涙液層の不安定化による眼疾患の 機構解明と治療に関する研究

2019

下川 達張

目	次
---	---

緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1
第一章 : 正常ヒト角膜細胞を用いた in vitro ドライアイモデルにおける乾燥スト
レスが及ぼす細胞内 ROS 量と老化関連因子への影響
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17
第二章 : 正常ヒト角膜細胞を用いた in vitro ドライアイモデルにおける抗酸化物
質の効果
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・24
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30
第三章: In vivo ドライアイモデルにおける乾燥ストレスと老化関連因子
の関係及び抗酸化物質のドライアイ予防効果
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・48

本研究は、涙液層の不安定化による眼疾患の機構解明と治療に関するものである。 ドライアイは多因子性疾患であり、世界中で多くの患者が存在することから一般的な眼 疾患として認識されている。治療薬について、投薬期間が長いことからアドヒアランス の低下を招きやすく、より効果的な治療薬の開発が望まれている。ドライアイの原因と して涙液の過度な蒸散に伴う乾燥ストレスや高浸透圧ストレスが挙げられ、これらが酸 化ストレスを誘導すると報告されていることから酸化ストレスとドライアイ発症の密 接な関係が示されている。一方でドライアイの罹患率は年齢と共に増加することから、 加齢に伴う疾患であるとも考えられている。酸化ストレスが関与する生命現象として老 化があり、ドライアイの発症にも関連していることが考えられることから、乾燥ストレ スにより生じる酸化ストレスが、p21、p53 及び p16 といった老化関連因子の遺伝子発 現亢進を誘導するのではないかと仮説を立てた。この仮説に基づき、in vitro ドライアイ モデルを用いて乾燥ストレスが酸化ストレスや老化関連因子に及ぼす影響を評価した。 その結果、乾燥ストレスにより細胞内 related oxygen species(ROS)量が増加し、老化 関連因子の遺伝子発現が亢進することを確認した。続いて抗酸化物質が酸化ストレスの 増加を抑制することで老化関連因子の遺伝子発現亢進を抑制しドライアイ治療薬にな り得るとの仮説を立て、in vitro ドライアイモデルを用いて抗酸化剤である Astaxanthin (Asx)を含有したリポソーム製剤が細胞内 ROS 量及び老化関連因子の遺伝子発現に及 ぼす影響について評価した。その結果、細胞内 ROS 量の増加及び老化関連因子の遺伝 子発現亢進はAsx 含有リポソーム製剤処理により抑制され、わずかに正に荷電したリポ ソーム製剤は中性リポソーム製剤に対し細胞親和性が高くより効果的であった。更に in

ッシュス製制は中国ウボジュス製制に対し細胞親相国が高くより効果的であらた。受に m vivo ラットドライアイモデルを用いて、乾燥ストレスと点状表層角膜症並びに老化関連 因子の関係について評価し、抗酸化剤のドライアイ治療薬としての可能性について検証 を行った。その結果、点状表層角膜症の悪化に伴う老化関連因子の遺伝子発現亢進を認 めた。Asx 含有リポソーム点眼製剤反復投与を行った結果、点状表層角膜症の悪化及び 老化関連因子の遺伝子発現亢進が抑制された。In vivo ラットドライアイモデルにおいて も、正荷電 Asx 含有リポソーム製剤で高いドライアイ予防効果を確認した。正荷電 Asx 含有リポソーム製剤は細胞との親和性が高く、角膜上皮から角膜内皮への拡散が少なく 角膜上皮中の Asx 濃度が高いことから、より効果的であると推察された。

今後 in vitro 及び in vivo ドライアイモデルを用いた抗酸化作用に基づくドライアイ 治療薬の探索が活性化され、更には物理化学的特性により眼疾患への適用が困難であっ た薬物に正荷電リポソーム製剤技術を適用することによるドラッグリポジショニング が推進されることにより、ドライアイの治療が発展していくことが期待される。

緒論

ドライアイは現在、日本を中心としたアジア圏では「*様々な要因により涙液 層の安定性が低下する疾患であり、眼不快感や視機能異常を生じ、眼表面の障害 を伴うことがある*」と定義される疾患である^{1,2)}。ここでは、ドライアイの本質は 涙液層の安定性の低下と考えられており、この涙液層の安定性は涙液量、涙液の 質、角結膜上皮の状態、眼瞼の状態など数多くの因子によって決定される。

これに対し、現在欧米では「Dry eye is a multifactorial disease of the tears and ocular surface that results in symptoms of discomfort, visual disturbance, and tear film instability with potential damage to the ocular surface. It is accompanied by increased osmolarity of the tear film and inflammation of the ocular surface.」と定義されているが ^{3,4}、元来、涙液層の浸透圧上昇、特に眼表面の炎症がドライアイの本質であると 考えられてきた⁵。

ドライアイについて多くの疫学的調査が行われており、居住する地域やその 環境、人種及び各国の診断基準により罹患率は変動し0.4-33%であると報告されて おり、バラつきはあるもののドライアイは世界中で確認される一般的な疾患とし て理解されている^{6,7)}。更にドライアイの罹患率は、西欧諸国と比較しアジア諸国 でより高いことが示唆されており⁶、日本のみならず韓国や、特に中国において その疾患に対する認識が変化してきている。ドライアイ発症の原因は、温度、湿 度、気流及び紫外線を含む光照射といった環境的要因、パソコン、タブレットや スマートフォンを使用するVisual Display Terminal作業、コンタクトレンズの着用、 化学物質や物理的要因など多岐にわたる。その症状としては、眼の乾燥感、かす み眼や異物感といった視機能異常から慢性的な炎症や痛みが挙げられ、これらを 複合的に伴うことにより著しくQuality of Lifeを低下させる疾患である。

ドライアイの発症する部位は角膜であるが、この角膜は眼球の最外層に位置 する組織である。5 層から構成される組織で、他の組織と最も異なる点として血 管を欠いた構造が挙げられる。角膜上皮は基底層から表層まで 5~6 層の細胞から なる厚さ約 50 µm の非角質化重層扁平上皮である。上皮内には多数の神経終末が みられ、第5 脳神経の脊索神経を介して瞬目反射の求心性の部分を構成する。ボ ウマン膜は細胞外基質に埋め込まれた細かな膠原線維からなり、厚さ 8~10 µm である。角膜固有質は角膜の主要な部分で、板状膠原繊維の 60~70 層のシートが 細胞外基質に埋め込まれた構造をしており、角膜の機械的な強度に寄与している。 デスメ膜は角膜の内層に存在する厚さ 7~10 µm の透明な層である。角膜内皮は



角膜の最内層に位置する1層の細胞からなり、前眼房に面している。

Figure 1. 角膜の構造

角膜上皮の外層には涙液が存在しており、この涙液は油層と液層に分類され る。油層は液層の水分蒸発の抑制、眼表面の透明性の維持、細菌や塵埃・花粉等 からの眼を保護するなど様々な役割を果たす⁸⁾。この油層の本質はマイボーム腺 より分泌されるマイバムと呼ばれる脂質で、種々の極性、非極性脂質の複雑な混 合物であり、ワックスエステル、コレステリルエステル、ジエステル、トリアシ ルグリセロール、遊離脂肪酸、リン脂質を含んでいる^{8,9)}。一方で液層のほとんど は水分で、種々の電解質、サイトカイン、ケモカイン、タンパク質、糖タンパク 質を含んでおり、特に糖タンパク質であるムチンが涙液中の水分蒸発抑制におい て重要な役割を果たす⁸⁻¹¹⁾。ムチンのコアタンパクは MUC と呼ばれ、ヒトでは約 20 種類のムチン遺伝子が知られており^{12,13)}、涙液中のムチンは分泌型ムチンと膜 型ムチンとに分類される。分泌型ムチンは結膜杯細胞から涙液中に分泌され、液 層をゲル化することにより水分揮散を抑制するとともに瞬目時の眼瞼と眼球との



Figure 2. 涙液の構造

潤滑性向上及び外界からの異物を除去する役割を果たし、その主成分は MUC5AC である^{8,14,15)}。これに対し角膜上皮細胞より分泌される膜型ムチンは、細胞に結合 しており角膜の濡れ性や保水性の向上及び異物から角膜上皮細胞を保護する役割 を果たす。その成分は、主に MUC1、MUC4 及び MUC16 であり、これらの中で も最も大きな分子である MUC16 が重要であるといわれている^{8,14,15)}。

ドライアイの治療について人工涙液が世界共通として用いられているが、こ れは単に水分を補うことを目的としている。その他の治療薬に関して、日本を含 むアジア圏と欧米諸国との間でドライアイの定義が異なることから、承認され臨 床利用されている薬物が異なる。

ドライアイの本質は、涙液層の安定性の低下であると定義する日本を中心と したアジア圏では、涙液層の安定性低下の原因を探る眼表面の層別診断(Tear FilmOriented Diagnosis: TFOD)、およびそれをもとに治療法を決定する眼表面の 層別治療(Tear Film Oriented Therapy: TFOT)の有用性が提唱されている^{1,2)}。TFOT は、局所治療の選択により眼表面を層別に治療して涙液層の安定性をさらに高め ることにより、より効果的にドライアイを治療するという概念である。

これに基づいて日本では、ドライアイ治療薬として幾つかの製剤が承認され 臨床利用されている。涙液中の水分揮散を防ぐとともに涙液の眼表面への貯留時 間を延長することを目的として粘性を有する水溶性高分子が用いられるが、現在 日本で承認され、広く臨床利用されているものとしてはヒアルロン酸ナトリウム が挙げられる。複数の報告において、ヒアルロン酸ナトリウム点眼剤により、涙 液層の安定性、眼表面の完全性及び患者の症状が改善されることが示されている ¹⁶⁻¹⁸⁾。ヒアルロン酸ナトリウムが涙液中分泌型ムチンの水分揮散抑制効果を補助 する役割で使用されることに対し、生理学的に涙液中分泌型ムチンや角結膜の膜 型ムチンの分泌を促進することを目的として臨床利用されているものとして、ジ クアホソルナトリウムやレバミピドが挙げられる。ジクアホソルナトリウムは、 眼瞼、眼球結膜、角膜上皮やマイボーム腺で見られるプリン受容体に分類される P2 受容体の一種である P2Y2 受容体のアゴニストであり、角結膜からの涙液分泌 を促進するとともに結膜杯細胞からのムチン分泌を増加させることにより、ドラ イアイ症状を改善することが示されている¹⁹⁻²¹⁾。レバミピドは、分泌型及び膜型 ムチンの分泌、及び結膜杯細胞数を増加させると共に、眼表面における炎症性サ イトカイン産生を抑制することにより角結膜上皮細胞障害を改善することが示さ れている^{22,23)}。これら3種の既承認薬の薬理・薬効作用からも、ドライアイ治療 における涙液層の安定性改善が重要視されていることが良く分かる。

これに対し欧米においては、ドライアイの本質は、涙液異常により涙液の浸

透圧が上昇することで炎症を生じ、その結果眼表面における角膜上皮障害を招き、 更に涙液異常が悪化するという悪循環を招くことにあると考えられてきた²⁴⁻²⁶⁾。 そのため眼表面の炎症を抑制することを目的として、免疫抑制剤として良く知ら れるシクロスポリンAが広く臨床で使用されている^{27,28)}。シクロスポリンAの 水に対する溶解度は 0.0000312g/mL、pH7.0 リン酸緩衝液に対する溶解度は 0.0000178g/mL と非常に低い²⁹⁾ことから、最初はシクロスポリンAを単純にエマ ルジョン又はミセル化にした製剤が開発された²⁸⁾。近年ではシクロスポリン A の効果を高めると共に投与回数を減少することを目的として、カチオン性エマル ジョン製剤が欧州で承認された^{30,31)}。これらのことからも、ドライアイ治療にお いて抗炎症効果を期待したシクロスポリンAの重要性が分かる。

2016年米国にて、リフィテグラスト点眼薬が承認された。CD4 陽性 T 細胞は ドライアイに関与する浸潤細胞と考えられており、T 細胞は炎症性サイトカイン やケモカインの放出を招くことが報告されている^{32,33)}。リンパ球機能関連抗原-1

(Lymphocyte Function-Associated Antigen-1: LFA-1) と細胞間接着分子-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1: ICAM-1) は、相互作用することによりT細胞 の増殖/活性化、サイトカイン放出及び炎症部位へのT細胞の遊走を促進する³⁴⁾。 リフィテグラストはLFA-1がICAM-1と結合することを競合的に阻害し抗炎症作 用を示すことがドライアイ治療に有効であると報告されている^{35,36)}。これらの事 実からも、欧米ではドライアイが炎症性疾患として認識されていることがわかる。

その他の治療戦略として、ドライアイと酸化ストレスとの関係が近年注目されている。Meganらはヒト角膜上皮細胞を高浸透圧培地で処理した *in vitro*ドライアイモデルを用いて、緑茶ポリフェノールである没食子酸エピガロカテキン

(Epigallocatechin Gallate; EGCG)のドライアイに対する効果を報告している³⁷⁾。 細胞を高浸透圧培地で処理することで認められる p38/c-Jun N-terminal kinase (JNK)のリン酸化亢進は、この高浸透圧培地に 3-30 µM となる様 EGCG を添加 することで有意に抑制された。更にグルコースオキシダーゼ処理により増加する 細胞内活性酸素種(related oxygen species; ROS)量は、3-30 µM EGCG で前処理 することにより有意に抑制され、いずれの結果もドライアイに対する EGCG の抗 酸化作用の有用性を示している。同様のモデルを用いて、Yanwei らはヒドロキシ ラジカルスカベンジャーであるエダラボンの効果に関して報告している³⁸⁾。高浸 透圧培地で細胞を 24 時間処理することで細胞内やミトコンドリア内の ROS 量が 増加したことに対し、10-20 µM エダラボン前処理により有意に抑制され、更に アポトーシスに関しても抑制効果を認めた。すなわちエダラボンはドライアイ治 療薬の候補になり得ると述べている。

