

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、榛村重人、許斐健二
- (2) 東京歯科大学整形外科 高橋正憲
- (3) 東京歯科大学産婦人科 兼子 智
- (4) オタワ大学眼科センター May Griffith

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では、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にはがす方法、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. 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

培養液として数種、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。また、ヘキスト染色の排泄能による細胞の分離を行う研究と比較する。

(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。継代した角膜内皮細胞にヘキスト染色を行い、幹細胞と思われる分画の存在を調査した共同研究より検討を加えた。

(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。

また、ヘキスト染色の排泄能の違いによる細胞の分類法の研究との結果と比較した。

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（解冻後）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（解冻）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。

また、今後作成予定である再生組織の運搬について、現在当眼科で共同研究を行っている羊膜組織上培養細胞の輸送に伴う変化について検討した。

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。

しかし、内皮細胞がついた状態でデスマ膜をはがし、これを EDTA のみで処理し細胞が回収・培養できるか検討したところ、dispase による酵素処理と同程度の回収および培養が可能であった。

物理的に内皮細胞のみを剥がす方法ではその作用力の調整が困難で、内皮細胞のみを選択的に回収することはできず、デスマ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、物理的な損傷により培養されなかった。

デスマ膜を物理的に（鑷子をもちいて）内皮ごとにはがし、この内皮細胞側を培養皿におく方法ではデスマ膜を剥離後、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マ膜がすぐ丸まってしまうことによる。この方法は細胞を酵素などで処理しないことから、細胞自体に対する障害は少ないと思われる。

しかし、丸まったデスマ膜を培養皿に接着させることが難しいために、培養皿においたデスマ膜のうち、10%未満程度しか内皮細胞の接着および増殖が認められなかった。家兎を用いた実験では内皮細胞の回収・培養は比較的容易であったが、これは内皮細胞の本来の分裂能の違いによるものと思われた。

また、内皮細胞が接着した状態で剥離したデスマ膜を酵素処理し、内皮細胞を回収する方法では、dispase を用いた方法で、内皮細胞の回収・培養が可能となった（図 1）。デスマ膜に内皮細胞が十分に残った状態の検体であれば、少ない検体からも内皮細胞の回収および培養がほぼ 100% の割合で可能となった。ただし、培養細胞の増殖能については検体の保存状況、とくに年齢などに左右された。継代培養については初代培養の増殖の状態により可否が異なった（図 2）。

これまでに比較して、培養自体は高い確率で可能となったものの、培養後の増殖能については個体差がはげしく高齢者からの細胞でいかに増殖させるかなど、検討が必要と思われた。

(2) 培養法

角膜組織のまま培養する方法、デスマ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では、角膜組織のまま培養する方法での回収、増殖は不可能であったが、その他の方法での回収、培養は可能となった。現時点では酵素処理（dispase）を用いて回収した場合がもっとも高い確率でヒト角膜内皮細胞が培養された。EDTA を用いたものでも回収、培養は可能であったが、酵素処理のほうが

効率がよかった。デスメ膜ごと内皮細胞を培養する方法は成功率が低く、また増殖するスピードも緩やかであった。

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。培養液に増殖因子(bFGF, EGF)を加えた培地では、ヒト角膜内皮細胞の増殖が認められた。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を用いた。マトリジェルでコートした培養皿はコーティングの状況により細胞の観察が困難であった。いっぽうコラーゲンを付いた場合は増殖およびこれらの観察が十分可能であった。

2) 幹細胞の同定

周辺部の内皮細胞に、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ることが電子顕微鏡による観察で確認された。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異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。

ヘキスト染色を用いた細胞の排泄能の違いによる細胞の分類法では他臓器で幹細胞と思われる細胞と同様の細胞分画が回収されることが共同研究で分かった。内皮細胞では一度に多くの細胞を組織から回収するのが困難であるため、継代し細胞数を増やしたもので上記の実験を施行したところ、同様に幹細胞と思われる分画が回収され、この結果から内皮細胞にも幹細胞が存在する可能性が示唆された(図3)。

3) 長期保存法

ヒト角膜内皮細胞では、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。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。いっぽう上皮細胞では一般の培養液を用いても、融解後の細胞の生存率は高かった。

