

## 審査の結果の要旨

氏名 森田 希輔

角膜上皮は、輪部に存在する幹細胞から増殖した細胞の分化、移動、脱落により透明性が維持されている。犬では角膜損傷の発生が多いが、従来の治療法では瘢痕や色素沈着により透明性の回復が困難な場合が少なくない。そこで新たな再生治療として、自己輪部組織から培養した角膜上皮細胞シートの移植が期待されている。しかし、角膜上皮細胞の培養には通常増殖能維持を目的とした異種動物由来のフィーダー細胞や増殖促進因子が使用され、移植の安全性やコストの増大が懸念される。また自己組織を用いたシートは、シート自体の作製に加え細胞の調製に時間を要するため、損傷後早期の移植が困難である。一方、犬口腔粘膜上皮細胞では、種特異的なフィーダー細胞非依存性細胞増殖と増殖能維持に関与する液性因子の自己分泌が報告されている。口腔粘膜上皮は角膜上皮と類似点が多いため、犬角膜上皮細胞においても同様の増殖能維持機構の存在が期待される。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可能であれば、安全で安価なシートの作製が可能となり、また細胞の株化に成功すれば、自己組織に代わるシート作製の材料として、作製期間の短縮も期待される。そこで本研究では、犬角膜上皮細胞の増殖能維持におけるフィーダー細胞や増殖促進因子への依存性の検討、および犬角膜上皮細胞株の樹立と、細胞株由来シートの移植療法の安全性と有用性の検討を目的として以下の実験を行った。

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と増殖促進因子への依存性を、フィーダー細胞への依存性が高いウサギ角膜上皮細胞と比較しながら検討した。その結果、ウサギと異なり犬の細胞は基礎培地のみで増殖可能であり、10継代以上の維持が可能であった。よって犬角膜上皮細胞は、フィーダー細胞や増殖促進因子非依存的に増殖可能であり、何らかの増殖能維持機構を有する可能性が示唆された。

第2章では、まず連続継代による犬角膜上皮細胞株の樹立とその性状解析を行った。第1章で用いた細胞のうち6歳齢、雌の犬の細胞で、基礎培地のみで100継代以上の培養が可能であった。細胞形態や増殖様式に大きな変化はなく、角膜上皮幹・前駆細胞マーカーおよび角膜上皮細胞マーカーの発現を認めた。腫瘍性の獲得は否定され、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、犬角膜上皮細胞の増殖能維持機構の探索を行った。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細胞（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。また遺伝子発現解析では、犬角膜上皮初代培養細胞と細胞株で角膜上皮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いた。一方、ウサギ角膜上皮初代培養細胞では増殖抑制作用を有する CTGF と TGF- $\beta$ 2 の高発現を認めた。以上より犬角膜上皮細胞の増殖能維持機構として、増殖促進因子の自己分泌もしくは増殖抑制因子の低分泌が示唆された。

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角膜上皮シートを作製し、移植材料としての品質を評価した。増殖促進因子の添加は必要であったが、無フィーダーで、幹・前駆細胞を含む十分な強度を持つ重層化したシートが得られた。したがって、樹立細胞株を用いることでシート作製期間の短縮、無フィーダー培養による安全性の向上が期待された。また基底膜成分の発現を認めたため、無縫合での移植も可能と考えられた。

第4章では、細胞株由来シートを犬角膜損傷モデルへ他家移植し、移植の安全性と有効性を検討した。シートは無縫合で移植し、対照群では損傷作製のみを行った。術後、移植群では早期の上皮化が得られたが、その後、上皮のターンオーバーが原因と考えられるシートの縮小とシート周囲のフルオレセイン陽性領域を認めた。対照群と比較し、移植群では角膜混濁が軽度であった。移植後7日目における角膜組織は、細胞シート中の上皮の配列は不正であったが、移植部直下の角膜実質では対照群と比較し炎症細胞の浸潤、角膜混濁の原因となる筋線維芽細胞の増殖が軽度であった。また細胞シートへの明らかな拒絶反応所見は認められなかった。安全性についてはより長期の観察が必要であるが、細胞株由来シートの移植は、上皮組織の早期再建や角膜混濁の軽減が期待され、角膜再生療法として有用であると考えられた。

以上、本研究では、犬角膜上皮細胞の種特異的な増殖能およびその維持機構の一部を明らかにし、新たに樹立した細胞株から作製した細胞シートの臨床応用可能性を示した。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。