

8) 脂肪幹細胞を用いた新しい網膜移植治療

研究代表者 高宮 央

【研究目的】

哺乳類における成熟網膜細胞は自己再生能を殆んど有さないため、網膜の損傷は永久的な視機能障害を生じ、高度な場合には失明に至る。このような網膜傷害に対して、現在最も注目されている治療法の一つに網膜移植治療がある。しかし、これまでに網膜移植に関する多くの研究が行われて来たにも拘らず、未だ有用には至っていない。その最大の原因の1つに、有用なドナー細胞が存在しないことが挙げられる。今回我々は、網膜移植の新しいドナー細胞を探求するにあたり、幹細胞を高率に含んでいる脂肪細胞に着目し、網膜移植法におけるドナー細胞の可能性およびその有用性を検討した。

【研究方法】

1 動物

宿主動物に C57BL/6 マウス (生後 2-4 ヶ月) を、ドナー細胞として成熟 GFP マウス (green fluorescein protein: バックグラウンドは C57BL/6 マウス (Okabe, 1997)、生後 2-4 ヶ月) から抽出した脂肪細胞を用いた。

2 網膜移植前グリアトキシン治療

ドナー細胞の生着率向上のため、グリア細胞特異的傷害物質であるグリアトキシン (Sigma, St. Louis, MO) を網膜移植前に投与し、網膜移植の障害となる宿主網膜のバリアー形成の抑制を図った。これは我々が、ハーバード大学の Chen 博士のラボに留学した際に開発した方法である。グリアトキシンの作用効果は、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いた免疫組織化学 (IHC) 法により確認した。

3 脂肪細胞の抽出

GFP マウスにペントバルビタールを過剰投与し安楽死をさせた後、鼠径部から脂肪組織を摘出しコラゲナーゼ酵素で分離してドナー細胞を得た。

4 網膜への移植

グリアトキシン治療 2 日目に、GFP 陽性脂肪細胞を 2 つの経路から移植した。

- 1) 経尾静脈移植 (尾静脈からの注入) (細胞数 $3 \times 10^6 \sim 10^7 / \text{ml}$ 150 μl を静脈注入)
- 2) 網膜下移植 (網膜下への注入) (細胞数 $1 \times 10^6 \sim$

$10^7/ml$ $2\mu l$ を網膜下注入)

5 網膜移植の評価

移植後の網膜切片および網膜伸展標本を作製し、ドナー細胞である GFP 陽性脂肪細胞の形態学的変化を検討した。

【結果】

網膜移植の評価

網膜移植後のドナー細胞である GFP 陽性脂肪細胞の形態学変化を、網膜切片及び網膜伸展標本を作製して検討を行った。

1) 経尾静脈移植

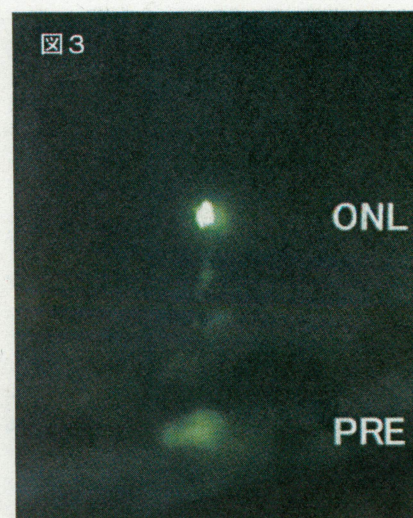
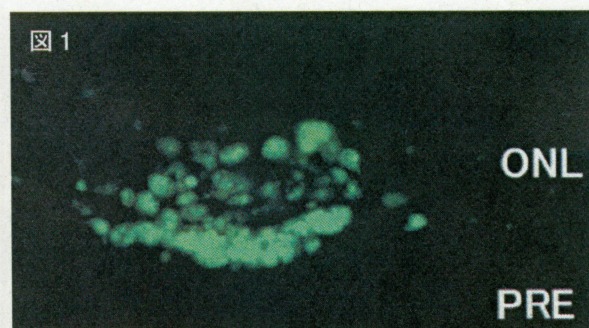
移植後2週および3週目の網膜切片において、網膜内に少数の GFP 陽性細胞を認めた。この結果より、尾静脈から注入された GFP 陽性脂肪細胞は血液網膜柵を通過して網膜内へと侵入が可能であったことを意味する。しかし、網膜内に進入した GFP 陽性細胞の形態は大きな細胞体を有しており、神経突起様の伸展は見られなかった。以上から、GFP 陽性細胞は脂肪細胞が網膜内にそのままの状態であり、形態変化を生じていない可能性が示唆された。本移植経路においては、神経細胞様に形態変化を示した GFP 陽性脂肪細胞は認められなかった。

