

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20968

研究課題名（和文）黄斑円孔に対する幹細胞由来網膜組織移植後の電子顕微鏡によるシナプス解析

研究課題名（英文）Electron microscopic analysis of macular hole after stem cell-derived retinal organoid transplantation

研究代表者

秋葉 龍太郎（Akiba, Ryutaro）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70963049

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,600,000円

研究成果の概要（和文）：黄斑円孔は網膜中心部が障害され視力低下をきたす疾患であり、手術によって治療困難な症例が問題となっている。今回我々は神戸理化学研究所と共同研究で、ニホンザルの黄斑円孔モデルに対し、ヒトES細胞由来の網膜組織を移植し、移植後の網膜組織を電子顕微鏡で撮影した。撮影画像を解析したところ、黄斑円孔は閉鎖し、ホスト由来と思われる視細胞がロゼットを形成している像を取得することができた。これらのことから黄斑円孔への網膜組織移植が黄斑円孔の閉鎖に寄与し、網膜に生着することができることを示唆する結果を得ることができた。今後は得られた結果を含む論文を海外学術誌に投稿予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄斑円孔の動物モデルにおいて、ヒトES細胞由来の網膜組織が円孔閉鎖に有用であることが明らかになり、今後細胞治療が黄斑円孔の治療に有用な可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Macular hole represents a condition in which damage to the central part of the retina leads to a reduction in visual acuity, with cases that are difficult to treat surgically posing a significant challenge. In collaboration with Riken, we transplanted human embryonic stem cell-derived retinal organoid into the eye of a Japanese Macaque with macular hole and subsequently dissected and fixed the retina, then captured images of the transplanted retinal tissue using electron microscopy. Analysis of these images revealed closure of the macular holes and the formation of rosettes by what are presumed to be host-derived photoreceptors. These findings suggest that transplantation of retinal tissue contributes to the closure of macular holes and can successfully integrate with the host retina. We plan to include these results in a paper to be submitted to an international academic journal.

研究分野：再生医療

キーワード：黄斑円孔 視細胞移植 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む霊長類には眼球の網膜中心部に黄斑が存在し (図 1A 左)、Midget pathway という回路が高精度の視力を司っている。Midget pathway は光を受容する視細胞、介在ニューロンである双極細胞、そして中枢への出力を行う神経節細胞が 1:1:1 で接続する特殊な構造をとっており、光の onset で反応する ON pathway と光が消えた際に反応する OFF pathway が存在する (図 1B)。この黄斑に特発性または外傷などの原因で円孔を生じる疾患が「黄斑円孔」であり、発症すると重篤な視力低下を引き起こす (図 1A 右) (Gass et al., *Arch Ophthalmol*, 1988)。黄斑円孔は硝子体手術により治療可能だが、巨大円孔や強度近視の症例、発症から長期間経過した場合などは閉鎖が困難であり、重篤な視力障害が残存してしまう (Bikbova et al., *J Ophthalmol*, 2019)。近年は患者自身の周辺部網膜を採取して黄斑円孔に移植する自己網膜移植術も試みられている (Tanaka et al., *Retina*, 2020) が、患者の自己網膜を採取するため医原性網膜裂孔を生じてしまう問題がある。

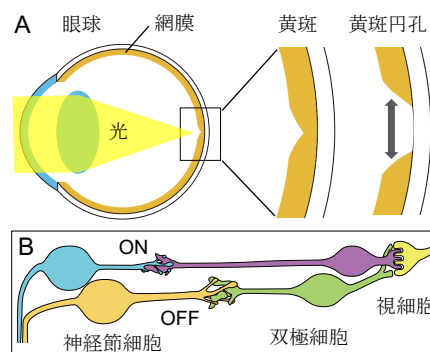


図 1.網膜中心にある黄斑部(A 左)には Midget pathway という特殊な回路が高精度の視力を司っており(B)、黄斑円孔が生じると重篤な視力低下を引き起こす(A 右)。

一方で、幹細胞から分化誘導した網膜組織を遺伝性網膜変性疾患に移植すると、移植組織がホスト網膜に生着・半年以上生存するだけでなく (Tu et al., *EBioMedicine*, 2019)、移植後にはシナプス形成を行うことを示す結果が報告されており (Akiba et al., *Front Cell Neurosci*, 2019, Matsuyama et al, *iScience*, 2021)、幹細胞由来網膜組織を移植することで、患者網膜を切除することなく難治性黄斑円孔の治療が行える可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、幹細胞由来網膜組織を黄斑円孔へ移植後に、黄斑円孔の閉鎖が得られるかを検討し、さらにホストの網膜とシナプス形成により網膜回路の修復を行うことが可能であることを明らかにすることである。

