

明 細 書

発明の名称：角結膜障害の治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、RAR γ アゴニストを有効成分として含有する角結膜障害の治療剤に関する。

背景技術

[0002] 角膜は眼球前面を覆う直径1cm程度の透明な無血管の組織、また、結膜は角膜縁より後方の眼球表面と眼瞼の裏面を覆っている粘膜であり、これらは視覚において重要な機能を担っており、何らかの障害が起こると視機能へ重篤な影響を及ぼすことが知られている。角膜潰瘍、角膜炎、ドライアイ等の種々の疾患により引き起こされる角結膜障害は、外的障害等、何らかの理由により生じた障害の修復が遅延したり、あるいは障害が遷延化したものである。角膜と結膜は連なった組織であるため、これら疾患により互いの上皮の正常な構築に悪影響を及ぼし、更には、角膜実質や内皮の構造や機能まで害することがある。

[0003] 角膜実質組織を構成する代表的な基質成分の一つとしてコラーゲン（特にタイプIコラーゲン）が知られており、角結膜障害に起因する疾患においては基質分解に伴う機能障害が生じる。従って、コラーゲン（特にタイプIコラーゲン）の分解を抑制することは、角結膜障害に起因する疾患に対して有効であると考えられる。

[0004] また、角結膜障害においては、炎症が沈静化した後にしばしば形成される瘢痕組織が視機能を障害することがある。それ故、上記のコラーゲンの分解抑制と同様に、コラーゲンの収縮抑制が可能であれば、瘢痕の形成及び収縮（以下「瘢痕形成」と総称する）に対しても有効であると考えられる。

[0005] 特許文献1には、全トランスレチノイン酸（以下、ATRAいうこともある）が角膜再生を促進することが記載されているが、その作用は弱く、詳細なメカニズムも明らかにされていない。

- [0006] また、A T R Aはレチノイン酸受容体（以下、R A Rということもある）のアゴニストであるが、R A RのサブタイプであるR A R α 、R A R β 及びR A R γ に対する選択性を持たないため、角膜再生作用に対する各R A Rサブタイプの寄与も不明である。
- [0007] 一方で、R A Rは、炎症、免疫及び構造細胞といった多くの細胞で、増殖、形態形成及び分化等の多様な作用に関与しており、また、R A Rサブタイプの分布は、哺乳動物の組織及び器官によって差があることが確認されている。
- [0008] R A Rの作用には、R A R α によるトリグリセリド上昇等の好ましくない作用もあるため、R A Rのアゴニスト活性を有する化合物がサブタイプに対する特異性又は選択性を有することは、副作用リスクの低減につながることを期待される。
- [0009] 以上より、強力な角結膜障害抑制作用を有し、サブタイプ選択性に基づく高い安全性を持つR A Rアゴニストが求められている。
- [0010] 特許文献2及び3には、R A Rアゴニストである（E）-4-（2-（3-（（1H-ピラゾール-1-イル）メチル）-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタレン-2-イル）ビニル）安息香酸及びその誘導体が開示されている。また、特許文献2には、（E）-4-（2-（3-（（1H-ピラゾール-1-イル）メチル）-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタレン-2-イル）ビニル）安息香酸が、肺気腫、癌、及び皮膚疾患に有用であることが記載されており、特許文献3には、神経性疼痛に有用であることが記載されている。
- [0011] このほか、非特許文献1には、R A Rアゴニストである6-（3-（1-アダマンチル）-4-ヒドロキシフェニル）-2-ナフタレン酸が、肺癌細胞のアポトーシスを誘導することが記載されている。
- [0012] さらに、特許文献4には、R A Rアゴニストである3-フルオロ-4-（2-ヒドロキシ-2-（5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テ

トラヒドロナフタレンー２－イル) アセチルアミノ]安息香酸が筋修復又は筋再生に有用であることが記載されている。

- [0013] しかしながら、いずれのRARアゴニストに関しても角結膜障害や角結膜障害に伴う瘢痕形成に対する薬理作用について検討した報告はなく、示唆する文献も無い。

先行技術文献

特許文献

- [0014] 特許文献1：特開2009-235031号公報
特許文献2：国際公開第2002/028810号パンフレット
特許文献3：国際公開第2008/057930号パンフレット
特許文献4：特開2013-536855号公報

非特許文献

- [0015] 非特許文献1：Sun SY et al., Cancer Research 62(8): 2430-2436(2002)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0016] 眼疾患、特に角結膜障害に有効な薬物を探索することは、眼分野において重要且つ興味深い課題である。本発明の課題は、角結膜障害抑制作用を有し、サブタイプ選択性に基づく高い安全性を有する治療剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0017] 本発明者は角結膜障害に有効な薬物を探索すべく鋭意研究を行ったところ、RAR γ アゴニストである(E)-4-(2-{3-[(1H-ピラゾール-1-イル)メチル]-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン-2-イル}ビニル)安息香酸(R667：以下「RAR γ アゴニストA」ということもある)が、ウサギ角膜実質細胞や結膜下線維芽細胞を用いた薬理試験において、強力なコラーゲン分解抑制作用を示し、更に有意なコラーゲン収縮抑制作用も示したことより、角結膜障害

