

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 獣医学専攻
平成 26 年度博士課程入学

氏名 森田 希輔
指導教員名 西村 亮平

論文題目

Establishment of a limbus-derived canine corneal epithelial cell line and application of its cell sheet for corneal regenerative therapy
(犬輪部由来角膜上皮細胞株の樹立と細胞シートによる角膜再生療法への応用)

犬ではその解剖学的特徴から角膜疾患の発生率が高く、重度の混濁により様々な治療を行っても透明性の回復が困難な重症例が少なくない。このような症例に対する根治的治療として角膜移植が報告されているが、術後の移植片混濁の発生が多いこと、またアイバンクが整備されておらずドナー組織の入手が困難であることなどから、実用性は低い。一方、人医療では、角膜上皮細胞をシート状に培養して作製した細胞シートの移植療法により良好な角膜の透明性回復が報告されており、一部の症例において角膜移植に代わる再生療法として注目されている。

これまでに、人やウサギと同様に、犬の角膜上皮細胞も輪部組織から培養可能であり、さらに細胞シートの作製が可能であることが報告されている。一般に、角膜上皮や口腔粘膜上皮などの重層扁平上皮の培養では、細胞の増殖能維持のため、マウス胎仔由来線維芽細胞（3T3 細胞）などのフィーダー細胞との共培養や、EGF、insulin などの増殖促進因子の添加が必要であり、これらがないと上皮細胞の増殖能が低下し、継代維持が困難となる。一方、犬の口腔粘膜上皮細胞では、フィーダー細胞非依存的に増殖が可能であること、その理由として増殖能維持に関与する液性因子を自己分泌することが報告されている。人では口腔粘膜上皮が、眼表面再建に用いる細胞シート作製のセルソースとして、角膜上皮の代替として利用されており、両者は類似した性質を持つと考えられる。したがって犬角膜上皮細胞では、犬口腔粘膜上皮細胞と同様の増殖能維持機構が存在することが期待される。フィーダー細胞や増殖促進因子に依存せず増殖能を維持できれば、異種動物由来材料を用いずにより安全かつ安価に細胞シートの作製が可能となる。また犬角膜上皮細胞を株化し半永久的に維持することができれば、緊急処置を要することが多い犬の重度角膜疾患に対しても細胞シートによる角膜再生療法の応用が可能となり、その汎用性が向上すると考えられる。

以上の背景から本研究では、まず犬角膜上皮細胞がフィーダー細胞や増殖促進因子に依存せず増殖能を維持できるか、ウサギ角膜上皮細胞と比較しながら検討し（第1章）、続いて細胞株の樹立を試み、得られた細胞株を用いて犬角膜上皮細胞の増殖能維持機構を探索した（第2章）。さらに細胞株から角膜上皮細胞シートの作製が可能であるかを検討し（第3章）、最後に犬角膜損傷モデルに、作製した細胞シートの移植を行い、角膜再生療法としての安全性と有効性を評価した（第4章）。

第1章では、犬角膜上皮細胞の増殖能維持における、フィーダー細胞および増殖促進因子の必要性を、ウサギ角膜上皮細胞と比較した。安楽死したビーグル犬23頭と日本白色ウサギ9羽から角膜上皮細胞を採取し、基礎培地（DMEM/F12培地+10%牛胎仔血清）のみ、基礎培地+フィーダー細胞（3T3細胞）、基礎培地+増殖促進因子（EGFおよびinsulin）、基礎培地+フィーダー細胞+増殖促進因子の各条件で培養を行った。その結果、犬角膜上皮細胞は基礎培地のみで増殖が認められたのに対し、ウサギの細胞はほとんど増殖せず、細胞増殖マーカーであるKi-67の陽性細胞率も犬で有意に高かった。基礎培地の場合に比べ、フィーダー細胞の存在下では、ウサギ角膜上皮細胞の増殖能やKi-67陽性細胞率は有意に上昇したが、犬では有意な変化は認められなかった。一方、増殖促進因子の存在下では、フィーダー細胞の有無に関わらず、犬、ウサギともに細胞増殖能、Ki-67陽性細胞率は有意に上昇した。また基礎培地のみ、あるいは基礎培地+増殖促進因子の条件下で連続継代を行い、増殖停止が認められるまでの継代数を比較したところ、犬では23頭中11頭（47.8%）および17頭（73.9%）の細胞で10継代以上の維持が可能であったのに対し、ウサギでは2継代および4継代以内に全ての細胞で増殖が停止した。以上より、犬角膜上皮細胞は、ウサギと異なり、フィーダー細胞や増殖促進因子に依存せずに増殖能の維持が可能であり、液性因子の自己分泌など何らかの増殖能維持機構を有する可能性が示唆された。また基礎培地のみでさらに長期の連続継代が可能であると期待された。

第2章では、まず基礎培地のみで犬角膜上皮細胞の長期連続継代を行い、細胞株の樹立を試みた。第1章で用いた細胞のうち、6歳齢、雌由来の細胞を長期継代に供したところ、100継代以上の培養が可能であった。第100~120継代の細胞の表現型を評価したところ、小型、敷石状の上皮細胞の形態を示したが、細胞倍加時間は第30、60継代時と比較し短縮していた。また角膜上皮幹・前駆細胞マーカーであるp63とcytokeratin 15（K15）、角膜上皮細胞マーカーであるcytokeratin 3（K3）の発現が認められたが、初代培養と比較しコロニー形成効率の上昇やコロニー形態の変化を認めた。さらに染色体数の変化（78~82本）が認められたが、足場非依存的な増殖や免疫不全マウスへの皮下移植で腫瘍形成はなく、腫瘍性の獲得は否定された。以上より連続継代に伴う若干の性質変化を認めるものの、正常な角膜上皮細胞の性質を有する犬角膜上皮細胞株の樹立に成功したと考えられた。

