

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16965

研究課題名（和文）ミトコンドリア自家蛍光を利用した角膜内皮機能評価の機器開発

研究課題名（英文）Development of an instrument to evaluate corneal endothelial function using mitochondrial autofluorescence

研究代表者

山口 昌大（Yamaguchi, Masahiro）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20574700

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）：作製した培養ヒト角膜内皮細胞シートは、in vitroの細胞シートはNa/K ATP ase、ZO-1、Phalloidinが発現し、ヒトドナー角膜と比しても遜色なかった。異なる角膜内皮細胞密度（500、1000、2000、3000個/mm<sup>2</sup>）の培養シートを用いてNADH/NADPHの自家蛍光を撮影し、発光を認めた。内皮細胞のポンプ機能を抑制するouabainを用いて、ポンプ機能抑制による自家蛍光の低下を測定する予定だったが、新型コロナウイルスパンデミックによって研究期間の大幅な遅延が生じた。ouabain濃度設定に時間がかかりNADH自家蛍光の発現強度に違いを認めることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の移植医療における問題点は、提供者数が少ないことであり、眼科領域においても慢性的なドナー不足に陥っている。ドナー角膜は肉眼による角膜混濁の有無、スベキュラマイクロスコープを用いた角膜内皮細胞密度で評価している。既存の測定方法は内皮機能を直接評価できない。角膜内皮細胞はミトコンドリアが豊富な細胞であり、ミトコンドリア内の電子伝達系でエネルギーを供給されている。ミトコンドリア内のATP活動を観察・評価細胞機能を直接評価できる可能性がある。NADH/NADPHの自家蛍光を利用した機器開発は非侵襲的に機能の直接評価ができるため、移植手術のパラダイムシフトを起こせる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The cultured human corneal endothelial cell sheets prepared in vitro expressed Na/K ATP ase, ZO-1, and Phalloidin and were comparable to human donor corneas. Autofluorescence of NADH/NADPH was captured using culture sheets of different corneal endothelial cell densities (500, 1000, 2000, and 3000 cells/mm<sup>2</sup>) and luminescence was observed. We planned to use ouabain, which suppresses the pump function of endothelial cells, to measure the decrease in autofluorescence due to the suppression of the pump function, but COVID-19 pandemic caused a significant delay in the study period. The study was not able to determine a difference in the intensity of NADH autofluorescence.

研究分野：角膜内皮細胞

キーワード：角膜内皮細胞 自家蛍光 NADH 角膜移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本の移植医療における問題点は、提供者数が少ないことであり、眼科領域においても慢性的なドナー不足に陥っている。2017年3月時点で移植待機患者数は1967人だが、1年間の献眼数は1367眼である。また高い生着率を誇る角膜移植においても、移植後拒絶反応を含む移植片の機能不全が慢性的なドナー不足を助長している。

1980年代までは水疱性角膜症に対する治療法は全層角膜移植術(PKP)のみであった。しかし、PKP後の45%は拒絶反応、28%は角膜内皮数減少を生じ、再移植が必要となることが多かった(Yamagami S, et al. Jpn J Ophthalmol 1994)。また、PKP症例の約60%は角膜内皮細胞数減少眼(水疱性角膜症、移植片不全)であった。そこで角膜内皮のみを移植する角膜内皮移植術が1990年代後半より普及し、現在、角膜移植全体の約50%を占めるようになっている。角膜内皮移植術の主流はDescemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK)である。DSAEKグラフトは角膜実質一部+デスメ膜+角膜内皮で構成され、厚さ150 $\mu\text{m}$ ~250 $\mu\text{m}$ である。PKPと比較したDSAEKの利点は、術後早期の視力回復、術後の屈折変化が少ない、拒絶反応が低い(8%)、再移植が容易などと報告されている(Price M O, et al. Ophthalmology. 2009)(Lee W B, et al. Ophthalmology. 2009)。一方で、早期の内皮細胞減少(29~61%:6M)、術中・術後のシート偏位(1~82%)が問題となる(Price M O, et al. Ophthalmology. 2009)(Lee W B, et al. Ophthalmology. 2009)。内皮細胞減少率は5年経過後にPKPよりDSAEKが悪くなるとの報告もあり、今後も内皮細胞減少による水疱性角膜症の増加が懸念される。また、WHOは移植臓器の国内使用を推奨しており、輸入臓器の使用が著しく制限される可能性がある。角膜は輸入に依存しており、2015年度の輸入角膜移植眼数は1444眼、国内角膜移植眼数1365眼を上回る。こうした制限のなかで、いかに効率良く角膜移植をおこなうかが重要となってくる。ドナー角膜の評価は、肉眼的な角膜混濁の有無、スペキュラマイクロスコープを用いた角膜内皮細胞密度(個/ $\text{mm}^2$ )のみで評価しているのが現状である。細胞密度2500/ $\text{mm}^2$ 以上のドナー角膜を移植しても、術後に内皮機能不全を認めることがしばしばある。既存の測定方法は内皮機能を直接評価できない。

