

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462686

研究課題名(和文) 視神経乳頭周囲強膜クロスリンキングによる緑内障神経保護治療法開発

研究課題名(英文) Development of neuroprotective treatment for glaucoma with scleral crossing around the optic nerve head

研究代表者

松下 賢治 (Kenji, Matsushita)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40437405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は近年眼圧以外の循環障害、篩状板の脆弱性、遺伝性、免疫性などの多数の危険因子により進行する慢性多因子疾患と理解されている。特に視神経乳頭を支える篩状板と乳頭周辺組織の脆弱性が注目されている。今回、我々は円錐角膜に対して臨床応用され、近視の治療としても注目されているクロスリンキング治療を乳頭周囲強膜へ応用し、生体安全性と強膜強度増加への有効性を確認する。さらに高眼圧モデルマウスにより神経保護効果の有効性を確認する。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma is now understood as a chronic multifactorial disease which progresses with numerous risk factors such as circulatory disorders other than ocular pressure, vulnerability of lamina cribrosa, heredity, immunity and the like. Particularly attention is paid to the vulnerability of the lamina cribrosa and the tissue around the optic disc that support the optic nerve head. Here, to treat glaucoma, we are developing the cross-linking therapy, which is clinically applied to keratoconus, and attracting attention as a treatment for myopia to the pericapillary sclera. We confirm the effectiveness to biological safety and increase of scleral strength. Furthermore, the efficacy of neuroprotective effect is confirmed with a intra ocular hypertensive model mouse.

研究分野：医工学

キーワード：クロスリンキング 緑内障 紫外線 篩状板 神経保護

1.研究開始当初の背景

緑内障の原因として唯一エビデンスのある因子は眼圧であるが、眼圧以外にも循環障害、篩状板の脆弱性、遺伝性、免疫性などの多数の危険因子により進行する慢性多因子疾患と理解されている。特に視神経乳頭を支える篩状板と乳頭周辺組織の脆弱性が近年注目されている。篩状板は100万本の視神経が通過する場所であり、近視など元々脆弱な個体では視神経に大きな負荷がかかり視神経症が発症リスクを増大すると考えられているが治療法は開発されていない。

2. 研究の目的

今回我々は円錐角膜に対して臨床応用され、近視の治療としても注目されているクロスリンキング治療を乳頭周囲強膜へ応用し、安全性有効性を確認する。さらに高眼圧モデルマウスを作製しその有効性を確認する。本研究は緑内障性視神経症の脆弱性改善を目指す治療法の開発であり、眼医工学の応用で、新たな神経保護治療と治療効果判定法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) 強膜クロスリンキングの安全性と効果

まず眼球が大きく操作性が保たれており、前眼部 OCT を用いた組織観察が可能である家兎を用いて施行した。UV 照射にはウシオ電機製の波長 365nm の UV-LED が搭載されたスポット UV 照射装置 SPL-2 を用いた。まず家兎眼を摘出し結膜を除去後、強膜を露出した。0.1%リボフラビン点眼を3分おきに20 μ l ずつの塗布する作業を30分間施行した。その後、UV を出力1%で強膜上から2.5cm 離れた場所から照射し、前眼部 OCT にて観察した。またホルマリン固定後の組織を電子顕微鏡にて解析した。