続いて、犬角膜上皮細胞が増殖能維持に働く液性因子を自己分泌するという仮説に基づき、犬角膜上皮細胞の増殖能維持機構を探索した。犬角膜上皮初代培養細胞および細胞株の培養上清をウサギ角膜上皮細胞に添加したところ、増殖を促進する傾向を認めた。一方、ウ

サギ角膜上皮細胞の培養上清を、犬角膜上皮第1継代細胞および細胞株に添加したところ、増殖が有意に抑制された。両動物種の角膜上皮細胞における網羅的遺伝子発現解析を行い、発現量に差を認めた液性因子を抽出したところ、犬では角膜上皮細胞の増殖促進作用を有する複数の EGF 受容体リガンドが高発現しており、そのうち NRG1 と HB-EGF は細胞株でも高発現が認められた。一方、ウサギでは角膜上皮細胞の増殖抑制作用を有する CTGF と TGF- β 2 が高発現しており、TGF- β 受容体 (TGFBR1/2) も犬の細胞に比べて高発現していた。以上より、犬角膜上皮細胞の増殖能維持機構として、NRG1 や HB-EGF の自己分泌による EGF 受容体の活性化で増殖が促進されている、もしくは CTGF や TGF- β の分泌能が低く増殖が抑制されにくいことが考えられた。

第3章では、第2章で樹立した犬角膜上皮細胞株を用いて細胞シートを作製し、その品質を評価した。その結果、得られた細胞シートは4~6層に重層化し、基底膜成分である collagen type IV、基底層に p63 と K15、微弱ではあるが中間層から表層に K3 を発現していた。これらの表現型は第1継代細胞を用いて作製した細胞シートと同等であり、移植材料として利用可能と考えられた。

第4章では、犬角膜上皮細胞株から作製した細胞シートの犬角膜損傷モデルへの移植を行った。細胞株由来シートの利用は他家移植となることを踏まえながら、移植の安全性および有効性を検討した。ビーグル犬7頭の片眼の角膜中央に直径 7.5 mm、深さ 200 μ m の損傷を作製し、移植群4頭では蛍光標識試薬である PKH26 で標識した細胞シートを損傷部に移植した。細胞シートは基底膜成分が認められていることから、露出した角膜実質の上に静置し無縫合での接着を試みた。対照群3頭ではシートの移植をせずに同様の処置を行った。その結果、シート静置後15分で角膜実質への十分な接着が認められた。移植後2日目には、全頭で細胞シートが損傷部全域を被覆していたが、その後、1頭は2日目の検査直後にシート全体が脱落し、3頭ではシートの経時的な縮小とシート周囲の部分的なフルオレセイン陽性領域を認めた。対照群と比較し、移植群では結膜充血や血管新生に顕著な差はなかったが、角膜混濁は軽度であった。

移植後7日目に角膜組織を採材し、病理組織学的に評価した。移植群ではシート残存部位に PKH26 陽性の細胞を認めたが、それ以外の部位や対照群では陰性で、輪部組織由来と考えられる再生上皮が認められた。細胞シート中の上皮の配列は再生上皮と比較して不正で、多核巨細胞の浸潤やアポトーシスと考えられる核濃縮が認められた。また p63 の発現を認めたが、K3 の明確な発現は認められなかった。一方、移植部位直下の角膜実質では、対照群と比較し炎症細胞の浸潤、実質細胞の増殖、筋線維芽細胞と考えられる α SMA 陽性細胞の増殖が軽度であった。また CD3 陽性 T 細胞は認められず、Iba1 陽性マクロファージの浸潤も対照群と比較し少数で、シートへの拒絶反応所見は認められなかった。

以上より、細胞株由来の角膜上皮細胞シート移植は、正常上皮と比較して構造がやや不整であるものの上皮組織の早期再建が可能であり、犬の角膜再生療法として有用であると考えられた。拒絶反応の有無は、より長期間の観察が必要であるが、急性期拒絶は生じないと

考えられた。また細胞シートによる実質細胞の筋線維芽細胞への分化抑制が見られ、角膜混濁軽減への寄与が示唆された。一方、シートの縮小は、輪部からの細胞供給による正常な上皮のターンオーバーが原因と考えられたが、シート中の細胞は p63 発現を維持していたため、輪部機能が破綻している場合には構造を維持可能であると予想された。またシートの脱落は、眼瞼の動きなどの物理的刺激が原因と考えられるため、シートの保護法の改善が必要であると考えられた。

以上の研究により、犬角膜上皮細胞はフィーダー細胞や増殖促進因子に依存せず増殖能を維持可能であり、その機構として増殖促進因子の自己分泌、あるいは増殖抑制因子の低分泌が示唆された。また犬角膜上皮細胞株から細胞シートを恒常的に得ることが可能となった。さらに細胞株由来のシートを用いた他家移植は早期の上皮組織の再建、角膜混濁の軽減を期待でき、角膜再生療法として有用であると考えられた。今後、細胞シートの保存法の確立や角膜実質、内皮までを含めた再生療法など、より利便性、治療効果が高い方法への発展が期待される。