

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861630

研究課題名(和文)角膜内皮細胞のポンプ機能および生理学的特性の可視化

研究課題名(英文)Physiological evaluation for corneal endothelial pump function

研究代表者

藤本 久貴(Fujimoto, Hisataka)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50624227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：角膜内皮細胞の機能的特性および角膜剛性および微細形状の解析を行った。ナノ粒子化したカルシウム感受性色素は非侵襲的に点眼で角膜に負荷可能であり、生理的解析に有用であった。フックス角膜ジストロフィ患者では、角膜内皮細胞の変性進行が場所に依存し、耳下側で重篤であることを示した。円錐角膜の解析では菲薄化、前面と後面急峻化は経時的に進行し、若年者のみならず従来では進行しないと考えられてきた中高年者でも進行する危険性を見出した。また、角膜剛性を担うケラタン硫酸の解析から、予想外に中枢神経系での機能を発見し、後天的音声学習に関係する領域においてケラタン硫酸が生後発達に伴って成熟することを示した。

研究成果の概要(英文)：In Fuchs endothelial corneal dystrophy, the corneal is damaged more severely in the center and paracentral zones than in the peripheral, and peripheral measurement can objectively grade the disease. In the peripheral zones, the inferotemporal endothelium is damaged. Chronologic measurements of in keratoconus demonstrated that the progression of steepening at posterior corneal surface was found not only in patients under 30 years but also in older patients. The rate of progression is predicted by mapping of corneal curvature and thickness, and the risk of progression was greater in younger patients with steeper maximal K value.

Exclusively in the song nuclei in zebra finch, an increase in expression of high-sulfated keratan sulfate (KS) started after hatching, and reached a plateau at the end of the sensory period. Ubiquitous expression of low-sulfated KS remained unchanged until the end of the sensory period, and first increased in the song nuclei at the end of the sensorimotor period.

研究分野：神経解剖学、眼科学

キーワード：角膜 生理機能 フックス角膜ジストロフィ 円錐角膜 臨界期 ケラタン硫酸 カルシウム感受性色素

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が進む中で、眼疾患に罹患し失明する患者は年々増加している。その中でも角膜疾患に対しては角膜移植術が開発され、臨床上で実際行われてきた。しかしながら角膜移植はドナー不足が深刻で、世界的に見れば全需要の1/100しかドナーの供給がないと言われている。

角膜移植を要する疾患の中で最も数が多いのが角膜内皮疾患である。霊長類の角膜内皮は再生能力を持たず、何らかの原因によって減少するとそれは不可逆的である。内皮数減少がある限界を超えると、角膜実質は水泡性角膜症と呼ばれる浮腫を引き起こす。現在角膜移植の適応となる疾患の中で最多のものは水泡性角膜症である。

角膜内皮は以上のように臨床的に重要な意味を持っているにもかかわらず、そのバイオロジカルな特性は不明な点が多い。特に角膜内皮細胞の最大の作用は浸透圧差を利用して角膜実質より水を前房水側に移送するポンプ機能であるにもかかわらず、このような機能的な特性を測定する方法は極めて限られている。

また、角膜内皮の変性形式は、病型によって変わることが知られている。例えば落屑緑内障に伴う内皮減少は角膜周辺部から進行するのに対し、フックス角膜ジストロフィでは中心部より進行する。その進行形式が病理的な動態を反映している可能性が考えられるが、正確に位置依存的に内皮変性を評価する測定系が存在しなかったため、その詳細は不明であった。

さらにまた、角膜の剛性が低下することによって角膜の変形をきたす一連の疾患群が存在する。円錐角膜関連疾患と呼ばれるこれらの疾患では、経験的に偏心性変化(非対称性変化)と急峻化によって病態が規定されると考えられている。しかしながら眼球という小型の臓器の一部である角膜を、眼球全体のグローバルな関係性の中で、高い計測精度を保ちつつ経時的に計測することは現在までの技術では難しかった。

