

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

## 眼組織からの幹細胞等の同定・単離・細胞株化および これらの保存方法に関する研究

所属 東京歯科大学市川総合病院角膜センター  
研究者 篠崎尚史

分担研究者

- (1) 東京歯科大学眼科 坪田一男、島崎潤、榛村重人、許斐健二  
(2) 京都府立医科大学眼科 木下茂

要旨

眼組織のうち、角膜および結膜細胞の長期保存としての凍結保存法の開発等を行い検討した。また、角膜細胞（上皮・内皮）における幹細胞の検索を行い、これらの単離・培養法などについて検討した。

### 1. 研究目的

長期にわたり増殖能のある幹細胞を単離・培養し細胞株として確立する。また、長期保存法を開発することにより、現在開発中である人工角膜等と組み合わせることにより、眼表面を再建する。幹細胞の単離・培養は細胞の安定した供給源となり、またこれらの長期保存法の開発は長期の安定した細胞供給を可能とするだけでなく、感染症などに対する安全対策においても重要である。さらに自己の細胞を用いたこれらによる眼表面の再建では拒絶反応を減少させることも可能となる。

### 2. 研究方法

#### 1) 角膜内皮細胞の培養

角膜移植術(海外ドナー角膜)時に余剰した角膜組織を用い、内皮細胞の回収法を検討した。

さらにこれらを種々の条件で培養し、培養条件等について検討を行った。

#### (1)回収法

角膜輪部組織の状態、**a.** 内皮細胞面を培養皿に直接おき、培養液中には内皮細胞のみが浸るような形で培養し、培養皿についたものをそのまま回収・培養する方法、**b.** 内皮側のみをトリプシン/EDTA処理し、ここから内皮細胞を回収する方法、**c.** 内皮側を物理的にスクレープし回収する方法、**d.** デスマ膜を物理的に内皮細胞ごとはがす方法、またこれに酵素処理を追加する方法を比較した。

#### (2)培養法

回収した内皮細胞を **a.** 上記 **a.**のごとく角膜組織のまま培養する方法、**b.** 酵素処理した細胞を細胞のみで培養する方法、**c.** デスマ膜ごと内皮を培養する方法、**d.** デスマ膜と内皮の状態から酵素処理し、ここから細胞を回収し、培養する方法などを検討した。

#### (3)培養条件

培養液として2種、培養皿についてもいくつかの種類を用いた。

#### 2)幹細胞の同定

角膜上皮および内皮細胞の幹細胞の同定を行うため細胞の形態学的評価を行い、かつ実際に培養することにより、その変化等を観察・検討した。

#### (1)角膜内皮細胞

角膜上皮細胞と同様に角膜中央部でなく、その辺縁部に幹細胞の存在が疑われたため、電子顕微鏡を用いた内皮細胞の形態学的比較検討を行った。

#### (2)角膜上皮細胞

上皮細胞での幹細胞は上皮のうちでも深層に存在していると考えられるため、表層の上皮細胞を物

理的に剥離した後、残存する輪部の上皮層の深層にある細胞の形態を評価しこれらを培養した。

### 3)長期保存法

角膜内皮細胞を組織の状態、また、結膜上皮細胞を羊膜上で培養したものを凍結保存し、保存後（解凍後）の状態を検討した。凍結保存液として **DMSO** とエチレングリコールを 1:1 で混合したものにショ糖およびトレハロースを加え、これらを培養液と混合し使用した。

融解(解凍)液としてはこの糖液を用い、これら凍結液・融解液の濃度を変化させ、その保存状態について検討した。

## 3. 研究成果

### 1)角膜内皮細胞の培養

#### (1)回収法

組織のまま培養皿のおき、細胞を回収・培養する方法は上皮細胞においては極めて有効であり、操作も簡単で培養は容易であるが、内皮においては培養皿に接着する細胞が少数であり、初代培養はされなかった。

トリプシン/**EDTA** 処理による内皮の回収は処理濃度および時間の設定を検体量が少ないことから種々行えなかったが、今回設定した濃度および時間では内皮のみを有効に回収できなかった。

