

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670728

研究課題名(和文)印刷技術を応用した病的近視新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapies for myopia by printing technology

## 研究代表者

森田 育男(Morita, Ikuo)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60100129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、病的近視において眼球形状異常が視覚障害を起こすことを明らかにし、眼球変形自体を是正する治療法の確立を試みた。ラットを片眼遮蔽することによる眼軸長延長を伴う病的近視モデルを作成し、このラットを用いてヒト間葉系幹細胞移植による効果を調べた。その結果、移植された幹細胞がコラーゲンを産生するとともに、屈折度の近視化が有意に抑制され、眼軸長の延長も有意に抑制されていた。光学顕微鏡所見でも細胞を移植されたラットでは強膜の肥厚が観察された。以上から、ラットは病的近視の動物モデルとして有用であり、強膜後方への間葉系幹細胞の移植により局所でコラーゲンが産生され、病的近視を抑制できることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have established that the eye shape abnormalities is revealed in myopia, and in this project, we tried to establish a treatment to correct the eye deformation itself in pathological myopia. The rats were prepared pathological myopia model with axial lengthening due to one eye shield, and using this rats we examined whether the transplantation of human mesenchymal stem cells affected the several markers in myopia. As a result, the transplanted stem cells produced type I collagen. Moreover, in the cell-transplantation group refractivity was significantly suppressed, and the extension of the axial length was also significantly suppressed. Thickening of the sclera were observed in rats implanted with the cells by an optical microscope observation. From the above, the rats are useful as an animal model of a pathological myopia, and mesenchymal stem cells transplantation are possible therapy to suppress pathologic myopia.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医学 病的近視 間葉系幹細胞 近視モデル

## 1. 研究開始当初の背景

病的近視は我が国の主要な失明原因である。我々は、高解像度 3D MRI を用いて世界で始めてヒト眼球形状の三次元的解析に成功し、その結果、病的近視眼の眼球形状異常が 4 つの特徴的パターンに分けられ、特に耳側偏位型の眼では、視神経障害を高頻度に合併することを報告した。この結果は、病的近視において、特定の眼球形状異常が視覚障害を起こすことをダイレクトに示すものである。

このように眼球変形による黄斑部網膜や視神経の障害が病的近視の失明を生じる原因であることが明らかとなったが、これらの合併病変の多くは治療による改善が難しく、合併病変を生じる前に眼球変形自体を是正する治療が切望されていた。

強膜は主としてタイプ I コラーゲンから構成される組織で、眼球の最外壁を構成し、眼球変形の原因となる組織である。病的近視眼では強膜の菲薄化に伴い形状が変形することから、強膜組織を再生、肥厚することにより強膜の変形を是正する治療が期待される。

申請者らは、これまで印刷技術を利用した組織再生技術を開発し、血管再建、骨再生実験において良好な結果を得ている。血管再建方法は組織特異的な細胞を単離、培養したのち、前もって疎水・親水性を利用してパターン化した基板上に播種し、その後、脱細胞化したヒト羊膜上に転写し、血管網を構築し、この血管付き羊膜を体内に移植し、迅速な組織再生を図ってきた。

そこで上記のユニークな研究成果のもと、眼球変形が認められた眼球強膜へのコラーゲン産生細胞の移植により、変形の進展を予防し、失明を防ぐことができるのではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

病的近視の進行を止める医療として、申請者が開発した印刷技術を用いて、光リソグラ

フィー法で表面を親水化した基板上に自己の皮膚由来線維芽細胞、もしくは間葉系幹細胞を自己血清で培養し、高圧処理により脱細胞化した羊膜（非抗原性）への転写ののち、強膜への細胞移植の実施により病的近視による視覚障害を抑制する新規治療法を確立しようとするものである。

具体的には、マウスまたはラットの眼球前部を覆うゴーグルを用いることにより、眼軸延長を伴う実験近視モデルを作成し、これら病的眼球モデル動物に対して、線維芽細胞、もしくは間葉系幹細胞を光リソグラフィー法で親水化した基板上に播種したのち、羊膜に転写し、眼球強膜に張り付け、組織変化とともに、眼球変形への効果を調べる。