に対して優れた改善効果を発揮し、併せて角結膜障害に伴う瘢痕形成にも優れた改善効果を発揮することを見いだした。さらに、他のRAR γ アゴニストである6-[3-(1-アダマンチル)-4-ヒドロキシフェニル]-2-ナフタレン酸(CD437:以下「RAR γ アゴニストB」ということもある)や、3-フルオロ-4-[2-ヒドロキシ-2-(5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン-2-イル)アセチルアミノ]安息香酸(BMS961:以下「RAR γ アゴニストC」ということもある)も、ウサギ角膜実質細胞を用いた薬理試験において、有意なコラーゲン分解抑制作用を示すことを見だし、本発明を完成した。

- [0018] すなわち、本発明は、[1] RAR γ アゴニストを有効成分として含有する角結膜障害の治療剤や、[2] RAR γ アゴニストが、(E)-4-(2-{3-[(1H-ピラゾール-1-イル)メチル]-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン-2-イル}ビニル)安息香酸、6-[3-(1-アダマンチル)-4-ヒドロキシフェニル]-2-ナフタレン酸、若しくは3-フルオロ-4-[2-ヒドロキシ-2-(5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン-2-イル)アセチルアミノ]安息香酸、そのエステル又はその塩である、上記[1]に記載の治療剤や、[3] 角結膜障害が、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ、結膜炎、慢性表層角膜炎、角膜糜爛、遷延性角結膜障害、点状表層角膜炎、角膜上皮欠損、結膜上皮欠損、乾性角結膜炎、上輪部角結膜炎、糸状角結膜炎、感染性角膜炎、非感染性角膜炎、感染性結膜炎、非感染性結膜炎、角膜瘢痕化、結膜瘢痕化からなる群から選択される、上記[1]又は[2]に記載の治療剤や、[4] 投与形態が点眼投与又は経口投与である、上記[1]～[3]のいずれかに記載の治療剤や、[5] 剤型が、点眼剤、眼軟膏、注射剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤又はカプセル剤である、上記[1]～[4]のいずれかに記載の治療剤である。

発明の効果

- [0019] 本発明の角結膜障害の治療剤の有効成分であるRAR γ アゴニストは、角

結膜におけるコラーゲン分解を強力に抑制することにより、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ、結膜炎、慢性表層角膜炎、角膜糜爛、遷延性角膜障害、点状表層角膜炎、角膜上皮欠損、結膜上皮欠損、乾性角結膜炎、上輪部角結膜炎、糸状角結膜炎、感染性角膜炎、非感染性角膜炎、感染性結膜炎、又は非感染性結膜炎等の角結膜障害の治療剤として有用である。

[0020] また、本発明の角結膜障害の治療剤の有効成分であるRAR γ アゴニストは、角結膜におけるコラーゲン収縮を強力に抑制することにより、角結膜障害に伴う角膜瘢痕化又は結膜瘢痕化の治療剤としても有用である。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]RAR γ アゴニストA (R667) の濃度 (nM) とコラーゲン分解 (ウェルあたりのヒドロキシプロリン量 (μ g)) の関係を示すグラフである。縦軸は、コントロールのヒドロキシプロリン量を100とした時の数値 (%) を示す。

[図2]結膜下線維芽細胞を用いた場合のRAR γ アゴニストA (R667) の濃度 (nM) とコラーゲン収縮 (ディッシュ中のコラーゲンゲルの直径 (mm)) の関係を示すグラフである。図中、「★」は、統計的に有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。

[図3]角膜実質細胞を用いた場合のRAR γ アゴニストA (R667) の濃度 (μ M) とコラーゲン収縮 (ディッシュ中のコラーゲンゲルの直径 (mm)) の関係を示すグラフである。図中、「★」は、統計的に有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。

[図4]角膜実質細胞を用いた場合のRAR γ アゴニストA (R667)、RAR γ アゴニストB (CD437)、RAR γ アゴニストC (BMS961) の濃度 (nM) とコラーゲン分解の関係を示すグラフである。縦軸は、RAR γ アゴニスト及び刺激剤を加えていない場合のウェルあたりのヒドロキシプロリン量 (μ g) を1とした場合の、RAR γ アゴニスト及び刺激剤を加えた場合のウェルあたりのヒドロキシプロリン量 (μ g) の割合 (Ratio) を示す。また、図中、「★」は、統計的に有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。

ることを示す。

[図5]角膜実質細胞を用いた場合のRAR γ アゴニストA (R667) の濃度 (μ M) とマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現及び活性化との関係を示す図である。図5 A上段はMMP-1、図5 A下段はMMP-3、図5 BはMMP-2 及びMMP-9 の発現及び活性化を示す。

