

細胞外マトリックスを有する 全層角膜モデルの開発

信州大学繊維学部 根岸 淳

【研究背景と目的】体外に露出しているヒトの眼は外界からの影響を受けやすく、環境因子の眼への影響解析は重要である。眼の最外層の角膜は、積層化した角膜上皮細胞からなる上皮層、細胞外マトリックス（ECM）と線維芽細胞からなる実質層および単層の角膜内皮細胞からなる内皮層で構成されている。現在、積層化ヒト角膜上皮細胞モデルが開発され、環境因子の角膜上皮層への影響評価が可能になっている。しかし、角膜の実質層と内皮層を有するモデルはなく、動物実験以外での角膜全体への環境因子の影響評価は困難である。また、角膜上皮細胞のバリア機能や角膜内皮細胞の水分調節機能は細胞間相互作用と細胞-ECM 相互作用で制御されているため、角膜実質層を模した生体外評価系の開発が求められている。

本研究グループは、ブタの角膜から細胞を除去した脱細胞化ブタ角膜の ECM 組成や構造がヒト角膜に類似し、脱細胞化ブタ角膜上でのヒト角膜上皮細胞の積層化が可能なことを明らかにしている。また、金属加工分野で使用されている含浸法を応用し、一般的な播種では細胞が浸透しないポリ乳酸材料や脱細胞化組織への細胞導入法を確立している。本研究では、含浸法を用いた脱細胞化ブタ角膜へのヒト線維芽細胞導入、ヒト角膜上皮細胞とヒト角膜内皮細胞の播種を行い、全層角膜モデルの作製に取り組んだ。また、毒性試験を行い、全層角膜モデルの環境評価系としての有用性の解明を目指した。

【実験方法】研究用ブタ眼球から採取した角膜に高静水圧法による脱細胞化処理を行い、H&E 染色と DAPI 染色および含有 DNA 定量による細胞除去評価を行った。凍結乾燥した脱細胞化ブタ角膜にヒト線維芽細胞懸濁液を添加し、播種群とした。また、凍結乾燥した脱細胞化ブタ角膜をバイアル内に真空密栓し、シリンジを介してヒト線維芽細胞懸濁液を注入し、真空含浸群とした。ヒト線維芽細胞を導入した脱細胞化ブタ角膜の上皮側にヒト角膜上皮細胞、内皮側にヒト角膜内皮細胞を播種した。内皮細胞は 1 回播種を行い、上皮細胞は積層化を目的に複数回の播種を行い、各細胞の生着と形態を LIVE/DEAD 染色と DAPI 染色で評価した。ヒト線維芽細胞、角膜上皮細胞と角膜内皮細胞で再細胞化した脱細胞化ブタ角膜の上皮側を上にしてセルカルチャーインサートに設置し、上皮側からエタノール溶液を添加した。培養 6 時間後と 48 時間後、経上皮電気抵抗（TEER）測定、角膜上皮細胞と角膜内皮細胞の生細胞評価を行った。

【結果と考察】脱細胞化処理後の角膜では、DAPI 染色における細胞核の消失と含有 DNA 量の低下が認められ、ブタ細胞の除去が確認された。また、角膜の配向したコラーゲン線維と内皮層のデスメ膜様構造の維持が認められた。ヒト線維芽細胞による再細胞化処理後、播種群の脱細胞化ブタ角膜内部にはヒト線維芽細胞を示す DAPI の青色蛍光は認められず、真空含浸処理群の脱細胞化ブタ角膜の実質部に青色蛍光が認められた。また、全層角膜モデルの上皮面では積層化したヒト角膜上皮細胞が観察され、内皮面では敷石状のヒト角膜内皮細胞による被覆が確認された。真空状態で脱細胞化ブタ角膜と細胞懸濁液を接触させる真空処理では、空気による溶液の浸潤阻害を回避したため、実質部にヒト線維芽細胞が到達したと考えられる。また、角膜上皮細胞と角膜内皮細胞の接着には角膜の ECM 組成や構造が関与することが知られており、脱細胞化ブタ角膜が ECM 組成や構造を維持していたため、ヒト角膜上皮細胞および内皮細胞が生着したと考えられる。

エタノール添加前の全層角膜モデルの TEER 値は $262\ \Omega/\text{cm}^2$ 、6 時間後は $180\ \Omega/\text{cm}^2$ 、48 時間後は $162\ \Omega/\text{cm}^2$ であり、時間経過による TEER 値の低下が認められた。また、上皮側はエタノール添加 6 時間後に生細胞を示す吸光度の低下が認められ、内皮側では添加 6 時間後の吸光度低下は認められず、添加 48 時間後の吸光度低下が認められた。TEER 値低下は角膜上皮細胞のバリア機能低下を表し、毒性物質の角膜上皮への影響をリアルタイムに測定可能なことが示唆された。また、エタノールによる全層角膜モデルの上皮層破壊、角膜実質層のエタノールの通過に時間を要したため、内皮面の細胞数減少が遅れたと推察される。以上から、本研究で開発した全層角膜モデルが生体外での角膜上皮および角膜内皮への毒性評価系として有用なことが示唆された。

【今後の課題】本研究では脱細胞化ブタ角膜を基材とし、ヒト角膜上皮細胞、線維芽細胞と内皮細胞を有する全層角膜モデルを構築した。セルカルチャーインサートと組み合わせることで毒性試験や物質透過試験への利用可能性が示されたが、培地組成によっては角膜モデルが徐々に膨潤することが明らかになった。今後は、角膜内皮細胞のポンプ機能の亢進、細胞機能を阻害せずに膨潤を抑制する多糖などの添加物質の探索が必要である。