物理的に内皮を剥がす方法ではその作用力の調整が困難で、内皮のみを選択的に回収することはできず、デスメ膜ごと回収することは可能であった。しかし、内皮層は単層であるため、物理的な損傷が大きくなってしまい、培養されなかった。

デスメ膜を物理的に(鑷子をもちいて)内皮ごとはがし、この内皮細胞側を培養皿におく方法ではデスメ膜を剥離後、内皮側を培養皿に固定するのが困難であった。これは剥離したデスメ膜がすぐ丸まってしまうことによる。しかし、ヒトでなく、家兎を用いた実験では内皮細胞が回収・培養された。

また、内皮細胞が接着した状態で剥離したデスメ膜を酵素処理し、内皮細胞を回収する方法を現在検討中である。検体量が少ないことから回収率の問題があるが **dispase** 処理したものでは少量の内皮細胞が回収された。

#### (2)培養法

角膜組織のまま培養する方法、デスメ膜に内皮細胞が接着したままの培養法、酵素処理後の細胞のみの培養法、いずれにおいても十分な細胞の増殖は得られなかった。しかし、家兎ではデスメ膜ごと培養したもので、内皮細胞の増殖は確認された。また、ヒト内皮細胞ではデスメ膜剥離後、酵素処理した内皮細胞で少数の細胞の増殖を認めている。

培養液としては増殖因子を含まないものを最初に使用したが、ヒト角膜内皮細胞ではいずれも十分な細胞の増殖が認められなかった。いっぽう、家兎の角膜内皮細胞では成長因子を含まない培養液でも内皮細胞の増殖が確認された。培養皿としてはコラーゲンIVおよびマトリジェルコーティングデッシュいずれにおいても増殖が不十分であったため、比較検討はできなかった。

#### 2)幹細胞の同定

周辺部の内皮細胞のほうに、未分化な形態をした細胞が存在しており、このうちいくつかの細胞の形態は明らかに中央部の内皮細胞とは異なっていた(図 1, 2)。これらの細胞が幹細胞として疑われた。

上皮細胞では輪部のポーマン膜のない部分で、一般の上皮細胞とは明らかに形態のことなる深層にある細胞を初代培養しこの継代培養を試みているが、現在成功はしていない。

### 3)長期保存法

#### 角膜内皮

保存液の組成としては培養液よりもむしろ、強角膜保存液である **Optisol-GS** の方が、融解(解凍)後の保存状況が良かった。コントロール群と比較し、現時点では凍結後の細胞の生存率は低かった(図 3, 4)。

保存条件の設定により、デスメ膜ごと内皮細胞が脱落してしまうことや内皮細胞が完全に死んでしまうこともあった。

## 4. 考察

### 1)角膜内皮細胞の培養

#### (1)回収法

増殖能がほとんどなく、単層であること、デスメ膜との接着が強固であることがその回収を困難にし

ている。特に物理的に内皮細胞のみ回収する方法は、内皮細胞が単層しかないため、スクレーブ操作で内皮細胞にかなりのダメージを与えることになり、有用ではなかった。

デスメ膜ごと内皮細胞を回収する方法は比較的容易であり、組織に及ぼすダメージも大きくないと思われたが、角膜実質より剥離後にデスメ膜が丸まってしまうため、これを培養皿上に接着するように伸展させることが手技的に難しく、確実性に乏しかった。酵素処理によって、内皮細胞を回収する方法はその濃度と作用時間の十分な検討が必要であった。とくにデスメ膜と内皮細胞の接着、内皮細胞の培養時点での **viability** は検体ごとに異なることが予想されるため、条件設定を熟慮する必要がある。

しかし、スクレーピングのように物理的なダメージを加えないため、単層構造の内皮細胞に有用性はありと判断された。

特別な操作をせずに内皮細胞側を組織ごと直接培養皿において内皮細胞の回収をはかる方法は、最も組織に対する侵襲が少ないと考えられた。

しかし、上皮細胞や実質細胞のコンタミネーションが生じる可能性があり、また、細胞間の接着は生体内と同様であり増殖能に乏しいことから、内皮細胞のみの回収は困難と思われる。

