

array CGH という方法で HCE-T のゲノム構成が正常 2 倍体細胞から大きく変化していることを見出した。さらにサブクローニングによってこの細胞が性質の異なるヘテロな亜集団の集合であることも確認されたことから、この細胞を安易に角膜上皮細胞の *in vitro* モデルとして利用することへの警鐘を鳴らす論文を発表した (Yamasaki K. et al, *IOVS* 2008.)。

三次元モデルを用いた試験法としては、MATREX などがあり、非刺激性物質の検出を目的としている。しかし、MATREX はヒト皮膚線維芽細胞を含んだコラーゲンゲルで作製されているため、角膜上皮細胞を用いたモデルではない。

一方、三次元角膜再構築モデルとしては、HCE / CORNEAL EPITHELIUM (SkinEthic)、LabCyte CORNEA-MODEL (J-TEC) などによる研究が行われている。また、前述した HCE-T を用いた三次元角膜再構築モデルの研究も行われている。

バリデーションスタディにおいて、施設内・施設間再現性が高く、反復実験において変動幅の少ない細胞を用いることが望ましい。ヒトの眼刺激性に対する評価の代替試験法であれば、本来ヒト角膜上皮細胞を用いることが当然であろう。しかし、日本国内では日本アイバンク協会に提供して頂いたヒト角膜組織を研究目的で使用することが禁止されている。またヒト正常角膜上皮由来細胞は 4 継代以上培養することが困難である。(Yamamoto N et al. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010)

本研究において使用する iHCE-NY 細胞は、研究代表者が作製したヒト角膜輪部由来の新規不死化角膜上皮細胞株であり、①ウサ

ギ角膜上皮由来細胞 (SIRC) ではなく正常ヒト角膜上皮細胞由来であること、②既報のヒト角膜上皮不死化細胞 (HCE-T) のように作製時に生ウイルスを使用せず、新しく開発した技術による遺伝子導入不死化細胞であること、③特殊なフィーダー細胞や羊膜などを必要としないこと、④細胞培養・維持が容易で同時多施設あるいは同一施設内反復試験に適した細胞であることなど、これまでの *in vitro* 眼刺激性試験評価系よりもヒト眼刺激性を評価できる代替試験材料として多くのアドバンテージポイントを有している。

本研究期間では、化粧品や医薬部外品等の安全性評価のために用いられている試験法の中で重要な位置付けを占める眼刺激性試験法に着目し、分子生物学的・組織化学的手法を用いた眼刺激性試験・眼毒性試験代替法を開発するという目的に基づき、化粧品原料の原体および化学物質全般を評価できる眼刺激性試験として、有害性の同定だけでなく、NOAEL を求めるための簡便で安価なヒト角膜三次元再構築モデルの開発と試験プロトコールの検討を行う。

各年度における研究課題は、以下のとおりであった。

【平成22年度】

1. 不死化遺伝子の SV40 Large T Antigen (SV40) を組み込んだ GFP ベクターの構築。
2. 構築したプラスミドベクターを用いて、ヒト角膜上皮細胞由来の不死化細胞を作出する。
3. 作出された不死化ヒト角膜上皮細胞 (iHCE-NY) のクローニングと細胞選出。

4. 選出したクローンの解析。
5. 不死化細胞の対照として使用するHCE-Tの追加クローニング。
6. 高感度で簡便な試験評価系とマーカーの開発にむけた予備実験。
7. 追加クローニングを行ったHCE-Tを用いて三次元角膜再構築モデルの作製に関する予備実験。

【平成23年度】

1. 平成22年度からの継続研究である正常角膜上皮培養細胞、iHCE-NY細胞、nHCE-Tを用いてマイクロアレイによる遺伝子解析を行った。
2. マイクロアレイによる遺伝子解析結果を基に、iHCE-NY細胞の二次元培養モデルを用いて、細胞に与える影響を検出できる高感度（被験物質がMTT法やCV法より低濃度）な指標（遺伝子マーカー）を選出した。
3. 2種類の不死化角膜上皮細胞（iHCE-NY、nHCE-T）を用いて、再現性が高く、安定して三次元角膜再構築モデルが作製できる培養方法を検討した。

【平成24年度】

1. iHCE-NYを用いた二次元培養系の曝露実験プロトコールを作成する。
2. 平成23年度に実施したマイクロアレイ遺伝子解析結果を基に、iHCE-NY細胞の二次元培養モデルを用いて、細胞毒性試験よりも低濃度被験物質でも細胞に与えるごくわずかな影響を検出できる高感度指標遺伝子を選出する。
3. iHCE-NYを用いて、再現性が高く、安定して三次元角膜再構築モデルが作製

できる培養法の確立および三次元角膜再構築モデルを用いた曝露実験プロトコールの検討を行う。

B. 研究方法

B-1. 細胞材料の現状

市販されている正常角膜上皮細胞は、2継代程度しか維持させることができない。また、日本国内のヒト角膜組織から新たに研究目的で細胞を分離培養することが禁止されており、さらにヒト角膜上皮から比較的未分化な角膜上皮細胞を安定して分離・培養する方法が確立されていない。一方、既存の不死化角膜上皮細胞（HCE-T）は、細胞樹立当時は重層化能をもっていたようであるが、度重なる継代の結果、現在では重層化能が減衰（消失）してしまった細胞になっている。さらに樹立時にクローニングがされていないため、ヘテロな細胞集団である。

以上のように、現状で市販・購入できる細胞は様々な課題があり、この状態のままでは安定して供給できないため、眼刺激性試験代替法で使用することはできない。

B-2. 供試細胞

今回の研究に使用した細胞は、ヒト角膜輪部組織から分離・培養した正常ヒト角膜上皮幹／前駆細胞（HCE）とHCEに不死化遺伝子を導入して作製した不死化ヒト角膜上皮細胞（iHCE-NY）を用いた。なお生ウイルスを用いてSV40を導入したが、分化能が減衰している不死化ヒト角膜上皮細胞株（HCE-T；理化学研究所 筑波研究所 バイオリソースセンター）を不死化細胞の対照として用いた。

HCEの初代分離培養には、PCT Corneal Epithelium Medium（CnT-20；CELLnTEC Advanced Cell Systems, Bern, Switzerland）を使用し、不死化遺伝

子導入後は血清含有培地で培養した。

一方、対照としてヒト角膜上皮から分離・培養した正常ヒト角膜上皮細胞に生ウイルスにSV40-*adeno virus*組換えウイルスベクターを導入して作成した不死化したヒト角膜上皮細胞株（HCE-T；理化学研究所 筑波研究所 バイオリソースセンター）は64kDケラチン産生能があり、ウイルス粒子は産生しなくなったと報告されている。しかし、細胞株樹立時にクローニングを行っておらず、さらに複数回にわたる継代培養によって、現在供給されている細胞は、細胞分化能（重層化能）が減衰したと報告されている。そこで、このHCE-Tを山本が細胞表面マーカーによるクローニングを行い、分離樹立した細胞（nHCE-T）を用いた。

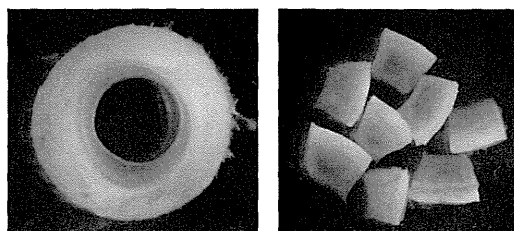
さらに、近年二次元培養法による細胞を用いた眼刺激性試験代替法で使用されているウサギ角膜上皮由来細胞のSIRCも併せて対照として使用した。

