

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010~2012

課題番号：22591958

研究課題名（和文）

近視の原因解明と治療に関する分子細胞生物学的研究

研究課題名（英文）

Cellular and Molecular Biological Study on Pathogenesis and Treatment of Myopia

研究代表者

世古 裕子 (SEKO YUKO)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 感覚機能系障害研究部・室長

研究者番号：60301157

研究成果の概要（和文）：強度近視は視覚障害の重要な原因疾患であるが、眼軸が延長するメカニズムは未だ不明であり根本的な治療法はない。強度近視眼では強膜が著しく菲薄化することが知られている。本研究では、幼若なヒト強膜細胞を用い、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、ヒト強膜細胞が種の違いを超えて軟骨の性格を保持しており、軟骨関連遺伝子、TGF-betaファミリーなどのサイトカンが前部よりも後部で発現上昇し、眼球形状維持のための制御機構の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

High myopia (Pathological myopia) is one of major causes for visual impairment. The mechanism for axial elongation with high myopia has not been clarified, so we do not have any definite preventive measures for high myopia. It is known that the sclera of highly myopic patients is significantly thinner. Under this grant, microarray analysis was performed using human scleral tissues. The tissues were excised from surgical specimens as a therapy for retinoblastoma with the approval of the Ethics Committee of the National Institute for Child and Health Development (NCCHD), Tokyo. The results of global genes expression analysis suggested that the human sclera maintains chondrogenic potential throughout evolution although the human sclera is not a cartilaginous tissue. Especially, expression levels of several cartilage-associated genes were significantly higher in a posterior part than in an anterior part. The expression levels of several cytokines were different between a posterior part and an anterior one. It is suggested that the gradient of genes expression levels along anteroposterior axis indicates the presence of a regulatory mechanism to maintain the shape of the eye ball.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：近視・眼軸延長機序・ヒト強膜・網羅的遺伝子発現解析

### 1. 研究開始当初の背景

近視は遺伝と環境が互いに作用しあっており、その本態はまだ十分に解明されていない。強度近視では、眼軸長（眼球の長さ）が延長していて、眼軸延長に伴って様々な合併症を生じ、網膜脈絡膜萎縮症を生じると視力低下を来す。特に、黄斑部脈絡膜新生血管は黄斑部萎縮を経て失明に至ることもあるが、現在の治療法では限界がある。眼軸延長の機序を解明することが、治療法もしくは予防法の開発の鍵である。強度近視は失明原因の上位を占め、近視発症機序を解明することは失明の予防に寄与するはずである。

申請者の世古は、近視発症機序解明を目指し、片眼遮蔽による実験近視ヒヨコモデルを用いた基礎研究を行い、実験近視ヒヨコ眼で TGF- $\beta$  が増加し、b-FGF が減少していることを明らかにした (Seko Y, et al.: Invest Ophthalmol Vis Sci 36(6): 1183-1187, 1995)。ヒヨコ眼強膜から軟骨細胞と線維芽細胞とを分離培養し、TGF- $\beta$  と b-FGF とが、細胞増殖に強く関与していることを明らかにした (Seko Y, et al.: Ophthalmic Res 27(3), 144-152, 1995)。このときに、TGF- $\beta$  が、線維芽細胞の増殖能のみならず、形態をも著しく変化させ、軟骨細胞に近い形態に変化させ、細胞分化が示唆された。また、成長因子だけではなく、レチノイン酸が関与していることも明らかにした (Seko Y, et al. Exp Eye Res 63: 443-452, 1996, Seko Y, et al. Ophthalmic Res 30: 361-367, 1998)。さらに、培養網膜色素上皮細胞から、強膜軟骨細胞の細胞増殖を制御する因子が分泌されていることを明らかにし (Seko Y, et al. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 232(9): 545-552, 1994)、in vivo では実験近視ヒヨコ眼で TGF- $\beta$  が増加し、b-FGF が減少してした (Seko Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 36(6): 1183-1187, 1995)。申請者らは培養細胞伸縮装置を用い、眼軸延長に伴い伸展・ひ薄化するとされる強膜と網膜色素上皮由来の細胞にさまざまな機械的伸展刺激を加え (in vitro)、成長因子や細胞外マトリックスの代謝変化を検討した。その結果、ニワトリの強膜におけるゼラチナーゼ活性が主に MMP 2 に由来することが明らかとなり、機械的伸展刺激を加えた強膜軟骨細胞