様々な in vivo ドライアイモデルが検討され、酸化ストレスと抗酸化剤の効果 に関する報告がされている。Nakamura らは、Jogging Board と呼ばれる装置を用 いてラットの瞬目を抑制し、更に低湿気流で曝露することでドライアイモデルを 作成している³⁹⁾。このラットドライアイモデルの角膜において、酸化ストレスマ ーカーである 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)、Malondialdehyde (MDA) 及び 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE)の増加を認めており、ドライアイ発症メカニ ズムと酸化ストレスの関係を示している。Higuchi らは、眼窩外涙腺摘出ラットド ライアイモデルを用いて、抗酸化タンパク質の一つであるセレノプロテインPと 酸化ストレスの関係について報告している⁴⁰⁾。涙腺摘出による涙液低下に伴い、 術後4週間で角膜障害及び8-OHdGが増加し、5-50 μg/mL セレノプロテインPを 反復投与することで角膜障害や酸化ストレス増加予防が可能であると述べている。 更にドライアイ患者の涙液中セレノプロテインP量が健常者と比較して有意に低 いことを示しており、ドライアイ患者の角膜表面ではセレン不足に伴うグルタチ オンペルオキシダーゼ合成低下により酸化ストレスが増加すると報告している。 Evgeni らはウサギを全身麻酔し最長で6時間の開眼を維持することで作成したド ライアイモデルを用いて、10-(6'-plastoquino- nyl) decyltriphenylphosphonium bromide(SkQ1; Fig. 3)の効果について報告している⁴¹⁾。SkQ1 とは葉緑体の主要キ ノンであるプラストキノン誘導体であり、同様に抗酸化作用を示すユビキノン誘 導体10-(6'-ubiquinonyl)decyltriphenylphosphoni-um bromide(MitoQ; Fig. 3)と比較し、 抗酸化作用は4倍強く還元体の抗酸化作用と酸化体の酸化作用の有効濃度幅が広



Figure 3. 構造式

(A) 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium bromide(SkQ1)及び (B) 10-(6'-ubiquinonyl)decyltriphenylphosphonium bromide(MitoQ)

い。前述のウサギドライアイモデルにおいて全身麻酔処理前後で SkQ1 を投与したところ、前投与により有意なドライアイ症状の予防効果が認められた。これは 涙液中の抗酸化活性の上昇、炎症性サイトカイン分泌の減少及び抗炎症性サイト カイン分泌の亢進に基づくことが示されている。

これらの論文をはじめ、多くの報告によりドライアイの発症メカニズムと酸 化ストレスの関係が示され、*in vitro*及び *in vivo*ドライアイモデルによって抗酸化 物質の有用性が示唆されている。そこで著者は、ドライアイと酸化ストレスの関 係について *in vitro*ドライアイモデル及び *in vivo* ラットドライアイモデルを用い て解明するとともに、抗酸化効果を有する物質として知られているアスタキサン チンの効果について評価を行うこととした。

第一章

正常ヒト角膜細胞を用いた in vitro ドライアイモデルにおける乾燥ストレスが 及ぼす細胞内 ROS 量と老化関連因子への影響

1.1 緒言

ドライアイは、涙液の不安定化や高浸透圧化を伴う涙液層の恒常性の喪失、 及び眼表面の炎症や損傷を特徴とする多因子性疾患である⁴⁾。ドライアイは世界 中で多くの患者が存在することから一般的な眼疾患として認識されており、その 罹患率は、居住する環境や診断のクライテリアにより変動し0.3~33%といわれて いる^{6,7)}。ドライアイの治療薬として最も良く知られているものとしてシクロスポ リンが挙げられるが、それ以外にも例えば人工涙液、ステロイド、ジクアホソル ナトリウム、レバミピド及びリフィテグラストが臨床で使用されている。これら の薬物治療では、ある一定の効果は認められているものの、投薬期間が長いこと からアドヒアランスの低下を招きやすく、より効果的な治療薬の開発が望まれて いる。

ドライアイの原因の一つとして、涙液量の減少、涙液層の不安定化及び過度 な涙液蒸散が挙げられるが、これらが乾燥ストレスや高浸透圧ストレスを引き起 こすと考えられている^{4,42)}。これらのストレスは、ミトコンドリアの脱分極に伴 うミトコンドリア機能不全を引き起こし、更にミトコンドリア呼吸鎖の障害によ り ROS が産生され、この ROS が DNA Damage Response(DDR)を介して DNA の転写複製を阻害することが知られている^{38,44)}。実際、*in vitro* 及び *in vivo* ドライ アイモデルにおいてミトコンドリア損傷、ROS 量及び 8-OHDG、MDA や 4-HNE といった酸化ストレスマーカーが上昇することが示されており、これらの報告は 酸化ストレスとドライアイ発症の密接な関係を示唆している^{38,39,45,46)}。

また、ドライアイは加齢に伴う疾患であるとも考えられており、ドライアイ 罹患率は年齢と共に増加することが多くの報告で示されている^{6,47-49}。性差につい ても女性は男性よりもドライアイ発症のリスクが高く、その差は加齢とともに大 きくなることが示されている⁶。老化プロセスは、一般的にサイクリン E-サイク リン依存性キナーゼ (Cyclin-dependent kinase; Cdk) 2 複合体を阻害する p53/p21 経 路、及びサイクリン D-Cdk4 複合体やサイクリン D-Cdk6 複合体を阻害する p16 の活性化を伴う細胞周期停止により説明され、これらの老化関連因子は様々な内 因性及び外因性ストレスにより活性化することも知られている^{50,51)}。特に p53/p21 経路は DDR により刺激され、この経路における p53 の安定化及び p21 の転写活 性化を介して Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) 又は Ataxia Telangiectasia and Rad3-related (ATR) kinase が細胞周期進行を阻害、すなわち細胞周期停止を引き 起こす⁵²⁾。

酸化ストレスが関与する生命現象として老化があり、ドライアイの発症にも 関連していることが考えられる^{53,54)}ことから、乾燥ストレスにより生じる酸化ス トレスが、p21、p53 及び p16 といった老化関連因子の遺伝子発現亢進を誘導する のではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するために、正常ヒト角膜上皮

(normal Human Corneal Epithelial; HCE) 細胞を用いた *in vitro* ドライアイモデル により細胞内 ROS 量と老化関連因子の遺伝子発現との関係性について評価を行 った。

1.2 実験方法

1.2.1 細胞及び試薬

正常ヒト角膜組織から単離し2次培養したHCE細胞はクラボウより購入した。 培地として OcuLife Basal Medium、OcuLife Lifefactor (構成:L-Glutamin 15 mL、 rh-Insulin 0.5 mL, Epinephrine bitartrate 0.5 mL, Apo-transferrin 0.5 mL, Bovine pituitary extract 2 mL、Hydrocortisone hemisuccinate 0.5 mL、OcuFactor 1 mL 及び Gentamicin-Amphotericin B 0.5 mL) をクラボウより購入した。継代用試薬として トリプシン/EDTA 溶液 (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfornicacid; HEPES 緩衝タイプ)及びトリプシン中和液(HEPES 緩衝タイプ)を、細胞保存用試薬と してラボバンカー2(無血清タイプ)をクラボウより購入した。Phosphate-buffered saline (PBS) は日水製薬より購入した。24 mm Transwell with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert は Corning より購入した。トリパンブルーは和光純 薬工業より購入した。Total ROS Detection Kit は Enzo Life Sciences より購入した。 RNeasy Plus Mini kit は Qiagen より購入した。PrimeScript RT master Mix(Perfect Real Time)はタカラバイオより購入した。Ultra Pure DNase/RNase Free Distilled Water は Invitrogen より購入した。SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)はタカラバイオよ り購入した。Table 1 に示すプライマーはユーロフィンジェノミクスより購入した。 特に記述が無い限り、試薬については市販の特級のものを使用した。

Gene	Forward	Reverse
p16	GGCACCAGAGGCAGTAACCA	CCTACGCATGCCTGCTTCTACA
p21	GTTCCTTGTGGAGCCGGAGC	GGTACAAGACAGTGACAGGTC
p53	TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC	AGGACAGGCACAAACACGCACC
β-actin	CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC	CGTACTGGTCTTTGCGGATGTC

Table 1. 第一章で使用したプライマー配列

1.2.2 細胞の立ち上げ及び凍結保存

OcuLife Basal Medium 485 mL に OcuLife Lifefactor (構成: L-Glutamin 15 mL、 rh-Insulin 0.5 mL、Epinephrine bitartrate 0.5 mL、Apo-transferrin 0.5 mL、Bovine pituitary extract 2 mL、Hydrocortisone hemisuccinate 0.5 mL、OcuFactor 1 mL 及び Gentamicin-Amphotericin B 0.5 mL)を添加し、良く混合することで OcuLife 完全培

地を調製した。凍結された HCE 細胞懸濁液が入った細胞凍結保存用チューブを 37℃の恒温槽で加温し、HCE 細胞懸濁液を解凍した。細胞懸濁液 1 mL を、あら かじめ 37℃に加温した OcuLife 完全培地 4 mL を添加した 15 mL コニカルチュー ブへ添加しよく混合した。細胞懸濁液 20 µL を 1.5 mL マイクロチューブに採取 し、そこへ濃度が 0.3%となるように PBS ヘトリパンブルーを溶解させたトリパ ンブルー染色液 20 µL を添加し、血球計数板を用いて細胞数を計数後、1.0×105 cells/60 mm dish となるように 60 mm dish へ播種し、37℃、5%CO2インキュベー ターで培養した。OcuLife 完全培地は2日毎に交換し、80%コンフルエント状態に なるまで培養した。培養した HCE 細胞の培地を除去し PBS 2 mL で洗浄後、トリ プシン/EDTA 溶液 0.5 mL を添加し、37℃、5%CO2インキュベーターで5分間イ ンキュベートした。トリプシン中和液 0.5 mL 及び OcuLife 完全培地 0.5 mL を添 加しピペッティングすることにより懸濁させた後、この細胞懸濁液 20 µL を 1.5 mLマイクロチューブに採取しトリパンブルー染色液 20 µLを更に加え、血球計 数板を用いて細胞数を計数した。1500 rpm、25℃で3分間遠心分離した後、上澄 を除去し5×10⁵ cells/mL となるようにラボバンカー2(無血清タイプ)を加え軽 くピペッティングした。細胞凍結保存用チューブへ細胞懸濁液 1 mL を添加し、 -80℃で 24 時間凍結した後に-196℃で保存した。なお本手法にて得た細胞をスト ック細胞とした。

1.2.3 In vitro ドライアイモデルの作成

In vitro ドライアイモデルは、Higuchi らの方法 ⁵⁵⁾を一部変更して作成した。 凍結されたストック細胞が入った細胞凍結保存用チューブを 37℃の恒温槽で加 温し、ストック細胞を解凍した。60 mm dish にストック細胞 1 mL 及び OcuLife 完全培地 2 mL を添加し、37℃、5%CO₂インキュベーターで 1~2 日毎に培地を 交換し 80%コンフルエント状態になるまで培養した。OcuLife Basal Medium 485 mL に OcuLife Lifefactor から Hydrocortisone hemisuccinate を除いた構成成分を添加 し、良く混合することで OcuLife 完全培地 without Hydrocortisone を調製した。1.2.2 の方法により得た HCE 細胞懸濁液を 24 mm Transwell with 0.4 μ m Pore Polycarbonate Membrane Insert のトランズウェルインサートへ7.5×10⁴ cells 播種し た。プレートウェルへ 2.6 mL、トランズウェルインサートへ培地量として 1.4 mL となるように OcuLife 完全培地 without Hydrocortisone を添加し、37℃、5%CO₂イ ンキュベーターで 48 時間培養した。48 時間後、24 mm Transwell with 0.4 μ m Pore Polycarbonate Membrane Insert をクリーンベンチへ移動させ、プレートウェル及び トランズウェルインサートの培地を除去した後にプレートウェルへ OcuLife 完全 培地 without Hydrocortisone 1.3 mL を添加した。24 mm Transwell with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert の上カバーを外し、トランズウェルインサート上の HCE 細胞をクリーンベンチ内で 0、0.5、1 及び 2 時間乾燥処理した。乾燥処理終 了時に PBS 1 mL をトランズウェルインサートへ添加した。

1.2.4 細胞生存率測定

1.2.3 の 24 mm Transwell with 0.4 μ m Pore Polycarbonate Membrane Insert からト ランズウェルインサートを採り出し、PBS を除去し更に PBS 1 mL で洗浄後、ト リプシン/EDTA 溶液 0.5 mL を添加し、37°C、5%CO₂インキュベーターで 3 分間 インキュベートした。トリプシン中和液 0.5 mL を添加しピペッティングするこ とにより懸濁させた後、細胞懸濁液全量を 2 mL マイクロチューブに採取した。 このトランズウェルインサートへ OcuLife 完全培地 without Hydrocortisone 1 mL を 添加し、同じ 2 mL マイクロチューブに採取した。6000 rpm、25°Cで 3 分間遠心 分離した後、上澄を除去し OcuLife 完全培地 without Hydrocortisone 0.5 mL を加え 軽くピペッティングした。細胞懸濁液 30 μ L を 1.5 mL マイクロチューブに採取 しトリパンブルー染色液 30 μ L を更に加え、血球計数板を用いて生細胞数を計数 した。

1.2.5 細胞内 ROS 測定

細胞透過性を有する ROS 検出試薬が ROS によって酸化されることにより緑 色の蛍光化合物を産生することを利用した Total ROS Detection Kit を用いて細胞 内 ROS 測定を行った。本試薬は、ROS の前駆体であるスーパーオキサイドを除 く過酸化水素、ペルオキシナイトライト、一重項酸素及びヒドロキシラジカルと いった細胞内で生成し得る ROS と反応する。Total ROS Detection Kit の Detection Reagent に N,N-dimethylformamide 60 µL を添加し、ROS Detection Solution を調製 した。OcuLife 完全培地 without Hydrocortisone 10 mL あたり ROS Detection Solution 2 µL を添加し、よく混合した。1.2.3 のトランズウェルインサートの PBS 及びプ レートウェルの OcuLife 完全培地 without Hydrocortisone を除去し、プレートウェ ルへ 2.6 mL、トランズウェルインサートへ 1.4 mL の ROS Detection Solution 含有 OcuLife 完全培地 without Hydrocortisone を添加し、37°C、5%CO₂インキュベータ ーで 30 分間インキュベートした。30 分後、1.2.4 に従い生細胞数を計数した。6000 rpm、25℃で 3 分間遠心分離した後、上澄を除去し 5×10⁴ cells/100 μL となるよう に PBS を加え軽くピペッティングし調製した細胞懸濁液 100 μL を 96 ウェルプレ ート (Black) へ添加した。励起波長 488 nm、蛍光波長 520 nm の条件でマイクロ プレートリーダーにより蛍光強度を測定した。

