

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 3 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700472

研究課題名(和文)生体材料透明化による新しい眼科治療技術の開発

研究課題名(英文)Development of optically-cleared tissues for novel ophthalmic treatments

研究代表者

田中 佑治(TANAKA, Yuji)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40625513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 独自開発した手法により作製した透明化組織を眼科分野に応用するため、本研究ではそれらの機能改質と動物実験による評価を行った。主に眼科分野で広く使用されている羊膜に焦点を絞り、臨床応用に不可欠な生体親和性の確認、さらに縫合への耐性の向上と透明性の改善を試みた。まず2ヶ月間に渡る角膜実質層内移植で透明化羊膜が良好な生体親和性を有することを確認した。また改良した透明化羊膜の透明性は単層よりも低下するが、透明化処理により未処理組織の3倍程度まで透明性が改善された。さらに力学特性は単層膜の10倍程度まで改善可能であること、タイトな縫合が求められる角膜移植も可能であることを確認した。

研究成果の概要(英文)： For the ophthalmic application of optically-cleared tissues, their modification and animal experiments were investigated in this study. This study focused on the amnion that were widely used in the ophthalmology field, and examined their biocompatibility in vivo and also improvement in the tolerance to a suture and transparency. Firstly, it was confirmed that no inadequate biological responses to the optically-cleared amniotic membrane were observed during the transplanted into rabbit corneal stroma. Next, further functional refinements of the optically-cleared amnion, and additional tissue optical clearing were also induced. Further optical-clearing was effective to improve the transparency of the refinement processes. Furthermore, the improvements of mechanical properties were confirmed that it was possible to improve the mechanical property to about 10 times of the original amnion, and that the corneal transplantation, which requires a tight suture, was also possible.

研究分野： 医用生体工学・生体材料学

キーワード： バイオマテリアル 透明化 羊膜 コラーゲン 眼科 角膜

1. 研究開始当初の背景

現在、日本国内では角膜の提供が少なく、角膜混濁による多くの失明者が角膜提供を待っている。細胞膜である角膜上皮や内皮に関しては、近年再生医療技術開発が盛んに進められ、一部臨床応用されている。しかしコラーゲンを主成分とする角膜実質に関しては代償治療技術開発が進んでいない。特に人工角膜の歴史は約200年もあるのにも関わらずドナー角膜に匹敵するものはなく、近年報告された抗原部位を含まないアテロコラーゲンゲル移植のヒト臨床でも大半の患者の視力が悪化しており (M.Griffith *et al.*, *Sci Transl Med* 2010) 依然新規技術開発への期待は大きい。

そこで研究代表者らは本来脆弱で白いアテロコラーゲンや羊膜から透明で強靱な角膜に匹敵する移植片を見出す技術開発を目指してきた。これまでに黒目(角膜)と白目(強膜)のコラーゲン構造の差異(図1)に着目し、角膜特異的な構造を再現するために積層数、厚み、配向性等を厳密に制御できる技術を考案した。また別途白目(強膜)の様な不透明なコラーゲン組織を黒目(角膜)の様に透明化する手法を開発し、皮膚、羊膜、コラーゲン積層膜を透明化できることを見出した(図2)。これらを融合し、生体角膜に類似する構造・透明性・力学強度(世界最高レベル)を有する膜に発展させた。

近年手術の正確性や安全性の確保、検査や基礎研究で重要なイメージング技術の向上を図る目的でスケルトン人工骨や透明化試薬(Scale)(理研: *Nature Neuroscience* 2011)等の透明化技術の開発が始まっている。これまでに透明化してきたコラーゲン組織はどれも医療応用の可能性を考慮して選択したものである。ヒト羊膜に関してはすでに眼表面再建術等に頻繁用される素材であるが、従来法よりも簡易的な処理で常温保存が可能となり、良好な術後視野、形状の長期保持が期待される。透明化皮膚に関してはこれまで不可能であった自家組織による角膜実質再建術の実現が期待される。またアテロコラーゲンの応用範囲を狭めてきた光学特性と力学特性の課題を解決した。

本研究ではこれらの透明材料を、角膜実質を中心とした前眼部再建術への応用に向けて機能改質と *in vivo* 評価を行うことを第1の目的とした。また近年成人中途失明者の約半数を占める難治性網膜疾患に対する治療の開発が盛んになっている。そこで網膜疾患等の後眼部疾患への適応拡大を提案することを第2の目的として基礎研究を進めた。

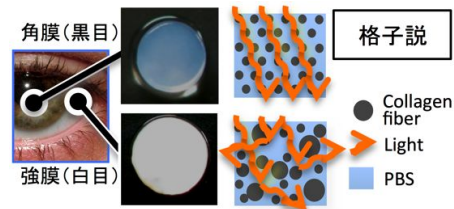


図1. 角膜と強膜のコラーゲン構造と光透過性の関係.

