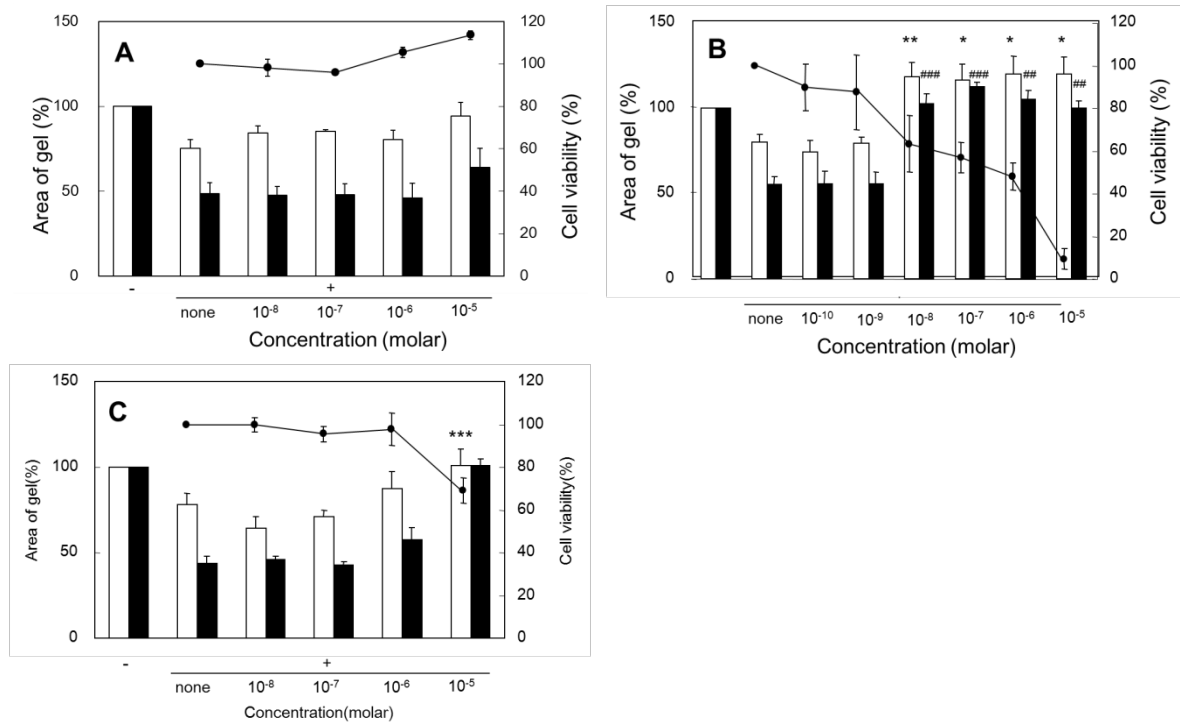


Fig. 7 Effects of ethacrynic acid (A), thapsigargin (B) and simvastatin (C) on collagen gel contraction induced by 0.5% and 2% FBS and viable cells.

Various concentrations of inhibitors were added and cells were cultured on collagen gels in the presence of FBS at a concentration of 0.5% or 2%. The areas of collagen gels were measured and data were shown as % of collagen gel's area without FBS. Open columns were 0.5% FBS-stimulated contraction and solid columns were 2% FBS. Symbols, "-" or "+" indicated with or without FBS. Dot line was shown as cell viability (%). Data were the mean \pm SE of triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ versus 0.5% FBS alone, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ versus 2% FBS alone.

アデノシン A2 受容体アゴニストの metrifudil は 10^{-6} M でコラーゲンゲル収縮を抑制した (Fig. 8A)。データは示さないが、アデノシン A3 受容体アゴニストの N6-(2-amino-phenyl)ethyladenosine や非選択的アデノシン受容体アゴニストである cyclohexyladenosine もコラーゲンゲル収縮を抑制した。

カンナビノイド受容体アゴニストの CP-55,940 (Fig. 8B) やエンドセリン受容体 A アンタゴニストの BQ-123 (Fig. 8C) も 10^{-5} M でコラーゲンゲル収縮を抑制したが、細胞毒性が認められた。データは示さないが、K-ATP チャンネルブロッカーで血糖降下薬の glibenclamide や Ca^{2+} チャンネルブロッカーで降圧薬の nitrendipine は弱いながらコラーゲンゲル収縮を抑制した。

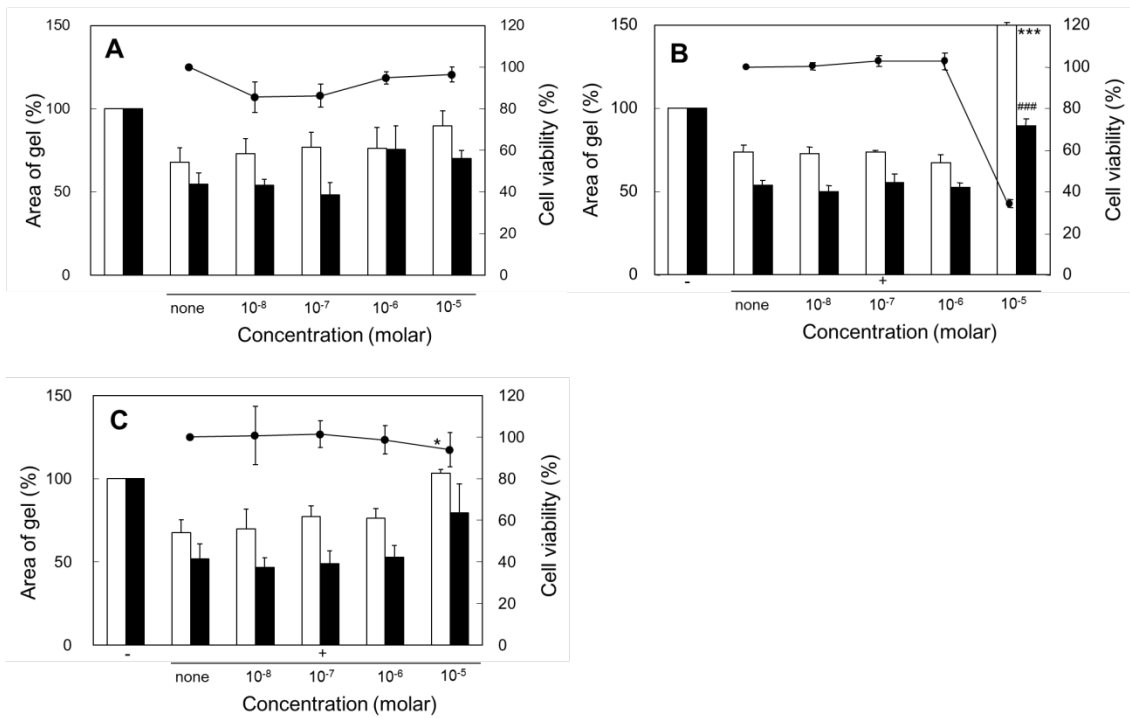


Fig. 8 Effects of metrifudil (A), CP-55,940 (B) and BQ-123 (C) on collagen gel contraction induced by 0.5% and 2% FBS and viable cells.

Various concentrations of inhibitors were added and cells were cultured on collagen gels in the presence of FBS at a concentration of 0.5% or 2%. The areas of collagen gels were measured and data were shown as % of collagen gel's area without FBS. Open columns were 0.5% FBS-stimulated contraction and solid columns were 2% FBS. Symbols, "-" or "+" indicated with or without FBS. Solid line was shown as cell viability (%). Data were the mean \pm SE of triplicate. * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$ versus 0.5% FBS alone. ### $P < 0.005$ versus 2% FBS alone.

細胞骨格調節薬である colchicin (Fig. 9A) や脱リン酸化酵素阻害薬であるオカダ酸 (Fig. 9B) は濃度依存的にコラーゲンゲル収縮を抑制したが、細胞毒性が認められた。

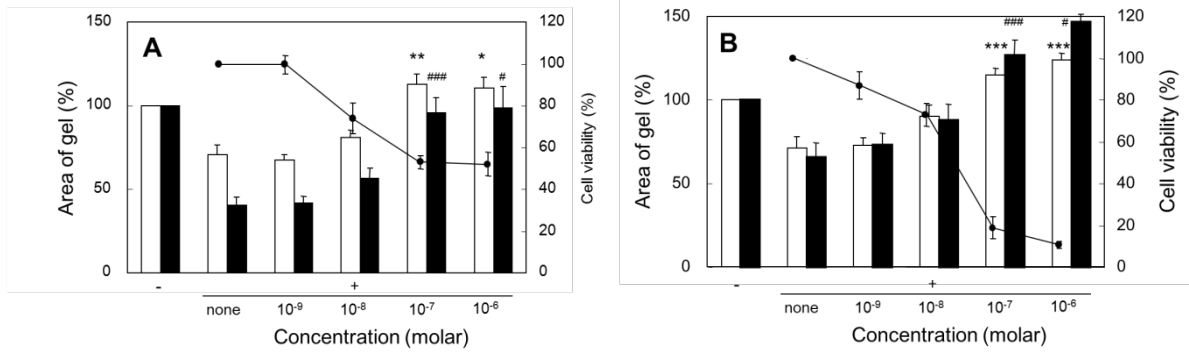


Fig. 9 Effects of colchicine (A) and okadaic acid (B) on collagen gel contraction induced by 0.5% and 2% FBS and viable cells.

Various concentrations of inhibitors were added and cells were cultured on collagen gels in the presence of FBS at a concentration of 0.5% or 2%. The areas of collagen gels were measured and data were shown as % of collagen gel's area without FBS. Open columns were 0.5% FBS-stimulated contraction and solid columns were 2% FBS. Symbols, “-” or “+” indicated with or without FBS. Solid line was shown as cell viability (%). Data were the mean \pm SE of triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ versus 0.5% FBS alone. # $P < 0.05$, ### $P < 0.005$ versus 2% FBS alone.

Table 1 には、各種薬剤のコラーゲンゲル収縮に対する 50%抑制率 (ID_{50}) と 50%細胞障害率 (LD_{50}) の関連性をまとめた。その結果、3つのカテゴリーに分類されることができた。グループ A には細胞毒性を全く示さずコラーゲンゲル収縮を示す薬剤が属し ($ID_{50} \ll LD_{50}$)、その中でも roscovitine、Y-27632 および tyrphostin AG879 は強い活性を示した。グループ B にはわずかながらの細胞毒性を有してコラーゲンゲル収縮を示す薬剤が属し ($ID_{50} < LD_{50}$)、simvastatin、BQ-123、BQ-788 (エンドセリン受容体 B アンタゴニスト)、LY294002 (PI3-K 阻害薬) および CGS15943 (非選択的アデノシン受容体アゴニスト) が属した。グループ C には細胞毒性を有してコラーゲンゲル収縮を示す薬剤が属し ($ID_{50} > LD_{50}$)、chelerythrine chloride、オカダ酸等が該当した。

Table 1 ID₅₀ and LD₅₀ values for various inhibitors of collagen gel contraction by pMT cells.

Compounds	ID ₅₀ with 0.5% FBS	ID ₅₀ with 2% FBS	LD ₅₀
ID₅₀<<LD₅₀			
Roscovitine	1.23	7.50	-
Y-27632	4.40	6.06	-
Tyrphostin AG879	5.91	8.19	-
Ethacrynic acid	2.64	>10.0	
Metrifudil	6.09	>10.0	-
N ⁶ -(2-Amino-phenyl)ethyladenosine	9.65	>10.0	-
N ⁶ -Cyclohexyladenosine	10.0	>10.0	-
Nitrendipine	9.65	>10.0	-
Wortmannin	10.0	>10.0	-
ID₅₀<LD₅₀			
H-7	5.78	9.65	>10.0
Sodium pravastatin	10.0	10.0	>10.0
Simvastatin	2.07	4.04	>10.0
BQ-123	3.56	8.93	>10.0
BQ-788	3.05	7.88	>10.0
LY294002	3.98	10.0	>10.0
CGS15943	2.28	3.00	>10.0
15-Deoxy prostaglandin J ₂	3.21	7.33	>10.0
ID₅₀>LD₅₀			
CP55940	2.51	6.80	7.84
BIM I	2.57	3.40	7.21
Chelerythrine chloride	0.49	0.44	0.52
Ouabain	0.06	0.36	0.07
Okadaic acid	0.08	0.07	0.05

- : without cytotoxicity

(x10⁻⁶ M)

第4節 考察

ブタ線維柱帯由来細胞を用いた3次元コラーゲンゲル培養法を構築し、多種多様の薬剤を用いてコラーゲンゲル収縮抑制を評価し、細胞毒性を示さずコラーゲンゲル収縮を抑制する薬剤 (roscovitine、Y-27632、tyrphostin AG879、ethacrynic acid、metrifudil、N⁶-(2-amino-phenyl)ethyladenosine、N⁶-cyclohexyladenosine、nitrendipine、wortmannin) を見出した。このような薬剤が組織障害性を示さず線維柱帯組織からの房水流出を促進させる可能性があると考えられる。

本研究では、FBS と PDGF-BB がコラーゲンゲル収縮を促進させたが、その他に PMA や TGF- β_1 にも同様の促進作用があることをデータには示していないが確認している。pTM 内の PKC を幾つかのサイトカインが活性化させることが報告されているため (Alexander et al., 2001)、サイトカインが同受容体に結合すると PKC を活性化させ、線維柱帯組織を収縮させる可能性が示唆されている。PKC は細胞の透過性、収縮、異動、増殖、分化、腫瘍転移とアポトーシス等に関与することが明らかである (Newton, 1995; Newton, 1997)。PKC にはアイソフォームが存在し、PKC- α 、- β_1 、- β_2 と λ の conventional あるいは classical PKCs、PKC- δ 、- ϵ 、- η および θ の novel PKCs、PKC - ζ 、- τ 、- μ および ν の atypical PKCs の 3 つに分類されているが、どのアイソフォームがコラーゲンゲル収縮に関与するか不明である (Mellor et al., 1998; Dempsey et al., 2000)。Ca²⁺依存性の PKC- α と Ca²⁺非依存性 PKC- ϵ が線維柱帯組織や毛様体筋に分布している (Wiederholt et al., 1997; Gills et al., 1998; Thieme, et al., 1999; Khurana et al., 2003)。これら PKC アイソフォーム阻害薬が将来の新しい緑内障治療薬の開発に繋がるかもしれない。