1.2.6 Total RNA 抽出

1.2.3 のトランズウェルインサートの PBS 及びプレートウェルの OcuLife 完全 培地 without Hydrocortisone を除去し、RNeasy Plus Mini kit の Buffer RLT Plus 350 µL をトランズウェルインサートへ添加した。200 µL 用チップを装着したマイクロピ ペットで 20 回以上ピペッティングすることで、トランズウェルインサート上の HCE 細胞を剥離及びホモジナイズし、これを RNeasy Plus Mini kit の 2 mL コレク ションチューブにセットされた gDNA Eliminator スピンカラムへ全量採取した。 15000 rpm、25℃で1分間遠心分離した後、gDNA Eliminator スピンカラムを廃棄 し、2 mL コレクションチューブ中のろ液に 70% エタノール 350 µL を添加後ピペ ッティングすることで混合した。混液を2 mL コレクションチューブにセットさ れた RNeasey スピンカラムへ全量採取し、15000 rpm、25℃で1分間遠心分離し た後、2 mL コレクションチューブのろ液を廃棄し、RNeasey スピンカラムへ同じ 2 mL コレクションチューブをセットした。RNeasy Plus Mini kit の Buffer RW1 700 μLを2mL コレクションチューブにセットされた RNeasey スピンカラムへ添加し、 15000 rpm、25℃で1分間遠心分離した後、2 mL コレクションチューブのろ液を 廃棄し、RNeasey スピンカラムへ同じ2mL コレクションチューブをセットした。 エタノールで4倍希釈した RNeasy Plus Mini kit の Buffer RPE 500 µL を2 mL コレ クションチューブにセットされた RNeasey スピンカラムへ添加し、15000 rpm、 25℃で 1 分間遠心分離した後、2 mL コレクションチューブのろ液を廃棄し、 RNeasey スピンカラムへ新しい2mL コレクションチューブをセットした。15000 rpm、25℃で2分間遠心分離することで完全にろ液を除去した後、RNeaseyスピ ンカラムヘセットした2mL コレクションチューブを1.5mL コレクションチュー ブに交換し、RNase-free water 50 µL を RNeasey スピンカラムのろ膜へ添加した。 2~3 分間室温で放置した後、15000 rpm、25℃で2 分間遠心分離した。その後、 Nanophotometer にて 230 nm、260 nm 及び 280 nm の波長で吸光度を測定し、total RNA 濃度及び精製度を確認した。

1.2.7 逆転写反応

氷上において、0.2 μL PCR チューブに、1.2.6 の total RNA 溶液(200 ng)及 び PrimeScript RT master Mix(Perfect Real Time)の 5 × PrimeScript RT Master Mix(Perfect Real Time) 2 μL を添加し、そこへ Ultra Pure DNase/RNase Free Distilled Water を全量 10 μL となるように添加した。軽く撹拌し卓上遠心機でスピンダウ ンさせた後、MJ Mini Personal Thermal Cycler にセットした。37℃で 15 分間の逆転 写反応を行った後、85℃で 5 秒間の逆転写酵素の熱失活を行った。

1.2.8 Real time PCR

p21、p53、p16 及び β-actin について、Thermal Cycler Dice Real Time System III により real time PCR 測定を行い、得られた結果について β-actin を内部標準物質として p21、p53 及び p16 の相対的発現量を 2^{-ΔΔCT} 値法にて求めた。

1.2.8.1 p53 及び β-actin

PCR プレートに、SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)の SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)(×2) 12.5 µL、cDNA サンプル 2 µL、プライマー(Table 1) 0.2 µL ずつ及び Ultra Pure DNase/RNase Free Distilled Water 10.1 µL を添加し、ピペッ ティングで混合した後、初期変性として 95℃で 30 秒間を 1 cycle、95℃で 5 秒間、65℃で 30 秒間を 40 cycle の条件で反応を行った。

1.2.8.2 p21

PCR プレートに、SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)の SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)(×2) 12.5 µL、cDNA サンプル 2 µL、プライマー(Table 1) 0.2 µL ずつ及び Ultra Pure DNase/RNase Free Distilled Water 10.1 µL を添加し、ピペッ ティングで混合した後、初期変性として 95℃で 30 秒間を 1 cycle、95℃で 5 秒間、65℃で 1 分間を 50 cycle の条件で反応を行った。

1.2.8.3 p16

PCR プレートに、SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)の SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)(×2) 12.5 µL、cDNA サンプル 2 µL、プライマー(Table 1) 0.1 µL ずつ及び Ultra Pure DNase/RNase Free Distilled Water 10.3 µL を添加し、ピペッ ティングで混合した後、初期変性として 95℃で 30 秒間を 1 cycle、95℃で 5 秒間、

65℃で1分間を 50 cycle の条件で反応を行った。

1.2.9 統計解析

Student's *t*-test を用いて統計解析を行った。**p*<0.05、#*p*<0.01 を用いて有意差を示した。

1.3 結果

1.3.1 In vitro ドライアイモデルにおける細胞生存率及び細胞内 ROS 量の評価

In vitro ドライアイモデルは、Higuchi らの方法⁵⁵⁾を一部変更して作成した。 すなわち 24 mm Transwell with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert のトラン ズウェルインサート上で培養した HCE 細胞について、プレートウェルに培地を 添加した状態でクリーンベンチ内で0.5~2時間蓋を開放した状態で乾燥処理を行 うことで作成した。この *in vitro* ドライアイモデルにおいて、細胞生存率と過酸化 水素、ペルオキシナイトライト、一重項酸素及びヒドロキシラジカルといった細 胞内で生成し得る ROS を測定することで、乾燥処理時間との関係性について評価 を行った。その結果、乾燥処理時間の延長に伴う細胞生存率の低下が確認された。 特に乾燥処理 0 時間に対し、乾燥処理 1 時間以上で有意な細胞生存率の低下が認 められた(Fig.4A)。これに対し細胞内 ROS 測定を実施した結果、乾燥処理時間 に依存した細胞内 ROS 量の増加を認め、乾燥処理 0 時間に対し乾燥処理 0.5 時間



Figure 4. In vitro ドライアイモデルにおける乾燥処理時間が細胞生存率及び細胞内 ROS 量へ及ぼす影響

In vitro ドライアイモデルにおける細胞生存率(A)及び細胞内 ROS 量(B)の評価 結果を示す。(平均値±SD、n=3、*p<0.05、#p<0.01 versus 乾燥処理時間 0 時間)

1.3.2 In vitro ドライアイモデルにおける老化関連因子の遺伝子発現の評価

In vitro ドライアイモデルにおいて、乾燥処理時間と p53、p21 及び p16 といった老化関連因子の遺伝子発現の関係について評価を行った。その結果、p53 において乾燥処理 0 時間と比較し乾燥処理 0.5 時間で顕著な遺伝子発現の亢進が確認され、この現象は乾燥処理 2 時間まで継続することが明らかとなった (Fig. 5A)。これに対し、p21 に関して乾燥処理 0 時間と比較し乾燥処理 0.5 時間では有意な遺伝子発現の亢進は認められなかったものの、乾燥処理 1 時間以降 2 時間まで継続した遺伝子発現の有意な亢進が認められた (Fig. 5B)。p16 において乾燥処理 0 時間と比較し乾燥処理時間 0.5 時間以降 2 時間まで乾燥処理時間に依存した遺伝子発現の顕著な亢進が確認された (Fig. 5C)。



Figure 5. In vitro ドライアイモデルにおける乾燥処理時間が老化関連因子の遺伝子発現へ及ぼす影響

In vitro ドライアイモデルにおける p53(A)、p21(B)及び p16(C)の遺伝子発現評価結果を示す。(平均値±SD、n=3、*p<0.05、#p<0.01 versus 乾燥処理0時間)

1.4 考察

In vitro ドライアイモデルを用いて、乾燥ストレスが老化関連因子へ及ぼす影響を評価した。In vitro ドライアイモデルにおいて乾燥処理の延長に伴う生細胞数の減少及び細胞内 ROS 量の増加が確認された (Fig.4)。更に細胞内 ROS 量の増加 に伴い、p53 や p21、更には p16 といった老化関連因子の遺伝子発現亢進が確認された (Fig.5)。これらのことから、ドライアイ発症メカニズムとして乾燥ストレスが老化に関与することが示され、その工程で酸化ストレスが重要な役割を果たすことが示された。

以上のことより、第一章にて乾燥ストレスにより生じる酸化ストレスが老関 連因子の遺伝子発現亢進を誘導するとの仮説について検証したが、この結果より 抗酸化物質を用いることで酸化ストレスの増加を抑制し老化関連因子の遺伝子発 現亢進を抑制することができるとの仮説を立てるに至った。そこで次章にて、in vitroドライアイモデルにおける抗酸化物質の影響を検証した。

第二章

正常ヒト角膜細胞を用いた in vitro ドライアイモデルにおける抗酸化物質の効果

2.1 緒言

ドライアイ発症には過度な涙液蒸散や涙液の不安定化が深くかかわっており、 更にドライアイは加齢に伴う疾患であると考えられていることから、第一章にお いて *in vitro* ドライアイモデルを用いて乾燥ストレスが及ぼす細胞内 ROS 量と老 化関連因子の遺伝子発現への影響を評価した。その結果、乾燥ストレスにより生 じる酸化ストレスが、老化関連因子の遺伝子発現亢進を誘導するとの結論に至っ た。この結論を基に、抗酸化物質は乾燥ストレスに基づく酸化ストレスの増加を 抑制することで老化関連因子の遺伝子発現亢進を抑制し、ドライアイ治療薬の候 補になり得るのではないかとの仮説を立てた。

この仮説を検証するために抗酸化物質として、アスタキサンチン (Astaxanthin; Asx、3,3'-dihydroxy-b, b-carotene-4,4'-dione、Fig. 6)を選択した。 Asx は藻類、魚類又は鳥類でみられる一般的な赤色の色素である^{56,57)}。化粧品原 料や栄養補助食品原料として世界中で使用されており、その安全性はヒトにおい ても証明されている。Asx は生体膜の脂質過酸化の阻害や一重項酸素産生の抑制 において、β-カロテンや α-トコフェロールといった他の代表的な抗酸化物質より も作用が強力であるとの報告がある⁵⁸⁻⁶³⁾。更に Asx はヒドロキシラジカルに対し て高い消去作用を有していることから、酸化ストレスに起因する疾患の発症を予 防することができると考えられている^{63,64)}。しかしながら、Asx は非常に高い疎 水性を有しており、通常は水溶性製剤である点眼製剤への適用は困難であること



Figure 6. アスタキサンチン (Astaxanthin; Asx) の構造式

が予想された。また点眼投与された製剤中の薬物は通常、涙腺から鼻涙管へと流 れる排液機構により眼における滞留時間が短いことからバイオアベイラビリティ ーが低いことが知られており、仮に Asx を水溶性点眼製剤とすることができたと しても、この問題点を解決する必要があると考えた。

Asx の点眼製剤化に関する問題点の解決方法として、分子中に親水性及び疎水性基を有する脂質、例えばリン脂質により二重膜構造を形成するリポソーム製剤の適用が考えられた。そこでAsx のリポソーム製剤化について検討を行い、次に第一章で評価を行った*in vitro*ドライアイモデルを用いてAsx含有リポソーム製剤の細胞内 ROS 量や老化関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響を評価した。

2.2 実験方法

2.2.1 試薬

L- α -Phosphatidylcholine from Egg yolk (Egg Phosphatidylcholine; EPC) は SIGMA-ALDRICH より購入した。COAT SOME CL-8181TA (1,2-Dioleoyloxy-3-3trimethylammonium propane chloride; DOTAP) は日油より購入した。アスタキサ ンチン、藻由来 細胞生物学用は富士フイルム和光純薬工業より購入した。Aminophenyl fluorescein (APF) は五稜化薬より購入した。1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) は Invitrogen より購入し た。特に記述が無い限り、試薬については市販の特級のものを使用した。

2.2.2 リポソーム製剤調製

Asx 3mg を量り採り、クロロホルムで溶解させ 25 mL とし、200 µM Asx 溶液 を調製した。EPC 384 mg を量り採り、99%エタノールで溶解させ 25 mL とし 20 mM EPC 溶液を調製した。DOTAP 349.25 mg を量り採り、クロロホルムで溶解さ せ 25 mL とし 20 mM DOTAP 溶液を調製した。Table 2 に示す各溶液を試験管へ添 加し、ボルテックス処理したものをドラフト内で水浴温度 40°Cの条件下で窒素乾 固させた。クロロホルム 100 µL を添加しボルテックス処理したものを再び窒素 乾固させ、PBS 200 µL 添加しパラフィルムで蓋をした後 15 分間静置した。ボル テックス処理し試験管内面の薄膜を完全に剥離した後、30 秒間超音波処理するこ とで薄膜を分散させた。細孔径 0.2 µm のフィルターを装着したエクストルーダー で 10 回処理することによりサイズ調整及び滅菌し、EPC リポソーム製剤(E-lipo)、 Asx 含有 EPC リポソーム製剤(E/Asx-lipo)、EPC/DOTAP リポソーム製剤(E/D-lipo) 及び Asx 含有 EPC/DOTAP リポソーム製剤(E/D/Asx-lipo)を調製した。各リポソ ーム製剤 25 µL とイオン交換蒸留水 825 µL を混合したものをキャピラリーセル

	添加量(μL)			
	E-lipo	E/Asx-lipo	E/D-lipo	E/D/Asx-lipo
 200µM Asx溶液	-	200	-	200
20mM EPC溶液	200	200	180	180
20mM DOTAP溶液	-	-	20	20
クロロホルム	100	100	100	100