2. 研究の目的

今回、非侵襲的な計測手段であることにこだわり、角膜の生理的および病理的ダイナミクスを複数の手法により計測した。

一つには、カルシウム蛍光指示薬を用いて角膜内皮細胞機能を評価することを目的とした。角膜内皮細胞の主たる生理活性であるポンプ機能はNa/K-ATPaseによって担われていることがわかっている。角膜内皮と同様にNa/K-ATPaseによる高いポンプ機能を有する腎臓近位尿細管上皮細胞などでは、Na/K-ATPase発現のノックダウンにより、ATP刺激などによる細胞内カルシウム濃度上昇が消失することが報告されている(Chen et al. Journal of Biological Chemistry 2008)。つまり、ATP刺激などに対する細胞内カルシ

ウム濃度応答がポンプ機能の有用な指標となると考えられる。

一般に生体に intact に色素負荷を行うことは難しい。そこで蛍光色素を直接的にナノ粒子化することで特殊精製したカルシウム感受性色素を作成した。ナノ粒子化することにより上皮細胞によってカルシウム感受性色素が貪食されて取り込まれ、通常は通過しない上皮バリアを通過して下層組織の染色が可能となる。さらにほぼ蛍光色素以外の添加薬剤をゼロと成し、生体にほぼ無害な蛍光色素負荷方法を開発した。

続いて、伝統的な臨床用角膜内皮撮影装置(スペキュラーマイクロスコープ)に改良を加え、患者固視を利用して周辺部まで含めた多数箇所での測定可能な装置で、ヒト患者眼の測定を試みた。病的変性過程の場所依存性を定量的に評価し、その進展過程および病型の視機能への影響を定量的に評価することを目的とした。

さらに円錐角膜関連疾患の評価のため、前眼部に特化した光干渉断層計(swept source optical coherence tomography)を用いて疾患眼の評価を行い、未知のままに留められていた円錐角膜関連疾患の長期自然進行過程を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

カルシウム蛍光指示薬は細胞膜に取り込まれ、細胞内カルシウム濃度を反映した強度の蛍光を発する。Fra2、Fluo4、Oregon green 488 BAPTA 1AMなど励起波長と蛍光波長、適した細胞内カルシウム濃度等においてさまざまな特性のカルシウム蛍光指示薬が存在する。生体組織ではナノ粒子化したOregon green 488 BAPTA 1AMを用いて角膜上皮に点眼し、角膜上皮および角膜実質を二光子励起顕微鏡およびライトシート顕微鏡にて観察した。ナノ粒子化はスターラーにて1400 rpmで攪拌中のDMSO(6%, w/w)含有水にOregon green 488 BAPTA 1AMを急速注入することで作成し、約500 μg/mlの濃度の平均200nm程度の粒子サイズのナノ粒子を得ることに成功した。

ヒト患者角膜内皮変性に対しては、患者固視を利用して周辺部の測定可能なスペキュラーマイクロスコープ(NIDEK CEM-530)を用いた。固視を利用して周辺部6点及び傍中心部8点を非接触にて計測した。Matlabベースで独自に開発した画像処理アルゴリズムを用いて画像輝度を均質化させることで、滴状角膜の面積を安定的に定量化した。得られた結果に対して一般化推定方程式を用いることで、左右眼の相関も考慮に入れた統計処理を行った。

ヒト円錐角膜関連疾患患者の測定に関しては、swept source optical coherence tomography(CASIA, トーメー)を用いて、円錐角膜(KC)、円錐角膜疑い(KCS)、forme fruste keratoconus(FFK)の進行を定量的

に評価した。最高 5.79 年(平均 3.03 年)にわたる長期の経過観察を行った。角膜形状解析にて、菲薄化については最菲薄部角膜厚、前方突出については前面 BFS (近似球面曲率半径)および後面 BFS、非対称性変化については、最菲薄部の中心からの距離について評価した。進行予測や統計解析においては、繰り返し測定データのデータ依存性を考慮した Robust 分散共分散を用いた非線形回帰モデルを用いた。

