

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791276
 研究課題名（和文）角膜輪部上皮メラノサイトの役割の同定および角膜上皮幹細胞との相互作用の解明
 研究課題名（英文） The role of limbal melanocytes in interaction between limbal stem cells and melanocytes
 研究代表者
 川島 素子（KAWASHIMA MOTOKO）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：00327610

研究成果の概要（和文）：

角膜輪部メラノサイトは角膜上皮幹細胞のニッチとして必要である」という仮説のもと、角膜輪部におけるメラノサイトおよび培養上皮シートでのメラノサイトの存在、および分布を明らかにし、ヒト角膜輪部からのメラノサイトおよび角膜上皮細胞の分離・培養方法の確立をした。これらの結果を用いてメラノサイトと上皮細胞との相互作用の解析を行うため、角膜輪部上皮細胞とメラノサイトの共培養の条件検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

On the ocular surfaces, limbal epithelial stem cells are maintained in undifferentiated and quiescent state in specialized microenvironment termed stem cell niche. To demonstrate the melanocytes are the one of the niche of limbal stem cells, at first we established the isolation and cultivated methods of limbal melanocytes, and performed co-culture of corneal epithelial cells and melanocytes in various conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：再生医学、外科、細胞組織

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮幹細胞は角膜輪部の基底細胞群に存在し、この部位が重度の障害を受けると、角膜輪部機能不全を呈し、遷延性角膜上皮欠損を生じ、遂には角膜上に結膜組織が侵入するため視機能は非常に低下する。これらの病態に対し従来の角膜移植を施行しても、角膜輪部機能不全のために角膜上皮が供給されず最終的には角膜の結膜化に陥るため、以前は手術適応外とされていた。十数年前より角膜上皮の幹細胞を直接眼表面に移植する角膜輪部移植や羊膜移植などが発案され、角膜輪部不全を伴う眼表面の上皮化を促す点で非常に画期的な術式として注目された。しかしながら、この上皮化がスムーズにいかない場合、遷延性上皮欠損、感染などの問題が生じることもあり、成功率は50%にとどまっていた。この欠点を補う方法として、*in vitro*であらかじめ角膜上皮、結膜上皮および口腔粘膜上皮を羊膜上で培養する技術が確立したのに伴い、増殖した上皮シートを眼表面に移植する培養上皮移植が生み出され、広く臨床に応用されるまでなってきた。

しかし、これらの技術革新にも関わらず、重症瘢痕性角結膜疾患に対する培養上皮移植を含む眼表面再建術の1年時点での成功率は50%程度であり、かつ術前の状態、術後の基本管理が同等の輪部移植と培養上皮移植の1年時点での成績はどちらも50%程度であった。(川島ら、第61回日本臨床眼科学会発表)。培養上皮移植の治療成績を左右する因子としては、術前の眼表面の状態とともに、手術の際の培養上皮シートの品質があげられる。培養上皮移植は先述したようにシート状に角膜全体をカバーするため、術前に重度の角膜上皮障害がある手術リスクの強い患者に対しても、術直後から上皮欠損を防止するという利点があり成績が良いと期待されるにも関わらず、培養上皮シートの成績が格段によいわけではなかった。これより、本来の解剖学的構造をそのまま移植する輪部移植が優れている点として、現在のシートには足りないニッチごと移植を行っている可能性が考えられる。最近になって輪部メラノサイトにN-cadherin陽性のものが存在し、輪部のニッチとして重要である可能性が推察されたと(Hayashi, Stem cells, 2006)報告されたが、まだ輪部メラノサイトに関してはその機能など不明な点も多く、報告もほとん

どない。輪部メラノサイトの研究や上皮との相互作用についての報告もされていないため、主にニッチとしての機能を調べる必要があると考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