Table 2. 各リポソーム調製時の各溶液添加量

へ全量採り、ゼータサイザーナノ ZS で粒子径及びゼータ電位を測定した。

2.2.3 リポソーム製剤中 Asx 濃度測定

クロロホルム:メタノール=2:1の混液にE/Asx-lipo又はE/D/Asx-lipo 40 µLを 加え撹拌溶解し 1 mLとした。これとは別に一定量の200 µM Asx溶液、20 mM EPC 溶液、又は20 mM EPC溶液及び20 mM DOTAP溶液を試験管へ添加し、クロロホル ム:メタノール=2:1の混液で溶解し 1 mLとすることにより検量線サンプルを 調製した。Nanophotometerにより波長 470 nmにおける吸光度を測定し、検量線サ ンプルの結果を回帰分析することで得た検量線を用いて各リポソーム中のAsx濃 度を算出した。

2.2.4 ヒドロキシラジカル測定

ヒドロキシラジカル消去能については、ヒドロキシラジカルやパーオキシニ トライトを選択的に検出できるAPFを用いた。すなわち、フェントン反応により 生じたヒドロキシラジカルによりAPFのアミノフェニル基が脱離することでフル オレセインが生成する原理を利用し、フルオレセインの蛍光強度を測定すること により評価した。APF 80 µLにPBS 3920 µLを添加し100 µM APF溶液を調製した。 イオン交換蒸留水へ0.1 N 塩酸を滴下し酸性 (pH 4.5) 水を調製した。硫酸鉄(II) 2.78 mgを量り採り、酸性 (pH 4.5) 水で溶解させ 10 mLとし1 mM 硫酸鉄水溶液 を調製した。過酸化水素水 (30%) 113.7 µLを量り採り、イオン交換蒸留水で10 mL に希釈し10 mM過酸化水素水を調製した。氷冷下、マイクロチューブに各リポソ ーム製剤1.5~45 µL、100 µM APF溶液 60 µL、1 mM 硫酸鉄水溶液 60 µL、イオ ン交換蒸留水 75~118.5 µLを添加しよく混合した。10 mM過酸化水素水 60 µLを 加えよく混合し60秒後の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nmの条件で測定した。

2.2.5 In vitro ドライアイモデルの作成

凍結されたストック細胞が入った細胞凍結保存用チューブを37℃の恒温槽で 加温し、ストック細胞を解凍した。60 mm dishにストック細胞 1 mL及びOcu- Life 完全培地 2 mLを添加し、37℃、5%CO₂インキュベーターで1-2日毎に培地を交換 し80%コンフルエント状態になるまで培養した。OcuLife Basal Medium 485 mLに OcuLife LifefactorからHydrocortisone hemisuccinateを除いた構成成分を添加し、良 く混合することでOcuLife完全培地without Hydrocortisoneを調製した。1.2.2の方法 により得たHCE細胞懸濁液を24 mm Transwell with 0.4 μ m Pore Polycarbonate Membrane Insertのトランズウェルインサートへ7.5 × 10⁴ cells播種した。プレート ウェルへ2.6 mL、トランズウェルインサートへ培地量として1.4 mLとなるように OcuLife完全培地without Hydrocortisoneを添加し、37°C、5%CO₂インキュベーター で48時間培養した。48時間後、24 mm Transwell with 0.4 μ m Pore Polycarbonate Membrane Insertをクリーンベンチへ移動させ、プレートウェル及びトランズウェ ルインサートの培地を除去した後にプレートウェルへOcuLife完全培地without Hydrocortisone 1.3 mLを添加した。24 mm Transwell with 0.4 μ m Pore Polycarbonate Membrane Insertの上カバーを外し、トランズウェルインサート上のHCE細胞をク リーンベンチ内で乾燥処理した。乾燥処理時間は第一章の結果より、細胞内ROS 量及び老化関連因子の遺伝子発現に最も影響を及ぼす2時間とした。乾燥処理終了 時にPBS 1 mLをトランズウェルインサートへ添加した。

2.2.6 各リポソーム製剤による in vitro ドライアイモデルの前処置

*In vitro*ドライアイモデルの乾燥処理直前、プレートウェル及びトランズウェ ルインサートの培地を除去し、Asx濃度が 0.2~10 μ MとなるようにE/Asx-lipo又は E/D/Asx-lipoを、vehicleとしてE-lipo又はE/D-lipoをOcuLife完全培地without Hydrocortisoneへ分散させ、プレートウェルへ 2.6 mL、トランズウェルインサー トへ 1.4 mL 添加し、37℃、5%CO2インキュベーターで1時間インキュベートした。

2.2.7 リポソームの HCE 細胞に対する相互作用

DiI 4.7 mgを量り採り、クロロホルムに溶解させ 25 mLとし 200 μ M DiI溶液 を調製した。2.2.2のE/Asx-lipo及びE/D/Asx-lipo調製時において、更に200 μ M DiI 溶液 20 μ Lを添加しDiI標識化E/Asx-lipo及びE/D/Asx-lipoを調製した。凍結された ストック細胞が入った細胞凍結保存用チューブを37℃の恒温槽で加温し、ストッ ク細胞を解凍させた。1.0×10⁵ cellsとなるように35 mm dishへ播種し、37℃、5%CO₂ インキュベーターで48時間培養した。培地を除去後、Asx濃度が0.2、1.0、2.0及び 10 μ MとなるようにOcuLife完全培地without HydrocortisoneへDiI標識化E/Asx-lipo 及びE/D/Asx-lipoを添加した培地2 mLを添加し、37℃、5%CO₂インキュベーター で1時間培養した。培地を除去後PBS 1 mLで3回洗浄し、OcuLife完全培地 1 mLを 添加し蛍光顕微鏡 (Axio Vert.A1) で画像を撮影した。培地を除去後、 n-octyl-b-D-glucosideをPBSに1%溶解させたlysis buffer 200 µLを添加し、37℃、 5%CO₂インキュベーターで20分間インキュベートした。200 µLのチップを装着し たピペットで30回以上ピペッティングすることでホモジナイズした細胞溶解液を 1.5 mLマイクロチューブへ全量移した。5000×g、4℃で10分間遠心分離した後、 上澄 100 µLをマイクロプレートへ添加した。これとは別に、Asx濃度が0.04、0.2、 0.4、2及び4 µMとなるようにDiI標識化E/Asx-lipo及びE/D/Asx-lipoを添加したlysis bufferを調製し、検量線サンプルとして100 µLをマイクロプレートへ添加した。マ イクロプレートリーダーにより励起波長549 nm、蛍光波長592 nmの条件で蛍光強 度を測定した。検量線サンプルの結果を回帰分析することで得た検量線を用いて 各サンプルのDiI濃度を算出した。

2.2.8 統計解析

Student's *t*-testを用いて統計解析を行った。**p*<0.05、#*p*<0.01を用いて有意差を示した。

2.3 結果

2.3.1 リポソーム製剤の物理化学的性質

調製した各リポソーム製剤の物理化学的性質及びヒドロキシラジカル消去能 について評価を行った。各リポソームの平均粒子径は約145 nmであり、平均多分 散度指数 (polydispersity index; PDI) は約0.325であり粒度分布プロファイルはい ずれも単一ピークを示したことから、均質なリポソーム製剤であると判断された (Table 3)。Asx含有の有無に関わらず、EPCからなるリポソーム製剤はゼータ電 位がそれぞれ-3.04 mV及び-3.08 mVであったことより中性の電荷を、EPC及び DOTAPからなるリポソーム製剤はゼータ電位がそれぞれ6.19 mV及び7.82 mVで あったことよりわずかに正の電荷を帯びており、期待した製剤が得られたことが 確認された (Table 3)。E/Asx-lipo及びE/D/Asx-lipoに封入されたAsx濃度を吸光度 測定により評価したところ、それぞれ99.2%及び99.4%とほぼ理論値であることが

確認された(Table 3)。

ヒドロキシラジカル消去能については、リポソーム中の脂質による影響が少 なからず存在することを想定し、E/Asx-lipoについては同じリポソーム量となるよ うに調整したE-lipo、また同様にE/D/Asx-lipoについても同じリポソーム量になる ように調整したE/D-lipoに対する消去比率として算出した。その結果E/Asx-lipo及 びE/D/Asx-lipoはいずれも同様なヒドロキシラジカル消去能を示し、そのヒドロキ シラジカル消去能はリポソームに含有されるAsx濃度に依存していた(Fig. 7)。す なわち今回調製したリポソーム製剤を構成する脂質組成はヒドロキシラジカル消 去能へ影響を及ぼさないことが示唆された。

Table 3.	各リボソームの物理化学的性質

	E-lipo	E/Asx-lipo	E/D-lipo	E/D/Asx-lipo
Asx理論濃度 (µM)	-	200	-	200
EPC濃度 (mM)	200	200	180	180
DOTAP濃度 (mM)	-	-	20	20
平均粒子径(nm)	145.0 ± 28.8	119.1 ± 8.5	158.5 ± 38.1	138.4 ± 7.4
PDI	0.353 ± 0.112	0.291 ± 0.058	0.357 ± 0.051	0.297 ± 0.072
ゼータ電位 (mV)	-3.04 ± 0.35	-3.08 ± 0.43	6.19 ± 0.35	7.82 ± 0.78
Asx濃度 (µM)	-	198.3 ± 7.3	-	198.7 ± 5.4

PDI: polydispersity index (多分散指数; 粒度分布の広がりを示す無次元指数、 平均値±SD、n=5)



Figure 7. 水溶液系におけるE/Asx-lipo及びE/D/Asx-lipoのヒドロキシラジカル 消去能曲線

各測定ポイントにおいてリポソーム量が同一となるように調整した E-lipo 又は E/D-lipo に対する E/Asx-lipo (●) 又は E/D/Asx-lipo (△) のヒドロキシラジカ ル消去比率として算出した。(平均値±SD、n=5)

2.3.2 E/Asx-lipo が in vitro ドライアイモデルの細胞生存率、細胞内 ROS 量及び老 化関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響の評価

*In vitro*ドライアイモデルに関して、第一章の結果を勘案し乾燥処理時間は細胞内ROS量及び老化関連因子の遺伝子発現に最も影響を及ぼす2時間とした。また、各リポソーム製剤の影響を評価するために、*in vitro*ドライアイモデルの乾燥処理 直前、各リポソーム製剤をOcuLife完全培地without Hydrocortisoneへ分散させ、37℃、5%CO₂インキュベーターで1時間インキュベートした。

ビークルであるE-lipoを用いて前処理を行った場合、ネガティブコントロール 群と比較し細胞生存率、細胞内ROS量及び老化関連因子の遺伝子発現に対して影 響は認められなかった(Fig. 8)。この結果とは対照的にE/Asx-lipoで前処理を行っ た場合、ネガティブコントロール群と比較し細胞生存率に関しては2 µM以上の Asx濃度で改善を、細胞内ROS量に関しては1 µM以上のAsx濃度で抑制を認め、い ずれの効果に関してもAsx濃度に依存していた(Fig.8A及びB)。更にE/Asx-lipo は ネガティブコントロール群と比較し、p53及びp16については1 µM以上、p21につ いては2 µM以上のAsx濃度で遺伝子発現の亢進を有意に抑制しており、この現象 もAsx濃度依存的であった(Fig.8C~E)。特に、10 µM E/Asx-lipoで前処理を行っ た場合、ほぼ完全に老化関連因子の遺伝子発現亢進を抑制していた(Fig.8C~E)。





Figure 8. *In vitro*ドライアイモデルにおける各評価項目に対するE/Asx-lipo又はE-lipo前処理の影響

細胞生存率(A)、細胞内 ROS 量(B)、p53(C)、p21(D) 又は p16(E)の遺 伝子発現に対する E/Asx-lipo 又は E-lipo 前処理の効果(平均値±SD、n=3-5、 *p<0.05、 $^{#}p<0.01$ versus ネガティブコントロール;リポソーム製剤前処理無且 つ乾燥処理有(\blacksquare)、 $^{\dagger}p<0.01$ versus コントロール;リポソーム製剤前処理無且 つ乾燥処理無(\Box)

2.3.3 正荷電リポソーム製剤に含有された Asx の乾燥処理に対する効果

次に、*in vitro*ドライアイモデルをAsx含有正荷電リポソーム製剤である E/D/Asx-lipoで前処理し、得られた結果について中性電荷を有するE/Asx-lipoの結 果と比較することとした。ビークルであるE/D-lipoを用いて前処理を行った場合、 ネガティブコントロール群と比較し細胞生存率、細胞内ROS量び老化関連因子の 遺伝子発現亢進に対して影響は認められず、この結果は前述したE-lipoと同様な結



Figure 9. *In vitro*ドライアイモデルにおける各評価項目に対するE/D/Asx-lipo 又はE/D-lipo前処理の影響

細胞生存率(A)、細胞内 ROS 量(B)、p53(C)、p21(D) 又はp16(E)の遺 伝子発現に対する E/D/Asx-lipo 又は E/D-lipo 前処理の効果(平均値±SD、n=3-5、 *p<0.05、 $^{#}p<0.01$ versus ネガティブコントロール(\blacksquare);リポソーム製剤前処 理無且つ乾燥処理有、 $^{\dagger}p<0.01$ versus コントロール;リポソーム製剤前処理無 且つ乾燥処理無(\Box)

果であった(Fig.9)。一方E/D/Asx-lipoを用いた前処理により、ネガティブコント ロール群と比較し細胞内ROS量の増加が有意に抑制され(Fig.9B)、同様に老化関 連因子の遺伝子発現亢進抑制については0.2 µM以上(Fig.9C~E)、細胞生存率の 改善については1 µM以上のAsx濃度でそれぞれ効果が認められた(Fig.9A)。更に 細胞内ROS量及び老化関連因子の遺伝子発現の亢進に対する有効性に関して、例 えば0.2 μMといった低いAsx濃度においても効果が確認された。これらの結果より、DOTAPのようなカチオン性脂質を配合した正荷電リポソームが中性リポソームよりもAsxの抗酸化作用を効率的に発揮する点において優れていることが示された。

2.3.4 リポソームの HCE 細胞に対する相互作用

2.3.3の結果より、中性リポソーム製剤であるE/Asx-lipoよりも正荷電リポソーム製剤であるE/D/Asx-lipoの前処理でより高い効果が認められた。この差異はHCE 細胞に対する各リポソーム製剤の親和性の違いにより生じたのではないかと推察されたため、DiIで標識化したE/Asx-lipo及びE/D/Asx-lipoを用いて各リポソーム製剤のHCE細胞に対する親和性を評価することとした。すなわち、Asx濃度が0.2、1.0、2.0及び10 µMとなるようにDiI標識化E/Asx-lipo又はE/D/Asx-lipoをOcuLife完全培地without Hydrocortisoneへ分散させた培地を用いて35 mm dishで培養したHCE細胞を37℃、5%CO₂インキュベーターで1時間培養した後に、PBSで洗浄しOcuLife完全培地を添加後、蛍光顕微鏡(Axio Vert.A1)で画像を撮影した。更に培地を除去後、lysis bufferでホモジナイズした細胞溶解液の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより測定した。

