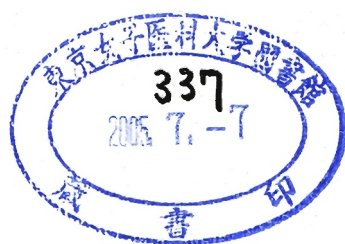


温度応答性培養皿を応用した
培養角膜上皮・実質層の作製
(課題番号14571688)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書



平成17年3月

研究代表者 篠崎和美

(東京女子医科大学医学部眼科 助手)



はしがき

近年、東京女子医科大学・医用工学研究施設が、温度に応じ水との親和性を大きく変化させる温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を培養皿表面に共有結合的に固定化することにより温度応答性培養皿の開発に成功した。温度応答性培養皿で培養され、回収した細胞シートは、タンパク化学的、形態学的検討から細胞上面の微絨毛の発達やタイトジャンクションの構築など、正常組織に匹敵する分化形態を維持したまま回収できることが明らかにされている。細胞の機能が維持されたまま移植が可能となると考えられる角膜上皮の細胞シート、角膜実質層を温度応答性培養皿を用いて作製することができた場合、培養条件が確立すれば、少量の自己細胞から培養した角膜上皮・実質層の作製も可能になると考えられる。

角膜は5層からなるが、いずれの層の障害による混濁においても、角膜移植を行い視機能の回復を得ることができるが、一症例に対し、一眼球の提供が必要である。わが国の提供角膜の絶対的な不足により、患者は長期間、疼痛と重篤な視力低下に悩まされることになる。さらに、機会に恵まれ移植したドナー角膜が、拒絶反応により機能不全に陥ることも少なくはない。

少量の自己細胞から角膜上皮・実質層の作製ができれば、細胞の供給の問題も少なく、移植を施行した際の拒絶反応の問題も解決できる。角膜移植に至る症例の中には、角膜内皮障害を伴わない症例も少なくない。また、創傷治癒過程で、組織の補充をすることで角膜移植に至らないですむ症例もあると考える。したがって、培養角膜上皮・実質層の移植が可能となると、ドナー角膜の不足、の問題を克服でき

多くの患者に福音をもたらすことができると考えられる。

そこで今回、温度応答性培養皿を用い、東京女子医科大学・医用工学研究施設が開発した温度応答性培養皿を用い、角膜上皮細胞、実質細胞による角膜上皮・実質層の作製を試みることにした。

研究組織・研究経費

研究組織

研究代表者: 篠崎和美(東京女子医科大学・医学部・助手)

研究分担者: 堀 貞夫(東京女子医科大学・医学部・教授)

研究分担者: 高村悦子(東京女子医科大学・医学部・助教授)

研究分担者: 大和雅之(東京女子医科大学・医学部・助教授)

研究経費

平成14年度	1,400(千円)
平成15年度	1,300(千円)
合計	2,700(千円)

研究発表

(1) 学会誌

篠崎和美、高村悦子、村田真由美、堀 貞夫、大和雅之、岡野光夫、角膜実質細胞をフィーダーとした応答性培養皿による角膜上皮細胞シート作製、日本眼科学会雑誌、109巻、2005年

(2) 口頭発表

篠崎和美、高村悦子、村田真由美、堀 貞夫、大和雅之、岡野光夫、角膜実質細胞をフィーダーとした応答性培養皿による角膜上皮細胞シート作製、第109回日本眼科学会総会、2005年3月24日

研究成果

研究の背景および目的

角膜は5層からなるが、いずれの層の障害による混濁においても、角膜移植を行い視機能の回復を得ることができるが、一症例に対し、一眼球の提供が必要である。わが国の提供角膜の絶対的な不足により、患者は長期間、疼痛と重篤な視力低下に悩まされることになる。さらに、機会に恵まれ移植したドナー角膜が、拒絶反応により機能不全に陥ることも少なくはない。

ヒト角膜上皮において、羊膜を用いて培養した角膜上皮の移植が行われているが、十分な透明性が得られなかったり、羊膜という生体材料を利用しているために大量の供給が困難である。また、薬剤耐性試験用として5層の構築をもったゲル状の人工角膜が開発されたが、移植には用いることができない。

近年、東京女子医科大学・医用工学研究施設が、温度に応じ水との親和性を大きく変化させる温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を培養皿表面に共有結合的に固定化することにより温度応答性培養皿の開発に成功した。温度応答性培養皿で培養され、回収した細胞シートは、タンパク化学的、形態学的検討から細胞上面の微絨毛の発達やタイトジャンクションの構築など、正常組織に匹敵する分化形態を維持したまま回収できることが明らかにされている。

細胞の機能が維持されたまま移植が可能となると考えられる角膜上皮の細胞シート、角膜実質層を温度応答性培養皿を用いて作製することができた場合、培養条件が確立すれば、少量の自己細胞から培養した角膜上皮・実質層の作製も可能になると考えられる。少量の自己細胞から角膜上皮・実質層の作製ができれば、細胞の供給の