4. 研究成果

カルシウム感受性色素による組織染色の系の安定的構築に成功した。おもにブタおよびウサギ角膜組織を切り出し、Fluo4 により染色をおこなった。角膜内皮をはじめ、角膜実質、上皮のカルシウム感受性色素による染色に成功していた。さらに ATP などの細胞活性を刺激する薬剤負荷をおこない、内皮細胞の生理学的応答の計測に成功した。また、キシロカイン、塩化ベンザルコニウムなど臨床的に細胞障害性が知られている薬剤や、アルカリ負荷などの薬剤負荷をおこない、内皮細胞変性や脱落を観察することに成功した。リアルタイムに短い時間スケールで臨床的に問題となる角膜内皮変性を観察した例はなく、新たな病態理解を与える知見を提示できたと考えられる。

また生体角膜においても、ナノ粒子化した FDA (通常の蛍光色素) による点眼角膜染色し 2 光子顕微鏡観察を可能にした。さらにカルシウム感受性色素、Oregon Green BAPTA 1AM をナノ粒子化することに成功し、難題であったカルシウム感受性色素による角膜染色を可能とした。マウス角膜において、上皮細胞の ATP 刺激によるカルシウムシグナル反応の *in vivo* での観察に成功した。深部において実質内に分布するケラトサイトの描出に成功した。

フックス角膜内皮ジストロフィは滴状角膜を呈する進行性の内皮変疾患で最終的に水疱性角膜症を引き起こす。本疾患における観察の結果、傍中心部の滴状角膜面積が周辺部に比して有意に広く、それらの関係性が病期分類に有効であることを示した。また、周辺部分の中では統計的な有意性を持って耳下側が変性しやすいことを示した。さらに局所的な滴状角膜面積が局所的な角膜厚に影響することを示した。これらの結果は現在までは考えられてこなかった、前房水の温度対流による循環や eye lid による紫外線遮蔽など未知の病態が内皮変性に関係している可能性を示唆するものである。

円錐角膜関連疾患の解析では、大規模な症例集団に対する長期間観察により、今回初めて明らかにされる知見を多数見出した。Swept source optical coherence tomography で軽症から重症までの形状解析が初めて可能と

なり、自然経過が判明した。菲薄化、前面と後面急峻化は経時的に進行する一方で、非対称性変化は進行しないことが明らかになった。若年者のみならず、一般に進行することがなく安全と考えられていた中高年者でも進行する例が多数存在し、医学的に注意深いフォローがどの年齢層であっても必要であることを示した。また、年齢と最大角膜屈折力で、今後の進行が予測可能であることを示した。さらには深刻な合併症である角膜急性水腫発生前には、数年前からにわたる急速な進行が認められ、それを指標とすることで確度の高い急性水腫発症の予測が可能であることを示した。

最後に、角膜剛性を担うケラタン硫酸の解析から、予想外に songbird における中枢神経系での機能を発見した。大脳皮質や基底核のうち、言語に類似した後天的音声学習に関する領域において、ケラタン硫酸の成熟が生後発達に伴って進行することを見出した。高硫酸化型ケラタン硫酸は言語類似行動関連部位に特異的に発現し、その発現上昇により sensory period (模範となる音声を記憶にとどめる時期)と呼ばれる臨界期は閉じられる。低硫酸化型ケラタン硫酸は全脳に広く分布するが言語類似行動関連部位に強く発現し、その発現上昇により sensorimotor period (未成熟な音声を練習する時期)と呼ばれる臨界期は閉じられる。全脳において低硫酸化型ケラタン硫酸の分布が見られるが、生後発達に伴って硫酸化が後天的学習に係る領域特異的に行われることも示した。さらにその責任酵素 (KSGal6ST) は言語類似行動関連部位の Parvalbumin 陽性細胞にのみ特異的に発現し、それが高硫酸化型ケラタン硫酸の限局された発現を規定することも明らかにした。これらの結果は細胞外マトリックスの多面的な重要性を明らかにするものである。

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 10 件)

Fujimoto H, Maeda N, Shintani A, Nakagawa T, Fuchihata M, Higashiura R, Nishida K. (2016) Quantitative Evaluation of the Natural Progression of Keratoconus using Three-Dimensional Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. In press.