B-3. HCEの初代分離培養

研究目的での使用として米国アイバンク（Northwest Lions Eye Bank）より眼球を購入し、研究に用いた。

摘出した前眼部から水晶体、虹彩、毛様体などの組織を切除した。さらに角膜輪部の周辺組織のみを残し、角膜中心部や眼球結膜も切除した。

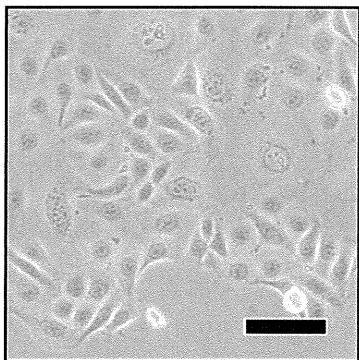
次にデスメ膜と一緒に角膜内皮細胞を剥離し、角膜輪部を8等分に分割し、コラゲナーゼ（新田ゼラチン）と細胞分散溶液を加えて37℃で30分間酵素処理した。酵素処理終了後、リン酸緩衝液（PBS）で遠心洗浄を行い、培養した。



CnT-20 を用いて培養した細胞を用いて、不死化遺伝子の SV40 Large T Antigen（SV40）の導入実験と不死化角膜上皮細胞の作出を行った。なお、ヒト角膜輪部組織から正常ヒト角膜上皮幹/前駆細胞の分離・培養法に関する詳細は、論文として報告した。（Yamamoto N, Hirano K, Kojima H, Sumitomo M, Yamashita H, Ayaki M, Taniguchi K, Tanikawa A, Horiguchi M. Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46 (9), 774-780, 2010.）

B-4. HCE-T の追加クローニング

ヒト角膜上皮から分離・培養した正常ヒト角膜上皮細胞を SV40-*adeno virus* 組換えウイルスベクターを用いて不死化したヒト角膜上皮細胞株である。64kD ケラチン産生能があり、ウイルス粒子は産生しなくなったと報告されている。細胞株樹立時にクローニングを行っておらず、さらに複数回にわたる継代培養によって細胞分化能（重層化能）が減衰したと報告されている。培地は理化学研究所 バイオリソースセンターの能書に従って培養を開始した。



上記写真のように、様々な形態をしている細胞が観察されたため、まずセルソーターを用いて細胞を選択することとした。具体的には、細胞の大きさと細胞内構造および上皮系・間葉系幹/前駆細胞マーカーの1つであるCD29 (Integrin β 1) の発現量の違いで細胞を分取した。

次に分取した細胞を限界希釈法によるクローニングを試みたが、従来の方で培養すると細胞増殖性が著しく低下することが判明したため、従来の限界希釈法よりも多い細胞数を播種し、その後レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LMD) を用いて細胞の形態で判断しながら細胞のクローニングを行った。

B-5. 発現プラスミドベクター

B-5-1. 発現プラスミドベクターの構築

ヒトの正常角膜上皮を用いた眼刺激性試験・毒性試験代替法の開発において、まず、使用する細胞特性などを安定して供給できるようにしなければならない。しかし、ヒト角膜上皮細胞は、初代培養が難しく、さらに継代・維持することができない細胞として知られている。そこで、細胞特性を維持させることを目的とし、不死化遺伝子 (SV40 Large T antigen : SV40) を定常的に発現する Green Fluorescent Protein (GFP) ベクターに組み込んだ発現プラスミドベクターを厚生労働科学研究費補助金

の医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業 (国際協調を重視した化粧品・医薬部外品における安全性試験法の再評価に関する研究 [H22-医薬-一般-002]) で開発した。

しかし、実際に角膜上皮細胞への導入実験を行ってみたところ、遺伝子は一時的に組み込まれたものの、安定した目的遺伝子が発現しない、あるいは遺伝子導入マーカーとして組み込んだ蛍光物質を合成する遺伝子の読み込みに何等かの支障が発生し、蛍光が著しく減衰する結果となったため、平成21年度にはSV40と新たな発現ベクターと組み合わせた発現ベクター (SV40 Large T antigen - GFP ベクター) およびNCBIに登録されたアミノ酸配列 (Accession Number : NP_043127) の非翻訳領域を除いて作成したベクター (SV40 Large T antigen ORF - GFP ベクター) を構築した。

さらに今年度ではpAcGFP1-N1ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) にSV40を導入し、IRESを介さずGFPにつなぎ、発現プラスミドベクターを作製した。

SV40 Large T Ag 遺伝子 (Simian virus : SV40)は、サルを宿主とするポリオマウイルスであり、アカゲザルの腎臓の細胞から分離された。不死化遺伝子SV40-T抗原は、細胞周期を制御する働きを持つ癌抑制遺伝子p53の働きを阻害し、結果として細胞の増殖を促す作用を持つと考えられている。本研究で使用したSV40は、K12株由来大腸菌 (XL1-Blue) に組み込まれたpBluescript II KS (-) ベクター (3.0 kbp) に導入されたpBS-SVT : SV40 Large T antigen (JCRB Gene Bank (財)ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンク ; 遺伝子クローン (Resource ID) : VG0402より購入) を用いた。

B-5-2. 発現プラスミドベクターの確認

SV40 Large T Ag遺伝子の5'末端領域の配列はSequencer(3730 XL DNA Analyzer, ABI)を用いて解析した。遺伝子クローン(VG0402)を鋳型として、終止コドンを除くSV40 Large T Ag遺伝子の翻訳領域(2,479bp)を増幅した。ベクターDNA(pAcGFP-N1)のマルチクローニングサイトを制限酵素(EcoR I/BamH I)で処理し、PCRで増幅させたSV40 Large T Ag遺伝子をIn-Frameとなるように挿入・ligationさせた。

この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認とSV40 Large T Ag遺伝子の発現を確認するためのPrimerを作製し、Sequencerを用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行った。

B-5-3. 細胞への遺伝子導入

平成20年度の厚生労働科学研究において、細胞への遺伝子導入方法として、リポフェクション法(8試薬×4条件)とエレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入を検討した。しかし、十分に満足できる遺伝子導入の条件を確立することができなかった。

そこで、平成21年度ではおよそ10 µl程度の微量サンプル量で遺伝子導入ができる新しいエレクトロポレーション法による検討を行った。なお、平成21年度に作製した新しいベクターにはGreen Fluorescent Protein (GFP)が目的遺伝子の直後に連結して組み込まれているため、導入された細胞は、倒立蛍光顕微鏡で観察すること緑色の蛍光を発していることから、遺伝子導入効率を判別することができる。

B-6. iHCE-NYの選択分離と細胞特性

HCE細胞にSV40 Large T antigenを導入した細胞(iHCE-NY)を初回の細胞選択で薬剤選択を行い、その後はセルソーター(FACS Vantage SE; BD)を用いて、GFP

の蛍光で9回セルソーティングを行い、遺伝子導入細胞の選択を行った場合と初回の細胞選択で薬剤選択を行わず、全てセルソーターを用いてGFPの蛍光で10回セルソーティングを行い遺伝子導入細胞の選択を行い、結果を比較した。

正常ヒト角膜上皮細胞(HCE)、初回の細胞選択において薬剤選択を行った代表的なクローン(iHCE-NY 090409)と薬剤選択を行わなかった代表的なクローン(iHCE-NY 090502)および対照の不死化角膜上皮細胞(HCE-T)を用いて、核型解析(Karyotype)とプロテオミクスを行い、比較検証した。

B-6-1. 核型解析 (Karyotype)

カリオタイプは種ごとに一定であり、ヒトの2倍体細胞は22対の常染色体と1対の性染色体、計46本の染色体を持つ。不死化遺伝子の導入により正常の染色体の状態ではないが、出来る限り正常の染色体数に近い細胞クローンを選出することが望ましい。そこで、得られたクローンについての核型解析を行った。

実際の核型解析の手法は、以下のとおりである。

1. 培養中の細胞に対して、コルセミド溶液を最終濃度 0.06 µg/ml になるように加える。
2. 添加後、16 時間培養を続ける。
3. 0.075M KCl を加える (低張処理)。
4. 継代の常法に従って細胞を 15 ml 遠心チューブに回収。遠心、PBS で洗浄・遠心後、Trypsin-EDTA で処理し、細胞を単一分散する。
5. 遠心して上澄みを吸引する。

