

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861639

研究課題名(和文) 高品質培養再生角膜上皮細胞シート作製法の開発

研究課題名(英文) Development of high quality corneal epithelial cell sheet

## 研究代表者

上松 聖典 (UEMATSU, Masafumi)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：30380843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では重篤な角膜疾患の治療に使用する培養角膜上皮細胞シートの品質を電気抵抗値(TER)で評価し、質の高いシートを移植に使用できるか検討した。角膜上皮細胞シートの細胞間結合が密になるとTERは上昇した。ウサギ角膜にTERの高い角膜上皮細胞シートを移植したところ、生着することが確認された。臨床で用いる角膜上皮細胞シートでも、TER評価で移植後の状態を予測できる可能性が高くなった。

さらに角膜上皮の質を悪化する要因として、移植後に投与する点眼薬の防腐剤の塩化ベンザルコニウムがあったが、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などの添加で、角膜上皮細胞シートの質を保つことができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the quality of the cultivated corneal epithelial cell sheets used for treatment of severe corneal diseases was evaluated by the corneal transepithelial electrical resistance (TER). TER increased after construction of tight junctions among the corneal epithelial cells. The corneal epithelial cell sheets with high TER value were successfully transplanted to the rabbit cornea. It is confirmed that evaluation of TER have a potential to prognosticate the results of corneal epithelial cell sheet transplantation clinically.

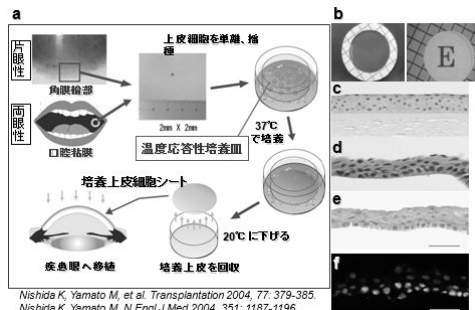
Furthermore, the factors that would affect the quality of the corneal epithelial cells are examined by TER study. Especially benzalkonium chloride in eye drops used after corneal transplantation damaged the corneal epithelium. However additives such as polyoxyethylene castor oil have a protective effect on corneal damage by benzalkonium chloride.

研究分野：眼科学

キーワード：眼科 角膜 経上皮電気抵抗値 再生医療 薬物毒性

## 1. 研究開始当初の背景

近年再生医療は様々な臓器や組織に行われるようになったが、特に角膜上皮の再生医療は最先端かつ優れた医療の一つである。角膜上皮再生治療は1997年にPellegriniらにより患者自身(自家)の幹細胞・前駆細胞を用いた培養角膜上皮移植法として初めて報告された。しかし、両眼性疾患に適応できないことや酵素処理による細胞シートの品質低下が問題視された。そこで2004年西田らは両眼性疾患にも適応可能で、基質および酵素処理を必要としない、独自の自家培養上皮細胞シート移植法を世界に先駆けて開発した。

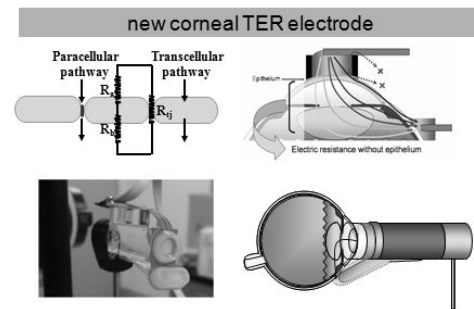


片眼性疾患の場合には、健常眼の輪部、両眼性疾患の場合には口腔粘膜より少量の組織を採取し、上皮幹細胞・前駆細胞を温度応答性培養皿上で培養した。この自家培養上皮細胞シートは非侵襲的に温度応答性培養皿から回収され、角膜上皮幹細胞疲弊症の角膜に移植された。これまでに多くの症例で角膜透明性が長期間維持されている。