DiI標識化E/Asx-lipo及びE/D/Asx-lipoで処理したHCE細胞の蛍光シグナルは、 いずれも処理後1時間においてリポソーム添加量依存的に増加することが確認さ れ、その親和性はEPCのみで構成されるE/Asx-lipoよりもEPCとDOTAPで構成され るE/D/Asx-lipoでより高いことが確認された(Fig. 10A)。例えば、10 µM DiI標識 化E/Asx-lipoで前処理した場合の蛍光強度は4510であったことに対し、同じAsx濃 度を示すリポソーム量のDiI標識化E/D/Asx-lipoで前処理した場合の蛍光強度は 24350であり約5倍も高い値であった(Fig. 10B)。これらの結果より、正荷電リポ ソーム製剤は高い細胞親和性を有することが示された。

28



Figure 10. DiI標識化E/Asx-lipo又はE/D/Asx-lipoのHCE細胞に対する親和性評価

(A) DiI 標識化 E/Asx-lipo 又は E/D/Asx-lipo で1時間処理した時の HCE 細胞の代表的な通常及び蛍光写真を示す。スケールバー=50µm。(B) DiI 標識化 E/Asx-lipo 又は E/D/Asx-lipo で1時間処理した HCE 細胞の細胞溶解液の蛍光強度を示す。(平均値±SD、n=3、*p<0.05、*p<0.01 E/Asx-lipo(□) versus E/D/Asx-lipo (■))

2.4 考察

本検討により、in vitroドライアイモデルで認められた細胞生存率の低下、細 胞内ROS量増加及び老化関連因子の遺伝子発現亢進が、Asx含有リポソーム製剤 の適用により抑制できることを確認した(Fig. 8及び9)。これらの効果はAsxの抗 酸化能、例えばヒドロキシラジカル消去能に起因すると考えられた(Fig. 7)。実 際10 μM E/Asx-lipo又は2μM E/D/Asx-lipoで前処理した場合、乾燥処理により誘導 される細胞内ROS量増加を約80%減少させることが、また10 μM E/Asx-lipo又は1 μM E/D/Asx-lipoで前処理した場合、老化関連因子の遺伝子発現亢進を完全に抑制 することが可能であった(Fig.8及び9)。これらの結果は、水系リポソーム製剤化 した難水溶性のAsxがドライアイ治療薬として有用であることを示唆している。 更に、わずかに正に荷電したE/D/Asx-lipoは中性に荷電したE/Asx-lipoに対し、そ の高い細胞親和性のためより高い効果を示した(Fig. 9及び10)。また、1時間処理 後のHCE細胞に取り込まれたDiI標識化リポソーム製剤の取り込み率についても 評価したところ、10 μM E/Asx-lipoの前処理の場合は培地中の総Asx量に対し 0.35%の取り込み率であったことに対し、10 µM E/D/Asx-lipoの前処理の場合は 2.0%の取り込み率であった。Steinfeldらは凍結乾燥技術により調製したフルオレ セイン製剤を用いて角膜におけるバイオアベイラビリティーの改善について報告 している。その結果、投与後2分におけるフルオレセインの角膜濃度が通常の点眼 剤では839 ng/mLであったことに対し凍結乾燥製剤では3391 ng/mLと約4倍改善し ていることを報告している⁶⁵⁾。今回の結果では取り込み率が約5.7倍の改善を認め ていることから、正荷電リポソーム製剤は点眼剤のバイオアベイラビリティーの 改善に有用であることが示唆された。

以上より、抗酸化物質は乾燥ストレスに基づく酸化ストレスの増加を抑制す ることで老化関連因子の遺伝子発現亢進を抑制し、ドライアイ治療薬の候補にな り得るのではないかとの仮説に関し、*in vitro*ドライアイモデルを用いて実証を行 った。そこで次章では、一般的に用いられる*in vivo*ラットドライアイモデルを用 いて仮説を検証した。

30

第三章

In vivo ドライアイモデルにおける乾燥ストレスと老化関連因子の関係及び 抗酸化物質のドライアイ予防効果

3.1 緒言

ドライアイ発症メカニズムとして、涙液の減少に伴う乾燥ストレスが起因し ていると考えられていることから、第一章では、*in vitro*ドライアイモデルを用い て乾燥ストレスにより生じる酸化ストレスが老関連因子の遺伝子発現亢進を誘導 するとの仮説について検証し、第二章では、抗酸化物質は乾燥ストレスに基づく 酸化ストレスの増加を抑制することで老化関連因子の遺伝子発現亢進を抑制し、 ドライアイ治療薬の候補になり得るのではないかとの仮説について検証を行った。 そこで更なる検討として、*in vivo*ドライアイモデルを用いて抗酸化物質含有リポ ソームのドライアイ治療薬としての可能性について検証を行うこととした。

*In vivo*ドライアイモデルについてはこれまで種々検討されており、Jogging Boardと呼ばれる装置を用いて瞬目を抑制し、更に低湿気流に曝露することで作成 するラットドライアイモデル³⁹⁾や、全身麻酔し最長で6時間の開眼を維持すること で作成するウサギドライアイモデル⁴¹⁾が知られているが、本研究では最も一般的 である眼窩外涙腺摘出ラットドライアイモデルを用いることとした。同モデルは、 ジクアホソルナトリウムやレバミピドといった既存ドライアイ治療薬の有効性を 評価するために使用される^{66,67)}モデルであり、ドライアイを良く再現できること で知られていることから、今回の*in vivo*ドライアイモデルとして最適であると判 断した。ドライアイの臨床学的症状である点状表層角膜症(Superficial Punctate Keratopathy; SPK)については、フルオレセインスコアを指標として評価した。

31

3.2 実験方法

3.2.1 動物及び試薬

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットは日本エスエルシーより購入した。セボフ ルランはマイラン製薬より購入した。ペントバルビタールナトリウムは共立製薬 より購入した。フェノールレッド糸(ゾーンクイック)はあゆみ製薬より購入し た。フルオレセインナトリウムは東京化成工業より購入した。RNA later RNA Stabilization Reagent は Qiagen より購入した。Takara BioMasher Standard (Sterile)は タカラバイオより購入した。Table 4 に示すプライマーはユーロフィンジェノミク ス株式会社より購入した。Optimal Cutting Temperature (O.C.T) コンパウンド はサ クラファインテックジャパンより購入した。その他については 2.2.1.8 に示すもの を購入した。特に記述が無い限り、試薬については市販の特級のものを使用した。

Gene	Forward	Reverse	
p53	ACAGCGTGGTGGTACCGTAT	GGAGCTGTTGCACATGTACT	
p21	ACACGCTCCCAGACGTAGTT	AGCAAAGTATGCCGTCGTCT	
p16	CCAGAAGTGAAGCCAAGGAG	GTGCGGTATTTGCGGTATCT	
β-actin	CCAGATCATGTTTGAGACCTTCAA	GTGGTACGACCAGAGGCATACA	

Table 4. 第三章で使用したプライマー配列

3.2.2 In vivo ラットドライアイモデルの作成

全ての動物実験は、興和株式会社 富士研究所の動物実験委員会によって審査 承認されたプロトコール(承認番号 18-019)に従って実施した。飼育環境は specific-pathogen free (SPF)条件下、温度 23 ± 3℃、湿度 50 ± 20%RH、照明は人 工照明で 12 時間明期、12 時間暗期、食餌及び水の摂取は自由にした。

ラットに麻酔マスクを装着した吸入麻酔器で、セボフルランを導入時3~4%、 維持時2~3%の濃度となるように吸入させ全身麻酔を施した。全身麻酔下のラッ トの頬部から耳下部にかけて剃毛した後、エタノール消毒し切開することで眼窩 外涙腺を露出させ摘出した。眼窩外涙腺を摘出した後、上記条件下で14日~25 日間通常飼育することで *in vivo* ラットドライアイモデルを作成した。

3.2.3 涙液量測定及びフルオレセインスコア評価

ラットにペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し、全身麻酔下で涙液

量及びフルオレセインスコアの測定を行った。

ラット目尻の下瞼と眼球の間にゾーンクイックを挿入し3分間後、メニスカ ス涙液により湿潤着色したゾーンクイックの長さを計測することで涙液量を測定 した(Fig.11)。



Figure 11. ゾーンクイックおよび涙液測定終了時の代表的な写真 矢印はゾーンクイックを示す。赤矢印はラット目尻の下瞼と眼球の間への挿入 部、黒矢印は湿潤着色部、白矢印は未湿潤部を示す。

ドライアイの臨床学的症状である SPK は、最もよく用いられるフルオレセイ ンスコアにより評価した。SPK は角膜上皮細胞の最表層に障害を生じている又は 微細に欠損している状態であり、これらがフルオレセインにより染色されること を利用し SPK の状態を数値化した診断法としてフルオレセインスコアが用いら れる。フルオレセインナトリウムを 2%濃度となるように生理食塩水へ溶解し 0.22 µm フィルターでろ過滅菌することでフルオレセイン染色液を調製した。全身麻 酔下のラット角膜へフルオレセイン染色液 5 µL を点眼し、3 分間閉瞼状態を維持 した。その後適量の無菌生理食塩水で眼球を洗浄し、暗室にてバンドパスフィル ターを装着した LED アーム照明 (波長:505 nm) でラットの眼球を照射し、560 nm 以上の波長をカットするフィルターをセットした実体顕微鏡で角膜表面写真を撮 影した。角膜表面写真の角膜を上下左右に3分割することで9つの領域に分割し、 各領域における蛍光染色されたスポット面積の比率に応じスコア化 (スポットを 認めない:スコア 0、0 以上 25%未満:スコア 1、25%以上 50%未満:スコア 2、 50%以上:スコア3)した後に、9つの領域のスコアを総計することでフルオレセインスコアを算出した。

3.2.4 角膜摘出及び total RNA 抽出

3.2.2 で述べた麻酔法により全身麻酔したラットの腹部を切開し、腹部大動脈 より放血することでラットを安楽死させた。その後ラット眼球を摘出し、生理食 塩水中に投入後角膜をすみやかに切除した。RNA later RNA Stabilization Reagent 500 µL を添加した 1.5 mL マイクロチューブへ投入し、液体窒素で急速冷凍した 後 total RNA 抽出まで-20℃で保管した。Takara BioMasher Standard (Sterile)に RNeasy Plus Mini kit の Buffer RLT Plus 600 µL を添加し、凍結保存した角膜を更に 加えホモジナイズした。これを RNeasy Plus Mini kit の 2 mL コレクションチュー ブにセットされた gDNA Eliminator スピンカラムへ全量採取した。15000 rpm、25℃ で1分間遠心分離した後、gDNA Eliminator スピンカラムを廃棄し、2 mL コレク ションチューブ中のろ液に 70% エタノール 600 µL を添加後ピペッティングする ことで混合した。この混液を2mL コレクションチューブにセットされた RNeasey スピンカラムへ全量採取し、15000 rpm、25℃で1分間遠心分離した後、2 mL コ レクションチューブのろ液を廃棄し、RNeasey スピンカラムへ同じ2 mL コレク ションチューブをセットした。RNeasy Plus Mini kit の Buffer RW1 700 µL を 2 mL コレクションチューブにセットされた RNeasey スピンカラムへ添加し、15000 rpm、 25℃で 1 分間遠心分離した後、2 mL コレクションチューブのろ液を廃棄し、 RNeasey スピンカラムへ同じ2 mL コレクションチューブをセットした。エタノ ールで4 倍希釈した RNeasy Plus Mini kit の Buffer RPE 500 µL を2 mL コレクショ ンチューブにセットされた RNeasey スピンカラムへ添加し、15000 rpm、25℃で1 分間遠心分離した後、2 mL コレクションチューブのろ液を廃棄し、RNeasey スピ ンカラムへ新しい2mLコレクションチューブをセットした。15000 rpm、25℃で 2 分間遠心分離することで完全にろ液を除去した後、RNeasey スピンカラムへセ ットした2 mL コレクションチューブを 1.5 mL コレクションチューブへ交換し、 RNase-free water 50 µL を RNeasey スピンカラムの濾膜へ添加した。2~3 分間室温 で放置した後、15000 rpm、25℃で2分間遠心分離した。その後、Nanodrop 8000 にて 230 nm、260 nm 及び 280 nm の波長で吸光度を測定し、total RNA 濃度及び精 製度を確認した。

3.2.5 逆転写反応

氷上において、0.2 µL PCR チューブに、3.2.5 で抽出した total RNA 溶液(25 ng) 及び PrimeScript RT master Mix(Perfect Real Time)の 5×PrimeScript RT Master Mix(Perfect Real Time) 2 µL を添加し、そこへ Ultra Pure DNase/RNase Free Distilled Water を全量 10 µL となるように添加した。軽く撹拌し卓上遠心機でスピンダウ ンさせた後、MJ Mini Personal Thermal Cycler にセットした。37℃で 15 分間の逆転 写反応を行った後、85℃で 5 秒間の逆転写酵素の熱失活を行った。

3.2.6 Real time PCR

p21、p53、p16 及び β-actin について、Thermal Cycler Dice Real Time System III により real time PCR 測定を行い、得られた結果について β-actin を内部標準物質と して p21、p53 及び p16 の相対的発現量を $2^{-\Delta/2CT}$ 値法にて求めた。PCR プレート に、SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)の SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus)(×2) 12.5 µL、cDNA サンプル 2.0 µL、プライマー(Table 4) 0.2 µL ずつ及 び Ultra Pure DNase/RNase Free Distilled Water 10.1 µL を添加し、ピペッティングで 混合した後、初期変性として 95°Cで 30 秒間を 1 cycle、95°Cで 5 秒間、60°Cで 30 秒間を 55 cycle の条件で反応を行った。

