

令和元年6月13日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04156

研究課題名(和文) コラーゲン選択的架橋剤の創製と角膜実質の架橋による物性変化の非侵襲的測定法の開発

研究課題名(英文) Non-invasive measurement of the elasticity of cross-linked cornea by Brillouin Microscopy

研究代表者

安中 雅彦 (ANNAKA, MASAHIKO)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：40282446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、眼球組織では角膜ゲルの角膜実質を研究対象とし、以下の成果を得た。(1) コラーゲンを特異的に認識する生体架橋剤の創製：コラーゲンモデルペプチドに注目し、これを多分岐水溶性高分子末端に導入した生体架橋剤を創製し、安定なコラーゲンゲル形成を実現した。(2) 力学物性の非侵襲的評価法の開発：生体組織の力学物性を非侵襲的に計測することを目標として、in situ かつ in vivo条件で弾性率測定が可能なブリルアン顕微鏡システムを構築した。(3) 角膜架橋法の開発：開発した生体架橋剤を用いて豚角膜の架橋を実施した。さらに、架橋角膜の弾性率をブリルアン顕微鏡で測定する方法論を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視覚は人間にとって重要な情報手段であり、角膜は眼球を構成する主要な組織である。近年、非炎症性変性疾患で1000名に1人の有病率である円錐角膜、さらに近視による視力低下に対する治療として一般化した屈折矯正手術後に発症することが確認されている角膜拡張症が社会的問題となっている。その機構は未だ解明されていないのが現状であるが、角膜を構成するコラーゲンの架橋が治療法として有効であると考えられている。本研究では、コラーゲンを特異的に認識する選択的生体適合性架橋剤の創製、さらに架橋による角膜ゲルの物性変化を明らかにし、生体分子物理化学の新しい分野を築くと共に、眼科分野への貢献も大きい成果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, the corneal stroma of corneal gel was studied, and the following results were obtained. (1) Creation of a novel bio-crosslinking agent that specifically recognizes collagen: Focusing on a collagen model peptide (CMP), creating a crosslinking agent in which CMP was incorporated into the end of a multi-branched water-soluble polymer to form stable collagen gel formation. (2) Development of non-invasive evaluation method of mechanical properties: With the goal of non-invasively measuring mechanical properties of living tissue, we constructed a Brillouin microscope system capable of measuring elastic modulus under in situ and in vivo conditions. (3) Development of corneal cross-linking method: Cross-linking of pig cornea was carried out using the newly developed cross-linking agent. Furthermore, the methodology to measure the elastic modulus of the cross-linked cornea with Brillouin microscope was established.

研究分野：高分子物理化学

キーワード：角膜 コラーゲン 架橋 ブリルアン顕微鏡 弾性率

1. 研究開始当初の背景

ヒトなど高等動物の組織・器官の構築・恒常性維持においては、細胞と細胞外マトリックスの相互作用は決定的に重要な役割をしている。細胞外マトリックスは一般にゲルに類似した構造体で、そのモルフォロジーが生体の状態を反映するため、医学的に重要である。その主要構成成分であるコラーゲンは力学的な支持をし、組織の骨格構造を構成するだけでなく、細胞との相互作用を介して、これらの生命現象に関わっている。コラーゲタンパク質は27種類の分子種が知られており、その中でI, II, III, V, XI型コラーゲンはコラーゲン線維を形成すると考えられている。すなわち組織の骨格構造は多成分複合系であり、様々な空間スケールでの構造・物性の理解が必須となるが、研究例は極めて少ない。