および強膜線維芽細胞では、MMP と TIMP とともに増加し、特に強膜線維芽細胞において、高いゼラチナーゼ活性が認められ (Fujikura H, Seko Y, et al. Jpn J Ophthalmol 46 (1): 24-30, 2002)、眼軸延長に調節や眼圧上昇による機械的伸展刺激が関与することが示唆された。また、機械的伸展刺激を加えた網膜色素上皮細胞の培養上清中の成長因子 (TGF- $\beta$ , VEGF) の濃度は有意に増加し、VEGF の発現も増加した (Seko Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 40(13): 3287-91, 1999)。この研究により、近視発生に伴う眼軸延長過程のみならず、外傷その他による網膜色素上皮の創傷治癒過程において、機械的伸展刺激による VEGF の発現が増加することを明らかにし、強度近視の視力低下の主たる原因である脈絡膜新生血管の発症機序に新たな示唆を与えた。

一方で、動物モデルとヒト近視との比較も必要である。ヒト強度近視では、近視化への運命付けは先天的あるいは後天的に学童期以前に起こると考えられ、幼若なヒト眼球由来強膜および網膜の解析は意義深い。そこで、子どもの眼手術検体から得た強膜細胞の遺伝子発現プロファイリングを Gene Chip (Affymetrix) を用いて行い、種々の間葉組織由来細胞と階層的クラスタ分析によって比較した。ヒト強膜細胞は軟骨細胞と最も近い遺伝子発現パターンを示し、種の違いを超えて軟骨の性格を保持していることが示唆された (図 1、Seko Y, et al. PLoS ONE. 2008;3(11):e3709. Epub 2008 Nov 12)。

GeneChip 解析 (主成分分析)

強膜は軟骨に似ている

図 1



一方で、眼科科領域における再生医学の研究では、角膜では上皮と内皮の培養、移植が行われている。眼以外の細胞から角膜組織を作る研究は、口腔粘膜から代用上皮を作っている。他の組織は、いまだ基礎実験の段階である。わが国においては、まだ研究目的でのアイバンクアイの使用は認められていない。本研究では、国立成育医療センター倫理委員会にて、承認を受けた眼手術検体を用いることが可能である。小児の細胞は成人の細胞と比べ、分化能や増殖能が高く、さまざまな組織や臓器への形作りが可能であると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト幼若強膜の網羅的遺伝子発現解析をさらに進め、前後軸の遺伝子発現解析を行うことによって、眼軸延長を決定する分子機構を明らかにし、近視発症の分子機構解明につなげることを目的とする。さらに、強度近視に対する治療として、網膜と強膜の再生を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 国立成育医療センター倫理委員会（承認番号 156）にて承認を受けたヒト眼球由来の強膜細胞を単離、培養し、後の研究を進めるための蓄積をはかった。ならびに、分離培養したヒト強膜細胞のプロファイリングを行った。強膜細胞は眼球の前部・中間部・後部から採取し、それぞれの初代培養細胞から total RNA を抽出し、gene chip (Affymetrix) を行った。