3. 研究の方法

共同研究先である神戸アイセンター研究所においてヒト ES 細胞から分化誘導した網膜組織を作成し、全身麻酔下の硝子体手術で ES 細胞由来網膜組織をニホンザルの黄斑円孔眼の黄斑円孔中心部に移植する。移植後 1 年の時点で、全身麻酔科で眼球摘出を行い、黄斑円孔部の網膜を切離、グルタルアルデヒドで固定し、University of Washington においてシリアルブロックフェイス走査型電子顕微鏡 (SBFSEM; Denk & Horstmann, *PLoS Biology*, 2004) を用いて撮影を行った。この顕微鏡は、サンプルブロックから薄切り切片を除去し撮影するというプロセスを自動で繰り返す事で、高精度なアラインメントを保ったまま連続切片を撮影でき、シナプスレベルの高解像度で神経組織の三次元再構築

が可能な最先端の電子顕微鏡である(図2)。SBFSEM 画像の解析では、神経細胞の三次元再構築を行うことで、移植後の網膜細胞の形態を明らかにすることができる。今回は $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ 程度のサイズの画像を XY 方向に 2×2 枚、そして Z 軸方向に 400 枚程度撮影し、千葉大学にて撮影画像のタイリングとアラインメントを行い、画像解析を行なった。

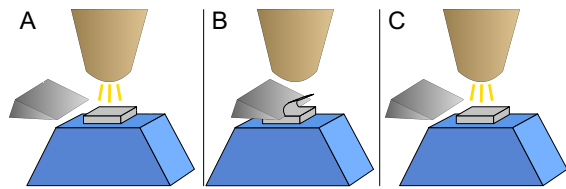


図2. SBFSEM は撮影(A)の後、薄切り切片を切除(B)、再度撮影(C)を繰り返すことで、ずれの少ない連続切片画像取得が可能である。

4. 研究成果

研究計画1年目の時点では、共同研究先である神戸アイセンター研究所においてヒト ES 細胞から分化誘導した網膜組織を作成した。さらに、全身麻酔下の硝子体手術で ES 細胞由来網膜組織をニホンザルの黄斑円孔眼の黄斑円孔中心部に移植することに成功した。そして移植後半年の時点まで、継続して網膜組織が生着し、黄斑円孔が閉鎖していることを光干渉断層計(OCT)を用いて非侵襲的に確認することに成功した(図3)。移植半年後に全身麻酔下で眼球摘出および網膜サンプルの固定を行った。移植後の網膜組織は University of Washington に送付し、電子顕微鏡撮影のためのオスミウム染色や脱水、レジンプロック包埋などの前処理を行った上、厚切り切片の光学顕微鏡像を用いて撮影部位を決定し、移植片とホスト網膜黄斑円孔境界部にしぼったサンプルのトリミングを行い、SBFSEM 画像撮影に成功した。計画2年目において撮影画像を解析したところ、ホスト-グラフト間でのシナプス形成は今回の画像からは確認できなかったが、グラフト由来と思われる視細胞がロゼットを形成している像を取得することができた(図4)。これらのことから黄斑円孔への網膜組織移植が黄斑円孔眼の網膜に生着することができることを示唆する結果を得ることができた。今後は得られた結果を含む論文を、海外学術誌に投稿予定である。

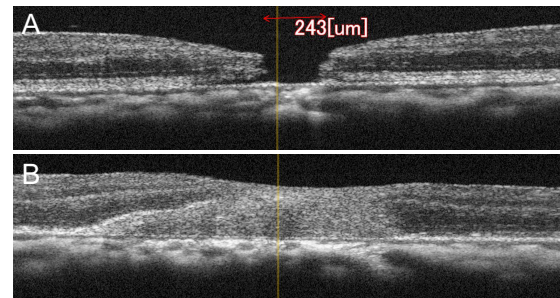


図3. 光干渉断層系画像：黄斑円孔モデル動物(A)に幹細胞由来網膜組織を移植後、黄斑円孔の閉鎖を得られた(B)

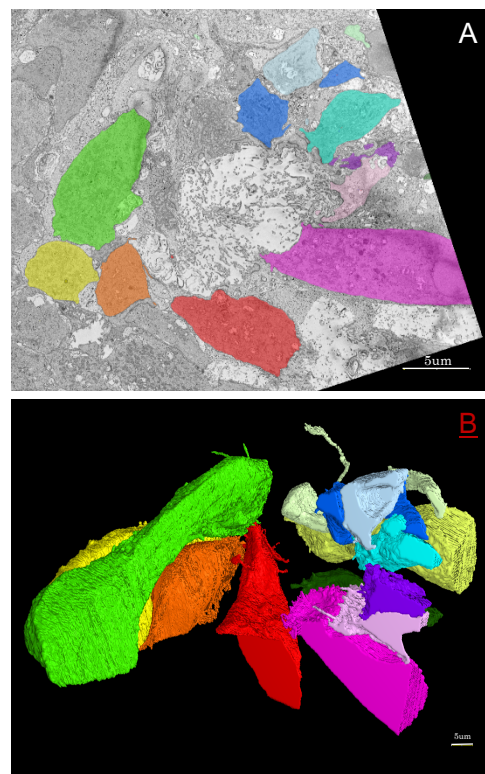


図4. シリアルブロックフェイス走査型電子顕微鏡：グラフト由来と思われる視細胞がロゼットを形成している像(A)と三次元再構築(B)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究協力者	万代 道子 (Mandai Michiko)	神戸アイセンター研究所・センター長	

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