Koh S, Ikeda C, Fujimoto H, Oie Y, Soma T, Maeda N, Nishida K. (2015) Regional Differences in Tear Film Stability and Meibomian Glands in Patients With Aqueous-Deficient Dry Eye. *Eye Contact Lens*. 2015 Sep 16. [Epub ahead

of print]

Fujimoto H, Ohgomori T, Abe K, Uchimura K, Kadomatsu K, Jinno S. (2015) Time-dependent localization of high- and low-sulfated keratan sulfates in the song nuclei of developing zebra finches. *Eur J Neurosci*. 2015 Sep 15. doi: 10.1111/ejn.13073.

Watanabe S, Oie Y, **Fujimoto H**, Soma T, Koh S, Tsujikawa M, Maeda N, Nishida K. (2015) Relationship between Corneal Guttae and Quality of Vision in Patients with Mild Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Ophthalmology*. 2015 Jul 15. S0161-6420 (15) 00584-9.

Kawashima R, Matsushita K, **Fujimoto H**, Maeda N, Nishida K. (2015) Air pressure-induced iridocornea contact in a patient with primary angle closure observed with a dynamic Scheimpflug analyzer. *J Glaucoma*. 2015 Jun-Jul;24(5):e137-8.

Hasegawa T, **Fujimoto H**, Tashiro K, Nonomura M, Tsuchiya A, Watanabe D. (2015) A wireless neural recording system with a precision motorized microdrive for freely behaving animals. *Sci Rep*. 2015 Jan 19;5:7853.

Maeda N, Ueki R, Fuchihata M, **Fujimoto H**, Koh S, Nishida K. (2014) Corneal biomechanical properties in 3 corneal transplantation techniques with a dynamic Scheimpflug analyzer. *Jpn J Ophthalmol* 2014 Nov;58(6):483-9.

Fujimoto H, Maeda N, Soma T, Oie Y, Koh S, Tsujikawa M, Nishida K. (2014) Quantitative regional differences in corneal endothelial abnormalities in the central and peripheral zones in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Jul 24 55 (8): 5090-8.

Oie Y, Kamei M, Matsumura N, **Fujimoto H**, Soma T, Koh S, Tsujikawa M, Maeda N, Nishida K. (2014) Rigid gas-permeable contact lens-assisted cataract surgery in patients with severe keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2014 Mar;40(3):345-8.

Koh S, Maeda N, Ikeda C, Takai Y, **Fujimoto H**, Oie Y, Soma T, Tsujikawa M, Nishida K. (2013) Effect of instillation of eyedrops for dry eye on optical quality. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013 Jul 26;54(7):4927-33.

[学会発表](計 13 件)

藤本久貴、神野尚三 マウス下丘を構成

する多様なニューロン群の新規サブクラス分類の確立. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビックパレット福島、2016 年 3 月 30 日

藤本久貴、神野尚三 下丘神経回路の神経化学的特性に関する解析. 第 71 回日本解剖学会九州支部学術集会、熊本大学、2015 年 10 月 31 日

藤本久貴、神野尚三 Neuroanatomical identification of novel neuronal circuits in the mouse inferior colliculus. 日本神経科学会総会 神戸 2015 年 7 月 28 日

藤本久貴、大籠友博、神野尚三 Developmental localization of highly sulfated keratan sulfate defines the songbird brain areas involved in acquired vocalization. 日本解剖学会 神戸 2015 年 03 月 21 日

