

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09407

研究課題名（和文）生体適合性架橋剤を用いた水疱性角膜症治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment for bullous keratopathy using a biocompatible crosslinking agent

研究代表者

相馬 剛至（Soma, Takeshi）

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70582401

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：水疱性角膜症に対する生体適合性架橋剤PEG-POG点眼の効果について家兎モデルを用いて検討した。白色家兎の水晶体を超音波乳化吸引したのちに、角膜内皮を物理的に掻破し、水疱性角膜症モデルを作製した。続いて、PEG-POG群には5wt%のPEG-POG10を、コントロール群には生理食塩水を5分毎に12回点眼し、各群で細隙灯顕微鏡を用いた前眼部写真撮影、パキメーターによる中心角膜厚測定および組織学的検討（HE染色）を行った。結果、PEG-POG群ではコントロール群と比較して、中心角膜厚の低下を認め、当該架橋剤の水疱性角膜症に対する有効性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水疱性角膜症に対する唯一の治療法は角膜移植であるが、課題としてドナー不足が挙げられる。また、角膜移植を初めとする臓器移植では他家の組織を移植するため、免疫学的な拒絶反応を避けることはできない。加えて、拒絶反応の発症を抑制するために長期間の眼局所および全身的な免疫抑制であり、緑内障や感染症、腎機能障害など合併症のリスクが非常に高い。本治療法の開発によって、水疱性角膜症の進行予防が可能になれば、角膜移植を要する患者の減少に寄与できると考える。

研究成果の概要（英文）：The effect of PEG-POG eye drops, a biocompatible cross-linking agent, on bullous keratopathy was investigated in a rabbit model. After ultrasonic phacoemulsification and aspiration of the lens of white rabbits, the corneal endothelium was physically scraped to create a bullous keratopathy model. The PEG-POG group was then treated with 5 wt% PEG-POG10 and the control group with saline every 5 minutes for 12 doses, and each group underwent anterior segment photography using a slit-lamp microscope, central corneal thickness measurement using a pachymeter, and histological examination (HE staining). The results showed a decrease in central corneal thickness in the PEG-POG group compared to the control group, confirming the efficacy of the cross-linking agent in bullous keratopathy.

研究分野：眼科

キーワード：水疱性角膜症 生体適合性架橋剤 家兎

### 1. 研究開始当初の背景

角膜は体表面側より上皮層、実質層、内皮層の3層から構成される。このうち内皮層は角膜の最も内側に位置する一層の細胞層で、角膜実質の含水量を調節するポンプ機能を有している。角膜内皮細胞は生体内での増殖能に乏しいため、疾患や外傷により角膜内皮層が障害されると、角膜実質が浮腫をきたす水疱性角膜症に陥り、視機能が著しく低下する。

このような水疱性角膜症に対する唯一の治療法は角膜移植であるが、課題としてドナー不足、拒絶反応がある。共同研究者である Matsuzaki らは生体適合性ポリエチレングリコール (PEG) の末端にコラーゲンモデルペプチド (Pro-Hyp-Gly)10: (POG)10) を結合した生体適合性架橋剤 PEG-POG10 を開発した。本架橋剤はコラーゲン分子と選択的に三重らせんを形成することを特徴とする。すなわち、本架橋剤とコラーゲンを材料として角膜実質の主成分であるコラーゲンマトリクスの形成が期待できる。既に本架橋剤をアテロコラーゲン溶液に添加することにより、コラーゲンが瞬時にゲル化する予備的な知見を見出している (M. Matsuzaki et al, Adv. Mater., 2011)。加えて、フェムト秒セカンドレーザーで切開した家兎角膜実質内に生体適合性架橋剤とコラーゲンモデルペプチドの混和物を注入すると人工角膜実質層が形成されることを見出した。生体適合性架橋剤 PEG-POG10 は角膜実質のコラーゲンに架橋を形成させることにより、角膜実質浮腫の進行を予防する効果が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では新規に開発された生体適合性ポリエチレングリコールの末端にコラーゲンモデルペプチドを結合した架橋剤を用いて角膜実質のコラーゲンを架橋し水疱性角膜症の進行予防に対する効果について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 家兎水疱性角膜症モデルに生体適合性架橋剤 PEG-POG10 を投与するにあたり、PEG-POG10 の濃度についての最適化を行った。実験には蛍光ラベルした生体適合性架橋剤を用い上皮剥離を行った水疱性角膜症モデルに対し点眼を行い、蛍光顕微鏡を用いて実質内への浸透度を評価した。加えて、投与方法 (一日あたりの投与回数ならびに投与日数) についても同様に最適条件の探索を行った。水疱性角膜症モデルの手術手技については、申請者は臨床において角膜移植の豊富な経験があり (T Soma, et al. Cornea, 2017) 加えて、家兎やサルを用いた動物実験にも精通しており、すでに水疱性角膜症モデルの作製にも成功しており、技術・手技は確立している。

