

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08096

研究課題名(和文) 生体内組織形成術を利用した犬角膜バイオ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 canine corneal bio-sheet using in body tissue architecture (iBTA)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：犬角膜内皮細胞の分離培養法をExplant法を用いて検討し、未分化マーカーであるp75と分化マーカーであるZO-1およびNa+K+ATPaseを有する内皮細胞が混在した細胞群を得た。両者を分離するには至らなかった。iBTAを用いた人工犬角膜の作製は犬角膜上皮細胞株とバイオシートのみを用いて行い、犬角膜上皮細胞をバイオシートに播種し、5日間の空気暴露を行うことで重層化上皮をもつ組織を形成することができた。また、犬角膜実質細胞を分離・培養し、筋線維芽細胞への分化誘導法を確立するとともに、肝細胞成長因子が犬角膜実質細胞の筋線維芽細胞分化を抑制することで点眼薬として有用である可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬角膜内皮細胞の培養が可能であることが示された。今後、成熟細胞の誘導や純化を検討する必要があるが、犬の角膜内皮疾患の病態解明などへの応用が期待できる。また、iBTAを用いた角膜組織の作製には至らなかったが、犬角膜上皮細胞がバイオシートに定着し、重層化が誘導された。このことは、バイオシートを用いて体外で他の細胞と融合させた組織体の作製が可能であることを示し、iBTAを用いた組織再生療法において新たなアプローチを提案する。さらに、犬角膜実質細胞の分離培養と筋線維芽細胞分化の検討から、角膜混濁の病態を再現できた。今後、肝細胞成長因子の他、角膜混濁治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We tried to culture canine corneal endothelial cells using explant method, however, the cultured cells consisted of p75-positive immature cells and ZO-1 and Na+K+ATPase-positive mature endothelial cells. It was difficult to isolate mature cells. Therefore, we fabricate an artificial canine cornea only using a canine corneal epithelial cell line and bio-sheet fabricated using iBTA. Canine corneal epithelial cells were successfully cultured on a bio-sheet and 5 days of air exposure induced a sufficient stratified epithelium on the bio-sheet. We also established culture method of canine corneal stromal cells and successfully induced these cells into myofibroblasts. Using this induction system, we revealed that hepatocyte growth factor (HGF) can repress the differentiation from stromal cells into myofibroblasts. This result indicates that HGF can be a promising drug for opacity induced after corneal injury.

研究分野：獣医眼科学

キーワード：犬 角膜損傷 生体内組織形成術 角膜移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで、犬の角膜損傷に対する根治的治療の開発を目的とし、犬角膜上皮細胞株を樹立し、それを用いた犬角膜上皮シートの作製に成功した。犬角膜上皮シートの移植により、良好な上皮再建がえられたが、角膜混濁が残存する課題が残った。一方、近年開発された生体内組織形成術 (iBTA) により作製されたバイオシートは、角膜実質の代替となる移植材料になりうる事が報告された。犬角膜内皮細胞の分離・培養法については不明な点が多いが、角膜上皮細胞と同様に株化可能であれば、犬角膜上皮細胞株、バイオシート、犬角膜内皮細胞株を組み合わせることで、人工的な犬角膜組織の作製が可能となることが期待された。

2. 研究の目的

犬角膜内皮細胞の分離・培養法を確立し、犬角膜上皮シート、バイオシート、犬角膜内皮シートを組み合わせた人工犬角膜の作製を試みる。また、角膜移植に用いる移植材料として有用性及び安全性を検討する。

3. 研究の方法

犬角膜組織片の内皮面をプラスチックシャーレに張り付ける Explant 法により、角膜内皮の培養を試みた。得られた細胞の形態学的評価、角膜内皮細胞マーカー (ZO-1, Na⁺/K⁺ATPase/p75) の発現解析や増殖能を評価した。

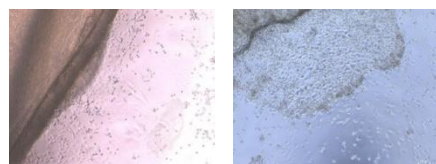
人工犬角膜の作製においては、犬皮下で iBTA を用いてバイオシートを作製し、バイオシート上に角膜上皮細胞株を播種した後、3, 5, 7 日間空気暴露することで、上皮の重層化を促したのち、病理組織学的にバイオシート・重層化上皮組織体の構造を評価した。

一方、犬角膜内皮細胞の分離・培養が難航したため、角膜混濁の原因の一つとなる角膜実質細胞の筋線維芽細胞分化について検討することを目的とし、計画を一部変更した。犬角膜実質の分散培養により得られた細胞を血清含有培地および無血清培地で培養し、得られた細胞の形態学的評価・犬角膜実質細胞マーカー (ALDH3A1)、筋線維芽細胞マーカー (α SMA) の発現解析を行った。また、近年、角膜混濁の治療薬として期待されている肝細胞成長因子 (HGF) が角膜混濁の原因となる筋線維芽細胞への分化を抑制しうるかを検討した。

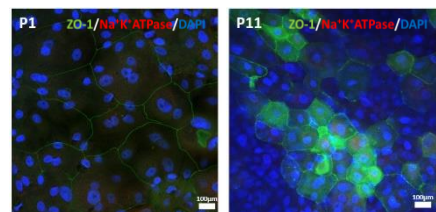
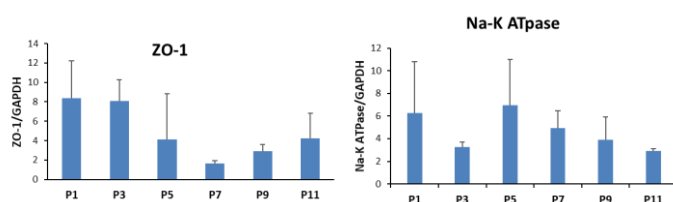
4. 研究成果

犬角膜内皮細胞の培養

Explant 法による培養 3 日目に、角膜組織片からシャーレ上に付着して増殖する上皮細胞が観察され、コロニーを形成した【図 1】。この細胞は継代後も増殖能を維持し、ZO-1 および Na⁺/K⁺ATPase の遺伝子発現は継代後も維持された。また、これらマーカーのタンパク発現は継代後の細胞でより安定的に強く発現する傾向がみられた【図 2】。一方、神経堤幹細胞マーカーである p75 発現もこれらの内皮細胞マーカーと同様に上昇した【図 3】。したがって、Explant 法により犬角膜内皮細胞の培養が可能で、継代により未分化な犬角膜内皮細胞が選択的に純化される一方で、バリア機能やポンプ機能を有する分化した犬角膜内皮細胞が共存しながら増殖が維持されたと考えられた。

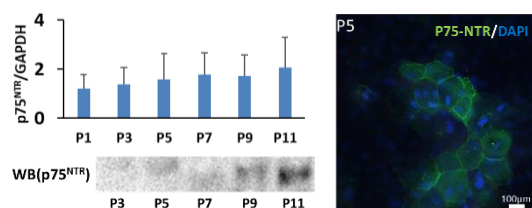


【図 1】培養 3 日目に組織片より増殖して広がる細胞が得られ(左)、培養 6 日目にはコロニーが形成された(右)



【図 2】初代培養細胞から第 11 継代細胞において、角膜内皮細胞マーカーの遺伝子発現が維持された。免疫染色では ZO-1 および Na⁺/K⁺ATPase の発現は継代により、細胞膜により明瞭にみられる傾向をみとめた。

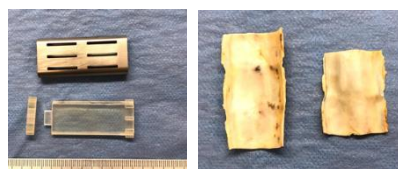
しかし、ZO-1/Na⁺/K⁺ATPase 発現を有する細胞の純化は困難であり、移植可能な角膜内皮シートの作製には、未分化状態で維持された細胞を適切な方法で分化誘導する方法を検討する必要があると考えられた。現在、スフェア培養による p75 陽性犬内皮細胞の純化培養を試みており、今後分化型内皮細胞への誘導法をさらに検討する予定である。



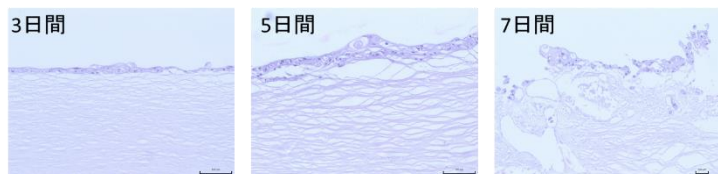
【図 3】初代培養細胞から第 11 継代細胞において、神経堤幹細胞マーカーである p75 の遺伝子発現が維持され、タンパク発現は継代により増加する傾向がみられた。

人工犬角膜の作製

犬角膜実質の代替となるバイオシートの鑄型を作製し、犬皮下に埋め込むことで、バイオシートの作製が可能であった(図4)。バイオシート表面に犬角膜実質細胞が定着したが、重層化に至るには5日間の空気暴露が必要であった。7日以上の空気暴露は組織の脆弱化を招いたことから、バイオシート上での角膜上皮細胞層の作製には5日間の空気暴露が適していることが明らかとなった(図5)。犬角膜内皮細胞の培養が困難であったため、3層構造をもつ人工犬角膜の作製には至らなかった。



【図4】鑄型(左)と犬皮下で作製したバイオシート(右)

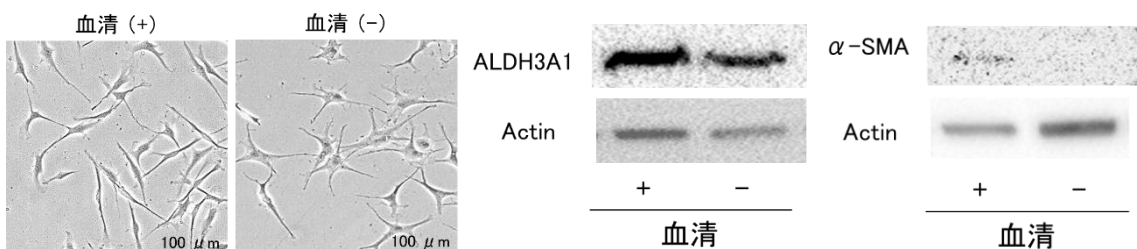


【図5】バイオシート上に犬角膜上皮細胞株を播種し、数日間培養した後、空気暴露を3.5, 7日間行った。重層化は5日目以降でみられたが、7日目行くと組織の脆弱化がみられた。

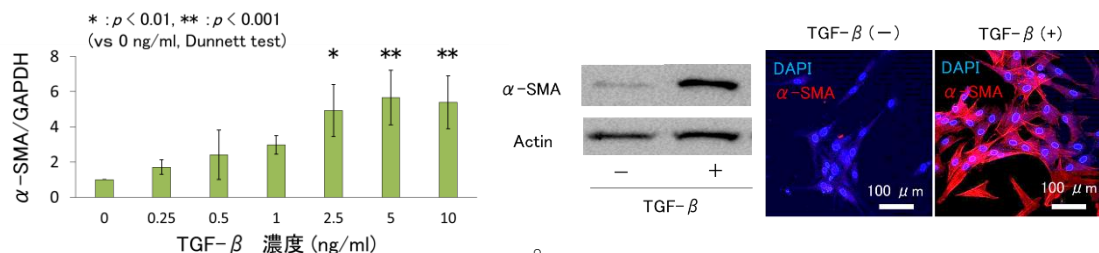
犬角膜実質の分離・培養

犬角膜内皮細胞の分離・培養が困難であったため、一部計画を変更し、角膜損傷後の混濁原因となる角膜実質細胞の筋線維芽細胞分化について検討することとし、犬角膜実質細胞の分離・培養と筋線維芽細胞分化を試みた。

犬角膜組織を酵素処理して得られた細胞を血清含有培地および無血清培地にて培養したところ、血清培地で増殖能の高い線維芽細胞様細胞が得られ、無血清培地では増殖能が低く、複数の樹状突起を持つ形態を示す細胞が得られた。また、これらの細胞はいずれも角膜実質細胞マーカーであるALDH3A1を発現しており、血清含有培地での培養により筋線維芽細胞マーカーである α -SMAの発現もわずかに検出され、無血清培地では角膜実質細胞が得られた一方で、血清刺激により活性型角膜実質細胞として増殖能を得たと考えられた【図6】。さらに、活性型角膜実質細胞をTGF- β 刺激することで、 α -SMA発現が上昇し【図7】、筋線維芽細胞へと分化誘導されることが示唆された。

