

—総説—

緑内障治療薬の探索と薬理的検討

葛西洋芳^{a)}, 原英彰^{b)*}

要約: 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慢性疾患の一つである。緑内障発症の原因の一つは眼圧が亢進し、眼底部にある視神経が物理的障害を受けて、視力が低下すると考えられている。そのため、眼圧を下げるのが緑内障治療の第一選択肢となる。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。現在のところ、主経路からの房水流出を促進させる薬剤が少なく、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。本研究では、主経路からの房水流出促進を評価するため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 *in vitro* で簡便に評価する方法を構築し、多数の薬剤を評価した結果、cyclin 依存性 kinase (CDK) 阻害薬である roscovitine が強いコラーゲンゲル収縮抑制作用を示した。Roscovitine には R 体と S 体の2つの異性体が存在するため、両異性体をウサギに点眼した後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。さらに培養神経節細胞を用いたストレス負荷試験で roscovitine 両異性体の抗ストレス作用を検討したところ、S 体の異性体のみに保護作用が認められた。

索引用語: 眼圧、3次元コラーゲンゲル培養方法、roscovitine

Screening and pharmacological research for anti-glaucoma drugs

Hiroyoshi KASAI^{a)}, Hideaki HARA^{b)*}

Abstracts: Glaucoma comprises group of eye diseases that gradually diminish eyesight, often without warning or symptoms. Loss of vision results from optic nerve damage, which was once attributed primarily to high intraocular pressure (IOP). Therefore, lowering IOP is the first choice for glaucoma therapy. The IOP is regulated by a balance between aqueous inflow and outflow, and is modulated by changes in the contractile state of the TM. If aqueous outflow decreases, IOP may gradually increase, resulting in hypertensive glaucoma. At present, only a limited number of agents that have the capability of modulating outflow through the conventional route are available. Identification of new and improved agents that can improve outflow is therefore important. We developed a 3-D collagen gel assay using primary porcine trabecular meshwork (pTM) cells and evaluated the inhibitory effects of various agents on the contractility of collagen gel. Roscovitine, a cell cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, strongly induced relaxation of pTM cells. Additionally, we investigated the effects of both the R- and S-isomer on the IOP of rabbits and on the death of cultured retinal ganglion cells. In the *in vivo* rabbit experiment, instillation of both isomers significantly lowered the IOP. In the *in vitro* cell experiment, the S-isomer alone inhibited tunicamycin- and glucose deprivation-induced cell damage.

Key phrases: intraocular pressure, 3-D collagen gel assay, roscovitine

1. 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慢性疾患の一つである。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

^{a)} わかもと製薬株式会社医薬開発統括部 (〒108-8330 東京都中央区日本橋本町2丁目2-2)

Pharmaceutical Development Division, Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd. (2-2-2 Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-8330, JAPAN)

^{b)} 岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西1丁目25-4)

Department of Biofunctional Evaluation, Molecular Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University (1-25-4 Daigaku-nishi, Gifu 501-1196, JAPAN)

低下する。眼圧が 1mmHg 高まれば、緑内障の進行が 10-19% 高まると言われている。そのため、眼圧を下げるの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出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 (Fig.1)。

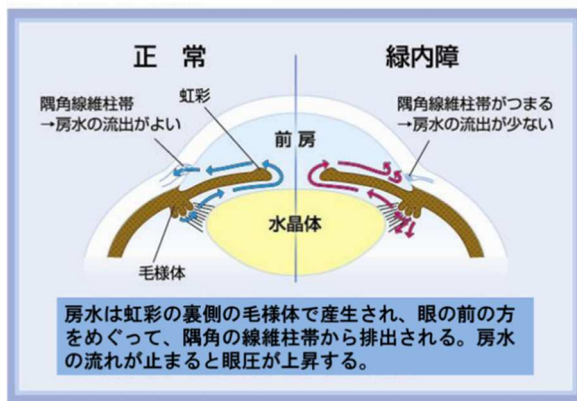


Fig. 1 房水の流れ

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

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²⁾、(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³⁾、(3) マクロファージのようなファゴサイトーシス や平滑筋細胞の機能特性を有することが報告されている^{4,5)}。

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。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. 2)⁶⁾。