コラーゲンゲル収縮を抑制した Y-27632 (ROCK 阻害薬)、H-7 および BIM I (serine/threonine kinase 阻害薬)、tyrphostin AG879 (tyrosine kinase)、LY294002

(phosphoinositide 3-kinase:PI3-K 阻害薬)、roscovitine (cyclin-dependent kinase:CDK 阻害薬) の中で、Y-27632 と tyrphostin AG879 については過去にも異なる実験方法で報告されており (Wiederholt et al., 1998; Stumpff et al., 1999; Koga et al., 2006; Ramachandran et al., 2011)、今回の研究成果と一致していた。Y-27632 は可逆的な細胞形態の変化 (Rao et al., 2001)、MLC のリン酸化の減弱 (Thieme et al., 2000)、アクチン束の破壊および接着斑形成の阻害 (Honjo et al., 2001)、*in vitro* では毛様体筋断片を用いたカルバコール収縮の阻害等を示すことが報告されている (Honjo et al., 2002)。また動物眼にて房水流出促進や眼圧下降作用を示すことも報告されている (Thieme et al., 2000; Honjo et al., 2001; Rao et al., 2001)。今回の実験成果より、Y-27632 は細胞毒性を示さずコラーゲン収縮を抑制したことから、新しい作用機序を有し、副作用の少ない緑内障治療薬の候補になりうるということが示唆された。現在、同様の作用機序を有する薬剤が日米で臨床試験段階にある。

H-7 および BIM I のような Serine/threonine PKC 阻害薬も、Y-27632 と同様に細胞形態の変化や細胞骨格の調節を誘導することが報告されている (Gills et al., 1998; Liu et al., 2001; Khurana et al., 2003)。これらの変化は器官培養や動物眼を用いた研究で房水流出の促進や眼圧下降させる要因の一つと考えられている (Tian et al., 1999)。しかしながら Y-27632 と異なり、今回の研究より 10^{-6} M 以上の濃度でコラーゲン収縮を抑制したが、その機序に細胞毒性が関与することが示唆されている。別の PKC 阻害薬である chelerythrine chloride もコラーゲン収縮を強く抑制したが、H-7 および BIM I と同様に細胞毒性が関与することが今回の実験結果より示唆された。Chelerythrine chloride が眼圧下降作用を示す報告はないが、線維柱帯組織断片を弛緩させることが報告されている (Wiederholt et al., 1998)。細胞毒性を示すものの、PKC 阻害薬も緑内障治療薬の

候補になりうることが示唆された。

今回の研究成果より、コラーゲンゲル収縮を抑制した tyrphostin AG 879 の房水流出もしくは眼圧に関する報告は今の所なされていない。一方、別の tyrosine kinase 阻害薬である tyrphostin 51 および genistein がカルバコールによる牛由来線維柱帯組織断片の収縮を抑制することが報告されている (Wiederholt et al., 1998)。しかしながら、種々の tyrphostin が房水流出を促進しない報告もある (Volberg et al., 2002)。今回の実験結果では、tyrphostin AG 879 以外の tyrosine kinase 阻害薬はコラーゲンゲル収縮を抑制しなかった (genistein, tyrphostin AG82, tyrphostin AG490, tyrphostin AG494, tyrphostin AG527, tyrphostin AG555 および tyrphostin AG1296)。したがって、tyrosine kinase 阻害薬が緑内障治療薬になりうるか今の所一致した見解がなく、今後の研究を待たなければならない。

CDK 阻害薬である roscovitine が現在までに緑内障研究に応用された報告がない。今回の実験結果より、CDK が線維柱帯組織の収縮弛緩を調節することが示唆されたため、前述の通り PKC 阻害薬や ROKC 阻害薬と同様、新しい緑内障治療薬になりうることが期待される。PI3-K 阻害薬である wortmannin や LY294002 もコラーゲンゲル収縮を抑制したが、その作用の一部に細胞毒性が関与することが示唆されたことから、線維柱帯組織の収縮において PI3-K が一部関与することが明らかとなった。

一方、 Na^+ , K^+ -ATPase 阻害薬 (ethacrynic acid および ouabain)、 Ca^{2+} -ATPase 阻害薬 (thapsigargin)、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (pravastatin および simvastatin) も、 10^{-5} M の濃度でコラーゲンゲル収縮を抑制した。例えば、ouabain はコラーゲンゲル収縮を強く抑制したが、強い細胞毒性を示した。ethacrynic acid および ouabain が線維柱帯における細胞骨格変化や眼圧を下降させることが知られているが (Xu et al., 1992; Johnson et al., 1993; Johnstone et al., 1997)、現在までに収縮

抑制に関する報告はない。Thapsigargin もコラーゲンゲル収縮を強く抑制したが、強い細胞毒性が関与する事が示唆された。Simvastatin のような脂溶性の高いスタチン類がコラーゲンゲル収縮を強く抑制し、一方水溶性の高い pravastatin によるコラーゲンゲル収縮抑制は弱いことが明らかとなった。しかしながら、脂溶性の高いスタチン類の同作用には細胞毒性が関与することが示唆された。最近、スタチン類と眼に関する研究が報告されている。例えば、血管新生抑制作用 (Wilson et al., 2004) や黄斑症 (Klein et al., 2003)、白内障 (Smeeth et al., 2003)、眼内出血 (Fraunfelder et al., 2004) に対してスタチン類が有効と報告されている。また、スタチン類を継続的に服用した患者では緑内障発達の危険率が低下している (McGwin et al., 2004)。しかし、眼圧調節とスタチン類の関連性がまだ明らかとなっていない。ROCK 阻害薬による rho の直接的不活性化と同様、イソプレニル化による rho の活性化をスタチン類が間接的に抑制して、恐らく眼圧調節に関与しているのではないかと推察されている (Laufs et al., 2002)。

エンドセリン、アデノシン、カンナビノイド受容体のアゴニスト/アンタゴニストも、線維柱帯の収縮を抑制することが報告されている (Choritz et al., 2005; Stumpff et al., 2005)。エンドセリン-1 (ET-1) は眼圧および線維柱帯組織の収縮弛緩に対して二相性の作用を示すが (Lepple-Wienhues et al., 1991; Taniguchi et al., 1994)、今回の結果では ET-1 受容体アンタゴニストである BQ-123 および ET-2 受容体アンタゴニストである BQ-788 はいずれもコラーゲンゲル収縮を抑制した。

アデノシンは眼圧や眼血流に対して影響する事が報告されている。アデノシン A1 受容体と A2a 受容体のアゴニストが房水産生の抑制もしくは房水流出の促進により眼圧下降させることが報告されている (Crosson et al., 1992; Crosson et al., 1995)。しかし、正確な作用機序は不明である。アデノシンアゴニストがアデ

ノシン受容体に結合することで MMP-2 が大量に分泌放出され、房水流出を促進させているか、もしくは直接線維柱帯組織を弛緩させているのではないかとの考察がなされている (Shearer et al., 2002)。カンナビノイド受容体アゴニストが眼圧を下降させることが報告されているが、恐らく房水流出を促進させていると考えられている (Beilin et al., 2000)。カンナビノイド受容体アゴニストが有力な緑内障治療薬になりうるが、眼圧下降作用と中枢神経系の作用を分離させることが非常に難しく、現時点で緑内障治療薬としての開発はされていない (Jarvinen et al., 2002)。イオンチャネル (L 型もしくは T 型のカルシウムチャネルおよび KATP チャネル)、アドレナリン受容体 (α と β)、GABA 受容体 (A~C)、プロスタグランジン FP 受容体、ドパミン受容体に関与するアゴニスト/アンタゴニストが今回の 3 次元コラーゲン培養法では明確な反応性を示さなかった。

以上より、ブタ由来線維柱帯から線維柱帯細胞の初代培養法およびブタ由来線維柱帯細胞を用いた 3 次元コラーゲンゲル培養方法を確立した。同方法を用いて各種薬剤をスクリーニングし、CDK 阻害薬 (roscovitine)、ROCK 阻害薬 (Y-27632) 等の各種 kinase 阻害薬、アデノシン受容体作動薬 (metrifudil)、カンナビノイド受容体作動薬 (CP-5594) 等の各種受容体作動薬や拮抗薬がコラーゲンゲルの収縮を抑制することを明らかにした。特に roscovitine は細胞障害を示さず、コラーゲンゲルの収縮を強く抑制したことは興味深い知見である。したがって、次章では、roscovitine について詳しく検討することとした。

第2章 ウサギ正常眼圧および網膜神経節細胞障害に対する cyclin 依存性 kinase 阻害薬の roscovitine の薬理学的研究

第1節 緒言

緑内障の病型分類において、大部分を示す原発開放隅角緑内障 (POAG) の病態は、線維柱帯組織の形態学的並びに生化学的変化に起因すると言われてい
る。とくに、加齢に伴い、線維柱帯組織における細胞外マトリックスの産生量
が増大し、細胞骨格由来タンパク質の機能が低下していることが要因であると
考えられている (Liton et al., 2006)。その結果、房水流出路での房水排出が円滑
に行われず、房水産生と房水流出のバランスが破綻し、眼圧が高まると考えら
れている (Leske, et al., 1995; Gordon et al., 2002)。さらに、眼圧上昇により、酸化
ストレス、虚血、興奮毒性、小胞体ストレス等が網膜神経節細胞に加わり、同
細胞死に至ると考えられている (Yasukawa et al., 2001; Shimazawa et al., 2007;
Masuda et al., 2010)。したがって、眼圧下降作用だけではなく、種々のストレス
で誘導された網膜神経節の細胞障害に対して予防や保護することが緑内障治療
に大いに役立つと考えられる。

そこで、前章で記述した通り、CDK 阻害薬の roscovitine がブタ由来の線維
柱帯細胞のコラーゲンゲル培養法でコラーゲンゲル収縮を強く抑制したことか
ら、眼圧下降や房水流出を促進させる可能性が示唆された。種々のストレス
(Katchanov et al., 2001; Kato et al., 2003; Byrnes et al., 2007) に対して発現上昇し、
アポトーシスや興奮毒性 (Knockaert et al., 2002; Rashidian et al., 2007; Timsit et al.,
2007) にも関わる CDK のアイソフォームである CDK2、CDK4 と CDK5 を
roscovitine が阻害することが報告されている。そのため、roscovitine が網膜神経
節細胞死に対して保護効果をもたらすと期待される。Roscovitine は R 体と S 体

のラセミ体のため、各アイソマーにより異なる生理活性を示すと考えられる。実際、小脳虚血に対する保護効果が異なっていることが報告されている (Menn et al., 2010)。そのため、眼圧下降作用や網膜神経節細胞死に対しても同様の傾向があると推測される。

本章では、roscovitine の両アイソマーによる正常なウサギの眼圧下降作用と培養網膜神経節細胞におけるストレス障害に対する作用を検討した。

第2節 実験材料および方法

2-1 材料

雄性のニュージーランド白色ウサギ (2.5-3.4kg) は北山ラベス株式会社 (Nagano, Japan) より購入した。Association of Vision Research in Ophthalmology (ARVO) で承認されている眼科用研究における動物使用のガイダンスに従い飼育し、以下の実験に使用した。なお、12時間の明暗サイクル下 (朝8時に点灯、夜8時に消灯するサイクル) で白色ウサギを飼育した。Roscovitine の R アイソマーは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。Roscovitine の S アイソマーは、EMD Chemicals La Jolla (CA, USA) から購入した。ポリエチレングリコール 4000 と tunicamycin は、和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。オキシブプロカイン塩酸塩点眼液 (商品名はネオベノール点眼液 0.4%) は、株式会社日本点眼薬研究所 (Aichi, Japan) より購入した。マウス由来の網膜神経節細胞 (RGC-5) は、UNT Health Science Center の Neeraj Agarwal 博士 (Fort Worth, TX, USA) により供与された。DMEM は、ナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) より購入した。グルコース不含の DME、Hoechst 33342 および propidium iodide (PI) は、Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。FBS は、Valeant Pharmaceuticals (Costa Mesa, CA, USA) より購入した。ペニシリンとストレプト

マイシンは、明治製菓株式会社（現在は株式会社明治に改称，Tokyo, Japan）より購入した。

2-2 正常ウサギを用いた眼圧測定

Medtronic Xomed Ophthalmics (Minneapolis, MN, USA) の Model 30 Classic Pneumatomete を用いて、ウサギの眼圧を測定した。眼圧測定の前に、取扱説明書に準じてキャリブレーションを実施した。Roscovitine の両アイソマーは4%のポリエチレングリコール 4000 水溶液に懸濁させ、0.1%の濃度を調製し、以下の実験に使用した。Roscovitine の両アイソマーを 50 μ L ずつウサギの左眼に点眼し、僚眼である右眼には 4%のポリエチレングリコール 4000 水溶液を同量点眼した。13 時に点眼し、点眼後 5 時間まで眼圧測定を行った。眼圧測定する際には、オキシブプロカイン塩酸塩点眼液にて局所麻酔を施した。

2-3 RGC-5 を用いた脱酸素・脱グルコース (oxygen and glucose deprivation : OGD) ストレス

RGC-5 は 10%FBS、100 U/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL カナマイシンを含む DMEM で 37°C (95%空気-5%炭酸ガス、100%湿度の条件下) で培養し、3 ないし 4 日間毎にトリプシン処理して継代した。

OGD ストレスで低酸素細胞障害を誘導した。すなわち、 2.0×10^3 個/ウェルで 96 穴カルチャープレートに RGC-5 を播種後、37°C (95%空気-5%炭酸ガス、100%湿度の条件下) で 24 時間培養した。OGD ストレスはグルコース不含の DMEM で細胞を洗浄後、同 DMEM に置き換えて、低酸素条件下 (94%窒素-5%炭酸ガス-1%酸素) でさらに 37°C、4 時間培養した。終了後、4.5 mg/mL のグルコース、1%の FBS を含む DMEM に置き換えて、元の培養条件 (95%空気-5%炭酸ガス、