これまで角膜の培養上皮シートを用いた眼表面の再生の報告では、培養上皮シートの質の向上として、移植時の角膜上皮細胞の重層化の状態や未分化細胞維持について述べる事が主となっている。しかし、実際の臨床ではその生着には niche (周りの環境) が非常に大切であり、本来の角膜輪部では角膜上皮幹細胞はメラノサイトと相互作用がある可能性がある。輪部メラノサイトの機能は未だ不明であり、培養上皮シート作成で、メラノサイトに関してはまったく考慮されていない。

このため、本研究では「輪部メラノサイトが角膜上皮幹細胞のニッチとして必要である」という仮説のもと、輪部メラノサイトの機能及び角膜上皮幹細胞との相互作用、ニッチとしての役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)角膜輪部におけるメラノサイトの分布と培養上皮シートでのメラノサイトの分布

ヒト輪部上皮にどれくらいのメラノサイトが含まれているかは、我々の研究グループがすでに調べ、報告している(Higa, Exp Eye Res, 2005) そこで、まず現在臨床応用されているヒト輪部培養上皮シートにどのくらいのメラノサイトが存在するのか、上皮細胞対メラノサイトの比をFACSと免疫染色の両面から調べる。また形態と上皮の表現型、形態、またその相互作用を既存のマーカーを用いて調べる。

(2)ヒト角膜輪部からのメラノサイトの単離・培養方法の確立

輪部由来のメラノサイトと輪部上皮の分離培養方法の確立をする。メラノサイトの分離・培養に関しては現在当研究室で進行中であり、純粋なメラノサイトのコロニーを輪部組織から得ることに成功している。具体的には、中央部を角膜移植に用い不要となった輸入角膜の輪部組織を、ディスパーゼとトリプシンを用いて輪部細胞を回収し、defined

KSFM+FCS、メラノサイト培地で培養する。培養開始後 7 日目に geneticin (100 μg/ml) を 2 日間添加し、角膜上皮細胞を死滅させ、メラノサイトのみを選択的に分離培養する。純粋なメラノサイトであることを、免疫染色 (MART1, MITF, pancycto-keratin)、RT-PCR で確認する。

(3)メラノサイトと上皮細胞との相互作用解析に向けての co-culture の条件検討

単離した輪部上皮およびメラノサイトを培地(d-kSFM,SHEM,メラノサイト培地、混合培地、血清添加有無)を各種条件で co-culture の条件を検討する。相互作用の解析に向けてはセルラインを利用して行う。

4. 研究成果

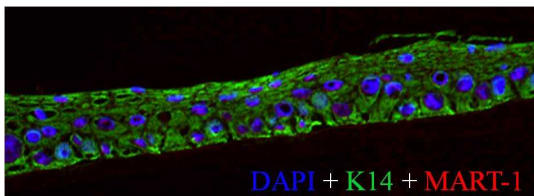
(1) 角膜輪部におけるメラノサイトの分布と培養上皮シートでのメラノサイトの分布

(左図 : MART1 右図 : vimentin)

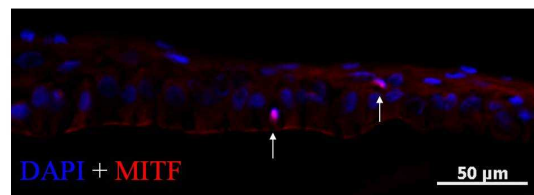
ヒト角膜輪部では MART1 陽性、vimentin 陽性のメラノサイトが上皮基底層で確認された。

(左図 : K19, 右図 : MITF)

また、輪部基底層では K19 陽性細胞および、わずかに MITF 陽性細胞も確認された。



(培養シート : MART1 染色)



