



Title	Structual characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes
Author(s)	井手, 武
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46157
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名 井手 武
 博士の専攻分野の名称 博士(医学)
 学位記番号 第 20147 号
 学位授与年月日 平成 18 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 医学系研究科臓器制御医学専攻
 学位論文名 Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes
 (温度応答性培養皿上で作成した角膜内皮細胞シートの構造的特徴)
 論文審査委員 (主査)
 教授 田野 保雄
 (副査)
 教授 片山 一朗 教授 宮崎 純一

論文内容の要旨

〔目的〕

角膜内皮細胞は角膜の最内層にありポンプ機能とバリア機能により角膜の水分を一定に保つことにより角膜の透明性維持に不可欠な細胞であるが、生体内では細胞分裂しない。よって、角膜内皮細胞が機能代償不全に陥り水疱性角膜症という疾患になった時には、アイバンク眼を使用する同種角膜移植術が現時点の治療法となっている。しかし、慢性的なドナー不足や拒絶反応という問題点が存在する。我々はこのような角膜移植の問題点を解決するため臨床利用可能な角膜内皮シートを作成・移植する角膜内皮の再生医療の開発を行った。これまで、細胞シートのみを作成する技術が存在しなかつたが、近年、担体不要な細胞シートを可能にする温度応答性ポリマーをグラフトした温度応答性培養皿が開発された。この培養皿上では、ポリマーのグラフトされた領域上でのみ細胞が増殖する。一定期間の培養後に温度を下げるとき、ポリマーが親水性になり薬剤の使用なしに細胞シートが剥離可能となる。我々は温度応答性培養皿を用いて培養角膜内皮シートを作成・回収する技術を開発し、in vivo 内皮細胞と類似した性質を有するかの確認を目的とした。

〔方法〕

直径 35 mm のプラスティック培養皿の中心 18 mm の領域にポリマーがグラフトされた温度応答性培養皿を用いて以下の実験を行った。米国アイバンク眼の角膜周辺部から角膜内皮細胞を採取・継代した後に、温度応答性培養皿上に播種して数週間後に培養角膜内皮細胞シートを作成・回収した。作成した角膜内皮細胞シートを位相差顕微鏡、走査・透過電子顕微鏡にて形態学的観察を行った。細胞外基質の存在と経時的蓄積、そして細胞シート回収後に温度応答性培養皿でなく細胞シートに細胞外基質が温存されることをコラーゲン Type IV (Col IV) とファイプロネクチン (FN) の免疫染色にて確認を行った。細胞外基質の蓄積をより定量的に見るために、免疫染色像の画像解析と Immunoblotting にて解析した。バリア機能の形成に必要な細胞間接着を細胞間接着関連分子 ZO-1 の免疫染色で確認した。細胞回収方法の違いにより、分泌・形成された蛋白の分解・温存程度に違いが出現するかを ZO-1 の Immunoblotting にて確認を行った。

[成績]

温度応答性培養皿上で培養した角膜内皮細胞は、ポリマーがグラフトされた領域上においてのみ、接着性を示すことが確認された。走査電子顕微鏡像では *in vivo* と同様の多角形態と細胞表面の微絨毛が確認された。透過電子顕微鏡像では角膜内皮に特徴的な大きな核とエネルギー消費量の多い角膜内皮細胞に見られる豊富な細胞内小器官が確認された。細胞シート移植に際して移植時の接着能や移動のための強度が必要になり、それを担うために細胞外基質の蓄積が非常に重要になる。Col IV と FN の免疫染色像、画像解析、IMMUNOBLOTTING にて経時的な蓄積が確認された。次に、内皮細胞シートを培養皿から一部分のみ剥離した後に Col IV と FN の免疫染色を行った。培養中に分泌・形成されたこれらの蛋白が培養皿上でなく細胞シートと一緒に温存されていることも確認された。細胞間接着関連分子の一つである ZO-1 は *in vivo* 角膜内皮では斑状に存在するが、同じパターンを示す染色像が確認された。この ZO-1 を用いて、細胞回収法の違いによる蛋白の温存を確認したところ、酵素処理による細胞回収では減少してしまう ZO-1 が低温処理による細胞回収法では温存されることが Immunoblotting で確認された。

[総括]

温度応答性培養皿を用いて培養ヒト角膜内皮細胞シートを作成に着手した。従来の物理的・酵素的処理による細胞回収法では培養中に形成・分泌されたものが破壊されてしまう欠点があるが、この温度応答性培養皿の利用により、単に温度を下げるこによって非侵襲的に完全な一枚の移植可能な角膜内皮細胞シートを回収することができた。角膜内皮細胞の培養系を確立し、細胞シートを作成回収する技術を開発した後、位相差顕微鏡、走査・透過電子顕微鏡で形態学的観察を行い、免疫染色にて細胞外基質蓄積と細胞間接着形成の確認を行い、immunoblotting にて温度応答性培養皿の優位性を確認した結果、培養角膜内皮細胞と *in vivo* の角膜内皮細胞と類似点が確認された。従来の細胞移植ではゲルや羊膜などの担体上に培養し担体ごと移植する必要があるため、担体に伴う合併症が存在する。しかし、この温度応答性培養皿での培養では担体なしに細胞シートのみを移植できるというのが本法の大きな長所である。以上のことにより、我々の作成した角膜内皮細胞シートが角膜内皮細胞疾患に対する外科的治療法に非常に有効なものであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

角膜移植の手術適応で最も頻度の高いのは角膜内皮疾患であり、この角膜内皮疾患に対しては、全層角膜移植術といわれるドナー角膜の全層を置換する手術法が現時点での第一選択となっている。しかし、ドナー不足や拒絶反応が現代の角膜移植医療の大きな問題点となっている。

本研究では、このような移植医療の問題点を克服するために培養細胞シート移植による角膜内皮の再生医療の開発を目的としている。温度応答性培養皿を用いることにより温度を下げるという極めて非侵襲的な方法により *in vivo* 類似の構造的特徴を持った機能的な培養角膜内皮細胞シートの作成と回収が可能であることが証明されている。

臨床応用に直結する技術開発に成功した重要な研究発表で学位の授与に値すると考える。