

Title	Injured corneal epithelial cells promote myodifferentiation of corneal fibroblasts.
Sub Title	角膜実質細胞の筋線維芽細胞への変化に及ぼす角膜上皮細胞の影響
Author	中村, 邦彦(Nakamura, Kunihiko)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.1 (2003. 3) ,p.10-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030304-0010">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030304-0010</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Injured corneal epithelial cells promote myodifferentiation of corneal fibroblasts.

(角膜実質細胞の筋線維芽細胞への変化に及ぼす角膜上皮細胞の影響)

中村 邦彦

## 内容の要旨

【目的】 傷害された角膜上皮細胞からの液性因子が、角膜実質細胞の収縮力の増加、増殖、そして筋線維芽細胞への変化に影響するかを検討した。

【方法】 白色家兎の角膜実質細胞と角膜上皮細胞を、液性因子のみ交通可能な共培養系にて培養した。実質細胞はインサートディッシュ内に滴下したコラーゲンゲル上に培養して、これとコンパニオンプレート上に上皮細胞を培養したもの、上皮細胞を培養した後に部分的に剥離して傷害を加えたもの、上皮細胞のないものを組み合わせて、無血清の培地にて共培養した。実質細胞によるコラーゲンゲルの収縮は、ゲルの厚さの変化を計時的に測定し初日と比較した。6日間培養後、実質細胞数を測定した。筋線維芽細胞数はマーカーである $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) を指標として免疫染色にて決定した。共培養後、3日目と6日目に採取した培養液中のTGF- $\beta$ 1とTGF- $\beta$ 2の濃度をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて測定した。角膜上皮の生物学的挙動変化を決定する指標として、mesenchymal cellsのマーカーであるVimentinの発現を免疫組織化学的に検出した。同様の過程をanti-panspecific-TGF- $\beta$  antibodyの存在下でも行った。

【結果】 剥離された領域は、1日で周囲より移動した上皮細胞で覆われ、同領域の上皮細胞はしだいに形態を変えて行き、4日目には渦を描くようになりVimentin陽性の細胞を多くみとめた。剥離を行わなかったプレートでは、正常な形態を保っており、Vimentin陽性の細胞はわずかであった。傷害された上皮細胞との共培養のゲルは、傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に収縮した。 $\alpha$ -SMAの陽性率は障害された上皮細胞との共培養のゲルが、傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に高かった。実質細胞数は傷害された上皮細胞との共培養のゲルで、障害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に多かった。培養液中のTGF- $\beta$ 2の濃度は共培養3日目と6日目のどちらでも、実質細胞と傷害された上皮細胞との共培養で、実質細胞と傷害されない上皮細胞との共培養と実質細胞単独培養より有意に高かった。TGF- $\beta$ 1については検出限界以下であった。Anti-panspecific-TGF- $\beta$  antibodyの存在下では、これらの差はみとめられなかった。

【結論】 障害された上皮細胞から分泌される液性因子が実質細胞の筋線維芽細胞への変化を促進し、これにTGF- $\beta$ が強く関与していることが示唆された。

## 論文審査の要旨

近年、エキシマレーザーによるphotorefractive keratectomy (PRK) と呼ばれる屈折矯正手術が行われてきたが、術後に角膜実質の創傷治療反応として角膜混濁がみられる。これは角膜実質細胞が筋線維芽細胞を経て筋線維芽細胞に変化し、この細胞が創の収縮や癒復形成にかかわっているためといわれている。一方現在広く行われているlaser in-situ keratomileusis (LASIK) は角膜上皮を温存する事によって、PRKによって生じる副作用を軽減する事ができる。この事実は角膜上皮が角膜実質の創傷治療に関与していることを示唆している。そこで本研究では、白色家兎の角膜実質細胞をコラーゲンゲル上で上皮細胞と液性因子のみ交通可能な共培養系にて培養して、傷害された角膜上皮細胞からの液性因子が、角膜実質細胞の収縮力の増加、増殖、そして筋線維芽細胞への変化に影響するかを検討した。その結果、傷害された上皮細胞はしだいに形態を変えてVimentin陽性の細胞を多くみとめ、傷害された上皮細胞との共培養のゲルは傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に収縮した。また $\alpha$ -SMA陽性率は傷害された上皮細胞との共培養のゲルの方が、傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に高く、実質細胞数は傷害された上皮細胞との共培養のゲルの方が、傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に多かった。さらに培養液中のTGF- $\beta$ 2の濃度は実質細胞と傷害された上皮細胞との共培養で実質細胞と傷害されない上皮細胞との共培養と実質細胞単独培養より有意に高かった。Anti-panspecific-TGF- $\beta$  antibodyの存在下ではこれらの差は認められなかった。

審査に当たり、皮膚組織での研究と比べ、in vitroの結果がin vivoの結果によく合致しているが角膜では皮膚との違いはどうか、また傷害されない上皮細胞との共培養にても角膜実質細胞の筋線維芽細胞への変化がみられるのはどうしてかなどいくつかの質問がなされた。これらの質問に対し、角膜では皮膚と比べ無血管組織であり血液を介した影響が少ないためin vitroの結果がin vivoの結果によく合致すると思われるとの回答があった。また傷害されない上皮細胞との共培養での角膜実質細胞の筋線維芽細胞への変化についてはin vitroでは完全に健全な角膜上皮を再現する事が出来ていない為であり、in vivoでは生じていないと思われると回答された。また液性因子としてTGF- $\beta$ のみ検討されているが、それ以外のものとの影響はないのかとの議論がなされた。これに対し、TGF- $\beta$ 以外にも多くの液性因子が関わっていると思われるが、文献上これらの多くは最終的にはTGF- $\beta$ を介していると言われていると回答があった。また、コラーゲンゲルの高さの現象を収縮の指標としているが、matrix metalloproteinaseの誘導によりゲルが融解した可能性についてはどうかとの議論がなされた。これに対しては、通常TGF- $\beta$ は細胞外基質の生成に働くのであまり考えられないが、今回の実験では判定出来ないとの回答がされた。またゲルの最大高のみを測定しているが複数点による測定と、ゲルの高さの相対的な比較ではなく絶対値での比較をした方がよい、測定したTGF- $\beta$ と同等のTGF- $\beta$ を直接、実質細胞に作用させた実験を加えた方がよいとの意見があった。

本研究は今後検討が必要な点もあるが、PRK術後の角膜混濁の原因を明らかにした点、眼科学上意義のある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 小口 芳久  
病理学 岡田 保典 皮膚科学 西川 武二  
形成外科学 中島 龍夫 解剖学 相磯 貞和  
学力確認担当者：北島 政樹、岡田 保典  
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成14年11月27日