しかし、再生角膜上皮は正常の角膜上皮より障害を受けやすく、バリア機能が低下していると考えられる。また、このため血管侵入が次第に増強する場合がある。培養上皮細胞シート移植の治療効果の向上には培養上皮細胞シートの移植前後のバリア機能の解明が必要であるが、現在までそのような研究はない。角膜のバリア機能の測定が、従来の方法では非常に困難であることがその原因である。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究で、経上皮電気抵抗値(Trans-epithelial electrical resistance, TER)により生体における角膜バリア機能測定方法の開発に成功した。この装置により、より正確に角膜バリア機能とその障害を測定できること報告してきた。



特願2008-062667 角膜経上皮電気抵抗値の測定方法

この方法では培養シートのバリア機能を測定する方法とほぼ同じ条件で、生体における角膜バリア機能を測定することが可能であり、培養上皮細胞シートの移植前のバリア機能と移植後のバリア機能を比較することが可能である。そこで今回申請者は、このバリア機能測定方法を用いて培養上皮細胞シート移植眼の角膜バリア機能を解析し、さらに分子生物学的な解析も含めて、培養上皮細胞シート移植成功に必要な因子を探求する。これらの結果を元に高品質の培養再生角膜上皮細胞シートの作製法を開発する。

また、今回の研究において、上皮細胞シート移植後術後の品質を下げる要因として術後に必要な点眼薬の防腐剤の影響が強いことがわかった。そこで、点眼薬防腐剤の角膜上皮への影響についても調査した。さらに角膜上皮の質を下げる防腐剤の影響を緩和させる添加物が発見されたため、その添加物の角膜上皮障害緩和作用についても解析した。

### 3. 研究の方法

#### **1. 培養上皮細胞シート作製およびバリア機能とタイトジャンクション関連蛋白の検討**

ウサギの強角膜片を採取し、トリミングした輪部組織を Dispase でインキュベートし、EDTA で反応を止めた後洗浄して、DMEM 培地の中で角膜輪部細胞を採取する。採取したペレットを遠心管に回収して遠心後、上清を取り除き Trypsin-EDTA を加えインキュベートする。KCM (10% FBS)で反応を止めた後カウントし、遠心分離した後再懸濁し、feeder layer 上の温度応答性培養皿に播種する。feeder は mitomycin 処理した NIH-3T3 細胞を用い KCM 培地で培養する。5% CO<sub>2</sub>、37 °C のインキュベーターで KCM (10%FBS)にて約 2 週間培養し、上皮細胞シートを作製する。角膜上皮細胞シートの作成が計画通りに進まない場合は、よりシートの作成が容易である口腔粘膜上皮細胞シートを作製する。ウサギ口腔粘膜細胞はウサギの口腔粘膜を約 3x3cm 採取し、角膜上皮細胞シート作製と同じ手法を用いて作製する。

上皮細胞培養シートには移植時の侵襲と生着後長期的な外的刺激に耐えうる品質が求められる。実際にはバリア機能を担う表層細胞の細胞間接着、上皮細胞のターンオーバーに必要な幹細胞数、上皮細胞数が関与する。

上記細胞培養シートは 2 日毎に電圧抵抗測定機 (EVOMX, Endohm)にて測定する。各測定時点でシートを温度応答性培養皿から剥離し、凍結切片においてバリア機能に関与するタイトジャンクションを ZO-1, Occludin で染色し確認する。また、Real time PCR にて ZO-1 および Occludin の mRNA を測定する。これら細胞シートの分

子生物学的解析結果と、バリア機能による生理機能の関連を解明する。また、必要成分を含まない培養液を用いることや過度に長期間培養することで作製した品質の悪い細胞シートの品質を上述のように分子生物学的に、また生理機能的に評価する。また、角膜上皮細胞シートと口腔粘膜上皮細胞シートの品質の違いについても上記項目を比較し、検討する。計画通りに品質の悪いシートが作製できない場合は、通常通り作製したシートに塩化ベンザルコニウムなどの毒性のある薬剤を投与して、品質を下げたもので検討する。

