

平成15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

目 次

課題番号		
20030960A KH71066	免疫抑制剤の体内動態並びに薬効発現に関わる蛋白群の遺伝子解析を基盤とした移植臓器における拒絶反応防御に関する研究	乾 賢一 …… 1
961A KH71067	インフォームドコンセントに基づいた外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制の確立とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション	大野泰雄 …… 11
962A KH71068	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立とその応用	永森静志 …… 21
963A KH71069	ヒト組織・細胞の新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究－ヒト組織バンクの効率的運用へ向けて－	松浦成昭 …… 25
964A KH72076	公共的な研究利用ヒト組織バンクシステム構築の検討	小林英司 …… 30
965A KH72077	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	篠崎尚史 …… 36
966A KH72078	ヒト組織の創薬研究資源化に関する研究	林 真 …… 42

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

研究要旨

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

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) 東京歯科大学角膜センター 菅谷健

A. 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、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。

また、生体材料の凍結保存に関して、細胞、組織、全体臓器の各レベルで研究が進められている。すでに配偶子(精子、胚)、赤血球、骨髄細胞等の浮遊細胞については凍結保護剤、凍結手技が確立し、臨床応用がなされている。一方、細胞塊である組織に関しては凍結保護剤がすべての細胞に均等に接触せず、

凍結法の確立が望まれる。さらに凍結保存、融解した組織片を移植して生着、組織構築を観察する際に、拒絶反応が問題となるなど研究は困難を極めている。

本研究は組織凍結保存法確立を目的として、鶏胚大腿骨を用いて骨および軟骨を緩速凍結（プログラムフリーズ法）および急速凍結（ガラス化法）した場合の融解後 Viability を比較した。

B. 研究方法

1) 角膜内皮細胞のシングルセル化

白色家兎を用い角膜内皮細胞を高い生存率でシングル化し回収する方法を検討した。具体的には内皮細胞が接着した状態でデスメ膜ごと鑷子を用いて実質細胞より剥離し、これに酵素処理を加えることで内皮細胞を単離した。trypsin/EDTA 処理、dispase II 処理、EDTA 処理およびこれらの組み合わせ、あるいは Accumax[®] 処理などにより、その生存率とシングル化の度合いを比較検討した。

2) 幹細胞の同定

(1) ABCG2 transporter

内皮細胞における幹細胞様細胞集団の同定を行うため、幹細胞マーカーの一つと考えられている ABCG2 transporter の発現を観察した。角膜を 8mm のトレパンを用いて周辺部と中央部に

分離し、それぞれから角膜内皮細胞を回収・培養し、継代細胞を用いて ABCG2 transporter の発現を免疫細胞染色にて検討した。

(2) 細胞分裂能

角膜内皮細胞は周辺部と中央部においてその増殖能に差があると考えられているため、増殖期のマーカーである Ki67 用いてその差異を組織培養の状態にて検討した。増殖誘発として EDTA 処理あるいは創傷作成を行い、48 時間後および 72 時間後の Ki67 の取り込みを観察した。

(3) 増殖率

ヒト角膜内皮細胞を部位別に回収・培養し、その増殖率について比較した。ABCG2 transporter 発現の実験と同様に 8mm のトレパンにて角膜を周辺部と中央部に分け、それぞれから内皮細胞を回収・培養し、形態学的差異および、継代細胞 (passage 2) において細胞数の増加を経時的に観察した。

一方、器官凍結保存法の開発にあたり、鶏胚の幼若大腿骨下端を用い、DMSO を基にした凍結保護剤でプログラムフリーズしたものと各種容器でガラス化して凍結したものを液体窒素中 (-196°C) で保存した。凍結保存骨を融解して、授精 9 日の鶏胚より作成した漿尿膜培地で 10 日間培養した (図 1)。

培養した骨を採取し、軟 X 線撮影後、組織学的観察を行うとともにサフラニン O 染色、トルイジンブルー染色による軟骨基質の染色性を観察した。

図 1 Culture of Cryopreserved Chick Embryonic Femur on Egg Chorioallantoic Membrane