3.2.7 リポソーム製剤調製

2.2.2 に従い実施した。但し、分散媒として 10% スクロース水溶液を用いた。

3.2.8 In vivo ラットドライアイモデルにおけるリポソーム点眼製剤反復投与試験

3.2.7 で調製したリポソーム製剤を無菌生理食塩水で希釈し、各種 Asx 濃度の リポソーム点眼製剤を調製した。眼窩外摘出の翌日より1回5µL、1日6回2時 間毎、13日間のリポソーム点眼製剤反復投与を行った。

3.2.9 リポソーム製剤の正常ラット角膜に対する相互作用

2.2.7 に従い DiI 標識化 E/Asx-lipo 及び E/D/Asx-lipo を調製した。DiI 標識化 E/Asx-lipo 又は E/D/Asx-lipo 5μL を正常ラット眼球へ点眼投与した。30 分後、3.2.4 に従い摘出した眼球を速やかに O.C.T コンパウンドを用いて包埋し、ドライアイ スで冷却したエタノールを用いて凍結した。-20℃の条件下、20 μm の厚みとなる ようにミクロトームで凍結切片を作成した。得られた切片について、共焦点レー

ザー顕微鏡を用いて通常光及び蛍光画像を撮影した。更に得られた蛍光画像を Image J で解析し、角膜、ボウマン膜を含む角膜上皮、角膜固有質及びデスメ膜を 含む角膜内皮の蛍光強度を算出した。

3.2.10 統計解析

Dunnett's test を用いて統計解析を行った。**p*<0.05、#*p*<0.01 を用いて有意差を示した。

3.3 結果

3.3.1 In vivo ラットドライアイモデルにおける涙液量及びフルオレセインスコア に関する評価

眼窩外涙腺を摘出した後、SPF 条件下 14 日~25 日間通常飼育することにより *in vivo* ラットドライアイモデルを作成した。これとは別にコントロールとしてシ ャム群を作成した。涙液量はペントバルビタールナトリウムによる全身麻酔下、 ラット目尻の下瞼と眼球の間にゾーンクイックを挿入し3分間後、メニスカス涙 液により湿潤着色したゾーンクイックの長さを計測することで涙液量を測定した。 ドライアイの臨床学的症状である SPK は、最も用いられるフルオレセインスコア により評価した。0 日目の涙液量とフルオレセインスコアは、眼窩外涙腺摘出前



Figure 12. In vivo ラットドライアイモデルにおける涙液量及びフルオレセイ ンスコア推移

In vivo ラットドライアイモデルの涙液量(A)及びフルオレセインスコア(B)の推移。各シンボルは、シャム群(◆)、*in vivo* ラットドライアイモデル群(□)の結果を示す。(平均値±SD、n=6、*p<0.05、[#]p<0.01 versus シャム群0日目) (C)シャム群 25 日目又は(D) *in vivo* ラットドライアイモデル群 25 日目に おけるフルオレセイン染色後の代表的な眼表面写真を示す。 に測定を行い、その後は5日おきに術後25日まで継続した。

シャム群の涙液量は0日目から25日目までの間で変化を認めなかったが、in vivo ラットドライアイモデル群の涙液量は0日目に対し5日目で有意な減少を示 し25日目まで継続した(Fig.12A)。シャム群のフルオレセインスコアは0日目と 25日との間で差は認められなかった(Fig.12B,C)。これに対し in vivo ラットドラ イアイモデル群ではシャム群の0日目と比較し眼窩外涙腺摘出後よりフルオレセ インスコアの有意な上昇が認められ、15日目まで上昇を示したが、15日目と25 日目の結果に差はほとんど認められなかった(Fig.12B,D)。

3.3.2 In vivo ラットドライアイモデルにおける老化関連因子の遺伝子発現に関する評価

シャム群及び in vivo ラットドライアイモデル群における老化関連因子の遺伝 子発現について 0、15 及び 25 日目に評価した。シャム群の p53、p21 及び p16 の



Figure 13. In vivo ラットドライアイモデルにおける老化関連因子の遺伝子発現の挙動

p53 (A)、p21 (B) 及び p16 (C) の遺伝子発現推移。各シンボルは、シャム 群 (◆)、*in vivo* ラットドライアイモデル群 (□)の結果を示す。(平均値±SD、 n=3、*p<0.05、#p<0.01 versus シャム群0日目) 遺伝子発現は 0、15 及び 25 日目の間で変化は認められなかった(Fig.13)。これ に対し *in vivo* ラットドライアイモデル群の老化関連因子遺伝子発現は、シャム群 0 日目に対し 15 日目において有意な亢進が認められた(Fig.13)。*In vivo* ラットド ライアイモデル群の 15 日目と 25 日目における p53 及び p16 の遺伝子発現はあま り差を認めなかったが(Fig.13A、B)、p16 の遺伝子発現は上昇傾向を示した (Fig.13C)。

3.3.3 リポソーム製剤の物理化学的性質

In vivo ラットドライアイモデルに Asx 含有リポソーム点眼製剤を適用するに あたり、本試験で使用した各リポソーム製剤の物理化学的性質の評価を行った。 E-lipo 及び E/Asx-lipo の平均粒子径は約 130 nm であった(Table 5)。これに対し E/D-lipo 及び E/D/Asx-lipo の平均粒子径は約 80 nm であり、E-lipo 及び E/Asx-lipo と比較しやや粒子径は小さかった(Table 5)*。In vitro* ドライアイモデルではリポ ソームの薄膜を水和する際に PBS を使用したことに対し、本検討では 10%スクロ ース水溶液を用いたことにより平均粒子径に多少の差が認められたと予想された。 但しリポソーム脂質中の DOTAP の有無に関わらず、いずれも十分に微細な粒子 径であり問題ないと判断した。

但しいずれも 100 nm 前後の粒子径であり本試験における影響はほとんどな いと判断した。各リポソーム製剤の PDI は約 0.25 であり、いずれのリポソーム製 剤も単一ピークの粒度分布を示した(Table 5)。EPC 単独で構成される E-lipo 及 び E/Asx-lipo のゼータ電位はそれぞれ-0.88 mV 及び-0.39 mV とほぼ中性であった ことに対し、EPC 及び DOTAP より構成される E/D-lipo 及び E/D/Asx-lipo はそれ ぞれ 8.68 mV 及び 8.95 mV とわずかに正電荷を帯びており、期待する結果を満た すものであった(Table 5)。E/Asx-lipo 及び E/D/Asx-lipo に封入された Asx 濃度を 吸光度測定により評価したところ、それぞれ 98.6%及び 101.9% とほぼ理論値であ ることが確認された(Table 5)。

3.3.4 In vivo ラットドライアイモデルにおける生理食塩水、E-lipo 及び E/D-lipo の影響

リポソーム点眼製剤反復投与試験のプロトコールについて、3.3.1 及び 3.3.2 の結果に基づき眼窩外涙腺摘出翌日から13日間反復投与を行い、眼窩外涙腺摘出 後14日目における涙液量、フルオレセインスコア及び老化関連因子の遺伝子発現

Table 5.	各リポソ	ームの物理化学的性質
----------	------	------------

	E-lipo	E/Asx-lipo	E/D-lipo	E/D/Asx-lipo
Asx理論濃度 (µM)	-	200	-	200
EPC濃度 (mM)	200	200	180	180
DOTAP濃度 (mM)	-	-	20	20
平均粒子径(nm)	130.3 ± 6.6	131.2 ± 7.0	75.1 ± 7.5	84.6 ± 21.1
PDI	0.209 ± 0.033	0.279 ± 0.021	0.230 ± 0.015	0.281 ± 0.086
ゼータ電位 (mV)	-0.88 ± 0.64	-0.39 ± 0.53	8.68 ± 0.98	8.95 ± 1.07
Asx濃度 (µM)	-	197.1 ± 0.9	-	203.8 ± 3.7

PDI: polydispersity index (多分散指数; 粒度分布の広がりを示す無次元指数、 平均値±SD、n=5)

について評価を行うこととした。

Asx 含有リポソーム製剤を *in vivo* ラットドライアイモデルへ適用する前に、 リポソーム点眼製剤調製時に使用する生理食塩水、Asx を含有していない E-lipo 及び E/D-lipo を用いて、これらが *in vivo* ラットドライアイモデルへ及ぼす影響を 確認することとした。 *in vivo* ラットドライアイモデル群と比較し、生理食塩水、 E-lipo 及び E/D-lipo 点眼製剤投与群の涙液量、フルオレセインスコア及び老化関 連因子の遺伝子発現には変化が認められなかった(Fig. 14)。この結果より、生理 食塩水、E-lipo 及び E/D-lipo はドライアイ症状の悪化又は予防に影響を及ぼさな いと判断された。

3.3.5 In vivo ラットドライアイモデルを用いた E/Asx-lipo 点眼製剤反復投与試験

中性電荷である E/Asx-lipo 点眼製剤について反復投与試験を実施した。*In vivo* ラットドライアイモデル群と比較し、いずれの E/Asx-lipo 点眼製剤投与群につい ても涙液量に変化は認められなかった(Fig. 15A)。1µM E/Asx-lipo 点眼製剤投与 群では、*in vivo* ラットドライアイモデル群と比較しフルオレセインスコア及び老 化関連因子の遺伝子発現に差は認められなかった(Fig. 15B~E)。これら結果と は対照的に、10 µM E/Asx-lipo 点眼製剤投与群ではフルオレセインスコアの上昇 を有意に抑制した。老化関連因子の遺伝子発現に関して、10 µM E/Asx-lipo 点眼 製剤群では、*in vivo* ラットドライアイモデル群で認められた p53 及び p16 の遺伝 子発現亢進を有意に抑制した(Fig. 15C 及び E)。これに対し、p21 の遺伝子発現 亢進の抑制に有意な差は認められなかったが、抑制傾向は確認された(Fig. 15D)。



Figure 14. 生理食塩水、E-lipo 及び E/D-lipo が *in vivo* ラットドライアイモデ ルへ及ぼす影響

生理食塩水、E-lipo 又は E/D-lipo 点眼製剤を眼窩外涙腺摘出翌日から 13 日間 反復投与した後の涙液量(A)、フルオレセインスコア(B)、p53(C)、p21(D) 及び p16(E) の遺伝子発評価結果を示す。(E:E-lipo、E/D:E/D-lipo、DE model: dry eye mode、平均値±SD、A 及び B; n=10-12、C-E; n=5、*p<0.05、#p<0.01 versus in vivo ラットドライアイモデル群(\blacksquare))



Figure 15. In vivo ラットドライアイモデルを用いた E/Asx-lipo 点眼製剤反復 投与における涙液量、フルオレセインスコア及び老化関連因子の遺伝子発現 に関する評価

1 µM 又は 10 µM E/Asx-lipo 点眼製剤を眼窩外涙腺摘出翌日から 13 日間反復投 与した後の涙液量(A)、フルオレセインスコア(B)、p53(C)、p21(D)及 び p16(E)の遺伝子発現評価結果を示す。(DE model: dry eye model、平均値 ±SD、A 及び B; n=10-12、C-E; n=5、*p<0.05、#p<0.01 versus in vivo ラットド ライアイモデル群(■))

3.3.6 In vivo ラットドライアイモデルを用いた E/D/Asx-lipo 点眼製剤反復投与試験

次に、正の電荷を有する E/D/Asx-lipo 点眼製剤について反復投与試験を実施 し、得られた結果について E/Asx 点眼製剤反復投与試験結果と比較した。*In vivo* ラットドライアイモデル群と比較し、各 E/D/Asx-lipo 点眼製剤投与群の涙液量に 変化は認められなかった (Fig. 16A)。*In vivo* ラットドライアイモデル群と比較し、 0.1 μ M 以上の E/D/Asx-lipo 点眼製剤投与群でフルオレセインスコア上昇の有意な 抑制が認められ、特に 1 μ M E/D/Asx 点眼製剤投与群で高い効果を認めた (Fig. 16B)。老化関連因子の遺伝子発現に関して、*in vivo* ラットドライアイモデル群と 比較し p53 と p16 では 0.1 μ M 以上の E/D/Asx-lipo 点眼製剤投与群で有意な亢進 抑制を認めた。p21 についてはいずれの E/D/Asx-lipo 点眼製剤投与群でも遺伝子 発現亢進の有意な抑制は認められなかったものの、抑制傾向は確認された (Fig. 16C~E)。これらの結果は 3.3.5 の結果と同様な傾向を示していたが、フルオレセ インスコア及び老化関連因子の遺伝子発現に関する評価結果を比較すると、 E/Asx-lipo よりも E/D/Asx-lipo 点眼製剤でより低い Asx 濃度により効果を示すこ とが確認された。

3.3.7 正常ラット角膜に対する E/Asx-lipo 及び E/D/Asx-lipo の親和性評価

3.3.6 より、E/Asx-lipo と比較し E/D/Asx-lipo はより低濃度でドライアイ予防 効果を示した。この現象は第二章で確認されたリポソーム製剤の細胞親和性の違 いに起因すると推測し、正常ラット角膜に対する E/Asx-lipo 及び E/D/Asx-lipo の 結合性を観察し、*in vivo* における各リポソームの組織親和性について比較するこ ととした。

DiI 標識化 E/Asx-lipo 及び E/D/Asx-lipo を正常ラット角膜へ点眼し 30 分後の 角膜断面切片について共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、いずれのリポソ ーム製剤についても角膜上皮中に蛍光シグナルが認められ、その蛍光シグナル強 度は角膜上皮中心部よりも周縁部でより強いことが確認された(Fig.17)。更に正 常ラット角膜上皮の親和性は E/Asx-lipo よりも E/D/Asx-lipo でより高かった(Fig. 17)。興味深いことに、E/Asx-lipo 投与 30 分後の角膜内皮では蛍光シグナルが確 認される一方で、E/Asx-lipo よりも高い角膜上皮親和性を示した E/D/Asx-lipo 投 与 30 分後の角膜内皮ではほとんど蛍光シグナルが観察されなかった。



Figure 16. In vivo ラットドライアイモデルを用いた E/D/Asx-lipo 点眼製剤反 復投与における涙液量、フルオレセインスコア及び老化関連因子の遺伝子発 現に関する評価

