

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10886

研究課題名(和文) FIB/SEMを用いた強角膜線維芽細胞ネットワークの解析と近視病態解明への応用

研究課題名(英文) Observation of corneal and scleral fibroblast network by using FIB/SEM

研究代表者

平田 憲 (Hirata, Akira)

久留米大学・医学部・客員准教授

研究者番号：60295144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス4眼をKarnovsky液で固定し、フェロシアン化カリウムおよびOsO₄混合液にて後固定、酢酸ウラン、Walton's Lead solutionにてブロック染色を行った。脱水後、樹脂に包埋、重合させた。試料をトリミングし観察部位を露出させ、FIB/SEMを用いスタック画像撮影後、再構築し、細胞の形態および細胞間の結合について検討した。
強膜線維芽細胞はコラーゲン線維内に数層にわたり位置していた。三次元構築による観察では、線維芽細胞がネットワークを構成し、隣接する細胞同士が結合していた。後極部強膜線維芽細胞は赤道部のそれに比して有意に垂直方向の結合がおおく、複雑なネットワークを形成していた。

研究成果の概要(英文)：To observe the three-dimensional structure of the mouse scleral fibroblasts by focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM). Four eyes from C57BL/6J mice were fixed using a mixture of glutaraldehyde and formaldehyde. The sclera was cut out at the equatorial portion and at the posterior pole, and postfixed with potassium ferrocyanide, osmium, thiocarbonylhydrazide, uranyl acetate and lead aspartate. Specimens were then dehydrated and embedded in an epoxy resin. Serial block face images were obtained using FIB/SEM. Three-dimensional image reconstruction and segmentation of the image stack were created.
Scleral fibroblasts were arranged in collagenous layers. The cells frequently showed a cellular connection with the neighboring cells and formed cellular networks. Compared with equatorial fibroblasts, there was a more complicated cellular arrangement of the posterior scleral fibroblasts. Scleral fibroblasts connect with neighboring cells to form three-dimensional cellular networks.

研究分野：眼科学

キーワード：強膜 角膜 線維芽細胞 内境界膜 FIB/SEM

1. 研究開始当初の背景

角膜・強膜は眼球の最外層を形成し、眼球の形態の維持・機能保持に深く関与している。角膜はその特徴、眼球前面に位置し、透明であることから、手術の機器(細隙灯顕微鏡、共焦点顕微鏡)の発達により、生体での観察も可能である。組織学的研究においては Nishida らの報告にあるごとく、実質内に存在するか fibroblast (keratocyte) は互いに突起を伸ばし、gap junction によるネットワークを形成していることが古くから知られ、シグナル伝達はもとより、角膜の感染防御、創傷治癒に関わっていることが知られている (Nishida T et al. IOVS 1988)。keratocyte のネットワーク構造の破綻は強膜の組織構築にも関わることが知られている。keratocyte の apoptosis が keratoconus に関与しているとの報告もある (Kim WJ et al. Exp Eye Res 1999, Erie JC et al. Am J Ophthalmol 2002)。

強膜は静的な構造ではなくむしろ動的な変化をうける組織であることが知られている。特に眼内に入る視覚刺激により、眼球の大きさと屈折状態を変化させることは視覚の維持において非常に重要である (Rada JA et al Exp Eye Res 2006)。しかしながら、強膜の構造は角膜に比して十分研究されているとは言い難い。その理由として、透明でないことと眼球後方に位置しているため生体内での観察が困難であること、強膜組織のコラゲンの配列が整然としていないことがある。組織学的研究においても強膜のコラゲンの形態解析、走行に関する報告はなされているものの、強膜コラゲンを生合成する強膜内 fibroblast に関する研究は乏しい。教科書的には keratocyte と異なり、強膜内 fibroblast は細胞密度が非常に疎で、散在する細胞も互いに接していない比較的孤立した細胞配列を呈するとの記載もある。しかしながら、強膜が動的な眼球形態を司る機能を持つと考えられるならば、その構造の保持には強膜全体のコラゲンの生合成を制御する fibroblast のネットワーク機構の存在は否定出来ない。