角膜の厚さは約0.5mmであり、表面から角膜上皮、ボーマン膜、角膜実質、デスメ膜、角膜内皮の5層から構成されるゲル状のECMである。角膜には目に光を取り入れる窓の役割があるほか、光を屈折させて水晶体とともに光を網膜上で結像させる働きがある。また角膜表面は常に涙で覆われ、乾燥と眼球内部への細菌感染を防ぐ常用な役割を担う。角膜の約90%を占める角膜実質は、均一な直径の規則的に配列されたコラーゲン線維は直交するラメラ層を形成しており、角膜の強度、透明性を確保している。このような角膜実質の特異的構造の形成を制御する機序は未だよく理解されていないのが現状である。近年、角膜に非炎症性変性疾患で人種によらず1000名に1人の有病率である円錐角膜、さらに近視、老視による視力低下に対する治療として一般化してきたLASIK等のレーザーによる屈折矯正手術を受けた後に発症することが確認されている角膜拡張症が社会的問題となっている。円錐角膜は、角膜の中央部分の厚みが薄くなり、角膜が前方へ突出するため、角膜の曲率が正常範囲を越えて小さくなり(乱視)視力が低下する非炎症性変性疾患であり、主に思春期に発症し、20-30歳代に最も重篤になる。さらに角膜の突出が強くなると、デスメ膜が破裂し、角膜内に水が溜まり角膜が突然白く濁る「急性水腫」という病態になると著しく視力が低下する。円錐角膜の病因は未だ解明されていないが、多くの医学的研究で円錐角膜ではプロテアーゼ活性が高いことが示されており、角膜実質のコラーゲンの架橋構造の破壊がひとつの原因と考えられている。そのため、治療法として未だ国家的認証は得られていないもののリボフラビン(vitamin B₂)の点眼が注目されている(Dresden protocol)。リボフラビンは長波長紫外線($\lambda = 370\text{nm}$, UV-A)の照射により活性化され、角膜実質内のコラーゲンの架橋を促進し、その結果として角膜の力学的強度をある程度回復できると期待されている。しかしながら1時間以上に及ぶ手術時間の長さ、角膜上皮搔爬に伴う疼痛、充血や易感染性、角膜混濁などの合併症が報告されている。さらに、高エネルギーでの紫外線照射によって角膜内の酸素不足が生じ架橋の効果が落ちること、角膜がどの程度架橋されたのか(架橋度)を評価する方法がないことなど、多くの欠点が指摘されている。

そこで本研究では、①コラーゲンを特異的に認識する選択的性適合性架橋剤の創製と架橋方法の確立と架橋メカニズムの解明、さらに②架橋による角膜ゲルの物性変化を非侵襲的に明らかにする方法論を確立することで、③角膜の構造・物性から円錐角膜等の疾患を分子レベルで理解すると同時に④円錐角膜等の疾患への新たな治療法を提案することを目的としている。視覚は人間にとって重要な情報収集手段であり、本研究の意義は大きいといえる。

2. 研究の目的

本研究は特に角膜、関節液、軟骨などの細胞外マトリックス(ECM)が関わる生体現象を、構造・物性・ダイナミクスの観点から、分子レベルで総合的に理解することである。視覚は人間にとって重要な情報手段であり、角膜は眼球を構成する主要なECMである。非炎症性変性疾患で1000名に1人の有病率である円錐角膜、さらに近視、老視による視力低下に対する治療として一般化してきたLASIK等のレーザー屈折矯正手術を受けた後に発症することが確認されている角膜拡張症が社会的問題となっている。その機構は未だ解明されていないのが現状であるが、角膜を構成するコラーゲン(Type I)の架橋が治療法として有効であると考えられている。そこで本研究では、コラーゲンを特異的に認識する選択的生体適合性架橋剤の創製、その架橋メカニズムの解明、さらに架橋による角膜ゲルの物性変化を、明らかにすることで、新しい「ECMの分子物理化学」の構築を目指す。「ECMの分子物理化学」から得られる指導原理・理論を基に、ECMが関わる様々な生命現象の分子レベルでの理解を深化させる。

3. 研究の方法

本研究では、コラーゲンの架橋構造およびその安定性の要因、架橋構造形成のメカニズム、病態により破壊された角膜実質架橋の分子特異的な修復、角膜実質の力学物性（架橋度）の非侵襲的観測法の確立を目的として以下の検討を実施する。①コラーゲンを特異的に認識する選択的生体架橋剤の創製と架橋方法の確立と架橋メカニズムの解明、②高速かつ高空間分解能計測が可能な段差の大きい仮想的な回折格子(VIPA)を用いたブリルアン光学系を用いた分光器の開発と架橋による角膜ゲルの物性変化をリアルタイムにかつ非侵襲的に明らかにする方法論を確立する、③角膜の構造・物性から円錐角膜等の疾患を分子レベルで理解することを目的とする。検討により得られた結果から、疾病など眼内環境の変化による角膜の分子レベルでの挙動を明らかにする。検討には、研究分担者として松浦豊明博士（奈良県立医科大学・眼科）が参加した。