100%湿度の条件下) に戻して、37°C、16 時間追加培養した (再酸素化)。Roscovitine の両アイソマーを OGD 処置後に添加し、16 時間培養後の細胞生存率を定量した。

2-4 RGC-5 を用いた tunicamycin 誘導小胞体ストレス

Tunicamycin 誘導小胞体ストレスにより細胞障害を誘導した。すなわち、 1.0×10^3 個/ウェルで 96 穴カルチャープレートに RGC-5 を播種後、10%FBS、100 U/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g/mL}$ カナマイシンを含む DMEM で 37°C (95% 空気-5% 炭酸ガス、100%湿度の条件下) で 24 時間培養した。1%FBS と roscovitine の両アイソマーを含む DMEM に置き換えて、1 時間培養後、最終濃度 2 $\mu\text{g/mL}$ の tunicamycin になるように 96 穴カルチャープレートに加えて 27 時間追加培養した。培養終了後の細胞生存率を定量した。

2-5 Hoechst 33342 と propidium iodide による二重染色

細胞生存の評価は Hoechst 33342 と propidium iodide (PI) による二重染色で行った。前述した OGD ストレスと tunicamycin 誘導小胞体ストレスを roscovitine の両アイソマー存在下 RGC-5 に負荷した後、Hoechst 33342 もしくは PI を最終濃度 8 μM もしくは 1.5 μM になるよう 96 穴カルチャープレートに加えて 15 分間培養した。

励起波長 360 nm、蛍光波長 490 nm で観察可能な Hoechst 33342 は蛍光フィルター (DP30BW、オリンパス株式会社) (Tokyo, Japan)、励起波長 535 nm、蛍光波長 617 nm で観察可能な PI は蛍光フィルター (U-MWIG、オリンパス株式会社) (Tokyo, Japan) を装着し、蛍光顕微鏡 (IX70、オリンパス株式会社) (Tokyo, Japan) で観察した。

2-6 統計学的処理

データは平均値±標準誤差で示し、SAS Institute Japan 株式会社の Stat view (version5.0, Cary, NC, USA) を用いて、対のある *t*-検定もしくは Dunnet の *t*-検定による ANOVA で統計解析し、危険率 5%水準で有意差ありと判定した。

第3節 実験結果

3-1 正常ウサギの眼圧に対する roscovitine の両アイソマーの作用

Roscovitine の両アイソマーを正常ウサギへ点眼した場合の眼圧推移を Fig. 10 に示した。両アイソマーともに、いずれの時間帯においても有意に眼圧を下降させることが明らかとなった。その効力は同程度であった。

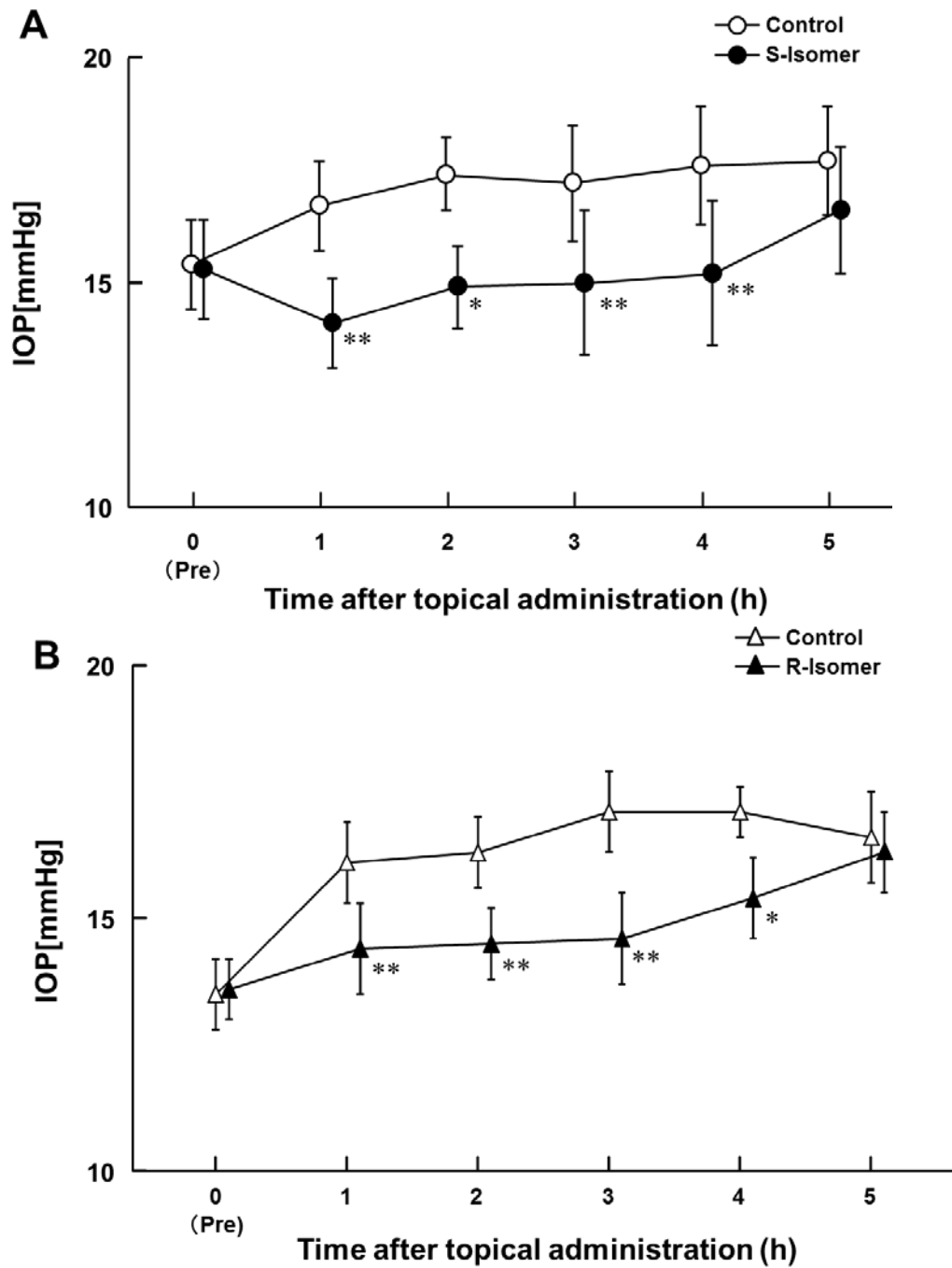


Fig. 10 Effects of the S-isomer (A) and R-isomer (B) of roscovitine on intraocular pressure.

Roscovitine S-isomer and R-isomer significantly lowered IOP at 1, 2, 3 and 4 h after administration when compared to the control eyes. Data were shown as mean±SE (n = 6). *P < 0.05, and **P < 0.01 versus control (Paired *t*-test).

3-2 OGD ストレス誘発網膜神経節細胞障害に対する roscovitine の両アイソマーの作用

OGD ストレス誘導後の RGC-5 を Hoechst33342 と PI で染色した画像を Fig. 11 に示した。前者は全細胞を染色し、後者は死細胞のみを特異的に染色した (Fig. 11A と Fig. 11C)。1 μM の S 体 roscovitine は細胞障害を有意に抑制した (Fig. 11B)。一方、0.01-1 μM の R 体 roscovitine で前処置しても OGD ストレスに伴う細胞障害を抑制しなかった (Fig. 11D)。1 μM の R 体 roscovitine はむしろ細胞障害を有意に増悪した (Fig. 11D)。また、1 μM の R 体と S 体 roscovitine を単独処理しても細胞障害は認めなかった (Fig. 11B と 11D)。

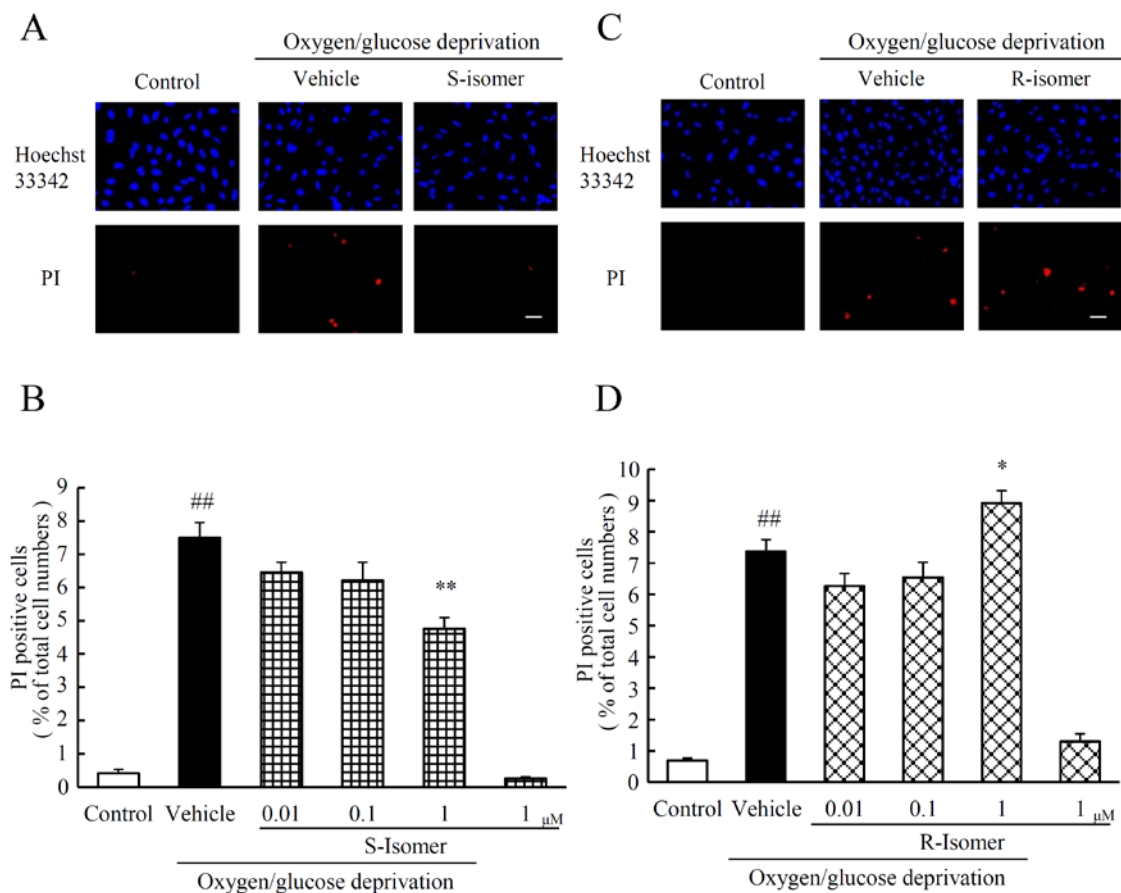


Fig. 11 Effects of the R-isomer and S-isomer of roscovitine on cell damage induced by oxygen–glucose deprivation (OGD) in RGC-5 cell cultures.

A and C showed representative fluorescence microscopy image of Hoechst 33342 and PI staining (OGD for 4 h and reperfusion for 16 h later). B showed the roscovitine S-isomer had no effect at 0.01 or 0.1 μ M on RGC-5 cell death induced by OGD, but showed a significant protective effect at 1 μ M. D showed the roscovitine R-isomer had no effect at 0.01 or 0.1 μ M on RGC-5 cell death induced by OGD, but strongly promoted cell death at 1 μ M. Data were shown as mean \pm SE (n = 6). ^{##}P < 0.01 versus control (Student's *t*-test or Welch's *t*-test). *P < 0.05, and ^{**}P < 0.01 versus vehicle plus OGD treated group (Dunnett's test). Scale bar represented 50 μ m.

3-3 Tunicamycin 誘発小胞体ストレスに対する網膜神経節細胞障害に対する roscovitine の両アイソマーの作用

OGD ストレスの研究と同様、tunicamycin 誘導小胞体ストレスを負荷した RGC-5 を Hoechst33342 と PI で染色した画像を Fig. 12 に示した。OGD ストレスの結果と同様、1 μM の S 体 roscovitine は細胞障害を有意に抑制した (Fig. 12A と Fig. 12B)。一方、0.01-1 μM の R 体 roscovitine で前処置しても OGD ストレスに伴う細胞障害を抑制しなかった (Fig. 12C と Fig. 12D)。1 μM の R 体 roscovitine はむしろ細胞障害を有意に増悪した (Fig. 12C と Fig. 12D)。

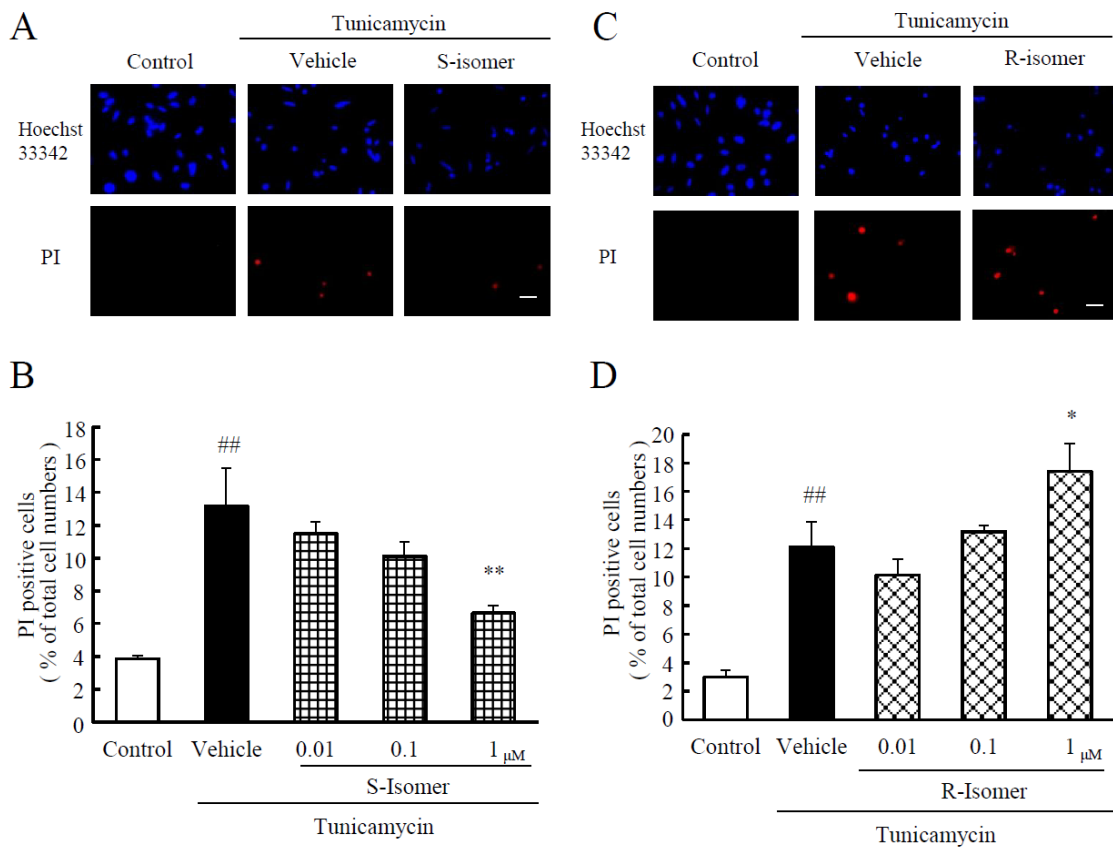


Fig. 12 Effects of R-isomer and S-isomer of roscovitine on cell damage induced by tunicamycin in RGC-5 cell cultures.

