

〈原著論文〉

## iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植のための NaIO<sub>3</sub>誘因網膜色素上皮変性げっ歯類モデルの特性評価

石田 順子<sup>1)</sup>, 桐生 純一<sup>1)</sup>, 須田 泰司<sup>2)</sup>

1) 川崎医科大学眼科学 1, 〒701-0192 倉敷市松島577,

2) 同 中央研究センター バイオイメーシングユニット

**抄録** 網膜色素上皮 (RPE) は視細胞維持に重要な役割を担い、その機能低下は加齢黄斑変性等の原因となる。近年、健常な RPE を補充する RPE 移植が注目されており、臨床応用も開始された。前臨床研究における動物実験にあたり、過去にもげっ歯類のヨウ素酸ナトリウム (NaIO<sub>3</sub>) 誘因 RPE 変性モデルの研究はあるが、げっ歯類は黄斑部を欠くため最適でない。黄斑を有する非ヒト霊長類における薬剤全身投与は両眼の失明を招くため動物愛護の観点から不適切であり、現在適切なモデルが存在しない。従って、我々はサルを用いた移植実験を念頭に置き NaIO<sub>3</sub>の硝子体内投与によりラット片眼に RPE 変性を誘発可能か研究した。また、NaIO<sub>3</sub>誘因 RPE 変性モデルにヒト多能性幹細胞由来 RPE (hiPS-RPE) を網膜下移植し視細胞の保護効果を検討した。

8-10週齢のオスの Wistar ラットの片眼に0.005, 0.01, 0.02  $\mu\text{g/ml}$  の NaIO<sub>3</sub>を硝子体内投与した。経時的に HE 染色にて網膜外層厚と網膜内層厚を計測し、透過型電子顕微鏡で形態学的評価を行った。NaIO<sub>3</sub>投与後2日目に hiPS-RPE 懸濁液を網膜下に移植し、組織学的評価を行った。

0.005  $\mu\text{g/ml}$  投与群では網膜内層・外層厚ともに変化はなく、0.02  $\mu\text{g/ml}$  投与群では網膜全層が障害され、0.01  $\mu\text{g/ml}$  投与群では網膜外層のみが障害された。RPE の形態学的変化は NaIO<sub>3</sub>投与後3日目から出現し、以降網膜外層厚が急速に菲薄化した。いずれの投与群も非投与眼に影響はなかった。hiPS-RPE 移植眼では、網膜外層厚が厚い傾向にあった。

まとめると、NaIO<sub>3</sub>片眼硝子体内投与により、げっ歯類片眼 RPE 障害モデル作製に成功した。hiPS-RPE 網膜下移植により視細胞保護効果を得られた。本方法は RPE 移植の前臨床研究の動物モデルの基礎として有用である。

doi:10.11482/KMJ-J42(2)85 (平成28年7月29日受理)

キーワード：網膜色素上皮細胞, ヨウ素酸ナトリウム, 加齢黄斑変性, 移植, ヒト iPS由来RPE

### 緒 言

網膜色素上皮細胞 (RPE) は、網膜の最外層にあたり、ブルッフ膜を基底膜とする単層の上皮細胞である<sup>1)</sup>。RPE は、視細胞への栄養供給やバリア機能、視細胞の老廃物処理などの視細胞のメンテナンスに重要な役割を担うため、

RPE が障害されると二次的に視細胞が障害され視力低下を引き起こす<sup>2)</sup>。RPE が障害される代表的な疾患に加齢黄斑変性 (AMD) があり、高齢者の主要な失明原因の一つである<sup>3)</sup>。近年、障害された RPE に健常な RPE を補充する RPE 移植が注目されており、ヒト ES 細胞由来 RPE

別刷請求先

石田順子

〒701-0192 倉敷市松島577

川崎医科大学眼科学 1

電話：086 (462) 1111

ファックス：086 (464) 1565

E メール：junkochan@med.kawasaki-m.ac.jp

(hES-RPE)<sup>4)</sup>やヒト多能性幹細胞由来網膜色素上皮 (hiPS-RPE)<sup>5)</sup>は、臨床応用が始まっている<sup>6-8)</sup>。