### 2. 研究の目的

内皮機能を術前に評価できれば、効率的な治療選択を行うことができる。角膜内皮細胞はミトコンドリアが豊富な細胞であり(図1)、ミトコンドリア内の電子伝達系でエネルギーを供給されている。ミトコンドリア内のATP活動を観察・評価できれば、細胞機能を客観的に評価できる可能性がある。

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸(NADPH)はATP産生に関与しており、細胞活性を間接的に評価できるマーカーであり、自家蛍光を持つことが知られている。(Blacker TS, et al. Free Radic Biol Med. 2016)可視光ベースの共焦点顕微鏡は、散乱光やダメージによって深部の情報を十分に観察することができない。多光子励起顕微鏡(MPLSM)は赤外光が組織の奥深くにまで浸透し、細胞と細胞レベル下で進行するプロセスの微細構造を超高感度で撮影できる。角膜を摘出せずに、眼球組織のまま撮影が可能となる。NADHおよびNADPHの自家蛍光を利用して、MPLSMにてin vivoの生体イメージングを測定することで術前に内皮細胞機能を評価できる可能性がある。我々はヒト培養角膜内皮細胞から内皮シートを作成することに成功している。ヒト角膜内皮細胞はin vivoで増殖しないが、特殊な培養条件下ではin vitroで増殖させることが知られている(Miyata K, et

al. Cornea. 2001)。我々はアスコルビン酸2リン酸 (Asc-2P) がヒト角膜内皮細胞を顕著に増殖させることを見いだした (Shima N, Yamaguchi M, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011)。また、繊維芽細胞増殖因子 (b-FGF) と Asc-2P の組み合わせが、Asc-2P 単独より有意に培養ヒト角膜内皮細胞の増殖を増強し、継代培養を繰り返しても細胞老化せずに角膜内皮細胞の形態を維持して増幅可能であることがわかった。作製した培養ヒト角膜内皮細胞シートは、光学顕微鏡、免疫染色いずれも均一で 3000/mm<sup>2</sup> を超える高密度な細胞シート作製が可能となった。in vitro の細胞シートはポンプ機能のマーカ-Na/K ATP ase、バリア機能のマーカ-ZO-1、細胞骨格のマーカ-Phalloidin が、兔眼モデルに移植 2 週後に発現増強を認め、ヒトドナー角膜と比しても遜色なかった (Yamaguchi M, et al. Curr Eye Res. 2016)。

我々は、角膜内皮細胞密度が 3000/mm<sup>2</sup> の培養シートを用いて、MPLSM による角膜内皮細胞の NADH/NADPH 自家蛍光の測定を介して、新しい角膜内皮細胞機能の評価機器の構築を目指す。NADH をマーカとした細胞活性を評価することができれば、臨床では角膜移植の効率的な術式選択が可能となる。基礎においては、iPS 細胞を用いた角膜内皮再生医療の発展が期待されている。しかし培養を行っても実際の移植において細胞機能を評価することは重要である。現在は Na/K ATPase、ZO-1、N-Cadherin などの機能マーカで in vitro の評価はできるが、移植前後の in vivo における評価はスペキュラマイクロスコープによる細胞密度のみである。MPLSM による生体イメージングが可能になれば、再生医療分野での臨床応用の成功に大きく寄与すると考える。