6. 低張液処理 37°C に加温した 5 ml の塩化カリウム溶液に細胞を軽いピペティングで浮遊させる。
 7. 37°C 恒温槽で 10 分間静置。
 8. 5 ml の低張塩化カリウム液に対して 0.5 ml のカルノア固定液を加え、転倒混和する。
 9. 室温で 5 分静置。遠心 1,000 rpm, 5 min 後に、上清を吸引する。
 10. 5 ml のカルノア固定液を加え、転倒混和する。
 11. 室温で 5 分静置。遠心 1,000 rpm, 5 min 後に、上清を吸引する。
 12. 5 ml のカルノア固定液を加え、転倒混和する。
 13. 室温で 5 分静置。遠心 1,000 rpm, 5 min 後に、上清を吸引する。
 14. 低張液と同量のカルノア固定液を加え、転倒混和する。
 15. 室温で 5 分静置。遠心 1,000 rpm, 5 min 後に、上清を吸引する。
 16. 細胞を 1ml のカルノア固定液に浮遊させる。
 17. エタノールで清拭し乾燥させたスライドガラスの上に、1 滴を数 cm 上方より滴下することで展開し、メタノール固定後にギムザ染色して検鏡する。
1. サンプルを溶解し、分子量と等電点による 2 次元電気泳動を行う。
 2. Image analyzer Typhoon 9400 を用いてスポットの検出を行う。
 3. Image master 2D Platinum DeCyder 2D のソフトウェアを用いてスポット分析を行う。
 4. スポットを回収し、ゲル内プロテアーゼ処理を行う。
 5. Multi dimensional HPLC Paradigm と ESI イオントラップ型質量分析装置を用いて質量分析 (LC/MS/MS) を行う。
 6. データベースと照合し、Mascot Search を行い、スポットの同定を行う。

B-7. 高感度で簡便な試験評価系とメーカーの開発に関する予備実験

従来手法では、 10^4 個の細胞から遺伝子 (total-RNA) を抽出し、逆転写反応を行い、その後目的遺伝子の Primer & Probe を用いてリアルタイム PCR を行っていた。

1. 細胞(10^4 cells)より遺伝子抽出
2. 逆転写反応 (cDNA の作製)
3. 前増幅反応 (Pre-Amp PCR)
4. リアルタイム PCR を実施

従来法の場合、試薬反応時間等だけでも 7 時間以上かかっており、コストも 200test で 200,000 円以上かかっていた。

そこで、様々なメーカーから販売されている試薬と組み合わせを検討した結果、細胞を溶解して遺伝子 (total-RNA) を取り出し、Primer & Probe set を用いた 1 step RT real time PCR を行う新しい手法を考案した。

1. 細胞(10^4 cells)より遺伝子抽出

B-6-2. プロテオミクス (プロテオーム解析)

プロテオーム (Proteome) とは、ある組織や細胞に存在しているタンパク質の総体である。複数の組織や細胞の間でプロテオームを比較することにより、生命現象を総合的に理解することが可能となる。プロテオームを扱う解析をプロテオミクスと言う。

実際のプロテオミクスの手法は、以下のとおりである。

2. Probe を用いた 1step RT-real time PCR を実施

この手法であれば、2ステップで終了し、時間もおよそ3時間以内で終了する。コストは200testで100,000円以下に抑えることができる。

一方、評価マーカーとしては、角膜上皮細胞で検出されるマーカーを中心に検討した。

B-8. 追加クローニングした HCE-T による三次元角膜再構築モデルの作製に関する予備実験

追加クローニングした HCE-T による分化能（細胞重層化能）を評価した。

セルカルチャーインサート上に播種し、無血清培地（CnT-20）で3日間コンフルエントになるまで培養した。その後、血清含有培地で培養し、その後セルカルチャーインサートの内側の培地を抜き取り、既報のようにエアリフト法による培養を行い、分化能（細胞重層化能）を評価した。

B-9. マイクロアレイ解析

正常ヒト角膜上皮培養細胞、山本が作製した不死化角膜上皮細胞（iHCE-NY細胞）および理化学研究所から分譲されている不死化角膜上皮細胞（HCE-T）を山本がクローニングした細胞（nHCE-T）のそれぞれの遺伝子発現解析を行い、不死化による正常細胞との違いを検証した。

B-9-1. 供試細胞

- HCE（正常ヒト角膜上皮培養細胞）
- iHCE-NY（不死化角膜上皮細胞）
- nHCE-T（不死化角膜上皮細胞）

B-9-2. 使用キットと試薬

- CodeLink™ Bioarray (Applied Microarrays, Inc.)
- CodeLink™ Controls and Buffer kit (Applied Microarrays, Inc., cat# 320001)
- Message Amp™ II - Biotin Enhanced Kit (Life Technologies Corporation (Ambion), cat.# AM1791)
- Cy5 streptavidin for microarray (GE Healthcare Bio-Science Corp., cat.# 28-9002-24)
- 1 x TNT buffer; 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, and 0.1 M Tris-HCl(pH 7.6)
- Cy5 - streptavidin working solution; 10 ug Cy5 - streptavidin and 5 ml TNB buffer
- TNB buffer; 0.5% NEN blocking reagent (PerkinElmer, cat.# FP1020), 0.05% Tween 20, and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6)

B-9-3. 標識 aRNA の作製とハイブリダイゼーション

1. Total RNA QC チェックを、分光光度計または Agilent 2100 バイオアナライザーを用いて行う。
2. Total RNA 1 ug を分取する。
3. MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit を用いて、標識 aRNA を作製する。
4. 10 ug 標識サンプル及び 5 x fragmentation buffer を用いて、94 °C、20 分加温後クラッシュアイスで急冷する。
5. 以下の溶液を用いて、ハイブリダイゼーション溶液 260 ul を調製する。
78 ul hybridization buffer component A

130 ul hybridization buffer component B

27 ul nuclease-free water

25 ul fragmented aRNA

6. ハイブリダイゼーション溶液を 90°C で 5 分間インキュベートした後、室温になるまで放置し、マイクロアレイ上にアプライする。
7. マイクロアレイをチャンバー内に入れ、37°C、18 時間 (300 rpm) インキュベートする。
8. ハイブリダイズしたアレイを 0.75 x TNT buffer で 46°C、60 分間洗浄する。
9. アレイを Cy5 - streptavidin working solution に 25°C、30 分浸す。
10. アレイを 1 x TNT buffer で 25°C、5 分間洗浄を 4 回繰り返す。
11. アレイを 0.1 x SSC/0.05% Tween 20 溶液で 25°C、30 秒間洗浄を 2 回繰り返す。
12. アレイを 25°C、600 x g、3 分間遠心乾燥する。

B-9-4. スキャニングとデータ解析

1. アレイ用スキャナー GenePix® 4000B (Molecular Devices 社) を用いて、洗浄後のアレイのスライドのスキャニングを行う。
2. 解析ソフトウェア CodeLink™ Expression Analysis Software v5.0 (Applied Microarrays, Inc.) を用いて、得られたイメージ画像 (TIFF 画像、16bit 形式) から、各スポットにおける蛍光強度値の定量化を行う。その際に、各スポットの蛍光強度値 (raw intensity) からバックグラウンド値 (background) の差をシグナル値 (net

intensity) として算出する。

B-10. 二次元培養系曝露実験プロトコール

平成23年度の実験結果を基に、播種細胞数、曝露前培養時間、被験物質の曝露時間を検討した。

播種細胞数は $1.0E+06$ cells/ml に調製し、公比2にて11段階希釈した条件で検討した。曝露前培養時間(前培養)は、0日(0時間)、1日(24時間)、2日(48時間)を比較した。曝露後培養時間(後培養)は、0日(0時間)、1日(24時間)、2日(48時間)を比較した。