[図6]日本白色種雄性ウサギの片眼の角膜実質内にリポポリサッカリド (LPS) 及びRAR γ アゴニストA (R667) を投入した場合の観察結果を示す図である。上段(Vehicle)が本発明のRAR γ アゴニストA (R667) を含まない溶液のみを投入した結果、下段(0.1%R667)がRAR γ アゴニストA (R667) を含んだ溶液を投入した結果である。

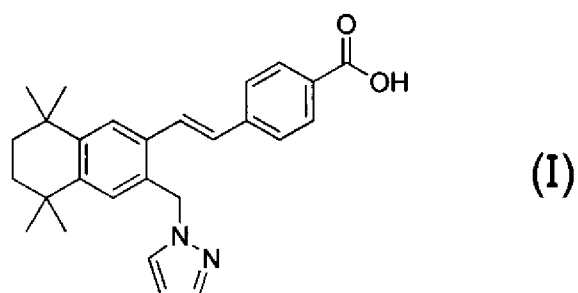
発明を実施するための形態

[0022] 本発明の角結膜障害の治療剤としては、RAR γ アゴニストを有効成分とするものであれば特に制限されず、本発明のRAR γ アゴニストとは、RAR α 受容体やRAR β 受容体と比較してRAR γ 受容体に有意に結合して、RAR γ 受容体の活性化を促進することができる化合物を意味する。

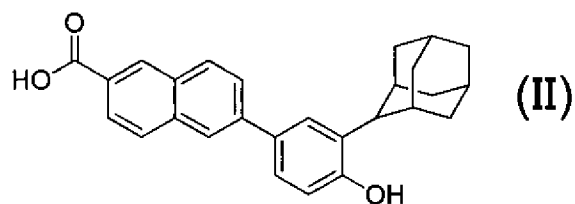
[0023] かかるRAR γ アゴニストとしては、以下の式 (I) で表わされる (E)-4-(2-{3-[(1H-ピラゾール-1-イル)メチル]-5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタレン-2-イル}ビニル)安息香酸 (R667) や、以下の式 (II) で表わされる 6-[3-(1-アダマンチル)-4-ヒドロキシフェニル]-2-ナフタレン酸 (CD437) や、以下の式 (III) で表わされる 3-フルオロ-4-[2-ヒドロキシ-2-(5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタレン-2-イル)アセチルアミノ]安息香酸 (BMS961) や、以下の式 (IV) で表わされる (2E)-3-(4-カルボキシフェニル)-1-(5, 5, 8, 8-テトラメチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロナフタレン-2-イル)-2-プロペン-1-オン オキシム (NRX204647: 以下「RAR γ アゴニストD」ということもある) や、以下の式 (V) で表わされる 4-[7-(1-アダマンチル)-6-ヒドロキシナフ

タレン-2-イル] 安息香酸 (CD1530 : 以下「RAR γ アゴニストE」ということもある) や、これら化合物 (RAR γ アゴニストA、B、C、D、E) のエステルや、これら化合物 (RAR γ アゴニストA、B、C、D、E) の塩等を例示することができ、RAR γ アゴニストA、RAR γ アゴニストB、RAR γ アゴニストC、これら化合物 (RAR γ アゴニストA、B、C) のエステル、これら化合物 (RAR γ アゴニストA、B、C) の塩を好適に例示することができる。

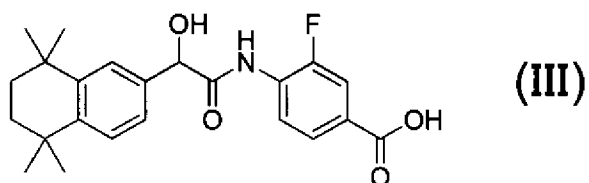
[0024] [化1]



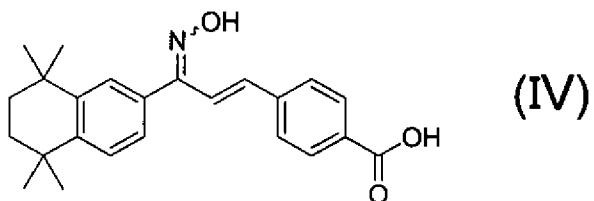
[0025] [化2]



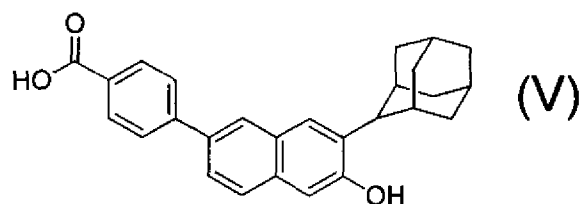
[0026] [化3]



[0027] [化4]



[0028] [化5]



[0029] また、本発明の他の態様としては、本発明のRAR γ アゴニストを対象に投与することを特徴とする角結膜障害の治療方法や、角結膜障害の治療剤として使用するための本発明のRAR γ アゴニストや、本発明のRAR γ アゴニストの角結膜障害の治療剤の調製における使用を挙げることができる。