A and C Representative fluorescence microscopy image of Hoechst 33342 and PI stained cells (added 27 h after tunicamycin treatment). B showed the roscovitine S-isomer at 0.01 or 0.1 μM had no effect on RGC-5 cell death induced by tunicamycin and showed a significant protective effect at 1 μM . D showed the roscovitine R-isomer at 0.01 or 0.1 μM had no effect on RGC-5 cell death induced by tunicamycin and strongly promoted cell death at 1 μM . Data were shown as mean \pm SE (n = 6). ^{##}P < 0.01 versus control (Student's *t*-test or Welch's *t*-test). *P < 0.05, and **P < 0.01 versus vehicle plus tunicamycin treated group (Dunnett's test). Scale bar represented 50 μm .

第4節 考察

CDK 阻害薬の roscovitine には R 体と S 体のアイソマーがあり、両アイソマーを正常なウサギに単回点眼したところ、いずれも有意な眼圧下降作用を示した。また、OGD ストレス誘発網膜神経節細胞障害と tunicamycin 誘導小胞体ストレスに対する両アイソマーの神経保護作用を検討したところ、S 体の roscovitine は神経保護作用を示したが、R 体の roscovitine は神経保護作用を示さなかった。

前章で記述した通り、roscovitine はブタ由来の線維柱帯細胞の収縮を有意に調節する事が明らかとなり、房水流出を促進させることが示唆された。線維柱帯は種々の細胞外マトリックス (I 型、II 型、IV 型、VI 型のコラーゲン) の生合成や分泌を司る組織であり (Yun et al., 1989)、眼圧を制御する機能を果たしていると考えられている。Roscovitine が阻害する酵素、CDK は線維芽細胞 (Nho et al., 2011) やメサンギウム細胞 (Schöcklmann et al., 2000) に発現する I 型コラーゲンおよび関節軟骨細胞 (Hwang et al., 2007) の II 型コラーゲンの産生を調節することが報告されている。したがって、roscovitine が眼圧を調節する可能性が示唆された。

p21Cip、p27 および p57 のような内因性の CDK 阻害物質が存在しているが、これら阻害物質が緑内障の網膜 glia 細胞で低下しており、一方 TGF- β や結合組織増殖因子 (connective tissue growth factor : CTGF) 等の線維化を促進する因子の活性化が報告されている (Kirwan et al., 2005; Chen et al., 2010)。内因性の CDK 阻害物質は CDK1、CDK2、CDK4 その他 kinase を阻害する。緑内障患者の SNP 解析より、p16^{INK4a} および p14^{ARF} をエンコードする遺伝子の *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)* および p15^{INK4b} をエンコードする遺伝子 *CDKN2B* に変異が起きている事が報告されている (Takamoto et al., 2012)。すなわち、緑内障に罹患すると内因性の CDK 阻害物質が機能不全となり、その結果 CDK が過

剰に活性化されていると考えられている。過剰に活性化された CDK が線維柱帯組織でのコラーゲンの産生を促進させ、コラーゲンによる線維化を介して房水流出が低下し、眼圧が上昇すると考えられる。したがって、roscovitine が CDK の活性化を阻害することで、コラーゲン産生量を減らし、眼圧を下降させる可能性が示唆された。

CDK のアイソフォームである CDK2、CDK4 および CDK5 が虚血状態にて神経細胞死を誘導することが報告されている (Katchanov et al., 2001)。今回の研究より、S 体の roscovitine がこれら CDK アイソフォームを阻害し、保護作用を示したと考えられる。しかしながら、R 体の roscovitine は神経保護作用がなく、むしろ細胞障害を誘導させた。以上の事より、roscovitine のアイソマーにより、CDK の阻害反応が異なることが示唆された。種々の CDK アイソマーが様々な条件下でアポトーシスの誘導もしくは細胞保護を促し、恒常性を維持しているかもしれない。とくに CDK2 は細胞周期の G1/S 期を停止させ、過剰に活性化すると細胞死を誘導し、CDK2 の阻害薬がアポトーシスを促進させる Bcl-xs をアップレギュレートさせることが報告されている (Chae et al., 2008)。したがって、基質に対する阻害活性の程度が RGC-5 の細胞死に重要であると考えられる。Roscovitine の両アイソマーが CDK および細胞内情報伝達を司る kinase に影響を及ぼし、細胞機能性を変化させているかもしれない。以上の事から、CDK の基質と細胞内情報伝達との関係を更に明らかにすることで、異なるアイソマーの roscovitine を用いた研究を発展させ、将来の新規緑内障治療薬の開発に繋がる可能性を明らかにした。

第3章 ベンザルコニウム塩化物フリーのラタノプロストを用いたウサギおよびヒトの正常眼圧に対する有効性と安全性に関する薬理学的研究

第1節 緒言

前章で述べたように、原発開放隅角緑内障 (POAG) が緑内障の主たる病態であり、種々の因子により高眼圧になることが特徴である。高眼圧が緑内障における重要な危険因子だが、日本で最近実施された多治見スタディ ([疫学対象者 4,000 人のうち、期間内死亡・転出者が 130 人あったため対象者は 3,870 人で、このうちの受診者 3,021 人 (受診率 78.1%) を対象とした疫学研究]) の結果、POAG (広義) が 3.9% 存在し、このうち眼圧が 21 mmHg 以下の正常眼圧緑内障 (normal tension glaucoma, NTG) の割合が 3.6%、21 mmHg を越える POAG (狭義) の割合が 0.3% であった (Iwase et al., 2004)。このような背景の中、21mmHg 以下の眼圧が大多数を占める NTG 患者の治療法は、POAG 患者と同様に眼圧を下降させることで視野障害の進行を抑制することが第一選択になっている (Araie et al, 2008)。

1990年代半ばまではチモロールマレイン酸塩のようなβブロッカーが緑内障治療の第一選択薬として使用されてきたが、1990年代後半にプロスタグランジン F_{2α} 誘導体が登場してから、現在まで世界中で第一選択薬となっている。プロスタグランジン F_{2α} 誘導体の中で、ラタノプロストが最初に商業化に成功した薬剤で、キサラタンという商品名で販売されている。1日2回の点眼で投与されるチモロールマレイン酸塩と比べて、1日1回の点眼で投与されるラタノプロストは強い眼圧下降作用を示すことが大きな利点である (Hotehama et al., 1993; Diestelhorst et al., 1997)。日本人の緑内障患者を対象としたラタノプロストの長期反復点眼投与後の臨床研究により、安定な眼圧下降と視野の維持が報告されて

いる (Kashiwagi et al., 2008)。

緑内障は慢性疾患のため一旦罹患すると、患者は緑内障治療薬を点眼し続けなければならない。しかしながら、長期間の緑内障治療薬の点眼により、眼局所における副作用が問題となる事が見受けられる (Inoue et al., 2003; Baffa et al., 2008)。2008年、欧州4か国にある多施設が防腐剤を含む点眼液と防腐剤を含まない点眼液を点眼した緑内障患者における眼局所に発現した副作用の差異を報告した (Jaenen et al., 2007)。その結果、防腐剤を含む点眼液を点眼した患者では、眼痛、眼の違和感、ドライアイ様の兆候、熱傷感、眼瞼の搔痒や眼瞼炎、充血、角膜上皮障害といった所見が高頻度に認められた。しかしながら、防腐剤を含まない点眼液を点眼した患者では、これら所見の発現率が低下していた。

防腐剤は細菌や真菌のコンタミネーションを防ぐため、点眼液の添加物としては必須である。広く使用されている防腐剤がベンザルコニウム塩化物 (benzalkonium chloride:BAK) であり、ラタノプロストを始めとする大多数の点眼液に配合されている。一方、*in vitro* および *in vivo* の研究で、BAK が涙液層、角膜と結膜の前眼部組織、線維柱帯等の眼組織に悪影響を及ぼすことが多数報告されている (Miyake et al., 2003; Epstein et al., 2009; Ammar et al., 2011; Georgiev et al., 2011; Sarkar et al., 2012; Stevens et al., 2012)。

日本ではキサラタンの特許が満了し、2010年5月、20社の製薬会社が製造販売承認を受けて、ラタノプロスト後発品を販売している。製造販売承認された後発品のうち、BAKを配合している点眼液が大多数を占めているが、BAK濃度を低減させた後発品、異なる防腐剤を配合した後発品、BAKを含まない後発品も含まれている。

本章では、BAKを含まないラタノプロスト後発品とBAKを含むラタノプロスト (キサラタン) を用いたサルおよびヒトの正常眼圧に対する有効性と安全

性を *in vitro* と *in vivo* で検討した。

第2節 実験材料および方法

2-1 材料

BAK を含むラタノプロスト (キサラタン) は、ファイザー株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。BAK を含まないラタノプロスト (ラタノプロスト点眼液 0.005% 「NP」 : NP) は、ニプロ株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。BAK は、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) と MP Biomedicals (California, USA) より購入した。Trolox は、Enzo Life Science (Plymouth Meeting, PA, USA) より購入した。SV-40 で株化させたヒト由来の角膜上皮株細胞 (human corneal epithelial cells : HCECs)、は理化学研究所バイオリソースセンター (Ibaraki, Japan) より購入した。ジメチルスルフォキシドと過酸化水素は、和光純薬工業社 (Osaka, Japan) より購入した。インスリン、トランスフェリンおよびセリン混合物は、ITS-G の商品名として Life Technologies (California, USA) より購入した。組み換え体ヒト由来の上皮成長因子 (recombinant human epidermal growth factor : EGF) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。WST-8 試薬は、生化学工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。ケタラールは、第一三共プロファーマ株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。

2-2 動物

4 歳以上の雄性カニクイザルを 10 頭、今回の研究に用いた。12 時間の明暗サイクル下 (朝 7 時に点灯、夜 7 時に消灯するサイクル) で動物を飼育した。

2-3 被験者

12名の20-24歳の日本人(健康成人男性志願者)を今回の研究に登録した。ヘルシンキ宣言を遵守した試験計画を立案し、わかもと製薬株式会社と委託先である大阪治験病院での倫理審査委員会で各々審議、承認された後、実施した。今回の研究の目的を被験者へ十分説明し、書面による同意説明文書を入手した。被験者は自らの病歴、身体検査、定期的な血液検査や眼科検査に基づき、医師により良好な健康状態にあると診断された。

2-4 BAKを含むラタノプロストとNPを用いた細胞毒性試験 (*in vitro*)

2.0×10^4 個/ウェルで96穴カルチャープレートにHCECsを播種後、0.5%ジメチルスルフォキシド、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ インスリン、2.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トランスフェリン、3.35 ng/mL セレン、10 ng/mL のEGFおよび5%FBSを含むDMEMとHam's F12の各培地を等量混合したsupplemental hormonal epithelial medium (SHEM) 培地に37°C (95%空気-5%炭酸ガス、100%湿度の条件下) で24時間培養した。培養後、0.002% BAKを含むラタノプロスト、NPおよび0.02% BAKを1、2、5、10分間、同プレートに添加し、HCECsと接触させた。接触後、培地を除去し、再度SHEM培地で37°C (95%空気-5%炭酸ガス、100%湿度の条件下)、24時間培養した。24時間後、SHEM培地9に対してWST-8試薬1の比で混合したWST-8溶液を100 μL ずつ同プレートに添加し2時間インキュベートし、450 nmの吸光度を測定し、その値を生細胞数としてみなした。

一方、 6.0×10^3 個/ウェルで96穴カルチャープレートにHCECsを播種して、24時間SHEM培地で培養後、SHEM培地で100倍、300倍、500倍、1000倍に希釈したBAKを含むラタノプロストおよびNPそして0.02%BAK溶液を同プレートに添加し12時間培養した後、WST-8試薬で生細胞数を定量した。

2-5 BAKを含むラタノプロストとNPを用いた薬理学試験 (*in vitro*)

前項で記述した通り、 2.0×10^4 個/ウェルで96穴カルチャープレートにHCECsを播種後、24時間培養した。培養後、BAKを含むラタノプロストおよびNP、0.02%BAK、0.000066% BAK (BAKを含むラタノプロストを300倍希釈した際のBAK量に相当) もしくはtroloxで1時間前処置した後、0.3 mMの過酸化水素を加えて12時間処置した。処置後、培地を除去し、WST-8試薬で生細胞数を定量した。