評価基準としては、被験物質の曝露前にコンフルエントにならない播種細胞数と曝露前培養時間(前培養)の設定、および被験物質曝露後培養時間(後培養)によって細胞が増えることが確認できる各条件を設定することである。

被験物質の曝露時間は、1分、5分、30分を比較検討した。実際に眼に物質が入った場合、通常は痛み等を伴うため、速やかに洗眼することが多いことから、眼内に留まる時間は比較的短いと推定される。よって評価基準としては、実際の臨床で想定される眼内貯留時間(1分程度)の結果とほぼ同じ程度の短い時間で、かつ細胞実験の実際の手技において、短時間で曝露できるか、である。

B-10-1. 条件検討-① (播種数、前/後培養)

2 回/週の頻度で継代培養している細胞を酵素処理 (TRYPLE™ SELECT, Gibco 12563-011) にて剥離回収した。細胞懸濁液を培地にて $1.0E+06$ cells/ml に調製し、公比 2 にて 11 段階希釈した後、96 ウェルプレート (CellBIND, Costar 3300) に 100 μ l

ずつ播種した。

前培養 2 日のプロトコールは、播種培養 1 日後に培地を交換し、合計 2 日間、37°C、5% CO₂ 前で前培養し、被験物質（ここでは PBS のみ）を曝露した。前培養 1 日のプロトコールは、37°C、5% CO₂ の条件で培養し、播種培養 1 日後に被験物質（ここでは PBS のみ）を曝露した。

被験物質（ここでは PBS のみ）を曝露した後、1 日、または 2 日の後培養してからニュートラルレッド（NR [Wako 140-00932]）の取り込み試験を行った。なお対照として後培養なしの条件でも試験を行った。後培養の後、培地を NR 含有培地（50 µg/ml）に置換して、2 時間静置した（37°C、5% CO₂）。PBS（-）にて洗浄後、抽出液（水：エタノール：酢酸 = 49:50:1）を添加し 3 時間以上室温（暗所）にて静置した。吸光マイクロプレートリーダー（VersaMax, Molecular Devices）にて吸収波長 540nm および 650nm の吸光度を測定した。

B-10-2. 条件検討-②（前培養、曝露時間）

条件検討-①の結果に基づき、プロトコール①として、前培養 2 日、後培養 1 日として、播種細胞数を 4 濃度（5.0E+04, 2.5E+04, 1.25E+04, 6.25E+03 cells/well）で設定した。

被験物質として SLS (Sigma L6026, CAS No.151-21-3)、Triton X-100 (SIGMA X100, CAS No. 9002-93-1)、EtOH (WAKO 057-00456, CAS No. 64-17-5) を用いた。曝露時間は、1 分、5 分、30 分を検討した。曝露に関わる一連の操作（培地除去、被験物質添加と除去および洗浄）については分

注機（EDR-384U, BioTec）を用いて 96 ウェルを同時に処理した。それぞれの条件における NR 取り込み試験の結果から、SLS の IC₅₀ 値を算出した。

B-10-3. 条件検討-③（前培養、曝露時間）

条件検討-①の結果に基づき、プロトコール②として、前培養 1 日、後培養 1 日として、播種細胞数を 4 濃度（5.0E+04, 2.5E+04, 1.25E+04, 6.25E+03 cells/well）で設定した。

被験物質として SLS (Sigma L6026, CAS No.151-21-3) を用いた。曝露時間は、1 分、5 分、30 分を検討した。曝露に関わる一連の操作（培地除去、被験物質添加と除去および洗浄）については分注機（EDR-384U, BioTec）を用いて 96 ウェルを同時に処理した。それぞれの条件における NR 取り込み試験の結果から、SLS の IC₅₀ 値を算出した。

B-11. 高感度指標遺伝子の選出

SLS およびエタノールを被験物質として、細胞生存率に影響のない濃度（IC₅₀ の濃度よりも薄い被験物質濃度、細胞毒性が検出されない濃度）が含まれるような希釈系列を作製し、細胞毒性試験よりも低濃度被験物質でも細胞に与えるごくわずかな影響を検出できる高感度指標遺伝子を選出する。

B-11-1. 被験物質曝露細胞からの RNA 抽出

曝露条件として、iHCE-NY 播種細胞数を 2.5E+04 cells/well、前培養 1 日、曝露時間 5 分、後培養 1 日と設定した。この曝露実験は、NR 取り込み試験用と高感度指標遺伝子を選出するための RNA 抽出用に 96 ウェルプレート 2 枚を 1 セットで調製した。なお、参考実験として曝露時間 30 分でも同

様の実験を実施した。

平成 23 年度の研究成果を基に、培養細胞から RNA を抽出する試薬として、CellAmp® Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (Real Time) (TaKaRa 3732) を用いた。96 ウェルフォーマットでの操作を考慮し、培養細胞から安定的に RNA を抽出するための酵素処理法 (Proteinase K プロトコール) を採択した。この方法は試薬キットの説明書中にオプションとして記載されているが、手順書に記載された反応時間 (5 分) を順守すると処理するウェル数が限られてしまう。そこで、反応時間を 20 分に延長した検討を平成 23 年度に実施したところ、得られる RNA 量の減少や純度に大きな影響は見られなかったため、酵素処理の時間は 20 分で実施した。

また、PCR の効率を向上させる目的で、抽出した RNA の純度を上げる操作 (試薬に溶解しない物質の除去) として、抽出した RNA 試料を遠心分離し (9,000×g, 5 分)、上清について分光光度計 (NanoDrop® ND-1000) を用いて 260nm と 280nm の吸光度比を測定した。

濃度の異なる被験物質曝露後の細胞から抽出した RNA サンプルは、リアルタイム PCR の実施まで -80°C で凍結保存した。

B-11-2. 高感度指標遺伝子の選出

データベースを基に BLAST サーチを行い、先に実施した microarray 上にスポットしてある 54,841 遺伝子から角膜上皮細胞に比較的特化して発現している遺伝子、microarray の結果を基にした細胞周期関連遺伝子、細胞死の関連遺伝子などの候補遺伝子 (28 gene + 2 Endogenous Control) を以下のように絞り込んだ。

1) 角膜上皮細胞マーカー

- p63
- Mucin-1
- Mucin-16
- Keratin-3
- Keratin-12

2) 細胞接着因子

- ZO-1
- E-cadherin
- Desmoglein-3
- Occcludin
- Involucrin
- CD29
- CD44
- Trk-A

3) 細胞周期マーカー

- Ki-67
- PCNA
- Cyclin-D1
- p15
- p21
- p27

4) アポトーシス関連因子

- Caspase-3
- Caspase-7
- Bcl-2
- BAX
- Snail-1
- Snail-2

5) 細胞内タンパク質

- Type-1 collagen
- MMP-9
- Beta-catenin

6) Endogenous Control

- GAPDH
- 18S rRNA

上記の候補遺伝子の発現について iHCE-NY 細胞に SLS と EtOH の各濃度を曝露して遺伝子発現量の変化を調査した。

B-12. 三次元角膜再構築モデルの作製

三次元培養角膜再構築モデルの作製プロトコールは、3種類の供試細胞を用いて、培養条件の検討を行った。

B-12-1. 供試細胞

三次元角膜再構築モデル作製には、HCE-T、nHCE-T、および iHCE-NY を用いて比較検討した。

B-12-2. モデル構築の培養条件検討

主に以下の項目について、様々な条件で検討した。

- セルカルチャーインサートの検討
メーカーとインサートの素材やポアサイズの検討
- コーティング物質の検討
セルカルチャーインサートのコーティング試薬や条件の検討
- 分化誘導培地の組成
血清濃度、成長因子濃度、培地ミネラル濃度、抗酸化物質、タンパク質分解阻害剤などの濃度
- 培養日数とプロトコール
継代維持培地から分化誘導培地、その後のエアリフト培養の各工程における培養日数
- 培地（培養液）の液量
インサート内液と外液の各培養ステップにおける液量の検討

