

平成21年 5月13日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19890026
 研究課題名（和文） 異種動物由来材料およびフィーダー細胞を用いないウサギ培養角膜上皮シートの作製
 研究課題名（英文） Fabrication of rabbit corneal epithelial cell sheets without feeder cells and animal-derived products.
 研究代表者
 久保田 享 (KUBOTA AKIRA)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：50451589

研究成果の概要：フィーダー細胞や異種動物由来材料を用いずに、温度応答性培養皿上にてウサギ角膜上皮細胞シートを作製した。作製したシートは、低温処理（20℃）にて回収可能であり、組織学的な評価にてケラチン12の染色に陽性で角膜上皮細胞の性質を維持していたが、ケラチン1、10にも陽性であり表層が角化していた。培地に添加剤を加えて角化を抑制することを試みたが、成功せず今後の課題である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：培養角膜上皮シート、フィーダーフリー、温度応答性培養皿、無血清、角化、重層化、再生医療

1. 研究開始当初の背景

スティーブンスジョンソン症候群やアルカリ・酸による化学外傷などの難治性眼表面疾患は、これまでの全層角膜移植術が行われてきたが、その成績は非常に悪かった。これらは病態自体が理解されていなかったのが問題であったが、角膜上皮幹細胞の概念をベースとして病態が考えられるようになったことで飛躍的に進歩した。角

膜上皮の幹細胞に関する基礎研究が進み、1980年代後半には角膜輪部移植などの新しい移植法が開発されたが、拒絶反応の問題は解決できなかった。これらの問題を解決するために、拒絶反応やドナー不足の心配のない自家細胞を用いた角膜上皮の再生医療の開発が行われてきた。1997年に Pellegrini らが自己の培養角膜上皮移植の初めての臨床応用の成功例を報

告した。その後、自家あるいは他家の角膜上皮幹細胞を羊膜やフィブリンゲルなどの基質の上に培養して、シートを作製して移植する方法が臨床応用された。しかし、これらの方法は、ディスプレイで処理することによる細胞間結合の消化によるシートの脆弱化や、基質に関する問題があった。そこで我々のグループは、温度応答性培養皿と自家の角膜輪部や口腔粘膜上皮から作製した細胞シートを移植する独自の方法を開発した。我々の方法の特徴は、32℃を境に親水性と疎水性の転移を起こす特殊なインテリジェントポリマーがグラフトされた温度応答性培養皿を使用することによって、培養した角膜上皮シートを細胞外マトリックスなども一体として、低温度処理のみにて回収可能なことである。

成績は良好であるが、我々の方法や、これまでに報告されている方法でも、ウシ血清とマウス胚由来の3T3フィーダー細胞を用いており、クロイツフェルトヤコブ病などのプリオン病への感染やマイトマイシンで処理するもののマウスの細胞という異種動物由来材料を用いることが問題となっていた。

2. 研究の目的

そこで本研究においては、ウサギの角膜上皮にターゲットを絞って、角膜上皮幹細胞が存在する角膜輪部の角膜上皮幹細胞をフィーダー細胞や血清などの異種動物由来材料を用いずに温度応答性培養皿上で培養し、重層化した培養角膜上皮シートを作製・回収し、それらの形態学的・免疫組織学的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ウサギの角膜輪部より採取した角膜上皮幹細胞を、カルチャーインサート型の温度応答

性培養皿上で、3T3フィーダー細胞を用いずに無血清培地にて培養する。基本培地としては、表皮用の無血清培地であるカスケードバイオ社のEpi-life[®]を使用した。細胞がコンフルエントになった後にさらに1週間程度培養し重層化させて、温度を20℃に下げることにより培養角膜上皮シートを回収した。重層化しにくかったため、条件を検討し、カルシウム濃度を変化させることと、インサート型タイプの内方の培地を減らすAir lift法の効果を評価した。

(2)回収した培養上皮シートを、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って重層化の程度を評価した。

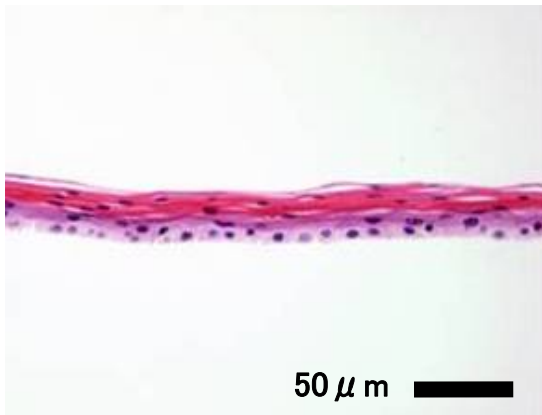
(3)さらに回収したシートに、角膜上皮特異的マーカーであるケラチン12の発現を確認する。また、表層が角化していないかどうかを、角化のマーカーであるケラチン1、10のマーカーで染色を行って確認した。

(4)培地および培地への添加物による細胞シートへの影響を検討した。表皮細胞培養用培地とAPFと呼ばれるfibroblast用の培地、そしてそれぞれの培地にS7、ARF(ADP-ribosylation factor)、KGF(keratinocyte growth factor)という添加剤を加えて重層化の程度と低温度処理にて細胞シートが回収できるかを評価した。