2-6 BAKを含むラタノプロストとNPをカニクイザルへ反復点眼後の正常眼圧に対する有効性と安全性および房水中のラタノプロスト遊離酸濃度 (*in vivo*)

点眼操作と眼圧測定の時にはケージから出して、モンキーチェアに固定しても暴れないよう十分に訓練されたカニクイザルを使用した。眼圧測定はModel 30™ pneumatonometer (Reichert Technologies, USA)で行った。なお、局所麻酔は行わなかった。BAKを含むラタノプロストとNPを20 μLずつ左眼の結膜嚢へ点眼した。右眼は無処置とした。1日1回、8週間点眼を継続した。眼圧測定は最初の点眼直前、点眼後1日目、8日目、15日目、29日目、57日目の点眼後2、4、6、24時間目に実施した。なお、点眼時には、眼部を観察した。点眼直前、点眼後3日目、28日目、56日目に角膜障害の有無を確認するため、McDonald-Shadduck scoring methodの変法で評価した (Hackett et al., 1991)。58日目の最終点眼後1時間経過した時点で、ケタラルールをサルに筋肉内投与して全身麻酔後、房水を採取した。房水中のラタノプロスト遊離酸をliquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) で定量するまで-60°Cで凍結保存した。

2-7 BAKを含むラタノプロストとNPを健常者へ単回点眼後の正常眼圧作用における生物学的同等性試験

全ての操作はヘルシンキ宣言を遵守して実施した。12人の20-24歳の日本人(健康成人男性志願者)を無作為に6名ずつ2群に分けた2群2期のクロスオーバー試験(非遮蔽)を計画し、BAKを含むラタノプロストとNPを単回点眼した。休薬期間は7日間とした。眼圧測定は点眼直前、点眼後2、4、6、8、12、14、24時間目に行った。最高眼圧変化値($\Delta C_{max0-24h}$)と眼圧変化値-時間曲線下面積($\Delta AUC_{max0-24h}$)を薬力学的パラメーターとした。後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインを参考に同等性を判定した。すなわち、BAKを含むラタノプロストとNPの生物学的同等性判定パラメーターの対数値の平均値の差の90%信頼区間が $\log_{10}(0.80) \sim \log_{10}(1.25)$ の範囲にあるとき、両剤は生物学的に同等と判定した。

2-8 統計学的処理

*In vitro*の試験結果で得た値は平均値±標準誤差で示した。2群間の差異は両側のStudentの*t*検定を採用した。Dunnett検定は多重比較する場合に採用した。房水中のラタノプロスト遊離酸の定量値は平均値±標準偏差で示した。分散分析後、StudentもしくはAspin-Welchの*t*検定を採用した。

第3節 実験結果

3-1 BAKを含むラタノプロストとNPを用いた細胞毒性試験(*in vitro*)

BAKを含むラタノプロスト、NPおよび0.02%BAKを1、2、5、10分間、HCECsに添加後の細胞毒性結果をFig. 13Aに示した。BAKを含むラタノプロストおよび0.02%BAK添加群では、どの時間帯でも細胞生存が認められなかった。

これに対して、NP の細胞生存率は、1 分間接触で 106.2%、2 分間接触で 87.1%、5 分間接触で 76.6%、10 分間接触で 67.5%であった。加えて、SHEM 培地で希釈した BAK を含むラタノプロストおよび NP を 12 時間接触させた場合の結果を Fig. 13B に示した。100 倍希釈した BAK を含むラタノプロストと 0.02%BAK のみ細胞生存率が低下したが、NP は細胞生存に影響を及ぼさなかった。

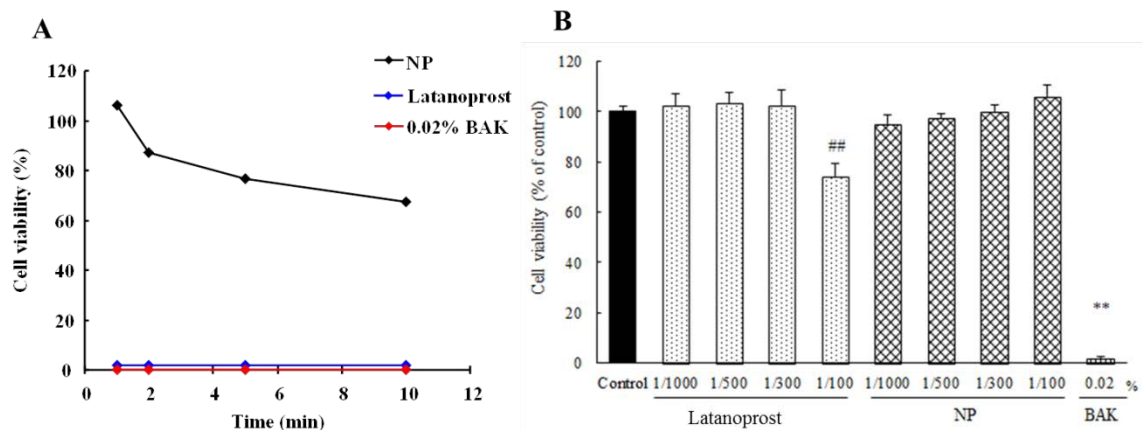


Fig. 13 Cytotoxicity of latanoprost, 0.02% BAK and NP on HCECs.

A showed HCECs were exposed for 1, 2, 5 and 10 min by each samples. Data represented the percentage of PBS-treated cell viability. Each value was expressed the mean (n = 12). B showed HCECs were exposed for 12 h by each agent. Data represented the percentage of SHEM-treated cell viability. Each value was expressed the mean \pm SE (n = 6). ^{##}P < 0.01 versus control (Dunnet's test). ^{**}P < 0.01 versus control (t-test).

3-2 BAKを含むラタノプロストとNPを用いた薬理学試験 (*in vitro*)

過酸化水素による酸化ストレスをHCECsに負荷した場合のBAKを含むラタノプロストおよびNPの保護効果をFig. 14に示した。300倍に希釈したBAKを含むラタノプロストは、酸化ストレスに対して作用がなかったが、同じく300倍に希釈したNPは酸化ストレスに対して有意に保護効果を示した。一方、0.02% BAKおよび0.000066% BAKは酸化ストレスを増悪させた。

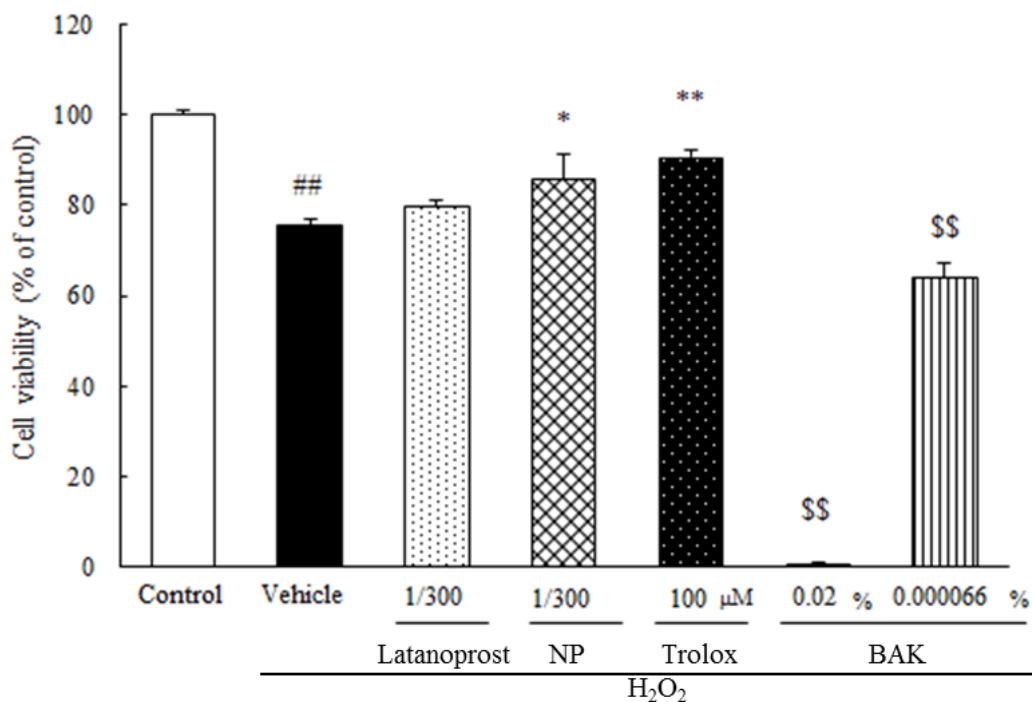


Fig. 14 Effect of latanoprost, NP, BAK and Trolox on cell damage induced by H₂O₂ in HCECs.

HCECs were damaged by H₂O₂ (0.3 mM). HCECs were pretreated 300-fold-diluted latanoprost, NP, 0.02%, 0.000066% BAK, and Trolox. Data represented the percentage of PBS-treated cell viability. Each value was expressed the mean ± SE (n = 6). ##P < 0.01 versus control (*t*-test). *, **P < 0.05, 0.01 versus vehicle plus H₂O₂ treated group (*t*-test). \$\$P < 0.01 versus control (Dunnet's test).

3-3 BAKを含むラタノプロストとNPをカニクイザルへ反復点眼後の正常眼圧に対する有効性と安全性および房水中のラタノプロスト遊離酸濃度 (*in vivo*)

正常なカニクイザルに BAK を含むラタノプロストと NP を 8 週間単回点眼後の眼圧の推移を Fig. 15 に示した。点眼前の眼圧が 20.14 ± 2.65 mmHg であったが、BAK を含むラタノプロストを点眼後 4 時間目と 6 時間目に最大下降作用を示した。NP の場合も同様に、点眼前の眼圧が 20.60 ± 2.30 mmHg が点眼後 4 時間目と 6 時間目に最大下降作用を示した。反復点眼期間中の眼圧変動幅は BAK を含むラタノプロスト点眼群で 1.74~2.60 mmHg、NP 点眼群で 2.34~3.52 mmHg であった。最大眼圧下降値は BAK を含むラタノプロスト点眼群で 3.54 ± 0.58 、NP 点眼群で 4.12 ± 0.94 mmHg であった。今回の研究より、両剤を反復点眼しても眼圧下降作用に変化がなく、両剤間に差異がないことが示唆された。両剤を反復点眼中の角膜障害の程度、閉瞼、角膜混濁、結膜や虹彩の充血、瞳孔異常は認められなかった。

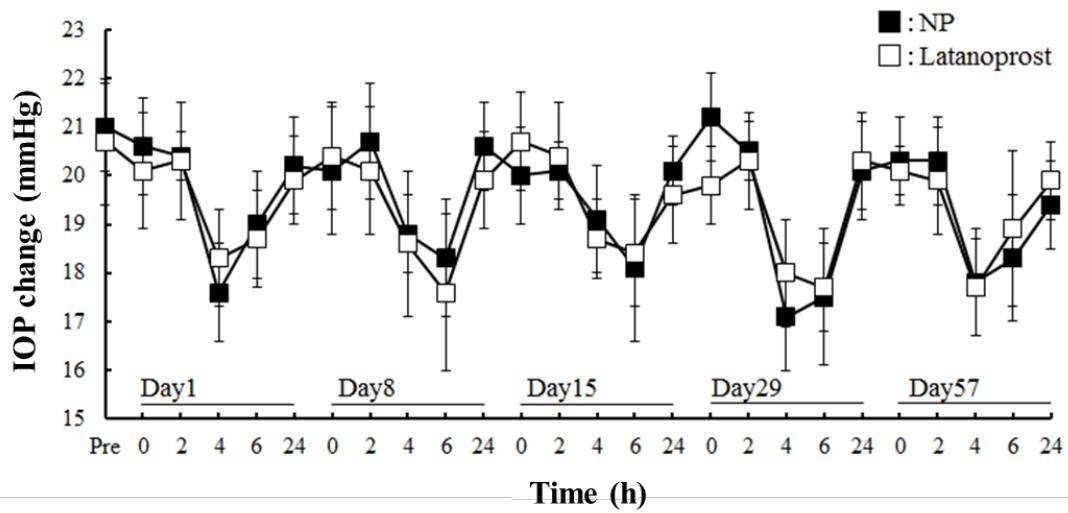


Fig. 15. Time course of the change in intraocular pressure (IOP) of normotensive male cynomolgus monkeys after repeated instillation of latanoprost with or without BAK.

IOP-lower effects of 0.005% latanoprost with or without BAK ophthalmic solutions was followed for 8 weeks. Each point was expressed the mean \pm SD (n = 5). No significant difference was observed between the two eyes at any time point.

房水中のラタノプロスト遊離酸量を Table 2 に示した。BAK を含むラタノプロスト点眼群で 13.33~39.96 ng/mL、NP で 12.71~17.32 ng/mL となり両群間に有意差は認められなかった。しかし、BAK を含むラタノプロスト点眼群で高値を示す傾向があった。

Table 2 Concentrations of latanoprost free acid in aqueous humor (ng/mL).

Individual values of concentration were indicated.

Animal No.	Latanoprost	NP
1	39.96	12.71
2	18.93	14.46
3	38.37	17.32
4	23.58	16.94
5	13.33	14.88
Mean	26.83	15.26
SD	11.84	1.89

(ng/mL)

3-4 BAK を含むラタノプロストと NP を単回点眼後の健常者の正常眼圧に対する作用における生物学的同等性試験

健常人へBAK を含むラタノプロストと NP の単回点眼した場合の薬力学的パラメーターを Table 3 に示した。最高眼圧変化値 ($\Delta C_{\max 0-24h}$) は BAK を含むラタノプロスト点眼群で 3.08 ± 1.38 mmHg、NP 点眼群で 3.25 ± 1.06 mmHg であった。BAK を含むラタノプロストと NP の生物学的同等性判定パラメーターの対数値の平均値の差の 90%信頼区間が 81.22%~116.85%となり、両剤は生物学的に同等と判定された。眼圧変化値-時間曲線下面積 ($\Delta C_{\max 0-24h}$) は BAK を含むラタノプロスト点眼群で 39.67 ± 26.83 mmHg·h、NP 点眼群で 43.00 ± 19.77

mmHg·h であった。BAK を含むラタノプロストと NP の生物学的同等性判定パラメーターの対数値の平均値の差の 90%信頼区間が 91.60~106.27%となり、両剤は生物学的に同等と判定された。両剤を点眼した際の眼局所における有害事象はなく、単回点眼の結果であるが同程度の忍容性があると判断された。

Table 3. 90% confidence interval for $\Delta C_{\max 0-24h}$ and ΔAUC_{0-24h} values (log transformed).