B-12-3. 再構築モデルの評価

以下の三次元角膜再構築モデル作製プロトコールを用いて検討した。

Day	0	1	2	3	4	5	6	7	10-13
Condition	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Mon-Thu
1	Seed	Growth		Diff24	A/L			Harvest Measure Fix Section	Measure Fix Section
2	Seed	Growth		Diff1.5? A/L	A/L				
3	Seed	Growth		(Half) Diff24	A/L				
4	Seed	Growth		(Half) Diff48	A/L				

● MTT 法（SLS 曝露）

SLS 曝露による被験物質の曝露プロトコールの検討を行った。SLS は、濃度を 2%、1%、0.5%、0.05% に設定し、曝露時間を 5 分と 60 分、曝露量を 50 μ L/insert とし、洗浄は PBS を 800 μ L \times 5 回実施した。三次元角膜再構築モデルの評価は、MTT を用いて行った。MTT の反応時間が 3 時間、抽出は 300 μ L のイソプロパノールで行った。

● FL 法（無処置）

THE FLUORESCEIN LEAKAGE TEST (INVITTOX Protocol No. 71) を基に FL 法の条件検討を行った。Fluorescein sodium の濃度は 0.01% とし、適用時間は 30、60、120、180 分で行った。測定波長は、Ex : 485nm、Em : 530nm に設定した。測定機器は、Gemini EM Fluorescence Microplate Reader (Molecular Devices 社製) を用いた。

● 電気抵抗（無処置）

三次元角膜再構築モデルの重層構造および細胞間結合の評価として、Millicell ERS-2 電圧抵抗計 (Millipore 社製) を用いて電気抵抗を測定した。

● 組織標本（無処置）

作製した三次元角膜再構築モデルは、SUPER FIX など固定した後、常法に基

づきパラフィンブロックまたはクライオブロックを作製し、ミクロトームにて薄切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色（H.E.染色）を行った。なお iHCE-NY については、免疫染色（ZO-1、Involucrin）も行った。

B-13. 三次元角膜再構築モデルの曝露

プロトコル作製

作製した三次元角膜再構築モデルを用いた被験物質による曝露実験プロトコルの基礎検討を実施した。

B-13-1. 被験物質曝露プロトコルの検討

6日間作製プロトコル（ショートタームプロトコル）で作製した三次元角膜再構築モデルを用いて、被験物質を5分間曝露した後、後培養を0日/1日で検討した。

Day	0	1	2	3	4	5	6	7	10-13
Condition	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Mon-Thu
1	Seed	Growth		Diff24			AL		
2	Seed	Growth		Diff15+AL			AL	Harvest Measure Fix	Measure Fix Section
3	Seed	Growth		(Half) Diff24			AL		
4	Seed	Growth		(Half) Diff48			AL		

陽性コントロールとして、2% SLS（Sigma L6026、CAS No. 151-21-3）を設定した。GHS分類のNCとして、3-Methoxy-1,2-propanediol（東京化成工業 M0125、CAS No. 623-39-2）とTween 20（Sigma P1379、CAS No. 9005-64-5）を曝露した。GHS2として、Ethanol（Wako 057-00456、CAS No. 64-17-5）と5% Triton X-100（Sigma X100、CAS No.9002-93-1）を曝露した。GHS1として、1-Butanol（Wako 026-03326、CAS No. 71-36-3）と50% Benzalkonium Chloride（東京化成工業 B0414、CAS No. 63449-41-2）とした。

曝露後の三次元角膜再構築モデルをMTT法で評価した。対照（PBS）の吸光度を100%とした時の各被験物質による細胞毒性を計算した。

（倫理面への配慮）

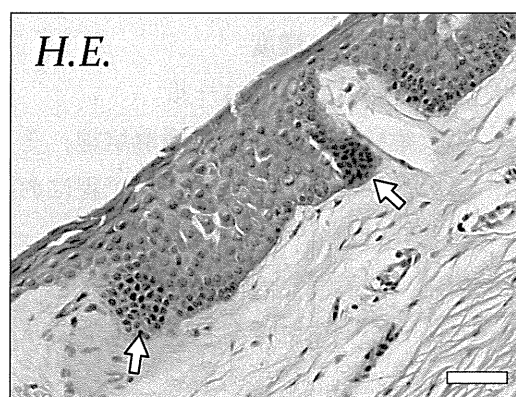
本研究で使用したヒト正常角膜上皮細胞は、市販されている細胞、研究用で販売・分譲されている細胞、および研究用として購入した眼球（角膜）組織から分離培養した細胞を用いているため、特別な倫理面への配慮は必要ないと考えている。

C. 研究結果

C-1. ヒト角膜輪部組織の細胞

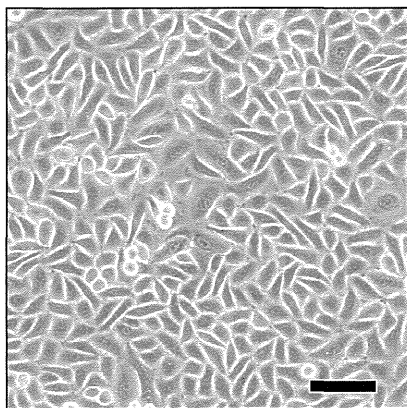
ヒト角膜輪部組織には、角膜上皮幹/前駆細胞が存在することは、既に多くの論文で報告されている。そこで、今回使用した角膜輪部組織における角膜上皮幹/前駆細胞の存在を確認した。

角膜輪部組織の組織切片標本をヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色したところ、角膜上皮の基底領域の細胞で、メラニン顆粒を有し、周辺の細胞よりも細胞核の大きさも細胞全体の大きさも小さく、細胞が凝集している（クラスターを形成している）細胞集団が存在していた。