問題も少なく、移植を施行した際の拒絶反応の問題も解決できる。角膜移植に至る症例の中には、角膜内皮障害を伴わない症例も少なくない。また、創傷治癒過程で、組織の補充をすることで角膜移植に至らないですむ症例もあると考える。したがって、培養角膜上皮・実質層の移植が可能となると、ドナー角膜の不足、の問題を克服でき多くの患者に福音をもたらすことができると考えられる。

そこで今回、温度応答性培養皿を用い、東京女子医科大学・医用工学研究施設が開発した温度応答性培養皿を用い、角膜上皮細胞、実質細胞による角膜上皮・実質層の作製を試みた。

方法

I. 細胞培養

A. 角膜上皮細胞

1. 白色家兎

局所麻酔・全身麻酔を白色家兎に施行。手術用顕微鏡下で、 $1.5 \times 3\text{mm}$ の角膜上皮を角膜輪部から採取。一眼から4片を採取した。直径 3.5mm の培養皿で explant 法で、初代培養を約1週間施行した。その後、継代培養を1-2回施行し、回収した細胞を角膜上皮細胞層の作製に使用した。

使用した培養液は、DMEM (High) :Ham's F12 (1:1)+ AB (streptomycin, penicillin G) に、Insuline $5 \mu\text{g/ml}$ 、EGF $10 \mu\text{g/ml}$ 、cholera toxin $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、Gentamicin $40 \mu\text{g/ml}$ 、hydrocortidone $0.4 \mu\text{g/ml}$ 、DMSO 0.5%を添加したものを使用した。さらに、FBSも添加しているが、初代培養1-2日は、15%で添加、初代培養3日後、継代培養では5%で添加した。ただし、同種の血清により、角膜上皮細胞層作成時には、使用する角膜上培養時も同種の血清を用いた。

2. ヒト

アメリカアイバンクから提供された輸入角膜から採取した。顕微鏡下、1.5×3mmの角膜上皮片を数箇所から採取。直径3.5mmの培養皿で explant 法で、初代培養を約1週間施行した。その後、継代培養を1-2回施行し、回収した細胞を角膜上皮細胞層の作製に使用した。使用した培養液は、白色家兎と同様のものを使用した。ただし、同種の血清により、角膜上皮細胞層作成時には、使用する角膜上培養時も同種の血清を用いた。

B. 角膜実質細胞

1. 白色家兎

致死後、手術顕微鏡下で角膜上皮層を除去した強角膜切片を採取した。その後、顕微鏡下で、デスメ膜・角膜内皮細胞を除去。得られた角膜実質組織を細かく分け、explant 法で初代培養を行い、1ヶ月以上、継代培養したものを回収した。使用した培養液は、DMEM (High) + AB で、FBS 10% で添加した。ただし、同種の血清により、角膜実質層作成時には、使用する角膜上培養時も同種の血清を用いた。

2. ヒト

アメリカアイバンクから提供された輸入角膜から、顕微鏡下で、角膜上皮層、デスメ膜、角膜内皮を除去した後、細かく分け、explant 法で初代培養を行った。1ヶ月以上、継代培養したものを回収し、実質層作製に用いた。使用した培養液は、DMEM (High) + AB で、FBS 10% で添加した。ただし、同種の血清により、角膜実質層作成時には、使用する角膜上培養時も同種の血清を用いた。

II. 細胞層作製

A. 角膜上皮細胞層作製(図1)

1. 3T3細胞を feeder とした角膜上皮細胞層作製
 - 1) FBS を添加した培養液による培養

温度応答性培養皿に、3T3細胞をマイトマイシン処理後、フィーダー細胞として播種し、1-2日後、角膜上皮細胞をさらに播種し、共培養を1~2週間行いました。20度のインキュベータで、低温処理を行い、培養角膜上皮細胞層の回収を行った。培養皿は、東京女子医科大学先端生命研究所が開発したものを使用した。また、培養液は、3T3細胞を播種する段階では、実質細胞の培養に用いたものと同様の培養液を用いた。次いで、角膜上皮細胞播種後からは、角膜上皮細胞培養時と同様の培養液を使用した。白色家兎、ヒト角膜細胞について、それぞれ施行した。