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。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いないため、スクレープ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。

しかし、酵素などの処理をしないため、剥がす操作の工夫によっては今後もこの方法による回収が可能性はあり、剥がす器具などの再検討を今後行う予定である。

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、確実性には乏しかった。ただし、これらの方法によって内皮細胞が培養皿に接着すれば培養が可能であることが判明した。デスメ膜を実質より剥がしたのちに丸まらないような形で培養皿に接着させることが容易になれば、この方法は細胞の損傷という意味ではきわめて有効である。しかし、細胞同士がデスメ膜上で接触しあっているため、接触障害などの影響により、細胞の増殖スピードが緩やかになる可能性も示唆された。

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検討を行い、dispase による処理で高率に細胞の回収と培養が可能となった。

スクレーピングのような直接的な物理的ダメージを加えないため、単層構造の内皮細胞の回収には有用であるが、回収後の細胞の増殖能については酵素処理の時点で細胞に損傷が加わっており、高い増殖能を維持できるようにするには検討が必要である。ただし、現在もっとも確立性の高い回収、培養法の一つであると考えられた。

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通常の培養法では困難と思われた。

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、この酵素処理の組み合わせを再検討する。
- b. デスメ膜ごと内皮細胞をはがした後、デスメ膜が丸まらないように接着させる方法を検討する。
- c. 内皮細胞を直接はがす方法について器具などを再検討する。

(2) 培養法

内皮細胞が十分存在する状態での回収が必要である。このためには細胞の回収前の検体の保存状態を考慮する必要がある。検体の保存期間、年齢などの確認と培養状況の比較、さらに回収までの検体の操作などを同一にする方法、あるいは条件の設定が必要であると思われた。

培養法としては単離した細胞を培養皿にまく方法と、組織ごと培養皿に接着させる方法がある。前者は単層である内皮細胞をばらばらにするのに酵素などの処理あるいは物理的処理が必要となり、その処理の際の細胞傷害が必須である。ただし、単離した細胞の傷害が強くなく、viability が十分残っていれば増殖させることは容易となった。後者の方法は細胞に直接あたえる障害が少ないと思われたが、組織ごと培養する方法はコンタミネーションの可能性が高いこと、角膜組織に曲率があるため接着しにくいことがあり、かつ培養も困難であったため、有効とは思われなかった。デスメ膜ごと培養する方法は上述のごとく、デスメ膜を伸展させ接着させる方法が確立すれば比較的細胞にダメージを与えることが少なく有用と思われた。

しかし、この場合には細胞同士が接触しており、接触障害の影響について検討する必要がある。今回の実験でも酵素処理し細胞をばらした状態のほうが、増殖するスピードが速かった。

回収直後の細胞の状態(生存率)については細胞の増殖能に反映されると考え、これまで十分に検討しなかったが、今後回収した細胞から幹細胞を単離するためには回収による細胞の傷害について調査する必要があり、次年度はこの評価法を検討する。

培養液については家兎では、増殖因子(basic-FGF)なしのもので培養が可能であり、内皮細胞の増殖を認めた。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、細胞の増殖を認めなかったため、増殖因子などの刺激がヒトの場合には重要と思われた。実際に bFGF などを加えた場合にはヒト角膜内皮細胞でも十分な細胞増殖が観察された。増殖因子は種々あり、今後は増殖因子をいくつか添加した培養液での培養状態を観察していく予定である。

また、幹細胞が単離、同定された場合にはこれらを分化させずに培養する技術が必要となる。このため、増殖因子や血清などが無い培養液での培養法の検討も今後行っていく。

(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はいずれも文献的には培養可能である。これまでに使用したマトリジェルでコートした培養皿は観察が難しかったため、またコラーゲンIVで十分に細胞培養が可能であったため、詳細な両者の比較は行わなかった。

しかし、ヒト角膜内皮細胞は本来増殖能が高くないため、培養の条件を整えることは重要であり、今後、幹細胞といった環境要因が重要な細胞を培養していくためには、コーティング物質に対する比較が必要となる。

現時点では内皮細胞特有のマーカーがないために、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も今後必要である。