Parameters	Latanoprost	NP	90% confidence interval
$\Delta C_{\max 0-24h}$ (mmHg)	3.08 ± 1.38	3.25 ± 1.06	81.22 - 116.85%
ΔAUC_{0-24h} (mmHg·h)	39.67 ± 26.83	43.00 ± 19.77	91.60 - 106.27%

第4節 考察

BAK を含まないラタノプロスト後発品と BAK を含むラタノプロスト (キサラン) を用いたサルおよびヒトの正常眼圧に対する有効性と安全性を *in vitro* と *in vivo* の両系で検討した。細胞障害を *in vitro* で検討したところ、BAK を含むラタノプロストは顕著な細胞障害性を示したが、BAK を含まないラタノプロストによる細胞障害性の程度は小さかった。過酸化水素による酸化ストレス負荷した角膜上皮細胞に対して、BAK を含まないラタノプロストは保護作用を示した。サルおよびヒトの正常眼圧に対して、両ラタノプロストは有意かつ同程度の眼圧下降作用を示した。

日本で 2000 年から 2008 年までに処方された緑内障治療薬を調査したところ、プロスタグランジン誘導体が全体の 40-45% 占めている (Kashiwagi, 2010)。数あるプロスタグランジン誘導体の点眼液の中で、ラタノプロスト点眼液が長い間ファーストライン (第一選択薬) となっており、後発品や類薬が登場した現在でも同様である (O'Donoghue, 2000; Zhang et al., 2001; Tsukamoto et al., 2002; Chen et al., 2004; Denis et al., 2010)。

ラタノプロスト点眼液は多数回点眼を目的としているため、防腐剤の BAK を含んでいる。最近、防腐剤と関連したドライアイ、結膜炎、アレルギー等に関する関心が高くなっており、緑内障のように長期に使用する点眼液では防腐剤の減量や不含を求める需要が高まってきている (Baudouin et al., 2010)。近年、BAK を不含とするプロスタグランジン誘導体の有効性や安全性に関する報告がなされており、眼局所の副作用の発現率も低下している (Hommer, et al., 2010; Katz et al., 2010; Mirza et al., 2010; Miyashiro et al., 2010)。

キサラン点眼液の後発品の一つであるラタノプロスト点眼液 0.005% 「NP」は 2010 年 11 月以降、日本でのみ発売されている。同点眼液は防腐剤フリーを

可能にした点眼容器 (NP 容器) に充填されている。NP 容器は通常使用されている点眼容器と比べて、部材が多く、5つの部材 (キャップ、ノズル、ハウジング、エラストマーとボトル) から構成されている (Fig.16)。ノズル、ハウジングとエラストマーから構成されるノズルユニットには2枚のフィルター (親水性と疎水性) が装着されており、内容液を点眼する際に親水性フィルターを通過してノズルから滴下されると内圧が陰圧になるが、同時に疎水性フィルターを介して外部の空気を容器内に取り込み、内圧を元に戻す機能がある。エラストマー内にはフィルターを通過した内容液が内部に戻らないよう逆止弁を設けている。NP 容器のサイズも通常容器のそれとほぼ同じ大きさであるため、利便性を維持している。

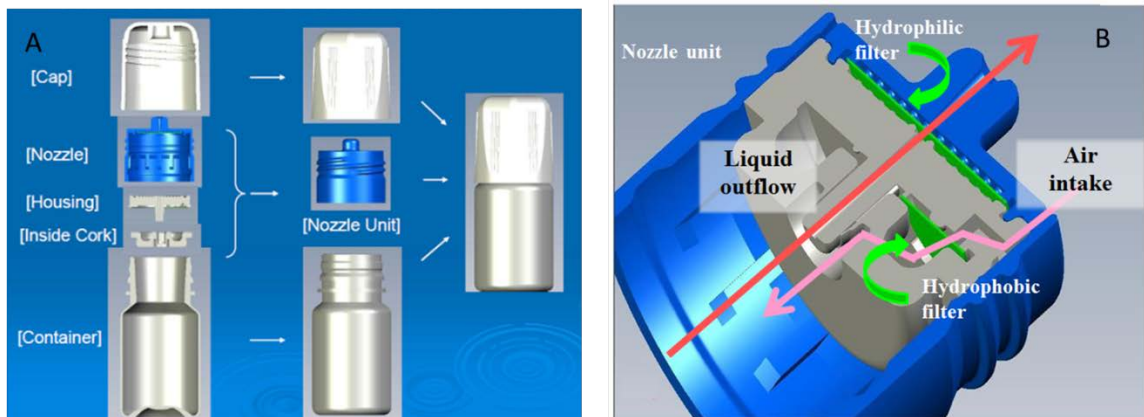


Fig. 16. None-preservative multi-dose container (NP container)

A showed structural attribute of NP container. The NP container consisted of 5 parts, cap, nozzle, housing and container. B was concept illustration of characteristics of Nozzle Unit.

緑内障治療薬を用いた細胞毒性に関して多数報告されているが、その要因の一つが配合されている防腐剤と考えられている (Baudouin et al., 2007; Ayaki et al.,

2010; Liang et al., 2011; Nakagawa et al., 2012)。今回の研究より、BAK を含まないラタノプロストが BAK を含むラタノプロストより細胞毒性の程度が顕著に小さく、*in vitro* の結果であるがより安全性の高い処方設計である事、かつこれまでに報告されてきた知見と一致している事が明らかとなった。併せて、BAK を含まないラタノプロストが酸化ストレスに対して保護効果を示すことも明らかになった。プロスタグランジン誘導体が *in vitro* の研究にて細胞保護作用や抗酸化作用を示す事が報告されているが (Guenoun et al., 2005; Yu et al., 2008) 、今回の研究結果と一致した。

BAK を含むラタノプロストと NP をサル正常眼に反復点眼した場合の房水中のラタノプロスト遊離酸の結果より、眼圧とラタノプロストの経角膜経路を介した薬物動態を比較することは有用である。ラタノプロスト遊離酸量は両剤の間で有意な差が認められなかったが、NP 点眼群は防腐剤を含むラタノプロスト点眼群と比べて低値を示す傾向が認められた。一方、眼圧下降の程度は BAK を含むラタノプロスト点眼群よりも NP 群の方が大きかった。房水中のラタノプロスト遊離酸量と最大眼圧下降作用の結果より、負の相関性があることが示唆された (Fig.17)。

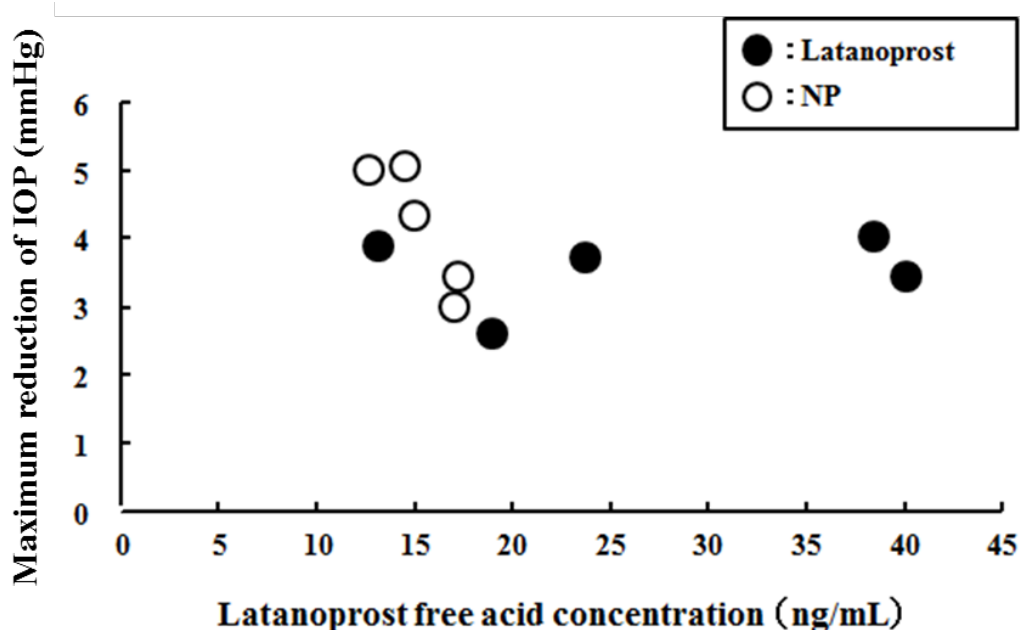


Fig. 17. Relationship between maximal reduction IOP and latanoprost free acid concentration in aqueous humor in normotensive cynomolgus monkeys.

Each dot represented individual data.

健常者へBAKを含むラタノプロストとNPを単回点眼した場合の最高眼圧変化値 ($\Delta C_{\max_{0-24h}}$) と眼圧変化値-時間曲線下面積 ($\Delta C_{\max_{0-24h}}$) の2つのパラメーターより、両剤の間で生物学的同等性があると判断され、ラタノプロスト遊離酸量に差異があったものの前述したサルでの眼圧下降作用と類似していた。

BAKを含むラタノプロスト点眼液治療していた日本人の正常眼圧緑内障患者に、今回使用したBAKを含むラタノプロスト点眼液と異なる同点眼液に切り替えて3か月点眼しても眼圧下降が維持した (Inoue et al., 2011)。BAKを含まないラタノプロスト点眼液とBAKを含むラタノプロスト点眼液の眼圧下降作用が同程度であることを示唆する知見であり、今回の研究と一致した。今後は、患者を用いた長期点眼の臨床研究で有効性そして安全性の検証が必要と考えている。

総括および結論

眼圧を制御する因子の一つが房水であるが、房水の産生量と流出量のバランスが破綻すれば、眼圧上昇に至る可能性が高い。そのため、緑内障の治療としては、薬物療法、レーザー療法、手術療法などが行われているが、第一目標としては眼圧を下げることであり、緑内障の悪化、進行を防がなければならない。

多数の緑内障治療薬が既に臨床使用されており、房水産生抑制薬、ぶどう膜強膜経路からの房水流出剤が主である。しかし主経路からの房水流出を促進させる薬剤は現在のところピロカルピンとウノプロストンしかない。そのため、新しい作用機序を有する治療薬の開発、販売が望まれている。

その一方、長期間の緑内障治療薬の点眼により、眼局所における副作用が問題となる場合がある。その要因としては主薬の他に配合される防腐剤と言われている。防腐剤は点眼液の製剤設計にあたっては必要な添加物であるが、前述の通り副作用発症の要因であり、防腐剤の減量や不含等の製剤設計の改良に製薬企業は日々取り組んでいる。

本研究では、新しい作用機序を有する緑内障治療薬、とくに主経路からの房水流出経路と線維柱帯の収縮弛緩に着目して、ブタ由来線維柱帯細胞を用いた3次元コラーゲンゲル培養方法を確立し、多種多様の薬剤を *in vitro* で簡便、かつ探索的に検討した。つぎに探索検討で得た薬剤の中より、roscovtine に着目して、動物を用いて眼圧下降作用を検討した。一方、緑内障治療薬が長期に使用されるため、副作用を軽減し眼に優しい製剤設計をする上で主薬とともに配合される防腐剤について着目し、防腐剤を含まない製剤設計をフィルター付の点眼容器を開発することで実現したので、防腐剤を含む緑内障治療薬との比較を薬理学的に検討した。

第1章では、ブタ由来線維柱帯細胞を用いた3次元コラーゲンゲル培養方法を確立し、緑内障治療薬の探索研究を行った。

- 1) ブタ由来線維柱帯から線維柱帯細胞の初代培養に成功した。
- 2) ブタ由来線維柱帯細胞を用いた3次元コラーゲンゲル培養方法を確立した。
- 3) 同方法により、CDK阻害薬 (roscovitine)、ROCK阻害薬 (Y-27632) 等の各種kinase阻害薬、アデノシン受容体作動薬 (metrifudil)、カンナビノイド受容体作動薬 (CP-55940) 等の各種受容体作動薬や拮抗薬がコラーゲンゲルの収縮を抑制することを示した。
- 4) コラーゲンゲル収縮抑制作用を示した薬剤は細胞毒性を介した場合と介さない場合に分類されることが明らかとなった。

第2章では、第1章で見出した roscovitine に着目し、動物を用いた眼圧下降作用を検討した。

- 1) Roscovitine には異性体が存在するため、両異性体を用いた家兎の眼圧下降作用を検討したところ、いずれも眼圧下降作用を示した。
- 2) 培養神経節細胞を用いたストレス負荷試験で抗ストレス作用を検討したところ、異性体のうちS体のみには保護作用が認められた。

第3章では、点眼治療時に散見される副作用の軽減を図るべく、BAK を含まない製剤設計をフィルター付の点眼容器を開発することで実現したので、BAK を含むものと BAK を含まない緑内障治療薬との比較をヒト由来角膜上皮株細胞、サルおよびヒトを用いて薬理的に検討した。

- 1) BAK を含むラタノプロスト点眼液では細胞障害性を認めたが、BAK を含まないラタノプロスト点眼液では、細胞障害性は殆ど認められなかった。

- 2) 酸化ストレスに対して、**BAK** を含まないラタノプロスト点眼液は、保護作用を示した。
- 3) **BAK** を含まないラタノプロスト点眼液をサルへ 2 か月間反復点眼しても眼圧下降作用の減弱は認められなかった。
- 4) **BAK** を含まないラタノプロスト点眼液を健常者へ単回点眼した場合でも、**BAK** を含むラタノプロスト点眼液と生物学同等性を示した。