近視は屈折異常の一つで、臨床においてごく一般的に遭遇する。しかし近視の中でも病的近視とよばれる病態は、著明な眼軸延長とそれに付随する様々な病態を呈する点で臨床において極めて重要である。網膜格子状変性、網膜裂孔・網膜剥離、網脈絡膜萎縮、視神経症、緑内障など現在でも難治とされる疾患の頻度を高めることから早急な対策が重要である。近視の発生メカニズムについては古くから臨床および実験的に検証が

なされている。現在、網膜周辺部の hyperopic defocus が眼軸長の伸長に関与していると報告されている。強膜は伸展・拡張する方向に作用するが、その速度は非常に迅速であり、受動的伸展ではなく能動的拡張と考えられる (McBrien NA et al. IOVS 2000)。この変化は広く研究に用いられてきた chick のみならず、tree shrew、monkey でも同様に見られる現象である。

我々は、過去に chick による実験近視の研究において、長期の形態覚刺激遮断を行うことで、脈絡膜毛細血管板内の血管密度の減少、fenestrae の減少が経時的に観察され、さらに長期観察では Bruch 膜の断裂によるラッカークラック様変化と、引き続いておこる網脈絡膜萎縮を観察した (Hirata et al. Graefe's Arch 1998)。これらの観察結果は実験近視眼でも臨床で観察しうる網脈絡膜萎縮と同様の合併症が普遍的な事象であること、網脈絡膜萎縮は強膜の迅速な remodeling によるものであることを示唆した。一方、高齢者の病的近視眼にしばしば見られる局所的な強膜の ectasia (=後部ぶどう腫)が見られるが、これらの多くはびまん性な拡張よりむしろ局所的な伸展と考えられる。後部ぶどう腫のある領域の強膜は高度菲薄化し、強膜のコラゲン径の狭小化も観察されるため、これらの変化は初期の近視発生のメカニズムとは異なるものであろうと考えられる。しかしながら、上述したごとく強膜の remodeling に深く関わる強膜 fibroblast の分布、細胞間ネットワークの有無、病態による細胞の挙動・配列変化についての研究は皆無である。

FIB/SEM は、高性能 SEM に超微細加工用のガリウムイオンビーム銃(FIB)を組み合わせた複合機器である。FIB による超微細加工技術を用いることで、試料ブロックの表面数 10nm のみを平坦に切削することが可能となり、新規の切削面を SEM で観察し(Block Face Imaging 法)、再び FIB で切削する作業を繰り返すことにより、連続切削像を得ることができる。得られた数百枚の SEM 像を専用ソフトウェアで立体的に再構築し、3 次元的な構造解析を行うことができる。断層的な観察を行うことで、細胞間、細胞内構造や、界面の状態を明瞭に観察することができる。本装置を用いることで、従来の観察法では全体像を把握することが困難であった組織の 3 次元構造を観察可能で、本研究の目的である、強膜内の fibroblast のネットワーク構造の有無、病的状態におけるその変化についてのアプローチが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

1. 正常角膜 keratocyte および強膜線維芽細胞ネットワークの FIB/SEM による観察
本研究では、3年間の研究期間に、正常角膜・強膜の FIB/SEM による、微細構造の解析を行い、眼球外膜の眼球形態保持機構の解明の一助とするとともに、実験的角膜・強膜の remodeling 異常時の角強膜内 fibroblast のネットワーク機構の変化について検討を行う。初年度には正常正常角膜・強膜の keratocyte および強膜 fibroblast の分布および細胞の広がりについて比較検討し、keratocyte のネットワークに匹敵する強膜 fibroblast ネットワークの存在の有無を明らかにする。動物眼はマウスを用いる予定であるが、広く実験近視眼として用いられてきた chick についても同様の解析を予定する。次年度では初年度で得られた解析結果を元に、実験近視眼における角膜・強膜の構造変化、とくに細胞間ネットワークの変化について検討を行う。近視の眼軸延長時には脈絡膜の構造変化も認められるため、脈絡膜毛細血管板の形態変化および脈絡膜間質(とくにメラノサイト)のネットワーク構造についても正常眼と比較検討する。最終年度では、前年度のデータを踏まえ、さらに部位別特徴、他の強膜再構築に関わる種々の因子による角膜・強膜の構造変化、とくに細胞間ネットワークの変化について検証を重ねる。角膜においては円錐角膜で全層角膜移植にいたった症例と水疱性角膜症で同様の手術にいたった症例の角膜 keratocyte の構造変化について検討する。強膜に関しては他の後天的眼軸伸長を認めうる未熟児網膜症における光凝固、もしくは冷凍凝固と同様の処置を行い、強膜リモデリングにおける fibroblast の挙動について検討する。

