

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591947

研究課題名（和文）角膜内皮の健全性に関与する原始繊毛の存在意義の解明

研究課題名（英文）Investigation of importance of existence of the primary cilia involved in viability of the corneal endothelium.

研究代表者

谷岡 秀敏（TANIOKA HIDETOSHI）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：90171834

研究成果の概要（和文）：米国アイバンクより提供され、移植に使用した角膜の内皮細胞を調べると、死細胞が5%程度存在していた。角膜移植後の内皮細胞数減少の一因として、保存中の死細胞増加が考えられた。また、ウサギ角膜を移植時と同様の角膜保存液を用いて4℃の状態では保存すると、角膜内皮細胞に存在する原始繊毛が消失したが、37℃で培養することにより再出現した。原始繊毛の存在は細胞の *viability* と何らかの関係があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We examined corneal endothelia of donor eyes which were provided by the U.S. Eye-bank and were used for corneal transplantation, and we found that about 5% of dead cells were present in the endothelial cells. It was considered that the increase of dead cells during storage might cause decrease of the number of the endothelial cells after corneal transplantation. In addition, when the rabbit cornea was stored at 4 °C in the corneal storage media, primary cilia in the corneal endothelial cells were disappeared, and they were reappeared after recovery culture at 37 °C. The presence of primary cilia was thought to have some kind of relationship to viability of corneal endothelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,00	1,050,000	4,550,000

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：角膜内皮、原始繊毛、角膜移植、角膜保存液、組織学的検査

## 1. 研究開始当初の背景

米国および日本においては、献眼された角膜は角膜保存液（Optisol-GS®）中に低温で数日保存されたのち角膜移植に使用されている。角膜移植後には一定量の角膜内皮細胞の減少が認められることが知られている。

角膜の透明性維持に重要な役割を果たしている角膜内皮細胞には、腎臓の尿管上皮細胞や原始結節の細胞と同様に原始繊毛が

存在することが報告されているが、その機能は未だ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

我々は、角膜移植時のドナー角膜組織を用いた組織学的研究を行い、保存液中で一定期間低温保存されたドナー角膜組織の角膜内皮細胞の中に、*viability* が低下した細胞が存在していることに気付いた。そこで本研究で

は、米国より提供を受けたドナー角膜組織を用いて、viability の低下した内皮細胞の出現率および、角膜内皮細胞の viability と形態学的、組織学的異常の関係について検討を行う。また、角膜保存液で保存された角膜の内皮細胞に存在する原始繊毛の変化を組織学的に検討し、原始繊毛の存在意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) Optisol-GS<sup>®</sup>中に保存され、角膜移植に使用した中央部以外の周辺部角膜の内皮について、viability を調べるために Propidium Iodide (PI), Hoechst 33342, Calcein-AM を用いた 3 重染色を実施した。撮影した写真より、全細胞数と PI 陽性細胞数より死細胞率を算出した。

(2) (1)のサンプルについて、PI で核が染色される細胞の組織学特徴を詳細に検討するため、アポトーシス細胞を染色するアネキシン V (緑色)、間葉系細胞の細胞骨格を構成する中間径フィラメントであるビメンチンと特異的に反応する抗ビメンチン抗体 (黄色) で染色した。

(3) (1)のサンプルより透過電顕用エポンプロックを作製し、厚切り切片をトルイジンブルー染色した。

(4) (1)のサンプルを 37°C で培養した場合の PI 陽性の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で三次元観察した。また、経時的变化をタイムラプス観察した。

(5) 日本白色種家兎の角膜を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、原始繊毛に結合する抗アセチル化  $\alpha$  チューブリン抗体で緑色、アクチン線維を認識するローダミン-ファロイジンを赤色、核を DAPI で青色に染色し、共焦点レーザー顕微鏡で三次元観察した。

(6) 日本白色家兎の新鮮角膜を Optisol-GS<sup>®</sup>中で 4°C 保存した際に、角膜内皮細胞の原始繊毛がどのように変化するかを、抗アセチル化  $\alpha$  チューブリン抗体 (緑色) および DAPI (青色) で染色し観察した。また、Optisol-GS<sup>®</sup>中での保存後に 37°C の培養液を用いて回復培養したサンプルについても同様に検査した。

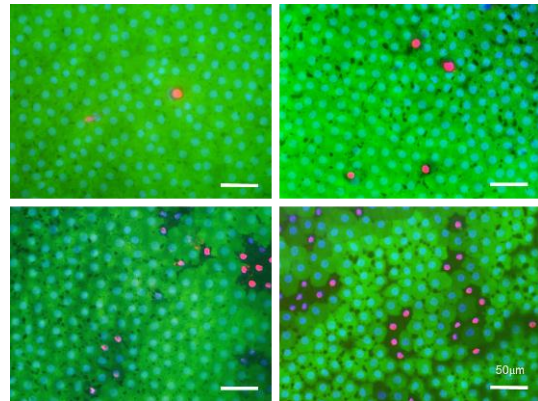
(7) (6)のサンプルを 2.5%グルタルアルデヒドで固定し、角膜内皮細胞表面の状態を走査型電子顕微鏡で観察した。

(8) SV40 large T antigen と hTERT のプラスミドをレンチウイルスで感染させて作製した不死化ウサギ角膜内皮細胞を Optisol

-GS<sup>®</sup>中で保存した際の変化について観察した。

### 4. 研究成果

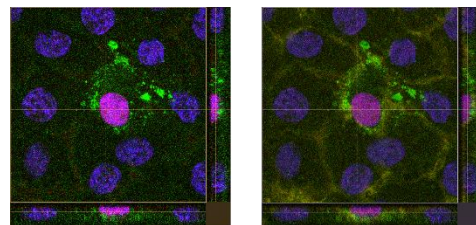
(1) Optisol-GS<sup>®</sup>中に保存され、角膜移植に使用した中心部以外の周辺部角膜の内皮中に Calcein-AM 陽性の生細胞の中に、PI 陽性の核を有する viability の低下した細胞が認められた。



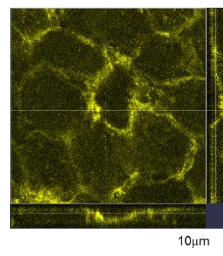
検査した 28 例で、総内皮細胞のうち、平均 4.9%の細胞核が PI で赤く染色された。これらの細胞は細胞質が Calcein-AM 陰性であり、死細胞の状態であることが分かった。

No.	死細胞率 (%)	細胞密度 (cells/mm <sup>2</sup> )	年齢 (y)	死後保存までの時間 (hrmm)	保存期間 (day)	性別	死因
1	10.5	2143	72	3:55	6	F	Cancer-Colon
2	10.5	2613	50	11:05	5	M	Blunt Force Trauma
3	10.4	2994	72	6:25	6	M	Cancer-Lung
4	10.1	2616	64	5:40	6	M	Closed Head Injury 27ATV
5	10.1	2924	56	5:53	7	F	Pulmonary HTN
6	9.8	2724	53	17:16	3	M	Cerebral Vascular Accident
7	8.3	2510	66	5:31	7	M	Myocardial Infarction
8	8.5	2646	73	21:20	6	F	Acute MI
9	6.1	2945	62	14:53	7	M	Intestinal Hemorrhage
10	6.0	2645	49	7:22	5	M	Myocardial Infarction
11	5.8	2788	70	7:11	4	F	Cancer-Ovarian
12	5.7	2726	74	7:56	4	F	Dissecting Aortic Aneurysm
13	4.8	3069	51	6:23	4	M	End Stage Liver Disease
14	4.5	3548	64	5:13	4	F	Aspiration
15	4.3	3003	26	12:45	6	M	Ovitic Fibrosis
16	4.1	3251	37	17:58	5	F	Blunt Force Head Trauma
17	3.6	2647	41	3:59	7	M	Acute Cardiac Dysrhythmia
18	3.0	2907	43	21:11	6	F	Myocardial Infarction
19	2.5	3106	64	5:45	6	F	Cancer-Esophagus
20	2.0	2884	51	5:55	7	M	Anoxic Encephalopathy
21	1.9	2986	66	6:30	6	M	Cancer-Colon
22	1.5	2805	39	3:59	5	M	Anoxic Encephalopathy
23	1.2	2813	62	7:09	5	M	Ruptured Spleen
24	1.1	2571	66	5:15	7	M	Acute MI
25	1.0	2511	48	7:05	7	M	Dilated Cardiomyopathy
26	0.8	2684	26	4:54	7	F	Ovitic Fibrosis
27	0.6	2929	52	15:35	5	M	Gunshot Wound to Head
28	0.5	3330	70	9:32	6	F	Constrictive Heart Failure

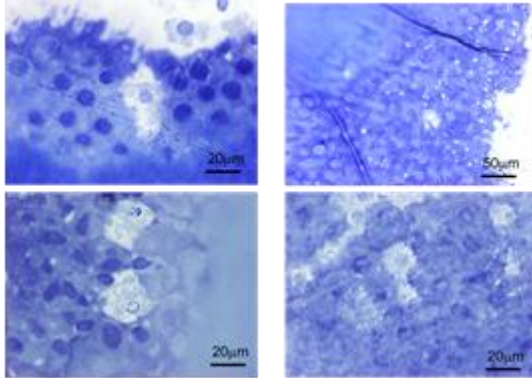
(2) PI で核が染色される細胞は、アネキシンに陽性であったことから、アポトーシスを起こしていると考えられた。また、これらの細胞は抗ビメンチン抗体に陰性であった。



• PI (red) : dead cell nuclei  
 • Annexin V (green) : combine with phosphatidyl-serine at the surface of apoptosis cells  
 • Hoechst33342 (blue) : living-cell nuclei  
 • Anti-Vimentin antibody (yellow) : combine with vimentin (one of the cytoskeleton proteins)

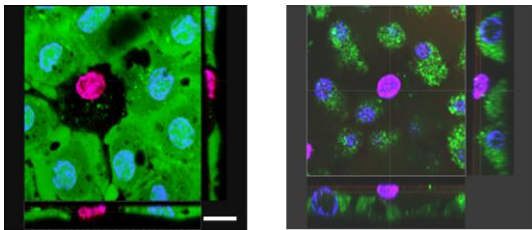


(3) 電顕用エポンブロックより作製した厚切り切片のトリジンブルー染色では、細胞質が淡染した細胞が認められた。

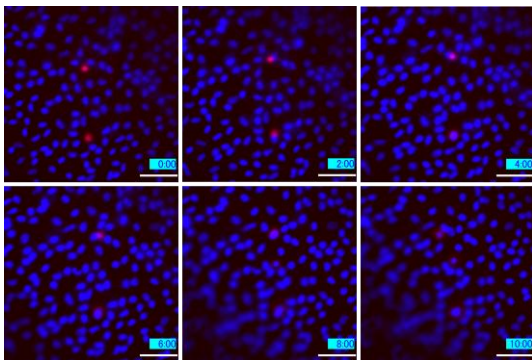


以上より、核が PI 陽性を示した細胞は細胞骨格等の細胞成分が乏しいアポトーシスの状態であることが分かった。

(4) 培養細胞の共焦点レーザー顕微鏡観察において、死細胞は培養前には生細胞と同一平面上に認められたが、培養1日後では生細胞より浮き上がった位置に観察された。

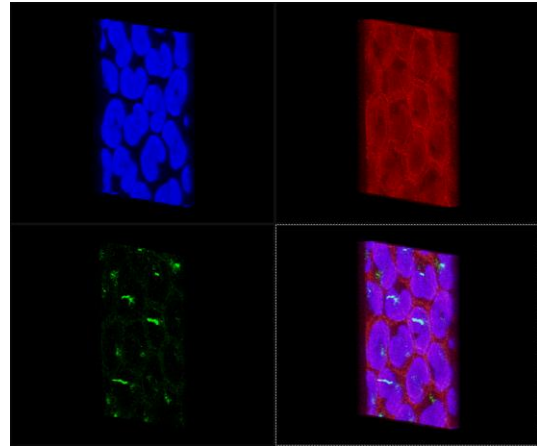


さらにタイムラプス観察では、PI 陽性の死細胞の核が生細胞によって押しつけられるように移動し、脱落する様子が観察された。生体においても、内皮の死細胞は同様な脱落様式を示すと考えられた。

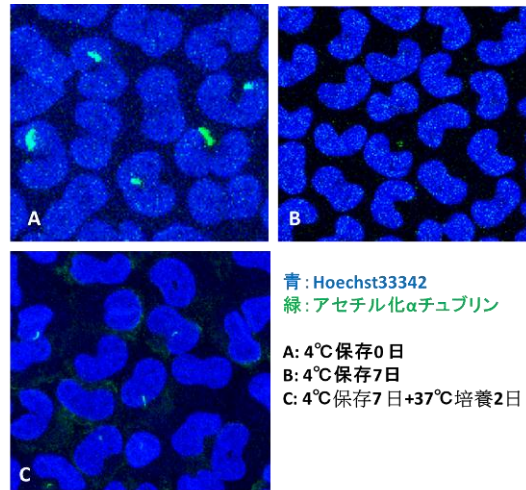


(5) ウサギ角膜内皮の原始繊毛に結合する抗アセチル化 $\alpha$ チューブリン抗体で緑色、アクチン線維を認識するローダミンファロイジンを赤色、核を DAPI で青色に染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で立体観察を行ったところ、角膜内皮細胞表面から伸びる原始繊

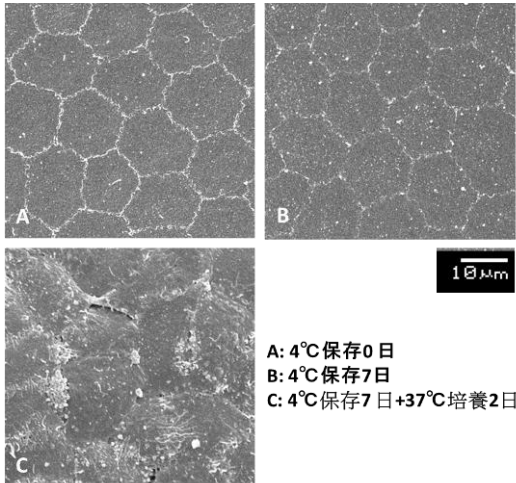
毛が観察された。



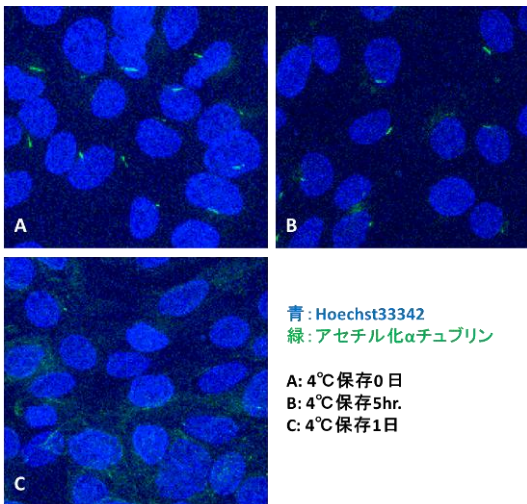
(6) 摘出直後の日本白色家兔角膜では、抗アセチル化 $\alpha$ チューブリン抗体陽性の原始繊毛を有する細胞が約 20%の内皮細胞に認められた。保存7日後では抗体に陽性を示す原始繊毛は観察されなかった。しかし7日間保存した組織を 37°Cで2日培養したところ、原始繊毛を有する内皮細胞が再び観察された。



(7) (6) のサンプルの一部を走査型電子顕微鏡で観察したところ、摘出直後には角膜内皮細胞表面に突出した1本の原始繊毛が認められ、4°C保存による原始繊毛の消失と保存後の培養による原始繊毛の再出現が観察された。



(8) SV40 large T antigen と hTERT のプラスミドをレンチウイルスで感染させた不活化ウサギ角膜内皮細胞を培養し、保存液中に4°Cで保存したところ、5時間で原始繊毛の減少が観察され、保存1日で原始繊毛の消失が観察された。



ウサギ角膜内皮の原始繊毛は、角膜保存液中低温で保存すると消失するが、回復性がある変化と考えられた。

本研究において、角膜保存液で保存されたドナー角膜中には viability の低下した細胞が約 5%含まれていることが判明し、角膜移植後の内皮細胞密度の低下に関連する可能性があると考えられた。また、ウサギ角膜内皮に存在する原始繊毛は角膜保存液中に低温で保存すると消失し、37°Cで培養すると再出現することから、ヒトの角膜移植後には生体内でドナー由来の内皮細胞にも原始繊毛が発現し内皮機能の回復と関連しているものと考えられた。また、角膜内皮細胞における原始繊毛の存在は細胞の viability と何らかの関係があることが判明した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 4 件)

① 谷岡 秀敏、Disappearance and Reappearance of Cilia of Corneal Endothelium Preserved in Corneal Preservation Media、ARVO2013、2013年5月6日、Washington State Convention Center、Seattle、米国

② 谷岡 秀敏、角膜保存液中に保存されたウサギ角膜内皮細胞の原始繊毛の変化、角膜カンファランス 2013、2013年2月15日、白浜町立総合体育館、和歌山県

③ 谷岡 秀敏、The Existence of Dead Cells in Corneal Endothelium Preserved with Storage Media、ARVO 2010、2010年5月4日、Fort Lauderdale Convention Center、Fort Lauderdale、米国

④ 谷岡 秀敏、ドナー角膜内皮細胞中の死細胞の組織学的検討、第114回日本眼科学会総会、2010年4月15日、名古屋国際会議場、愛知県

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷岡 秀敏 (TANIOKA HIDETOSHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 90171834

### (2) 研究分担者

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 30116024

篠宮 克彦 (SHINOMIYA KATSUHIKO)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 50585289

野口 敦司 (NOGUTHI ATSUSHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 00515992

(H22 年のみ)