(2) 生体適合性架橋剤点眼後の水疱性角膜症モデルにおいて、経時的に細隙灯顕微鏡検査による角膜透明性の評価、光干渉断層計による角膜厚の評価、眼圧測定を行い、治療効果を判定した。経過観察の後に、架橋剤投与眼を組織学的検討に供した。光学的顕微鏡、電子顕微鏡および免疫組織学的手法を用いて観察し、点眼後の創傷治療反応、免疫反応、角膜実質細胞の挙動について評価した。

### 4. 研究成果

(1) 家兎における水疱性角膜症モデルの作製については既報に従って、次の方法で行った。すなわち、白色家兎の水晶体を超音波乳化吸引したのちに、前房内に手術用粘弾性物質を注入し、角膜内皮全面をシリコンチューブで物理的に掻破した。家兎の角膜内皮細胞は生体内で増殖するため、前房内にトレパンブルーを注入して残存する内皮細胞を可視化することで、角膜裏面の内皮細胞が観察できなくなるまで掻破を行った。処置後、細隙灯顕微鏡および前眼部光干渉断層計にて角膜全体が浮腫状 (水疱性角膜症) であることを確認した。つづいて家兎水疱性角膜症モデルに生体適合性架橋剤 PEG-POG10 を点眼にて投与するにあたり、角膜上皮剥離の有無の必要性について検討した。実験には Alexa488 でラベルした 10wt% の PEG-POG10 を用い、上皮剥離ありおよび剥離なしの個体に対し、5分毎に60分間点眼した。結果、上皮剥離を行った個体では実質深層にまで PEG-POG が浸透していたが、上皮剥離を行わなかった個体では実質内への PEG-POG の浸透はわずかであった (図1)。コントロールの正常角膜では全く PEGPOG の浸透はみられなかった。以上より、角膜上皮剥離を行った上で点眼を行うプロトコールとした。続いて、PEG-POG

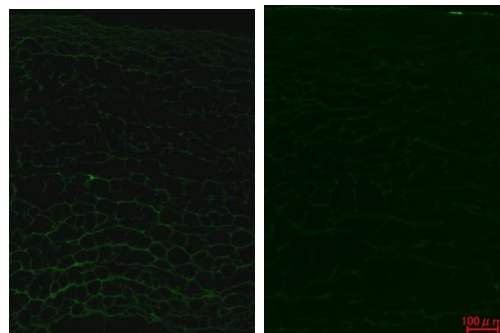


図1 架橋剤の角膜実質内への浸透  
(角膜上皮剥離あり、なし)

の濃度による実質内浸透度の違いについて検討した。1、0.5、0.1wt%の PEG-POG を角膜上皮を剥離した水疱性角膜症モデルに 5 分毎に 60 分間点眼を行った。その結果、0.1wt%ではほとんど検出されず、0.5、1wt%と高度になるに従い、浸透度は高くなった。(2) 上記の条件をもって、家兎水疱性角膜症モデルを作製し、PEG-POG 群には 5wt%の PEG-POG10 を、コントロール群には生理食塩水を 5 分毎に 1 時間(12 回)点眼した。12 時間おきに合計 6 シリーズを施行した。各群で細隙灯顕微鏡を用いた前眼部写真撮影、パキメーターによる中心角膜厚測定および組織学的検討(HE 染色)を行った。結果、PEG-POG 群ではコントロール群と比較して、中心角膜厚の低下を認められた(表 1)。以上から PEG-POG 点眼は水疱性角膜症に対し、一定の効果を有すると考えられた。