## 3. 研究の方法

マウスもしくはラットの眼球に半透明のゴーグルを装着して飼育し、視覚刺激遮蔽を行うことにより、病的近視モデルの作成を安定して確立する。その眼球長軸の進展を眼軸長角膜厚測定装置、眼球屈折度などで測定する。つぎに、マウスまたはヒトの線維芽細胞または、ヒト間葉系幹細胞を培養、増幅する。これらの細胞を 1) 実験近視動物モデルの強膜に沿って細胞懸濁液として注入する、2) 光リソグラフィー法で親水化した基板上に細胞を培養した後、羊膜上に転写し、細胞転写羊膜を強膜後方に移植する、を行う。

移植する細胞は事前にラベリングしておき、移植後経日的に細胞の生存率を確認する。また、移植した細胞が *in situ* でコラーゲンを産生し、強膜を肥厚させることができるか、免疫組織学的に調べる。

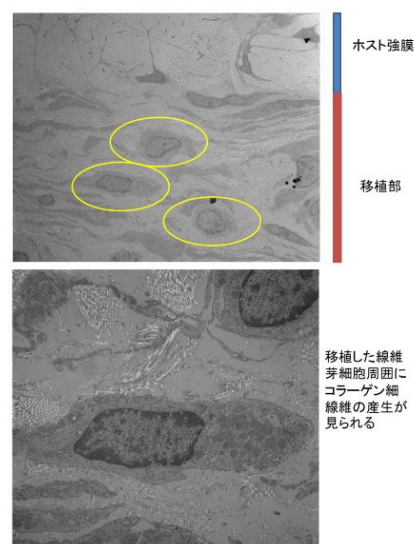
最後に、眼球長軸の長さを測定することにより移植による効果を判定するとともに、移植された強膜の組織学的検討を行うことにより、その安全性も確認する。

## 4. 研究成果

まず初年度には、C57 マウスを用いて、視覚刺激遮断による病的近視モデルを作成した。眼軸延長を伴う近視眼の作成に成功したが、マウス眼球は小さく、強膜組織周囲への細胞移植手技が困難であることが判明した。そこでつぎに主たる実験動物をラットのみに絞り、片眼遮蔽により眼軸長延長を伴う病的近視モデルの作成を試み、生後3週令のラットに片眼の瞼々縫合を行うことにより再現性をもって安定したモデルの作成に成功した。透過型電子顕微鏡を用いた観察により、視覚刺激遮断を行っていないコントロール眼と病的近視眼の強膜組織構造を比較検討したところ、特に強膜の外層において、病的近視眼における強膜コラーゲン細線維の狭小化が観察された。

つぎに、ラットに、免疫抑制剤を投与して飼育したのちに、ヒト間葉系幹細胞を眼球後部強膜に沿って移植を行った。移植1週間後では間葉系幹細胞が強膜外層に沿って生着している様子を確認し、またヒトコラーゲンに特異的な抗体を用いた免疫組織学染色により、移植された幹細胞が同部位でコラーゲンを産生している様子が観察できた。移植3週間後では、間葉系幹細胞は観察できなかったが、産生されたコラーゲン線維は認められた。間葉系幹細胞を移植されたラットの病的近視眼では、屈折度の近視化が有意に抑制されるとともに、眼軸長の延長も有意に抑制されていた。光学顕微鏡所見でも細胞を移植されたラットでは強膜の肥厚が観察された。以上から、ラットは病的近視の動物モデルとして有用であり、強膜後方への間葉系幹細胞の移植により局所でコラーゲンが産生され、病的近視を抑制できることが示された。

## 移植部位の電顕画像



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

1. Ikuno Y, Ohno-Matsui K, Wong TY, Korobelnik JF, Vitti R, Li T, Stemper B, Asmus F, Zeitz O, Ishibashi T; MYRROR Investigators. Intravitreal Aflibercept Injection in Patients with Myopic Choroidal Neovascularization: The MYRROR Study. *Ophthalmology*. in press, 査読あり
2. Ando Y, Inoue M, Ohno-Matsui K, Kusumi Y, Iida T, Hirakata A. Macular detachment associated with intrachoroidal cavitation in non-pathological myopic eyes. *RETINA*. in press, 査読あり
3. Soma R, Moriyama M, Ohno-Matsui K. Hemodynamics of focal choroidal excavations. *Int Ophthalmol*. 35(2):261-8, 2015, 査読あり
4. Ishida T, Moriyama M, Tanaka Y, Shinohara K, Shimada N, Yoshida T, Ohno-Matsui K. Radial tracts emanating from staphyloma edge in eyes with pathologic myopia. *Ophthalmology*. 122(1):215-216, 2015, 査読あり
5. Wong TY, Ohno-Matsui K, Leveziel N, Holz FG, Lai TY, Yu HG, Lanzetta P, Chen Y, Tufail A. Myopic choroidal neovascularisation:

