

D-8. nHCE-T 細胞株の分離・樹立

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-adenovirus 組換えウイルスベクターを導入して作成した理化学研究所より分譲されているヒト不死化角膜上皮細胞株 (HCE-T) は、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。

今回、HCE-T 細胞の中から分化能を有する細胞を細胞の性質を変えことなく独自の手法で分離して樹立した nHCE-T 細胞株は、今年度の研究において、三次元的に角膜構造を再構築できる分化能を有していることがわかった。

D-9. 二次元培養系曝露実験プロトコール

iHCE-NY を用いた二次元培養系曝露実験プロトコールの検討を行った。結果として、以下のプロトコールをまとめた。

- 前培養：24 時間
- 曝露時間：5 分
- 播種細胞数： 2.5×10^4 cells / well
- 後培養：24 時間

D-10. 高感度指標遺伝子の選出

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、*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。

D-11. 三次元角膜再構築モデルの評価

HCE-T は、三次元角膜再構築モデルとしては、組織像が薄いということが分かった。一方、HCE-T からクローニングして遺伝子導入した nHCE-T、および山本が作製した iHCE-NY は、三次元角膜再構築モデルとしての組織像は、非常に正常角膜上皮組織像に近いといえる。

MTT 法、FL 法、電気抵抗など、近年の眼刺激性試験代替法で用いられている評価方法を検討し、いずれも良好な結果を得ることができた。

D-12. 三次元角膜再構築モデルの曝露

実験

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 (曝露時間：5 分) を考案し、実施した。

残念ながら現状のモデルでは、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、感度が良すぎる (三次元角膜再構築モデルとしては脆弱) という結論に至った。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、後培養では、インサート内に培地を再添加するなどのプロトコールの改良が必要であると考えている。

E. 結論

正常ヒト角膜輪部組織から分離培養した HCE を用いて、ウイルスベクターを用いることなく、世界で初めて角膜上皮細胞の不死化細胞 (iHCE-NY) の作出に成功した。

SV40 Large T Ag 遺伝子 (Simian virus : SV40) は、サルを宿主とするポリオーマウイルスであり、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。本研究において、SV40の導入によって、プロテオミクスの結果ではドラステイックな変化はないことが分かった。

iHCE-NYを用いて、計6年の眼刺激性試験代替法に関わる研究に従事してきた。

研究分担者の山本に課せられた6年間のミッションは全てコンプリートすることができた。主な研究成果を表4にまとめた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yamamoto N., Hirano K., Kojima H., Sumitomo M., Yamashita H., Ayaki M., Taniguchi K., Tanikawa A., and 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.

2. 学会発表

- 山本直樹, 平野耕治, 小島肇, 綾木雅彦, 住友万里子, 山下宏美, 大野亜由美, 田島香里, 谷川篤宏, 谷口孝喜, 堀口正之. ヒト角膜輪部由来角膜上皮細胞の分離・培養. 第83回日本組織培養学会, 2010.
- Yamamoto N., Hirano K., Sumitomo M., Yamashita H., Nakamura M., Hara K., Tanikawa A., Horiguchi M.,

Taniguchi K., Kojima H. Generation and analysis of a new immortalized human corneal epithelium cell line. 2011 In Vitro Biology Meeting, North Carolina, 2011.

- 山本直樹, 平野耕治, 小島肇, 住友万里子, 山下宏美, 中村政志, 原和宏, 谷川篤宏, 谷口孝喜, 堀口正之. ヒト角膜組織より分離した角膜上皮細胞への不死化遺伝子の導入と評価. 日本組織培養学会第84回大会, 東京, 2011.
- 山本直樹. 新規作出したヒト角膜不死化細胞を用いた眼刺激性試験評価系の検討. 日本動物実験代替法学会第24回大会, 宮城, 2011.
- 山本直樹, 平野耕治, 山下宏美, 加藤義直, 佐藤淳, 中村政志, 原和宏, 谷川篤宏, 堀口正之, 谷口孝喜, 小島肇. 不死化角膜上皮細胞 (iHCE-NY) を用いた眼刺激性試験代替法に関する研究. 日本組織培養学会第85回大会, 京都, 2012.
- 山本直樹. 新規作出したヒト角膜不死化細胞を用いた眼刺激性試験評価系の確立. 日本動物実験代替法学会第25回大会, 東京, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

今のところ、新規特許出願については未定である。

本科研費交付前に申請・取得しているが、本研究の遂行には欠かせない特許は以下のとおりである。

- 標本作製に関する特許:『難浸透性組

織迅速固定液(特許番号:3723204)』

山本直樹ほか. 2005.

- ・ 新規幹細胞マーカーについての特許
出願状況:『網膜幹細胞の分離方法お
よび網膜幹細胞(出願番号:特願
2006-279917)』山本直樹ほか. 2006.

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

表 2. 細胞毒性試験における IC₅₀ 値の推測

SLS (ug/mL)	Cell viability (%)	RNA conc. (ng/mL)
400	28.3 ± 1.8	24.3 ± 5.58
267	55.5 ± 2.1	52.1 ± 2.62
178	85.8 ± 2.3	84.5 ± 3.00
119	99.9 ± 0.5	113.6 ± 8.74
79	100.5 ± 1.3	118.9 ± 2.37
53	99.9 ± 0.7	117.2 ± 5.96
35	99.8 ± 0.4	114.0 ± 1.79
0 (Control)	100 ± 1.4	116.9 ± 1.63

表 3. 高感度指標遺伝子を選出するための実験結果

- 曝露時間 5 分

	SLS	EtOH
播種細胞数	2.5 x 10 ⁴ cells	2.5 x 10 ⁴ cells
曝露時間	Expo. 5 min	Expo. 5 min
IC ₅₀	267 µg/mL	15 %
<i>cyclin-D1</i>	267 µg/mL	12 %
	Control Ct. - 0.5	Control Ct. - 0.5
<i>snail-1</i>	79 µg/mL	10 %
	Control Ct. + 0.5	Control Ct. + 0.5
<i>keratin-3</i>	119 µg/mL	6 %
	Control Ct. + 0.5	Control Ct. + 0.5

- 曝露時間 30 分

	SLS	EtOH
播種細胞数	2.5 x 10 ⁴ cells	2.5 x 10 ⁴ cells
曝露時間	Expo. 30min	Expo. 30min
IC ₅₀	79 µg/mL	10%
<i>cyclin-D1</i>	53 µg/mL	8 %
	Control Ct. - 0.5	Control Ct. - 0.5
<i>snail-1</i>	53 µg/mL	8%
	Control Ct. + 0.5	Control Ct. + 0.5
<i>keratin-3</i>	35 µg/mL <	6 % <
	Control Ct. + 0.5	Control Ct. + 0.5

表 4. 厚生労働科学研究 山本研究分担者の研究成果

研究年度	主な研究成果	
19年度	正常角膜上皮細胞(前駆細胞)の分離法を確立	
20年度	正常角膜上皮細胞(前駆細胞)の培養法を確立	
21年度	不死化遺伝子ベクターの構築と不死化角膜上皮細胞を樹立	
22年度	不死化角膜上皮細胞の解析①	
	不死化角膜上皮細胞の解析②	
23年度	【2次元培養】 評価遺伝子マーカーの選定	【3次元培養】 培養法の開発
24年度	【2次元培養】 試験プロトコルの確立	【3次元培養】 試験プロトコル概要の確立