[0030] 本発明の角結膜障害の治療剤の有効成分の一つである、RAR γ アゴニストA、そのエステル又はその塩は、特許文献2に記載された公知の化合物であり、特許文献2に記載された方法に準じて製造することができるほか、市販品を購入することもできる。かかる市販品として、Shanghai Haoyuan Chem express社製 商品名：パロバロテンを例示することができる。

[0031] 本発明の角結膜障害の治療剤の有効成分のうち、RAR γ アゴニストBは非特許文献1及び特許文献4に、RAR γ アゴニストCは特許文献4に、RAR γ アゴニストD及びEは次の文献（Shimono K. et al., Nat Med. 17(4) : 454-460 (2011)）に記載された公知の化合物であり、かかる化合物、そのエステル又はその塩は、常法に準じて製造することができるほか、市販品を購入することができる。市販品として、RAR γ アゴニストBについてはアブカム社製 商品名：CD437 (ab141305) や、Tocris Bioscience社製 商品名：CD437を例示することができ、RAR γ アゴニストCについてはTocris Bioscience社製 商品名：BMS961を例示することができ、RAR γ アゴニストEについてはSanta Cruz biotechnology社製：商品名 CD1530や、Tocris Bioscience社製 商品名：CD1530を例示することができる。

[0032] 本発明の角結膜障害の治療剤の有効成分である、前記RAR γ アゴニストA、B、C、D、Eのエステルにおけるエステルとは、生体内における生理

条件下で酵素等による反応により $R^1R^2R^3$ アゴニスト A、B、C、D、E に変換されるエステルであれば特に制限はなく、そのようなエステルとしては、メタノール、エタノール、プロパノール、ヘキサノール若しくはドデカノール等の一級アルコールとのエステル；イソプロパノール、s-ブタノール若しくは1-エチルプロパノール等の二級アルコールとのエステル；t-ブタノール若しくは1-メチル-1-エチルプロパノール等の三級アルコールとのエステル；又は2-アミノエタノール等のアミノアルコールとのエステル等が挙げられる。

[0033] 上記のエステルは、公知の方法によって前記 $R^1R^2R^3$ アゴニスト A、B、C、D、E 又はその合成中間体から製造することができる。

[0034] 本発明の角結膜障害の治療剤の有効成分である、前記 $R^1R^2R^3$ アゴニスト A、B、C、D、E の塩における塩としては、医薬として許容される塩であれば特に制限はなく、こうした塩には、(1) 酸付加塩として、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩若しくはリン酸塩等の無機酸塩；又は酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、安息香酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、グルタミン酸塩若しくはアスパラギン酸塩等の有機酸塩、或いは(2) 塩基性塩として、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩若しくはマグネシウム塩等の金属塩；アンモニウム塩等の無機塩；又はトリエチルアミン塩若しくはグアニジン塩等の有機アミン塩等が挙げられる。

[0035] 本発明において、角結膜障害とは、涙液異常、代謝異常、外的障害等といった種々の要因により角膜や結膜が障害を受けた状態にあるものをいい、例えば、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ、結膜炎、慢性表層角膜炎、角膜糜爛、遷延性角膜障害、点状表層角膜炎、角膜上皮欠損、結膜上皮欠損、乾性角結膜炎、上輪部角結膜炎、糸状角結膜炎、感染性角膜炎、非感染性角膜炎、感染性結膜炎、非感染性結膜炎等が挙げられ、コラーゲンの

分解抑制作用により優れた改善効果を奏する。また、本発明では、角結膜障害に伴う角膜瘢痕化（角膜での瘢痕形成）や結膜瘢痕化（結膜での瘢痕形成）も角結膜障害として挙げられ、コラーゲンの収縮抑制作用により優れた改善効果を奏する。

[0036] 本発明の角結膜障害の治療剤は、適宜の薬理学的に許容される添加剤と混合して製造される、錠剤、カプセル剤、散剤、シロップ剤、顆粒剤、細粒剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、経皮吸収剤、坐剤、軟膏剤（好ましくは、眼軟膏）、ローション、吸入剤又は注射剤等の形態で、経口、又は非経口（静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、経皮投与、経気道投与、皮内投与又は皮下投与）で投与することができる。

[0037] これらの製剤は、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、乳化剤、安定剤、矯味矯臭剤又は希釈剤等の添加剤を使用して、周知の方法で製造される。

[0038] 賦形剤は、例えば、有機系賦形剤又は無機系賦形剤が挙げられる。有機系賦形剤は、例えば、乳糖、ショ糖、ブドウ糖、マンニトール若しくはソルビトール等の糖誘導体；トウモロコシデンプン、馬鈴薯デンプン、 α -デンプン若しくはデキストリン等のデンプン誘導体；結晶セルロース等のセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；又はプルラン等が挙げられる。無機系賦形剤は、例えば、軽質無水珪酸；又は硫酸カルシウム等の硫酸塩等が挙げられる。