2. 剥離した内境界膜標本の FIB/SEM を用いた三次元的解析

内境界膜剥離は黄斑円孔や網膜前膜をはじめとする様々な黄斑疾患の手術の際に用いられる手術手技である。内境界膜剥離は黄斑円孔の解剖学的閉鎖、機能改善に寄与することが知られており、網膜前膜においては再発の予防効果があることが知られている。一方で dissociated optic nerve fiber layer appearance, concentric macular dark spots として知られる網膜表面の構造変化や網膜電図による網膜機能改善の遅延が見られることも報告されている。透過電顕を用いた摘出内境界膜の解析ではない境界膜の網膜側に Muller 細胞の足突起が付着していることが知られている。本研究

ではない境界膜剥離によって引き起こされる Muller 細胞の傷害を定量的に評価するために、FIB/SEM を用い解析を行った。黄斑円孔、網膜前膜を対象とし、疾患による差についても解析を行った。

3. 研究の方法

1. 正常角膜 keratocyte および強膜 fibroblast の FIB/SEM による観察
マウス(C57BL/6)を用い、ペントバルビタールナトリウムの過量投与により安楽死させ、速やかに眼球を摘出した。摘出した眼球を half Karnovsky 固定液で前固定し、観察部位を切り出した。フェロシアン化カリウムおよび四酸化オスmium混合固定液を用いて後固定し、酢酸ウラン、Walton's Lead solution を用いてブロック染色を行った。アルコール系列で脱水後、エポキシ樹脂に包埋し、重合させた。樹脂に包埋された試料をトリミングし、マイクロームで面出しを行った後、準超薄切片を作成し観察部位を確認した。FIB/SEM を用いて、約 $60\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$ のサイズを 100nm 毎で、2,500-4,000 倍にて観察した。得られた画像を再構築し、細胞の形態および細胞間の結合の有無、接着機構について検討した。観察部位として、角膜中央部、強膜赤道部、強膜後極部について検討した。

2. 術中摘出内境界膜標本を用いた Muller 細胞即突起の定量的解析

インフォームドコンセントにによって同意を得られた患者 40 人に対し、硝子体手術の際に剥離した内境界膜を採取し、Karnovsky 固定液で前固定した(黄斑円孔 10 眼、網膜前膜 30 眼)。この中からランダムに 6 検体、計 12 検体を選び、フェロシアン化カリウムおよび四酸化オスmium混合固定液を用いて後固定し、酢酸ウラン、Walton's Lead solution を用いてブロック染色を行った。アルコール系列で脱水後、エポキシ樹脂に包埋し、重合させた。樹脂に包埋された試料をトリミングし、マイクロームで面出しを行った後、準超薄切片を作成し、観察部位を確認する。FIB/SEM を用いて、約 $25\mu\text{m} \times 35\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$ のサイズを 50nm 毎で撮影した。得られた画像を再構築し、内境界膜および細胞片を segmentation し、視覚化した。内境界膜厚、内境界膜に付着した細胞片の数、細胞片の体積を測定し、黄斑円孔と網膜前膜とで比較検討した。

