The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces
Author(s)	角出, 泰造
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46366
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

【91】

氏　　名	角出泰造（すみで たいぞう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　20148　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	Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces **（温度応答性培養皿上で作成・回収した培養ヒト角膜内皮細胞シートの機能解析）**
論文審査委員	（主査） 教　授　田野　保雄 （副査） 教　授　仲野　　徹　　教　授　片山　一朗

論文内容の要旨

〔目的〕角膜内皮層は角膜裏面を被覆する単層の細胞層で、ポンプ機能、バリア機能を通じて角膜の透明性維持に重要な役割を担っている。現在角膜移植の最も多い適応疾患は角膜内皮障害に起因する水疱性角膜症である。しかし、本邦や欧州では慢性的ドナー角膜不足のため、多くの患者が角膜移植待機状態にある。また、アイバンク眼を用いた現在の同種角膜移植術では、免疫拒絶が高い頻度で起こり、移植片が再度混濁してしまうことも多い。このような移植医療の問題点を解決するため、我々は生体外で培養ヒト角膜内皮細胞シートを作成し、それを内皮疾患治療に用いる再生医療の開発に着手している。近年、このシート作成において、温度応答性のインテリジェント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。この温度応答性培養皿の使用は、低温度処理のみで、細胞シートを1枚の連続したシートとして培養皿より剥離することを可能にし、これまでの酵素処理等で不可避であったシート基底部の細胞接着タンパク等を傷害させること無いのが大きな長所である。今回、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、回収した培養ヒト角膜内皮シートを組織学的に検討するとともに、*in vivo* 角膜内皮と類似した機能を有するかを調べた。

〔方法〕米国より輸入した研究用ヒト角膜より得たヒト角膜内皮細胞（HCEC）を温度応答性培養皿（直径 18 mm）上に 4×10^5 個播き、37℃、10% CO_2 条件下で培養した。細胞がコンフルエントの状態になってから、1週間後、4週間後の培養皿を、20℃のインキュベータに移し、1時間放置した後、内皮シートの回収を試みた。回収したシートは、HE 染色により組織学的検討をおこなった。次に、種々の細胞密度（570～3070 cells/mm^2）を有する培養角膜内皮シートを作成した。各シートの、ポンプ機能に重要な役割を果たす Na^+, K^+-ATPase pump site 数を、^{3}H-ouabain を用い液体シンチレーションカウンターで測定した。また、このシートにおける Na^+, K^+-ATPase pump site の局在を免疫染色で検討した。白色家兎の角膜内皮細胞をデスメ膜ごと除去した後、低温処理にて回収したシートをその上に接着させ移植を実施した。術後7日間、移植した内皮シートが機能しているかを確認する為に、前眼部所見観察、角膜厚測定をおこなった。本移植実験においては、蛍光色素（DiI）でラベルした細胞を用いたシートを移植しており、角膜を摘出した後、組織観察をおこなうとともに、移植した HCEC の残存確認を、蛍光顕微鏡下で実施した。

〔成績〕温度応答性培養皿上でコンフルエントになってから４週間後の培養ヒト角膜内皮細胞は、低温度処理により１枚の内皮シートとして回収することができた。回収したシートは、HE 染色より、*in vivo* 角膜内皮と同様、単層の細胞で構成されていた。細胞密度 3070 cells/mm^2 のシートでは、単位面積あたりの Na^+, K^+-ATPase pump site 数は $4.65\pm0.05\times10^9$ pump sites/mm^2、単位細胞あたりでは $1.51\pm0.11\times10^6$ pump sites/cell で、*in vivo* 角膜内皮の値とほぼ同等に存在した。また、単位面積あたりの pump site 数はシートの細胞密度が低下するにつれ減少し、単位細胞あたりの pump site 数は細胞密度が低下するにつれ増加した。免疫染色により、Na^+, K^+-ATPase pump site は *in vivo* 角膜内皮と同様に細胞間に局在していることが示された。家兎眼へのシート移植においては、術後７日で、シート非移植眼において顕著な角膜混濁、角膜肥厚が認められたが、シート移植眼では、角膜浮腫は認められず、透明性を維持しており、角膜厚も非移植眼と比較して有意に薄かった（角膜厚；非移植眼 887.5±69.0μm、移植眼 496.1±111.6μm）。DiI 標識された培養角膜内皮細胞は移植７日後でも高密度に残存していた。（移植前：3102.7±91.3 cells/mm^2、移植７日後：2403.6±429.7 cells/mm^2）。組織学検討により、内皮面に接着した単層の培養ヒト角膜内皮細胞シートが確認され、移植した部分のみに DiI 標識した細胞が観察された。

〔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の作成に着手した。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と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。この細胞シートは、*in vivo* 角膜内皮と同様、単層の細胞で構成されており、ポンプ機能に重要な役割を果たす Na^+, K^+-ATPase pump site 数も同様なシートを作成できた。また、このシートは、移植実験より *in vivo* で機能することが示された。以上のことにより、我々の開発した角膜内皮細胞シート移植法が角膜内皮疾患に対する外科的治療法に有効である可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

最新の角膜手術は、病気の部分だけを移植する「パーツ移植」に移行しつつある。具体的には角膜内皮移植、上皮移植そして実質移植が挙げられる。既にドナー角膜を使ったパーツ移植は臨床応用されているが、本邦や欧州では慢性的ドナー角膜不足のため、多くの患者が角膜移植待機状態にある。近年、角膜移植の最前線として、角膜パーツ移植と再生医療の応用という新しい治療法が、より有効な治療として注目されている。本研究では、温度応答性培養皿を用いて *in vivo* 角膜内皮と同様の細胞密度を有し、単層の細胞で構成されており、ポンプ機能に重要な役割を果たす Na^+, K^+-ATPase pump site 数も同様なシートを作成できた。この細胞シートは、家兎眼への移植実験により *in vivo* で機能することも示された。以上のことにより、この機能性を有する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であることが示唆された。この方法を利用することは、拒絶反応の少ない、内皮細胞シートを１つのドナー眼より複数枚作成することを可能にし、ドナー不足と拒絶反応の現状を解消する有力な解決策になり得る。よって、本研究は、博士（医学）の学位授与に値すると考える。