Naoyuki Maeda, **Hisataka Fujimoto**, Hayato Mitamura, Yoshinori Oie, Takeshi Soma, Shizuka Koh, Motokazu Tsujikawa, Sataoshi Kawasaki, Kohji Nishida. Quantitative evaluation of natural progression in keratoconus with 3D anterior segment OCT. *American Academy of Ophthalmology, Chicago* 2014 年 10 月 18 日

藤本久貴、大籠友博、山田純、神野尚三 Electrophysiological auditory response and perineuronal net in Rodent. 日本神経科学会 横浜 2014 年 09 月 11 日

Hisataka Fujimoto, Naoyuki Maeda, Yoshinori Oie, Takeshi Nakao, Takeshi Soma, Shizuka Koh, Motokazu Tsujikawa, Satoshi Kawasaki, Kohji Nishida. Noninvasive Keratography Break-Up Time in Eyes with High Water-Content Contact Lense. *World Ophthalmology Congress 2014*. 2014 年 04 月 02 日

Hisataka Fujimoto, Naoyuki Maeda, Yoshinori Oie, Takeshi Nakao, Takeshi Soma, Shizuka Koh, Motokazu Tsujikawa, Satoshi Kawasaki, Kohji Nishida. Evaluation of Keratoconus Progression Using Anterior-Segment OCT in High-Resolution Parameters. *Japan Cornea Conference 2014*. 2014 年 01 月 30 日

藤本久貴、前田直之、相馬剛至、大家義則、高静花、辻川元一、西田幸二 Boveria Basiana による真菌性角膜炎. 日本臨床眼科学会 横浜 2013 年 11 月 2 日

藤本久貴、前田直之、相馬剛至、大家義則、高静花、辻川元一、西田幸二 ソフトコンタクトレンズ装着時の非侵襲的涙液層破壊時間. 日本コンタクトレンズ学会 大阪 2013 年 7

月 14 日
長谷川 拓、田代 紘一郎、野々村 万有、
藤本 久貴、土谷 亮、渡邊 大 モーター駆動マイクロドライブによる神経活動の無線記録システム。日本神経科学会 京都 2013 年 6 月 20 日

Hisataka Fujimoto, Takeshi Soma, Yoshinori Oie, Shizuka Koh, Motokazu Tsujikawa, Naoyuki Maeda, Kohji Nishida. Differences in corneal endothelial abnormalities in the central and intermediate zones in Fuchs' corneal dystrophy. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Meeting*. 2013 年 05 月 05 日

藤本 久貴、相馬 剛至、大家 義則、高 静花、辻川 元一、前田 直之、西田 幸二 フックス角膜内皮ジストロフィにおける内皮変性の場所依存性。日本眼科学会総会 東京 2013 年 04 月 04 日

〔図書〕(計 5 件)

藤本 久貴「遺伝性/上皮性/Meesmann 角膜ジストロフィ」を分担執筆 角結膜疾患、緑内障 (MEDICAL VIEW) 平成 28 年

藤本 久貴「言語に代表される、後天的学習と臨界期の基盤に迫る」を分担執筆 実験医学 (羊土社) 平成 27 年

藤本 久貴「Meesmann 角膜ジストロフィ」を分担執筆 角膜混濁のすべて (中山書店) 平成 26 年

藤本 久貴、前田直之「前眼部形状測定装置」を分担執筆 光技術コンタクト (日本オプトメカトロニクス協会) 平成 25 年

藤本 久貴、前田直之「角膜病変の評価」を分担執筆 眼科 (金原出版) 平成 25 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://researchmap.jp/hisatakafujimoto/>
<http://www.geocities.jp/neurosci5625/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 藤本 久貴
(FUJIMOTO Hisataka)
九州大学 医学研究院 講師
研究者番号：50624227