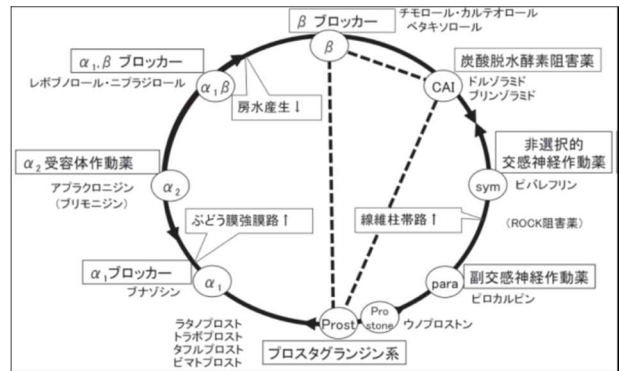


Fig. 2 薬物療法による現在販売されている眼圧下降薬の分類

細胞骨格調節薬である ethacrynic acid⁷⁾、cytochalasin B もしくは D⁸⁾、latrunculin-A もしくは B⁹⁾ の他に、細胞内シグナル調節薬である H-7¹⁰⁾、Y-27632¹¹⁾、ML-9¹²⁾ 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¹⁰⁾。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¹³⁾。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こと、(2) 皮膚¹³⁾、肝臓¹⁴⁾、心臓¹⁵⁾、平滑筋¹⁶⁾ の創傷治癒、線維化促進に寄与していることが報告されている。さらに、角膜の実質細胞¹⁷⁾、テノン嚢由来の線維芽細胞¹⁸⁾、網膜色素細胞¹⁹⁾、硝子体のヒアロサイト²⁰⁾、線維柱帯細胞²¹⁾を用いた研究でも 3 次元コラーゲンゲル培養法が広く利用されている。

また、ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum : FBS)²²⁾ 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^{23,24)}。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ことを報告している²¹⁾。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ことを示唆している。

一方、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²⁵⁻²⁷⁾。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。

始めに、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、さらに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。

つぎに、前述した検討結果より、強いコラーゲンゲル収縮抑制を示した cyclin 依存性 kinase (CDK) 阻害薬である roscovitine に着目した。すなわち、種々のストレス^{28,29)}に対して発現上昇し、アポトーシスや興奮毒性^{29,31)}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ことが考えられる。また 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³²⁾。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ため、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。

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 roscovitine によるコラーゲンゲル収縮抑制効果

豚眼球（北海道畜産公社）から初代培養で得た pTM と豚腱由来の I 型コラーゲン（新田ゼラチン）を低温下で混合後し、24 ウェルのセルカルチャープレートに播種し、1 時間培養してゲル化させた。ゲル化したコラーゲン層の上に 0.5% もしくは 2% の FBS（三光純薬）入り培地で 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ゲルを外して浮遊させた。37°C、48 時間共培養後、収縮したコラーゲンゲルを 0.1% クリスタルバイオレット染色液で染色後に撮影し、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ゲルの収縮に対する抑制率を算出した。FBS 存在下、種々の濃度の 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.3)。

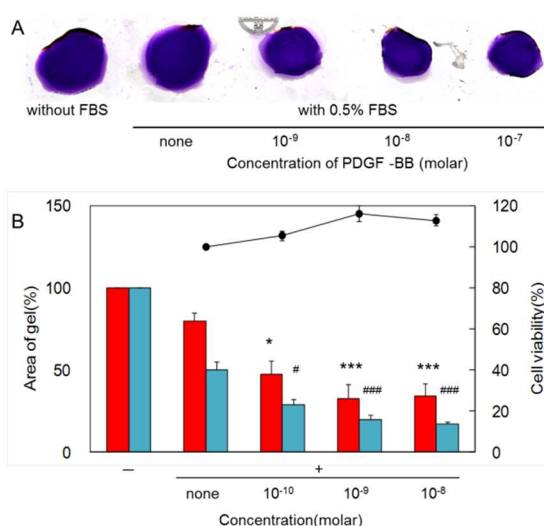


Fig. 3 Effects of FBS and additive PDGF-BB on contraction of collagen gel containing pTM cells.