4. 研究成果

(1) コラーゲンを特異的に認識する生体架橋剤の創製

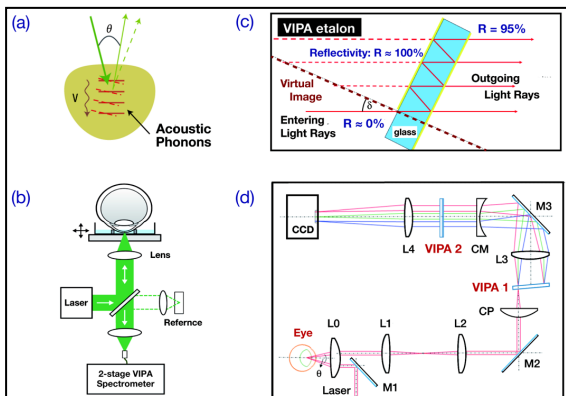
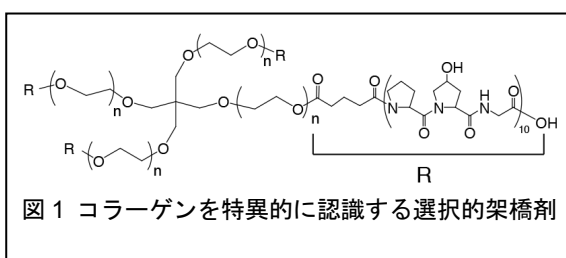
コラーゲンは現在知られている 28 種全てで三重らせんを形成することが知られており、その構造を安定化させる要因を解明するためにコラーゲンモデルペプチド(Collagen mimetic peptide, CMP)が有用である。特に(Pro-Pro-Gly)および(Pro-Hyp-Gly)をくり返し単位に持つCMPは分子量が3kD以下でありながら天然コラーゲンとほぼ同一の三重らせんを形成することが知られている。(Pro-Hyp-Gly)の場合、ヒドロキシプロリン(Hyp)の分子間水素結合を駆動力として三重らせんを形成し、コラーゲン繊維を構築することが知られている。そこで、本研究ではCMPである(Pro-Hyp-Gly)₁₀((POG)₁₀: 図1のR部分, Brodsky et al. 2006)に注目し、これを多分岐ポリエチレングリコール(Multi-arm-PEG)末端に導入した生体架橋剤(図1, Multi-arm-PEG-(POG)₁₀, 図では分岐数 $f=4$)の合成を行った。具体的には、PEG分岐数($f=2, 4, 8$)およびPEG分子量($M=5\text{kD}, 10\text{kD}, 20\text{kD}$, PEGのくり返し単位数で調整)の合成を行った。

調製した Multi-arm-PEG-(POG)₁₀ を用いて I 型コラーゲンのゲル化の確認と、PEGの分岐数と分子量の最適化を表面プラズモン共鳴スペクトル法を用いて解離定数 K_D の評価を行った結果、全ての場合において、I型コラーゲンとの解離定数は $K_D \sim 10^{-7}$ と非常に強く結合していることが明らかとなった。

(2)角膜の力学物性の非侵襲的評価法の確立

現在円錐角膜の治療法として、リボフラビン(vitamin B₂)の点眼と紫外線照射による角膜実質のコラーゲン架橋が治験として行われているが、「コラーゲンがどの程度架橋されたか」を *in situ* かつ *in vivo* で評価する方法が未だ開発されていない。生体組織の「生きたままの状態」の力学物性を非侵襲的に計測することを目標として、高速かつ高空間分解能計測が可能なブリルアン散乱光学系を用いて、*in situ* かつ *in vivo* 条件で弾性率が測定できるブリルアン顕微鏡システムの構築を行った。

非弾性散乱法であるブリルアン散乱法は、試料の粘弾性的性質を非侵襲的に直接測定可能な方法として有用であり、物質の特性解析に広く用いられてきた(図2a)。ブリルアン散乱法は本申請で研究対象とする角膜の力学物性の観測にも有用であるが、しかしながら、Fabry-Perot 干渉計をはじめとする従来の光学系は、計測に長時間を有するため、計測を point sampling から角膜



