

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10003

研究課題名（和文）実験近視眼におけるラッカークラック発生過程と脈絡膜非血管性平滑筋細胞の関与

研究課題名（英文）Non-vascular smooth muscle cells on development of lacquer cracks in experimental myopia

研究代表者

平田 憲（Hirata, Akira）

久留米大学・医学部・客員教授

研究者番号：60295144

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヒヨコ眼の実験近視の構造を観察し、近視のメカニズムを明らかにすること、水晶体嚢の形態異常を解析することを目的とし、実験近視の免疫染色、SEMによる構造解析、白内障患者の水晶体嚢の構造を解析した。ヒヨコ眼の透明化処理により、脈絡膜組織の解析が可能となった。FIB/SEMを用いた解析では、脈絡膜毛細血管板やlacunaeの構造が明らかになったが、近視発生の原因となる構造変化は同定できなかった。水晶体嚢の解析では若年者の水晶体嚢は均一な構造であったが、高齢者群ではラメラ構造が多く観察され、ラメラ構造の出現は加齢に関連していた。これにより、白内障手術後の晩期合併症に関する新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間では、実験近視を用いた構造解析を試みた。手法として、眼球組織の透明化による脈絡膜全層の構造解析が可能となることが明らかとなった。この手法はこれまでメラニン色素に覆われ困難であった組織の解析法として有用である。

一方で、構造解析による明らかな近視発生のメカニズムは解析困難であった。特に近視発生早期の構造変化は脈絡膜の肥厚という特徴的な変化はあるものの、構造上の差異は乏しいということであり、おそらく、血流変化など生理的な変化が先行するものであると考えられた。

水晶体嚢の解析は加齢により、明らかに水晶体嚢の構造が加齢によって脆弱化することを明らかにした初の報告

研究成果の概要（英文）：With the aims of clarifying the mechanism of myopia by observing the structure of experimental myopia in chick eyes and analyzing the morphological abnormalities of the lens capsule, immunostaining of experimental myopia, structural analysis using SEM, and analysis of the lens capsule structure of cataract patients were conducted. Transparency treatment of chick eyes allowed analysis of the choroidal tissue, and FIB/SEM analysis revealed the structure of the choroidal choriocapillaris and lacunae, but did not identify structural changes responsible for the development of myopia. Analysis of the lens capsule showed that the lens capsule in the younger group had a uniform structure, whereas in the older group, more lamellar structures were observed, and the appearance of lamellar structures was related to aging. This provided new insight into late complications after cataract surgery.

研究分野：眼科学

キーワード：近視 FIB/SEM 水晶体嚢

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病的近視は、特に東アジアで成人の失明の主因となっているが、効果的な治療法はまだ存在しない。1977年にRaviolaとWieselが発見したサルの上眼窩延長モデル以来、近視の動物モデルは病態理解と治療法開発の重要なツールとなっている。ヒヨコの眼は、ヒトの眼と形状や構造が異なるが、高度な視機能を持ち、研究に有用である。特に、ヒトの黄斑に類似した高密度の光受容体を持つ中央部網膜領域があり、ニフトリゲノムの完全な配列が決定されているため、低コストで維持できる実験用ヒヨコは研究に適している。Lacquer cracks (LC)は、病的近視患者における黄斑領域の黄色調線状病変で、平均年齢32歳の若い患者に多く見られる。LCは、色素上皮-ブルッフ膜-脈絡膜毛細管板複合体の機械的破綻であると考えられているが、その成因はまだ不明である。申請者の過去の研究では、ヒヨコの実験近視において、脈絡膜毛細血管密度の減少や毛細血管内のfenestraeの減少を報告している。また、8週間以上の実験近視眼において、Bruch膜の断裂と思われる黄白色病変や網膜外層の萎縮、色素上皮の不連続性、脈絡膜毛細管板の消失が見られ、ヒトのLCと同様の変化が現れることを報告している。脈絡膜は網膜外層への栄養供給を主な機能とするが、膜に裏打ちされた間隙(lacunae)や非血管性平滑筋細胞(NVSMCs)など、特有の構造を持つ。これらの構造は脈絡膜の容積変化や脈絡膜厚の調節に関与していると考えられている。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、NVSMCsとlacunaeの3次元立体的構造を解明し、病的近視の発生メカニズムを明らかにすることである。集束イオンビーム/走査電子顕微鏡(FIB/SEM)を用いて、従来の観察法では困難だった脈絡膜の3次元構造を詳細に解析する。この方法により、病的近視による脈絡膜病変の理解を深め、新たな知見を得ることを目指している。

