

研究区分：若手研究

角膜内皮細胞の加齢に伴う変性をきたすシグナルの同定と、
ヒトにおける慢性内皮細胞減少についての新規理論の創出

氏名 澤谷 友香理【医学教育研究センター】

角膜内皮細胞は一生増殖せずに減少し続け、炎症や手術などによって減少に拍車がかかる。正常の1/4程度に減少した際には水疱性角膜症を発症し、角膜移植が必要となる。炎症急性期の細胞減少の機序については理解されているが、炎症が見られない状態での慢性的な細胞減少の機序は全く不明であり、加齢や前房内微小環境の変化による細胞変性や老化であろうと考えられ始めている。そこで、前房水中のいかなる因子が内皮細胞減少につながるかを同定し、予防治療を創出することを最終目的とし、家兎眼球角膜を用い、様々な液性因子による細胞変性の評価系の創出を第一目的とした。

方法：家兎をソムノペンチル(4ml/head)を用いて安楽死させ、家兎眼球を摘出した。Non-coatの48 well plateを用いて内皮面を上側にして培養した。培養液の選定としてNancy培地とオプチゾール(OptiSol-GS Corneal Storage Media (Bausch & Lomb)) (双方ともにヒトで使用している培養液や内皮保存液)を検討した。また、炎症に関わるサイトカインとしてIL-6, IL-8, TGF- β , TNF- α を添加した。また、臨床での内皮細胞培養に使用しているROCK阻害剤(Y)の添加、低酸素刺激による変化も評価した。検出方法としては4% PFAで固定後、ZO-1、Phalloidin、Na⁺/K⁺ ATPase、ATPase、DAPI染色を行うとともに、SA β -GAL染色も施行した。

結果：1) 器官培養による評価時期の検討を行った。24時間培養で角膜が膨張、内皮細胞形態も

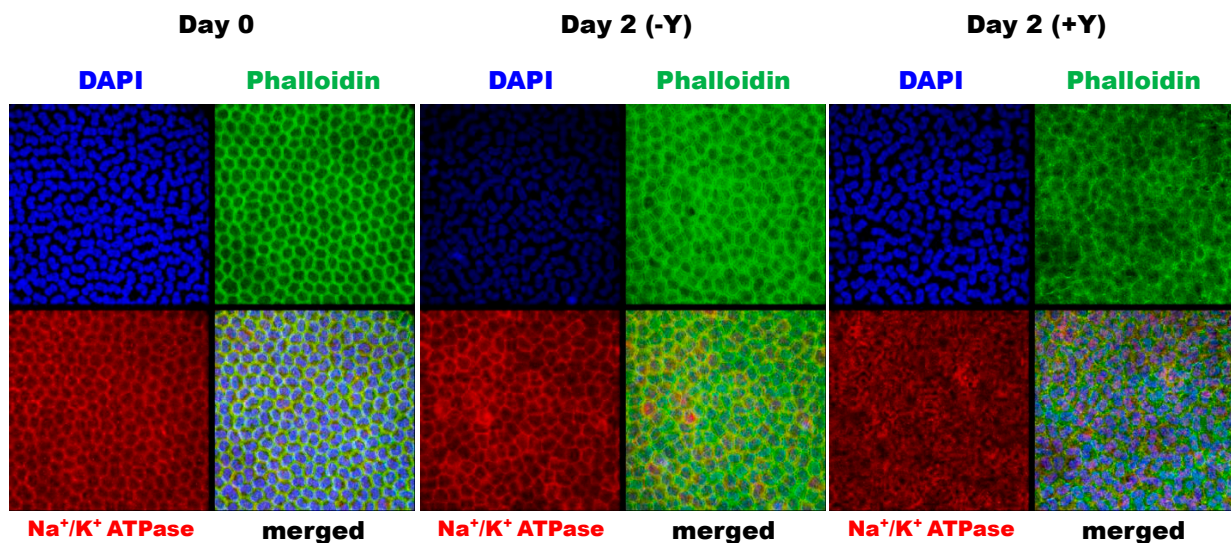
軽度悪化がみられた。D1, D2, D5, D7の評価を行ったところ、内皮細胞剥離や角膜浮腫などの影響を加味して、48時間培養による評価が妥当と考えられた。

2) ROCK阻害剤(Y)の添加による影響を評価したところ、Yの添加で顕著に内皮細胞形態悪化がみられた。Yのアクチン脱重合作用に起因していることが考えられ、臨床で信じられてきたYの添加は実は内皮細胞変性を進行させている可能性が示唆された。(図1)