上記より今後の回収法としては

a. デスメ膜ごと内皮細胞をはがし、これを酵素処理して最も効果的な回収法を再検討する。

b. デスメ膜ごと内皮細胞をはがした後、粘弾性物質をのせデスメ膜が丸まらないような方法で、培養皿に接着させる方法を検討する。

## (2) 培養法

上述のごとく回収が難しいために回収時(培養前)にストレスが加わっていた可能性があった。

また、培養するために培養皿に接着させる方法として組織ごとあるいはデスメ膜ごとおく操作を行ったが、前者は手技的には容易であったが、コンタミネーションの可能性が高いこと、後者はデスメ膜を進展させて培養皿に安定して接着させることが困難であった。

さらにこれらの方法では細胞間の接着が保たれており、接触障害による増殖の抑制が増殖不良の原因と考えられた。したがって、酵素処理により細胞を分離する方法を検討したが、現段階では条件調整が不十分であり、十分な増殖が得られなかった。今後、この条件設定を詳細に行っていく。

また、回収後の細胞の状態(生存率)についても検討が必要である。

培養液については家兎では、増殖因子(**basic-FGF**)なしのもので培養し内皮細胞の増殖が認められた。家兎の角膜内皮細胞は生体内でも増殖することも知られており、家兎においては増殖因子が内皮細胞の増殖に必須ではないことが確認された。

一方、ヒト角膜内皮細胞は細胞周期においてそのほとんどが休止期にあり、増殖因子の必要性が示唆された。実験当初は家兎と同様に増殖因子のない培養液を用いていたが、細胞の増殖が認めなかったため、現在はこれを追加している。しかし、現時点では継代するのに十分な増殖までは得られない。これには上述のような種々の要因が関与しており、今後は増殖因子を添加した培養液での培養で条件設定していく予定である。

## (3) 培養皿

コラーゲンIVおよびマトリジェルコーティングデッシュでも文献的には培養可能であるため培養条件が整った後、両者の比較を行っていく。

また、内皮細胞特有のマーカーがないために、現時点では培養された細胞が内皮細胞であるかは状況証拠的なものに頼らざるをえない。したがって培養された細胞が本当に内皮細胞であることを証明できる表面マーカーなどの発見が今後必要となってくる。

### 2) 幹細胞の同定

現時点では角膜上皮および内皮細胞の特異的マーカーも存在していない。しかし、その存在場所や形態についてはある程度予測されており、今回の内皮細胞の電子顕微鏡による形態的な評価では他の内皮細胞と明らかに形態の異なる細胞が輪部側に存在していた。今後これらの単離・培養と機能の評価が必要となる。また前述のごとく、幹細胞のマーカーの発見も重要である。上皮についてはすでに幹細胞と思われる細胞の初代培養を行っており、今後は継代培養を行い、分化・増殖能などを観察する。

### 3) 凍結保存

卵や精子での凍結保存は確立されてきており、今回のような組織の状態での保存も可能と考えられる。

今回は条件設定の段階であり、完全な状態での保存は行えなかったが、可能性が示唆された。凍結保存液の組成、混合比の設定、培養液の選択、融解(解凍)時の条件などを変化させていき、最良の条件を検討

していく。

また、融解(解冻)後の内皮細胞の状態として、今回は蛍光色素を用いて生死細胞の確認を行ったが、今後はその **viability** を見ていく必要があり、生理学的な評価も必要となる。

また、角膜組織(上皮・実質・内皮)としてだけでなく、デスメ膜と内皮細胞あるいは内皮細胞のみでの凍結保存などについても検討していく。

凍結条件については組織の種類、組織内の細胞の種類により異なってくるのは明らかである。今回の角膜内皮細胞でうまくいかない条件でも角膜上皮や結膜上皮細胞の凍結保存が可能であったのはこれを示唆している。また、角膜組織において内皮細胞の凍結保存法は内皮細胞の性質上、他の細胞と比較し難しいが、確立すれば角膜の組織での保存が達成される。

## 5. まとめ

今回の実験では培養、凍結保存などについては角膜組織内における重要性から内皮細胞を中心に行った。現時点では内皮細胞の確実な培養法、幹細胞の同定法などについては確立していないが、その可能性が示唆された。また凍結保存についても今後の条件設定により十分長期保存が可能であることが確認された。