本研究の結果より、ブタ由来線維柱帯細胞を用いた 3 次元コラーゲンゲル培養方法で簡便に緑内障治療薬のスクリーニング系を確立した。その結果、本法を用いて、現在臨床使用されている薬剤に代わる新しい薬剤を見出す創薬研究を可能にすることが示唆された。

本法で見出された **roscovitine** は正常なウサギで眼圧下降作用を示し、*in vitro* で神経保護作用を示したことから、**roscovitine** が両作用を併せ持つ次世代の緑内障治療薬になり得ることが示唆された。

BAK を含むラタノプロスト点眼液と比べて、**BAK** を含まないラタノプロスト点眼液はヒトおよびサルの正常眼圧に対する有効性に差がなく、安全性は勝るため、優れた製剤設計がなされたラタノプロスト点眼液であることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を賜り、また終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授の原英彰先生に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授の嶋澤雅光先生並びに同助教の鶴間一寛先生に深謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なる御助言を賜りました岐阜薬科大学細胞送達学大講座製剤学研究室教授の竹内洋文先生、岐阜薬科大学生体機能解析学大講座分子生物学研究室教授の古川昭栄先生並びに岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室教授の稲垣直樹先生に深謝致します。

本研究に際し、御協力と御助言を賜りました岐阜大学医学部眼科学教室教授の山本哲也先生、前大学同講師の青山裕美子先生に深謝致します。

本研究に際し、御協力と御助言を頂きました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室諸氏に感謝致します。とくに共同研究者として御協力いただきました石坂光絵修士並びに今村知代修士に厚く感謝致します。

本研究に際し、生前より本研究の機会を賜り、また御指導と御鞭撻を賜りましたわかもと製薬株式会社の前常務取締役の故白澤榮一氏に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、御支援と御鞭撻を賜りましたわかもと製薬株式会社代表取締役社長の神谷信行氏、前取締役の鈴木宏和氏、取締役の平田晴久氏に深謝致します。また、わかもと製薬株式会社医薬開発部並びに薬理研究室諸氏に心から感謝致します。とくに共同研究者として御協力を頂きました倉澤崇修士並びに高橋佑次学士に厚く感謝致します。

引用文献

相原 一 (2010) *日薬理誌*, 135, 129-133.

Alexander, J.P., Samples, J.R., Van Buskirk, E.M. and Acott, T.S. (1991) Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32**, 172-180.

Alexander, J.P., Acott, T.S. (2001) Involvement of protein kinase C in TNF α regulation of trabecular matrix metalloproteinases and TIMPs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42**, 2831-2838.

Ammar, D.A., Kahook, M.Y. (2011) Effects of benzalkonium chloride- or polyquad-preserved fixed combination glaucoma medications on human trabecular meshwork cells. *Mol Vis*, **17**, 1806-1813.

Araie, M., Shirato, S., Yamazaki, Y., Kitazawa, Y., Ohashi, Y. ; Nipradilol-Timolol Study Group. (2008) Clinical efficacy of topical nipradilol and timolol on visual field performance in normal-tension glaucoma : a multicenter, randomized, double-masked comparative study. *Jpn J Ophthalmol*, **52**, 255-64.

Assouline, M., Chew, S.J., Thompson, H.W., Beuerman, R. (1992) Effect of growth factors on collagen lattice contraction by human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **33**, 1742-1755.

Ayaki, M., Iwasawa, A., Inoue, Y. (2010) Toxicity of antiglaucoma drugs with and without benzalkonium chloride to cultured human corneal endothelial cells. *Clin Ophthalmol*, **21**, 1217-1222.

Baffa, Ldo.P., Ricardo, J.R., Dias, A.C., Módulo, C.M., Braz, A.M., Paula, J.S., Rodrigues, Mde.L, Rocha, E.M. (2008) Tear film and ocular surface alterations in chronic users of antiglaucoma medications. *Arq Bras Oftalmol*, **71**, 18-21.

Baudouin, C., Riancho, L., Warnet, J.M., Brignole, F. (2007) In vitro studies of antiglaucomatous prostaglandin analogues: travoprost with and without benzalkonium chloride and preserved latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **48**, 4123-4128.

Baudouin, C., Labbé, A., Liang, H., Pauly, A., Brignole-Baudouin, F. (2010) Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res*, **29**, 312-334.

Beilin, M., Neumann, R., Belkin, M., Green, K., Bar-Ilan, A. (2000) Pharmacology of the intraocular pressure (IOP) lowering effect of systemic dexamabinol (HU-211), a non-psychotropic cannabinoid. *J Ocul Pharmacol Ther*, **16**, 217-230.

Borderie, V.M., Mourra, N., Laroche, L. (1999) Influence of fetal calf serum, fibroblast growth factors, and hepatocyte growth factor on three-dimensional cultures of human keratocytes in collagen gel matrix. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **237**,861-869.

Byrnes, K.R., Faden, A.I. (2007) Role of cell cycle proteins in CNS injury.

Neurochem Res, **32**, 1799-1807.

Chae, H.D., Kim, B.M., Yun, U.J., Shin, D.Y. (2008) Deregulation of Cdk2 causes

Bim-mediated apoptosis in p53-deficient tumors following actin damage. *Oncogene*, **27**,

4115–4121.

Chauhan, B.C., Mikelberg, A.G. Balaszi, F.S. LeBlanc, R.P., Lesk, M.R. and Trope, G.E.

(2008) Canadian Glaucoma Study: 2. Risk factors for the progression of open-angle

glaucoma. *Arch Ophthalmol*, **126**, 1030-1036.

Chen, H., Zhang, M.C., Zhang, H.X. (2010) Effects of small interfering RNA approach to silence the connective tissue growth factor gene on the expression of the protein p27.

Zhonghua Yan Ke Za Zhi, **46**, 631-634.

Chew, P.T., Aung, T., Aquino, M.V., Rojanapongpun, P. ; EXACT Study Group. (2004)

Intraocular pressure-reducing effects and safety of latanoprost versus timolol in patients

with chronic angle-closure glaucoma. *Ophthalmology*, **111**, 427-434.

Choritz, L., Rosenthal, R., Fromm, M., Foerster, M.H., Thieme, H. (2005)

Pharmacological and functional characterization of endothelin receptors in bovine

trabecular meshwork and ciliary muscle. *Ophthalmic Res*, **37**, 179-187.

Coroneo, M.T., Korbmayer, C., Flugel, C., Stiemer, B. and Lutjen-Drecoll. E. (1991) Electrical and morphological evidence for heterogeneous populations of cultured bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*, **52**, 375-388.

Crosson, C.E. (1992) Ocular hypotensive activity of the adenosine agonist (R)-phenylisopropyladenosine in rabbits. *Curr Eye Res*, **11**, 453-458.

Crosson, C.E. (1995) Adenosine receptor activation modulates intraocular pressure in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*, **273**, 320-326.

Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P. A., Messing, R.O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**, L429-438.

Denis, P., Baudouin, C., Bron, A., Nordmann, J.P., Renard, J.P., Rouland, J.F., Sellem, E., Amrane, M. (2010) First-line latanoprost therapy in ocular hypertension or open-angle glaucoma patients: a 3-month efficacy analysis stratified by initial intraocular pressure. *BMC Ophthalmol*, **24**, 1-9

Diestelhorst, M., Krieglstein, G.K., Lusky, M., Nagasubramanian, S. (1997) Clinical dose-regimen studies with latanoprost, a new ocular hypotensive PGF2 alpha analogue. *Surv Ophthalmol*, **41**, 77-81.

Epstein, S.P., Ahdoot, M., Marcus, E., Asbell, P.A. (2009) Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther*, **25**, 113-119.

Eschenhagen, T., Fink, C., Remmers, U., Scholz, H., Wattchow, J., Weil, J., Zimmermann, W., Dohmen, H.H., Schäfer, H., Bishopric, N., Wakatsuki, T., Elson, E.L. (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix, a new heart muscle model system. *FASEB J*, **11**, 683-694.

Finesmith, T.H., Broadley, K.N. and Davidson, J.M. (1990) Fibroblasts from wounds of different stages of repair vary in their ability to contract a collagen gel in response to growth factors. *J Cell Physiol*, **144**, 99-107.

Fraunfelder, F.W. (2004) Ocular hemorrhage possibly the result of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Ocul Pharmacol Ther*, **20**, 179-182.

Georgiev, G.A., Yokoi, N., Koev, K., Kutsarova, E., Ivanova, S., Kyumurkov, A., Jordanova, A., Krastev, R., Lalchev, Z. (2011) Surface chemistry study of the interactions of benzalkonium chloride with films of meibum, corneal cells lipids, and whole tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 4645-4654.

Gills, J.P., Roberts, B.C. and Epstein, D.L. (1998) Microtubule disruption leads to cellular contraction in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**, 653-658.

Gordon, M.O., Beiser, J.A., Brandt, J.D., Heuer, D.K., Higginbotham, E.J., Johnson, C.A., Keltner, J.L., Miller, J.P., Parrish, R.K. 2nd, Wilson, M.R., Kass, M.A. (2002) The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma, *Arch Ophthalmol*, **120**, 714–720. (discussion 829-830) .

Guenoun, J.M., Baudouin, C., Rat, P., Pauly, A., Warnet, J.M., Brignole-Baudouin, F. (2005) In vitro comparison of cytoprotective and antioxidative effects of latanoprost, travoprost, and bimatoprost on conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46**, 4594-4599.

Hackett, R., McDonald, T. (1991) “Eye irritation. In: F Marzulli, H Maibach (eds) , *Advances in Modern Toxicology: Dermatotoxicology,*” Washington, DC: Hemisphere Publishing Corporation, 749-815.

Hirayama, K., Hata, Y., Noda, Y., Miura, M., Yamanaka, I., Shimokawa, H., Ishibashi, T. (2004) The involvement of the rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 3896-3903.

Hommer, A. (2010) A review of preserved and preservative-free prostaglandin analogues for the treatment of open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Today (Barc)*. **46**, 409-416.

Honjo, M., Tanihara, H., Inatani, M., Kido, N., Sawamura, T., Yue, B.Y., Narumiya, S. and Honda, Y. (2001) Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42**,137-144.

Honjo, M., Inatani, M., Kido, N., Sawamura, T., Yue, B.Y., Honda, Y. and Tanihara, H. (2002) A myosin light chain kinase inhibitor, ML-9, lowers the intraocular pressure in rabbit eyes. *Exp Eye Res*, **75**, 135-142.

Hotehama, Y., Mishima, H.K., Kitazawa, Y., Masuda, K. (1993) Ocular hypotensive effect of PhXA41 in patients with ocular hypertension or primary open-angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol*, **37**, 270-4.

Hwang, S.G., Song, S.M., Kim, J.R., Park, C.S., Song, W.K., Chun, J.S. (2007) Regulation of type II collagen expression by cyclin-dependent kinase 6, cyclin D1 and p21 in articular chondrocytes. *IUBMB Life*, **59**, 90-98.

Inoue, K., Okugawa, K., Kato, S., Inoue, Y., Tomita, G., Oshika, T., Amano, S. (2003) Ocular factors relevant to anti-glaucomatous eyedrop-related keratoepitheliopathy. *J Glaucoma*, **12**, 480-485.

Inoue, K., Masumoto, M., Wakakura, M., Tomita, G. (2011) Ocular hypotensive effects and safety latanoprost without benzalkonium. *Journal of the Eye*, **28**, 1635-1639.

Iwase, A., Suzuki, Y., Araie, M., Yamamoto, T., Abe, H., Shirato, S., Kuwayama, Y., Mishima, H.K., Shimizu, H., Tomita, G., Inoue, Y., Kitazawa, Y. Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society. (2004) The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology*, **111**, 1641-1648.

Jaenen, N., Baudouin, C., Pouliquen, P., Manni, G., Figueiredo, A., Zeyen, T. (2007) Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *Eur J Ophthalmol*, **17**, 341-349.

Jarvinen, T., Pate, D.W., Laine, K. (2002) Cannabinoids in the treatment of glaucoma. *Pharmacol Ther*, **95**, 203-220.

Johnstone, M., Tanner, D., Chau, B. and Kopecky, K. (1980) Concentration-dependent morphologic effects of cytochalasin B in the aqueous outflow system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **19**, 835-841.

Johnson, D.H., Tschumper, R.C. (1993) Ethacrynic acid: outflow effects and toxicity in human trabecular meshwork in perfusion organ culture. *Curr Eye Res*, **12**, 385-396.

Johnson, D.H. (1997) The effect of cytochalasin D on outflow facility and the trabecular meshwork of the human eye in perfusion organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **38**, 2790-2799.

Kashiwagi, K., Tsumura, T., Tsukahara, S. (2008) Long-term effects of latanoprost monotherapy on intraocular pressure in Japanese glaucoma patients. *J Glaucoma*, **17**, 662-666.

Kashiwagi, K. (2010) Changes in trend of newly prescribed anti-glaucoma medications in recent nine years in a Japanese local community. *Open Ophthalmol J*, **28**, 7-11.

Katchanov, J., Harms, C., Gertz, K., Hauck, L., Waeber, C., Hirt, L., Priller, J., von Harsdorf, R., Bruck, W., Hortnagl, H., Dirnagl, U., Bhide, P.G., Endres, M. (2001) Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci*, **21**, 5045-5053.

Kato, H., Takahashi, A., Itoyama, Y. (2003) Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull*, **60**, 215-221.

Katz, G., Springs, C.L., Craven, E.R., Montecchi-Palmer, M. (2010) Ocular surface disease in patients with glaucoma or ocular hypertension treated with either BAK-preserved latanoprost or BAK-free travoprost. *Clin Ophthalmol*, **3**, 1253-61.

Khurana, R.N., Deng, P.F., Epstein, D.L., Vasantha Rao, P. (2003) The role of protein kinase C in modulation of aqueous humor outflow facility. *Exp Eye Res*, **76**, 39-47.