2) 同種の血清を添加した培養液による培養

使用した培養液に添加する血清を同種のものにした以外は、1)と同様の手技で行った。白色家兎、ヒトの角膜細胞についてそれぞれ試みた。

3) 培養液への成長因子の最適量の検討

EGF、TGF- β 、b-FGF、Insuline、hydrocortidone について、添加量を変化させた。

2. 角膜実質細胞層を feeder とした角膜上皮細胞層の作製

1) FBS を添加した培養液による培養

温度応答性培養皿に、角膜実質細胞をマイトマイシン処理後、フィーダー細胞として播種し、1-2日後、角膜上皮細胞をさらに播種し、共培養を1~2週間行いました。20度のインキュベータで、低温処理を行い、培養角膜上皮細胞層の回収を行った。培養皿は、東京女子医科大学先端生命研究所が開発したものを使用した。また、培養液は、角膜実質細胞を播種する段階では、実質細胞の培養に用いたものと同様の培養液を用いた。次いで、角膜上皮細胞播種後からは、角膜上皮細胞培養時と同様の培養液を使用した。白色家兎、ヒト角膜細胞について、それぞれ施行した。

2) 同種の血清を添加した培養液による培養

使用した培養液に添加する血清を同種のものにした以外は、1)と同様の手技で行

った。白色家兎、ヒトの角膜細胞についてそれぞれ試みた。

3) 培養液への成長因子の最適量の検討

EGF、TGF- β 、b-FGF、Insuline、hydrocortidone について、添加量を変化させた。

B. 角膜実質層の作製

1. FBS を添加した培養液による角膜実質細胞層の作製

温度応答性培養皿に、角膜実質細胞を播種し、1~2 週間培養を行い、20 度のインキュベータで、低温処理を行い、培養角膜実質層の回収を行った。また、培養液は、角膜実質細胞の培養に用いたものと同様の培養液を用いた。

白色家兎、ヒト角膜細胞について、それぞれ施行した。

2. 同種の血清を添加した培養液による角膜実質細胞層の作製

使用した培養液に添加する血清を同種のものにした以外は、1)と同様の手技で行った。

3. 培養液への成長因子の最適量の検討

EGF、TGF- β 、b-FGF、Insuline、hydrocortidone について、添加量を変化させた。

4. 角膜実質細胞配列への磁場の影響

温度応答性培養皿に、角膜実質細胞を播種し、1~2 週間培養を行う際に、電気コイルを用いて磁場の発生起こした中で施行。

5. 角膜実質細胞配列への電位の影響

温度応答性培養皿に、角膜実質細胞を播種し、1~2 週間培養を行う際に、電流を流した中で施行。

6. 角膜実質細胞配列へのpH の影響

温度応答性培養皿に、角膜実質細胞を播種し、1~2 週間培養を行う際に、培養液のpHを調整した。

Ⅲ. 作製した角膜上皮細胞層の組織学的評価

A. 角膜上皮細胞層の評価

1. 光学顕微鏡的観察

1) HE 染色

4%パラホルムアルデヒドで固定し、脱水処理後、パラフィン包埋を行い、5 μ m に薄切。HE 染色施行。

2) サイトケラチン3/12 の発現

ケラチン 3/12 マウスモノクローナル抗体を一次抗体とし、ウサギ抗マウス IgG Alexa Fluor 594/Red を二次抗体、核染色にヘキスト 33258 を用い、免疫染色を施行。

2. 電子顕微鏡的観察

1) 透過型電子顕微鏡 (TEM)

2%グルタルで固定後、1%オスミニウム固定をし、脱水の後、樹脂(Quetol 812)に包埋。0.5 μ m の厚切りを施し、1%トルイジンブルーで染色し観察後、100nm に薄切、電子染色 (Reynolds 法) を行い、H-7000 (HITACHI) で観察。

2) 環境制御型電子顕微鏡 (ESEM)

固定は不要。培養液を吸引除去後観察。

3. 角膜上皮細胞層の寿命の評価

1) テロメラーゼ活性測定

B. 角膜実質層の評価

1. 光学顕微鏡的観察

1) HE 染色

4%パラホルムアルデヒドで固定し、脱水処理後、パラフィン包埋を行い、5 μ m に薄切。HE 染色施行。

2. 電子顕微鏡的観察

1) 透過型電子顕微鏡(TEM)

2%グルタルアルで固定後、1%オスミニウム固定をし、脱水の後、樹脂(Quetol 812)に包埋。0.5 μ mの厚切りを施し、1%トルイジンブルーで染色し観察後、100nm に薄切、電子染色(Reynolds 法)を行い、H-7000(HITACHI)で観察。

2) 環境制御型電子顕微鏡(ESEM)

IV. 角膜上皮・実質層の接着

1) 作製した角膜上皮層と実質層の接着

温度応答性培養皿に、角膜実質細胞を播種し、1~2週間培養を行った後、角膜上皮層の作製と同様の方法で作製した角膜上皮細胞層を重ねた。膜の安定状態を確認し、20度のインキュベータで、低温処理を行い回収。