## 6. 研究発表

なし

## 7. 知的所有権の取得状況

なし

## 写真

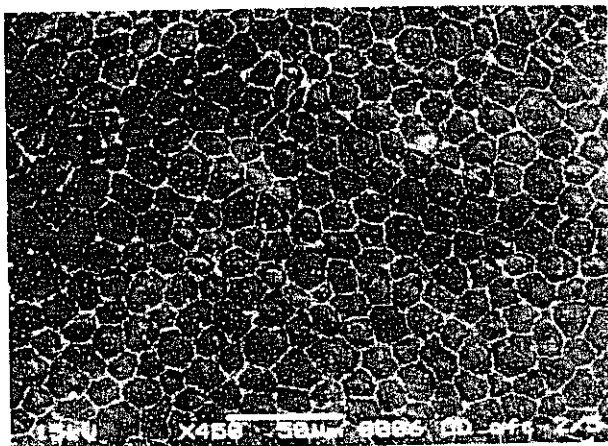


図1 ヒト角膜内皮細胞(中央部より)

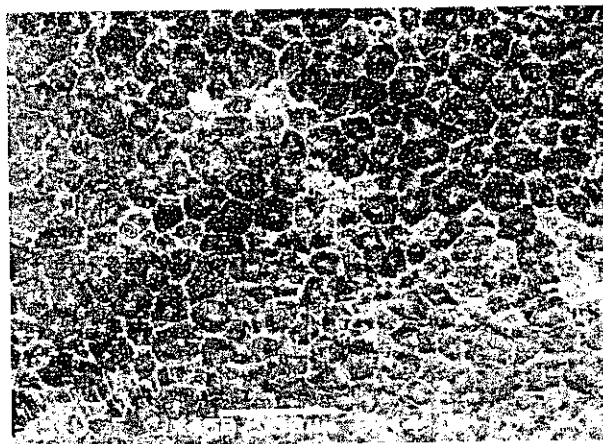


図2 ヒト角膜内皮細胞(周辺部)

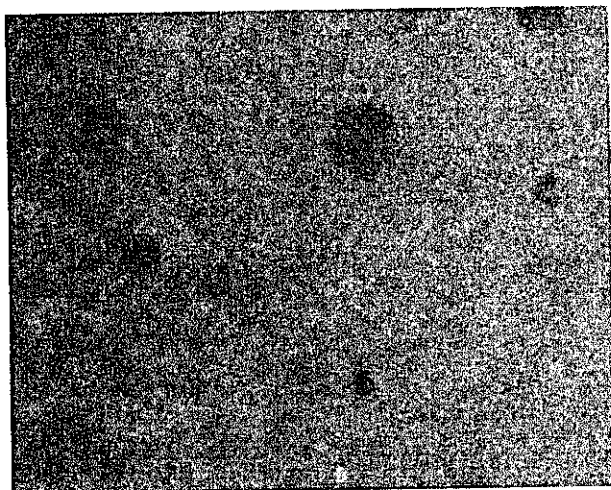


図3 凍結保存(コントロール)

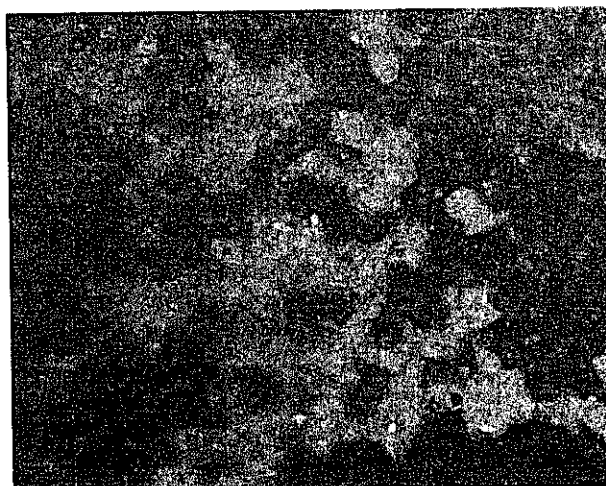


図4 凍結保存後(Optisol-GS)

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社