4. 研究成果

1. 正常角膜 keratocyte および強膜線維芽細胞ネットワークの FIB/SEM による観察
切片による強膜の組織像では線維芽細胞はコラーゲン線維内に数層にわたり位置していた。切片像では細胞は紡錘形を呈しており、

細い細胞突起を有しているように見えた。画像の再構成により、三次元構築による観察では、線維芽細胞が複雑に入り組んで、細網状のネットワークを構成し、隣接する細胞同士が結合していた。個々の細胞は多角形で、平坦であった。線維芽細胞は後極部強膜で $714.57 \pm 153.88 \mu\text{m}^3/\text{cell}$ であった。細胞間の結合は水平方向、垂直方向いずれにも見られた。後極部強膜の線維芽細胞は水平方向に $2.64 \pm 0.48 \text{ sites}/\text{cell}$ 、垂直方向に $2.37 \pm 0.21 \text{ sites}/\text{cell}$ の結合が見られた。一方赤道部強膜では水平方向に $3.31 \pm 1.75 \text{ sites}/\text{cell}$ 、垂直方向に $1.47 \pm 0.48 \text{ sites}/\text{cell}$ の結合が見られた。垂直方向の結合は後極部強膜の線維芽細胞が赤道部のそれに比して有意に多かった ($p=0.01$, paired t-test)。

2. 剥離した内境界膜標本の FIB/SEM を用いた三次元的解析

黄斑円孔では内境界膜厚 $2.69 \pm 0.31 \mu\text{m}$ で、内境界膜の網膜面 $100 \mu\text{m}^2$ あたり 5.07 ± 1.03 個の細胞片が付着していた。細胞片の総容積は、 $3.54 \pm 1.24 \mu\text{m}^3/100 \mu\text{m}^2$ であった。一個あたりの平均体積は $0.70 \pm 0.20 \mu\text{m}^3$ であった。一方網膜前膜では内境界膜厚 $3.07 \pm 0.21 \mu\text{m}$ で、黄斑円孔群に比較すると有意に大きかった ($p=0.030$, unpaired t-test)。内境界膜の網膜面 $100 \mu\text{m}^2$ あたり 12.85 ± 3.45 個の細胞片が付着していた。細胞片の総容積は、 $10.45 \pm 2.77 \mu\text{m}^3/100 \mu\text{m}^2$ で、いずれも黄斑円孔群に比べ有意に高かった (各 $p=0.0024$, 0.0022 , Mann-Whitney test)。一個あたりの平均体積は $0.82 \pm 0.11 \mu\text{m}^3$ で両群間に差はなかった。結論として、検討した内境界膜全てにおいて網膜面に細胞片が付着していた。黄斑円孔に比べ、網膜前膜では細胞片の数、総容積いずれも有意に大きく、網膜前膜における内境界膜剥離は網膜内層の傷害のリスクが高いことが示唆された。

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2件)

1. Hirata A, Murata K, Hayashi K, Nakamura KI. Three-Dimensional Analysis of Peeled Internal Limiting Membrane Using Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscopy. Transl Vis Sci Technol. 2018 2;7(1):15. (査読あり)

2. Hirata A, Hayashi K, Murata K, Nakamura KI. Removal of choroidal neovascular membrane in a case of macular hole after anti-VEGF therapy for age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol Case Rep. 2017 19;9:14-17. (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

1. 村田和久, 都合垂記暢, 太田啓介, 中村桂一郎, 江内田 寛, 平田 憲. FIB/SEM を用いたマウス強膜内の線維芽細胞間ネットワークの観察. 第 120 回日本眼科学会総会 2016 年

2. 平田 憲, 村田和久, 林 研, 中村 桂一郎. 集束イオンビーム/走査電子顕微鏡複合機を用いた摘出内境界膜表面の観察. 第 120 回日本眼科学会総会 2016 年

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 憲 (Hirata, Akira)
久留米大学・医学部・客員准教授
研究者番号: 60295144

(2) 研究分担者

中村 桂一郎 (Nakamura, Kei-ichiro)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 20172398

太田 啓介 (Ohta, Keisuke)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 00258401

(3) 研究協力者