- Kirwan, R.P., Leonard, M.O., Murphy, M., Clark, A.F., O'Brien, C.J. (2005)
Transforming growth factor-beta-regulated gene transcription and protein expression in human GFAP-negative lamina cribrosa cells. *Glia*, **52**, 309-24.
- Klein, R., Klein, B.E., Tomany, S.C., Danforth, L.G., Cruickshanks, K.J. (2003)
Relation of statin use to the 5-year incidence and progression of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol*, **121**, 1151-1155.
- Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L. (2002) Pharmacological inhibitors of cyclindependent kinases. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 417-425.
- Koga, T, Koga, T, Awai, M., Tsutsui, J., Yue, B.Y., Tanihara, H. (2006) Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*, **82**, 362-370.
- Laufs, U., Kilter, H., Konkol, C., Wassmann, S., Böhm, M., Nickenig, G. (2002) Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res*, **53**, 911-920.
- Lepple-Wienhues, A., Stahl, F., Willner, U., Schafer, R., Wiederholt, M. (1991)
Endothelin-evoked contractions in bovine ciliary muscle and trabecular meshwork: interaction with calcium, nifedipine and nickel. *Curr Eye Res*, **10**, 983-989.

Leske, M.C., Connell, A.M., Wu, S.Y., Hyman, L.G., Schachat, A.P.(1995) Risk factors for open-angle glaucoma. The Barbados Eye Study. *Arch Ophthalmol*, **113**, 918-924.

Liang, H., Pauly, A., Riancho, L., Baudouin, C., Brignole-Baudouin, F. (2011) Toxicological evaluation of preservative-containing and preservative-free topical prostaglandin analogues on a three-dimensional-reconstituted corneal epithelium system. *Br J Ophthalmol*, **95**, 869-875.

Liu, X., Cai, S., Glasser, A., Volberg, T., Polansky, J.R., Fauss, D.J., Brandt, C.R., Geiger, B., Kaufman, P.L. (2001) Effect of H-7 on cultured human trabecular meshwork cells. *Mol Vis*, **7**, 145-153.

Liu,X., Wu, Z., Sheibani, N., Brandt, C.R., Polansky, J.R. and Kaufman, P.L. (2003) Low dose latrunculin-A inhibits dexamethasone-induced changes in the actin cytoskeleton and alters extracellular matrix protein expression in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*, **77**, 181-188.

Liton, P.B., Luna, C., Challa, P., Epstein, D.L., Gonzalez, P. (2006) Genome-wide expression profile of human trabecular meshwork cultured cells, nonglaucomatous and primary open angle glaucoma tissue. *Mol Vis*, **12**, 774-790.

Masuda, Y., Horiguchi, H., Dumoulin, S.O., Furuta, A., Miyauchi, S., Nakadomari, S., Wandell, B.A. (2010) Task-dependent V1 responses in human retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **51**, 5356-5364.

McGwin, G. Jr., McNeal, S., Owsley, C., Girkin, C., Epstein, D., Lee, P.P. (2004) Statins and other cholesterol-lowering medications and the presence of glaucoma. *Arch Ophthalmol*, **122**, 822-826.

Mellor, H., Parker, P.J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, **332**, 281-292.

Menn, B., Bach, S., Blevins, T.L., Campbell, M., Meijer, L., Timsit, S. (2010) Delayed treatment with systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection and inhibits in vivo CDK5 activity increase in animal stroke models. *PLoS ONE*, **5**, e12117.

Mirza, S.K., Johnson, S.M. (2010) Efficacy and patient tolerability of travoprost BAK-free solution in patients with open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Clin Ophthalmol*, **9**, 877-888.

Mishima, H., Hibino, T., Hara, H., Murakami, J., Otori, T. (1998) SPARC from corneal epithelial cells modulates collagen contraction by keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**, 2547-2553.

Miyake, K., Ibaraki, N., Goto, Y., Oogiya, S., Ishigaki, J., Ota, I., Miyake, S. (2003) ESCRS Binkhorst lecture 2002 : Pseudophakic preservative maculopathy. *J Cataract Refract Surg*, **29**, 1800-1810.

Miyashiro MJ, Lo SC, Stewart JA, Stewart WC. (2010) Efficacy, safety, and tolerability of travoprost 0.004% BAK-free versus prior treatment with latanoprost 0.005% in Japanese patients. *Clin Ophthalmol*, **23**, 1355-1359.

Nakamura, Y., Hirano, S., Suzuki, K., Seki, K., Sagara, T., Nishida, T. (2002) Signaling mechanism of TGF-beta1-induced collagen contraction mediated by bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43**, 3465-3472.

Nakagawa, S., Usui, T., Yokoo, S., Omichi, S., Kimakura, M., Mori, Y., Miyata, K., Aihara, M., Amano, S., Araie, M. (2012) Toxicity evaluation of antiglaucoma drugs using stratified human cultivated corneal epithelial sheets. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **53**, 5154-5160.

Nakamura, Y., Sagara, T., Seki, K., Hirano, S., Nishida, T. (2003) Permissive effect of fibronectin on collagen gel contraction mediated by bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **44**, 4331-4336.

Newton, A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, **270**, 28495-28498.

Newton, A.C. (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 161-167.

Nho, R.S., Hergert, P., Kahm, J., Jessurun, J., Henke, C. (2011) Pathological alteration of FoxO3a activity promotes idiopathic pulmonary fibrosis fibroblast proliferation on type I collagen matrix. *Am J Pathol*, **179**, 2420-2430.

O'Donoghue, E.P. (2000) A comparison of latanoprost and dorzolamide in patients with glaucoma and ocular hypertension: a 3 month, randomised study. Ireland Latanoprost Study Group. *Br J Ophthalmol*, **84**, 579-82.

Porter, R.A., Brown, R.A., Eastwood, M., Occeleston, N.L., Khaw, P.T. (1998) Ultrastructural changes during contraction of collagen lattices by ocular fibroblasts. *Wound Repair Regen*, **6**, 157-166.

Quigley, H.A. (1996) Number of people with glaucoma worldwide. *British Journal of Ophthalmology*, **80**, 389-393.

Ramachandran, C., Patil, R.V., Sharif, N.A., Srinivas, S.P. (2011) Effect of elevated intracellular cAMP levels on actomyosin contraction in bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 1474-1485.

Rao, P.V., Deng, P.F., Kumar, J., Epstein, D.L. (2001) Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42**, 1029-1037.

Rashidian, J., Iyirhiaro, G.O., Park, D.S. (2007) Cell cycle machinery and stroke. *Biochim Biophys Acta*, **1772**, 484-493.

Raymond, M.C., Thompson, J.T. (1990) RPE-mediated collagen gel contraction. Inhibition by colchicine and stimulation by TGF-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **31**, 1079-1086.

Rohen, J.W., Schachtschabel, O.O. and Matthiessen, P.F. (1975) In vitro studies on the trabecular meshwork of the primate eye. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, **193**, 95-107.

Schöcklmann, H.O., Lang, S., Kralewski, M., Hartner, A., Lüdke, A., Sterzel, R.B. (2000) Distinct structural forms of type I collagen modulate cell cycle regulatory proteins in mesangial cells. *Kidney Int*, **58**, 1108-1120.

Sarkar, J., Chaudhary, S., Namavari, A., Ozturk, O., Chang, J.H., Yco, L., Sonawane, S., Khanolkar, V., Hallak, J., Jain, S. (2012) Corneal neurotoxicity due to topical benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **53**, 1792-802.

Shearer, T.W., Crosson, C.E. (2002) Adenosine A1 receptor modulation of MMP-2 secretion by trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43**, 3016-3020.

Shimazawa, M., Inokuchi, Y., Ito, Y., Murata, H., Aihara, M., Miura, M., Araie, M., Hara, H. (2007) Involvement of ER stress in retinal cell death. *Mol Vis*, **13**, 578-587.

Smeeth, L., Hubbard, R., Fletcher, A.E. (2003) Cataract and the use of statins: a case-control study. *QJM*, **96**, 337-343.

Stevens, A.M., Kestelyn, P.A., De Bacquer, D., Kestelyn, P.G. (2012) Benzalkonium chloride induces anterior chamber inflammation in previously untreated patients with ocular hypertension as measured by flare meter: a randomized clinical trial. *Acta Ophthalmol*, **90**, e221-224.

Stumpff, F., Que, Y., Boxberger, M., Strauss, O., Wiederholt, M. (1999) Stimulation of maxi-K channels in trabecular meshwork by tyrosine kinase inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 1404-1417.

Stumpff, F., Boxberger, M., Krauss, A., Rosenthal, R., Meissner, S., Choritz, L., Wiederholt, M., Thieme, H. (2005) Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork. *Exp Eye Res*, **80**, 697-708.

Takamoto, M., Kaburaki, T., Mabuchi, A., Araie, M., Amano, S., Aihara, M., Tomidokoro, A., Iwase, A., Mabuchi, F., Kashiwagi, K., Shirato, S., Yasuda, N., Kawashima, H., Nakajima, F., Numaga, J., Kawamura, Y., Sasaki, T., Tokunaga, K. (2012) Common variants on chromosome 9p21 are associated with normal tension glaucoma. *PLoS ONE*, **7**, e40107.

Taniguchi, T., Okada, K., Haque, M.S., Sugiyama, K., Kitazawa, Y. (1994) Effects of endothelin-1 on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in the rabbit eye. *Curr Eye Res*, **13**, 461-464.

Tian, B., Kaufman, P.L., Volberg, T., Gabelt, B.T. and Geiger, B. (1998) H-7 disrupts the actin cytoskeleton and increases outflow facility. *Arch Ophthalmol*, **116**, 633-643.

Tian, B., Gabelt, B.T., Kaufman, P.L. (1999) Effect of staurosporine on outflow facility in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 1009-1011.

Thieme, H., Nass, J.U., Nuskovski, M., Bechrakis, N.E., Stumpff, F., Strauss, O., Wiederholt, M. (1999) The effects of protein kinase C on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 3254-3261.

Thieme, H., Nuskovski, M., Nass, J.U., Pleyer, U., Strauss, O., Wiederholt, M. (2000) Mediation of calcium-independent contraction in trabecular meshwork through protein kinase C and rho-A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 4240-4246.

Thimgan, M.S. and Yee, H.F., Jr (1999) Quantitation of rat hepatic stellate cell contraction: stellate cells' contribution to sinusoidal resistance. *Am J Physiol*, **277**, G137-G143.

Timsit, S., Menn, B.C. (2007) Cerebral ischemia, cell cycle elements and Cdk5. *Biotechnol J*, **2**, 958-966.

Tsukamoto, H., Mishima, H.K., Kitazawa, Y., Araie, M., Abe, H., Negi, A. ; Glaucoma Study Group. (2002) A comparative clinical study of latanoprost and isopropyl unoprostone in Japanese patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *J Glaucoma*, **11**, 497-501.

Volberg, T., Tian, B., Kaufman, P.L., Geiger, B. (2002) Tyrphostins which interfere with the actin cytoskeleton do not increase outflow facility. *Exp Eye Res*, **74**, 411-416.

Wiederholt, M., Dorschner, N. and Groth, J. (1997) Effect of diuretics, channel modulators and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork. *Ophthalmologica*, **211**, 153-160.

Wiederholt, M., Groth, J. and Strauss, O. (1998) Role of protein tyrosine kinase on regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**, 1012-1020.

Wilson, H.L., Schwartz, D.M., Bhatt, H.R., McCulloch, C.E., Duncan, J.L. (2004) Statin and aspirin therapy are associated with decreased rates of choroidal neovascularization among patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*, **137**, 615-624.

Xu, S., Roychowdhury, S., Gaskin, F., Epstein, D.L. (1992) Ethacrynic acid inhibition of microtubule assembly in vitro. *Arch Biochem Biophys*, **296**, 462-467.

Yamamoto, M., Nakamura, H., Yamato, M., Aoyagi, M., Yamamoto, K. (1996)

Retardation of phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells in three-dimensional primary culture. *Exp Cell Res*, **225**, 12-21.

Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y., Ogura Y. (2001) Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **52**, 25-36.

Yu, A.L., Fuchshofer, R., Kampik, A., Welge-Lüssen, U. (2008) Effects of oxidative stress in trabecular meshwork cells are reduced by prostaglandin analogues. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **49**, 4872-4880.

Yun, A.J., Murphy, C.G., Polansky, J.R., Newsome, D.A. and Alvarado, J.A. (1989) Proteins secreted by human trabecular cells. Glucocorticoid and other effects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **30**, 2012-2022.

Zhang, W.Y., Po, A.L., Dua, H.S., Azuara-Blanco, A.Br. (2001) Meta-analysis of randomised controlled trials comparing latanoprost with timolol in the treatment of patients with open angle glaucoma or ocular hypertension. *J Ophthalmol*, **85**, 983-990.

略語一覧表

acetylated low density lipoprotein	: Ac-LDL
Association of Vision Research in Ophthalmology	: ARVO
basic fibroblast growth factor	: FGF
benzalkonium chloride	: BAK
connective tissue growth factor	: CTGF
cyclin-dependent kinase	: CDK
1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate	: DiI
Dulbecco's Modified Eagle Medium	: DMEM
epidermal growth factor	: EGF
fetal bovine serum	: FBS
Hank's Balanced Salt Solution	: HBSS
human corneal epithelial cells	: HCECs
liquid chromatography-mass spectrometry	: LC/MS
matrix metalloproteinase	: MMP
normal tension glaucoma	: NTG
oxygen and glucose deprivation	: OGD
myosin light chain kinase	: MLCK
primary angle closure glaucoma	: PACG
platelet-derived growth factor	: PDGF
phorbol 12-myristate 13-acetate	: PMA
phosphoinositide 3-kinase	: PI3-K

porcine trabecular meshwork cells	: pTM
propidium iodide	: PI
recombinant human epidermal growth factor	: EGF
Rho-associated protein kinase	: ROCK
secondary glaucoma	: SG
supplemental hormonal epithelial medium	: SHEM
transforming growth factor	: TGF
tissue inhibitors of matrix metalloproteinase	: TIMP