図1. マイクロアレイ解析で使ったサンプルの精製度

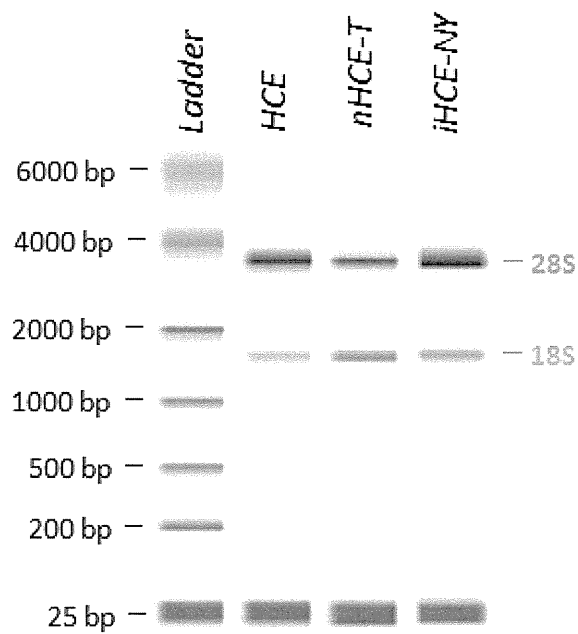
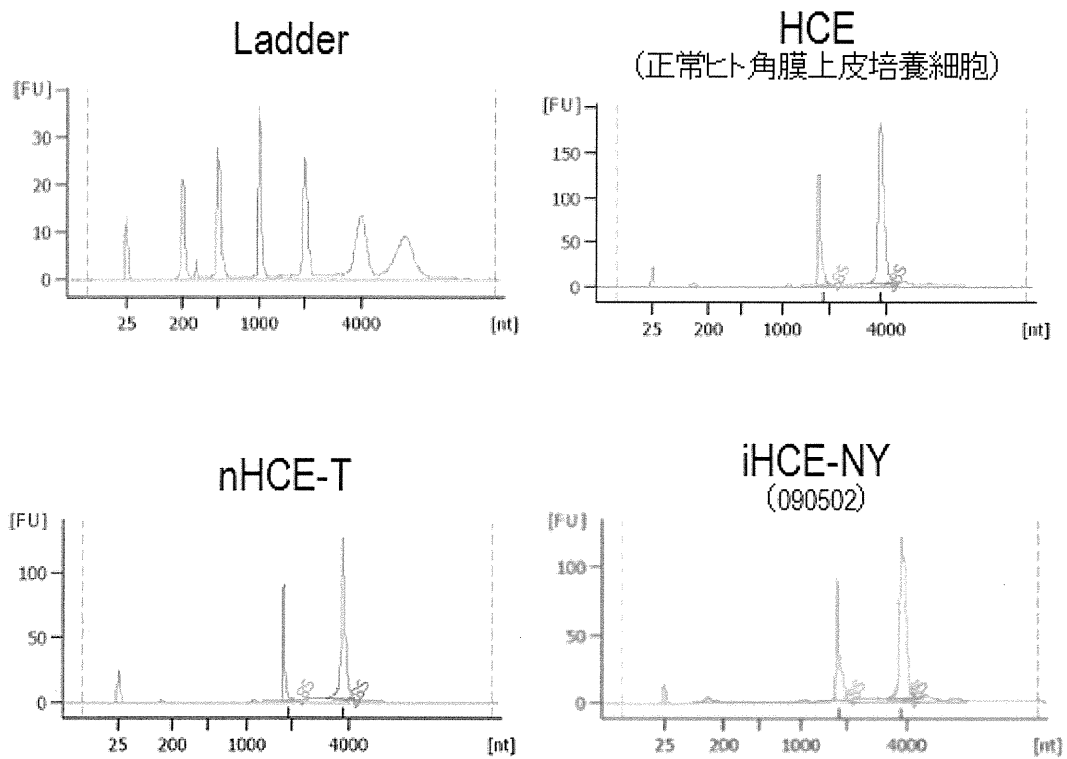


図 2 A. 実際のマイクロアレイのスポット (HCE v.s. iHCE-NY)

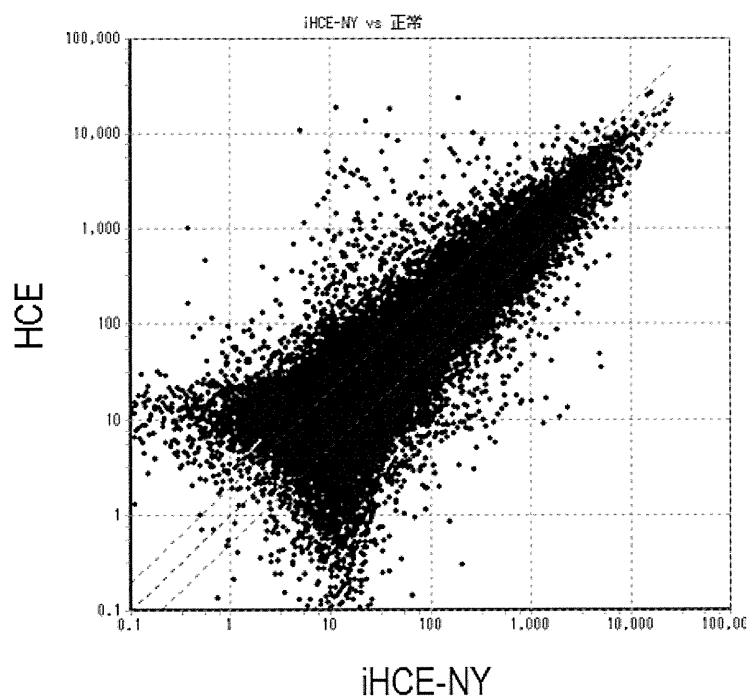
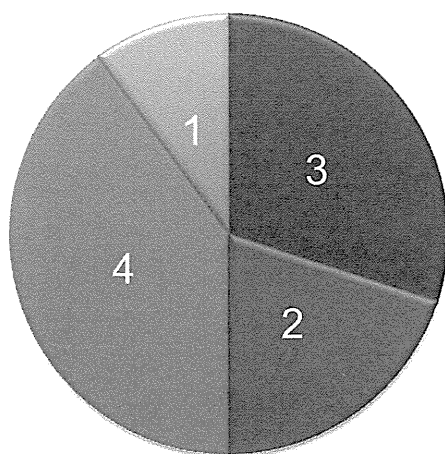