2) 生体マウスにおける強膜クロスリンキ

ングの効果およびレーザー誘発高眼圧モデルマウスの作製

我々はすでに albino である CD-1 マウスを用いた高眼圧モデルマウスの作製に成功している。今回はその方法を用いて眼圧が上昇しにくい C57BL6J マウスに対するより効率的なレーザー誘発高眼圧モデルマウスの作製の検討をした。次にマウス強膜に対して上記クロスリンキング法を応用した。強膜局所に点眼投与できるような還流孔付き、吸引付きパイペット型固定プローブを作成した。マウス眼球を脱臼回旋し強膜を露出した。その後、固定プローブでマウス眼球強膜の赤道部 5x 5mm 四方の領域を固定し、限局性に光感受素材リボフラビン 0.1% 点眼を 30 分間プローブ内に還流した。次に、角膜クロスリンキングで標準的に用いられる DRESDEN PROTOCOL を参考に 5cm 離れたプローブ型 UVA ダブルダイオードで表面照度 3 mW/cm² を基準に距離条件照度条件を変え、370 nm で照射した。7日後、1ヵ月後、3ヵ月後に眼球摘出し、色素染色透過性から、組織抵抗性の変化を確認した。また、コンピュータ制御のバイオテスターで強膜の引っ張り試験を行い、Young 率 (Pa) など生体力学的特性を測定し、生体強度変化の組織リモデリングの影響を分子生物学的に解析するため、摘出組織を酵素分解しマイクロレイで左右の治療眼、非治療眼で組織特異変化を検出した。さらに、周辺組織の観察により本治療の強膜と周辺組織に対する安全域を検討した。

4. 研究成果

1) 強膜クロスリンキングの安全性と効果

UV 照射後の強膜は OCT 上輝度が上昇していた。しかし照射 2 日後に前眼部に強い炎

症が出現した。安全性が確保できる照射範囲およびエネルギー、照射プローブの選定について検討を重ねたが研究期間中には見いだせなかった。一方、UV 照射後の強膜を切り出し、張力を測定したところ、5.8N から 15N の張力によって強膜が数本のコラーゲン組織に分離した。さらに線維化が起きている可能性を予想し強膜をホルマリン固定し現在組織解析中である。

2) レーザー誘発高眼圧モデルマウスの作製および生体マウスにおける強膜クロスリンキングの効果

C57BL6J マウスの高眼圧モデルマウスの成功率は通常の方法では低いが、レーザー光を吸収しやすい ICG を尾静脈から注入することにより成功率を上げることができた。しかし出血や炎症が伴いやすく 40-50mmHg の異常高眼圧になるものやレーザー施行後 1 週間程度してから眼圧が上昇する個体も存在し安定性に欠けた。これは続発性の眼圧上昇の影響があるため今後は原発緑内障の病態に近い眼圧上昇のモデル作製の検討の必要があると思われる。次に正常マウスにおける強膜クロスリンキングを施行したところ、UV 照射群は非照射群と比べて張力強度は大きくなっていった。しかし、サンプルサイズが小型化した結果、半数が測定中に測定器から離れることで測定不能となり、さらなる測定器への固定条件設定が必要となった。また、クロスリンキングが分子的起きているかを検討するには分子レベルの解析が必要であると考えられた。そこで、セカンドハーモニックによるコラーゲン組織の観察に有用な二光子顕微鏡での観察も検討したが、顕微鏡の手法の習得に時間を要し観察まで至らなかった。

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 9 件)

- ① 横山 洵子、三木 篤也、白井 審一、松下 賢治、西田 幸二、緑内障の光干渉断層計パラメータと視野の相関、*眼科臨床紀要* 10(2), 107-111, 2017
- ② Miki A, Kumoi M, Usui S, Endo T, Kawashima R, Morimoto T, Matsushita K, Fujikado T, Nishida K. Prevalence and Associated Factors of Segmentation Errors in the Peripapillary Retinal Nerve Fiber Layer and Macular Ganglion Cell Complex in Spectral-domain Optical Coherence Tomography Images. *J Glaucoma*. 2017;26(11):995-1000.
- ③ Miki A, Kawashima R, Usui S, Matsushita K, Nishida K, Treatment Outcomes and Prognostic Factors of Selective Laser Trabeculoplasty for Open-angle Glaucoma Receiving Maximal-tolerable Medical Therapy. *J Glaucoma* 25: 785-789, 2016.
- ④ Rong SS, Chen LJ, Leung CK, Matsushita K, Jia L, Miki A, Chiang SW, Tam PO, Hashida N, Young AL, Tsujikawa M, Zhang M, Wang N, Nishida K, Pang CP. Ethnic specific association of the CAV1/CAV2 locus with primary open-angle glaucoma. *Sci Rep*. 2016;6:27837.
- ⑤ Kawashima R, Matsushita K, Fujimoto H, Maeda N, Nishida K. Air pressure-induced iridocornea contact in a patient with primary angle closure observed with a dynamic Scheimpflug analyzer. *J Glaucoma*. 2015;24(5):e137-8.
- ⑥ 呉 文蓮, 松下 賢治, 河嶋 瑠美, 桑村