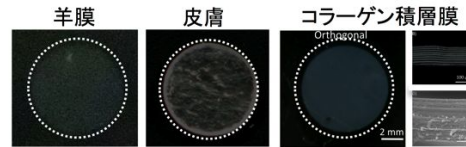


図2. 透明化した様々な生体材料.

2. 研究の目的

これまで開発してきた透明化材料は幅広い分野へ応用可能であると考えている。本研究ではそれらの中で眼科分野での応用の可能性がある以下の2点に焦点を絞った。

- (1) 前眼部再建を主な目的とした移植材料
- (2) 網膜疾患・緑内障疾患等の後眼部疾患の治療等を目的とした移植材料

また本研究ではこれまで開発してきた4つの透明化組織のうち、比較的透過性が高いヒト羊膜と配向性を制御した積層コラーゲン膜を対象として研究を進めた。様々な条件でこの2つの透明化材料の物性評価や機能改質を試み、上記2点の実現に向けた透明化材料の活用方法の提案を模索する。

3. 研究の方法

東北大学医学部倫理委員会及び東北大学動物実験専門委員会の承認を得て以下の実験を実施した。

- (1) 透明化積層コラーゲン膜の作製及び透明化羊膜の機能改質: 積層コラーゲン膜はこれまでに開発した通り (Y. Tanaka *et al.*, *Biomaterials* 2011) フローキャスト方を応用して積層した後に、乾燥及びカルボジイミドによる架橋処理を行い透明化した。透明化羊膜は提供者から同意を得て採取・凍結保存した羊膜を解凍・洗浄し、透明化組織の機能を向上させるために2-10層積層した。次にこれまで検討した単層羊膜を透明化する手法 (Y. Tanaka *et al.*, *JTERM* 2012) と同様の手法で積層羊膜に対して、乾燥及びカルボジイミドによる架橋処理を行

い、組織を透明化した。

- (2) 透明化膜の物性評価：透明性評価にはUV-vis 分光光度計を用いて紫外光及び可視光透過率を評価した。力学特性には突き刺し試験を行い、膜強度を評価した。さらにコラーゲンの配向と関連する複屈折性を定量的に評価するため一般型高精度万能旋光計を使用した。
- (3) 角膜実質層内への移植試験：単層透明化羊膜を作製し、直径3 mmの生検トレパンで打ち抜き移植片とした。白色家兎角膜実質層内にポケットを作製し、移植片を移植した。細隙灯顕微鏡で経過観察を行い、8週間後に摘出し、HE染色した。
- (4) 表層角膜移植術等への応用検証：白色家兎の角膜表層を摘出し、透明化積層羊膜を移植した。移植1週間後にフルオレセイン試験を行い上皮化の正否を確認した。

4. 研究成果

はじめにこれまで検討していなかった透明化羊膜の安全性試験として家兎角膜実質層内への移植試験を行った。化学架橋していないヒト羊膜と化学架橋した透明化羊膜とを比較したところ、共に8週間に渡る経過観察中に移植片の混濁、血管の侵入などの異常は認められず、摘出した角膜切片のHE染色においても異常は認められなかった(図3)。しかしながら角膜実質代用物としての実用化を考慮した際の課題として、通常透明化羊膜は角膜実質と比較して厚みが薄く、またタイトな縫合に耐えられるほど強度がないことが確認された。

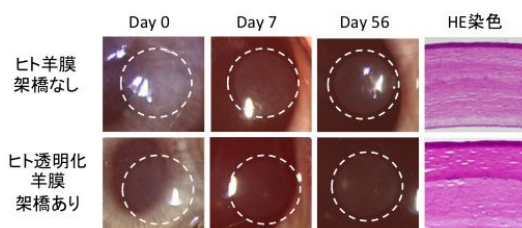


図3.透明化羊膜の角膜実質層内移植による安全性試験。

これまでに従来脆弱なアテロコラーゲンをコラーゲンの配向を制御しながら積層させることで厚みを担保し、かつ著しく力学特性を向上させることが可能であることを確認している(Y. Tanaka et al., Biomaterials 2011)。本研究にて改めて一般型高精度万能旋光計で解析を行ったところ、この手法により強靱な積層コラーゲン膜内のコラーゲン