(2) FIB/SEMを用いて、水晶体嚢の形態異常の有無も解析する。水晶体嚢は水晶体全体を包む透明な膜であり、体内で最も厚い基底膜である。弾力性があり、引き裂かれにくい特性を持つ。電子顕微鏡で観察すると、基底膜は薄い層が重なった構造をしており、この構造は加齢とともに不明瞭になることが確認されている。研究により、水晶体カプセルの強度が加齢とともに低下することが明らかになっており、これが構造変化と関連している可能性がある。加齢により白内障手術時の後嚢破裂のリスクが増加し、さらに高齢者では真性剥離が多く見られる。従来の光学顕微鏡による研究には限界があり、透過型電子顕微鏡の使用も現実的ではない。本研究ではblock-face imaging法を用いて、術前に異常のない患者50眼の水晶体嚢の形態を解析し、真性剥離を有する患者との差異も検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒヨコ実験近視

ヒヨコ眼球壁の透明化と免疫染色

生後2週間後のヒヨコを4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定をおこなったのち、眼球を摘出し、赤道部で半切。10%過酸化水素水溶液に60度で120min浸漬し、脱メラニン処理を行った。PBSにて洗浄、Cubic L溶液(1:1)に2時間浸漬ののち、その後全量CubicL溶液に2時間浸漬した。PBSで洗浄(30minx4)後、BSA含有PBSに置換(30minx3)し、一次抗体(α-smooth muscle cell actin+prox-1)に浸漬した。PBSにて洗浄(30minx3)。CubicR溶液(1:1)に6時間浸漬し、さらにCubicR(全量)に浸漬し、スライドガラスに包埋し、観察した。

FIB/SEMによる網膜の観察

Half-Karnovsky溶液で灌流固定を行った眼球を摘出した後、固定液に浸漬して4℃で保存。2x1mmの大きさで、後極部網膜強膜片を採取した。PBSで洗浄後、四酸化オスミウムやフェロシアン化カリウムで後固定し、蒸留水で洗浄した後、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂で重合させた。エポキシ樹脂に埋め込まれた試料の観察面をマイクロトームで露出させ、FIB/SEM(Quanta3D FEG, 日本FEI)を用い、NVSMCsの三次元的微細構造解析を試みた。解析は倍率2,000倍および5,000倍、弱拡大では100nmごとの切削厚、強拡大では50nmの切削厚でおこなった。

Choriocapillarisのfenestration観察

Half-Karnovsky溶液で灌流固定を行った眼球を摘出した後、周囲の結合組織を除去した。眼球後半部を10%アガロース（タイプVII、Sigma Aldrich）に包埋し、ピプラトームを用いて、視神経に垂直に後側から50~100 μ mの断面を切り出した。組織のOsO₄に対する反応性を高めるため、切片をPBS中の1%タンニン酸に室温で一晩浸した。切片を水で2時間洗浄した後、2%OsO₄に浸漬し、4 \times で2時間後固定した。標本をエタノールで脱水し、100%t-ブタノールに浸漬して凍結し、真空下で蒸発させて凍結乾燥した。標本は、RPE側の毛細血管板面を上にしてアルミニウム台上にマウントした。薄いOsO₄層でコーティングした後、試料をSEMで15-20kVの加速電圧で観察した。

(2) 水晶体嚢の形態解析

2021年8月から12月にかけて、加齢性白内障と診断され、白内障手術を受けた患者50名を対象とした（80歳以上の高齢者群25名、65歳以下の若年者群25名）。糖尿病や高血圧などの全身疾患、眼感染症や緑内障などの眼疾患、眼外傷や手術歴は除外した。

前房内麻酔後に角膜切開を行い、前嚢鉗子を用いて前嚢切開を施行。

水晶体嚢は採取後、固定液に浸漬して4 \times で保存。PBSで洗浄後、四酸化オスミウムやフェロシアン化カリウムで後固定し、蒸留水で洗浄した後、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂で重合させた。Block-face imaging: エポキシ樹脂に埋め込まれた前嚢の最大断面径をマイクロトームで露出させ、SEM（走査型電子顕微鏡）イメージングを行った。画像は5-10 keVのランディングエネルギーで取得した。術前の水晶体核密度、軸長、最高矯正視力（BCVA）を測定し、解析した。水晶体嚢の厚さやラメラ構造の有無などを比較し、各群間の差異を統計的に検討した。統計解析には、t検定やMann-Whitney U検定、Fisherの正確検定などを使用した。