2) 幹細胞の同定

角膜上皮および内皮細胞の幹細胞の特異的マーカーは存在していない。しかし、幹細胞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。また、ヘキスト染色を用いた研究から他の組織で幹細胞の性格を持つ細胞の回収が可能となっている。内皮細胞は一つの角膜組織から十分な細胞数を確保することが困難なために、継代培養したものをを用いたヘキスト染色が共同研究で行われ、この継代細胞の中で上述の幹細胞の性格をもつと考えられる細胞分画が回収された。(図2)これにより、角膜内皮細胞でも幹細胞の存在が示唆され、今後は組織から直接内皮細胞を単離し、上記の方法で幹細胞を含むと思われる細胞分画の回収を行う予定である。上皮細胞では当眼科によりこの方法での細胞の回収が可能となっている。また、組織の状態でのヘキスト染色の染色性の違いにより、幹細胞と思われる細胞の局在が判明する可能性があり、これまでに行った電子顕微鏡による形態学的な特徴と比較することで高い確率で幹細胞の同定が可能になるとと思われる。

さらに前述のごとく、幹細胞のマーカーの発見も重要である。また分化に伴う表面マーカーなどの変化も調査する必要がある。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、今後は培養液の検討や、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、今後は今回のような組織の状態での保存も可能と考えられる。

現時点で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、可能性は示唆された。凍結保存液の組成、浸透圧、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(解凍)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。

さらに角膜組織(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。

今後、作成した再生角膜あるいは人工角膜は保存後、実際に使用するにあたり、他施設などへ輸送する必要がある。当眼科の共同研究では羊膜上培養細胞の輸送に伴う細胞活性の変化について検討しており、羊膜上の培養角膜上皮細胞では常温での輸送でその活性が維持されていることが判明した。これらの結果をふまえ、今後長期保存した細胞あるいは組織の輸送法に関する検討を行う。

5. まとめ

これまでの研究では培養、凍結保存などについて角膜組織内におけるその重要性から内皮細胞を中心にを行った。現時点では内皮細胞の回収法、培養技術が一定レベルまで確立された。しかし、より細胞傷害の少ない状態での回収と培養法についてのさらなる検討が今後は必要である。幹細胞の同定法などについてはまだ確立していないがその可能性と方向性が示唆された。来年度は幹細胞と思われる細胞(特に角膜内皮細胞)の回収を行う予定である。また凍結保存については長期保存が可能であることが確認されたが、今後の条件設定が必要である。