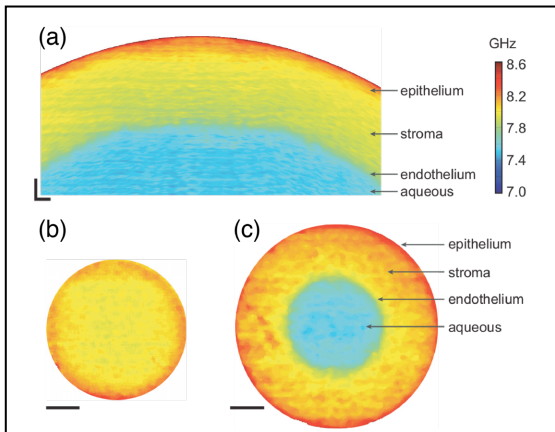


図 3 (a) A cross-sectional Brillouin image of porcine cornea, revealing the decreasing modulus with depth. The horizontal (x) and vertical (z) span is 5) 0.5 mm. (b) En face Brillouin image of the cornea optically sectioned at a shallow depth. (c) A Brillouin image of a deeper section. Scale bars: (a) 200 μ m; (b, c) 1 mm.

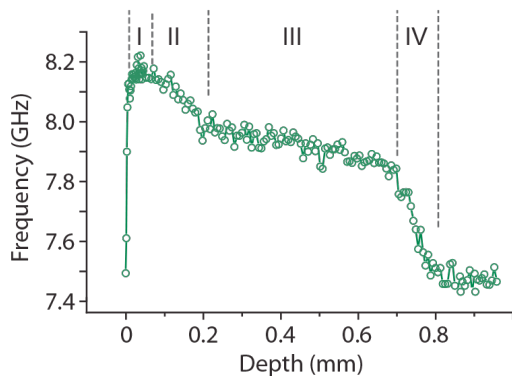


図 4 Brillouin depth profile of the entire porcine cornea including the epithelium (I), anterior stroma (II), posterior stroma (III), and the innermost region (IV).

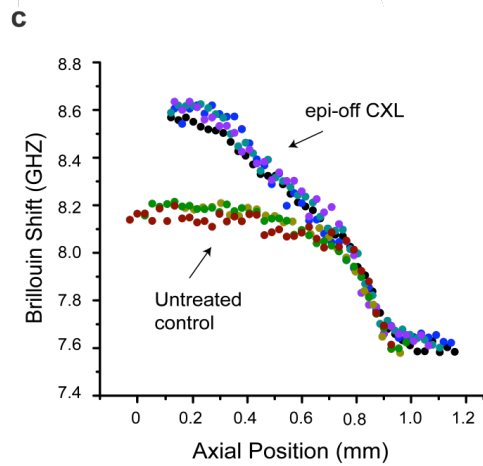
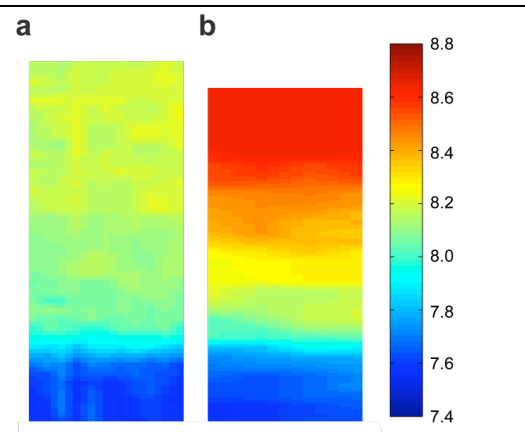


図 5 コラーゲンを特異的に認識する選択的架橋剤を用いた豚眼架橋前後のブリルアンシフトの変化：架橋によりブリルアンシフトが増大し、弾性率が増加していることが確認できる。

全体へ拡張することは実用上不可能であった。この問題を解決するために、申請者らは、ブリルアン光学系に高速かつ高空間分解能計測が可能な仮想的な回折格子(VIPA etalon)をタンデム型で導入したブリルアン分光器(図 2d の CP から L4 の光学系)の開発を検討してきた。光学顕微鏡(図 3d の M1 から L2 の光学系)にこの分光器を組み込むことで、ブリルアン光学顕微鏡を新たに開発し、高速・高分解能で弾性マッピングを行い、試料の局所的な粘弾性情報とその空間分布計測を実現した。