2) 網膜下移植

1)と同様に網膜標本を作製し、網膜移植後の GFP 陽性脂肪細胞の形態学的変化を観察した。その結果、網膜内に多数の GFP 陽性細胞が認められた。このことは、網膜下に移植した GFP 陽性脂肪細胞が(グリア細胞が作り出す)生体内バリアーを越えて網膜内に進入したことを意味する。また、網膜内に見られた GFP 陽性細胞数は経尾静脈移植のものよりも有意に多かった。以上より、網膜下移植は静脈注入移植によるものより効率の良い移植経路であると考えられた。

また、大部分の GFP 陽性細胞の形態学的変化は経尾静脈移植と同様で、細胞体は大きく丸みをおびたもので突起の伸展は認めずに網膜内に留まっていた(図1)。しかし、移植の際、硝子体中に漏れ出た一部の GFP 陽性脂肪細胞は網膜表層の内境界膜(ILM)に生着しており、それらは神経細胞様の扁平な細胞体に形態を変え、同時に神経様の突起を伸ばしていた(図2)。また、網膜内に進入した GFP 陽性細胞のうち、少数

の細胞は視細胞層に生着しており視細胞様の形態を有していた(図3)。(ILM:内境界膜、INL:内顆粒層、ONL:視細胞層、RPE:網膜色素上皮層)



【今後の課題】

ドナー細胞として脂肪細胞を用いた網膜移植治療は、これまでに報告は無く、今回の研究が初めての試みとなる。本研究より、GFP 陽性脂肪細胞が網膜内に多数認められたことから、グリアトキシン治療が生体内バ

リアーを十分に排除したことで、ドナー細胞である脂肪細胞の網膜内侵入を可能にした事が証明された。また、一部の脂肪細胞はその形態を神経細胞様へと変化させ突起を伸展させた事は、脂肪細胞が網膜移植のドナー細胞になりえる可能性を示唆する驚くべき所見であり、今後の網膜移植治療につながる大変意義のある結果であると考えられる。しかし、現在のところ、ドナー細胞として使用した脂肪細胞の生着率および神経細胞への分化率は低い。今後、網膜移植治療を行う上で十分満足の出来る結果を得るために、以下の研究を継続して進めていく必要がある。

1) 最適なドナー細胞数の決定

経尾静脈からの GFP 陽性細胞移植の場合、網膜切片における観察から確認される GFP 陽性細胞数は少なく、ドナー細胞数の不足も一因と考えられた。今回の移植細胞数は過去の論文 (Brain Research 2007) を参考に決定したが、参照論文は脳への移植であり、網膜移植とは条件が異なることが考えられる。今後はドナー細胞数を調整し、網膜移植における最適な移植細胞数を決定することで、ドナー細胞の生着率の向上を図る。脂肪細胞は生体内に豊富に存在しており、ドナー細胞数の調整は比較的容易である。

2) 脂肪幹細胞の純度の向上

MACS[®] 細胞分離用カラムなどを用いたセルソーティングを行う事で、ドナー細胞に含まれる脂肪幹細胞の割合を高める事が可能である。ドナー細胞に未分化な多能性を有する細胞が多く含まれる事により、宿主網膜への生着率および種々の網膜細胞への分化率の向上を図る。

3) IHC 法による形態学的検討

今回の研究で、ドナー細胞である脂肪細胞の一部に神経細胞様の形態学的変化がみられた。しかし、今回の検討から、これらの細胞が実際に網膜神経細胞に分化したかどうかを判断することは出来ない。今後は特異的神経マーカーを用いた IHC 法により、詳細な形態学的検討を行う。