0.1 µM、1 µM 又は 10 µM E/D/Asx-lipo 点眼製剤を眼窩外涙腺摘出翌日から 13 日間反復投与した後の涙液量(A)、フルオレセインスコア(B)、p53(C)、 p21(D)及び p16(E)の遺伝子発現評価結果を示す。(平均値±SD、A 及び B; n=10-12、C-E; n=5、*p<0.05、#p<0.01 versus in vivo ラットドライアイモデル 群(■))



Figure 17. DiI標識化E/Asx-lipo又はE/D/Asx-lipo点眼30分後の正常ラット角膜 における組織親和性の評価

DiI標識化 E/Asx-lipo 又は E/D/Asx-lipo の点眼 30 分後における正常ラット角膜 切片の代表的な通常及び蛍光写真を示す。白矢印は角膜上皮、赤矢印は角膜内 皮を示す。スケールバー=50µm。

3.4 考察

第一章及び第二章の結果を基に、本章では in vivo ラットドライアイモデルを 用いて乾燥ストレスとドライアイの臨床学的症状の指標である SPK 並びに老化 関連因子の関係について評価し、抗酸化物質のドライアイ治療薬候補に関する仮 説について検証を行った。その結果、in vivo ラットドライアイモデルにおいてフ ルオレセインスコアの上昇、すなわち SPK の悪化を確認し、p53、p21 及び p16 といった老化関連因子の遺伝子発現の亢進を認めた(Fig. 12 及び 13)。特に老化 関連因子については第一章の in vitro ドライアイモデルで得られた結果と類似し たものであり、in vitro と in vivo の相関性があることを示唆した。

Asx 含有リポソーム製剤を in vivo ラットドライアイモデルへ適用する前に各 リポソーム製剤で使用する添加剤の影響について確認を行ったが、いずれの添加 剤に関してもドライアイの発症又は予防に関与しないことが示された(Fig. 14)。 Asx 含有リポソーム点眼製剤反復投与を行ったところ、涙液量の減少を改善して いないにも関わらずフルオレセインスコアの上昇が抑制されたことから、涙液量 の改善とは関係ないメカニズムによりドライアイ発症を抑制する効果があると推 測された(Fig.15A 及び B、Fig16A 及び B)。また老化関連因子である p53、p21 及び p16 の遺伝子発現を評価したが、E/Asx-lipo では 1 μM 以上、E/D/Asx-lipo で は 0.1 µM 以上の Asx 濃度で有意な抑制、若しくは抑制傾向を認めた(Fig. 15C~ E、Fig. 16C~E)。第一章の結果では乾燥ストレスが細胞内 ROS 量増加に伴う酸 化ストレスを増加させることで老化関連因子の遺伝子発現が亢進し、第二章の結 果ではAsx 含有リポソーム製剤処理によりこれらが抑制された。これらのことか ら、in vivo ラットドライアイモデルにおいても涙液量減少による乾燥ストレスか ら酸化ストレスが増加し SPK の指標であるフルオレセインスコアが上昇したと 考えられ、Asx 含有リポソーム点眼製剤反復投与により酸化ストレスが抑制され たことからドライアイ発症予防効果を示したと推測された。

第二章と同様に、*in vivo* ラットドライアイモデルを用いた Asx 含有リポソー ム点眼製剤反復投与においても、中性よりも正に荷電したリポソーム製剤がより 低い Asx 濃度でドライアイ予防効果を示した(Fig. 15 及び Fig. 16)。これは Asx 含有リポソーム製剤の細胞への親和性の差に起因すると考え、正常ラット角膜へ Dil 標識化 Asx 含有リポソーム製剤を点眼しその親和性について評価した。正に 荷電した E/D/Asx-lipo でより高い蛍光シグナルが観察され、リポソーム点眼製剤 のバイオアベイラビリティーを上昇させることが示唆された(Fig. 17)。興味深い

ことに、角膜上皮における蛍光シグナルは中性に荷電した E/Asx-lipo よりも正に 荷電した E/D/Asx-lipo の方が強いにも関わらず、角膜内皮の蛍光シグナルは E/Asx-lipo で強かった (Fig. 17)。更に得られた画像 (Fig. 17C,G) について ImageJ により角膜、ボウマン膜を含む角膜上皮、角膜固有質、デスメ膜を含む角膜内皮 の蛍光強度を算出し、角膜に対するボウマン膜を含む角膜上皮、角膜固有質及び デスメ膜を含む角膜内皮の蛍光強度の割合を算出した。その結果、中性に荷電し た E/Asx-lipo ではボウマン膜を含む角膜上皮; 79.5%、角膜固有質; 9.5%、デス メ膜を含む角膜内皮; 11.0% であったことに対し、正に荷電した E/D/Asx-lipo では ボウマン膜を含む角膜上皮;98.7%、角膜固有質;1.3%、デスメ膜を含む角膜内 皮;0.1%未満であった。通常、角膜上皮で取り込まれたリポソーム製剤は、ボウ マン膜を介し角膜固有質を経て角膜内皮に向かい拡散していく。しかし E/D/Asx-lipo は膠原繊維から構成される角膜固有質よりも、角膜上皮細胞との親 和性が高いと考えられ、ボウマン膜を通過し角膜固有質を経由した角膜内皮への E/D/Asx-lipo の拡散が生じ難いことが考えられた。ドライアイの病変部位は角膜 上皮であることから、本現象は点眼投与された薬物が角膜上皮に貯留されること により薬物、今回は Asx の効果を効率的に発揮することが可能であることを示す ものである。以上をまとめると、E/D/Asx-lipo は細胞との親和性が高く取り込ま れやすいことに加え E/Asx-lipo よりも角膜上皮からの拡散が少なく、結果として 角膜上皮中の Asx 貯留量が増大することから、E/D/Asx-lipo は E/Asx-lipo よりも 低い Asx 濃度で予防効果を示したと推測された。

総括

第一章では、乾燥ストレスにより生じる酸化ストレスが老関連因子の遺伝子 発現亢進を誘導するとの仮説に基づき、*in vitro*ドライアイモデルを用いて乾燥ス トレが酸化ストレスや老化関連因子へ及ぼす影響を評価した。その結果、乾燥ス トレスにより細胞内 ROS 量が増加し、p53 やp21、更にはp16 といった老化関連 因子の遺伝子発現が亢進することを確認した。これらのことから、ドライアイ発 症メカニズムとして涙液の過度な蒸散、すなわち乾燥ストレスにより細胞内 ROS 量が増加することで酸化ストレスの増加が生じ、p53 やp21、更にはp16 といった 老化関連因子の遺伝子発現が亢進すると考えられ、ドライアイ発症には酸化スト レスが深く関与していることが示された。

第二章では、抗酸化物質が乾燥ストレスに基づく酸化ストレスの増加を抑制 することで老化関連因子の遺伝子発現亢進を抑制し、ドライアイ治療薬になり得 るのではないかとの仮説に基づき、*in vitro*ドライアイモデルを用いて抗酸化剤で ある Asx を含有したリポソーム製剤が細胞内 ROS 量及び老化関連因子の遺伝子 発現へ及ぼす影響について評価した。その結果、*in vitro*ドライアイモデルで認め られた細胞内 ROS 量の増加及び老化関連因子の遺伝子発現亢進を Asx 含有リポ ソーム製剤が抑制することを確認した。更に、わずかに正に荷電した E/D/Asx-lipo は中性に荷電した E/Asx-lipo に対し細胞親和性が高いことからより高い効果を示 すことを確認した。

第三章では第一章及び第二章の結果を基に、*in vivo* ラットドライアイモデル を用いて、乾燥ストレスとドライアイの臨床学的症状の指標である SPK 並びに老 化関連因子の関係について評価し、抗酸化物質のドライアイ治療薬候補に関する 仮説について検証を行った。その結果、*in vivo* ラットドライアイモデルにおいて SPK の悪化に伴う p53、p21 及び p16 といった老化関連因子の遺伝子発現の亢進 を認めた。特に老化関連因子については第一章の *in vitro* ドライアイモデルで得ら れた結果と類似したものであり、*in vitro* と*in vivo* の相関性があることを示唆した。 続いて Asx 含有リポソーム点眼製剤反復投与を行ったが、涙液量の減少を改善し ていないにも関わらず SPK の悪化及び老化関連因子の遺伝子発現亢進が抑制さ れた。第二章と同様に *in vivo* ラットドライアイモデルに関しても、中性よりもわ ずかに正に荷電した Asx 含有リポソーム製剤において、より低い Asx 濃度でドラ イアイ予防効果を示すことが確認された。E/D/Asx-lipo は細胞との親和性が高い ことに加え、角膜上皮から角膜内皮側への拡散が少なく、角膜上皮中の Asx 濃度 が高くなることに起因すると推測された。

ドライアイは多因性疾患といわれているが、本研究ではドライアイ発症に係 る重要な要素である涙液不安定化に伴う乾燥ストレスと老化について関連性を検 討した。In vitro 及び in vivo ドライモデルを用いて乾燥ストレスにより細胞内 ROS 量の増大及び老化関連因子の遺伝子発現が亢進することを検証したが、涙液の過 度な蒸発や高浸透圧化といった涙液の不安定化により誘導される酸化ストレスに よりドライアイ発症を示した報告と一致するものである^{38,39,45,46)}。更に細胞内 ROS 量の増加に相関した p53 や p21 といった老化関連因子発現の亢進を確認した が、p53/p21 経路が ROS によって活性化されることを実証した多くの報告とも一 致している⁶⁸⁻⁷⁰⁾。p53 や p21 の発現亢進はいくつかの細胞種でアポトーシス、細 胞終期停止や細胞老化関連分泌現象(Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP)を誘導する^{39,45,46,52)}ことが確認されており、同様な現象がドライアイの発 症に深く関与している可能性が示唆される。また本研究では同じく老化関連因子 の一つである pl6 の有意義な発現亢進が確認された。酸化ストレスによる pl6 の 発現亢進についてはほとんど知られていないが、p38/ Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 及び ROS 発生が p16 の活性化を誘導するとの報告^{71,72)}がある一方 で、*in vitro* 及び *in vivo* において p38/MAPK 経路が高浸透圧により活性化されると の報告がある 37,73,74)。これらの報告に基づいて考察すると、本研究で確認された p16の発現亢進は、in vitro ドライアイモデルにおいては HCE 細胞の表面に存在す る薄層培地が乾燥により高浸透圧化、in vivo ドライアイモデルにおいては涙液減 少に伴い涙液中の水分揮散が亢進することで角膜表面の涙液層が高浸透圧化した ことに起因するのではないかと推察された。本研究結果からは、酸化ストレスが 直接的又は間接的に p16 の発現亢進を誘導するかどうかまでは解明できなかった が、p16の発現亢進がドライアイ発症に寄与していることを示唆している。

また本研究において、抗酸化剤である Asx を用いることにより in vitro ドライ アイモデルで認めた細胞内 ROS 増加抑制や老化関連因子の発現亢進抑制に伴う 細胞生存率の低下抑制、in vivo ドライアイモデルで認めた老化関連因子の発現亢 進抑制に伴う SPK の進行抑制することを確認した。これらの結果より、ドライア イの発症のメカニズムの一つは涙液不安定化による乾燥ストレスが角膜上皮細胞 の最外層に酸化ストレスを生じさせることにより細胞障害(例えば SASP)や細 胞死(例えばアポトーシス)を招くことで SPK を進行させることであると考えら れ、Asx の抗酸化作用によりこれらの現象を抑制することでドライアイ発症に対 する効果を認めたと推察された。その効果はこれまでの報告^{38,40,41)}と矛盾しない が、その一方でこれらの報告は抗炎症効果に着目したものであり今回著者らが見 出した老化関連因子の発現亢進抑制による効果も存在した可能性は否定できない。 更に先述したように今回著者らが見出した pl6 発現には p38/MAPK 経路が関与す ることが推察されることから、抗酸化物質のドライアイに対する効果には抗酸化 と抗炎症の両方を有することが推察された。今回は予防効果について確認したが、 SkQ1 を用いた Zernii の報告 ⁴¹⁾や抗酸化物質の作用メカニズムを考慮すると、抗 酸化物質は治療よりも予防、特に再発予防に適していると考えらる。また抗酸化 物質による薬物治療の欠点として涙液減少の改善効果が認められないことが挙げ られる。一方で、現在日本で利用されているレバミピドやジクアホソルナトリウ ムといった涙液増加・安定化作用を有する薬物は治療期間が長いことが欠点とし て挙げられる。これら薬物は細胞障害を予防することができないことから、治療 中に寛解と再発を繰り返すことで治療期間が長くなることが考えられる。これら を考慮すると、涙液増加・安定化作用を有する薬物と抗酸化物質を配合剤とする ことで、涙液増加・安定化、抗酸化、抗炎症及び再発予防効果を示す治療期間を 短縮したドライアイ治療薬が提供できるかもしれない。

通常投与された点眼剤の眼表面での滞留時間は4分未満といわれており、速 やかに鼻涙管へ排出されてしまうことからバイオアベイラビリティーを改善する ことが望まれている。また通常水溶性が非常に低い薬物の点眼剤への適用は難し いとされている。今回の結果は、水溶性が非常に低いAsxをリポソーム製剤化し 特に正に荷電させた製剤でより高い効果を認めたことから、従来の点眼剤の問題 点を改善する方法を見出すことができた。

今後 in vitro 及び in vivo ドライアイモデルを用いた抗酸化作用に基づくドライ アイ治療薬の探索が活性化され、更には物理化学的特性により眼疾患への適用が 困難であった薬物へ正荷電リポソーム製剤技術を適用することによるドラッグリ ポジショニングが推進されることにより、ドライアイの治療が発展していくこと が期待される。

50

謝辞

本研究の遂行から論文作成に至るまで、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜 りました徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学域)衛生薬学分野 小暮 健太朗 教 授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行する上で有益な御助言、御指導を賜りました徳島大学大学院社 会産業理工学研究部食料科学分野(前徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学域) 衛生薬学分野准教授) 田中 保 教授に謹んで深謝致します。

本研究の実験手技や論文の作成にわたり、多くの御助言、御指導を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学域)衛生薬学分野 福田 達也 助教に心から御礼申し上げます。

また、本研究に携わる機会を与えてくださるとともに、多くの御助言及び御 配慮を賜りました稲木 敏男 様に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行に格別の御支援、御協力を賜りました徳島大学大学院 医歯薬学研究部(薬学域)衛生薬学分野の皆様、興和株式会社 富士研究所の職員 に深く感謝いたします。