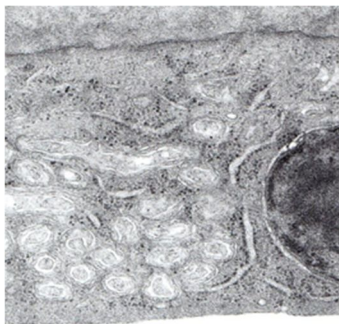


図1 角膜内皮細胞の電子顕微鏡像  
角膜内皮細胞はミトコンドリアが豊富に存在する

### 3. 研究の方法

検討項目は(1)in vitro 培養角膜内皮細胞を用いて NADH/NADPH の生体イメージングの条件設定および有効性を検討、(2)in vivo 水疱性角膜症モデルに移植し、NADH/NADPH 自家蛍光の発現差による移植評価、(3)in vivo ドナー角膜内皮細胞で活性を計測、角膜移植における術前後の評価、を行う。

#### (1)in vitro 培養内皮細胞シートの NADH/NADPH 自家蛍光

異なる細胞密度 (500、1000、2000、3000/mm<sup>2</sup>) の NAD/NADP 自家蛍光を MPLSM で撮影し、細胞密度による自家蛍光の信号強度の違いを測定する。次に細胞密度 3000/mm<sup>2</sup> 内皮シートに異なる濃度の ouabain でポンプ機能を抑制し、NADH/NADPH 自家蛍光を MPLSM で撮影する。

#### (2)in vivo 水疱性角膜症家兎モデルへのシート移植、NADH/NADPH 自家蛍光測定

異なる細胞密度 (500、1000、2000、3000/mm<sup>2</sup>) の培養内皮細胞シートを移植し、MPLSM を用いた撮影で NADH/NADPH の自家蛍光から内皮機能を測定する。術後 (術翌日、3 日、1 週間、2 週間、1 月) の角膜厚、ZO-1、Na/K ATP-ase、Phalloidin の免疫染色、タンパク発現を測定する。NADH/NADPH の自家蛍光との相関を検証する。

#### (3)ドナー角膜の細胞密度、細胞活性を評価する (MPLSM およびスペキュラマイクロスコープ)

角膜移植後の視力、眼圧、角膜厚、収差を測定 (術後 1 日、3 日、1 週間、1 月、3 月、半年)

術前の NADH 細胞活性との相関を検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 培養内皮細胞シートの作成

作製した培養ヒト角膜内皮細胞シートは、光学顕微鏡、免疫染色いずれも均一で  $3000/\text{mm}^2$  を超える高密度な細胞シートを作製した(図 2)。in vitro の細胞シートはポンプ機能のマーカー Na/K ATP ase (図 2A)、バリア機能のマーカー ZO-1 (図 2B)、細胞骨格のマーカー Phalloidin (図 2C) が発現し、ヒトドナー角膜 (図 2 GHI) と比しても遜色なかった。

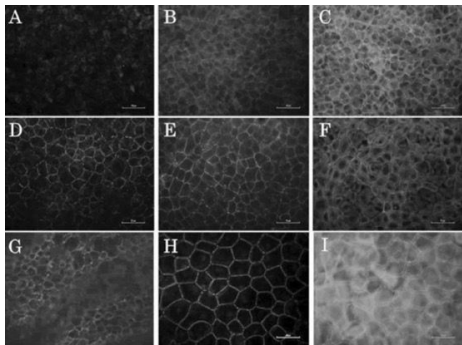


図 2 培養内皮細胞シートの機能発現  
in vitro 培養内皮細胞シート (上段)  
in vivo 培養内皮細胞シート (中段) ドナー角膜 (下段)  
Na/K ATP-ase (A,D,G) ZO-1 (B,E,H) Phalloidin (C,F,I)

##### (2) NADH/NADPH 自家蛍光の検討

異なる角膜内皮細胞密度 ( $500$ 、 $1000$ 、 $2000$ 、 $3000$  個/ $\text{mm}^2$ ) の培養シートを用いて、NADH の自家蛍光が生じる条件下で、NADH/NADPH の自家蛍光を撮影し、発光を認めた。(図 3)