#### **2. 培養上皮シート移植後のバリア機能測定とタイトジャンクション関連蛋白の検討**

上記 1 の手順で作製した温度応答性培養皿上の上皮細胞シートを 20 °C でインキュベートし培養皿から剥離する。ウサギの角膜上の上皮を剥離し、上皮細胞シートを移植する。同じロットの細胞シートを上記 2 の手順で品質評価を行う。保護用のソフトコンタクトレンズをのせ、抗生物質と抗炎症剤の点眼を行う。上皮細胞シートの移植が生着しない等、計画通りに進まない場合は、移植後生着しやすい羊膜を基質として用いた細胞シートを作製し、これを移植する。

上皮細胞シート移植後の角膜を移植後 3 日、1, 2 週後、1, 2, 4, 8, 12 カ月後バリア機能を、新しく開発した角膜バリア機能測定装置を用いて測定する。また各時点で角膜を採取、固定後、バリア機能に関与するタイトジャンクションを ZO-1, Occludin で染色し確認する。Real time PCR にて ZO-1 および Occludin の mRNA を測定する。シートの品質は移植前に測定した TER 値に判断し、分子生物学的解析結果とバリア

ア機能による生理機能の関連を多重解析にて解明する。

### **3. 角膜上皮細胞シートをより高品質に保つ方法の研究**

上述の研究で得られた質の高い上皮シートの培養条件を確認する。その上で血清や EGF などの濃度を変え上皮シートを作製し品質を評価する。品質が上がらない場合は、マイクロアレーやプロテオミクス解析の結果を元に、培地に品質の良いシートに多くみられる因子を加えシートを作製し解析する。これにより従来の上皮シートに比べより品質の高い上皮シートの作製方法を開発する。

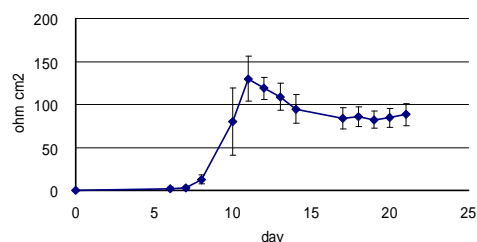
また、今回の研究において、上皮細胞シート移植後術後の品質を下げる要因として術後に必要な点眼薬の防腐剤の影響が強かったことがわかった。そこで、点眼薬防腐剤の角膜上皮への影響についても調査した。さらに角膜上皮の質を下げる防腐剤の影響を緩和させる添加物が発見されたため、その添加物の角膜上皮障害緩和作用についても解析した。ウサギに全身麻酔をかけ、角膜上と前房内に電極を留置し、試薬点眼 60 秒後の角膜 TER を測定した。試薬は 0.02%塩化ベンザルコニウム単剤と 0.01%, 0.1%, 1%の濃度の異なるポリオキシエチレン硬化ヒマシ油とポリソルベート 80 を添加した混合試薬である。それぞれの試薬を 1 分間暴露した角膜を切除後に電子顕微鏡で観察した。さらに試薬の最小発育阻止濃度を、黄色ブドウ球菌、アクネ菌、緑膿菌、肺炎球菌、大腸菌について調べた。

#### 4. 研究成果

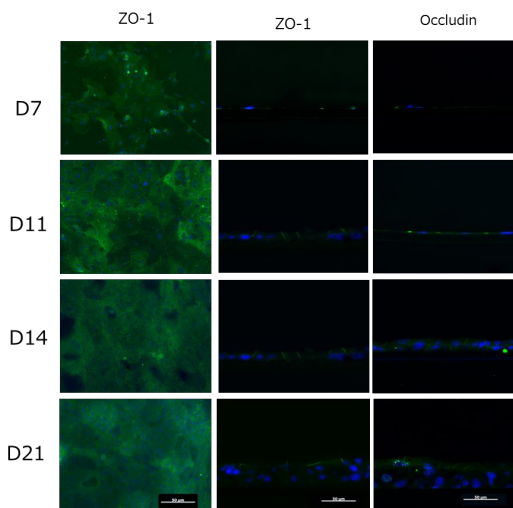
##### **1. 培養上皮細胞シート作製およびバリア機能とタイトジャンクション関連蛋白の**