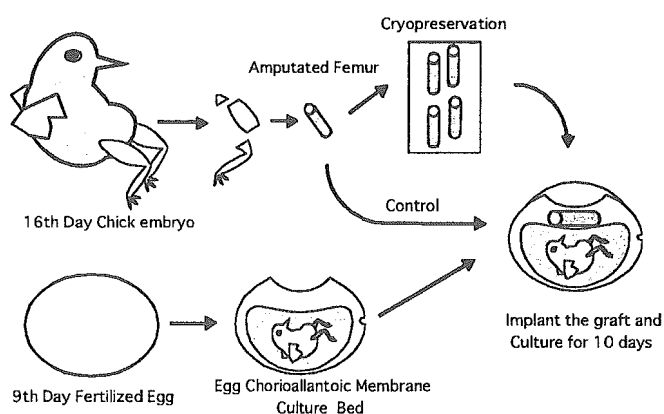


図 1

<倫理面への配慮>

本研究には眼球とその周囲の組織、あるいは角膜

移植時に不要となったレシピエント角膜また結膜組織等の入手が必要である。国内ドナー角膜については移植に用いる以外は国内では法的根拠が明確でないため使用できず、当分は米国のアイバンクより供給される研究用眼球から試料を得ることが基本となる。あるいはドナー角膜とは関係なく、献体と同様に本人もしくはその家族に希望があった場合には当大学の倫理委員会の承認を得た後、承諾書を作成してインフォームドコンセント後、承諾を得て使用することとする。

また、レシピエント角膜については必要性がある場合には、同様に当大学の倫理委員会の承認を得た後、承諾書を作成してインフォームドコンセント後、承諾を得て使用することとする。

これらにより得られた試料はまず実験室レベルでの使用範囲内とするため安全性について対象者に不利益が生じる可能性はないと思われる。

C. 研究結果

1) 角膜内皮細胞のシングルセル化

trypsin/EDTA 処理のみでは高い生存率を保持したまま細胞をデスメ膜より単離してることが困難であった。また Accumax^R についても同様に十分な内皮細胞を回収してることが困難であった。

dispase II を用いた場合はデスメ膜から内皮細胞を高率に回収可能であったが、細胞をシングル化する効果が不十分であった。EDTA 処理のみの場合はデスメ膜から比較的十分量の細胞を回収することができ、またシングル化も可能であった。このため、dispase II 処理後に trypsin/EDTA 処理する方法と EDTA 処理のみで回収する方法を最終的に比較検討した。0.2% dispase II により 1 時間処理し、その後 0.25%/0.02% Trypsin/EDTA 処理 5 分間による方法と、0.02% EDTA により 1 時間処理する方法では、その生存率は前者が、90.3%、後者が 74.4% であり、シングルセル化については前者の方が有効であった。各々の方法で、それぞれ 2 眼から回収された細胞数は前者が 5.2×10^5 個 後者は 7.0×10^5 個であった。

2) 幹細胞の同定

(1) ABCG2 transporter 周辺部および中央部から回収されたヒト培養角膜内皮継代細胞においては ABCG2 transporter の発現は免疫細胞染色においては認められなかった。

(2) 細胞分裂能

増殖誘発を行わない場合、角膜内皮細胞が細胞周期へ導入されていることを示す Ki67 陽性細胞をほとんど認めることはなく、これは *in vivo* の状態と似ていた。

一方、増殖誘発として EDTA 処理あるいは創傷作成した場合には Ki67 陽性細胞を認めた。EDTA 処理の場合には周辺部において Ki67 陽性細胞率が比較的高い傾向を認めた。(図 2,3) 創傷作成の場合には中央部および周辺部のいずれにおいても Ki67 陽性率が上昇した。