培養液は、角膜実質細胞の培養に用いたものと同様の培養液を用いた。

2) 実質層上に角膜上皮の培養

温度応答性培養皿に、角膜実質細胞を播種し、1~2週間培養を行った後、角膜上皮細胞を播種した。さらに、1~2週間培養を行った後、20度のインキュベータで、低温処理を行い回収。培養液は、上皮細胞を播種するまでは、角膜実質細胞の培養に用いたものと同様の培養液を用い、上皮細胞播種後は、上皮細胞培養に用いた培養液を用いた。

V. 移植

A. 角膜上皮細胞層

白色家兎について行った。白色家兎の角膜上皮を擦過し、その部位に、作製した角膜上皮層を接着させ、移植を行った。術後、抗菌薬点眼を行い、経過観察をした。

B. 角膜実質層

白色家兎について行った。白色家兎の角膜上皮を剥離し、実質浅層を除去し、その部位に作製した角膜実質層を接着させ、移植を行った。術後、抗菌薬点眼を行い、経

過観察をした。

結果

I. 細胞培養

A. 角膜上皮細胞

1. 白色家兎

細胞培養時に使用する FBS でも、同種の血清でも可能であった。発育は、従来の FBS の方が良好であった。

2. ヒト

白色家兎同様、可能であった。白色家兎の方が、増殖能が良かった。

B. 角膜実質細胞

1. 白色家兎

細胞培養時に使用する FBS でも、同種の血清でも可能であった。

2. ヒト

白色家兎同様、可能であった。

II. 細胞層作製

A. 角膜上皮細胞層作製(図2)

1. 3T3細胞を feeder とした角膜上皮細胞層作製

1) FBS を添加した培養液による培養

シート状で培養角膜上皮細胞層の回収ができた。白色家兎、ヒトから採取した細胞のいずれでも回収可能であった。

2) 同種の血清を添加した培養液による培養

シート状で培養角膜上皮細胞層の回収ができた。白色家兎、ヒトから採取した細胞のいずれでも回収可能であった。

3) 培養液への成長因子の最適量の検討

EGF、TGF- β 、b-FGF、Insuline、hydrocortidone の添加量について、回収される細胞シートについて、今回の検討の範囲では、明らかな差はなかった。

2. 角膜実質細胞層を feeder とした角膜上皮細胞層の作製

1) FBS を添加した培養液による培養

シート状で培養角膜上皮細胞層の回収ができた。白色家兎、ヒトから採取した細胞のいずれでも回収可能であった。

2) 同種の血清を添加した培養液による培養

シート状で培養角膜上皮細胞層の回収ができた。白色家兎、ヒトから採取した細胞のいずれでも回収可能であった。

3) 培養液への成長因子の最適量の検討

EGF、TGF- β 、b-FGF、Insuline、hydrocortidone の添加量による違いは明らかではなかった。

B. 角膜実質層の作製(図3)

1. FBS を添加した培養液による角膜実質細胞層の作製

温度応答性培養皿にて、培養角膜実質層の回収が可能であった。白色家兎、ヒトのいずれの角膜実質細胞についても回収できた。

2. 同種の血清を添加した培養液による角膜実質細胞層の作製

1. と同様に、培養角膜実質層の回収が可能であった。白色家兎、ヒトのいずれの角膜実質細胞についても回収できた。

3. 培養液への成長因子の最適量の検討

EGF、TGF- β 、b-FGF、Insuline、hydrocortidone について、添加量を変化させた。

4. 角膜実質細胞配列への磁場の影響

電気コイルを用いて磁場の発生起こした中で施行を試みましたが、周囲の培養皿への影響が懸念され、試みは中断となった。

5. 角膜実質細胞配列への電位の影響

周囲の他の培養皿への影響が懸念されるということで、試みは途中で中断となった。

6. 角膜実質細胞配列へのpHの影響

細胞培養が可能な範囲のpHの差では、差の違いを明らかにするほどの違いがつけられなかった。

Ⅲ. 作製した角膜上皮細胞層の組織学的評価

A. 角膜上皮細胞層の評価

1. 光学顕微鏡的観察

1) HE染色(図4)

いずれの方法においても、得られた角膜上皮細胞層は、重層化しており、細胞の形態は、表面では扁平上皮細胞様の形態をとり、中間層では翼状細胞様の形態を示し、基底部では、基底細胞にみられるような円柱上皮細胞様の形態を示しており、生体の角膜上皮細胞層に類似した細胞層が形成されていることが観察された(図4)。

2) サイトケラチン3/12の発現(図5)

ケラチン3/12の陽性所見を認めた。

2. 電子顕微鏡的観察

1) 透過型電子顕微鏡(TEM)(図6)

表層では、角膜上皮組織の再表層で観察されるmicrovilliが観察され、表層は扁平な細胞、中間層では翼状細胞の様な多角形の細胞を認めました。基底細胞層では、円柱形を呈していた。細胞間隙はほとんどなく、tight-junctionの形成やデスモン

ームも認められ、細胞間は良好な接着を示していた。

2) 環境制御型電子顕微鏡(ESEM)