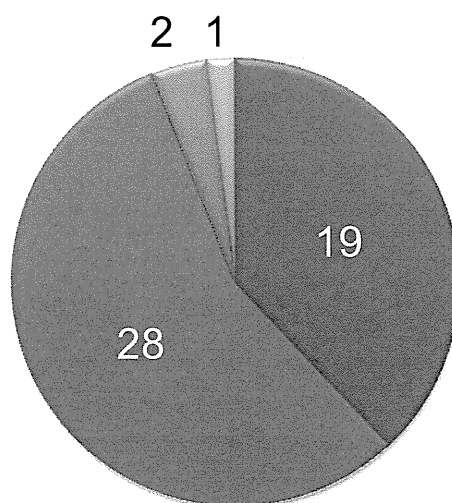
図 2 B. 遺伝子機能解析

4 up



- chromosome segregation
- protein targeting
- cell division
- mitosis

4 down



- cell adhesion
- extracellular region
- extracellular space
- cell-cell signaling

図 2 C. HCE に対する iHCE-NY と nHCE-T の遺伝子発現の比較

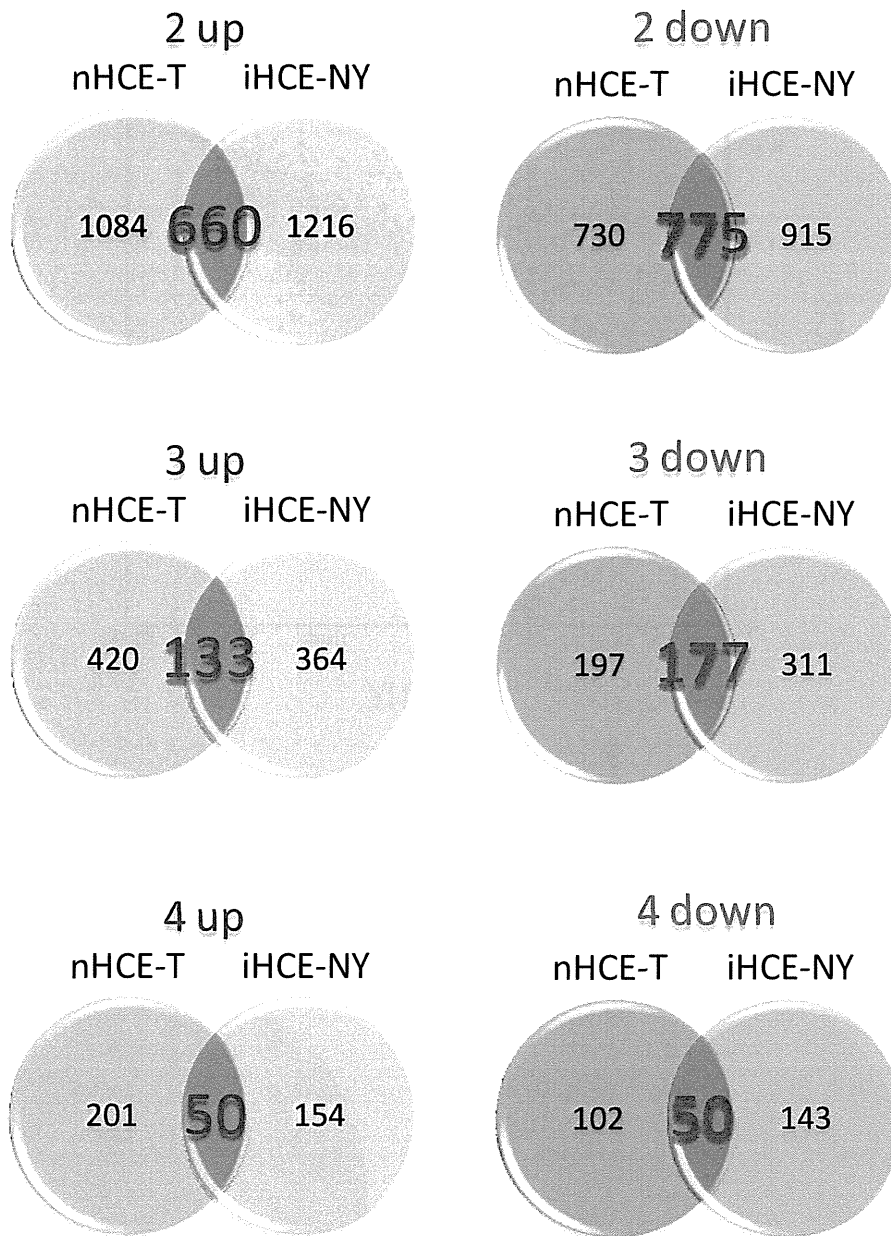