- current concepts and update on clinical management. *Br J Ophthalmol.* 99(3):289-296, 2015、査読あり
6. Yoshihara N, Yamashita T, Ohno-Matsui K, Sakamoto T. Objective analyses of tessellated fundi and significant correlation between degree of tessellation and choroidal thickness in healthy eyes. *PLoS One.* 28;9(7):e103586, 2014、査読あり
  7. Ohno-Matsui K. Proposed classification of posterior staphylomas based on analyses of eye shape by three-dimensional magnetic resonance imaging and wide-field fundus imaging. *Ophthalmology.* 121(9):1798-1809, 2014、査読あり
  8. Kaneko Y, Moriyama M, Hirahara S, Ogura Y, Ohno-Matsui K. Areas of non-perfusion in peripheral retina of eyes with pathologic myopia detected by ultra-widefield fluorescein angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55(3):1432-1439, 2014、査読あり
  9. Wolf S, Balciuniene VJ, Laganovska G, Menchini U, Ohno-Matsui K, Sharma T, Wong TY, Silva R, Pilz S, Gekkieva M; RADIANCE Study Group. RADIANCE: a randomized controlled study of ranibizumab in patients with choroidal neovascularization secondary to pathologic myopia. *Ophthalmology.* 121(3):682-692, 2014、査読あり
  10. Shinohara K, Moriyama M, Shimada N, Tanaka Y, Ohno-Matsui K. Myopic stretch lines: linear lesions in fundus of eyes with pathologic myopia that differ from lacquer cracks. *RETINA.* 34(3):461-469, 2014、査読あり
  11. Yokoi T, Moriyama M, Hayashi K, Shimada N, Tomita M, Yamamoto N, Nishikawa T, Ohno-Matsui K. Predictive factors for comorbid psychiatric disorders and their impact on vision-related quality of life in patients with high myopia. *Int Ophthalmol.* 34(2):171-183, 2014、査読あり
- [学会発表](計25件)
1. Kyoko Ohno-Matsui. Imaging of the Highly Myopic Optic Nerve Head. 30th APAO(Asia-Pacific Academy of Ophthalmology). 2015.3.31. Guangzhou, China
  2. Kyoko Ohno-Matsui. Terminology and classification of pathologic myopia. WHO-BHVI joint Global Scientific Meeting on Myopia. 2015.3.16. Sydney, Australia
  3. Kosei Shinohara, Takeshi Yoshida, Tomoka Ishida, Liu Hongding, Ikuo Morita, Kyoko Ohno-Matsui. Form deprivation myopia in wistar rats. Asia - ARVO 2015、2015.02.16 横浜
  4. 大野京子. 画像診断による病的近視の新知見. 第529回総眼会. 2015.2.15、東京
  5. 大野京子. 病的近視における最新の知見. 第19回東海黄斑疾患研究会. 2015.2.12、名古屋
  6. 大野京子. 近視治療のトピックス. 第60回福井県眼科集談会. 2015.2.7、福井
  7. 大野京子. 画像診断により病的近視の謎を探る. 第2回京都黄斑疾患セミナー. 2015.1.23、京都
  8. 大野京子. 病的近視治療の進歩. 第72回埼玉眼科講習会. 2015.1.16、川越
  9. Kyoko Ohno-Matsui. Prognostic Factors for Visual Outcomes in Choroidal Neovascularisation Secondary to Pathological Myopia (Myopic CNV). AAO(American Academy of Ophthalmology) 2014. 2014.10.20. Chicago, USA
  10. Sonya Liang, Noriaki Shimada, Natsuko Nagaoka, Kosei Shinohara, Kyoko Ohno-Matsui. Analyses of dome-shaped macula in a large population of the patients with pathologic myopia. AAO(American Academy of Ophthalmology) 2014. 2014.10.19. Chicago, USA

