

論文の内容の要旨

獣医学 専 攻
平成 22 年度博士課程 入学
氏 名 南 垠列
指導教員名 西村 亮平

論文題目

Development of corneal epithelial cell sheets using limbal stem cells for
corneal regenerative therapy in dogs

(犬の角膜再生医療を目指した輪部幹細胞由来角膜上皮シートの開発)

犬では角膜疾患の発生率が高く、その損傷程度に応じて点眼治療から結膜被覆術などの外科治療まで様々な治療が行われている。しかし、重度角膜損傷では結膜由来細胞や血管が容易に浸潤し、角膜の不可逆的な混濁や色素沈着が生じる結果、視覚の喪失に陥る場合も少なくない。人では、切り札的治療法として角膜移植が行われているが、犬では拒絶反応の制御が難しいことに加え、人のような角膜バンクが存在せず、実際の適応は極めて難しい状況にある。近年人医領域では、重度角膜損傷に対する角膜再生医療として、自己の角膜上皮を用いて作製した角膜上皮細胞シートを移植し、良好な成績が得られたことが報告されている。角膜上皮細胞シートは、角膜上皮幹細胞が局在する角膜輪部由来の角膜上皮を一部採取し、シート状に培養したものである。シート作製にあたっては、増殖能が高く、未分化な細胞を多く含む方が良好な成績を得られることが報告されていることから、組織学的構造に加え、角膜上皮幹・前駆細胞のマーカーである ABCG2 や p63 などの発現を評価することが重要とされている。人では現在までに、様々な方法を用いてシートの作製が試みられており、これらのマーカーを用いた品質評価が行われているが、犬においてはシート作製やその評価を行った報告はほとんどない。

角膜上皮は角膜実質の支持を受けていることから、シート作製においても足場となる基質が用いられている。足場となる基質は角膜上皮細胞の増殖能や未分化性の維持にも関与し、移植の有効性・安全性に影響すると考えられていることから、シート作製において、足場としての基質の選択が重要となる。羊膜は EGF や HGF など、角膜損傷治療に働く液性因子を分泌し、以前から、単独で角膜損傷の治療に用いられているが、コラーゲンやラミニンを多く含み、幹細胞維持能力も示されていることから、足場としても用いられている。しかし、帝王切開時に得られる組織を利用することから、定常的な供給は難しく、感染の危険性などの欠点も考えられる。一方、近年、角膜実質に多く含まれる I 型コラーゲンの生体適合性・生物分解性を向上させたアテロコラーゲンが開発され、入手・利用のしやすさから、足場としての有用性が注目されている。また、足場を用いて作製した角膜上皮シートでは、上皮の重層化を促す空気暴露が可能であり、正常角膜と同様に重層化したシートを得ることができる。しかし、作製したシートを基質から剥離するには、ディスペーゼなどによる酵素処理が必要であり、シートの基底膜が損傷する危険性が指摘されている。最近、この問題を解決するために、温度応答性培養皿が開発された。温度応答性培養皿は足場となる材料を用いず、空気暴露を行えない反面、ディスペーゼなどの酵素を用いず、温度変化のみでシートを剥離できるため、基底膜を温存したシートの作製が可能で、既に人では臨床応用されている。

これらの背景から、犬においても培養角膜上皮シートが自家で作製できれば、犬の重度角膜疾患に対する画期的な治療法になりうると考え、臨床応用可能なシート作製を目標として、1) 犬羊膜基質、コラーゲンゲル基質、温度応答性培養皿を利用し、犬の角膜

輪部から角膜上皮シートを作製した後、シートの組織学的構造および、シートに含まれる細胞の未分化性を評価し、犬角膜上皮シートに最適な作製法を検討した（第2章）。2) コラーゲンゲル基質を用いた犬角膜上皮シートの作製において、シートに含まれる細胞の未分化性の評価から、空気暴露条件の設定を行い、さらに、基質からの上皮シートの剥離方法について検討した（第3章）。3) 第2章、第3章の結果を踏まえ、コラーゲンゲル基質を用いて作製した犬角膜上皮シートを用い、犬角膜損傷モデルに対する自家移植を行い、移植の有効性及び安全性を評価した（第4章）。