## **検討**

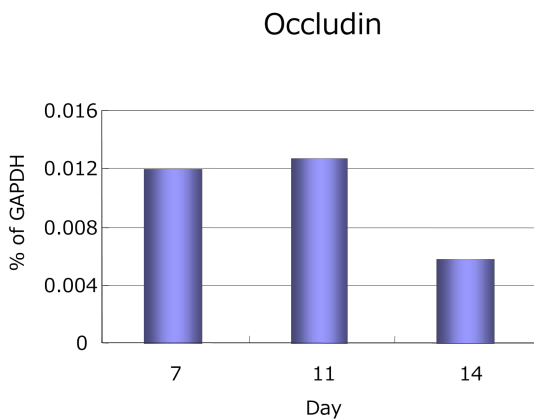
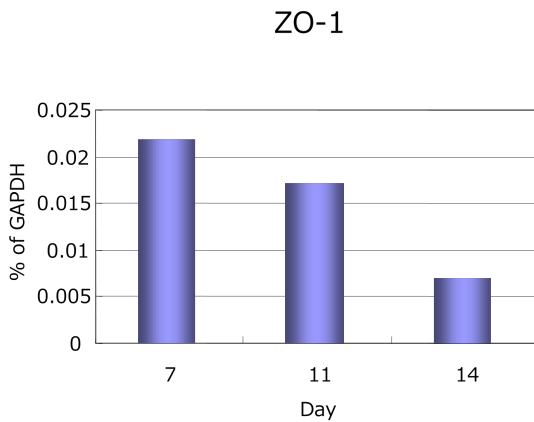
角膜上皮細胞シートの TER 値は培養 7 日目以降にコンフルエントとなると上昇し始めた。培養 11 日目で 1 層の細胞層が形成され ZO-1、Occludin が細胞間に隙なく形成されると最高値に達した。その後角膜上皮細胞シートが重層化するにつれて TER 値はやや減少し、培養 14 日目以降は定常状態となった。



TER上昇前	D7	3±1.6	Ohm cm <sup>2</sup>
TER上昇時	D11	130±26.1	Ohm cm <sup>2</sup>
TER定常時	D14	95±16.6	Ohm cm <sup>2</sup>



また real time PCR にて各タイトジャンクション関連タンパクの mRNA を解析したところ、コンフルエントから 1 層のシートができる時点で高くなり、重層化するにつれ徐々に減少することが分かった。



	~D6	D7	D11	D14	D21
TER (ohm cm <sup>2</sup> )	0	3	130	95	88
シートの層		0~1層	1~2層	2層	3~4層
TJ蛋白		-/+	+	+	+
TJ mRNA		+++	++	+	NA

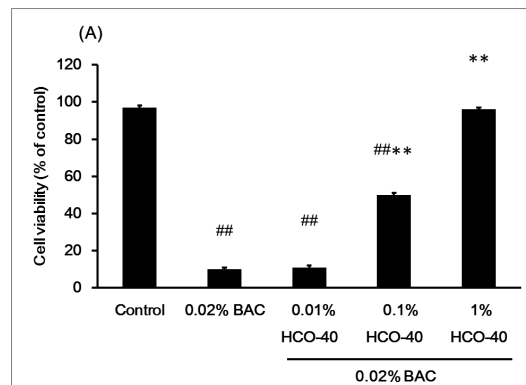
## 2. 培養上皮シート移植後のバリア機能測定とタイトジャンクション関連蛋白の検討

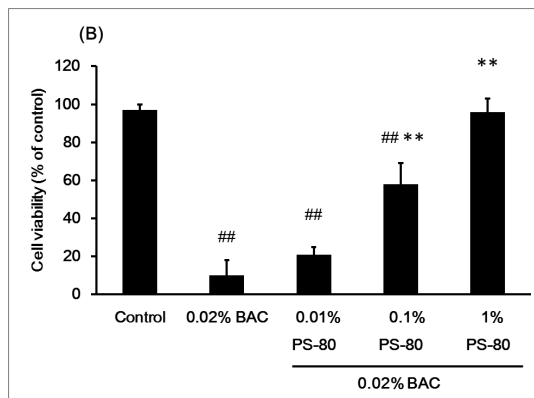
上記1の手順で作製した温度応答性培養皿上の上皮細胞シートをウサギの角膜上の上皮を剥離し、上皮細胞シートを移植したところ、術後およそ数日で生着することが確認された。これによりTERが130 ohm cm<sup>2</sup>の角膜上皮細胞シートであれば移植後生着することが確認された。しかし、さらにこの移植後の角膜上皮のバリア機能測定を試みたが、測定機器による擦過が容易に