RPE 移植の前臨床研究に必要な評価項目に、モデル動物を用いた移植効果の評価がある。現在、RPE の食能障害である RCS ラットがモデル動物としてよく用いられているが、AMD を治療対象とした場合、移植細胞に求められるものは完全な代替細胞であるので、RCS ラットは動物モデルとして最適とは言えない<sup>9)</sup>。

RPE を障害させる方法として、以前より薬剤のヨウ素酸ナトリウム (NaIO<sub>3</sub>) を用いた方法が報告されており<sup>10-13)</sup>、最近では Carido ら<sup>4)</sup>が、NaIO<sub>3</sub>全身投与により RPE を選択的に障害し、さらに障害した動物に ES 細胞由来 RPE を移植しその保護効果を確認している。一方、げっ歯類は霊長類の眼球と異なり黄斑部がないため、ヒトへの応用の前段階として移植効果や手術方法、移植後の評価を行う目的で、ヒトと同様の大きさの眼で黄斑部を持つサルなどの中型動物における RPE の移植実験が必要である。しかし、薬剤の全身投与は両眼の失明を引き起こすため、動物愛護の観点等から適切ではない。

そこで上記の点を解決するために、今回我々は NaIO<sub>3</sub>を片眼に硝子体内投与することで片眼だけの RPE 障害モデル動物作製が可能であるかを検討した。さらに、これまでヒト hiPS-RPE 移植による保護効果の報告がないため、ES-RPE と同様に移植効果が得られるか検討した。

## 方 法

8-10週齢のオスの Wistar ラットの片眼に 0.005, 0.01, 0.02 mg/ $\mu$ l の無菌の NaIO<sub>3</sub>溶液を 0.2  $\mu$ l 硝子体内投与し、コントロール群には PBS を 0.2  $\mu$ l 硝子体内投与した。

投与後、7, 14, 28日において評価した。

全ての実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No.12-049, 12-050, 15-021), 川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施された。

組織学的評価：麻酔下に眼球摘出し、superfix® (KURABO) で15~30分間固定した後、paraffin 包埋し、3  $\mu$ m 厚で薄切後、HE 染色を行った。

視神経の中心から、鼻側・耳側にそれぞれ 500, 1000, 2000  $\mu$ m にて、網膜外層 (外顆粒層) 厚、網膜内層厚 (外顆粒層の内側から神経節細胞層内側) を測定した。

免疫組織化学：クライオスタットにて、10  $\mu$ m 厚で薄切後、室温で1時間ブロッキングを行い、1次抗体を4℃ over night で反応させた。2次抗体を室温で60分反応させ、核は DAPI 染色を行った。観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus, Japan) を用いた。

網膜細胞死の評価：TUNEL 法を用いて、NaIO<sub>3</sub>投与後1, 3, 7日で評価した。クライオスタットにて、10  $\mu$ m 厚で薄切後、4%パラホルムアルデヒドで15分室温にて固定し、Permeabilisation Buffer を氷上で5分間反応させ、TdT enzyme を室温で90分反応させた。核は DAPI 染色を行った。観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus, Japan) を用いた。

透過型電子顕微鏡 (TEM) : 0.1% のフوسفェイトバッファーで4℃にて洗浄し、1% 4酸化オスミウムフوسفェイトバッファーで4℃にて1時間後固定、再度洗浄し、エタノール溶液で段階的に脱水した後、プロピレンオキサイドで置換を行った。エポキシ樹脂を用いて包埋し、超薄切切片作成後、トルイジンブルーで電子染色し、観察した (JEM-1400, JEOL, Japan)。

移植：移植の2日前から実験終了まで、ラットにはシクロスポリンを経口投与し免疫抑制を行った。0.01 mg/ $\mu$ l の NaIO<sub>3</sub>投与後2日に hiPS-RPE 懸濁液を網膜下に移植した。ケタミンとキシラジンの混合液での麻酔下にミドリン P® で散瞳させ、マイクロシリッジにて網膜下に2  $\mu$ l を2カ所投与した。投与後7, 14, 28日で組織学的評価を行った。