6. 研究発表

なし

7. 知的所有権の取得状況

なし

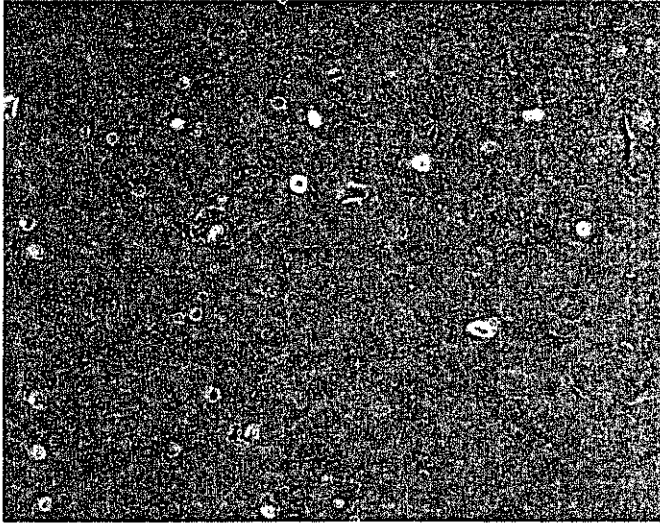


图 1 初代培養角膜內皮細胞

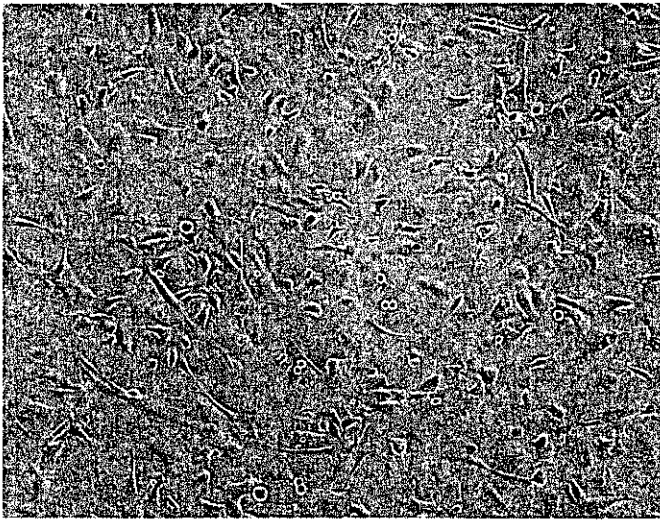
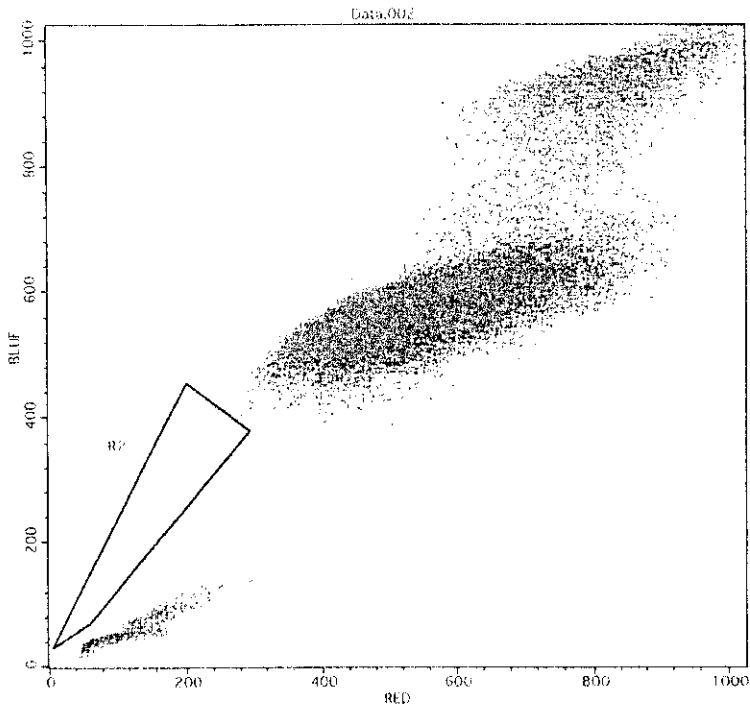
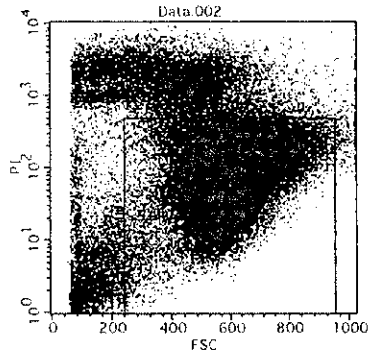
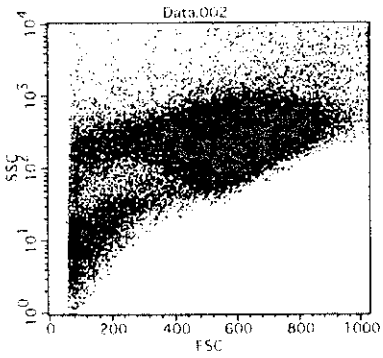


图 2 繼代角膜內皮細胞



File: Data.002
 Sample ID: P5
 Tube: tube #1
 Acquisition Date: 28-Feb-03
 Gated Events: 80207
 X Parameter: FL4-H RED (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total
R1	80207	100.00	80.21
R2	133	0.17	0.13



File: Data.002
 Sample ID: P5
 Tube: tube #1
 Acquisition Date: 28-Feb-03
 Gated Events: 80207
 X Parameter: FL4-H RED (Linear)

Gate	Events	% Gated	% Total
G1	80207	100.00	80.21
G2	133	0.17	0.13
G4	133	0.17	0.13

図3 ヘキスト染色による細胞分画