[0039] 滑沢剤は、例えば、ステアリン酸；ステアリン酸カルシウム若しくはステアリン酸マグネシウム等のステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス若しくはゲイロウ等のワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウム等の硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；D, L-ロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム；無水珪酸若しくは珪酸水和物等の珪酸類；又は上記の賦形剤におけるデンプン誘導体等が挙げられる。

[0040] 結合剤は、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール又は上記の賦形剤で示された化合物等が挙げられる。

- [0041] 崩壊剤は、例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム若しくは内部架橋カルボキシメチルセルロースカルシウム等のセルロース誘導体；架橋ポリビニルピロリドン；又はカルボキシメチルスターチ若しくはカルボキシメチルスターチナトリウム等の化学修飾されたデンプン若しくはセルロース誘導体等が挙げられる。
- [0042] 乳化剤は、例えば、ベントナイト若しくはビーガム等のコロイド性粘土；ラウリル硫酸ナトリウム等の陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウム等の陽イオン界面活性剤；又はポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル若しくはショ糖脂肪酸エステル等の非イオン界面活性剤等が挙げられる。
- [0043] 安定剤は、例えば、メチルパラベン若しくはプロピルパラベン等のパラヒドロキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール若しくはフェニルエチルアルコール等のアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール若しくはクレゾール等のフェノール類；チメロサール；無水酢酸；又はソルビン酸が挙げられる。
- [0044] 矯味矯臭剤は、例えば、サッカリンナトリウム若しくはアスパルテーム等の甘味料；クエン酸、リンゴ酸若しくは酒石酸等の酸味料；又はメントール、レモンエキス若しくはオレンジエキス等の香料等が挙げられる。
- [0045] 希釈剤は、通常希釈剤として使用される化合物であり、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ショ糖、硫酸カルシウム、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶性セルロース、水、エタノール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、デンプン、ポリビニルピロリドン又はこれらの混合物等が挙げられる。
- [0046] 本発明の角結膜障害の治療剤は、上記の投与剤型に加えて、点眼剤も挙げられる。添加剤として、等張化剤、緩衝剤、pH調節剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、保存剤（防腐剤）等を適宜配合することにより、周知の方法で製剤化することができる。また、pH調節剤、増粘剤、分散剤等を添加し、

薬物を懸濁化させることによって、安定な点眼剤を得ることもできる。

[0047] 等張化剤としては、例えば、グリセリン、プロピレングリコール、塩化ナトリウム、塩化カリウム、ソルビトール若しくはマンニトール等を挙げることができる。

[0048] 緩衝剤としては、例えば、リン酸、リン酸塩、クエン酸、酢酸若しくはε-アミノカプロン酸等を挙げることができる。

[0049] pH調節剤としては、例えば、塩酸、クエン酸、リン酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、ホウ酸、ホウ砂、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、炭酸ナトリウム若しくは炭酸水素ナトリウム等を挙げることができる。

[0050] 可溶化剤としては、例えば、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、マクロゴール4000等を挙げることができる。

[0051] 増粘剤及び分散剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース若しくはヒドロキシプロピルセルロース等のセルロース系高分子；ポリビニルアルコール；又はポリビニルピロリドン等を、また、安定化剤としては、例えば、エデト酸若しくはエデト酸ナトリウム等を挙げることができる。

[0052] 保存剤（防腐剤）としては、例えば、汎用のソルビン酸、ソルビン酸カリウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル若しくはクロロブタノール等が挙げられ、これらの保存剤を組み合わせ使用することもできる。

[0053] 点眼剤のpHは眼科製剤に許容される範囲内にあればよいが、4.0～8.5に設定することが望ましい。

[0054] 軟膏剤（好ましくは、眼軟膏）の場合は、白色ワセリン若しくは流動パラフィン等の汎用される基剤を用いて調製することができる。

[0055] 本発明の角結膜障害の治療剤の投与量は、剤型、投与すべき患者の症状の軽重、年齢、体重、医師の判断等に応じて適宜変えることができるが、経口剤の場合、一般には、成人に対し1日あたり0.01～5000mg、好ましくは0.1～2500mg、より好ましくは0.5～1000mgを1回

又は数回に分けて投与することができる。また、点眼剤の場合には、0.00001～10% (W/V)、好ましくは0.00001～3% (W/V)、より好ましくは0.0001～1% (W/V)の有効成分濃度のものを1日1回又は数回投与することができ、眼軟膏の場合には、0.00001～10% (W/W)、好ましくは0.0001～3% (W/W)、より好ましくは0.001～1% (W/W)の有効成分濃度のものを1日1回又は数回投与することができる。