観察するために、通常電子顕微鏡で行う固定や脱水の処理を必要とせず観察が可能であるが、細胞層の表面に水層が残存していると正確な細胞層の表面の観察は困難であった。

3. 角膜上皮細胞層の寿命の評価

テロメアーゼ活性測定を試みたが、結果に再現性がなかった。

B. 角膜実質層の評価

1. 光学顕微鏡的観察(図7)

HE染色では、角膜実質細胞が重層化している状態が観察された。生体の角膜実質で観察されるような膠原繊維の配列などは認めなかった。

2. 電子顕微鏡的観察

1) 透過型電子顕微鏡(TEM)(図8)

細胞間隙はほとんどなく、デスモソームも認められ、細胞間は良好な接着を示していた。

2) 環境制御型電子顕微鏡(ESEM)

角膜上皮層と同様に、観察時に細胞層の表面に水層が残存するため、正確な細胞層の表面の観察は困難であった。

IV. 角膜上皮・実質層の接着

1) 作製した角膜上皮層と実質層の接着

接着は可能と思われたが、それぞれがシート状で重ねて安定させるには、培養皿上では、安定性がなかった。シートの収縮などがあり、手技的に難しかった。

2) 実質層上に角膜上皮の培養

実質細胞層上に、角膜上皮細胞がシート状に細胞層を形成しているか、再現性の

の確実性に問題があった。

V. 移植

A. 角膜上皮細胞層

白色家兎の角膜上皮を擦過し、その部位への、作製した角膜上皮層の接着は良好であった。

B. 角膜実質層

作製した角膜実質層への接着は良好であったが、透明性などでは、長期に経過観察した結果で有用性の評価が必要と感じた。

考案

臨床応用を考慮した、自己または同種(ヒト)の細胞、血清による細胞培養、角膜上皮細胞層や角膜実質細胞層の作製は可能と考えられた。

今後の研究の展開に関する計画

臨床応用を考え、角膜上皮細胞層、角膜実質層の作製の手技の再現性、確実性の向上をめだす。また、従来の角膜移植に代わる治療方法への応用を考えるとともに、角膜移植に至らないよう予防的に組織を補充する目的の移植、QOL向上のため短期間での修復目的での移植などへの応用もできると推定されたので、今後、検討していく予定である。