A showed representative photographs of collagen gel stained by crystal violet after 48 hours culture and effect of PDGF-BB on both concentration of FBS-stimulated collagen gel contraction and viable cells. Various concentrations of PDGF-BB solution were added and cultured on collagen gels in the presence of FBS at concentrations of 0.5%. B showed the areas of collagen gels were measured and data were shown as % of collagen gel's area without FBS. Red columns were 0.5% FBS-stimulated contraction and blue columns were 2% FBS. Symbols, “-” or “+” were shown 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<0.05, ####P<0.005 versus 2% FBS alone. These results were cited from ref 33.

0.5% の FBS 存在下、roscovitine は 10^{-5} M 濃度で細胞毒性を示さずコラーゲンゲル収縮を有意に抑制した (Fig.4)。しかし、2% の FBS 存在下では、roscovitine によるコラーゲンゲル抑制作用は減弱した。データは示していないが、今回の結果より複数の薬剤がコラーゲンゲル収縮を抑制することが明らかだったが、その作用は roscovitine と異なり細胞毒性を示したため、コラーゲンゲル収縮自体が誘導されなかった。

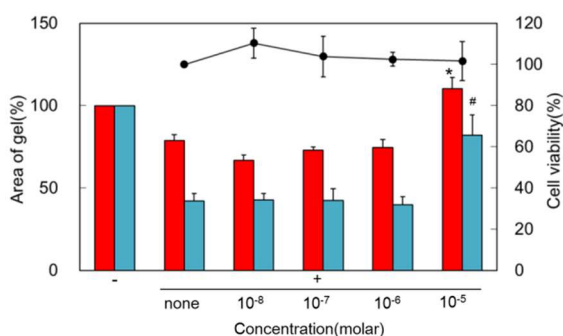


Fig. 4 Effects of roscovitine on collagen gel contraction induced by 0.5% and 2% FBS and viable cells.

Various concentrations of roscovitine 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. Red columns were 0.5% FBS-stimulated contraction and blue 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 2% FBS alone. These results were cited from ref 33.

Table 1 には、今回用いた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明らかとなった。すなわち、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 ($ID_{50} < LD_{50}$)、roscovitine はここに分類された。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抑制を示す薬剤が分類され ($ID_{50} < LD_{50}$)、グループ C には細胞毒性を与えてコラーゲンゲル収縮自体が誘導出来なかった薬剤が分類された ($ID_{50} > LD_{50}$)。

Table 1 ID_{50} and LD_{50} values for various inhibitors of collagen gel contraction by PMT cells.

These results were cited from ref 33.

Compounds	ID_{50} with 0.5% FBS	ID_{50} with 2% FBS	LD_{50}
$ID_{50} < LD_{50}$			
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	-
$ID_{50} < LD_{50}$			
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
$ID_{50} > LD_{50}$			
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

($\times 10^{-6}$ M)

3. 正常ウサギを用いた roscovitine による眼圧下降作用

4%のポリエチレングリコール 4000 水溶液で 0.1%に懸濁させた roscovitine の両アイソマー溶液を 50 μ L ずつ正常な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、眼圧を Model 30 Classic Pneumatometer (Medtronic Xomed Ophthalmics) で測定した。その結果、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. 5 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、その効力は同程度であった。

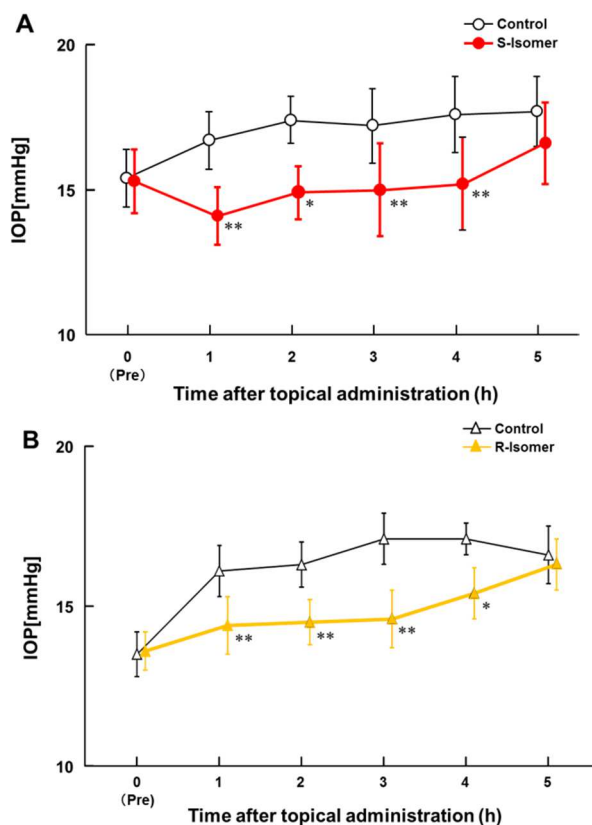


Fig. 5 Effects of the S-isomer (A) and R-isomer (B) of roscovitine on intraocular pressure.