図 3 A. 前培養 1 日のプロトコルにおける細胞の経時的変化

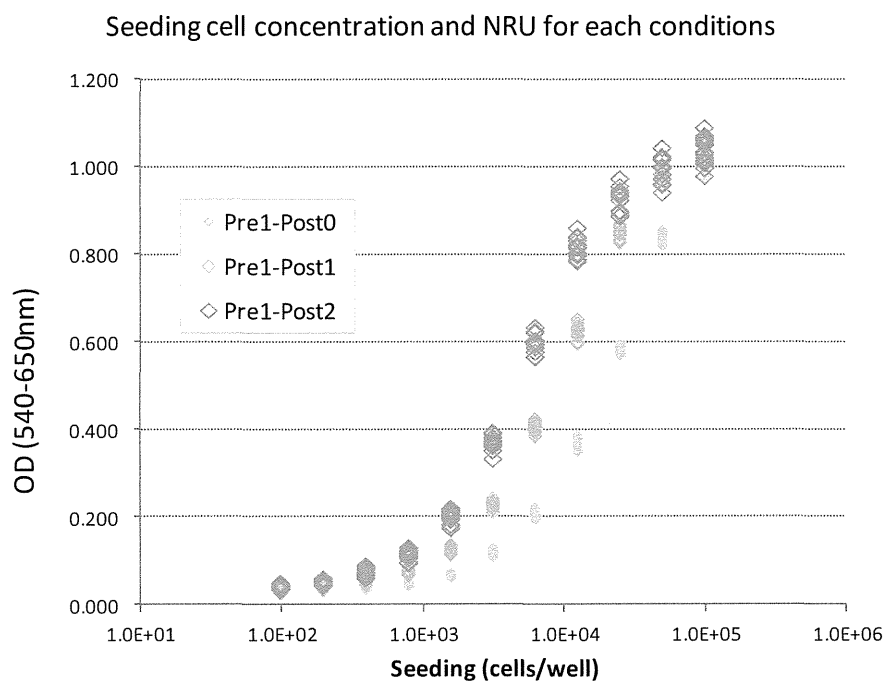


図 3 B. 前培養 2 日のプロトコルにおける細胞の経時的変化

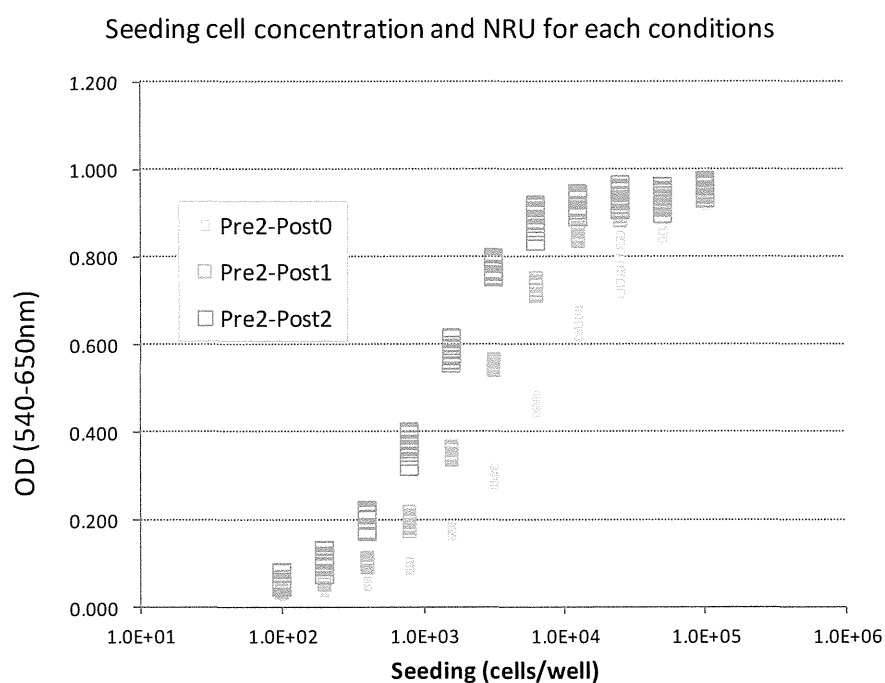


図 4 A. 播種細胞数の検討

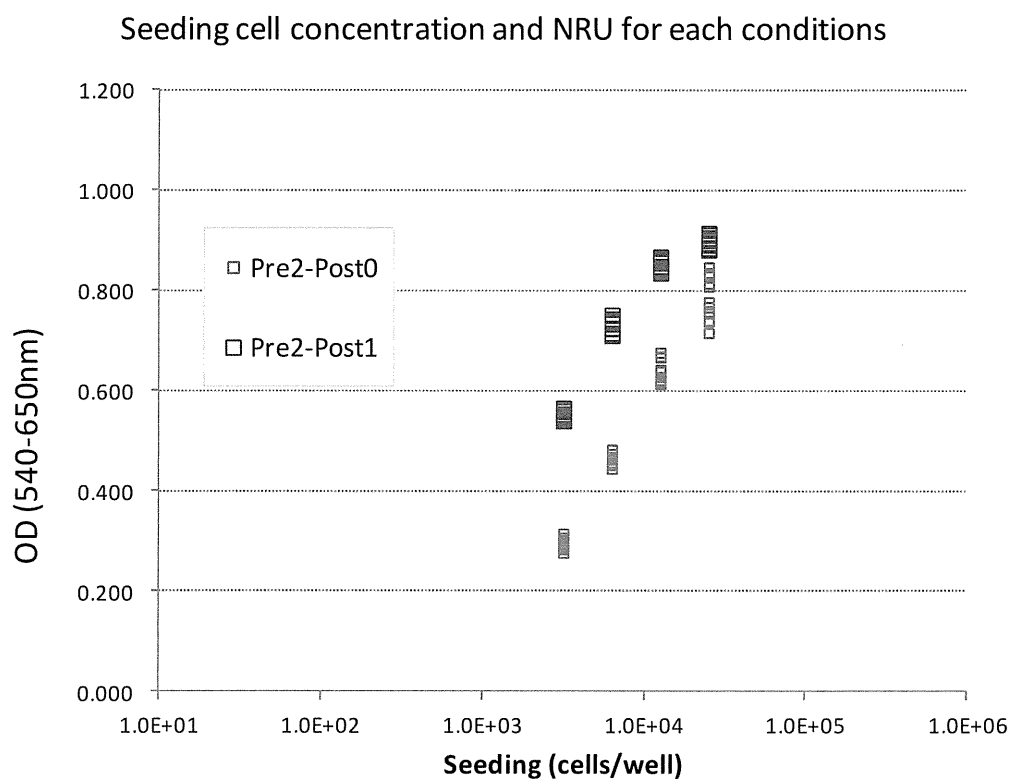


図 4 B. 曝露時間の検討結果

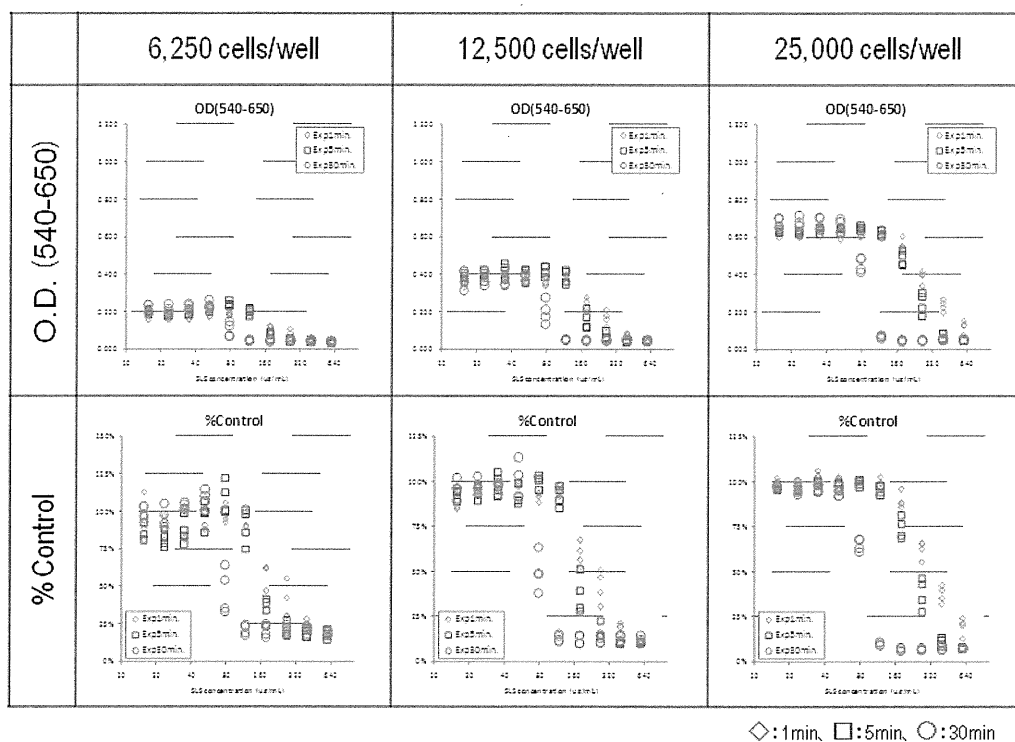
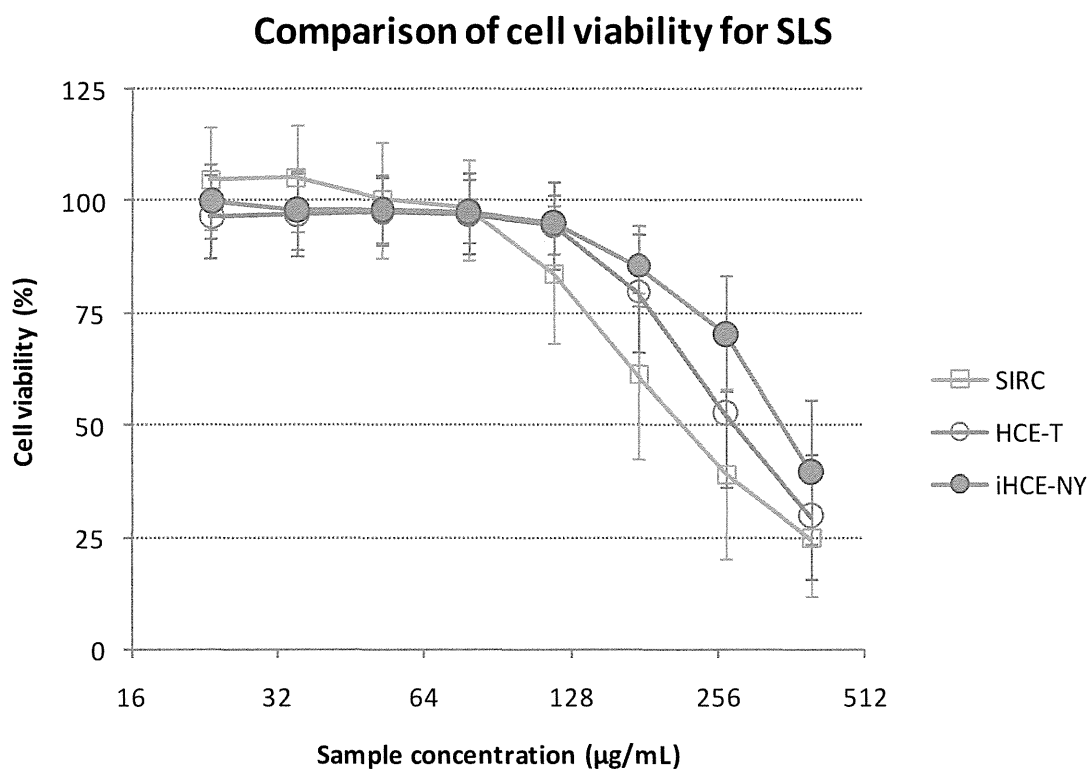