3) 培地の比較(Nancy培地と角膜内皮に特化した角膜保存液オプチゾールとを比較)を行ったところ、臨床で培養に用いられているNancy培地においても、内皮保存に用いるオプチゾールにおいても内皮細胞ダメージがさほどかわらない事が判明した。(図2)

4) 慢性炎症による内皮細胞減少に関連したサイトカインとして、TGF- β 2, TNF- α , IL-6, IL-8が想定されているため、これらを培養液に添加(100ng/ml)して内皮細胞変性変化を比較検討した。結果、それぞれのサイトカインを高濃度に添加しても有意な形態変化を導くことは出来なかった。(図3)

5) 臨床では、内皮細胞が減少する原因に角膜の低酸素が大きく関与している。低酸素刺激(アネロパックを用いて酸素濃度0%を8時間)、ならびにH2O2刺激による内皮細胞変性変化を検討したところ、無酸素刺激を数度行っても、H2O2刺激を行っても形態変化を導くことは出来なかった。

図1) Na⁺/K⁺ ATPase Staining #1

24時間培養で内皮細胞形態悪化が見られた。

Yの添加で顕著に内皮細胞形態の悪化がみられた。

6) TNF- α 、IL-6、IL-8 はセカンドシグナルの可能性も考えられ、事前の 1st シグナルが必要と仮定できる。1st シグナルとして、低酸素培養刺激、H2O2 刺激、創傷治癒、レーザー刺激を検討した。低酸素培養刺激についてはアネロパックケンキを使用し、酸素濃度は 0%、1% を検討した。また、数回の低酸素刺激を検討した。H2O2 刺激は 100 μ M 4h を基準として数種類検討した。結果、低酸素 2 回+IL-6、IL-8、TGF- β 刺激によって内皮障害を誘導することが出来た。逆に、低酸素 2 回のみや、IL-6、IL-8、TGF- β 刺激のみなどでは角膜内皮細胞変性を誘導出来なかった。(図 4)

結論：サイトカイン刺激や低酸素刺激による細胞形態変化の評価法を作成することができた。本方法を応用することにより、種々の薬剤や炎症状態が内皮細胞に及ぼす影響を評価可能となった。今後、どのサイトカイン刺激がいかなる臨床の状態を示しているのかについて臨床サンプルを用いたサイトカイン濃度などの評価を行うことが必要と考えられた。

【論文及び学会発表】

論文作成中。また、本結果は他の論文の基本データとして引用されていく予定である。

図 2) Nancy 培地と Optisol 培地による培養では有意な細胞変化を誘導できなかった。

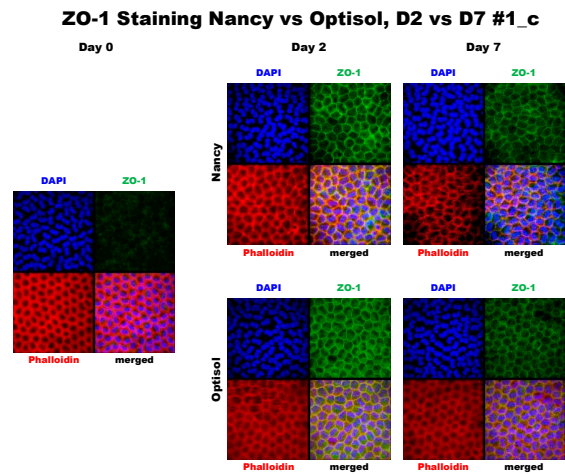


図 3) IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β 単独刺激では有意な細胞変化を誘導できなかった。

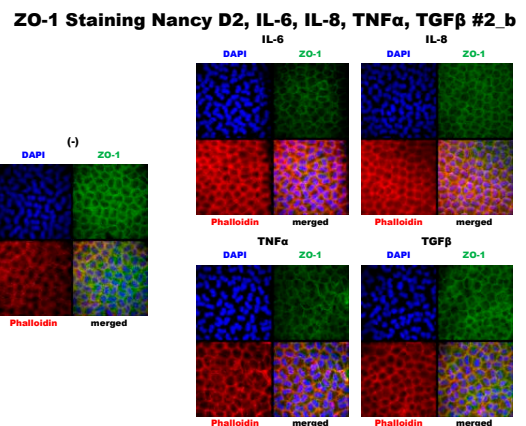


図 4) 低酸素 2 回+IL-6, IL-8, TGF- β 刺激によって in vivo で内皮障害を再現できた。