## 結 果

NaIO<sub>3</sub>硝子体投与による RPE への影響は、網膜外層厚と網膜内層厚の変化で評価した。

HE 染色では、投与後28日において、0.005  $\mu\text{g/ml}$  では網膜外層厚、内層厚ともに変化はなかった (図 1)。0.01  $\mu\text{g/ml}$  では、網膜外層厚のみ減少した。0.02  $\mu\text{g/ml}$  では、網膜外

層厚、内層厚ともに減少した。コントロール群ではいずれも変化はなかった。組織標本において、変性の初期変化として、後極部から始まる網膜剥離と網膜外層の波打ちが認められた。

濃度としては、0.01  $\mu\text{g/ml}$  が適当であったため、0.01  $\mu\text{g/ml}$  の経時変化をグラフに示した (図 2)。0.01  $\mu\text{g/ml}$  では、投与後7日目以降に網

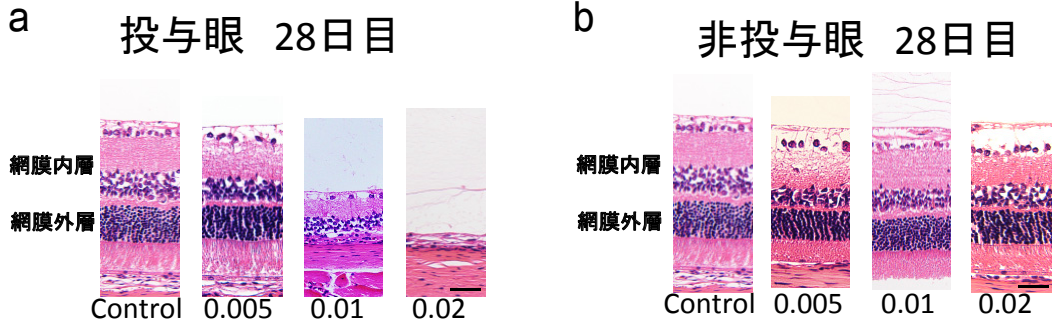


図 1 NaIO<sub>3</sub>硝子体投与後28日での組織変化

a) 投与眼. 0.005  $\mu\text{l/ml}$  投与群では、網膜外層、網膜内層ともに変化はなく、0.01  $\mu\text{l/ml}$  投与群では、網膜外層が障害されたが、網膜内層は保たれており、0.02  $\mu\text{g/ml}$  投与群では網膜全層がほぼ障害された。