生じたため、安定したTERを測定することが困難であった。また、術後約1週間であったが生着した角膜上皮が再度剥離するウサギがみられたため、その要因として術後点眼に含まれる防腐剤の角膜上皮毒性も疑われた。

## 3. 角膜上皮細胞シートをより高品質に保つ方法の研究

上記2の移植実験の結果から、術後点眼薬の角膜上皮細胞シートへの悪影響が疑われたため、防腐剤の角膜障害緩和により、角膜上皮シートの品質を改善できないか検討した。まず塩化ベンザルコニウムの角膜上皮毒性をTERで評価した。角膜TERは試薬投与前を100%とすると、0.02%塩化ベンザルコニウム投与で10±8%に有意に低下した。さらに以前の研究で塩化ベンザルコニウムの角膜毒性を緩和される可能性が指摘されたか溶解剤であるポリオキシエチレン硬化ヒマシ油とポリソルベート80の0.01%添加すると、11±5%, 21±4%だったが、0.1%添加するとそれぞれ50±10%, 58±11%に上昇した。1%の添加ではそれぞれ96±4%, 96±7%とさらに上昇した。





角膜上皮を走査型電子顕微鏡で観察すると、0.02% BAC 投与では表層細胞の破壊と細胞間の解離を認めた。0.01% HC040 または PS80 の添加では、表層細胞は破壊されたままだが、可溶化剤の濃度が濃くなるに従い、表層細胞は正常の形態を保てるようになった。最小発育濃度は 0.01% ~ 0.03% 程度の低濃度の可溶化剤の添加では BAC の防腐効果に影響なかったが、0.3% ~ 1% 程度の可溶化剤の添加では緑膿菌、肺炎球菌、大腸菌に対する防腐効果が減弱した。

この研究により、角膜上皮細胞シートの質を悪化させる要因として点眼薬防腐剤の塩化ベンザルコニウムがあることが分かった。さらに可溶化剤にはその角膜上皮毒性を緩和させるものがあり、角膜上皮細胞シート移植後には感染予防と免疫抑制のために抗生剤やステロイド点眼が必要になるが、塩化ベンザルコニウム含有する点眼液の使用を控えることや、角膜上皮障害緩和する添加剤を加えて投与することで、角膜上皮細胞シートの質を保つことができると考えられた。

## まとめ

本研究では重篤な角膜疾患の治療に使用する培養角膜上皮細胞シートの品質を電気抵抗値 (TER) で評価し、質の高いシートを移植に使用できるか検討した。角膜上皮細胞シートの細胞間結合が密になると TER は上昇した。ウサギ角膜に TER の高い角膜上皮細胞シートを移植したところ、生着することが確

認された。臨床で用いる角膜上皮細胞シートでも、TER 評価で移植後の状態を予測できる可能性が高くなった。さらに、角膜上皮の質を悪化させる要因を検討した。特に移植後用いられる点眼薬に含まれる防腐剤の塩化ベンザルコニウムに強い角膜障害があったが、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などの添加で、角膜上皮シートの質を保つことができる可能性が示唆された。

## 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 1 件)

Influence of different additives and their concentrations on corneal toxicity and antimicrobial effect of benzalkonium chloride.

Onizuka N, Uematsu M, Kusano M, Sasaki H, Suzuma K, Kitaoka T.

Cornea. 2014 May;33(5):521-6. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

上松聖典 井上大輔 植木亮太郎 鬼塚尚子 ヤッセルヘルミー モハメド 藤川亜月茶 北岡隆 培養角膜上皮細胞シートの経上皮電気抵抗値とタイトジャンクション関連蛋白 第 119 回日本眼科学会総会 2015/04/16 さっぽろ芸文館 (北海道・札幌)

〔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

上松 聖典 (UEMATSU, Masafumi)

長崎大学・病院 (医学系) 講師

研究者番号: 2030380843