The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Analysis of angiogenesis induced by cultured corneal and oral mucosal epithelial cell sheets in vitro
Author(s)	金山, 慎太郎
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48921
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

【63】

氏　　名	金　山　慎太郎（かなやま しんたろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１８５３　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 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	Analysis of angiogenesis induced by cultured corneal and oral mucosal epithelial cell sheets in vitro （培養口腔粘膜シートおよび培養角膜上皮シートによる血管新生誘導に関する検討）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　田野　保雄 （副査） 教　授　不二門　尚　　教　授　仲野　　徹

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

我々は角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、片眼性であれば僚眼の自己角膜上皮を、両眼性であれば自己口腔粘膜上皮を採取、培養し、それぞれ基質を用いない独自の培養角膜上皮シート（角膜シート；CCE）および培養口腔粘膜上皮シート（口腔シート；COE）を作製し、患眼に移植することで、これまでに良好な成績を得ている。しかしその術後経過観察中において、角膜シートを移植した術眼に比べ口腔シート移植した術眼では、角膜周辺部より中央部にかけて、新生血管の侵入が高頻度で認められることが報告されている。移植後の角膜新生血管は術後拒絶反応の原因と成り得る為、その機序を明らかにすることは臨床上重要と考えられる。そこで、この血管侵入の機序を明らかにする為、本研究ではヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた *in vitro* における血管新生浸潤能、遊走能および管腔形成能を定量的に評価し、またその原因となる血管新生誘導因子の検索を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

白色家兎の角膜輪部上皮および口腔粘膜上皮を採取し、ディスパーゼ処理およびトリプシン処理により上皮細胞を単離した。得られた上皮細胞をマイトマイシン C 処理した 3T3 フィーダー上（24 ウェルプレート）に播種し培養した。14 日後、重層化した各培養上皮シートを確認後、無血清培地に交換し 37℃で、22 時間培養した。さらにここで、マトリゲルおよびファイブロネクチンコーティングされた 24 ウェルインサート上で HUVEC を播種し、各上皮シートの培養プレート上にインサートを置き、共培養を行った。無血清培地中に放出された上皮シート由来の血管新生誘導因子による HUVEC の浸潤および遊走を血管新生誘導能の指標とした。さらに、角膜シートおよび口腔シートを無血清培地中で 22 時間培養することで得た Conditioned medium（CM）を用いて、HUVEC に対する管腔形成能についても検討を行った。その結果、口腔シートは角膜シートと比較して有意に高い HUVEC に対する浸潤および遊走誘導能を示した。また同様に、管腔形成能に関しても、口腔シートは角膜シートと比較して有意に高い HUVEC に対する管腔形成能を示した。次に、各上皮シートから得られた CM 中の FGF2、VEGF、TGF-β、Ang-1 の産生量を ELISA 法にて定量した。その結果、口腔シートは角膜シートと比較して有意に高い FGF2 産生量を示した。一方、VEGF は両 CM 中に産生は認めるものの、両シート間での産生量に有意差を認めなかった。次に、各上皮シートにおける VEGF、

FGF2 の mRNA 量について、real-time RT-PCR 法により定量した。その結果、口腔シートは角膜シートと比較して有意に高い FGF2 の mRNA 発現を示した。VEGF に関しては、ELISA の結果と同様に両上皮シート間の発現量に有意差を認めなかった。最後に、各上皮シートによる HUVEC の浸潤および遊走に対する VEGF および FGF2 の中和抗体の効果について検討した。その結果、FGF2 の中和抗体は、口腔シートによる HUVEC の浸潤および遊走を有意に抑制した。一方、VEGF の中和抗体は、口腔シートによる HUVEC の浸潤のみ有意に抑制したが、遊走は抑制しなかった。また、VEGF の中和抗体は、角膜シートによる HUVEC の浸潤に対しても抑制傾向を示したが、有意差は認めなかった（P＝0.057）。

〔 総　　括 〕

培養口腔粘膜上皮シートは培養角膜上皮シートに比較して、有意に高い HUVEC に対する浸潤、遊走および管腔形成誘導能を示すことを定量的に評価することができた。さらに、rea1-time RT-PCR、ELISA、中和抗体実験の結果から、FGF2 が各上皮シート間の血管新生誘導能の差に関与していることが示された。また、一方で、口腔シートと角膜シート間において、VEGF 発現量に有意な差は認められなかったことから、VEGF は両シート間の血管新生誘導能の差に関与する因子ではないと考えられた。以上のことから、培養口腔粘膜上皮シート移植における角膜周辺部からの血管侵入は FGF2 が関与していることが推察された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、再生医療が叫ばれて話題となっているがこの間、皮膚や角膜の再生ではすでに臨床応用が開始されている。日本では角膜移植医療において慢性的なドナー眼球不足は深刻な問題であるため角膜再生医療は夢の医療として期待されている。しかしながら角膜上皮幹細胞疲弊症の患者に自己角膜上皮もしくは自己口腔粘膜上皮より作製した培養上皮シートを移植した際、培養口腔粘膜上皮シートを移植した患眼の方がより角膜新生血管を誘導するという臨床所見が複数の施設から報告されている。上記の臨床所見に基づきウサギを用いた基礎研究において、定量的に培養口腔粘膜上皮の方が培養角膜上皮よりも血管新生能が高いことを *in vitro* 評価系で証明し、また原因となる血管新生誘導因子の一つが FGF2 であることも証明した。

筆者らが行った結果により FGF2 を抑制することで角膜新生血管の軽減が可能であり、その結果拒絶反応を軽減できるのではと考えられている。本研究の業績は学位に値するものと認める。