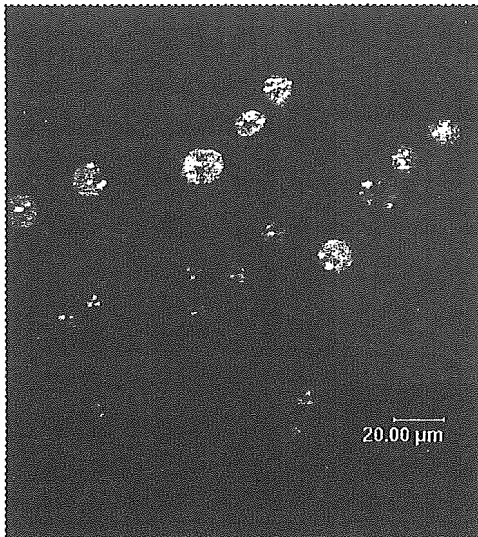


図 2 角膜周辺部 ki67 陽性細胞

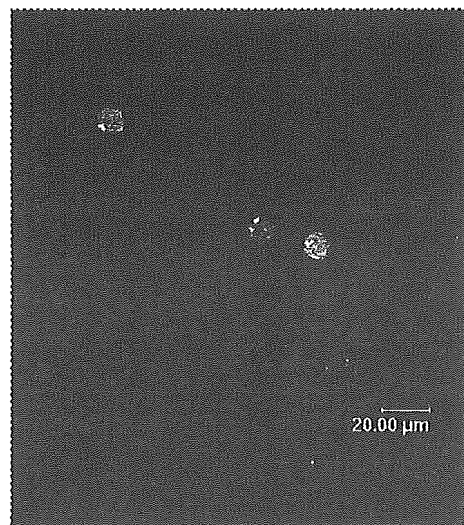


図 3 角膜中央部 ki67 陽性細胞

(3) 増殖率

8mm で周辺部と中央部にかけて培養し継代細胞で比較した場合、その増殖率に著明な差は認めなかった。(図 4,5)

また、形態学的にも周辺部と中央部での培養細胞に明らかな差は認められなかった。

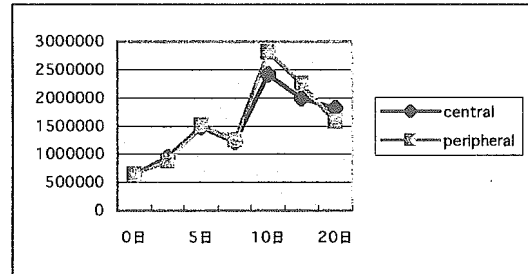


図 4 ヒト継代角膜細胞の増殖率(65 歳)

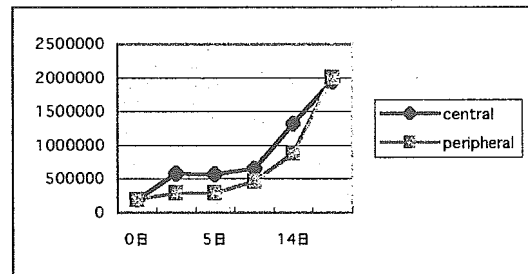
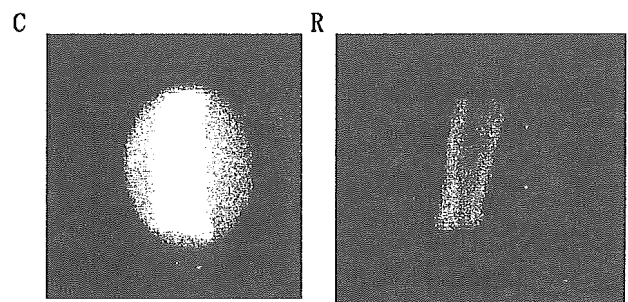


図 5 ヒト継代角膜細胞の増殖率(60 歳)

さらに、DMSO を基にした凍結保護剤でプログラムフリーズしたものでは、軟 X 線像は非凍結の対照に比較してやや劣るものの骨端部比較的良好に長径、横径とも成長していた(図 6)。ガラス化群でもチューブ内のシート上で凍結した群は比較的良好に成長していたが、ポリエチレンパックを使用した群は成長が悪かった。組織学的には、非凍結の培養骨では長径、横径とも良好に成長し、軟骨基質の染色性も良好であった。プログラムフリーズ群では長径、横径の成長は比較的良好で軟骨基質の染色性も良好であった。