4. 研究成果

(1)通常の血清入りの培地では平均14日間で重層化したシートを回収できるが、無血清培地+添加剤(S7)のみでは、シートが回収できなかった。細胞がコンフルエントになる前に培地のカルシウム濃度を上げることによって細胞間の接着が向上し、低温度処理にて細胞シートを回収できたが、重層化が十分でなかった。重層化を

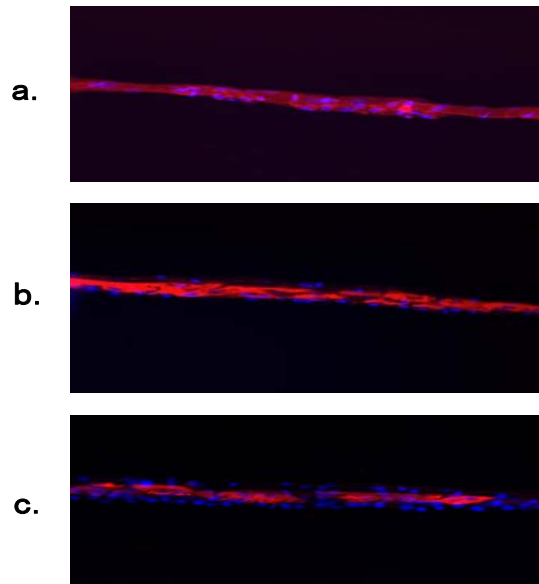
促進するために、さらに20日目よりインサートの内方の培地をできるだけ少なくする Air lift 法にてさらに2日間培養した。その結果重層化が促進され、(図1)のようなシートが安定して回収できるようになった。



(図1) 回収したウサギ培養角膜上皮シート

(2)回収したシートは、4~5層程度の重層化をしていることが確認できた。

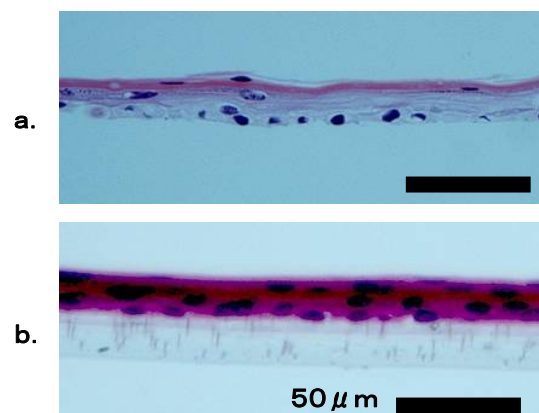
(3)回収したシートを、角膜上皮のマーカーであるケラチン12で染色し、また角化上皮のマーカーであるケラチン1、10にて免疫染色を行った。その結果、ケラチン12での染色が見られ(図2 a)、角膜上皮のシートが得られていることが確認できたが、ケラチン1(図2b)、ケラチン10(図2 c)でも染色がみられ、表層が角化していることもわかった。



(図2) ケラチン12、1、10での免疫染色

以上の結果より、得られたウサギ培養角膜上皮シートは、重層化し、低温度処理にて回収可能であったが、角化していることがわかった。

(4)表皮培養用培地+S7 では角化したシートが得られていたが、さらに KGF を添加した条件では、重層化の弱いシートが得られ(図3a)、S7の代わりに ARF と KGF を添加した条件では細胞が増殖せずにシートが剥離できなかつた。また、fibroblast 用の培地に代えて同様の添加剤で検討しても、重層化が弱くシートを剥離することができなかつた(図3b)。



(図3) 基本培地にKGFを添加

以上、この2年間での本研究を総括すると、無血清、フィーダー細胞フリーの条件化において、重層化したウサギ培養角膜上皮シートを、温度応答性培養皿にて回収可能であった。しかしながら、回収されたシートは角化しているという問題があり、今回の研究において検討した添加剤などでは改善できなかった。移植をして in vivo の条件に移すことによって、角化が改善する可能性はあるものの、臨床応用可能なクオリティにするためには、角化しない培養条件をみつけだすことが課題である。今後の研究により、角化を抑えるためのさらなる条件の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

①大家 義則、久保田 享ら、脂肪由来間葉系幹細胞および皮膚線維芽細胞を用いたヒト口腔粘膜上皮シートの製造、第33回角膜カンファレンス、平成21年2月20日、大阪

②林 竜平、久保田 享ら、Method for the Validation of Tissue-Engineered Epithelial Cell Sheet, 2008 Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology、平成20年5月1日、フォートローダーデール (米国)

[図書] (計 6 件)

①久保田 享、西田 幸二、自然科学社、医学と薬学 特集 生体移植医療の実際、2009, 287-292

②久保田 享、西田 幸二、医師薬出版株式会社、医学のあゆみ 感覚器の再生医療、2008, 856-960

③久保田 享、西田 幸二、株式会社メディカルドゥ、進みつつける細胞移植治療の実際 下巻、2008, 152-156

④久保田 享、西田 幸二、医学書院、眼表面の再生医療、2007, 1145-1151

⑤久保田 享、西田 幸二、メディカル葵出版、眼表面疾患に対するオート移植、2007, 189-193

⑥久保田 享、西田 幸二、金原出版株式会社、角膜上皮の移植再生、2007, 911-919

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 享 (KUBOTA AKIRA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50451589

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし