

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580437

研究課題名(和文) 羊膜を基質として作製した犬角膜上皮細胞シートを用いた犬の角膜再生治療

研究課題名(英文) Corneal Regeneration Therapy with limbal epithelial cell sheet cultivated on amniotic membrane in dogs

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：犬の羊膜を基質として、犬角膜上皮シートの作製に成功した。さらに、基質にアテロコラーゲンゲルを用いることにより、犬羊膜基質よりも角膜上皮の未分化性がより維持された角膜上皮シート作製が可能であることを見出した。作製した犬角膜上皮シートを角膜上皮損傷モデルに移植したところ、移植により角膜混濁の縮小がみられ、病理組織学的には角膜上皮の主要な構成タンパクであるケラチン3や、未分化性の指標となるマーカーであるp63の発現が維持された、正常角膜上皮の再生が認められた。しかし、移植による角膜上皮の過形成を疑う所見が得られ、今後の臨床応用には、より長期的な移植の安全性・有効性を観察する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Canine corneal epithelial cell sheets were successfully cultivated on canine amniotic membrane. Further investigation revealed that more immature corneal epithelial cells were sustained in epithelial cell sheets cultivated on atelocollagen substrate. Transplantation to canine corneal injury model was performed and reduction of corneal opacity was observed in transplanted group. Additionally, histopathological evaluation revealed that transplanted corneal epithelial cell sheet successfully exhibited K3 (differentiated corneal epithelial cell marker) and p63 (immature marker of corneal epithelial cells). However, hypercellularity of transplanted corneal epithelial cells were observed and more long-term investigation on safety and efficacy of transplantation of corneal cell sheet should be needed for clinical application in the future.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学・臨床獣医学

キーワード：再生医療 角膜上皮シート 角膜損傷

1. 研究開始当初の背景

犬では重度角膜損傷が多く発生するが、既存の結膜移植などの外科的治療では角膜の混濁や色素沈着が残存し、視覚を消失する症例も少なくない。角膜上皮シート移植は既に人では臨床応用され、角膜再生医療として良好な成績が報告されている。犬においても角膜上皮シートを作製し、移植できれば、犬の角膜再生医療として臨床応用可能であると考えられた。

2. 研究の目的

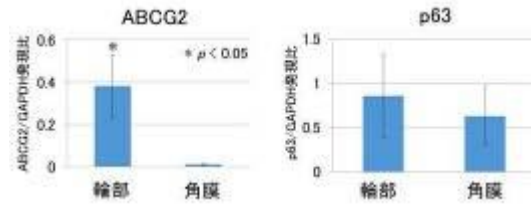
まず、犬角膜輪部より角膜上皮細胞を培養し、犬角膜上皮の幹細胞マーカーおよび分化マーカーを決定し、角膜再生の指標となるマーカーを検討することを目的とした。その後、それらのマーカー発現を評価に加え、犬羊膜を基質として犬角膜上皮シート作製を試み、正常組織との比較により、シートの品質を評価することとした。さらに、犬角膜上皮損傷モデルを作製し、移植の安全性および有効性を検討することとした。

3. 研究の方法

正常犬角膜組織において、ヒトやげっ歯類で角膜上皮幹・前駆細胞マーカーとして用いられている ABCG2 および p63 発現および角膜上皮分化マーカーである K3 発現を調べた。ABCG2 および p63 発現については継代培養した角膜上皮細胞における継時的変化を qPCR にて定量し、増殖や分化との関連を調査した。羊膜を基質とした犬角膜上皮シート作製では、播種細胞密度や空気暴露等の期間を検討し、移植に有効とされる幹・前駆細胞マーカー発現の高い細胞シートが作製される条件を検討した。シート作製条件の最適化を行った後、健康ビーグル犬を用いて角膜上皮損傷モデルを作製し、移植後 60 日間観察するとともに、安楽殺後に病理組織学的評価を行い、移植の安全性及び有効性を検討した。

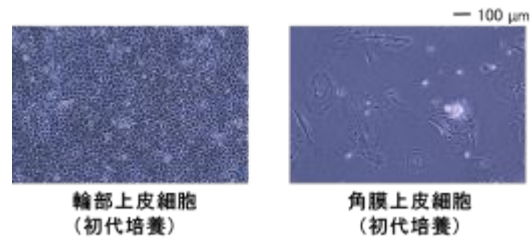
4. 研究成果

(1) 正常犬角膜組織を用いた免疫組織染色において、ABCG2 発現は角膜輪部基底層に局限しており、p63 は角膜全域に発現がみられるものの、輪部において強い発現がみられた。遺伝子発現量の比較からは、輪部における ABCG2 は中央角膜の 32.8 倍であり、p63 発現では有意な差はなかったものの、輪部で高い発現傾向にあった【図 1】。



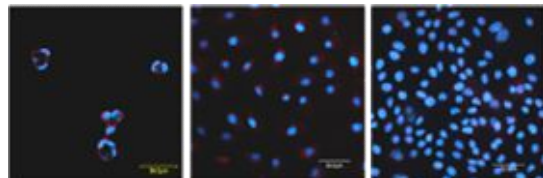
【図 1】犬輪部および中央角膜組織における ABCG2 および p63 発現

(2) 輪部由来角膜上皮細胞は小型で増殖能力が高く、継代可能であった一方、中央角膜由来上皮細胞は大型で増殖能力が低く、継代不可能であった。(図 2)



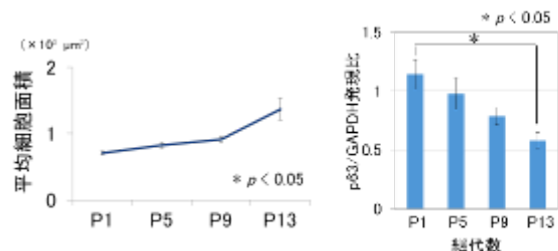
【図 2】犬の角膜輪部由来および中央角膜由来上皮の初代培養細胞

第 1, 5, 9, 13 継代時の輪部由来上皮細胞において、ABCG2 発現は免疫染色では同定されず、遺伝子発現も輪部組織と比較し、極めて低い発現であった。そこで、初代培養細胞の培養初期において免疫染色を行ったところ、培養初日には発現がみられたものの、3 日目には低下し、5 日目にはほぼ消失していた【図 3】。



【図 3】犬の角膜輪部由来上皮細胞の ABCG2 発現の変化(左)培養初日(中央)3 日目(右)5 日目

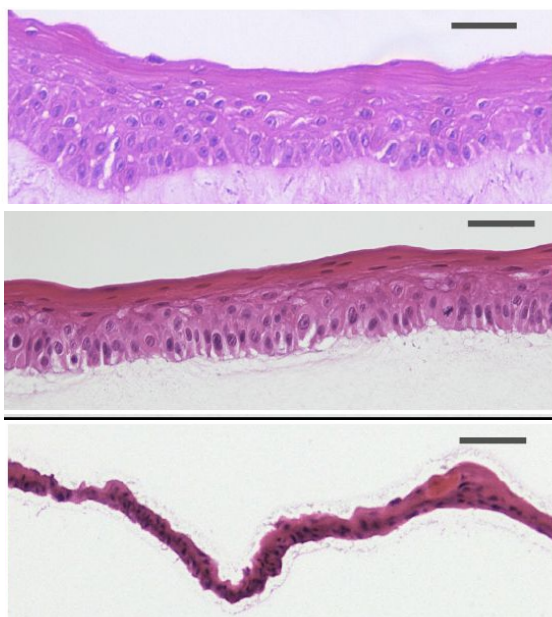
一方、p63 発現は免疫染色では維持されていたが、リアルタイム RT-PCR の解析からは、継代に伴い次第に発現量が低下し、細胞の肥大化と関連することが示唆された【図 4】。



【図 4】継代に伴う細胞面積と p63 発現の変化

また、継代を行った細胞において、角膜上皮分化マーカーである K3 の発現も同時に確認した。以上の事から、輪部には犬角膜上皮幹細胞あるいは前駆細胞が存在しており、ABCG2 は高い増殖能力を示す角膜上皮幹・前駆細胞の初期に発現し、幹細胞マーカーとして有用であることが示唆された。また、p63 は増殖能力の高い角膜上皮前駆細胞マーカーとして有用であり、発現量は細胞の増殖能や分化状態を示唆することから、犬角膜上皮シートの品質評価に有用なマーカーとなり得ると考えられた。