b) 非投与眼. いずれの投与群にも変化はなかった. bar: 50  $\mu\text{m}$

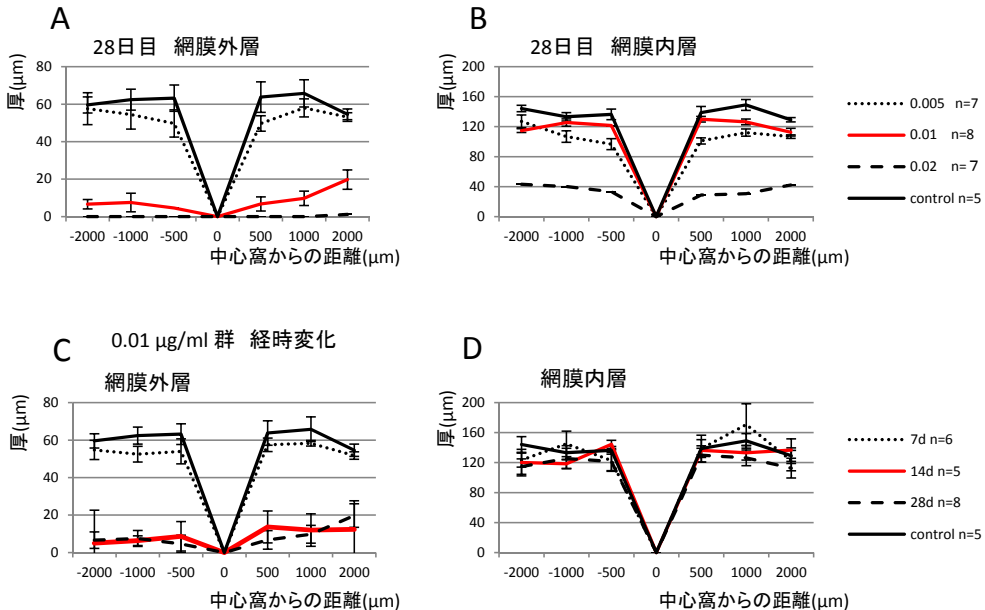


図 2 NaIO<sub>3</sub>硝子体投与後28日における各投与群での網膜外層厚、網膜内層厚の比較。

A) 0.005  $\mu\text{l/ml}$  投与群では、網膜外層の変化はなく、0.01  $\mu\text{l/ml}$ , 0.02  $\mu\text{g/ml}$  投与群では、網膜外層が障害された。

B) 0.005  $\mu\text{l/ml}$ , 0.01  $\mu\text{l/ml}$  投与群では、網膜内層の変化はなく、0.02  $\mu\text{g/ml}$  投与群では網膜内層が著明に障害された。

C) 0.01  $\mu\text{g/ml}$  群における網膜外層厚の経時変化. 投与後7日目までは外層厚は保たれているが、14日目以降急激に障害されている。

D) 網膜内層厚の変化は28日目まで認めなかった。

膜外層厚が急激に減少したが内層厚に変化はなかった。

免疫組織化学では、0.01  $\mu\text{g/ml}$  投与後の Ret-P1 の経時変化を示した (図3)。投与7日目以降に Ret-P1 の染色性が落ち、DAPI 染色では網膜外層の核の減少を認めた。非投与眼では、Ret-P1、DAPI いずれも変化はなかった。

TUNEL 染色では、3日目で TUNEL 陽性細胞がみられ、特に後極部の網膜剥離部分で多く

見られた。

TEM では、投与後1日目に大きな変化は認めず、微絨毛が視細胞外節を取り巻いているのが観察された。3日目から網膜剥離を認め、7日目からは核の変性を認めた。14日目では、核の平坦化を認め、基底膜は萎縮し、不明瞭になった。28日目には、RPE 細胞数の著明な減少とブルッフ膜の露出を認め、残存した核では著明な萎縮がみられ、基底膜の確認も困難であった (図4)。