図4C. プロトコル①による曝露実験の結果

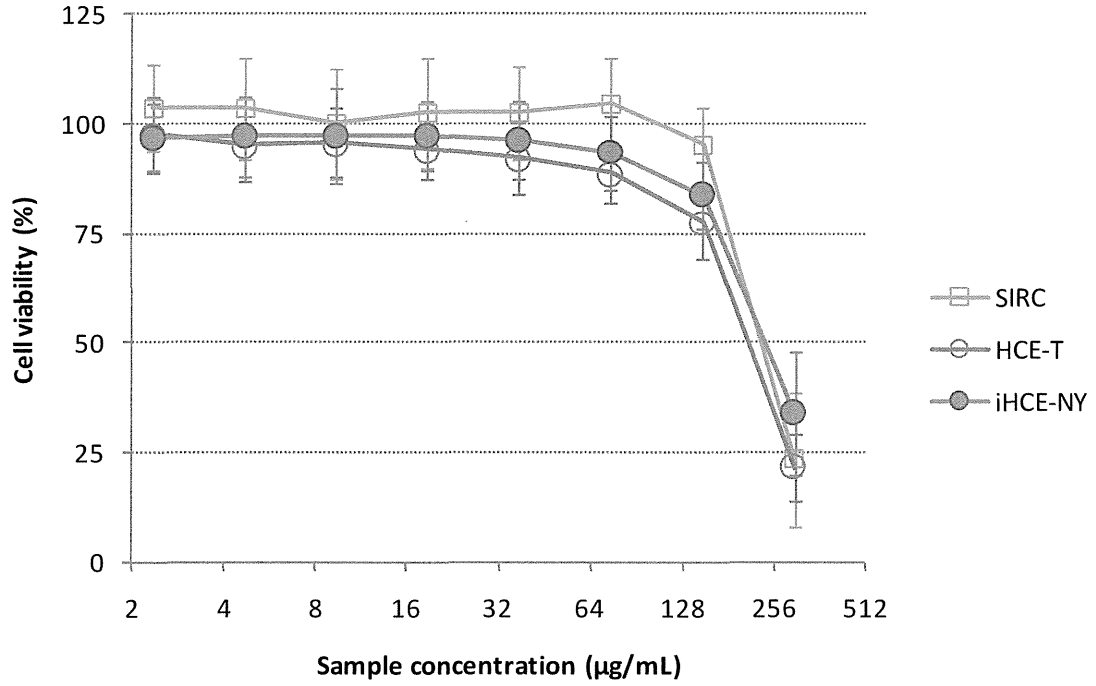
- SLS



	IC ₅₀
iHCE-NY cell	363 ± 72 ? /ml
HCE-T cell	293 ± 77 ? /ml
SIRC cell	239 ± 93 ? /ml

- Triton X-100

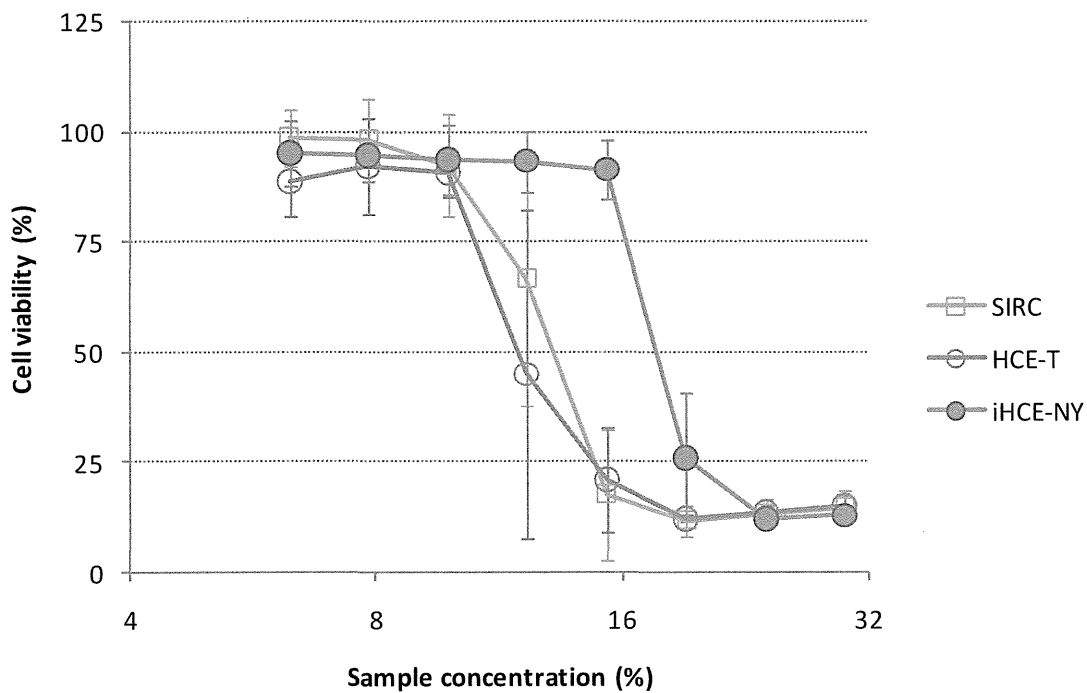
Comparison of cell viability for TritonX-100