C-1-2. HCEの初代分離培養

研究目的で米国アイバンク（Northwest Lions Eye Bank）より購入した眼球組織の角膜輪部より角膜上皮幹/前駆細胞の分離を行った。

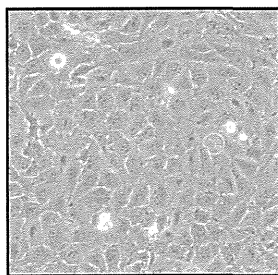


分離培養した HCE は、4 継代目までは上皮細胞様の多角形の細胞形態を呈しており、6 継代目ぐらいから一部の細胞で紡錘形の形態に変化するものも観察された。

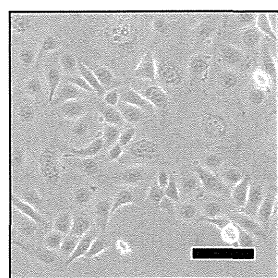
C-2. 供試細胞

各細胞の位相差顕微鏡写真を示す。

- iHCE-NY

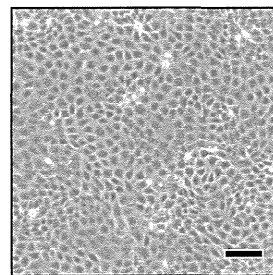


- HCE-T



クローニングしていないため、細胞の大きさや形態がさまざまである。

- nHCE-T

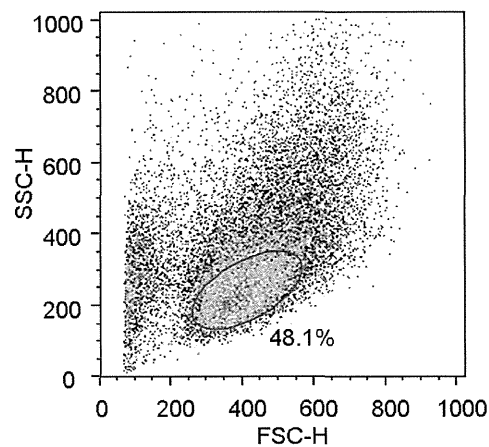


HCE-TをCD29でソーティングし、遺伝子導入とクローニングを行ったため、細胞形態がほぼ一律となった。

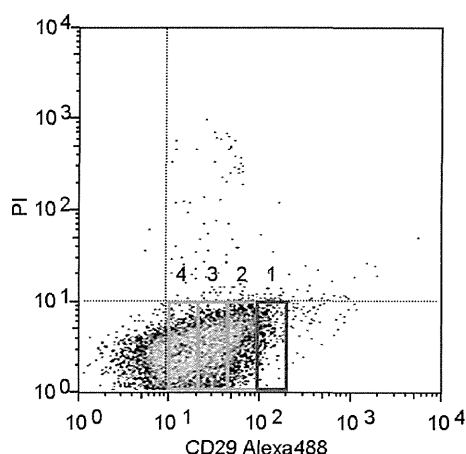
C-3. HCE-T の追加クローニング

細胞の大きさと細胞内構造および上皮系・間葉系幹/前駆細胞マーカーの1つであるCD29（Integrin $\beta 1$ ）の発現量の違いで細胞を分取した。細胞の大きさを反映する前方散乱光：Forward Scatter（FSC）、細胞内の構造や顆粒の状態を反映する側方散乱光：Side Scatter（SSC）およびCD29の発現強度について、いくつかの条件でソーティングした。

結果として、FSC mid、SSC small で



CD29 の発現が最も強いフラクションから分離した細胞を用いることとした。



次に従来の限界希釈法よりも多い細胞数を播種し、その後レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LMD) を用いて細胞の形態で判断しながら細胞のクローニングを行った。目的細胞以外の細胞を LMD のレーザーで照射することにより、細胞個々のレベルで選択することができた。

C-4. 発現プラスミドベクターの構築と導入

終止コドンを除く SV40 Large T antigen 遺伝子の翻訳領域 (2,479bp) を増幅した。ベクター DNA (pAcGFP-N1) のマルチクローニングサイトを制限酵素 (EcoR I / BamH I) で処理し、PCR で増幅させた SV40 Large T antigen 遺伝子を In-Frame となるように挿入し、IRES を介さず GFP につなぎ ligation させた。

この挿入した遺伝子を含む領域の塩基配列を確認と SV40 Large T Ag 遺伝子の発現を確認するための Primer を作製し、Sequencer を用いて片鎖解析による塩基配列のシーケンスを行い、SV40 Large T antigen 遺伝子が In-Frame で挿入されており、IRES を介さず GFP につなぎ、ligation できたことを確認した。作製した

Vector の全シーケンスデータを添付資料①に示した。

平成 21 年度の厚生労働科研で開発した微量サンプル量で遺伝子導入ができる新しいエレクトロポレーション法を用いて、HCE 細胞に SV40 Large T antigen を導入した。

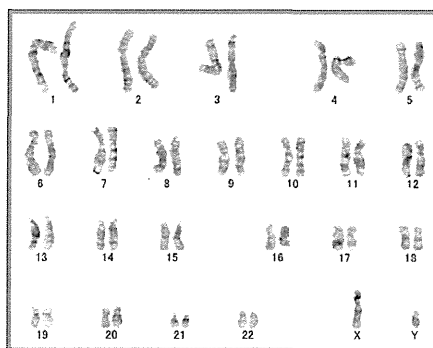
C-5. iHCE-NY の選択分離と細胞特性

初回の細胞選択で薬剤選択を行い、その後はセルソーター (FACS Vantage SE ; BD) を用いて、GFP の蛍光で 9 回セルソーティングを行い、遺伝子導入細胞の選択を行った代表的なクローン (iHCE-NY 090409) と初回の細胞選択で薬剤選択を行わず、全てセルソーターを用いて GFP の蛍光で 10 回セルソーティングを行い遺伝子導入細胞の選択を行った代表的なクローン (iHCE-NY 090502) が作製された。

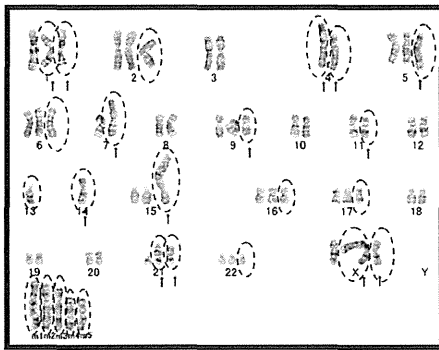
C-5-1. 核型解析 (Karyotype)

HCE、HCE-T、iHCE-NY の核型解析を行った。

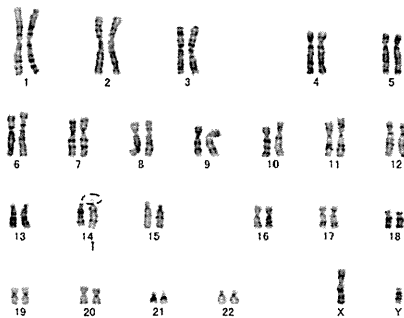
・ HCE は、Mode=46 であった。



・ HCE-T は、Mode=59 であった。



iHCE-NY (5 passage) のモードは 46 であった。



iHCE-NY (80 passage) のモードは 63 ~65 であった。

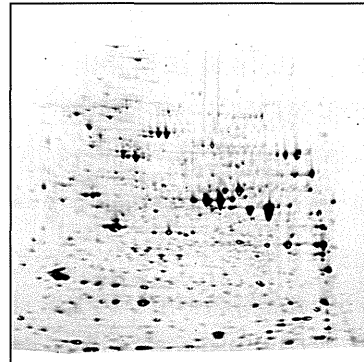


C-5-2. プロテオミクス (プロテオーム解析)

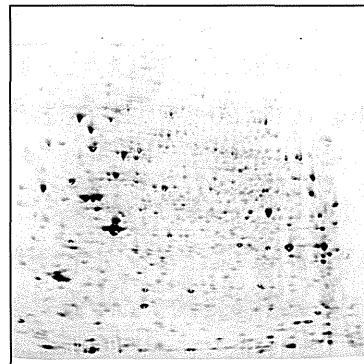
まず、角膜上皮組織における個人差を検証した。研究用角膜として米国アイバンクより購入した角膜組織の一部を用いたプロテオミクスを行ったところ、メジャーなスポットには相違はないものの、詳細なスポットでは違いがあることが明らかとなった。

次に角膜上皮組織 (未培養)、ヒト正常角膜上皮細胞 (HCE、培養細胞)、不死化角膜上皮細胞 (HCE-T、培養細胞)、不死化ヒト角膜上皮細胞 (iHCE-NY 090502、培養細胞) の二次元電気泳動を行った。

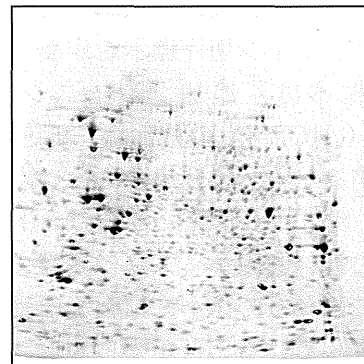
1. 角膜上皮組織 (未培養)