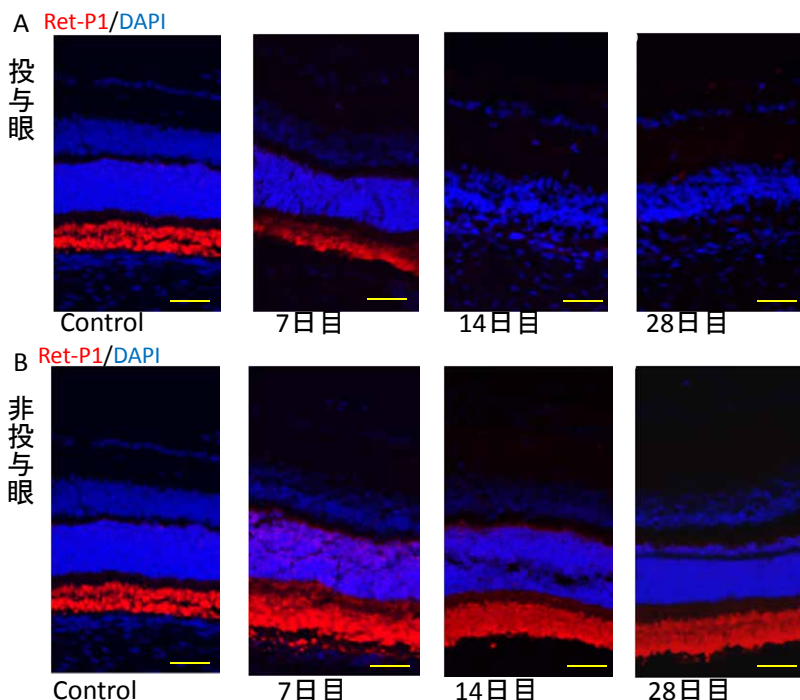


図3 免疫組織化学。0.01  $\mu\text{g/ml}$  投与後の抗ロドプシン抗体 (Ret-P1: 赤) の経時変化。

A) 14日目以降 Ret-P1陽性細胞はほとんど見られなくなり、網膜外層の核 (DAPI: 青) もほぼ障害されている。

B) 非投与眼では Ret-P1、DAPI 共に control 群と大きな差は認めない。bar: 50  $\mu\text{m}$

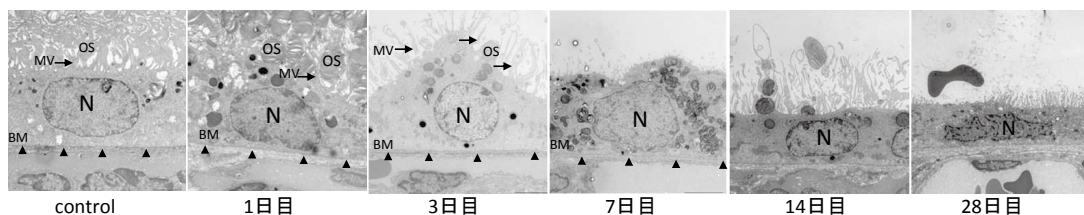


図4 0.01  $\text{mg}/\mu\text{l}$  投与後の透過型電子顕微鏡画像 (TEM) における経時変化。

1日目には目立った変化を認めず、微絨毛 (矢印) は視細胞外節を取り巻いている。3日目から網膜剥離を認め、7日目には核の変形を認めたが、基底膜 (矢頭) は、14日目では核が平坦化し、基底膜が不明瞭となった。28日目には核の萎縮がみられた。

略語: N, nucleus; BM, basal membrane; OS, outer segments; MV, Microvillus. bar: 5  $\mu\text{m}$

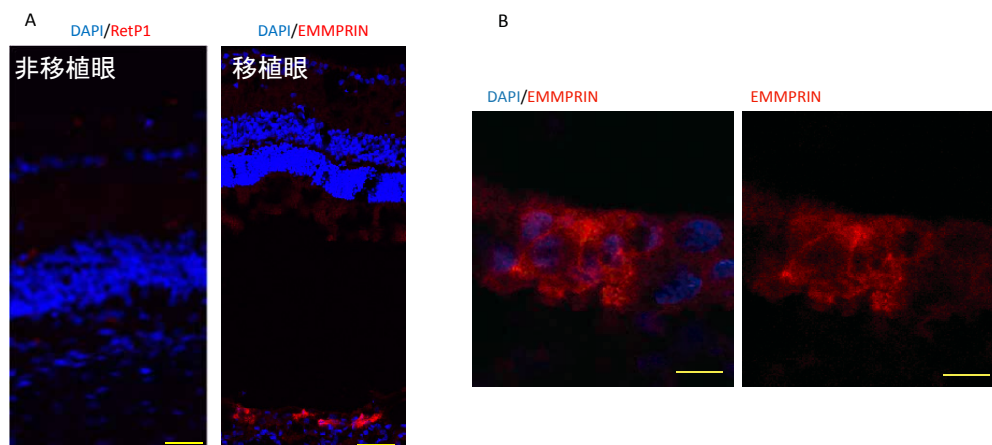


図5 移植後26日の免疫組織化学.

A) 移植眼では, EMMPRIN/CD147陽性細胞が生着しているのが確認でき, 非移植眼と比較し ONL が保たれている. bar: 50  $\mu$ m

B) 移植部位の強拡大. EMMPRIN/CD147陽性細胞が確認できる. bar: 10  $\mu$ m

### hiPS-RPE 移植の効果

ドナー細胞は EMMPRIN/CD147で標識した. 網膜下に単層の細胞として生着しているのが観察された(図5). 網膜外層厚については, 全体的に保たれており, hiPS-RPE 移植部と, 非移植部で有意な差は認めなかったが, 非移植眼と比較すると明らかに保たれていた. 移植部は標本作製時, 網膜剥離を生じやすい傾向にあった.