構造が制御した通りに配向していることを確認した。透明化羊膜の課題も同様に積層化により解決可能か検討を行った(図4)。

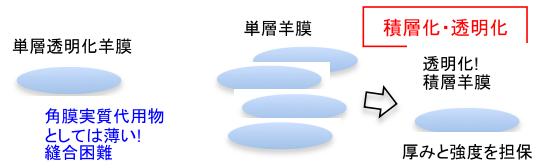


図4.積層化透明羊膜の作製。

まず透明性を評価したところ未架橋サンプルの場合、550 nmの光透過率が1層で約90%、2層で約60%であったのに対し、4層で約25%、6層で約20%と積層数が増すし、4層以上になると透明性が著しく低下することが分かった。しかしながら架橋サンプルでは1層で約90%、2層で約70%、4層で約65%、6層で約60%と、どの条件でも透明性の改善が認められた。特に4層以上では2倍以上の改善が確認され、積層するほど架橋による透明化効果が顕著に現れることが分かった。

次に1、2、4、8層積層した羊膜をそれぞれ架橋したものとしていないものを用意し、突き刺し試験で力学特性を評価した。すると1、2層では未架橋よりも架橋サンプルで有意に破断強度が低下した。積層すると破断強度が上昇する傾向にあるが未架橋サンプルは4層以上になると上積みを得られず、8層では積層した羊膜が崩れ、測定することができなかった。これに対し架橋したサンプルに関しては4層目で未架橋サンプル(約4.5N)よりも有意に破断強度が高くなり、倍量の8層で倍以上の破断強度(約11N)を示すことが分かった。

実際に積層化架橋羊膜の表層角膜移植試験を行い、積層数の影響を確認したところ、突き刺し試験の結果と同様に、5層以下では縫合に耐えられないケースが生じるが、それ以上であれば10-0ナイロン縫合糸を用いた縫合に十分に耐えることができることが分かった(図5)。7日後には移植片上で上皮化が得られ、バリア機能が回復することが確認できた(図5、右下)。

コンタクトレンズや生体高分子で構成されるゲルは脆く縫合に耐えることができない。本研究で作製した積層化羊膜はタイトな縫合が必要とされる角膜移植にも十分に適応可能であった。このような縫合に対する耐性と透明性を併せ持ち、かつ豊富な移植実績をもつ材料は他にない。本研究の成果は羊膜による治療が行われている前眼部保護膜や培養上皮細胞膜のキャリア、後眼部治療の精度や効果を向上し得ると考えている。

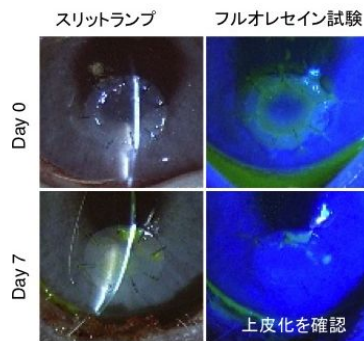


図5 . 家兎に対する透明化積層羊膜の表面角膜移植。透明化積層羊膜は10-0ナイロン縫合糸で縫合可能であり、7日後にフルオレセイン試験にて角膜特有のバリア機能が再生していることを確認した(右下)。緑：フルオレセイン。

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)

Hariya T, Tanaka Y, Yokokura S, Nakazawa T. Transparent, resilient human amniotic membrane laminates for corneal transplantation. *Biomaterials*. 査読あり, 101, 76-85, doi: 10.1016/j.biomaterials. 2016. 05. 038.

Nakagawa K, Harper-Lovelady H, Tanaka Y, Tanaka M, Yamato M, Asahi T. A high-accuracy universal polarimeter study of optical anisotropy and optical activity in laminated collagen membranes. *Chem Commun*. 査読あり, 50 (95), 2014, 15086-15089. doi: 10.1039/c3cc49328h.