角膜上皮細胞層作製

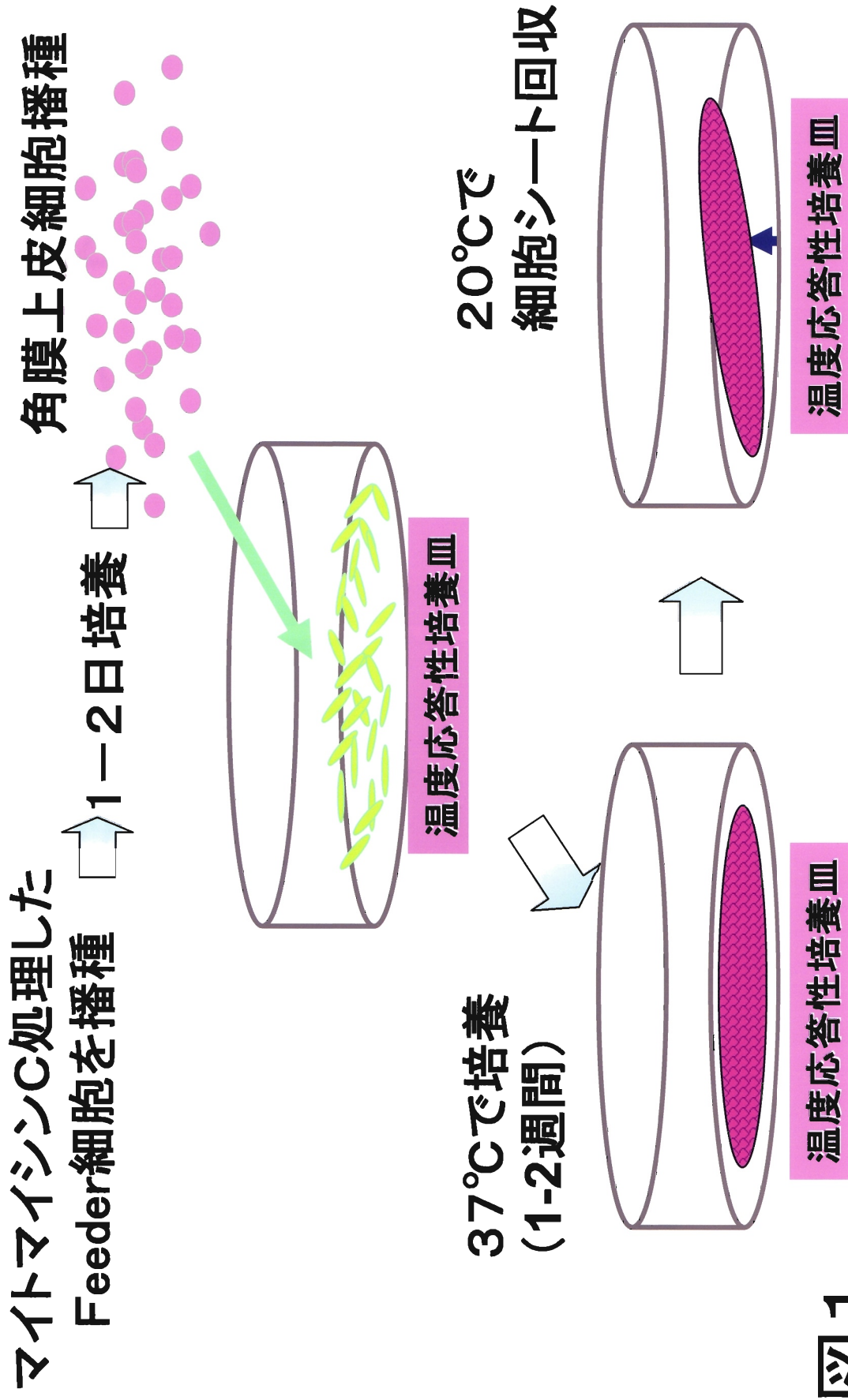


図1

回収された角膜上皮細胞シート

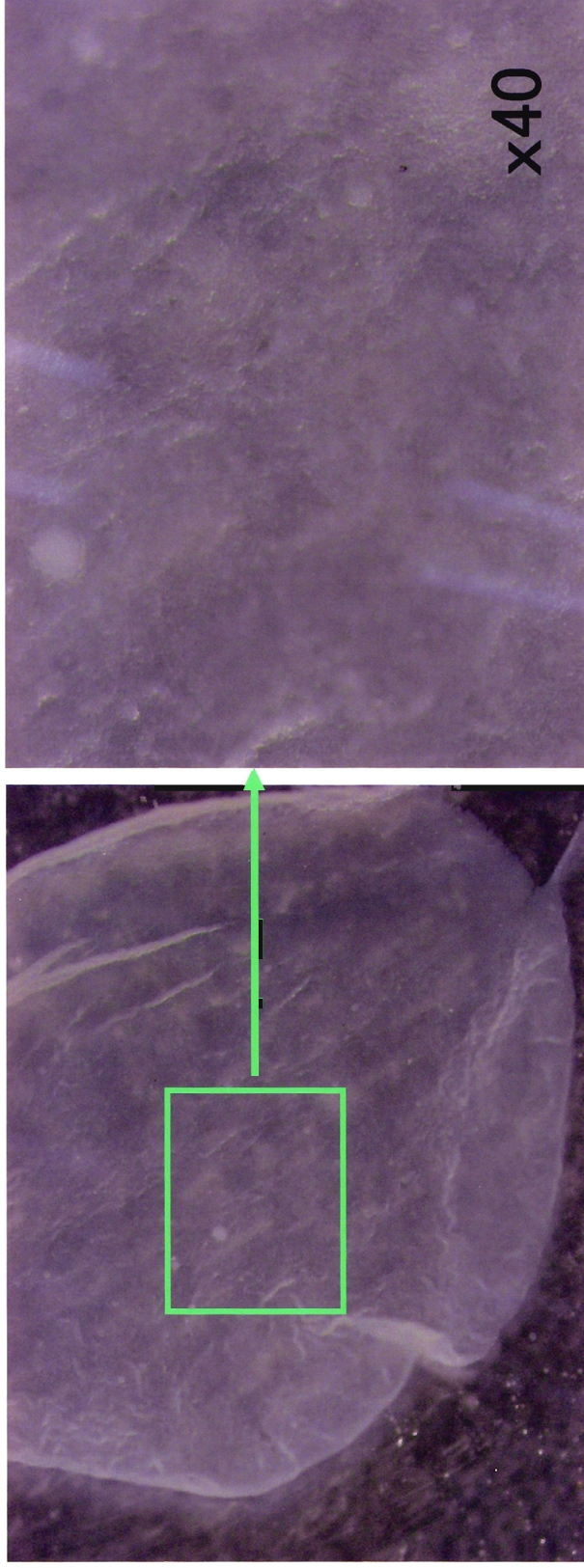


図2

回収された角膜実質細胞シート

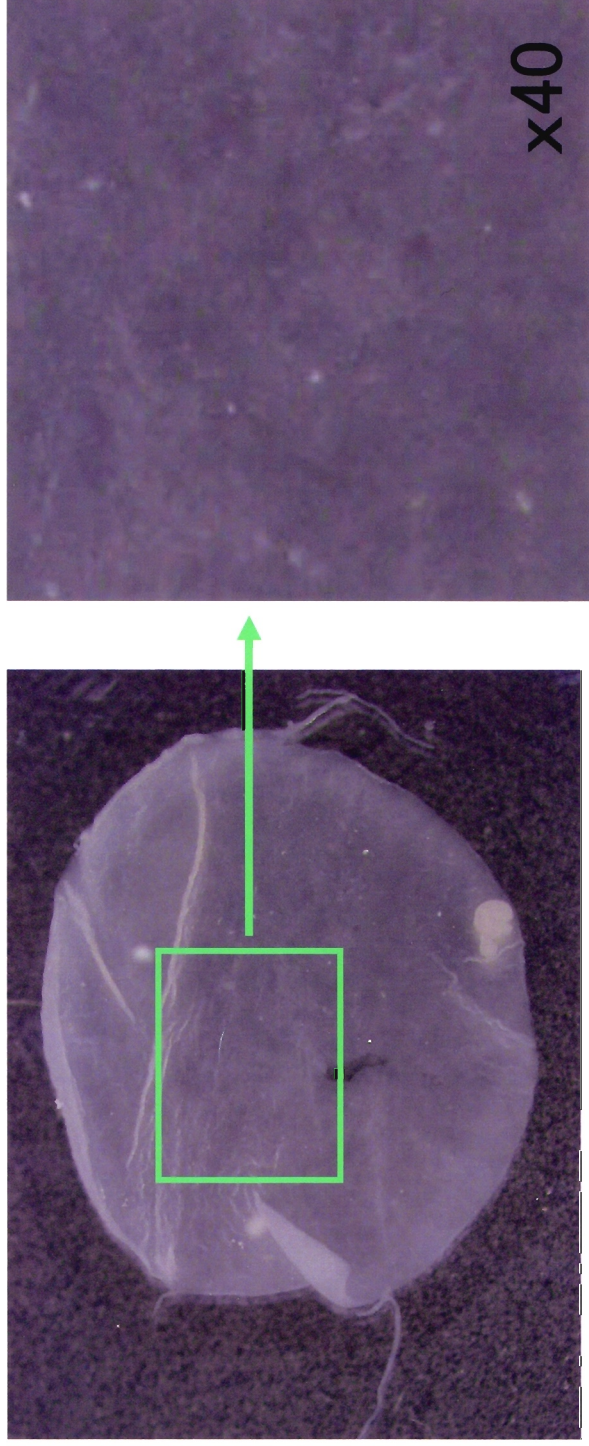