4. 研究成果

(1) ヒヨコ実験近視

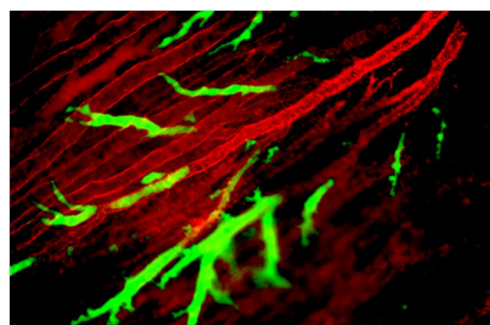
ヒヨコ眼球壁の透明化と免疫染色

脱メラニンにより、ヒヨコ眼球の透明化は可能であった（左：未処理、中：過酸化水素水処理



後、右：透明化処理後）。この手法は、これまで解析が困難であった脈絡膜組織の研究に大いに活用できる方法であると考えられた。

-smooth muscle cell actinは血管平滑筋のみならず脈絡膜間質に散在するNVSMCsを描出したが、圧倒的に血管平滑筋の分布を示した。PROX-1の局在はヒヨコ脈絡膜内層の毛細血管板の一部のみに見られ、リンパ管様構造は染色されなかった。おそらくNVSMCsの数は多くないことが想像される。PROX-1の局在がlacuna部分に見られなかったことは、lacuna構造がリンパ管とは異なる組織であることが示唆される。



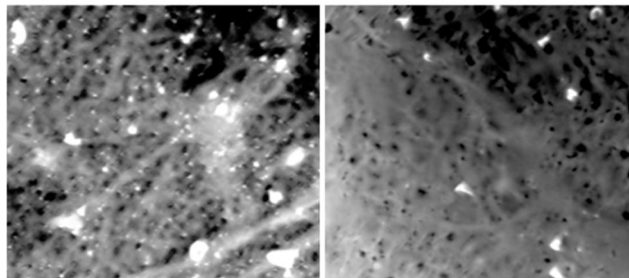
脈絡膜の免疫染色（赤：抗-smooth muscle cell actin、緑：PROX-1）

FIB/SEMによる網膜の観察

FIB/SEMを用い、脈絡膜毛細血管板、脈絡膜間質、lacunae、強膜-脈絡膜移行部の脈絡膜微細構造の解析を行った。対象眼および実験近視眼（近視誘導後2週間）の間に明らかな細胞の配列、細胞間接合に差異は見られなかった。Lacunaeはリンパ管特有のマーカーでは明瞭な染色は見られなかったが、SEMによる内腔の直接観察では、非常に薄い一層の内皮細胞による裏打ち構造は明らかであった。

Choriocapillarisのfenestration観察

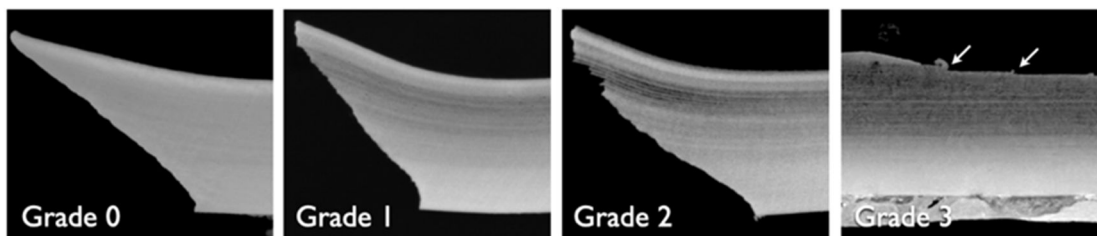
SEMを用いた脈絡膜毛細血管版におけるfenestraeの数においては、近視眼において毛細血管板の肥厚と部分的なfenestrationの減少が見られた（対照眼 46.2 ± 8.9 個/ μm^2 vs. 近視眼 30.2 ± 7.9 個/ μm^2 ）。しかしながら、その差は予測値より小さく、近視発生における主因とは考えにくいと思われた。



脈絡膜毛細血管板の SEM 像 (左:対照眼、右:実験近視)