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 \pm SE (n = 6). *P < 0.05, and **P < 0.01 versus control (Paired t-test). These results were cited from ref 34.

4. RGC-5 を用いた脱酸素・脱グルコース (oxygen and glucose deprivation : OGD) ストレスに対する roscovitine の保護効果

培養中の RGC-5 から、グルコース不含の培地に置換し、低酸素条件下 (94%窒素-5%炭酸ガス-1%酸素) で OGD ストレスを誘導した (低酸素化)。OGD ストレス誘導後、グルコース含有の培地に再置換し、追加培養した (再酸素化)。Roscovitine の両アイソマーは OGD ストレス誘導後に添加した。細胞生存率は追加培養後に Hoechst33342 と PI を添加し、染色された細胞数を計測し算出した。その結果、1 μ M の S 体 roscovitine は細胞障害を有意に抑制した。しかし、0.01-1 μ M 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.6)。

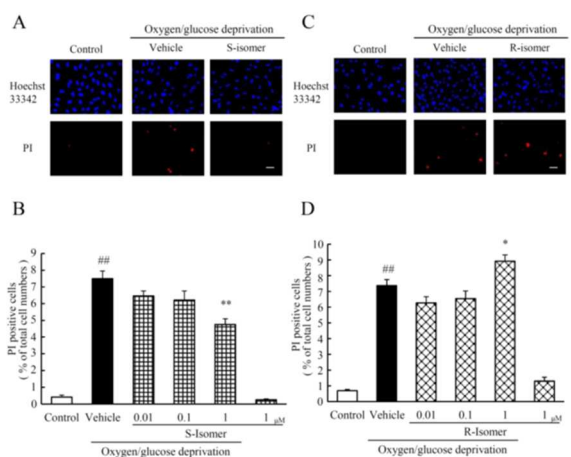


Fig. 6 Effects of the R-isomer and S-isomer of roscovitine on cell damage induced by oxygen–glucose deprivation (OGD) in RGC-5 cell cultures.

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 μM on RGC-5 cell death induced by OGD, but showed a significant protective effect at 1 μM. D showed the roscovitine R-isomer had no effect at 0.01 or 0.1 μM on RGC-5 cell death induced by OGD, but strongly promoted cell death at 1 μM. Data were shown as mean ± 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 μm. These results were cited from ref 34.

5. RGC-5 を用いた tunicamycin 誘導小胞体ストレスに対する roscovitine の保護効果

培養中の RGC-5 に tunicamycin を添加し小胞体ストレスを誘導した。小胞体ストレスを誘導後、前述した OGD 誘導ストレスの検討と同様、Hoechst33342 と PI を添加し染色された細胞数を算出した。1 μM の S 体 roscovitine は細胞障害を有意に抑制した。しかし、0.01-1 μM の R 体 roscovitine で前処置しても小胞体ストレスに伴う細胞障害を抑制しなかった (Fig.7)。

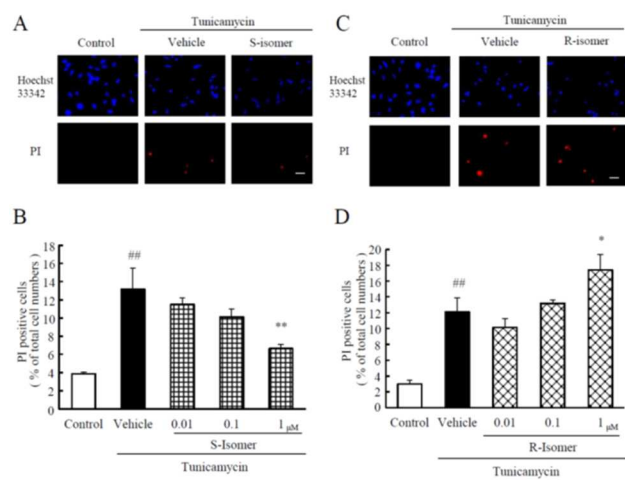


Fig. 7 Effects of R-isomer and S-isomer of roscovitine on cell damage induced by tunicamycin in RGC-5 cell cultures. A and C Representative fluorescence microscopy image of Hoechst 33342 and PI stained cells (added 27 h after tunicamycin treatment). B showed the roscovitine S-isomer at 0.01 or 0.1 μM 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 ± 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. These results were cited from ref 34.