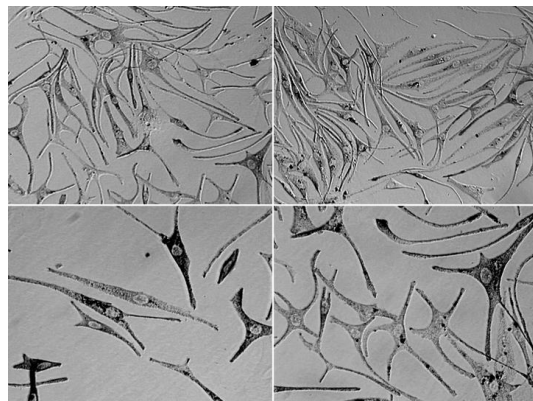
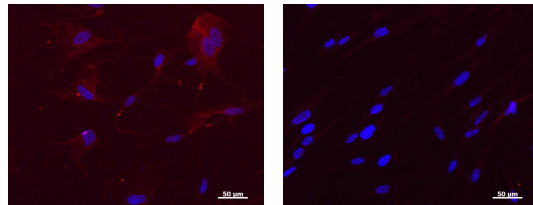
(培養シート : MITF 染色)

(サイトスピン左図 : MART1, 右図 : MITF)

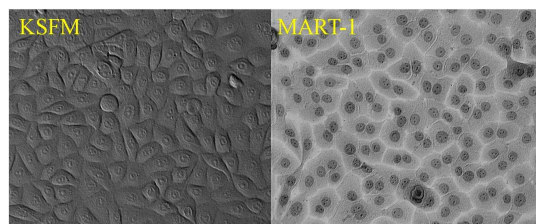
上皮培養シートにおいては、MART1 陽性細胞はシート断面の染色では得られなかったが、MITF 染色陽性像は得られた。またサイトスピンでの染色では両者とも陽性細胞が確認された。

(2) ヒト角膜輪部からのメラノサイトの単離・培養方法の確立および、メラノサイトと上皮細胞との相互作用解析に向けての co-culture の条件検討

角膜移植で使用後の残りの輸入角膜の輪部組織を、ディスパーゼとトリプシンを用いて輪部細胞を回収し、defined KSFM+FCS、メラノサイト培地で培養し、培養開始後 7 日目に geneticin (100 μg/ml) を 2 日間添加し、角膜上皮細胞を死滅させ、メラノサイトのみを選択的に分離培養することに成功した。

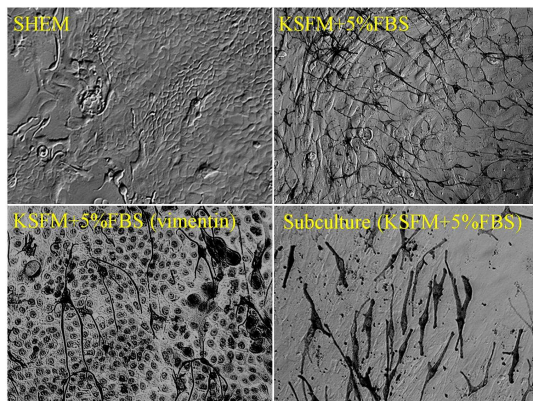


次に、輪部由来メラノサイトを選択的に分離培養する方法を用いて、ヒト輪部よりメラノサイトを分離培養、同じドナーより角膜上皮の分離培養を行った。メラノサイトは血清存在下で線維芽細胞様の形態、または樹状突起を失い、大きな N/C 比をもつ大型細胞の形態を呈した。血清非存在下では増殖速度が遅いが小さい N/C 比の形態を維持したが、メラニン色素が血清存在下と比べ弱い傾向にあった。このメラノサイトと上皮細胞との相互作用の解析を行うため、角膜輪部上皮細胞との共培養の条件検討として、細胞播種密度、培養液について検討を行った。低細胞密度では共培養の条件検討にまだ改善を要するため、現在メラノサイトのセルラインおよび角膜上皮細胞のセルラインを用いての検討を行っている。



(上図 : d-KSFM 下では MART1 陽性細胞像が得

られなかった)



(上図: KSFM+5%FBS の血清存在下で樹状のメラノサイトが得られた。SHEM 下では樹状様細胞はなくなった。ビメンチン陽性細胞(パンサイトケラチン陰性)は KSFM+5%FBS で得られたが。SHEM および KSFM では認められなかった。)

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)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 素子 (KAWASHIMA MOTOKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 00327610

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし