

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450422

研究課題名(和文)xeno-free犬角膜上皮シートの作製と移植効果の検討

研究課題名(英文)Fabrication and transplantation of xeno-free canine corneal epithelial cell sheet

研究代表者

都築 圭子(Tsuzuki, Keiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：30364251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Xeno-Free犬角膜上皮細胞シートの作製方を検討した結果、犬の角膜上皮細胞はフィーダー細胞を用いない場合でも、未分化性と増殖能を維持することが明らかとなり、フィーダー細胞の排除が可能であった。血清については、自家血清の利用は、明らかな細胞形態の変化をもたらしたため、FBSの排除には至らなかった。また研究の過程で、肝細胞成長因子が犬角膜上皮細胞の浸潤能を有意に上昇させることが明らかとなり、点眼薬としての有用性が期待された。角膜上皮細胞シートの移植においては、無縫合移植が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that canine corneal epithelial cells can maintain their undifferentiated state and proliferation ability even when cultured without any feeder cells. Thus, feeder cells can be eliminated for fabrication of canine corneal epithelial cell sheets. However, canine corneal epithelial cells showed apparent morphological change when cultured using autologous serum. Therefore, the use of fetal bovine serum could not be eliminated to fabricate canine corneal epithelial cell sheets. In the process to explore the possible growth factors to fabricate canine corneal epithelial cells, we found out that hepatocyte growth factor (HGF) promotes the cell invasion ability of canine corneal epithelial cells and HGF can be a promising drug to treat corneal injury. We could also developed transplantation of canine corneal epithelial cell sheets without sutures.

研究分野：角膜再生医療

キーワード：角膜上皮再生 犬 角膜上皮細胞シート

1. 研究開始当初の背景

犬の角膜疾患は多く、重度角膜損傷症例では9割で結膜被覆術などの治療後に強い角膜混濁が残る。これらの症例に対する新たな治療法として、角膜上皮シート移植に注目し、犬の輪部組織片から増殖培養した角膜上皮細胞を用いて作製を試みたところ、フィーダー細胞を用い、コラーゲンゲル上で培養したところ、角膜上皮幹・前駆細胞を多く含む角膜上皮細胞シートを作製可能であった。犬角膜損傷モデルで移植の安全性と有効性を検証したところ、損傷治癒効果が認められたものの、若干の角膜混濁が残った。また、シートを固定した縫合系に反応した肉芽形成も認められ、犬角膜上皮シートのさらなる改良と移植手技の改善の必要性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、異種動物由来材料の使用を避けるとともに、無縫合移植などの新たな移植方法を検討し、安全性の高い犬角膜上皮細胞シートの作製法と移植法を開発する。

3. 研究の方法

従来は、牛胎仔血清 (FBS) や Feeder 細胞としてマウス 3T3 細胞を使用しており、これらの因子を自己あるいは同種由来材料に置換し、Xeno-Free 角膜上皮細胞シートの作製法を検討した。具体的には、Feeder 細胞としては犬脂肪由来間葉系幹細胞 (cADMSCs) あるいは犬骨髄間葉系幹細胞 (cBMMSCs) を用い、血清として自己血清の添加について検討した。また、Feeder 細胞として用いた間葉系幹細胞 (MSCs) において発現上昇を示す成長因子を探索し、犬角膜上皮細胞の増殖・成熟に対する影響を検討した。最後に、得られた結果をもとに角膜上皮細胞シートを作製し、無縫合移植による角膜上皮シート移植を行った。なお、実験の一部では、犬角膜上皮細胞として、実験の過程で樹立した細胞株を用いている。

4. 研究成果

まず、cADMSCs および cBMMSCs を Feeder 細胞として用い、犬角膜上皮シートの作製を行ったところ、いずれの MSCs でも p63 発現を示す、犬角膜上皮前駆細胞を含むシートの作製が可能であったが、Feeder 細胞を用いない場合でも可能であり、犬角膜上皮細胞シートの作製には Feeder 細胞は必要ないと考えられた (図 1)。

また、角膜上皮細胞の増殖や成熟に関与する液性因子として、EGF (上皮細胞成長因子)、HGF (肝細胞成長因子)、KGF (ケラトサイト成長因子) について、Feeder 細胞として用いた場合に、MSCs で発現変化をリアルタイム PCR で評価したところ、いずれの MSCs においても、HGF の有意な発現上昇を示し、HGF はシート作製に有用な液性因子である可能性が示された。一方、自己血清を用いて角膜

上皮細胞シートを作製したところ、角膜上皮細胞の明らかな形態変化がみられたため、自己血清は材料として適さなかった。

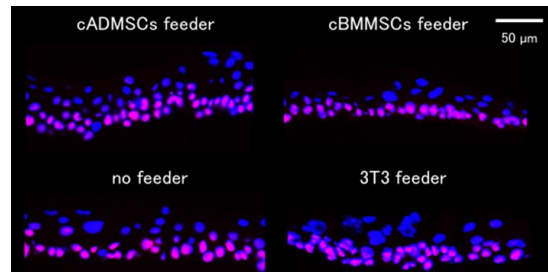


図 1: 各フィーダー細胞を用いて作製した犬角膜上皮細胞シートの p63 (角膜上皮前駆細胞マーカー) 発現。(赤 = p63、青 = DAPI)

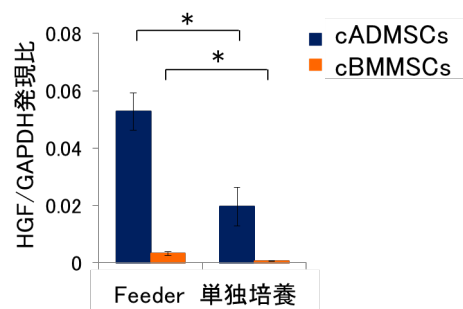


図 2: フィーダー細胞として用いた犬 MSCs において、HGF 発現の有意な上昇がみられた。

このことから、HGF はシート作製に有用な材料となる可能性が考えられたため、HGF 製剤として入手可能であるネコリコンビナント HGF (frHGF) が犬角膜上皮細胞の増殖に与える影響を評価した。まず、frHGF が犬角膜上皮細胞に作用するかを受容体である c-Met のリン酸化から評価したところ、frHGF 添加後 5-15 分で c-Met のリン酸化が起こり、下流経路に存在する ERK1/2 のリン酸化も認められた (図 3)。frHGF は犬角膜上皮細胞の増殖には影響がみられなかったが (図 4)、浸潤能を有意に促進させた (図 5)。したがって、シート作製に有利に働く可能性は低いが、角膜損傷時における点眼薬としての可能性が見出された。また、同様の効果は、猫角膜上皮細胞においても観察可能であった。このことから、予定を若干変更し、犬角膜上皮損傷モデルを作製し、frHGF の点眼薬としての有用性を検討したが、実際の損傷モデルにおいては、コントロールでの修復も早く、有意な損傷治癒促進効果は認められなかったため、今後、臨床例を用いた検討も必要である (図 6)。

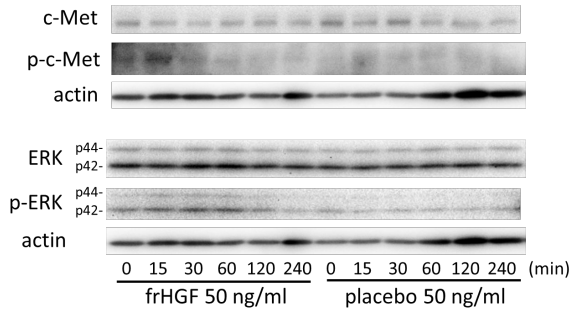


図 3: frHGF 添加後の犬角膜上皮細胞における c-Met および ERK のリン酸化

frHGF 刺激後、15-30 分後に c-Met のリン酸化が亢進し、それに伴うと考えられる、ERK のリン酸化が 60-120 分後にみられた。

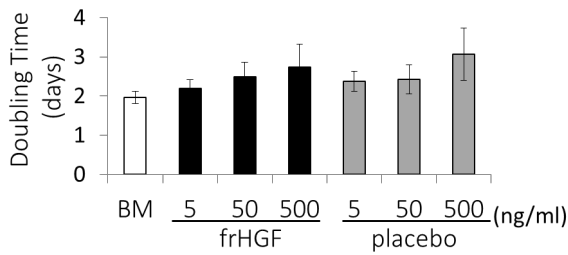


図 4: 犬角膜上皮細胞の増殖能に対する frHGF の影響

増殖能に対する影響は認められなかった。(BM は基礎培地のみ)

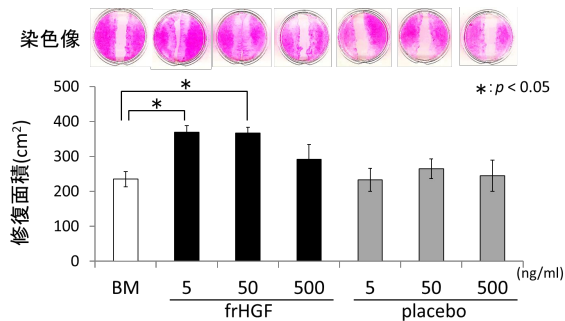


図 5: Invasion Assay による、犬角膜上皮細胞の細胞浸潤に対する frHGF の影響の検討

5-50 ng/ml の frHGF は犬角膜上皮細胞の細胞浸潤能を有意に促進させた。一方、500 ng/ml に frHGF は細胞浸潤能の有意な促進をしめさなかったことから、高濃度の HGF においては、ネガティブフィードバックがかかる可能性も考えられた。

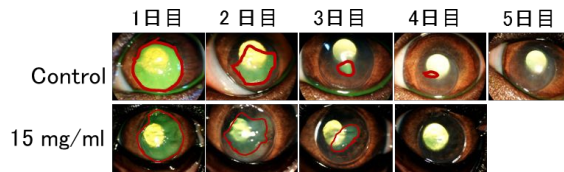
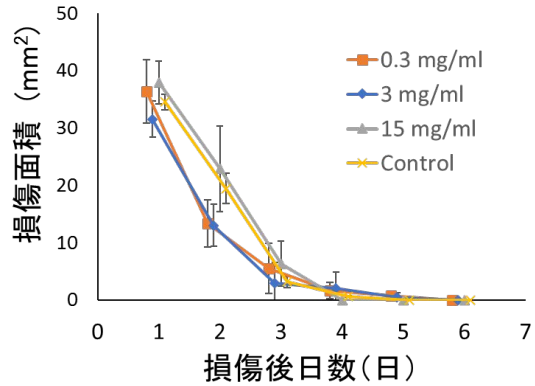


図 6: 犬角膜上皮損傷モデルに対する、frHGF 点眼の効果

フルオロセイン染色で陽性を示す領域を損傷面積とし、経時的に計測した。下図に、対照群 (frHGF 点眼なし) および 15 mg/mL の frHGF を 1 日 3 回点眼した治療群の肉眼所見を示す。15 mg/mL で損傷面積の修復促進傾向がみられたが、有意差はえられなかった。

以上の結果から、Feeder 細胞や成長因子は用いず、犬角膜上皮細胞株を用いてシート培養を行うこととし、作製したシートによる無縫合移植を試みた。角膜上皮損傷モデルを作製したのち、犬角膜上皮細胞株から作製したシートで損傷部を覆い、15 分間静置させたところ、シートは損傷部に定着した (図 8)。術後の経過観察でも、シートの生着が確認でき、無縫合移植が可能であった。また、免疫拒絶などの大きな合併症は認められず、犬角膜上皮細胞株移植の安全性が確認できた。今後、病理組織学的検討を含めた有効性の検討を行い、臨床応用へと発展させる。



図 8 無縫合移植した犬角膜上皮シート (矢頭)

15 分静置により定着し、移植後のフルオロセイン染色も陰性であった。

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2件)

1. Morita M, Fujita N, Takahashi A, Nam ER, Yui S, Chung CS, Kawahara N, Lin HY, Tsuzuki K, Nakagawa T, Nishimura R. Evaluation of ABCG2 and p63 expression in canine cornea and cultivated corneal epithelial cells. *Vet Ophthalmol.* 2015;18(1):59-68. 査読あり
2. Nam ER, Fujita N, Morita M, Tsuzuki K, Lin HY, Chung CS, Nakagawa T, Nishimura R. Comparison of the canine corneal epithelial cell sheets cultivated from limbal stem cells on canine amniotic membrane, atelocollagen gel, and temperature-responsive culture dish. *Vet Ophthalmol.* 2015;18(4):317-25. 査読あり

[学会発表](計6件)

1. 「犬輪部由来角膜上皮細胞の増殖能維持機構の検討」 森田希輔、藤田直己、佐伯亘平、林本考緒道、都築圭子、中川貴之、西村亮平、日本再生医療学会、2017年3月、仙台
2. “Therapeutic effect of feline recombinant hepatocyte growth factor (fr-HGF) on corneal injury in dogs” Morita M, Fujita N, Tsuzuki K, Kinoshita C, Nagakubo D, Muta K, Lin HY, Tanaka U, Hayashimoto K, Nakagawa T, Nishimura R. Annual Congress of Asian Society of Veterinary Surgery. 2016年12月、福岡
3. 「猫角膜上皮細胞に対する猫リコンビナントHGFの作用と点眼薬としての有用性」阿部桃子、藤田直己、木ノ下千佳子、森田希輔、都築圭子、中川貴之、西村亮平、日本再生医療学会、2016年3月、大阪
4. 「無フィーダーで長期継代維持された犬輪部由来角膜上皮細胞の性情解析」 森田希輔、藤田直己、阿部桃子、都築圭子、中川貴之、西村亮平、日本再生医療学会、2016年3月、大阪
5. 「増殖因子及びフィーダー細胞非存在下での培養による犬輪部由来角膜上皮細胞株の樹立とその性情解析」 森田希輔、藤田直己、林本考緒道、都築圭子、中川貴之、西村亮平、日本獣医学会学術集会、2016年9月、藤沢
6. “Regulation of soluble factors in

mesenchymal stem cells cultured as feeder cells for cultivation of corneal epithelial cell sheets in dogs.” Morita M, Fujita N, Nam ER, Abe M, Tsuzuki K, Nakagawa T, Nishimura R., Asian Meeting of Veterinary Surgery, 2014年12月、大阪

[その他]

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/geka/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

都築 圭子 (TSUZUKI, Keiko)

東京大学、農学生命科学研究科、特任助教

研究者番号：30364251