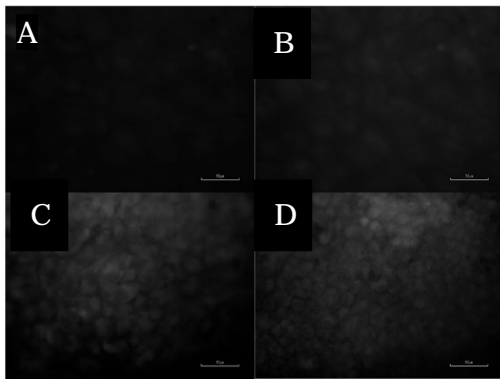


図 3 NADH/NADPH の自家蛍光  
 $500$  個/ $\text{mm}^2$  (A)、 $1000$  個/ $\text{mm}^2$  (B)、 $2000$  個/ $\text{mm}^2$  (C)、 $3000$  個/ $\text{mm}^2$  (D)  
発光を認めた

##### (3) ouabain によるポンプ機能抑制における自家蛍光の

次に、内皮細胞のポンプ機能を抑制する ouabain を用いて、ポンプ機能を抑制することで信号強度が低下するか、測定することが目標であった。しかし、新型コロナウイルスによるパンデミックによって、ouabain が海外から納入困難となり、研究期間の大幅な遅延が生じた。また、ouabain 濃度設定に時間がかかり NADH 自家蛍光の発現強度に違いを認めることができなかった。水疱性角膜症家兎モデルに異なる細胞密度の培養シートを移植し、NADH 自家蛍光の発現強度を比較する予定であったが、研究期間が終了となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11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 11件）