6. 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たところ、細胞毒性を示さずコラーゲンゲル収縮を抑制する薬剤を見出した。すなわち、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。

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 阻害薬が細胞障害性を示さず、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、これまでに報告されている PKC 阻害薬 (現在開発中止) や ROCK 阻害薬 (2014 年本邦で初めて承認、発売中) と同様、緑内障治療薬になりうるものが大いに期待される。

一方、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 *in vitro* で検討したところ、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。

Roscovitine が阻害する酵素、すなわち CDK は線維芽細胞³⁵⁾ やメサングイウム細胞³⁶⁾ に発現する I 型コラーゲンおよび関節軟骨細胞³⁷⁾ 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、これら阻害物質は緑内障の網膜 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^{38),39)}。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、p16INK4a および p14ARF をエンコードする遺伝子の Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) および p15INK4b をエンコードする遺伝子 CDKN2B に変異が起きていることが報告されている⁴⁰⁾。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⁴¹⁾。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。以上の結果より、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⁴²⁾。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。今後、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 を用いた研究を進展させ、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。

7. 結論

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、かつ探索的に評価することを可能にした。また、コラーゲン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。

コラーゲン収縮抑制を示した薬剤のうち、異性体を有する roscovitine を正常なウサギに点眼し眼圧下降作用を検討したところ、両異性体共に眼圧下降作用を示した。さらに、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 体のみに保護作用が認められた。

以上より、roscovitine のような CDK 阻害薬が新しい緑内障治療薬の候補になりうるということが明らかとなった。

8. 謝辞

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、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。

本研究の遂行に際し、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博士に深謝致します。

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、取締役の平田晴久博士、共同研究者の倉澤崇修士並びに高橋佑次修士に厚く感謝致します。

9. 引用文献

- 1) Chauhan, B.C., Mikelberg, A.G. Balaszi, F.S. LeBlanc, R.P., Lesk, M.R. and Trope, G.E., *Arch Ophthalmol*, **126**, 1030-1036 (2008).
- 2) Yun, A.J., Murphy, C.G., Polansky, J.R., Newsome, D.A. and Alvarado, J.A., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **30**, 2012-2022 (1989).
- 3) Alexander, J.P., Samples, J.R., Van Buskirk, E.M. and Acott, T.S., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **32**, 172-180 (1991).
- 4) Rohen, J.W. Schachtschabel, O.O. and Matthiessen, P.F., *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, **193**, 95-107 (1975).
- 5) Coroneo, M.T., Korbmacher, C., Flugel, C., Stiemer, B. and Lutjen-Drecoll, E., *Exp Eye Res*, **52**, 375-388 (1991).
- 6) Aihara M., *Folia Pharmacol. Jpn*, **135**, 129-133 (2012).
- 7) Wiederholt, M., Dorschner, N. and Groth, J., *Ophthalmologica*, **211**, 153-160 (1997).
- 8) Johnson, D.H., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **38**, 2790-2799 (1997).
- 9) Liu, X., Wu, Z., Sheibani, N., Brandt, C.R., Polansky, J.R. and Kaufman, P.L., *Exp Eye Res*, **77**, 181-188 (2003).
- 10) Tian, B., Kaufman, P.L., Volberg, T., Gabelt, B.T. and Geiger, B., *Arch Ophthalmol*, **116**, 633-643 (1998).
- 11) Honjo, M., Tanihara, H., Inatani, M., Kido, N., Sawamura, T., Yue, B.Y., Narumiya, S. and Honda, Y., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **42**, 137-144 (2001).
- 12) Honjo, M., Inatani, M., Kido, N., Sawamura, T., Yue, B.Y., Honda, Y. and Tanihara, H., *Exp Eye Res*, **75**, 135-142 (2002).
- 13) Finesmith, T.H., Broadley, K.N. and Davidson, J.M., *J Cell Physiol*, **144**, 99-107 (1990).
- 14) Thimman, M.S. and Yee, H.F., Jr., *Am J Physiol*, **277**, G137-