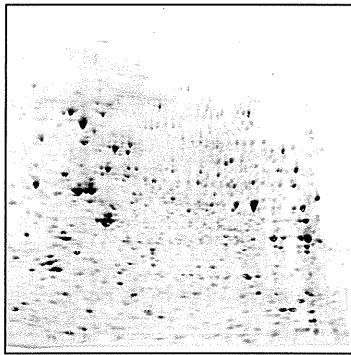
2. HCE



3. HCE-T



4. iHCE-NY 090502



C-6. 高感度で簡便な試験評価系とマーカーの開発に関する予備実験

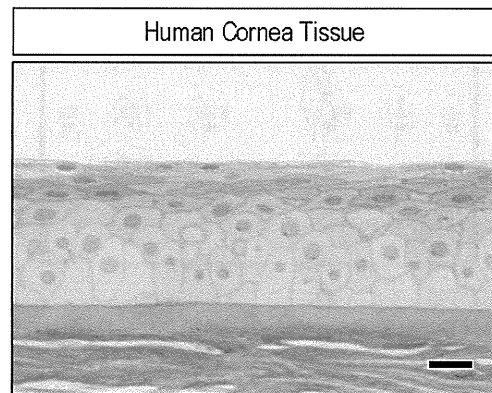
新しい手法を用いて、二次元培養の角膜上皮細胞で検出される候補マーカーの検出を試みた。

iHCE-NY 090502 を用いて 18S rRNA を Endogenous Control ($Ct = 13.9 \pm 0.5$) として検証したところ、CD29 ($Ct = 23.1 \pm 0.5$)、CD44 ($Ct = 26.7 \pm 0.4$)、E-cadherin ($Ct = 35.1 \pm 0.8$)、ZO-1 ($Ct = 27.8 \pm 0.3$)、Occludin ($Ct = 29.8 \pm 0.2$) であった。

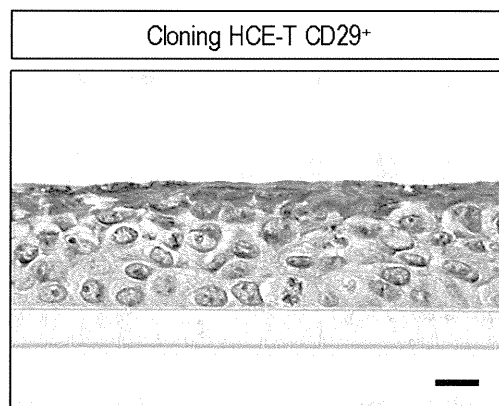
C-7. 追加クローニングした HCE-T (cHCE-T) による三次元角膜再構築モデルの作製に関する予備実験

エアリフト法による培養を施した細胞をセルカルチャーインサートに載せたまま、SUPER FIX (クラボウ) で固定し、通常の方法でパラフィン切片標本作製した。作製した標本は、追加クローニングした HCE-T (cHCE-T) の分化能 (細胞重層化) を評価するため、H.E.染色を行い観察したところ、セルカルチャーインサートのメンブレンに近い細胞から空気に暴露されている表面にむかって徐々に細胞が扁平となって重層化していることが明らかとなった。しかし、現在の条件では安定した三次元培養モデルが構築できていないことから、今後、さらに培養条件を検討する必要がある。

正常ヒト角膜組織切片標本



追加クローニングした HCE-T (cHCE-T) を用いた三次元角膜再構築モデルの作製



C-8. マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析に用いた細胞サンプル (HCE、iHCE-NY、nHCE-T) から RNA を抽出した結果を図 1 に示す。マイクロアレイ解析を行うために十分な精製度と濃度の RNA が回収できた。

HCE と iHCE-NY のマイクロアレイバーサスデータを図 2A に示す。プローブ数 (スポット数) 54,841 個のうち、HCE が iHCE-NY より発現が 2 倍上昇 (2 up) しているスポット数は 1965 個、3 倍上昇 (3 up) しているスポット数は 527 個、4 倍上昇 (4 up) しているスポット数は 220 個であった。

一方、発現が1/2に低下 (2 down) しているスポット数は1758個、1/3に低下 (3 down) しているスポット数は521個、1/4に低下 (4 down) しているスポット数は264個であった。

GO Term Listを用いて、4 upおよび4 downの遺伝子機能解析の結果を図2Bに示す。HCEと比べてiHCE-NYの方が4 upしている遺伝子は、細胞周期関連遺伝子が殆どであり、4 downしている遺伝子は、細胞接着に関連する遺伝子が多かった。

次にBioSystems Pathway Listを用いて遺伝子パスウェイ解析を行った。HCEよりもiHCE-NYの方が4 upしているパスウェイは、Cell cycle, Mitoticを中心に25個であり、4 downしているパスウェイは、ECM-receptorやCell junctionなどを中心に48個であった。

また、HCEに対して各々iHCE-NYとnHCE-Tが2 up、2 down、3 up、3 down、4 up、4 downしている遺伝子、およびiHCE-NYとnHCE-Tが共に2 up、2 down、3 up、3 down、4 up、4 downしている遺伝子の数を図2Cに示す。iHCE-NYとnHCE-Tが共に4 upしているパスウェイは、Cell cycle, Mitoticなどを中心に8個であり、4 downしているパスウェイは、ECM-receptorやCell junctionを中心に19個であった。

C-9. 二次元培養系曝露実験プロトコール

C-9-1. 条件検討-① (播種数、後培養)

細胞懸濁液を培地にて $1.0E+06$ cells/ml に調製し、公比2にて11段階希釈した後、96ウェルプレートに100 μ Lずつ播種し、培養した結果を図3Aと図3Bに示した。

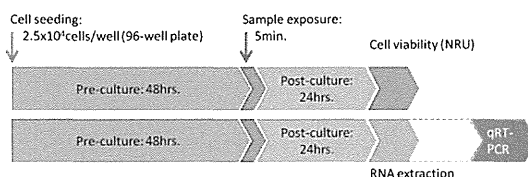
播種後に細胞の増殖を経時的に確認できる細胞濃度は、 $5.0E+04$ cells/well 以下であった。また、後培養2日では、細胞がオーバーコンフルエントになったため、後培養は1日以下とした。

C-9-2. 条件検討-② (前培養、曝露時間)

条件検討-①の結果に基づき、プロトコール①として、前培養2日、後培養1日として、播種細胞数を4濃度 ($5.0E+04$, $2.5E+04$, $1.25E+04$, $6.25E+03$ cells/well) で設定して検討した結果、再現性よく細胞の増殖を確認できる播種細胞数は、 $2.5E+04$ ($25,000$) cells/well であった (図4A)。

次にSLSの曝露時間を1分、5分、30分で検討した結果、1分と5分の曝露では、ほとんど差がなかったことから、曝露時間は実際の実験ハンドリングを考慮し、5分曝露を採用した (図4B)。

上記の条件絞り込みを行い、以下のプロトコール①を設定した。



このプロトコール①に基づき、iHCE-NY、HCE-T、SIRCを用いて、SLS、X-100、EtOHの曝露実験を行ったところ、各細胞間に大差は認められなかった (図4C)。

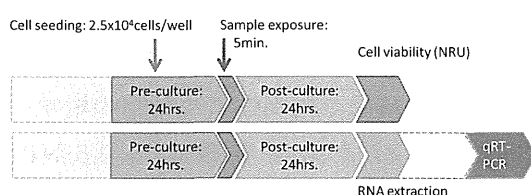
C-9-3. 条件検討-③ (前培養、曝露時間)

プロトコール②として、前培養1日、後培養1日として、播種細胞数を4濃度 ($5.0E+04$, $2.5E+04$, $1.25E+04$, $6.25E+03$ cells/well) で設定して検討した結果、このプロトコールにおいて再現性よく細胞の増

殖を確認できる播種細胞数は、 2.5×10^4 (25,000) cells/well であった (図 4 D)。

次に SLS の曝露時間を 1 分、5 分、30 分で検討した結果、1 分と 5 分の曝露では、ほとんど差がなかったことから、曝露時間は実際の実験ハンドリングを考慮し、5 分曝露を採用した (図 4 E)。

上記の条件絞り込みを行い、以下のプロトコール②を設定した。



C-10. 高感度指標遺伝子の選出

C-10-1. 被験物質曝露細胞からの RNA 抽出

細胞毒性試験の結果から算出される IC_{50} 値は、回収された total-RNA のコントロール (無処置) に対する濃度で予測できることを見出した。これは、遺伝子解析実験のみで細胞毒性試験を省略しても従来の IC_{50} 値を推測することができる可能性があることを示している。結果の一例を表 2 に示した。