### 考 察

現在の AMD に対する主流な治療方法である抗 VEGF 薬硝子体内注射は, 有効な治療成績を挙げている<sup>8, 14, 15)</sup>が, 無効例の存在や複数回の治療が必要などの問題点がある. このため代替治療として, 機能低下を起こした RPE に健常な RPE の補充を目的とした RPE 移植<sup>16)</sup>が注目されており, 既に臨床応用も行われている<sup>6)</sup>. また, RPE 移植は RPE tear といった現在治療方法がない疾患に対する治療方法としても期待されている<sup>17)</sup>. 一方で, RPE 移植の前臨床研究として用いられている動物モデル RCS ラット<sup>18)</sup>は, RPE の機能低下や欠損による疾患を十分に再現できていないことや黄斑部がないという解剖学的な違いがあるため, 評価に際し理想

的ではない<sup>4, 9)</sup>. 一方で, 黄斑部を有するサルなどの動物を用いた移植実験は理想的だが, サルの網膜変性モデル動物はなく, 網膜変性を作製する場合動物愛護の観点から片眼の障害モデルが望ましい. そこで, 今回我々はサルを用いた移植実験を念頭に置き, ラットの片眼に RPE を選択的に障害する NaIO3を硝子体内投与することで, 片眼の網膜変性モデル動物を作製できるかを検討した. さらに, NaIO3硝子体内投与後に hiPS-RPE を網膜下移植し, 移植効果を検討した.

網膜の機能として網膜外層は RPE と脈絡膜によってメンテナンスをされるため, RPE の機能障害は網膜外層の障害を引き起こす<sup>1, 19)</sup>. 従って, NaIO3を片眼の硝子体内に投与することで網膜内層を障害せず, 網膜外層を障害し, また非投与眼への影響は認めない濃度を調べた. その結果, 0.01  $\mu$ g/ml の NaIO3硝子体内投与が緩徐な網膜外層の菲薄化を引き起こし, また網膜内層や非投与眼は変化を認めなかった. これまで NaIO3を用いた RPE 障害モデルは全身投与の報告しかなく, 硝子体側からの局所投与で同様の結果が得られるかが不明であったが, 今回の研究で硝子体内投与が全身投与と同様の網膜変性を引き起こす結果が得られたこと

は、今後のサルなどの中型動物モデルへ移行する上でとても重要な基礎となりうる。しかも、局所投与は全身投与と比較し薬剤濃度が血流や代謝の影響を受けにくいと、結果のばらつきが少ないことも重要なメリットである。NaIO3硝子体内投与後の形態と機能の経時的変化をみると、投与後3日で後極部からTUNEL陽性細胞が出現し、後極部を中心とした網膜剥離が出現した。この原因として、RPEの機能障害による経上皮輸送の障害やRPEの微絨毛の障害によるRPEと視細胞の接着不良が原因として考えられた<sup>20)</sup>。14日目以降TEMにおけるRPEの形態学的変化やONLの菲薄化が急激に進行した。これらの結果から、機能障害が形態変化に先行して生じていることが示されており、これらは過去の研究とも矛盾しない<sup>4)</sup>。

hiPS-RPE懸濁液の網膜下移植は、薬剤で障害されたRPEの代替細胞として行われるため、移植効果は視細胞が保護されたかどうかで評価される。このため移植時期は、視細胞が障害される前、つまりTUNEL陽性細胞が出現し始める薬剤投与後3日目までに行う必要がある。一方で、NaIO3硝子体内投与における硝子体内の半減期の報告がないためNaIO3投与後早期の移植による移植細胞への影響は不明であるが、残存するNaIO3による移植細胞の障害の可能性も考慮しなければならない。以上のことから、我々は薬剤投与後2日に移植を行った。組織学的評価では移植細胞がブルッフ膜に生着し、単層構造を形成しており、移植部位における視細胞の保護効果を認めた。これらの結果は、我々が作製したNaIO3誘因網膜変性動物モデルはAMDやRPE tearを治療対象としたRPE移植のモデルとして有用であることを示唆している。