- G143 (1999).
- 15) 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., *FASEB J*, **11**, 683-694 (1997).
- 16) Yamamoto, M., Nakamura, H., Yamato, M., Aoyagi, M., Yamamoto, K., *Exp Cell Res*, **225**, 12-21 (1996).
- 17) Mishima, H., Hibino, T., Hara, H., Murakami, J., Otori, T., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**, 2547-2553 (1998).
- 18) Porter, R.A., Brown, R.A., Eastwood, M., Occleston, N.L., Khaw, P.T., *Wound Repair Regen*, **6**, 157-166 (1998).
- 19) Raymond, M.C., Thompson, J.T., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **31**, 1079-1086 (1990).
- 20) Hirayama, K., Hata, Y., Noda, Y., Miura, M., Yamanaka, I., Shimokawa, H., Ishibashi, T., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 3896-3903 (2004).
- 21) Nakamura, Y., Hirano, S., Suzuki, K., Seki, K., Sagara, T., Nishida, T., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43**, 3465-3472 (2002).
- 22) Borderie, V.M., Mourra, N., Laroche, L., *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **237**, 861-869 (1999).
- 23) Assouline, M., Chew, S.J., Thompson, H.W., Beuerman, R., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **33**, 1742-1755 (1992).
- 24) Nakamura, Y., Sagara, T., Seki, K., Hirano, S., Nishida, T., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **44**, 4331-4336 (2003).
- 25) Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y., Ogura, Y., *Adv Drug Deliv Rev*, **52**, 25-36 (2001).
- 26) Shimazawa, M., Inokuchi, Y., Ito, Y., Murata, H., Aihara, M., Miura, M., Araie, M., Hara, H., *Mol Vis*, **13**, 578-587 (2007).
- 27) Masuda, Y., Horiguchi, H., Dumoulin, S.O., Furuta, A., Miyauchi, S., Nakadomari, S., Wandell, B.A., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **51**, 5356-5364, (2010).
- 28) 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., *J Neurosci*, **21**, 5045-5053, (2001).
- 29) Rashidian, J., Iyirhiaro, G.O., Park, D.S., *Biochim Biophys Acta*, **1772**, 484-493, (2007).
- 30) Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L., *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 417-425, (2002).
- 31) Timsit, S., Menn, B.C., *Biotechnol J*, **2**, 958-966, (2007).
- 32) Menn, B., Bach, S., Blevins, T.L., Campbell, M., Meijer, L., Timsit, S., *PLoS ONE*, **5**, e12117, (2010).
- 33) Kasai H., Ishisaka M., Shirasawa E., Hara H., *Pharmaceut Anal Acta*, 1-7, (2012).
- 34) Kasai H., Imamura T., Tsuruma K., Takahashi Y., Kurasawa K., Hirata H., Shimazawa M. Hara H., *Neurosci Lett*, **535**, 95-99, (2013).
- 35) Nho, R.S., Hergert, P., Kahm, J., Jessurun, J., Henke, C., *Am J Pathol*, **179**, 2420-2430, (2011).
- 36) Schöcklmann, H.O., Lang, S., Kralewski, M., Hartner, A., Lüdke, A., Sterzel, R.B., *Kidney Int*, **58**, 1108-1120, (2000).
- 37) Hwang, S.G., Song, S.M., Kim, J.R., Park, C.S., Song, W.K., Chun, J.S., *IUBMB Life*, **59**, 90-98, (2007).
- 38) Kirwan, R.P., Leonard, M.O., Murphy, M., Clark, A.F., O'Brien, C.J., *Glia*, **52**, 309-24, (2005).
- 39) Chen, H., Zhang, M.C., Zhang, H.X., *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, **46**, 631-634, (2010).
- 40) 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., *PLoS ONE*, **7**, e40107, (2012).
- 41) 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., *J Neurosci*, **21**, 5045-5053, (2001).
- 42) Chae, H.D., Kim, B.M., Yun, U.J., Shin, D.Y., *Oncogene*, **27**, 4115-4121, (2008).

10. 特記事項

本総説は岐阜薬科大学博士論文(甲第154号)の内容を中心にまとめたものである。