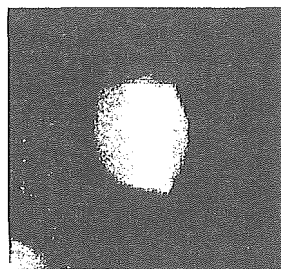
図 6 凍結保存骨の X 線像



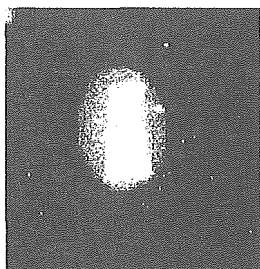
C: 対照 (非凍結)

R: 対照 (液体窒素に直接投入)

PD



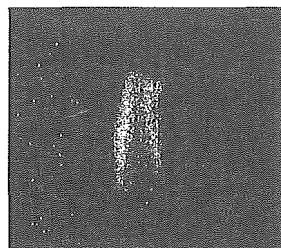
PDE



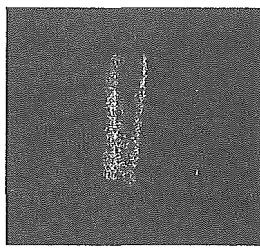
PD:プログラムフリージング (DMSO)

PDE:プログラムフリージング (DMSO+卵黄)

VP



VT



VP:vtrification (ポリエチレンパック)

VT: vtrification (ポリエチレンチューブ)

VTS



VTS:vtrification (ポリエチレンチューブ+クライオシート)

以上のことから、凍結保護剤への卵黄添加は、融解後の新生骨形成率向上に有用であった。その機序を検討するため、精製卵黄油、精製レシチン（フォスファチジルコリン）を卵黄の代わりに添加しても保護効果を認めしたが、全卵黄のほうが保護効果は高く、卵黄中の何が保護活性の主体であるか、現在検討中である。

鶏胚骨端軟骨を前項と同様に凍結保存して、viability を観察した。培養軟骨を採取し、軟 X 線撮影後、組織学的観察を行うとともにサフラニン O 染色、トルイジンブルー染色による軟骨基質の染色性を観察した。DMSO を基にした凍結保護剤でプログラムフリーズしたものでは、軟 X 線像は非凍結の対照に比較してやや劣るものの骨端部比較的長径、横径とも成長していた。ガラス化群でも VTS

群は比較的長径に成長していたが、VP 群は成長が悪かった。

組織学的には、非凍結の培養骨では長径、横径とも長径に成長し、軟骨基質の染色性も良好であった。プログラムフリーズ群では長径、横径の成長は比較的長径で軟骨基質の染色性も良好であった。ガラス化群では一般に viability は不良であったが、VT 群、VTS 群ではやや保たれ、VP 群は不良であった。プログラムフリーズ法では非凍結骨に比してやや劣るが viability は温存され、将来的には軟骨移植のドナーとして利用されることが期待される。次に DMSO を基にした凍結保護剤で汎用型冷凍庫を用い、 -10°C 、 -20°C 、 -40°C 、 -80°C に、または液体窒素 (-196°C) 中で凍結保存した。解凍後、受精 9 日の鶏胚より作成した漿尿膜培地で 10 日間培養した。培養した軟骨を採取し、凍結軟骨の viability を評価した。DMSO を基にした凍結保護剤で凍結保存したものは、 -80°C 、 -40°C 、 -196°C の順に viability が温存された。 -10°C 、 -20°C で凍結したものは生存しなかった。凍結保護剤で処理しなかった群（対照）は各温度とも軟骨の viability は温存されなかった。