[0056] 以下、実施例（試験例及び製剤例）を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

[0057] (試験例) RAR γ アゴニストAによる正常ウサギ初代角膜実質細胞の3次元コラーゲンゲル分解抑制試験

正常ウサギ角膜細胞を用い、Nishidaらの方法(Investigative Ophthalmology & Visual Science 42: 1247-1253(2001))に準じて、3次元コラーゲンゲル分解に対する被験化合物の抑制効果を評価した。

[0058] 正常ウサギ眼球から採取した初代角膜実質細胞を密集状態まで増殖させ、0.05% Trypsin-EDTAにより培養スライドから剥離し、無血清培地（製品番号11095; Gibco社製）にて洗浄後、細胞数をカウントした。得られた初代角膜実質細胞を、タイプIコラーゲン溶液であるCellmatrix Type I-A（製品番号637-00653; 新田ゼラチン社製）及びReconstitution Buffer（製品番号635-00791; 新田ゼラチン社製）と混合し、24ウェルプレートに終濃度 1×10^5 cells/wellになるように分注してコラーゲンゲルを作製した。

[0059] ゲル化後、MEM培地に、RAR γ アゴニストA (R667)のジメチルスルホキシド溶液（R667濃度: 0.1 nM、1 nM、10 nM、100 nM、1000 nM）若しくはコントロールとしてRAR γ アゴニストAを含まないジメチルスルホキシド溶液、刺激剤としてIL-1 β （製品番号2

01-LB-005; R&D systems社製) 10 ng (終濃度 10 ng/ml) 及び Plasminogen (製品番号 P9156; Sigma社製) 60 µg (終濃度 60 µg/ml) を加えて、先に調製したコラーゲングルに重層し、培養 (37℃、5% CO₂ 条件下) を開始した。

[0060] 培養 48 時間後、上清を限外濾過し、濃塩酸 100 µl を加えて加温し、コラーゲンの加水分解を行った。加水分解後の反応液を、ドライサーモユニット (DTU-2C、タイテック社製) 及びエバポレーションヘッド (E1-20、タイテック社製) を用いて窒素ガス雰囲気下で乾燥させた後、超純水 500 µl に溶解させた。この溶解液中のコラーゲン分解産物であるヒドロキシプロリン量を Bergman らの方法 (Analytical Chemistry 35(12): 1961-1965 (1963)) に準じて測定し、RARγ アゴニスト A のコラーゲン分解抑制作用を評価した。結果を図 1 に示す。

[0061] 本試験において、RARγ アゴニスト A は用量依存的に角結膜におけるコラーゲン分解抑制作用を示した。

[0062] (製剤例)

[0063] (処方例 1) 点眼剤

100 ml 中

RARγ アゴニスト A	100 mg
塩化ナトリウム	800 mg
ポリソルベート 80	適量
リン酸水素二ナトリウム	適量
リン酸二水素ナトリウム	適量
滅菌精製水	適量

滅菌精製水に RARγ アゴニスト A 及びそれ以外の上記成分を加え、これらを十分に混合して点眼液を調製する。RARγ アゴニスト A 等の添加量を変えることにより、濃度が 0.05% (W/V)、0.3% (W/V)、0.5% (W/V) 又は 1% (W/V) の点眼剤を調製できる。

[0064] (処方例 2) 眼軟膏

100g中	RARγアゴニストA	0.3g
	流動パラフィン	10.0g
	白色ワセリン	適量

均一に溶解した白色ワセリン及び流動パラフィンに、RARγアゴニストAを加え、これらを十分に混合して後に徐々に冷却することで眼軟膏を調製する。RARγアゴニストA等の添加量を変えることにより、濃度が0.05% (W/W)、0.1% (W/W)、0.5% (W/W) 又は1% (W/W) の眼軟膏を調製できる。

[0065] (処方例3) 錠剤

100mg中

RARγアゴニストA	1mg
乳糖	66.4mg
トウモロコシデンプン	20mg
カルボキシメチルセルロースカルシウム	6mg
ヒドロキシプロピルセルロース	6mg
ステアリン酸マグネシウム	0.6mg

RARγアゴニストA、トウモロコシデンプン及び乳糖を混合機中で混合し、その混合物にカルボキシメチルセルロースカルシウム及びヒドロキシプロピルセルロースを加えて造粒し、得られた顆粒を乾燥後整粒し、その整粒顆粒にステアリン酸マグネシウムを加えて混合し、打錠機で打錠する。また、RARγアゴニストA等の添加量を変えることにより、100mg中の含有量が0.1mg、10mg又は50mgの錠剤を調製できる。

実施例2

[0066] (試験例) RARγアゴニストAによる正常ウサギ由来の各種初代細胞の3次元コラーゲンゲル収縮抑制試験

初代結膜下線維芽細胞、初代角膜実質細胞を用い、Nishidaの方法に準じて、3次元コラーゲンゲル収縮に対する被験化合物の抑制効果を評

価した。

[0067] 実施例1と同様に、初代結膜下線維芽細胞を増殖させて培養スライドから剥離し、洗浄後、細胞懸濁液を作製した。得られた懸濁液（ 1.1×10^7 cells/ml MEM）と、タイプIコラーゲン溶液（5 mg/ml）と、 $10 \times$ MEMと、Reconstitution Bufferと、水を、0.2 : 7 : 1 : 1 : 1.8（容量比）にて氷上で混合し、この混合液0.5 mlを1%BSAでコートした培養ディッシュに播種し、37℃で1時間インキュベーションしてコラーゲンを作製した。