図3

角膜上皮細胞層

HE染色

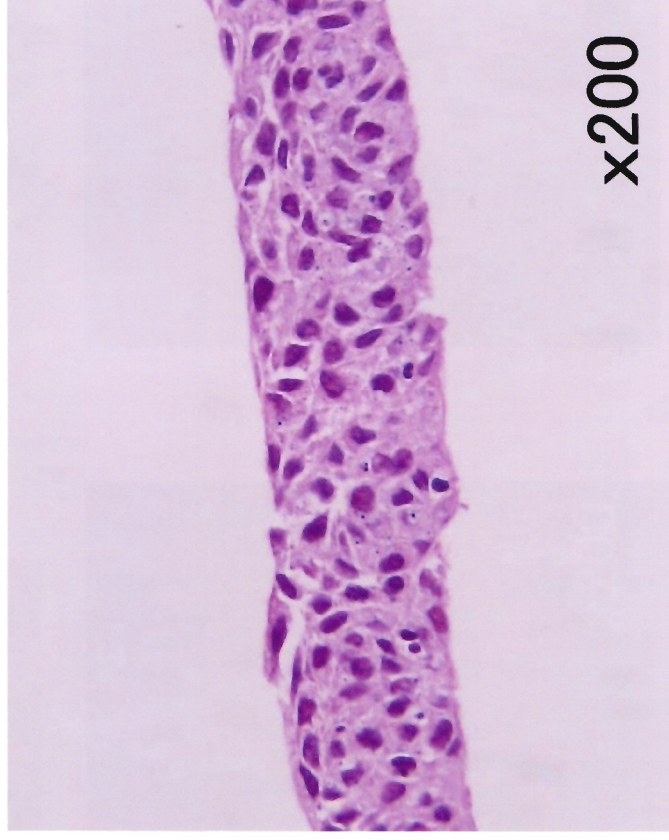


图4

角膜上皮細胞層

ケラチン3/12

ケラチン3/12

ヘキスト33258

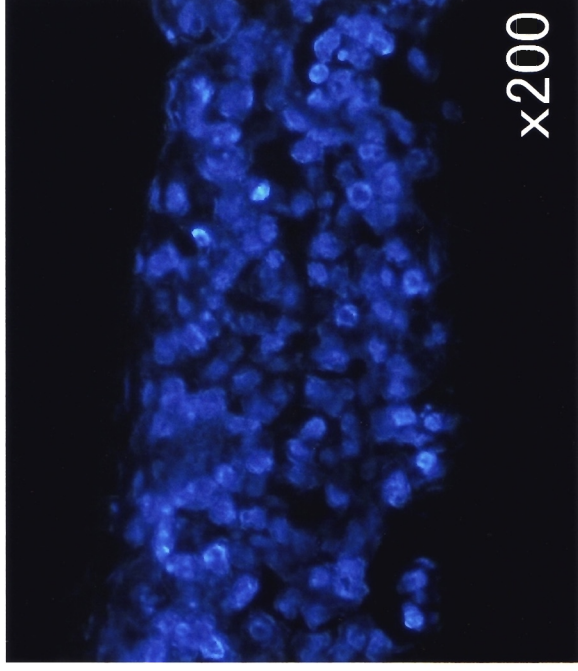