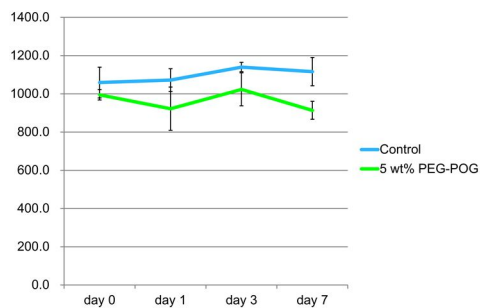


表 1 架橋剤の角膜実質内への浸透  
(角膜上皮剥離あり、なし)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Soma Takeshi, Koh Shizuka, Maeda Naoyuki, Nishida Kohji	4. 巻 38
2. 論文標題 NS Endo-Insertor: A New Graft Insertor for Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 S42 ~ S44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000002086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeno Sayo, Soma Takeshi, Tsujikawa Motokazu, Shigeta Ryujiro, Kawasaki Ryo, Oie Yoshinori, Koh Shizuka, Maruyama Kazuichi, Kawasaki Satoshi, Maeda Naoyuki, Nishida Kohji	4. 巻 104
2. 論文標題 Efficacy of therapeutic soft contact lens in the management of gelatinous drop-like corneal dystrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 241 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2018-313809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Shinya, Oie Yoshinori, Miki Atsuya, Soma Takeshi, Koh Shizuka, Kawasaki Satoshi, Tsujikawa Motokazu, Jhanji Vishal, Nishida Kohji	4. 巻 39
2. 論文標題 Correlation Between Angle Parameters and Central Corneal Thickness in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 540 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000002220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiritoshi Shoko, Soma Takeshi	4. 巻 192
2. 論文標題 Corneal perforation secondary to gonococcal keratoconjunctivitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Canadian Medical Association Journal	6. 最初と最後の頁 E1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1503/cmaj.200506.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 zaki A, Koh S, Maeda N, Asonuma S, Santodomingo-Rubido J, Oie Y, Soma T, Fujikado T, Nishida K.	4. 巻 44
2. 論文標題 Optimizing correction of coma aberration in keratoconus with a novel soft contact lens.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cont Lens Anterior Eye	6. 最初と最後の頁 101405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clae.2020.12.071.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuoka Y, Soma T, Maruyama K, Nishida K	4. 巻 21
2. 論文標題 Fusarium infection complicating rheumatic keratitis that acutely progressed to endophthalmitis during regular infusion of tocilizumab: a case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-021-01981-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiraki A, Sakimoto S, Oie Y, Soma T, Miki A, Usui S, Sato S, Matsushita K, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Inferior Removal of Dislocated Polymethyl Methacrylate Intraocular Lens and Scleral Refixation in Glaucomatous Eyes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmol Therapy	6. 最初と最後の頁 881-886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40123-022-00477-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koh S, Soma T, Oie Y, Nishida K.	4. 巻 12
2. 論文標題 First Diquafosol Treatment for Dry Eye: 10-Year Follow-Up	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Asia-Pacific Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 103-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/APO.0000000000000493.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshinaga Y, Soma T, Azuma S, Maruyama K, Hashikawa Y, Katayama T, Sasamoto Y, Takayanagi H, Hosen N, Shiina T, Ogasawara K, Hayashi R, Nishida K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Long-term survival in non-human primates of stem cell-derived, MHC-unmatched corneal epithelial cell sheets.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1714-1729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2022.05.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡邊 怜美, 相馬 剛至, 大家 義則, 高 静花, 川崎 諭, 辻川 元一, 前田 直之, 西田 幸二.	4. 巻 14
2. 論文標題 視力予後不良の水疱性角膜症に対するQOL改善を目的とした角膜内皮移植の4例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 眼科臨床紀要	6. 最初と最後の頁 73-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 相馬剛至
2. 発表標題 コラーゲン選択的架橋剤を用いた角膜実質再生治療法の開発
3. 学会等名 日本眼科手術学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相馬剛至
2. 発表標題 iPS細胞を用いた 角膜上皮の再生医療
3. 学会等名 日本再生医療学会 第1回秋季科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬剛至
2. 発表標題 日本角膜学会学術奨励賞受賞記念講演 角膜内皮移植術における新規デバイスの開発と術後視機能の検討.
3. 学会等名 角膜カンファランス2021
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相馬剛至
2. 発表標題 Advances in keratoplasty and eye banking, New Graft Insertion Device for DSAEK.
3. 学会等名 第125回日本眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相馬剛至
2. 発表標題 iPS細胞を用いた角膜上皮の再生医療
3. 学会等名 第43回 日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相馬剛至
2. 発表標題 難治性角膜疾患の克服に向けて iPS細胞を用いた角膜上皮の再生医療
3. 学会等名 角膜カンファランス2023（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------