[0068] 次に、RAR γ アゴニストAを1 nM、10 nM、100 nMの各濃度で、そしてTGF- β 1（R&D systems社製）を一定量（1 ng/ml）で添加した無血清培地0.5 mlを上記ゲル上にそれぞれ加え、薬剤無添加の無血清培地を加えたものと共に、引き続き37℃でインキュベーションし、24時間経過後からゲルの直径を測定した。48時間経過後のゲルの直径の測定結果を図2に示す。

[0069] 初代角膜実質細胞についても、初代結膜下線維芽細胞と同様にしてゲルの直径を測定した。結果を図3に示す。

[0070] 図2、3より、RAR γ アゴニストAは、コラーゲン分解だけでなく、結膜下線維芽細胞、角膜実質細胞を用いた、TGFによるコラーゲンゲル収縮も抑制することがわかる。このことは、RAR γ アゴニストAがコラーゲンのターンオーバーに寄与し、眼組織での炎症、出血、感染、手術、外傷等の後に起こる組織リモデリング、つまり、線維化や瘢痕化を抑制する作用があるということを示している。

実施例 3

[0071] （試験例）RAR γ アゴニストA、B、又はCによる正常ウサギ由来の初代角膜実質細胞の3次元コラーゲンゲル分解抑制試験

初代角膜実質細胞を用い、Nishidaらの方法に準じて、実施例1と同様の方法で3次元コラーゲンゲル分解に対する被験化合物の抑制効果を評価した。

[0072] 実施例1と同様に、初代角膜実質細胞を増殖させて培養スライドから剥離し、洗浄後、細胞懸濁液を作製した。得られた懸濁液（ 1.1×10^7 cells/ml MEM）と、タイプIコラーゲン溶液（5 mg/ml）と、 $10 \times$ MEMと、Reconstitution Bufferと、水を、0.2 : 7 : 1 : 1 : 1.8（容量比）にて氷上で混合し、この混合液0.5 mlを1%BSAでコートした培養ディッシュに播種し、37℃で1時間インキュベーションしてコラーゲンを作製した。

[0073] ゲル化後、MEM培地に、RAR γ アゴニストA（R667）のジメチルスルホキシド溶液（1 nM）、RAR γ アゴニストB（CD437）のジメチルスルホキシド溶液（1 nM、10 nM）、RAR γ アゴニストC（BMS961）のジメチルスルホキシド溶液（10 nM）若しくはコントロールとしてRAR γ アゴニストを含まないジメチルスルホキシド溶液、刺激剤としてIL-1 β （製品番号201-LB-005；R&D systems社製）10 ng（終濃度10 ng/ml）及びPlasminogen（製品番号P9156；シグマアルドリッチ社製）60 μ g（終濃度60 μ g/ml）を加えて、先に調製したコラーゲンゲルに重層し、培養（37℃、5%CO₂条件下）を開始した。

[0074] 培養48時間後、実施例1と同様の方法でコラーゲンの加水分解、コラーゲン分解産物であるヒドロキシプロリン量の測定を行い、それぞれのRAR γ アゴニストのコラーゲン分解抑制作用を評価した。結果を図4に示す。

[0075] 本試験において、RAR γ アゴニストAだけでなくRAR γ アゴニストB、Cも、角結膜におけるコラーゲン分解抑制作用を示した。

実施例 4

[0076] （試験例）RAR γ アゴニストAによるMMP-1、2、3及び9の発現及び活性化の抑制試験

タンパク質分解酵素であるマトリクスメタロプロテアーゼ（MMP）の分泌、発現がタイプIコラーゲンの分解に関与していると考えられている。そこで、RAR γ アゴニストAによるMMP-1、2、3及び9の発現及び活

性化の抑制について調べた。

[0077] 正常ウサギ眼球から採取した初代角膜実質細胞を無血清MEM培地で24時間培養を行った。得られた培養液に、RAR γ アゴニストA (R667) (R667濃度: $1 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$) を添加して前処理を12時間行った。ポジティブコントロールとしては、合成ステロイドであるデキサメサゾン (Dex) 10 nMを添加して同様に前処理を行った。次いで、IL-1 β (0.1 ng/ml) を添加して刺激し、さらに24時間後、上清を回収した。回収した培養液は以下のウェスタンブロット解析及びゼラチンザイモグラフィー解析に用いた。

[0078] (ウェスタンブロット解析)