D. 考察

1) 角膜内皮細胞のシングルセル化

trypsin/EDTA 処理は短時間ではデスマ膜から内皮細胞を遊離させる効果が不十分であり、作用時間を長くすると生存率が低下してしまうためコントロールが困難であった。これに比し、EDTA 処理のみの場合には細胞表面蛋白などを与える影響も少ないと考えられ、生存率が高かつデスマ膜からの遊離、および細胞間の接着から開放することが可能であり、有用な処理法であった。dispase II 処理についてはデスマ膜からの遊離に有用であったが、細胞間接着については trypsin/EDTA あるいは EDTA 処理に劣っていた。これは特に細胞間接着にはカドヘリンなどの関与があり、キレート剤が必要であることを示していた。このために dispase II と trypsin/EDTA による短時間の処理を組み合わせることになった。前述のごとく短時間の trypsin/EDTA 処理では細胞の生存率が著しく

低下することなく、また細胞間接着についても有効であり高率にシングルセル化が可能であった。このため、EDTA 処理とこの dispase II 処理に trypsin/EDTA 処理を組み合わせる方法を比較検討した。回収した細胞数 x 生存率の結果はほとんど同様であったが、最終的にシングルセル化がより高率であった後者のほうが有用と判断した。今回は白色家兎角膜内皮細胞を用いた実験であり、これをヒト角膜内皮細胞に応用する場合には生存率が低下する可能性がある。これはヒト角膜内皮細胞がより外的ストレスに弱いことと、若いドナーから検体を得ることが困難なことによる。このため同方法に改良を行いヒト角膜内皮細胞のシングル化に適応する必要があると思われる。今回、十分なドナー数を一時に得ることができず十分な検討が行えなかったため、これは今後の検討課題とする。

2) 幹細胞の同定

(1) ABCG2 transporter

現在、幹細胞のマーカーのひとつとして ABCG2 transporter が考えられている。今回の実験ではヒト培養角膜内皮細胞を用いてこの存在について調査した。培養細胞を用いて免疫細胞染色を行って検討したが、これらでは明らかな ABCG2 transporter の存在を証明できなかった。角膜内皮側にも幹細胞が存在した場合、その局在は重要である。現時点では最周辺部にその存在を疑っているが、これらの細胞を損傷することなく回収し、かつ培養可能であるかが問題点の一つとして挙げられる。現在の回収法はデスメ膜ごと内皮細胞を回収した後に細胞を酵素処理によってデスメ膜から遊離させている。

しかし、このデスメ膜の剥離が最周辺部では極めて困難である。これは最周辺部ではデスメ膜が徐々に薄くなるためである。したがって仮に幹細胞が最周辺部に存在した場合、培養時にこれらが回収されているか確認が困難である。

また、幹細胞にはその周辺環境が重要とされており (Niche)、この条件を培養という環境下で維持できない場合は幹細胞をそのまま保つことが困難と予想される。さらに幹細胞の数そのものがきわめて少ないと予想され、上記の回収

法と合わせると培養細胞による観察のみでは ABCG2 transporter の存在を完全に否定できないと思われる。このため、今後は角膜組織の状態での免疫組織染色を行うとともに、RT-PCR を行うことで ABCG2 transporter について調査していく。

さらに、上記のシングル化で得た細胞を用いて Hoechst33342 による染色を行い、SP 分画についても検討する。

(2) 細胞分裂能

ヒト角膜内皮細胞は生体内ではほとんど増殖をしていないことが知られているが、今回の角膜組織を用いた実験でも細胞周期に導入する刺激を加えない場合には、増殖あるいは細胞周期に導入される細胞がほとんど見られなかった。EDTA あるいは創傷作成により、細胞間接着から開放された細胞では細胞周期に入り、増殖することが確認された。これはヒト角膜内皮細胞に分裂能が残っていることを示している。創傷作成という強い刺激を加えた場合には中央部の細胞でも細胞周期に導入されることが確認された。したがって、角膜内皮細胞においては部位に限らず、増殖能を持っていることを示唆している。

幹細胞が存在する場合には周辺部に細胞周期に導入される細胞がより多いと予想されたが、創傷作成の場合には周辺部と中央部で差を認められなかった。これに対し EDTA 処理の場合にはやや周辺部に細胞周期に導入される細胞数が多い傾向が観察された。これは創傷作成による刺激が極めて強い刺激であったことによると考えられる。現時点では観察数が十分でないため今後も同実験を継続して詳細に検討していく。