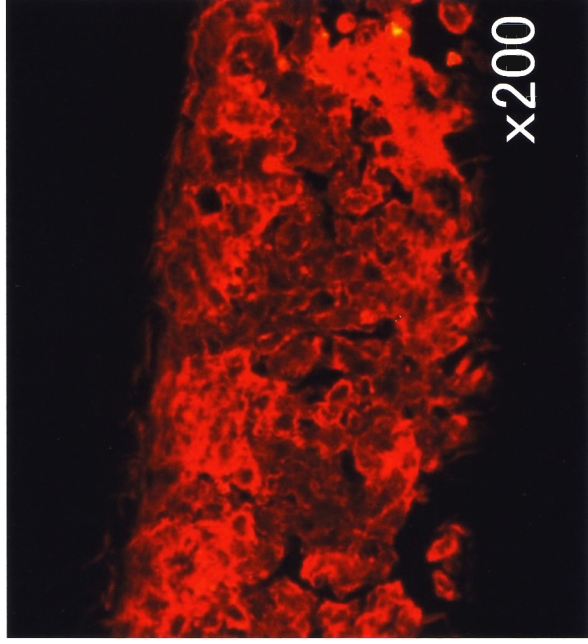


図5

角膜上皮細胞層

TEM

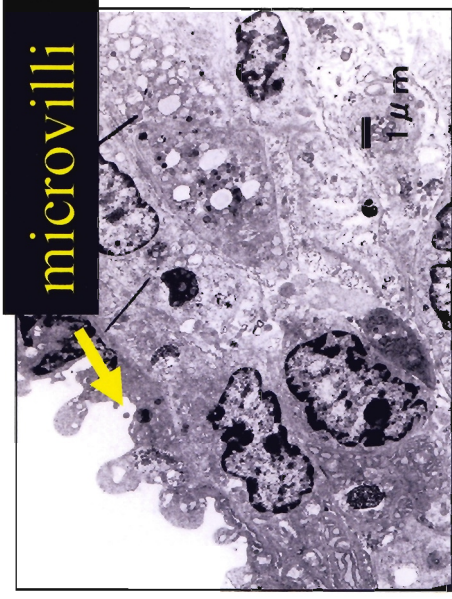


图6

角膜實質細胞層

HE染色

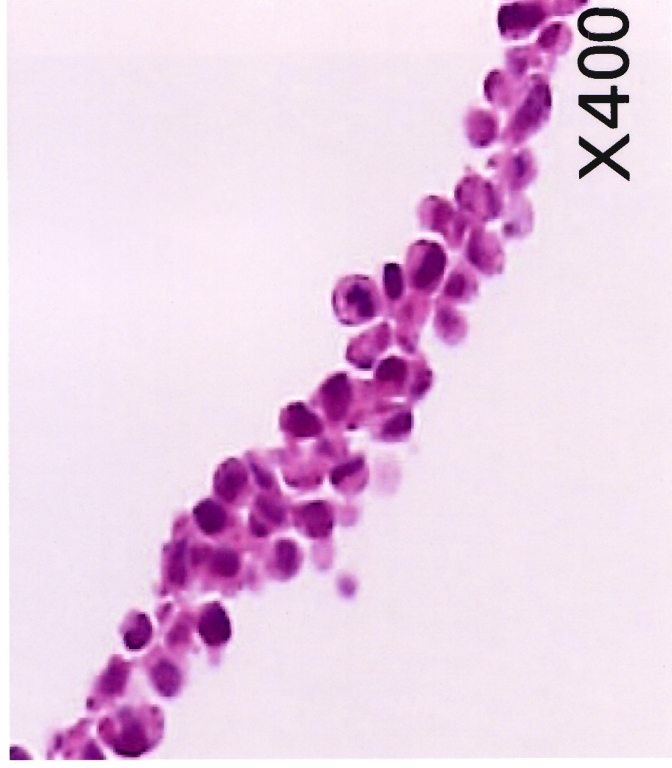


图7

角膜實質細胞層

TEM