(3)犬羊膜上で輪部由来上皮細胞を培養することで、犬正常角膜に類似した構造を示す角膜上皮シートの作製が可能であった。さらに、羊膜以外にも豚由来アテロコラーゲンを基質としたコラーゲン上角膜上皮シートや温度応答性培養皿を用いたシート作製も可能であった【図5】。

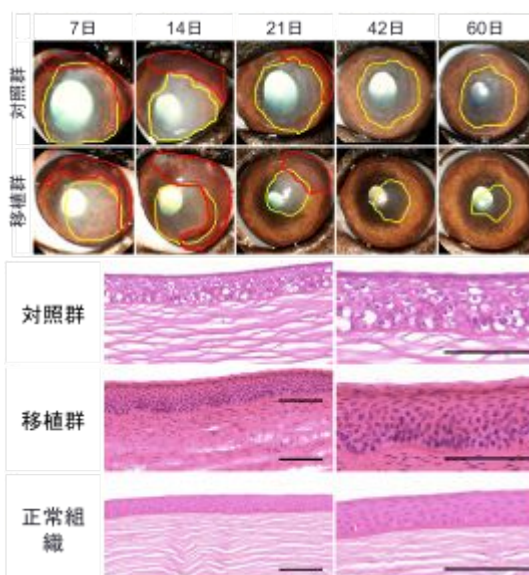


【図5】各シートのH&E染色
 (上)羊膜上犬角膜上皮シート
 (中)コラーゲン上犬角膜上皮シート
 (下)温度応答性培養皿で作製した犬角膜上皮

p63 発現量を指標とした評価では、コラーゲン上で作製した場合に最も高い発現量が維持されていた。

さらにシート作製条件において、空気暴露後、5日目のシートで最もp63発現の上昇がみられることを明らかにした。

(4)以上の結果から、コラーゲン上で作製し、5日間空気暴露した犬角膜上皮シートを、犬角膜損傷モデルへ移植し、安全性と有効性を検討したところ、移植により、角膜混濁面積の縮小がみられ、病理組織学的評価からは正常角膜と類似した組織学的再構築を示した。一方、移植を行わず、自然治癒に至った損傷角膜では損傷部が正常角膜上皮と異なり、K3発現やp63発現を示さない類円形細胞で満たされていた【図6】。



【図6】移植結果
 (上)肉眼所見:血管浸潤(赤)と角膜混濁(黄)の変化
 (下)移植後2か月後の角膜病理組織像(H&E染色)

さらに移植群では、シート移植部直下の実質においても、実質細胞の増殖が示唆され、上皮シート移植は実質の修復にも有効であることが示唆された。しかし、移植シートにおいて過増殖による角膜の重層化亢進が認められ、今後より長期的な観察を含めて安全性を検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Maresuke 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. *Veterinary Ophthalmology* 2014 (in press). DOI:10.1111/vop.12147, 査読あり

2. Nam ER., Takahashi A., Fujita N., Tsuzuki K., Nishimura R. Cultivation of corneal epithelial cell sheets on canine amniotic membrane. *Veterinary Ophthalmology* 2013; 16(4): 263–268, 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 「犬におけるコラーゲンを基質とした自己角膜輪部由来角膜上皮シート移植の安全性および有用性の検討」南很列(2014年2月8日、獣医内科学アカデミー、横浜)

2. “Development of cultivated corneal cell sheet using limbal stem cells” Nam ER. (2013年11月6日 American College of Veterinary Ophthalmologist Annual Conference、プエルトリコ)

3. 「犬角膜上皮細胞シート作製に用いるフィーダー細胞の検討」森田希輔(2013年9月22日、日本獣医学会学術集会、岐阜)

4. 「犬の角膜上皮幹細胞の局在と幹細胞マーカーの評価」森田希輔(2013年2月23日、獣医内科学アカデミー、横浜)

5. 「コラーゲンを基質とした犬角膜上皮シートの作製」南很列(2012年9月16日 日本獣医学会学術集会、岩手)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vn.a.u-tokyo.ac.jp/geka/index.html>

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