

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 南 垠列

犬では角膜疾患の発生率が高いが、従来の治療法では重度角膜損傷に対する治療効果は十分でなく、最終的に視覚を喪失する例も少なくなかった。近年人では、角膜輪部に含まれる角膜上皮幹細胞を培養して角膜上皮シートを作製し、これを移植することで良好な成績が得られている。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が得られるため、様々な方法を用いてシートの作製が行われている。犬においても、角膜上皮シート移植は重度角膜疾患に対する有望な治療法と考えられるが、これまでシート作製法の検討やその評価を行った報告はない。

そこで本研究では、犬の重度角膜疾患へ臨床応用可能で、かつ安全に移植できる角膜上皮シートを開発することを目標に以下の検討を行った。

人や実験での角膜上皮シート作製には、一般に基質が用いられているが、基質は角膜上皮細胞の増殖能や未分化性の維持に関与すると考えられている。羊膜は角膜損傷治癒を促すため、単独でも角膜治療に使用されているが、安定した供給が難しく、感染の危険性などの欠点もある。一方、アテロコラーゲンは、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もので、入手・利用のしやすさから細胞培養の足場としての有用性が最近注目されている。これらの基質を用いると、作製中に上皮の重層化を促す空気暴露が可能であり、正常角膜に類似した構造のシートが得られやすい。しかし、作製したシートを基質から剥離するには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ある。最近、この問題を解決するために開発された温度応答性培養皿は、空気暴露を行えない反面、温度変化のみでシートを剥離でき、基底膜を温存しやすい。このように角膜上皮シート作製に利用可能な基質、材料はいくつかあるため、第 2 章において、これら中で犬のシート作製に最も適したものはどれか検討を行った。まず、角膜輪部から採取した角膜上皮細胞を各基質また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。さらに犬羊膜とコラーゲングル群では、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、コラーゲングルを用いた場合に一番短く、重層化も観察された。犬羊膜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角膜上皮分化マーカー K3 の発現が認められ、コラーゲングルを用いた場合には基底層以外で認められた。一方、角膜上皮幹・前駆マーカーの p63 と Ki-67 の陽性細胞はコラーゲングルを用いた場合に最も多くみられた。定量的 real time RT-PCR では、p63 の発現はコラーゲングルを用いた場合に最も高かった。以上の結果から、犬ではコラーゲングルを基質として用い、空気暴露を行うことで最も臨床応用に適した角膜上皮シートの作製が可能であると考えられた。

第 3 章では、コラーゲングルを用いた角膜上皮シート作製に最適な空気暴露と I 型コラーゲナーゼ処理の条件を検討した。その結果、空気暴露を 5 日間行ったシートで p63 の発現

が最も強く、定量的 RT-PCR でも有意に高かった。また、80 分のコラゲナーゼ処理により基質は分解され、処理後も組織学的な影響は認められなかった。以上から、5 日間の空気暴露と 80 分間のコラゲナーゼ処理が、犬の角膜上皮シート作製に最も適していると考えられた。

第 4 章では、犬角膜損傷モデルにコラーゲン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、その有効性と安全性について検討した。角膜損傷モデルには健常ビーグル犬の中央角膜に作成した角膜損傷を用い、同時に対側の輪部組織を採取し、コラーゲン上で角膜上皮シートを作製した。損傷後 21 日目に作製した角膜上皮シートを損傷部に縫合し、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、両群とも結膜組織の浸潤はなく、移植群ではシートに対する炎症反応や拒絶反応は認められなかった。損傷部の角膜混濁は、対照群と比較して移植群で縮小が認められた。組織学的には、移植群では均一な角膜上皮配列と上皮の過形成がみられ、シート直下での実質細胞の増殖も認められた。蛍光免疫染色では、移植群で p63 と Ki-67 の発現と K3 の強い発現が認められた。以上の結果から、作製した角膜上皮シートは角膜上皮の再建に有効で、安全性にも問題がないことが明らかとなった。

以上本研究では、犬の輪部幹細胞由来角膜上皮シートの作製に成功し、さらに重度角膜疾患を念頭に置いた臨床応用への有用性と安全性を明らかにしたことから、学術上、臨床応用上貢献するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）論文として価値あるものと認めた。