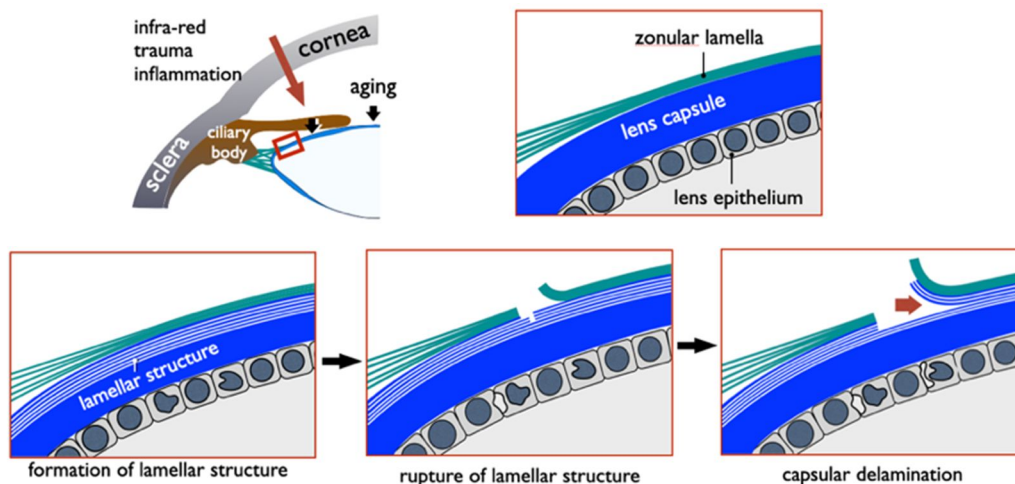
(2) FIB/SEM を用いた水晶体囊の解析

若年者群では、水晶体囊の厚さは $21.06 \pm 2.45 \mu\text{m}$ で、25眼中20眼で均一な構造が観察された。残りの5眼では、水晶体囊の外側に明部と暗部が混在する線状のラメラ構造が観察された。水晶体囊の縁であるCCC縁は、すべての症例で滑らかな境界であった。高齢者群では、水晶体囊の厚さは $21.89 \pm 2.83 \mu\text{m}$ で、両群間に有意差はなかった ($p=0.27$)。高齢者群の25眼中5眼では均一な構造が見られたが、残りの20眼では、最外膜の直下から内側にかけてラメラ構造が観察された。ラメラ構造は 20 ± 3.5 層からなり、各層の厚さは $264.16 \pm 50.10\text{nm}$ で、水晶体囊と平行に規則的に並び、間隔は $200\text{-}400\text{nm}$ であった。外層ほど広がっており（最大 530nm ）内側3分の1にはラメラ構造が存在しなかった。20眼中13眼では、ラメラ構造による位置ずれがCCC端に形成され、部分的な剥離も観察された。1眼では、明確なラメラ構造、CCC端でのラメラ構造のずれ、ラメラ構造に平行な被膜剥離が観察された。組織所見から水晶体囊の構造を以下の4つに分類し、解析した（Grade 0: 水晶体囊が均一で、層構造をもたない；Grade 1: 水晶体囊に層構造があり、CCC縁が滑らか；Grade 2: 水晶体囊に層構造があり、CCC縁が不規則；Grade 3: 水晶体囊に層構造があり、剥離がある）。



若年患者群の大部分はラメラ構造がないGrade 0またはラメラ構造のみのGrade 1に分類され、高齢患者群ではラメラ構造に加え前囊縁が不正な所見を示すGrade 2以上の割合が高くなっていった。名目ロジスティック回帰分析により、年齢層がラメラ構造の出現に有意に関連する因子として同定された ($p < 0.01$)。

本研究により、これまで着目されていなかった水晶体囊の加齢変化が明らかとなった。水晶体囊は白内障手術後も長期にわたり、安定性を要求される組織であるとともに、術後長期にわたって生じる晩期合併症に置いても重要な組織であり、さらなる研究が必要である。



水晶体囊の加齢による構造変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akira Hirata, Keiko Mine, Ken Hayashi	4. 巻 n/a
2. 論文標題 Contractility of temporal inverted internal limiting membrane flap after vitrectomy for macular hole	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 20035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99509-0.	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 Akira Hirata, Keiko Mine, Ken Hayashi	4. 巻 n/a
2. 論文標題 Age-related appearance of lamellar structures in lens capsule of cataractous eyes and its pathological significance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cataract Refract Surg	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/j.jcrs.0000000000000967.	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 Akira Hirata, Akiomi Takano, Takahiro Kawaji, Kei-Ichiro Nakamura	4. 巻 19
2. 論文標題 Macular pucker formation after macular hole surgery with inverted internal limiting membrane flap technique and silicone oil tamponade	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol Case Rep	6. 最初と最後の頁 100847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoc.2020.100847	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0件

〔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
---------	---------