	IC ₅₀
iHCE-NY cell	248 ± 34 ? /ml
HCE-T cell	211 ± 19 ? /ml
SIRC cell	242 ± 41 ? /ml

- EtOH

Comparison of cell viability for EtOH



	IC ₅₀
iHCE-NY cell	17.7 ± 0.7 %
HCE-T cell	12.3 ± 1.5 %
SIRC cell	13.1 ± 1.4 %

図 4 D. 播種細胞数の検討

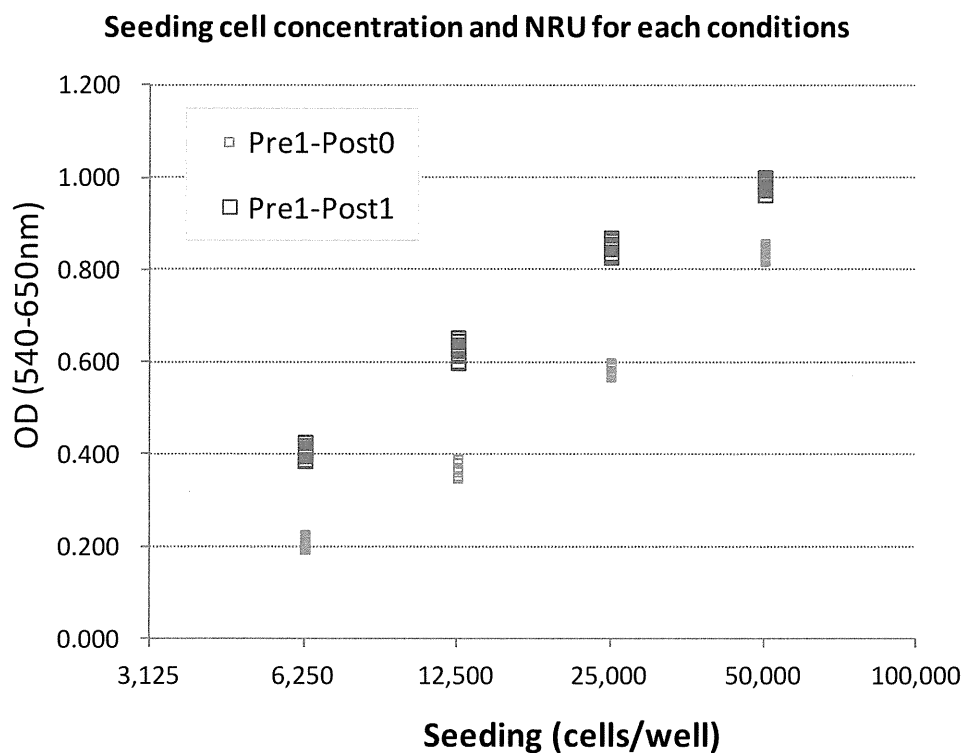


図 4 E. 曝露時間の検討結果

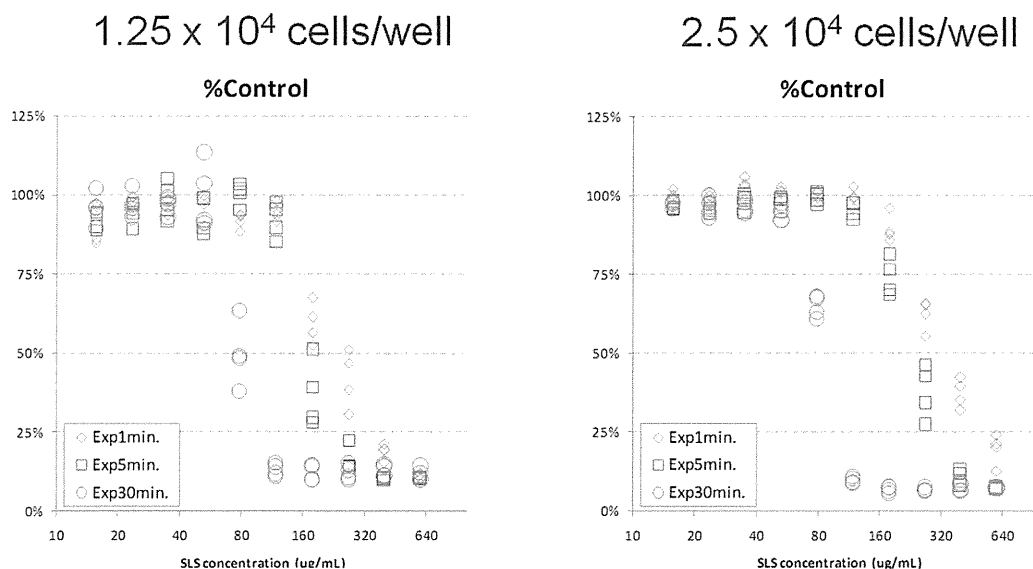


図 4 F. 三次元角膜再構築モデルの作製条件検討（一例）

条件	播種増殖	分化誘導	エアリフト	培地交換（1回/日）		培地交換（2回/日）	
1	3	1	1				
2	3	1	2				
3	3	1	3				
5	3	2	1				
6	3	2	2				