C-10-2. 高感度指標遺伝子の選出

データベースを基に BLAST サーチを行い、先に実施した microarray 上にスポットしてある 54,841 遺伝子から角膜上皮細胞に比較的特化して発現している遺伝子、microarray の結果を基にした細胞周期関連遺伝子、細胞死の関連遺伝子などの候補遺伝子 (28 gene + 2 Endogenous Control) のうち、細胞生存率に影響のない濃度 (IC_{50} の濃度よりも薄い被験物質濃度、細胞毒性が検出されない濃度) でも細胞に与えるこ

くわずかな影響を検出できる高感度指標遺伝子を選出した。

SLS と EtOH を 5 分曝露させた条件での遺伝子発現の推移についての結果、および参考までに 30 分曝露させた条件での遺伝子発現の推移の結果を表 3 にまとめた。検討の結果、*cyclin-D1*、*snail-1*、*keratin-3* が細胞毒性試験よりも低濃度において細胞に対する影響を検出できる遺伝子であることが分かった。

C-11. 三次元角膜再構築モデルの作製

C-11-1. モデル構築の培養条件検討

培養条件がわずかでも変わってしまうと、三次元角膜再構築の構造が変化することがわかった。その一例を図 4 F に示した。

C-11-2. 再構築モデルの評価

• MTT 法

SLS 曝露による iHCE-NY の三次元角膜再構築モデルに対する被験物質の曝露プロトコールの検討を行った。SLS の、濃度を 1%、曝露時間を 5 分に設定し、曝露量を $50 \mu\text{L}/\text{insert}$ 、洗浄は PBS を $800 \mu\text{L} \times 5$ 回実施した。評価は、MTT を用いて行った (図 4 G)。

• FL 法 (無処置)

THE FLUORESCEIN LEAKAGE TEST (INVITTOX Protocol No. 71) を基に FL 法の条件検討を行った結果、iHCE-NY の三次元角膜再構築モデルへの Fluorescein sodium の適用時間は、60 分とした (図 4 H)。

• 電気抵抗 (無処置)

iHCE-NY の三次元角膜再構築モデルの無処置における電気抵抗 (ER [Ω]) は、300 Ω 以上で再現性よく確認することができた (図 4 I)。

- 組織標本 (無処置)

HCE-T、nHCE-T、iHCE-NY を用いて作製した三次元角膜再構築モデルは、SUPER FIX など固定した後、常法に基づきパラフィンブロックまたはクライオブロックを作製し、マイクロトームにて薄切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E. 染色) を行った。

HCE-T で作製した三次元角膜再構築モデルは、細胞層が 3～4 層までしか形成されなかった。

nHCE-T で作製した三次元角膜再構築モデルは、細胞層が 5～6 層まで形成できるようになった。細胞形態的にも、表層に移動するほど扁平となり、細胞が分化していることがわかる。

iHCE-NY で作製した三次元角膜再構築モデルも、nHCE-T と同様に細胞層が 5～6 層まで形成されており、表層に移動するほど扁平となっていたことから、細胞が分化していることがわかる。

ヒト正常角膜上皮の組織構造、市販の三次元角膜再構築モデルの組織像 (図 4 J)、および上記の三次元角膜再構築モデルの組織像 (図 4 K) に示した。

iHCE-NY の免疫染色 (ZO-1、Involucrin) 結果を図 4 L に示した。ZO-1、Involucrin を検出することができた。

C-12. 三次元角膜再構築モデルの曝露 プロトコール作製

iHCE-NY を用いて作製した三次元角膜再構築モデルを用いた被験物質による曝露実験プロトコールの基礎検討を実施した。

結果として、NC の物質曝露でも細胞生存率が低かったため、現状のモデルでは感度が高すぎるという結果となった (図 4 M)。また、インサートの内部がエアリフトのまま後培養した場合、細胞生存率は回復せず、むしろ刺激や反応が強くなる傾向があったことから、後培養の条件を再検討する必要がある。

D. 考察

D-1. ヒト角膜輪部組織

ヒト角膜輪部組織には、角膜上皮幹/前駆細胞が存在することは、既に多くの論文で報告されている。今回の詳細な組織標本の作製と観察結果から、角膜上皮の基底領域の細胞で、メラニン顆粒を有し、周辺の細胞よりも細胞核の大きさも細胞全体の大きさも小さく、細胞が凝集している (クラスターを形成している) 細胞集団が存在していることが確認された。また山本が本年度に発表した論文の中でこれらの細胞は、Integrin β 1 (CD29) や p63 などの角膜上皮幹/前駆細胞マーカー陽性の細胞が観察され、それらの細胞は low-affinity neurotrophin receptor p75 (p75NTR) が陽性であることを報告した。

D-2. HCE の分離培養

ヒト角膜輪部より分離した角膜上皮幹/前駆細胞を培養したところ、4 継代目までは上皮細胞様の多角形の細胞形態を呈しており、6 継代目ぐらいから一部の細胞で紡錘形の形態に変化するものも観察された。検討に用いている培地は、市販の無血清培

地であり、今後、未熟な幹/前駆細胞の状態を保持したまま培養できる手法が開発されると、自己の組織幹細胞を用いた再生医療がさらに注目されることとなる。

確立したヒト角膜輪部から角膜上皮幹/前駆細胞の分離・培養手法の再現性は非常に高く、安定した分離培養法であることが確認できた。

D-3. HCE-T の追加クローニング

細胞株樹立時にクローニングを行っていないためヘテロな細胞集団であり、さらに複数回にわたる継代培養によって細胞分化能（重層化能）が減衰したと報告されている。本研究においてセルソーターと改良した細胞生物学的クローニング手法による追加クローニングを行い、細胞分化能（重層化能）を回復した細胞（nHCE-T）としてクローニングすることに成功した。

D-4. iHCE-NY の比較解析

研究成果の代表的な細胞として iHCE-NY と HCE-T を示した。HCE-T と iHCE-NY は、共に正常の 46 本染色体ではなくなっていた。

プロテオミクスの結果から、HCE と HCE-T や iHCE-NY の SV40 を導入した不死化角膜上皮細胞において、全体のスポットが極端に変化しなかった。一方、培養細胞と角膜上皮組織（未培養）を比較すると比較的大きなスポットの違いがあり、角膜上皮組織では Vitamin A 関連酵素などのスポットが検出されたが、全ての培養細胞では殆ど検出されなかった。細胞にとって培養系に移行することは、大きな環境変化が起こっていると考えるべきである。

D-5. 高感度な試験評価系の確立にむけた予備実験

新しく確立した遺伝子発現半定量解析手法を用いて角膜上皮細胞で比較的特異的に検出されるマーカーを検出することができた。一連の手技において従来よりも時間は 1/3 に短縮され、経費も半分に抑えることができた。

D-6. cHCE-T を用いた三次元角膜再構築モデルの作製

追加クローニングした cHCE-T を用いることで、特殊なフィーダー細胞や羊膜などを用いなくても、細胞形態が扁平に変化しながら重層化することができるようになった。再構築モデルの切片標本では、生体の角膜上皮と形態的に類似していた。

D-7. マイクロアレイ解析による比較

新たに樹立した iHCE-NY 細胞は、従来のヒト不死化角膜上皮細胞からクローニングした nHCE-T と同様に正常角膜上皮細胞の HCE と比べて発現が増加している遺伝子は、主に Cell cycle, Mitotic を中心とした細胞周期や細胞増殖に関与するものであった。一方、発現が減少している遺伝子は、ECM-receptor や Cell junction など細胞接着や細胞膜タンパク質の一部であり、細胞の培養環境への適応や継代による細胞増殖の安定性によって、発現遺伝子が減少したものと考えられる。角膜上皮細胞のマーカー遺伝子として代表されるものは、不死化によって減少することがなかったことから、不死化による角膜上皮細胞としての特異性が低下することはなかった。