AMDに対するhiPS-RPE移植は、視細胞の保護が目的であるので、視機能が良い時期に移植することが理想である。視機能が良い患者への移植は、RPE移植に伴う合併症や手術侵襲による視機能低下を防ぐために十分な検討が必要である。このため、今回我々が作製した片眼網膜変性モデルがRPE移植の前臨床研究とし

て貢献することを望む。一方で、NaIO3硝子体内投与を用いたRPE移植評価のデメリットは、眼内手術が2回必要となることである。つまり麻酔や点眼、NaIO3硝子体内投与により、RPE移植の妨げとなる白内障発症の危険性があることや、硝子体注射による合併症である感染や出血、外傷性白内障、網膜剥離といった危険性がある<sup>21)</sup>。ただし今回の研究では、処置前後の抗菌剤点眼、熟練した術者が施術を行うことで、これらの合併症は認めていない。

## 結 語

今回我々はNaIO3片眼硝子体内投与により、片眼のNaIO3誘導網膜変性モデルラットの作製に成功した。また、NaIO3投与後ヒトhiPS-RPE懸濁液移植により、視細胞の保護効果を認めた。以上より、本方法はAMDやRPE tearを対象としたRPE移植の前臨床研究の動物モデルの基礎として有用である。

## 謝 辞

実験の進行に際し、御助言を賜りました川崎医科大学 眼科学教室 鎌尾浩行先生、実験を行う上での技術的な補助をいただいた中央研究センター バイオイメージングユニットの須田泰司元主任技術員、松田宣昭技術員に心より御礼申し上げます。なお、本研究は川崎医大プロジェクト研究費（24挑-7）の援助により行われた。

利益相反：開示すべき事項なし。

## 引用文献

- 1) Strauss O: The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85: 845-881, 2005
- 2) Margalit E, Sadda SR: Retinal and optic nerve diseases. *Artif Organs* 27: 963-974, 2003
- 3) Jager RD, Mieler WF, Miller JW: Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 358: 2606-2617, 2008
- 4) Carido M, Zhu Y, Postel K, *et al.*: Characterization of a mouse model with complete RPE loss and its use for RPE cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55: 5431-5444, 2014
- 5) Krohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, *et al.*: Generation of retinal pigment epithelial cells from small



- molecules and OCT4-reprogrammed human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 1: 96-109, 2012
- 6) Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan C K, Ostrick R M, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R: Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379: 713-720, 2012
  - 7) Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H, *et al.*: In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1020-1025, 2004
  - 8) <http://www.riken-ibri.jp/AMD/index.html> (2016.5.30).
  - 9) Zeiss CJ: Animals as models of age-related macular degeneration: an imperfect measure of the truth. *Vet Pathol* 47: 396-413, 2010
  - 10) Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Moriguchi K, Tsubura A: Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice. *Curr Eye Res* 25: 373-379, 2002
  - 11) Marmorstein AD, Marmorstein LY: The challenge of modeling macular degeneration in mice. *Trends Genet* 23: 225-231, 2007
  - 12) Enzmann V, Row BW, Yamauchi Y, Kheirandish L, Gozal D, Kaplan H J, McCall M A: Behavioral and anatomical abnormalities in a sodium iodate-induced model of retinal pigment epithelium degeneration. *Exp Eye Res* 82: 441-448, 2006
  - 13) Franco LM, Zulliger R, Wolf-Schnurrbusch UE, Katagiri Y, Kaplan H J, Wolf S, Enzmann V: Decreased visual function after patchy loss of retinal pigment epithelium induced by low-dose sodium iodate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 4004-4010, 2009
  - 14) Vedula SS, Krzystolik MG: Antiangiogenic therapy with anti-vascular endothelial growth factor modalities for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* CD005139, 2008
  - 15) Ip MS, Scott IU, Brown GC, Brown M M, Ho A C, Huang S S, Recchia F M: Anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy for age-related macular degeneration: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 115: 1837-1846, 2008
  - 16) Thomas BB, Aramant RB, Sadda SR, Seiler MJ: Retinal transplantation. A treatment strategy for retinal degenerative diseases. *Adv Exp Med Biol* 572:367-376, 2006
  - 17) Clemens CR, Eter N: Retinal Pigment Epithelium Tears: Risk Factors, Mechanism and Therapeutic Monitoring. *Ophthalmologica* 235: 1-9, 2016
  - 18) D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes M T, Abderrahim H, LaVail M M, Vollrath D: Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* 9: 645-651, 2000
  - 19) Korte GE, Reppucci V, Henkind P: RPE destruction causes choriocapillary atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1135-1145, 1984
  - 20) Kita M, Marmor MF: Effects on retinal adhesive force in vivo of metabolically active agents in the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 1883-1887, 1992
  - 21) <http://www.aao.org/eyenet/article/how-to-give-intravitreal-injections> (2016.9.26)