図 4 G. 三次元角膜再構築モデルの曝露条件の検討結果

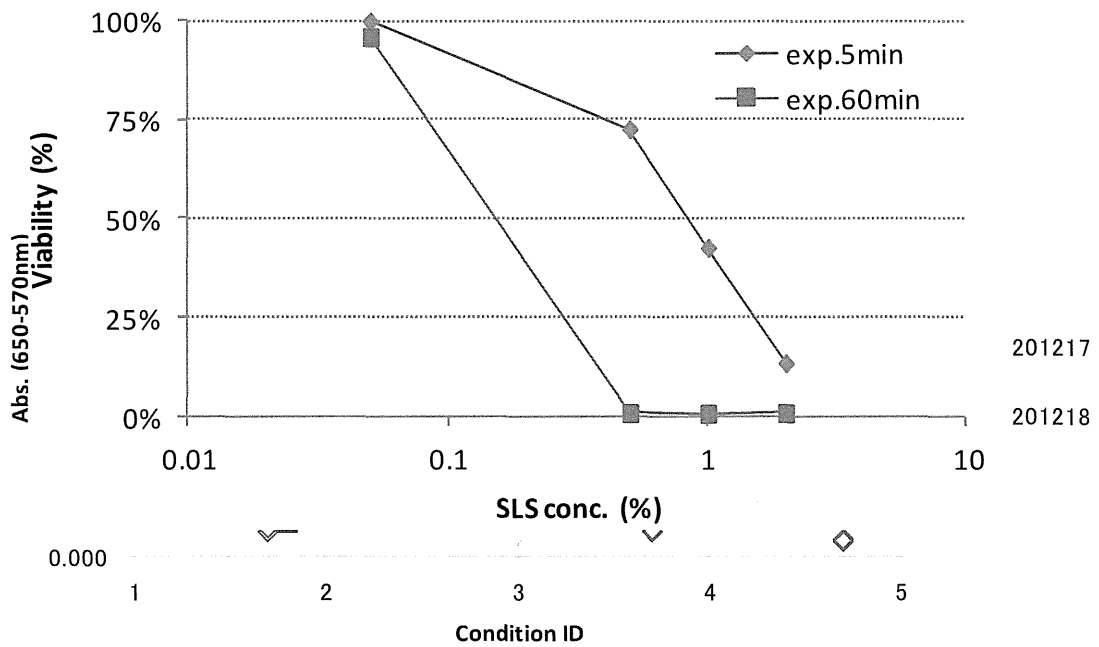
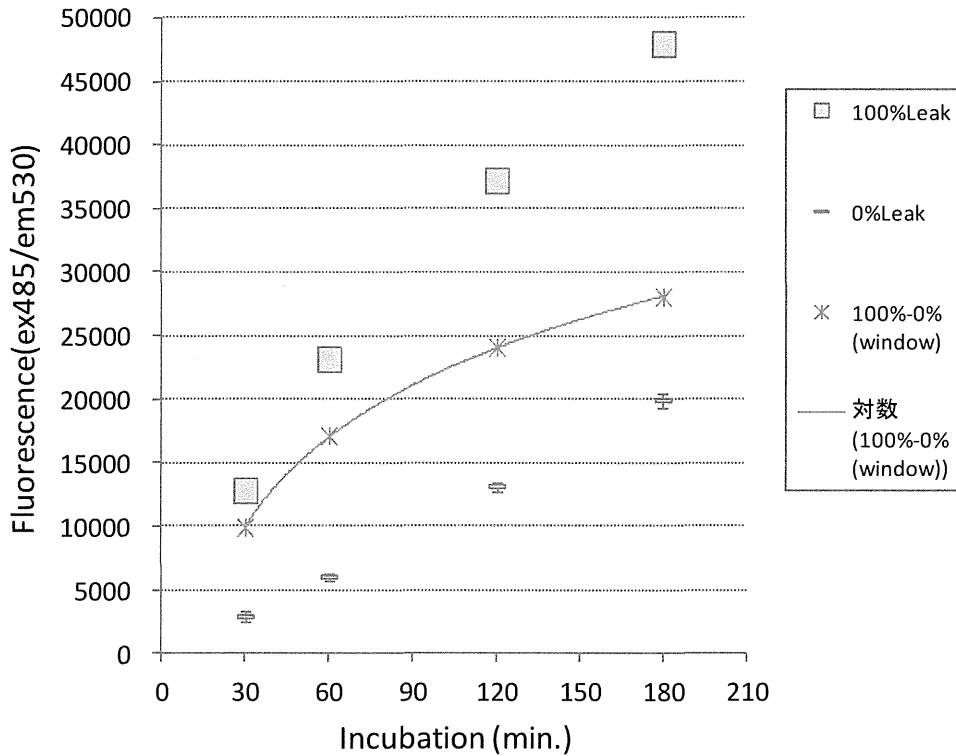
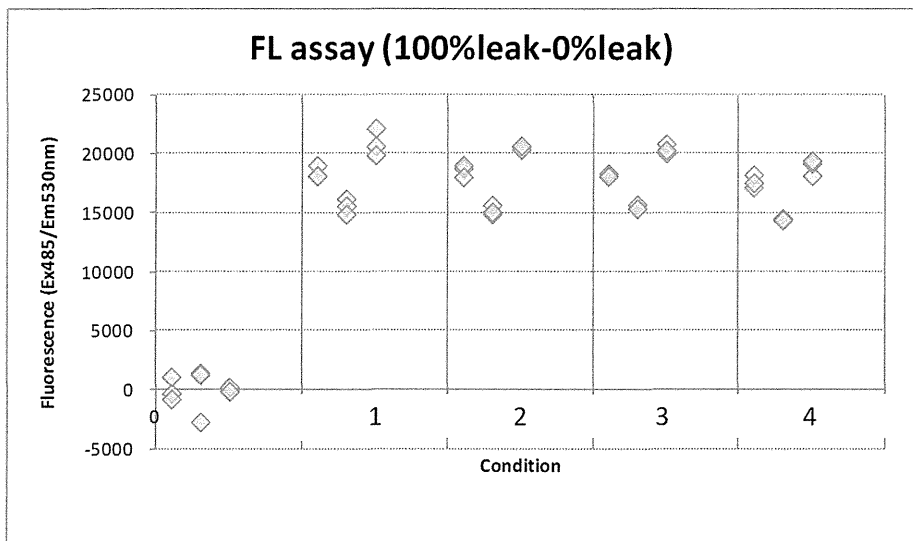


図 4 H. 三次元角膜再構築モデルの FL 法の条件検討

3D_iHCE-NY (D7 Model, lot201215)



Incubation (min.)	100% Leak	0%Leak			100%-0% (window)	s/n
		mean	stdev	cv%		
30	12790	2892	415	14	9898	4.4
60	23114	6014	329	5	17100	3.8
120	37179	13130	340	3	24049	2.8
180	47928	19920	533	3	28008	2.4



Condition ID: (1) Diff24, (2) Diff 1.5, (3) Diff24 (half conc.), (4) Diff48 (half conc.)