Yasuda M, Tanaka Y, Ryu M, Tsuda S, Nakazawa T. RNA sequence reveals mouse retinal transcriptome changes early after axonal injury. *PLoS One*. 査読有り, 9(3), 2014, e93258-1-11. doi:10.1371/journal.pone.0093258.

Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Nakazawa T, Hanaoka K (他10名). Development of azo-based fluorescent probes to detect different levels of hypoxia. *Angew Chem Int*

Ed Engl, 査読有り, 52, 2013, 13028-13032. doi: 10.1002/anie.201305784.

田中佑治, 中澤徹, 緑内障に対する神経保護薬の研究開発, *眼科*, 査読なし, 55(5), 2013, 601-607.

Tanaka Y, Kubota A, Yokokura S (他6名). Optical mechanical refinement of human amniotic membrane by dehydration and cross-linking. *J Tissue Eng Regen Med*, 査読有り, 6(9), 2012, 731-737. doi: 10.1002/term.479.

Shanab AY, Nakazawa T, Ryu M, Tanaka Y (他10名). Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. *Neurobiol Dis*. 査読有り, 48(3), 2012, 556-567. doi:

10.1016/j.nbd.2012.07.025.

Kunikata H, Yasuda M, Aizawa N, Tanaka Y (他2名). Intraocular Concentrations of Cytokines and Chemokines in Rhegmatogenous Retinal Detachment and the Effect of Intravitreal Triamcinolone Acetonide. *AmJ Ophthalmol*. 査読有り, 155(6), 2012, 1028-1037. doi: 10.1016/j.ajo.2013.01.013.

[学会発表](計9件)

田中佑治, 安田正幸, 中澤徹, RNA-Seqによるマウス視神経挫滅早期における網膜網羅的遺伝子発現定量解析, 第24回日本緑内障学会, 2013年9月21日-2013年9月23日, 東京.

中川鉄馬, 田中佑治, 朝日透 (他2名), コラーゲン異方性膜のG-HAUPによる光学的異方性及び光学活性の測定, 第60回応用物理学会春季学術講演会, 2013年03月27日~2013年03月30日, 神奈川工科大学.

Kenta, Nakagawa, Yuji Tanaka, Masayuki Yamato, Toru Asahi (他1名), The G-HAUP study on optical anisotropy and optical

activity in anisotropic membranes of collagen,
NIMS/ MANA- WASEDA
INTERNATIONAL SYMPOSIUM、 2013
年 03 月 11 日、物質材料機構.

Kenta Nakagawa, Yuji Tanaka, Masayuki
Yamato, Toru Asahi (他 1 名), The G- HAUP
study on optical anisotropy and optical activity
in anisotropic membranes of collagen、 The
4th Symposium on Chiral Science
&Technology、2013 年 03 月 01 日、早稲
田大学.

津田聡、田中佑治、國方彦志、花岡健二
郎、中澤徹 (他 4 名)、低酸素応答生理活
性蛍光プローブを用いた網膜低酸素領域
の in vivo イメージング、第 117 回日本眼
科学会総会、2013 年 4 月 4 日-4 月 7 日、東
京.

安田正幸、田中佑治、中澤徹 (他 8 名)、
エリストロボエチンノックアウトマウス
を用いた網膜・神経の組織学的検討、第 117
回日本眼科学会総会、2013 年 4 月 4 日-4
月 7 日、東京.

横山悠、田中佑治、中澤徹 (他 4 名)、
酸化ストレスによる網膜神経節細胞死に
おけるカルパインの働き、第 117 回日本眼
科学会総会、2013 年 4 月 4 日-4 月 7 日、東
京.

田中佑治、國方彦志、中澤徹、眼科分野
のニーズを捉えた異分野融合への試み、第
2 回超異分野学会、 2013 年 03 月 16 日、
すみだ中小企業センター

田中佑治、医療医学のニーズを捉えたエ
ンジニアリングへの試み、第 4 4 回ナノバ
イオ磁気工学専門研究会、2012 年 6 月
28 日、早稲田大学、東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称：視神経障害発症リスクの判定方法

発明者：田中佑治、安田正幸、面高宗子、中
澤徹
権利者：東北大学
種類：特許
番号：特願 2014-17481
出願年月日：2014 年 1 月 31 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
東北大眼科
<http://www.opht.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 佑治 (TANAKA, Yuji)
東北大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：40625513