〈Regular Article〉

## Characterization of a NaIO<sub>3</sub>-induced retinal pigment epithelium degeneration rodent model for iPSC-RPE cell transplantation

Junko ISHIDA<sup>1)</sup>, Junichi KIRYU<sup>1)</sup>, Yasushi SUDA<sup>2)</sup>

1) Department of Ophthalmology 1, 2) Bio imaging unit, Kawasaki medical school,  
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

**ABSTRACT** The retinal pigment epithelium (RPE) plays an important role in maintaining photoreceptors, and RPE dysfunction causes eye diseases such as age-related macular degeneration (AMD). RPE transplantation has garnered much attention in recent years as a way to replenish healthy RPE, and clinical applications for RPE transplantation in patients with AMD have been reported. Preclinical studies use animal models to examine treatment efficacy, however, whether conventional methods with animal models are suitable for examining RPE transplantation is controversial. Systemic administration of sodium iodate (NaIO<sub>3</sub>) has been shown to induce RPE degeneration in rodent models, recapitulating morphological atrophy in corresponding areas. However, as rodents lack a macular region, these studies cannot precisely evaluate the effects of systemic administration. The induction of blindness in both eyes in non-human primates bearing a macular region is also inappropriate in terms of animal ethics. With this in mind, we investigated whether intravitreal injection of NaIO<sub>3</sub> can selectively induce a single-eye impairment in an RPE animal model. Additionally, we investigated whether subretinal transplantation of human induced pluripotent stem cells-derived RPE (hiPS-RPE) can protect against NaIO<sub>3</sub>-induced RPE degeneration.

The intravitreal injection of NaIO<sub>3</sub> was performed in 8-10 week-old male Wistar rats with rats being grouped by dose (0.005, 0.01, and 0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). We measured outer nuclear layer (ONL) thickness and inner nuclear layer (INL) thickness at 8 retinal points by hematoxylin-eosin staining and evaluated RPE morphology by transmission electron microscopy sequentially (3, 7, 14, and 28 days after injection). In addition, hiPSC-RPE cell suspension was injected into the subretinal space 2 days after NaIO<sub>3</sub> administration and histological evaluation was performed sequentially (7, 14, and 28 days after NaIO<sub>3</sub> injection).

The results showed no significant changes in INL and ONL thicknesses in the 0.005  $\mu\text{g}/\text{ml}$  group. Retinal thicknesses in the 0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  group had almost completely degenerated. In the 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  group, ONL thickness had almost completely degenerated, but, in contrast INL thickness was preserved as well as 0.005  $\mu\text{g}/\text{ml}$  injection group. RPE morphological changes and TUNEL-positive cells appeared at 3 days after NaIO<sub>3</sub> injection, followed by rapid thinning of ONL thickness. None of the retinal thickness of contralateral eye in all groups showed any changes. Additionally, ONL thicknesses in the transplanted eyes were significantly greater than those in the nontransplanted and sham-surgery groups.

(Accepted on July 29, 2016)



**Key words : Retinal pigment epithelium, Sodium iodate, Age-related macular degeneration, Transplantation, HiPSC-derived RPE**

---

Corresponding author

Junko Ishida

Department of Ophthalmology 1, Kawasaki medical  
school, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 464 1565

E-mail : junkochan@med.kawasaki-m.ac.jp