図 4 I. 三次元角膜再構築モデルの電気抵抗測定結果

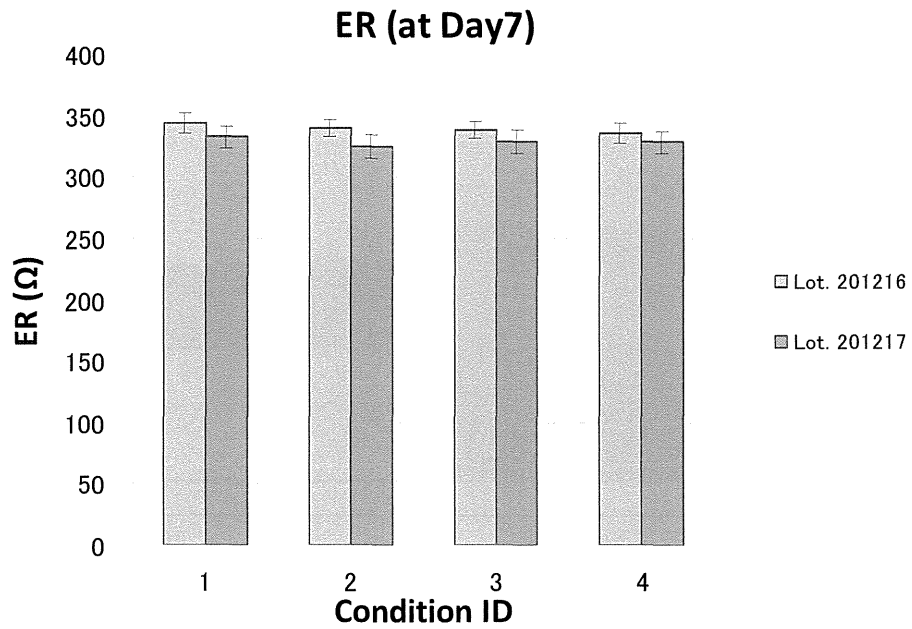


図 4 J. ヒト正常角膜上皮の組織構造と市販の三次元角膜再構築モデルの組織像

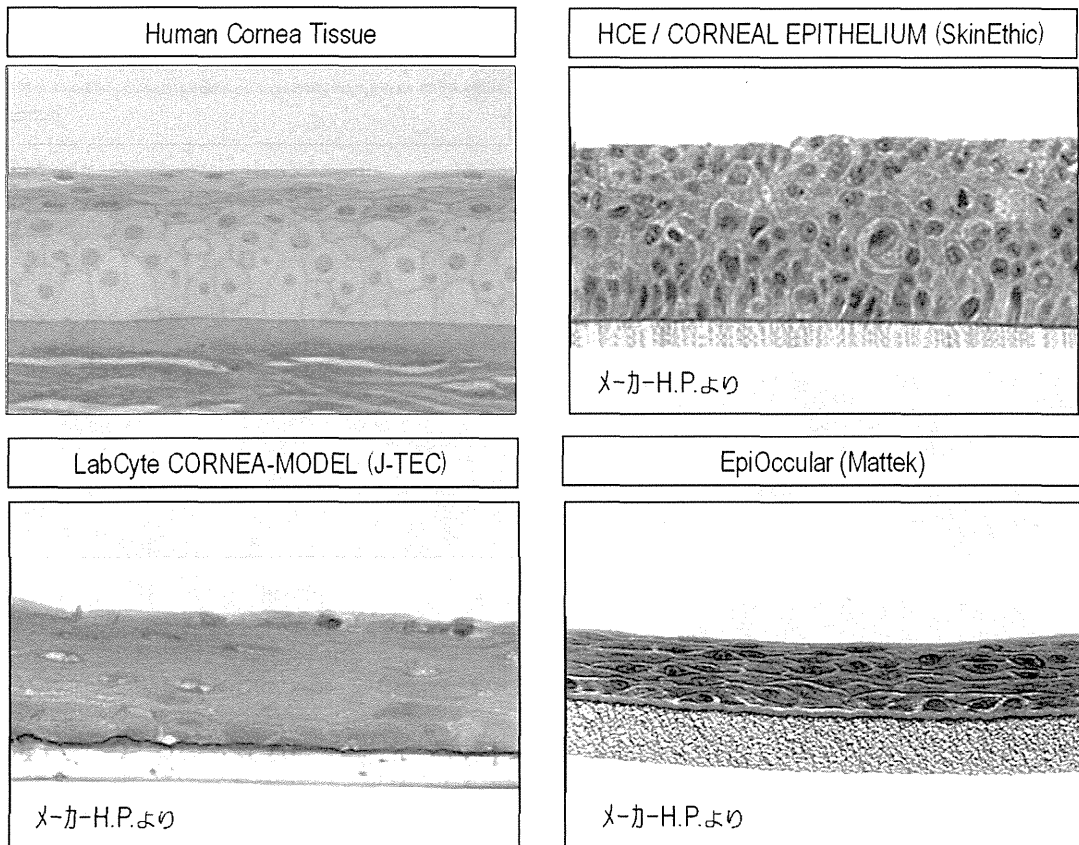


図 4 K. HCE-T、nHCE-T、iHCE-NY を用いた三次元角膜再構築モデルの組織像

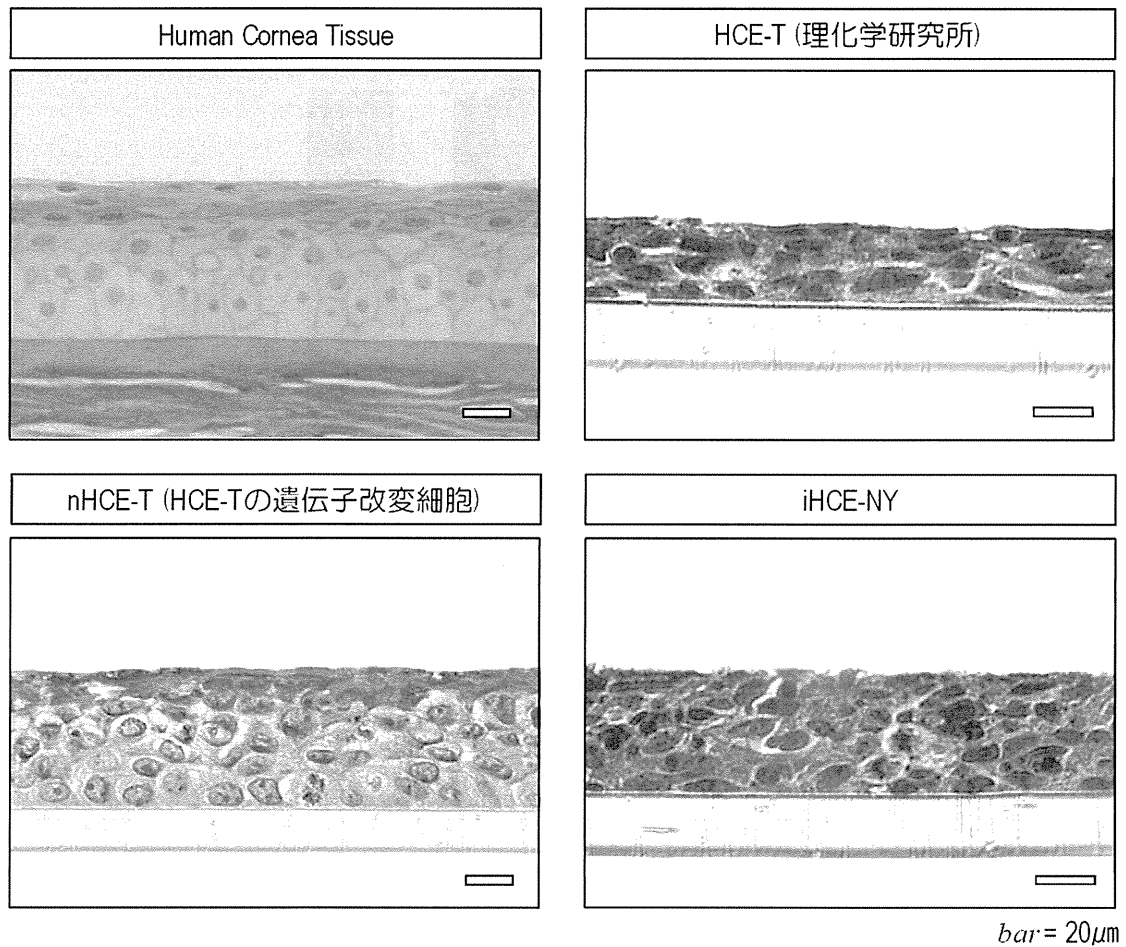


図 4 L. iHCE-NY の免疫染色結果