11. Paolo Nucci, Francesco Pichi, Antonio P Ciardella, Kyoko Ohno-Matsui. Spectral Domain OCT Findings in Pediatric Tilted Disc Syndrome. AAO(American Academy of Ophthalmology) 2014. 2014.10.19. Chicago, USA
  12. 大野京子. 強度近視の視神経病変の可視化 - SS-OCT を用いて - 第5回近視緑内障研究会. 2014.9.21、大阪
  13. Tien Yin Wong, Paolo Lanzetta, Nikol Heinrichs, Stefan Pilz, Kyoko Ohno-Matsui. Ranibizumab in patients with visual impairment due to myopic choroidal neovascularization : A subgroup analysis of East Asian and Caucasian patients from the RADIANCE study. 14th EURETINA Congress. 2014.9.11. London, UK
  14. Kyoko Ohno-Matsui. Ranibizumab: compelling evidence and clear guidance in myopic CNV management. 14th EURETINA Congress. 2014.9.11. London, UK
  15. Kyoko Ohno-Matsui. Treatment of Myopic CNV. Taiwan mCNV Launch Symposium. 2014.7.20. Taipei, Taiwan
  16. Kyoko Ohno-Matsui. Posterior Staphyroma. International conference of pathologic myopia (iPM). 2014.7.19. Taipei, TAIWAN
  17. Lai T, Ohno-Matsui K, Tien WY, Lanzetta P, Stefan P, Nikol H. Comparison of visual acuity outcomes and ranibizumab treatment exposure in East-Asian and Caucasian patients with visual impairment due to myopic CNV: a RADIANCE study subgroup analysis. The Association for Research in Vision and Ophthalmology: ARVO 2014 Annual Meeting. 2014.5.5. Orlando, USA
  18. Kyoko Ohno-Matsui. Topography of High Myopia. World Ophthalmology Congress(WOC). 2014.4.5. Tokyo
  19. Nikolle Tan, Kyoko Ohno-Matsui, Claudia Leteneux, Jennifer Petrillo, Neil Bressler. Impact of Ranibizumab on Patient-Reported Visual Functioning in Myopic Choroidal Neovascularization by Ethnicity: Asian and Caucasian Patients in the RADIANCE Trial. World Ophthalmology Congress(WOC). 2014.4.5. Tokyo
  20. Kyoko Ohno-Matsui. Visual Acuity Outcomes and Ranibizumab Treatment Exposure in East-Asian and Caucasian Myopic CNV Patients: A Post Hoc Subgroup Analysis from the RADIANCE Study. World Ophthalmology Congress(WOC). 2014.4.4. Tokyo
  21. Kyoko Ohno-Matsui. Anatomy of the Posterior Segment of High Myopic Eyes. World Ophthalmology Congress(WOC). 2014.4.4. Tokyo
  22. Kyoko Ohno-Matsui. Latest perspectives in myopic CNV: reducing the burden of disease, restoring vision. World Ophthalmology Congress(WOC). 2014.4.3. Tokyo
  23. Kyoko Ohno-Matsui. Observation of Optic Nerve and Sclera by 1  $\mu$  Swept-Source OCT. World Ophthalmology Congress(WOC). 2014.4.3. Tokyo
  24. Kyoko Ohno-Matsui. Surgical Management of Myopic Tractional Macular Schisis. World Ophthalmology Congress(WOC). 2014.4.2. Tokyo
  25. Kyoko Ohno-Matsui. Imaging of the Highly Myopic Optic Nerve Head. World Ophthalmology Congress(WOC). 2014.4.2. Tokyo
- [ 図書 ] ( 計 2 件 )
1. Ohno-Matsui K, Moriyama M. Springer, Pathologic Myopia. 2014, 9
  2. Ohno-Matsui K. Springer, Pathologic Myopia. 2014, 8

〔産業財産権〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森田 育男 (MORITA, Ikuo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授

研究者番号： 6 0 1 0 0 1 2 9

### (2)研究分担者

大野 京子 (OHNO-MATSUI, Kyoko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授

研究者番号： 3 0 2 6 2 1 7 4