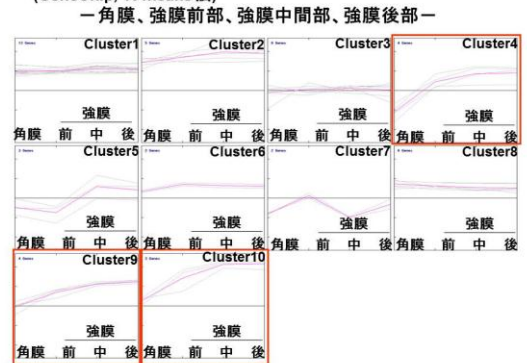
(2) 上記マイクロアレイのデータを解析し、RT-PCR によって確認した。

(3) ヒト虹彩細胞に、転写因子を同時に複数遺伝子導入すると、光応答のある視細胞様細胞に分化するか否か検討した。

## 4. 研究成果

(1) 強膜の網羅的遺伝子発現解析により、眼球の前部から後部にかけて発現上昇する遺伝子群が抽出された（K-means 法）（図 2、図 3）。

強膜前後軸で発現変化する遺伝子の抽出（軟骨遺伝子について）  
（GeneChip, K-means 法）



ヒト強膜における遺伝子発現マッピング  
—ヒト強膜前部から後部へ発現上昇傾向の遺伝子—

AGC1 (アグレカン): 軟骨組織の力学的強度を生み出している。  
PRELP (leucine-rich repeat protein のひとつ): 軟骨に多く発現し、コラーゲン繊維(I型 & II型)に結合する。  
COL11A1: 椎間板に多く発現し、椎間板ヘルニアの原因のひとつと考えられている。

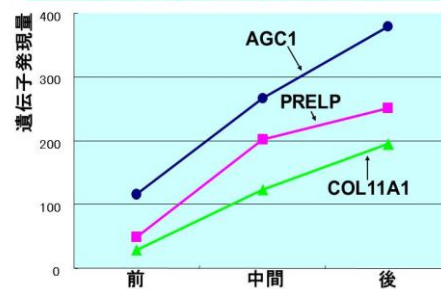
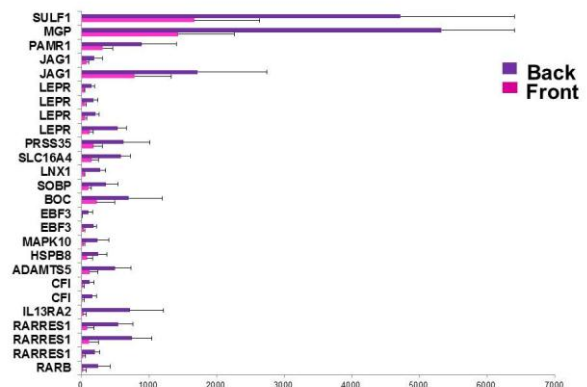


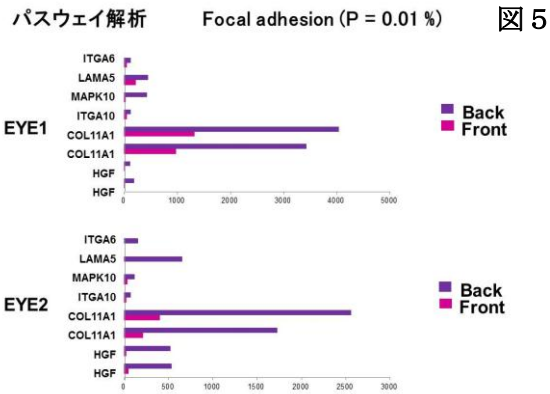
図 3 : 1 眼で複数のプローブについて再現性があった遺伝子を抽出した。

(2) 異なる 3 眼について共通して前部と後部とで発現量に差がある遺伝子が抽出された（図 4）。

3 眼で共通する (Front < Back) 図 4

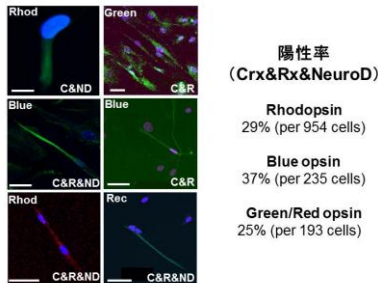


(3) パスウェイ解析を行った結果、Focal adhesion が抽出された (P=0.01%) (図5)