まず第2章では、帝王切開時に得られた犬羊膜基質、アテロコラーゲンから作製したコラーゲンゲル基質、および温度応答性培養皿を用い、犬の角膜上皮シート作製を試みた。角膜輪部から採取した角膜上皮細胞を各基質あるいは培養皿に同密度で播種、コンフルエントとなるまで培養した。犬羊膜基質および、コラーゲンゲル基質では、上皮の重層化を促すため、さらに5日間の空気暴露を行った。その結果、コンフルエントまでの期間は、犬羊膜基質、コラーゲンゲル基質、温度応答性培養皿でそれぞれ、7, 5, 14日で、重層化の程度は犬羊膜基質とコラーゲンゲル基質で作製したシートで6-8層と4-5層、温度応答性培養皿で作製したシートで2-3層であった。角膜上皮分化マーカーであるK3は犬羊膜基質および温度応答性培養皿を用いた場合にはシート全層で、コラーゲンゲル基質を用いた場合には基底層以外に発現がみられた。また、すべての作製法でABCG2およびp63の基底層での発現がみられたが、細胞増殖マーカーであるKi-67陽性の細胞はコラーゲンゲル基質を用いた場合に最も多くみられた。定量的real time RT-PCRの解析では、ABCG2発現は犬羊膜基質を用いた場合に最も高く、p63発現はコラーゲンゲル基質を用いた場合に最も高かった。以上から、いずれの方法でも犬角膜上皮シートが培養可能であるが、コラーゲンゲル基質を用いた場合、角膜上皮細胞の増殖が速く、短期間で正常組織と同様に重層化した組織学的構造をもつシートが得られたことに加え、基底層でK3が発現しない一方、p63・Ki-67の高い発現がみられ、シート中の細胞の増殖能や未分化性が最も高く維持されていると考えられた。以上の結果から、犬においても培養角膜上皮シートが作製可能であり、コラーゲンゲル基質を用いた作製法が有効性を最も期待できるシート作製法であるという結論に至った。

次に第3章では、第2章で最適と考えられたコラーゲンゲル基質を用いた角膜上皮シート作製における空気暴露の条件を検討した。また、基質から角膜上皮シートを剥離するためにI型コラゲナーゼ処理による基質の分解を行い、シートへの影響を組織学的に評価した。空気暴露期間を0, 3, 5, 7日間とし、第2章と同様にシート作製を行った。その結果、空気暴露0日で単層、3日で2-3層、5および7日では4-5層に重層化した犬角膜上皮シートを得た。空気暴露を0, 3および7日間行ったシートでは基底層に局限したp63発現がみられたのに対し、5日間行ったシートでは基底層の上層にもp63発現がみられ、定量的RT-PCRでも有意に高い発現を示した。Ki-67はいずれの条件でも基底層で発現がみられた。また、1時間のコラゲナーゼ処理により、基質は分解され、分解後も同様の組織学的構造とp63発現を示した。以上から、コラーゲンゲル上角膜上皮シートの作製では、5日間の空気暴露により、未分化な細胞を最も多く含むシートが得られることが明らかとなった。また、コラゲナーゼによる処理はシートの組織学的構造や未分化性に影響を与えず、移植の有効性も期待できると考えられた。

最後に第4章では、第2, 3章の結果を踏まえ、犬角膜損傷モデルにコラーゲンゲルを基質として作製した犬角膜上皮シートの自家移植を行い、有効性と安全性について検討した。健常ビーグル犬の中央角膜に全身麻酔下で直径7.5mmのトレパンを用い、200 μ mの深さで角膜損傷を作製した。同時に、対側の輪部より2mm \times 2mmの組織を採取し、コラーゲンゲル上で培養して犬角膜上皮シートを作製した。損傷後21日目に損傷部をデブライドしたのち、角膜上皮シートを縫合し、移植群とした。移植後、角膜混濁と血管新生を60日間観察した後、安楽殺し、移植部位の病理組織学的評価を行った。対照群の犬には、角膜損傷のみを行った。その結果、両群で結膜組織の浸潤はなかったが、血管浸潤が認められ、移植群では縫合糸反応性の炎症も認められたが、いずれも移植3週間後には消失した。角膜混濁は、対照群と比較して移植群で縮小が認められた。H&E染色では、

対照群で不均一な角膜上皮配列と空胞変性がみられた。移植群では均一な角膜上皮配列がみられたが、6 から 13 層に重層化し、上皮の過形成がみられた。また、移植群でのみ、シート直下での実質細胞の増殖がみられた。蛍光免疫染色では、移植群では強い K3 発現が認められたのに対し、対照群では発現がほとんどみられなかった。ABCG2 発現は両群で認められなかったものの、p63 および Ki-67 発現は移植群の基底層でのみ発現が認められた。以上の結果から、移植したシートは損傷部に定着し、角膜上皮を再建するとともに角膜実質細胞にも何らかの影響を与え、混濁の軽減に寄与したと考えられた。移植群での K3 発現や上皮細胞配列は正常角膜と類似していたが、過形成と考えられる重層化もみられ、移植したシートに含まれる細胞の過増殖と考えられた。

以上の結果より、犬において、角膜輪部幹細胞を用いた角膜上皮シートの作製が可能で、コラーゲンゲル基質はシートに含まれる細胞の未分化性や増殖能の維持に適していることが明らかとなった。さらに、5 日間の空気暴露とコラーゲナーゼ処理により基質を除去することで、有効性が期待できるシートが作製できた。実際に犬角膜損傷モデルにシートの自家移植を行ったところ、角膜混濁の縮小が得られ移植の有効性が示された。また、シートの自家移植は拒絶反応もなく、安全性は高いと考えられたが、縫合糸に対する反応もみられ、移植法を改善する必要性も考えられた。今後、移植後に過形成が生じた上皮が正常な重層化上皮へと回復するかなど、より長期的な予後評価も必要であると考えられた。