測定結果の例を図 3 および図 4 に示す。図 3 は豚角膜断面の弾性率イメージングを示しており、角膜表面から深さ方向に弾性率が減少していることを示している。図 4 はブリルアンシフトの光軸方向の変化を示しており、図 3 と同様に弾性率が減少していることを示している。以上の様に、新たに開発したブリルアン顕微鏡システムにより、非侵襲的に角膜の弾性率の測定が可能になった。

(3)架橋角膜の力学物性の非侵襲的評価法の確立

(1)で報告した新規コラーゲン選択的架橋剤 4-arm-PEG-(POG)₁₀ を用いて豚角膜の架橋を行い、(2)で報告したブリルアン顕微鏡システムにより、非侵襲的に角膜の弾性率の測定を実施した。図 5 にその結果を示す。(a)は架橋前、(b)は架橋後のブリルアンシフトの深さプロファイルであり、架橋により、角膜の弾性率が増加していることがわかる。また(c)は(a),(b)のデータを横軸を光軸方向に深さ(mm)、縦軸をブリルアンシフト(弾性率)としてプロットした物であり、角膜表面から深さ 0.6mm の範囲で弾性率が増加していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- ① M. Fujiki, M. Ito, K. Mortensen, and M. Annaka, Friction coefficient of well-defined hydrogel networks, *Macromolecules*, **49**, 624-624 (2016) (査読あり)
- ② K. Mortensen and M. Annaka, Structural study of four-armed amphiphilic star-block copolymers: Pristine and end-linked Tetronic T1307, *ACS Macro Letters*, **5**, 224-228 (2016) (査読あり)
- ③ K. Mortensen and M. Annaka, Stretching PEO-PPO type of star polymer gels: Rheology and small-angle scattering, *ACS Macro Letters*, **7**, 1438-1442 (2018) (査読あり)
- ④ Tomomats, K. Mortensen and M. Annaka, Tyrosine-modified Tetronic Hydrogels: Rheological Monitoring of Gelation and Their Mechanical Properties, in press (査読あり)
- ⑤ M. Annaka and K. Mortensen, Memory Effect of end-linked four-armed amphiphilic star-block copolymer Tetronic T1307, in press (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① Kell Mortensen and Masahiko Annaka : Structural Studies of Four-armed Star-block Copolymer Conetwork, 24th Polymer Networks Group Meeting, 2018 年 7 月 18 日, Prague
- ② Masahiko Annaka and Kell Mortensen : Friction Coefficient of Four-armed Star-block Copolymer Conetwork, 24th Polymer Networks Group Meeting, 2018 年 7 月 18 日, Prague
- ③ 安中雅彦, Kell Moetensen : 架橋星形高分子 Tetronic 1307 ゲルの状態記憶効果, 第 67 回高分子年次大会, 2018 年 5 月 23 日, 名古屋
- ④ 安中雅彦, Kell Moetensen : 酵素架橋星形高分子 Tetronic 1307 ゲルの力学物性, 第 66 回高分子討論会, 2017 年 9 月 20 日, 愛媛
- ⑤ 安中雅彦, Kell Moetensen : 架橋星形 PEO-PPO 型高分子ゲルの一軸伸長時の力学物性と小角散乱による微視的構造の変化, 第 66 回高分子年次大会, 2017 年 5 月 29 日, 幕張
- ⑥ 安中雅彦, Kell Moetensen : 架橋星形高分子 Tetronic 1307 ゲルの微視的構造の X 線小角散乱による研究, 第 65 回高分子討論会, 2016 年 9 月 14 日, 横浜
- ⑦ 安中雅彦, Kell Moetensen : 架橋星形高分子 Tetronic 1307 ゲル網目と溶媒間の摩擦係数の測定, 第 65 回高分子年次大会, 2016 年 5 月 26 日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 松浦 豊明
ローマ字氏名 : MATSUURA, toyoaki
所属研究機関名 : 奈良県立医科大学
部局名 : 医学部
職名 : 非常勤講師
研究者番号 : 10238959

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。