(3) 増殖率

今回の実験では周辺部と中央部で増殖率に差を認めるのは困難であった。8mm で中央部と周辺部にわけ、

周辺部には幹細胞を含むより増殖能の高い細胞が存在すると考えて施行したが、差を認めなかった。これは上記のように最周辺部の細胞を十分に回収できなかった可能性、および細胞を播種する際に細胞間接着による障害がないために中央部の細胞でも十分増殖可能であったことな

どがその原因として考えられる。このために内皮細胞をデスメ膜から遊離させず、デスメ膜ごと培養する方法も施行したが細胞の増殖が悪く、検体の有効利用が行えないことからこの方法は中止した。今後の方針としては増殖率を見るのではなく、何代まで継代可能かといった方法が考えられるが長期間の観察が必要となる。また最終的に培養されている細胞が内皮細胞であるか証明することも重要となってくる。

E. 結論

本年度の研究では角膜組織内におけるその重要性により、内皮細胞を中心にその幹細胞の同定、増殖能の部位別差異について検討した。現時点では角膜内皮細胞においては明らかな幹細胞の同定までに至っていないが、周辺部に増殖能の高い細胞の存在は疑われ、今後追加実験を行うことでより詳細な幹細胞についての同定が可能となる。

また、組織凍結に関しては DMSO を保護剤とする緩速凍結が適していた。さらに汎用冷凍庫を用いる緩速凍結法により融解後 viability が確認されたことは、将来的な臨床応用を考慮した場合、大きな利点となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suuronen EJ, Nakamura M, Watsky MA, Stys PK, Müller LJ, Munger R, Shinozaki N, Griffith M. Innervated human corneal equivalents as in vitro models for nerve-target cell interactions. FASEB J. 2003 Nov 3 [Epub ahead of print].
2. 篠崎尚史. バイオ角膜. 医療材料・医療機器の安全性と生体適合性. 181-192, 2003.
3. 篠崎尚史, 浅水健志. 組織の保存方法: 角膜・強膜. 日本組織移植学会雑誌. Vol. 2. No. 1: 103-108. 2003.
4. プログラムフリーズ法およびガラス化法による幼若骨の Viability 温存の違い、高橋正憲、浪花豊寿、兼子 智、低温医学 29 (3)、64-68、2003

2. 学会発表

1. World Health Organization, Meeting on Ethics, Access, and Safety in Tissue and Organ Transplantation: Issues of Global Concern, Madrid, Spain, 2003/10/6-9.

- 1) Shinozaki N. Cell and Tissue Banking and Transplantation: Issues in Tissue Banking and Transplantation in Japan.
- 2) Shinozaki N. Quality Management System.

2. 小野宏之、高橋正憲、兼子 智、各種凍結保存法による幼若骨の Viability の検討、歯科学報、102、87、2002

3. 三笠貴彦、高橋正憲、兼子 智、凍結方法の違いによる骨端部軟骨の Viability、- プログラムフリーズ法とガラス化法の比較-、歯科学報、102、48. 2002

4. 高橋正憲、兼子 智、凍結保存法の違いによる骨および軟骨の Viability の検討、日本低温医学会誌、28、2002

5. 浪花豊寿、高橋正憲、兼子 智、各種温度に設定された汎用型冷凍庫内で凍結保存した幼若骨の Viability の検討、日整会雑誌、77、1180、2003

6. 高橋正憲、兼子 智、幼若骨端部軟骨の各種温度に設定した汎用型冷凍庫内保存による Viability の検討、日整会雑誌、77、1142、2003.

7. 第 27 回角膜カンファレンス・第 19 回日本角膜移植学会、軽井沢、2003/2/20-22. 浅水健志. 篠崎尚史. 情報提供としてのアイバンクホームページ.

8. 第 2 回日本組織移植学会、神戸市、2003/8/9. 浅水健志. 吉野由希子. 篠崎尚史. 提供角膜情報の画像管理システム.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

平成15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16年9月30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