里佳, 白井 審一, 西田 幸二, 難治性角膜疾患に続発した緑内障に対するバルベルト緑内障インプラント挿入術の短期成績, *あたらしい眼科*, 2015:32, 413-418.

- ⑦ Miki A, Endo T, Morimoto T, Matsushita K, Fujikado T, Nishida K. Retinal nerve fiber layer and ganglion cell complex thicknesses measured with spectral-domain optical coherence tomography in eyes with no light perception due to nonglaucomatous optic neuropathy. *Jpn J Ophthalmol.* 2015;59(4):230-5.
- ⑧ Shimo N, Yasuda T, Kitamura T, Matsushita K, Osawa S, Yamamoto Y, Kozawa J, Otsuki M, Funahashi T, Imagawa A, Kaneto H, Nishida K, Shimomura I., A case of aniridia with a heterozygous PAX6 mutation whose pituitary function was partially impaired. *Internal medicine* 2014;53(1):39-42.
- ⑨ 河嶋瑠美, 松下賢治, 西田幸二, 閉塞隅角眼の眼表面温度に影響する解剖学的因子に関する多変量解析, *あたらしい眼科*, 2014:131, 1203-1206

[学会発表] (計 6 件)

- ① 線維柱帯切除術時の視認性確保材としての自己集合性ペプチドゲルの可能性, 口頭, 松下賢治, 河嶋瑠美, 上杉晃司, 岡田はるか, 坂口裕和, 西田幸二, 京都国際会館, 日本臨床眼科学会, 2016/11/03, 国内.
- ② バルベルトインプラント挿入術を施行した小児緑内障症例における前房内炎症反応所見, 口頭, 河嶋瑠美, 松下賢治, 白井審一, 三木篤也, 西田幸二, パシフィコ横浜, 日本緑内障学会, 2016/09/07, 国内.
- ③ 線維柱帯切除術時の視認性確保材としての自己集合性ペプチドゲル使用による影響, 口頭, 松下賢治, 河嶋瑠美, 上杉晃司, 坂口裕和, 西田幸二, 仙台国際センター, 日本眼科学会総会, 2016/04/07, 国内.
- ④ Hunter 病合併緑内障患児に観察された Translamina pressure difference 観察さ

れた, 口頭, 松下賢治, 河嶋瑠美, 松岡孝典, 酒井規夫, 西田幸二, ロイトン札幌, 日本眼科学会, 2015/04/16, 国内.

- ⑤ マウスの網膜内網状層 (IPL) における Necl-1 の発現, 口頭, 河嶋瑠美, 松下賢治, 西田幸二, ロイトン札幌, 日本眼科学会, 2015/04/16, 国内.
- ⑥ マウス乳頭アストロサイトのアクアポリン/アクアグリセロポリンの発現, 口頭, 河嶋瑠美, 松下賢治, 西田幸二, 大阪国際会議場, 第 25 回日本緑内障学会, 2014/09/19, 国内.

[図書] (計 0 件)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 賢治 (Matsushita Kenji)
大阪大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 4 0 4 3 7 4 0 5

(2) 研究分担者

白井 審一 (Usui Shinichi)
大阪大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号 : 2 0 5 4 6 8 8 2

(3) 研究分担者

相馬 剛至 (Soma Takeshi)
大阪大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 7 0 5 8 2 4 0 1