回収した培養液の上清を、10%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEで展開した後、分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。次に、ニトロセルロース膜の非特異的部位をブロックし、抗ヒトMMP-1抗体 (R&D systems社製)、抗ラビットMMP-3抗体 (第一ファインケミカル社製) で4℃、24時間インキュベートし、ECL (登録商標) 試薬 (GE・ヘルスケア社製) を用いて検出した。

[0079] 結果を図4Aに示す。非活性型のPro-MMP-1、Pro-MMP-3と活性型のMMP-1、MMP-3のいずれもRAR γ アゴニストAの濃度依存的にバンドが減弱しており、RAR γ アゴニストAは濃度依存的にMMP-1、MMP-3の発現及び活性化を抑制することが明らかとなった。

[0080] (ゼラチンザイモグラフィー解析)

回収した培養液の上清を0.1%のゼラチンを含む10%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEで展開した後、2.5%Triton X-100含むTBS溶液で室温にて1時間インキュベートした。インキュベート後のゲルをクマシーブリリアントブルー (和光純薬工業社製) の溶液にて染色し、5%メタノール-7.5%酢酸溶液 (ナカライテスク社製) にて脱色した。

- [0081] 結果を図4Bに示す。非活性型のPro-MMP-2、Pro-MMP-9と活性型のMMP-2、MMP-9のいずれもRAR γ アゴニストAの濃度依存的にバンドが減弱しており、RAR γ アゴニストAは濃度依存的にMMP-2、MMP-9の発現及び活性化を抑制することが明らかとなった。

実施例 5

- [0082] (試験例) RAR γ アゴニストAによる角膜混濁、潰瘍形成の抑制試験

日本白色種雄性ウサギ(体重2.5-3.5kg、27匹)に対してケタミン及びキシラジン混合溶液の筋肉内投与により全身麻酔を施した。次に、0.4%塩酸オキシブプロカイン点眼液により局所麻酔を施した。さらに、片眼の角膜実質内に1%LPS(シグマアルドリッチ社製)を30 μ l注入した。なお、反対眼には注入しなかった。

- [0083] 前記LPSを注入したウサギに対し、LPS注入当日は注入後に2回、以後10日後までは1日4回、マイクロピペットを用いて、RAR γ アゴニストA(R667:0.1%、24mM)を含む0.1%PBS/0.1%polyorbate80溶液を50 μ l点眼投与した。コントロールとして、RAR γ アゴニストAを含まない0.1%PBS/0.1%polyorbate80溶液(Vehicle)を同様に投与した。RAR γ アゴニストAを投与した場合、及びコントロールの代表例を図5に示す。

- [0084] 図5中、上段のコントロール(Vehicle)では角膜混濁、潰瘍形成が観察されたが、下段のRAR γ アゴニストAを投与した場合(0.1%R667)では角膜混濁、潰瘍形成が観察されず、RAR γ アゴニストAは角膜混濁、潰瘍形成を抑制することが明らかとなった。

産業上の利用可能性

- [0085] 本発明の角結膜障害の治療剤の有効成分である、RAR γ アゴニストは、コラーゲン分解を強力に抑制することにより、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ、結膜炎、慢性表層角膜炎、角膜糜爛、遷延性角膜障害、点状表層角膜炎、角膜上皮欠損、結膜上皮欠損、乾性角結膜炎、上輪部角結膜炎、糸状角結膜炎、感染性角膜炎、非感染性角膜炎、感染性結膜炎、又は

非感染性結膜炎等の角結膜障害の予防又は治療剤として有用である。また、コラーゲン収縮を強力に抑制することにより、角結膜障害に伴う角膜瘢痕化や結膜瘢痕化の治療剤として有用である。

請求の範囲

- [請求項1] R A R γ アゴニストを有効成分として含有する角結膜障害の治療剤。
- [請求項2] R A R γ アゴニストが、(E) - 4 - (2 - {3 - [(1 H - ピラゾール - 1 - イル) メチル] - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタレン - 2 - イル} ビニル) 安息香酸、6 - [3 - (1 - アダマンチル) - 4 - ヒドロキシフェニル] - 2 - ナフタレン酸、若しくは 3 - フルオロ - 4 - [2 - ヒドロキシ - 2 - (5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタレン - 2 - イル) アセチルアミノ] 安息香酸、そのエステル又はその塩である、請求項 1 に記載の治療剤。
- [請求項3] 角結膜障害が、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ、結膜炎、慢性表層角膜炎、角膜糜爛、遷延性角膜障害、点状表層角膜炎、角膜上皮欠損、結膜上皮欠損、乾性角結膜炎、上輪部角結膜炎、糸状角結膜炎、感染性角膜炎、非感染性角膜炎、感染性結膜炎、非感染性結膜炎、角膜瘢痕化、結膜瘢痕化からなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の治療剤。
- [請求項4] 投与形態が点眼投与又は経口投与である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の治療剤。
- [請求項5] 剤型が、点眼剤、眼軟膏、注射剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤又はカプセル剤である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の治療剤。