1. 著者名 Kawamorita Takushi, Uozato Hiroshi, Oshika Tetsuro, Negishi Kazuno, Fujikado Takashi, Murakami Akira, Kamiya Kazutaka, Maeda Naoyuki, Ueno Yuta, Onuma Kazuhiro, Hirota Masakazu, Hoshikawa Rie, Masui Sachiko, Yamaguchi Masahiro, Mihashi Toshifumi	4. 巻 17
2. 論文標題 Evaluation of ocular biometry in the Japanese population using a multicenter approach: Prospective observational study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0271814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chiba-Mayumi Miyako, Hirakata Toshiaki, Yamaguchi Masahiro, Murakami Akira	4. 巻 25
2. 論文標題 Infliximab recovers central cone dysfunction with normal fundus in a patient with ulcerative colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 101244 ~ 101244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2021.101244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 大場 絢加, 海老原 伸行, 山口 昌大, 春日 俊光, 田部 陽子, 保坂 好恵, 村上 晶	4. 巻 39
2. 論文標題 初診から32年後に眼感染症網羅的PCR検査にて診断に至ったHSV-2壊死性ヘルペス性網膜症の1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 新しい眼科	6. 最初と最後の頁 1408~1411
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koiwa Chihiro, Nakatani Satoru, Inomata Takenori, Yamaguchi Masahiro, Iwamoto Satoshi, Murakami Akira.	4. 巻 13
2. 論文標題 Multiple excimer laser phototherapeutic keratectomies for Avellino corneal dystrophy: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 841 ~ 844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18240/ijo.2020.05.22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 野地 悠太、山口 昌大、中谷 智、舟木 俊成、松田 彰、村上 晶	4. 巻 74
2. 論文標題 特集 第73回日本臨床眼科学会講演集[6] 原著 20年以上経過観察できた膠様滴状角膜ジストロフィの6症例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 971～976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1410213642	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Yuichi, Inomata Takenori, Miyamoto Shizuka, Nakatani Satoru, Hiratsuka Yoshimune, Yamaguchi Masahiro, Iwamoto Satoshi, Murakami Akira	4. 巻 21
2. 論文標題 Donor characteristics and risk factors for methicillin resistant Staphylococcus aureus contamination in storage medium for corneal transplantation: A 10 year retrospective study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplant Infectious Disease	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tid.13123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 松崎 絵里子、春日 俊光、山口 昌大、松田 彰	4. 巻 73
2. 論文標題 特集 第72回日本臨床眼科学会講演集[2] 原著 線維柱帯切除術後にレーザー切糸による低眼圧を生じた症例の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 451～455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1410213105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 長谷川 瞳、舟木 俊成、山口 昌大、村上 晶	4. 巻 11(5)
2. 論文標題 オルソケラトロジーレンズ装用中に角膜感染症をきたした未成年患者の2例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 眼科臨床紀要	6. 最初と最後の頁 339-343
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 大野 瑞, 舟木 俊成, 山口 昌大, 岩本 怜, 春日 俊光, 村上 晶	4. 巻 122(4)
2. 論文標題 白内障術後に角膜穿孔を来した3症例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本眼科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 300-305
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagino K, Okumura Y, Yamaguchi M, Sung J, Nagao M, Fujio K, Akasaki Y, Huang T, Hirokawa K, Iwagami M, Midorikawa-Inomata A, Fujimoto K, Eguchi A, Okajima Y, Kakisu K, Tei Y, Yamaguchi T, Tomida D, Fukui M, Yagi-Yaguchi Y, Hori Y, Shimazaki J, Nojiri S, Morooka Y, Yee A, Miura M, Ohno M, Inomata T	4. 巻 12
2. 論文標題 Diagnostic Ability of a Smartphone App for Dry Eye Disease: Protocol for a Multicenter, Open-Label, Prospective, and Cross-sectional Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JMIR Research Protocols	6. 最初と最後の頁 e45218 ~ e45218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2196/45218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 山口昌大, 山口達夫, 石田誠夫, 糸井素純, 平塚義宗.	4. 巻 40
2. 論文標題 直像鏡と眼底カメラを用いた円錐角膜検出における網膜徹照法の有効性.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 101~105
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masahiro Yamaguchi
2. 発表標題 屈折矯正法コンビネーションの必要性 眼鏡×CL
3. 学会等名 24th IRSJ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Yamaguchi
2. 発表標題 review of visual optics and surgery
3. 学会等名 Kyoto Cornea Club (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口昌大、山口達夫、石田誠夫、平塚義宗
2. 発表標題 網膜徹照法による円錐角膜検出の有効性
3. 学会等名 角膜カンファランス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口昌大、金原左京、海老原伸行、松田彰、貞松良成、平塚義宗
2. 発表標題 コンタクトレンズがアレルギー性結膜炎の生体力学特性に与える影響
3. 学会等名 フォーサム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口昌大、山口達夫、石田誠夫、平塚義宗
2. 発表標題 網膜徹照法による円錐角膜検出の有効性
3. 学会等名 角膜カンファランス
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 山口昌大、海老原伸行、平塚義宗、貞松良成、村上晶
2. 発表標題 角膜移植術後長期経過の円錐角膜の生体力学特性とアトピー性皮膚炎の関連
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口昌大、平塚義宗、村上晶
2. 発表標題 Mixed ED0F老視用レンズの有効性
3. 学会等名 日本コンタクトレンズ学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1. 山口昌大、中谷智、舟木俊成、村上晶
2. 発表標題 感染性角膜潰瘍後の角膜混濁とフェムトセカンドレーザー表層角膜移植術
3. 学会等名 角膜カンファランス
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口昌大、糸井素純、舟木俊成、村上晶
2. 発表標題 角膜移植術後のHCL矯正視力における角膜形状の影響
3. 学会等名 角膜カンファランス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口昌大、糸井素純、舟木俊成、平塚 義宗、村上晶
2. 発表標題 円錐角膜における移植術式別のHCL矯正視力の比較
3. 学会等名 日本コンタクトレンズ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口昌大、糸井素純、村上晶
2. 発表標題 円錐角膜の突出部位とHCL近見視力の相関
3. 学会等名 眼工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野地悠太、山口昌大、中谷智、舟木俊成、松田彰、金井淳、村上晶
2. 発表標題 20年以上経過観察できた膠様滴状角膜変性の6症例
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口昌大、山口達夫、石田誠夫、平塚義宗
2. 発表標題 網膜徹照法による円錐角膜検出における角膜形状の影響
3. 学会等名 角膜カンファランス2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiro Yamaguchi、Sakyo Kanehara、Nobuyuki Ebihara、Akira Matsuda、Yoshinari Sadamatsu、Yoshimune Hiratsuka
2. 発表標題 Effect of soft contact lens on corneal biomechanical properties of allergic conjunctivitis
3. 学会等名 ARVO2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口昌大、岩本怜、平塚義宗、中尾新太郎
2. 発表標題 HCL不耐症に対してユーソフトを処方した5症例
3. 学会等名 フォーサム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口昌大、村上晶、高丹、岩本怜、中谷智、平塚義宗、中尾新太郎
2. 発表標題 TGFB1関連角膜変性の遺伝子発現型別の臨床成績
3. 学会等名 第77回日本臨床眼科学会
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
---------	---------