(4) ヒト網膜視細胞を虹彩細胞から分化誘導して作製することに成功した。ヒト虹彩細胞を同時に遺伝子導入すると、光応答のある視細胞様細胞に分化した(図6)。強度近視に伴う著明な眼軸延長に伴って生じる網脈絡膜萎縮への遺伝子治療あるいは細胞治療の可能性について今後も引き続き検討していく。

図6 誘導視細胞のオプシン発現 (免疫染色)



(5) 前部では後部と比較して、*GREM1*, *HOXB*, *WNT* などの遺伝子発現が有意に高く、強膜幹細胞の存在が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計8件)

【原著論文】

- ① Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, Azuma N. Establishment of functioning human corneal

endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One*. 2012;7(1):e29677. Epub 2012 Jan 19. (査読有)

- ② Seko Y, Azuma N, Kaneda M, Nakatani K, Miyagawa Y, Noshiro Y, Kurokawa R, Okano H, Umezawa A. Derivation of human differential photoreceptor-like cells from the iris by defined combinations of *CRX*, *RX* and *NEUROD*. *PLoS One*. 2012;7(4): e35611. Epub 2012 Apr 25. (査読有)
- ③ Nishina S, Kurosaka D, Nishida Y, Kondo H, Kobayashi Y, Azuma N. Survey of microphthalmia in Japan. *Jpn J Ophthalmol*. 2012 ;56:198-202. (査読有)
- ④ Gojo S, Toyoda M, Umezawa A. Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs. *J Artif Organs*. 14:171-177, 2011. (査読有)
- ⑤ Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. 7:e1002085, 2011. (査読有)

## 【総説】

- ① 世古裕子 実験近視、再考！近視メカニズム—実臨床のために— Monthly Book OCULISTA No. 4, 2013年 7月
- ② 世古裕子 実験近視研究の最新の知見—網膜内シグナルの関与—、近視研究の新展開 医学のあゆみ Vol. 245 No. 10, 2013年
- ③ 世古裕子 網膜の細胞・組織の再生、日本の眼科 82、1608-1611, 2011

〔学会発表〕 (計4件)

- ① 世古裕子、東範行、金田誠、中谷敬、梅澤明弘 ダイレクト・リプログラミングによるヒト視細胞作製技術の開発。第4回先進医療フォーラム、シンポジウム2『世界をリードする我が国の再生医療最前線—臨床研究に学ぶ—』、2013年1月19日 東京
- ② 世古裕子、東範行、金田誠、中谷敬、梅澤明弘 ヒト培養誘導網膜視細胞の

光応答について、第16回視覚科学フォーラム研究会、2012年8月 埼玉

- ③ **世古裕子**、近視の原因解明と治療に関する分子細胞生物学的研究、第8回お茶の水眼科先進医療セミナー、2012年5月18日 東京
- ④ **世古裕子**、ヒト強膜細胞を用いた近視研究と再生治療の可能性、第116回日本眼科学会総会、シンポジウム8 近視発症メカニズム研究の最先端、2012年4月6日 東京

[図書] (計1件)

- ① **世古裕子**、金原出版、実験近視、近視 — 基礎と臨床 —、2012, pp.179-205

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

世古 裕子 (SEKO YUKO)

国立障害者リハビリテーションセンター  
(研究所)・研究所 感覚機能系障害研究部 視覚機能障害研究室・室長  
研究者番号：60301157

### (2) 研究分担者

東 範行 (AZUMA NORIYUKI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・研究所 生殖細胞医療研究部・室長  
研究者番号：10159395

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)

独立行政法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・センター長  
研究者番号：70213486

### (3) 連携研究者 なし