引用文献

- Tsubota K, Yokoi N, Shimazaki J, Watanabe H, Dogru M, Yamada M, Kinoshita S, Kim HM, Tchah HW, Hyon JY, Yoon KC, Seo KY, Sun X, Chen W, Liang L, Li M, Asia Dry Eye Society. New Prespectives on Dry Eye Definition and Diagnosis: A Consensus Report by the Asia Dry Eye Society. *Ocul Surf.* 15: 65-76; 2017.
- 2 ドライアイ研究会、ドライアイの定義及び診断基準委員会 日本のドラ イアイの定義と診断基準の改定(2016 年版)
- Nelson JD, Craig JP, Akpek EK, Azar DT, Belmonte C, Bron AJ, Clayton JA,
 Dogru M, Dua HS, Foulks GN, Gomes JAP, Hammitt KM, Holopainen J, Jones
 L, Joo CK, Liu Z, Nichols JJ, Nichols KK, Novack GD, Sangwan V, Stapleton F,
 Tomlinson A, Tsubota K, Willcox MDP, Wolffsohn JS, Sullivan DA. *Ocul Surf*.
 15: 269-275; 2017.
- 4 Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, Liu Z, Nelson JD, Nichols JJ, Tsubota K, Stapleton F. TFOS DEW II Definition and Classification Report. *Ocul Surf.* 15: 276-283; 2017.
- 5 The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 5: 75-92; 2007.
- 6 Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, Na KS, Schaumberg D, Uchino M, Vehof J, Viso E, Vitale S, Jones L. TFOS DEW II Epidemiology Report. *Ocul Surf.* 15: 334-365; 2017.
- 7 Kawashima M, Yamada M, Suwaki K, Shigeyasu C, Uchino M, Hiratsuka Y, Yokoi N, Tsubota K, DECS-J Study Group. A clinic-based survey of clinical characteristics and practice pattern of dry eye in Japan. *Adv Ther.* 34: 732-743; 2017.
- 8 Sweeney DF, Millar TJ, Raju SR. Tear film stability: a review. *Exp Eye Res*. 117: 28-38; 2013.
- 9 Green-Church KB, Butovich I, Willcox M, Borchman D, Paulsen F, Barabino S, Glasgow BJ. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on tear film lipids and lipid-protein interactions in

health and disease. Invest Ophthalmol Vis Sci. 30: 1979-93; 2011.

- Kehinde AJ, Ogugu SE, James BI, Paul, DK, Racheal AM, Adeyinka AE. Tears
 Production: Implication for Health Enhancement. *Open Access Scientific Reports*.
 1: 476. doi:10.4172/scientificreports.476; 2012.
- 11 Carreño E, Enríquez-de-Salamanca A, Tesón M, García-Vázquez C, Stern ME, Whitcup SM, Calonge M. Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta Opthalmol.* 88: e250-8; 2010.
- 12 Gum JR Jr. Mucin genes and proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7: 557-64; 1992.
- 13 Seregni E, Botti C, Massaron S, Lombardo C, Capobianco A, Bogni A, Bombardieri E. Structure, function and gene expression of epithelial mucins. *Tumori.* 83: 625-32; 1997.
- 14 Gipson IK, Argüeso P. Role of mucins in the function of the corneal and conjunctival epithelia. *Int Rev Cytol.* 231: 1-49; 2003.
- 15 Ablamowicz AF, Nichols JJ. Ocular Surface Membrane-Associated Mucins. *Ocul Surf.* 14: 331-41; 2016.
- 16 中村 雅胤 ドライアイ研究の最前線 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)
 134: 138-141; 2010.
- Johnson ME, Murphy PJ, Boulton M. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 244: 109-12; 2006.
- 18 Aragona P, Papa V, Micali A, Santocono M, Milazzo G. Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *Br J Ophthalmol.* 86: 181-4; 2002.
- 19 Shigeyasu C, Yamada M, Akune Y, Tsubota K. Diquafosol sodium ophthalmic solution for the treatment of dry eye: clinical evaluation and biochemical analysis of tear composition. *Jpn J Ophthalmol.* 59: 415-20; 2015.
- 20 Yokoi N, Kato H, Kinoshita S. Facilitation of tear fluid secretion by 3% diquafosol ophthalmic solution in normal human eyes. *Am J Ophthalmol.* 157: 85-92.e1; 2014.
- Fukuoka S, Arita R. Increase in tear film lipid layer thickness after instillation of
 3% diquafosol ophthalmic solution in healthy human eyes. *Ocul Surf.* 15:

730-735; 2017.

- 22 Koh S, Inoue Y, Sugmimoto T, Maeda N, Nishida K. Effect of rebamipide ophthalmic suspension on optical quality in the short break-up time type of dry eye. *Cornea*. 32: 1219-23; 2013.
- Igarashi T, Fujita M, Yamada Y, Kobayashi M, Fujimoto C, Takahashi H, Igarashi T, Nakano Y, Suzuki H, Takahashi H. Improvements in Signs and Symptoms of Dry Eye after Instillation of 2% Rebamipide. *J Nippon med Sch.* 82: 229-36; 2015.
- 24 崎本 暢 ドライアイは炎症性疾患なのか? ドライアイの近年の考え 方と絡めて- 日大医誌. 75: 52-53; 2016.
- Hessen M, Akpek EK. Dry eye: an inflammatory ocular disease. J Ophthalmic Vis Res. 9: 240-50; 2014.
- 26 Wei Y, Asbell PA. The core mechanism of dry eye disease is inflammation. *Eye Contact Lens.* 40: 248-56; 2014.
- 27 Perry HD, Donnenfeld ED. Medications for dry eye syndrome: a drug-therapy review. *Mang Care*. 12 Suppl: 26-32; 2003.
- 28 Lallemand F, Schmitt M, Bourges JL, Gurny R, Benita S, Garrigue JS. Cyclosporine A delivery to the eye: A comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm*. 117: 14-28; 2017.
- 29 ノバルティスファーマ株式会社 シクロスポリン製剤 医薬品インタビ ューフォーム 2018年7月改訂
- 30 Daull P, Feraille L, Barabino S, Cimbolini N, Antonelli S, Mauro V, Garrigue JS. Efficacy of a new topical cationic emulsion of cyclosporine A on dry eye clinical signs in an experimental mouse of dry eye. *Exp Eye Res.* 153: 159-164; 2016.
- 31 Baudouin C, Figueiredo FC, Messmer EM, Ismail D, Amrane M, Garrigue JS, Bonini S, Leonardi A. A randomized study of the efficacy and safety of 0.1% cyclosporine A cationic emulsion in treatment of moderate to severe dry eye. *Eur j Ophthalmol.* 27: 520-530; 2017.
- 32 Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol.* 147: 198-205; 2009.
- 33 Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E,

García-Vázquez C, Herreras JM, Calonge M. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis*. 16: 862-73; 2010.

- 34 Semba CP, Gadek TR. Development of lifitegrast: a novel T-cell inhibitor for the treatment of dry eye disease. *Clin Ophthalmol.* 10: 1083-94; 2016.
- 35 Abidi A, Shukla P, Ahmad A. Lifitegrast: A novel drug for treatment of dry eye disease. *J Pharmacol Pharmacother*. 7: 194-198; 2016.
- Keating GM, Lifitegrast Ophthalmic Solution 5%: A Review in Dry Eye Disease.
 Drugs. 77: 201-208; 2017.
- 37 Cavet ME, Harrington KL, Vollmer TR, Ward KW, Zhang JZ Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. *Mol. Vis.* 17: 533-42; 2011.
- 38 Li Y, Liu H, Zeng W, Wei J Edaravone protects against hyperosmolarity-induced oxidative stress and apoptosis in primary human corneal epithelial calls. *PLoS One*. 12: e0174437; 2017.
- 39 Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, Hisamura R, Masuda N, Imagawa T, Uehara M, Tsubota K Involvement of oxidative stress on corneal epithelial alterations in a blink-suppressed dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 1552-8; 2007.
- 40 Higuchi A, Takahashi K, Hirashima M, Kawakita T, Tsubota K Selenoprotein P controls oxidative stress in cornea. *PloS One*. 5: e9911; 2010.
- 41 Zernii EY, Gancharova OS, Baksheeva VE, Golovastova MO, Kabanova EI, Savchenko MS, Tiulina VV, Sotnikova LF, Zamyatnin AA Jr., Philippov PP, Senin II Mitochondria-tageted antioxidant SkQ1 prevents anesthesia-induced dry eye syndrome. *Oxid Med Cell Longev*.9281519; 2017.
- 42 Lemp MA, Crews LA, Born AJ, Foulks GN, Sullivan BD Distribution of aqueous-deficient and evaporative dry eye in a clinic-based patient corhort: a retrospective study. *Cornea* 31: 472–478; 2012.
- 43 Kruman I, Guo Q, Mattson MP. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. J Neurosci Res. 51: 293–308; 1998.
- 44 Joyce NC, Zhu CC, Harris DL. Relationship among oxidative stress, DNA

damage, and proliferative capacity in human corneal endothelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50: 2116–2122; 2009.

- Deng R, Hua X, Li J, Chi W, Zhang Z, Lu F, Zhang L, Pflugfelder SC, Li DQ.
 Oxidative stress markers induced by hyperosmolarity in primary human corneal epithelial cells. *PLoS One*. 10: e0126561; 2015.
- 46 Uchino Y, Kawakita T, Ishii T, Ishii N, Tsubota K. A new mouse model of dry eye disease: oxidative stress affects functional decline in the lacrimal gland. *Cornea* 31 Suppl 1: S63–S67; 2012.
- 47 Foulks GN. Pharmacological management of dry eye in the elderly patient. *Drugs Aging*. 25: 105–118; 2008.
- 48 Guillon M, Maïssa C. Tear film evaporation--effect of age and gender. *Cont lenz Anterior Eye* 33: 171–175; 2010.
- 49 Steven P, Braun T, Krösser S, Gehlsen U. Influence of aging on severity and anti-inflammatory treatment of experimental dry eye disease. *Klin Monbl Augenheilkd* 234: 662–669; 2017.
- 50 Morisaki H, Ando A, Nagata Y, Pereira-Smith O, Smith JR, Ikeda K, Nakanishi M. Complex mechanisms underlying impaired activation of Cdk4 and Cdk2 in replicative senescence: roles of p16, p21, and cyclin D1. *Exp Cell Res.* 253: 503–510; 1999.
- 51 Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differential in human fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 19: 2109–2117; 1999.
- 52 Zhang DY, Wang HJ, Tan YZ. Wnt/b-catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through the DNA damage response and the p53/p21 pathway. *PLoS One.*6: e21397; 2011.
- 53 Harper ME, Bevilacqua L, Hagopian K, Weindruch R, Ramsey JJ. Aging, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiol Scand.* 182: 321–331; 2004.
- 54 Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Aging Dev.* 125: 811–826; 2004.
- 55 Higuchi A, Kawakita T, Tsubota K. IL-6 induction in desiccated corneal epithelium in vitro and in vivo. *Mol Vis*.17: 2400–2406; 2011.

- 56 Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 21: 210–216; 2003.
- 57 Maoka T. Caritenoids in marine animals. *Mar Drugs*. 9: 278–293; 2011.
- 58 Terao J. Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*.24: 659–661; 1989.
- 59 Lim BP, Nagao A, Terao J, Tanaka K, Suzuki T, Takama K. Antioxidant activity of xanthophyll on peroxyl radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1126: 178–184; 1992.
- 60 Palozza P, Krinsky Nl. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch Biochem Biophys.* 297: 291–295; 1992.
- 61 Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, Terada H. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta*. 1512: 251–258; 2001.
- 62 Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta*. 1740: 101–107; 2005.
- Hama S, Uenishi S, Yamada A, Ohgita T, Tsuchiya H, Yamashita E, Kogure K.
 Scavenging of hydroxyl radicals in aqueous solution by astaxanthin encapsulated in liposomes. *Bio Pharm Bull*.35: 2238–2242; 2012.
- 64 Kamezaki C, Nakashima A, Yamada A, Uenishi S, Ishibashi H, Shibuya N, Hama S, Hosoi S, Yamashita E, Kogure K. Synergistic antioxidative effect of astaxanthin and tocotrienol by co-encapsulated in liposomes. J Clin Biochem Nutr. 59: 100–106; 2016.
- 65 Steinfeld A, Lux A, Maier S, Süverkrüp R, Diestelhorst M. Bioavailability of fluorescein from a new drug delivery system in human eyes. *Br J Ophthalmol.* 88: 48-53; 2004.
- 66 Fujihara T, Murakami T, Fujita H, Nakamura M, Nakata K. Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Opthalmol Vis Sci.* 42: 96-100; 2001.
- 67 Kimura K, Morita Y, Orita T, Haruta J, Takeji Y, Sonoda KH. Protection of human corneal epithelial cells from TNF- α -induced disruption of barrier function by rebamipide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54: 2752-2760; 2013.

- 68 Chen QM, Liu J, Merrett JB. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochem J*. 347: 543-551; 2000.
- 69 Limoli CL, Giedzinski E Rola R, Otsuka S, Palmer TD, Fike JR. Radiation response of neural precursor cells: linking cellular sensitivety to cell cycle checkpoints apoptosis and oxidative stress. *Radiat Res.* 161: 17-27; 2004
- Pereboeva L, Westin E, Patel T, Flaniken I, Lamb L, Klingelhutz A, Goldman F.
 DNA damage responses and oxidative stress in dyskeratosis congenital. *PLoS* One. 8: e76473; 2013.
- 71 Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of senescence associated secretory phenotype. *EMBO J.* 30: 1536-1548; 2011.
- 72 Chang J, Li Y, Huang Y, Lam KS, Hoo RL, Wong WT, Cheng KK, Wang Y, Vanhoutte PM, Xu A. Adiponectin prevents diabetic premature senescence of endothelial progenitor cells and promotes endothelial repair by suppressing the p38 MAP kinase/p16^{INK4A} singnaling pathway. *Diabetes*. 59: 2949-59; 2010.
- Luo L, Li DQ, Corrales RM, Pflugfelder SC. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye Contact Lens.* 31: 186-193; 2005.
- 74 Lui H, Begley C, Chen M, Bardley A, Bonanno J, McNamara NA, Nelson JD, Simpson T. A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 3671-3679; 2009.