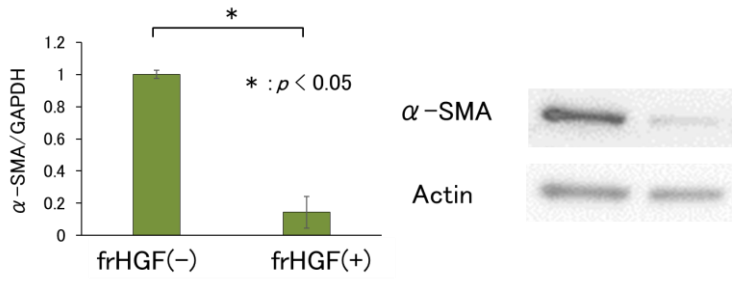


【図6】犬角膜組織を酵素処理により分散し、血清含有培地および無血清培地にて培養した。いずれの細胞も角膜実質細胞マーカーであるALDH3A1を発現していたが、血清含有培地では増殖能が高く、 α -SMA弱陽性の線維芽細胞様細胞で、無血清培地では複数の樹状突起を持つ増殖能の低い細胞であり、無血清培地では角膜実質細胞が、血清含有培地では活性型角膜実質細胞が得られたと考えられた。

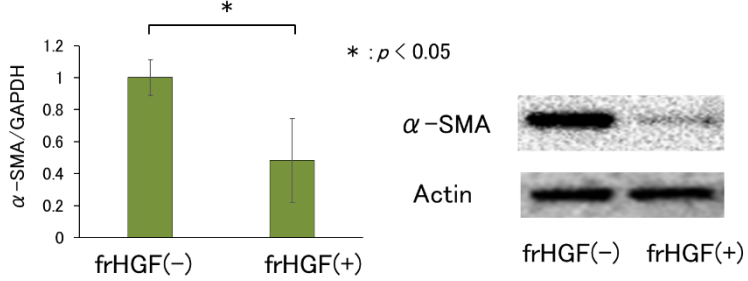


【図7】活性型角膜実質細胞はTGF- β 濃度依存的に α -SMA発現の上昇を示す。5 ng/mLのTGF- β 刺激による α -SMAの発現変化をウェスタンブロットおよび免疫細胞染色により示す。

次に、近年、角膜混濁の抑制効果が報告されている肝細胞成長因子(HFG)が筋線維芽細胞の分化抑制効果を有するかを、TGF- β 刺激による筋線維芽細胞分化にリコンビナント猫HGF(frHGF)を添加して検討した。その結果、frHGFの添加により、 α SMA発現が有意に抑制され、筋線維芽細胞分化抑制効果を有することが示された【図8】。また、筋線維芽細胞分化後の細胞にfrHGFを添加した場合でも α -SMA発現は有意に抑制され【図9】、HGFは筋線維芽細胞から角膜実質細胞への脱分化作用も有することが示唆され、frHGFが角膜混濁に対する点眼薬として有用であることが期待された。



【図 8】5 ng/mL の TFG- β 刺激による活性型角膜実質細胞からの筋線維芽細胞へ分化誘導に対し、frHGF (50 ng/mL) を添加したところ、 α SMA 発現上昇の有意な発現低下を認めた。



【図 9】5 ng/mL の TFG- β 刺激による活性型角膜実質細胞からの筋線維芽細胞へ分化誘導後、frHGF (50 ng/mL) を添加したところ、 α SMA 発現上昇の有意な発現低下を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morita Maresuke, Fujita Naoki, Abe Momoko, Hayashimoto Koji, Nakagawa Takayuki, Nishimura Ryohei, Tsuzuki Keiko	4. 巻 171
2. 論文標題 Canine corneal epithelial cells possess a sustained proliferative capacity and generate a spontaneously derived cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 155 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2018.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nam E, Fujita N, Morita M, Lin HY, Endo K, Nakagawa T, Nishimura R, Tsuzuki K.	4. 巻 80
2. 論文標題 A pilot study of transplanted of an autologous corneal epithelial cell sheet in a canine model of corneal injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Vet Res	6. 最初と最後の頁 772-777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita M, Fujita N, Abe M, Hayashimoto K, Nakagawa T, Nishimura R Tsuzuki K	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Canine corneal epithelial cells possess a sustained proliferative capacity and generate a spontaneously derived cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2018.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koji Hayashimoto, Naoki Fujita, keiko Tuzuki Ryohei Nishimura
2. 発表標題 Trial of canine corneal endothelial cell cultivation
3. 学会等名 8th Annual Congress of Asian Society of Veterinary Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	中山 泰秀 (Nakayama Yasuhide) (50250262)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	