

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：34318

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16969

研究課題名(和文) ヒト角膜移植後のドナー抗原感作時期の判定とその機序解明

研究課題名(英文) The absence of allosensitization after cultured corneal endothelial cell infusion therapy, comparison with corneal transplantation

研究代表者

三好 淳一郎 (Miyoshi, Junichiro)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・客員研究員

研究者番号：60811057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新しい再生医療である培養ヒト角膜内皮細胞(cHCEC)の前房内注入療法は拒絶応答が見られず良好な成績をあげている。マウス角膜内皮細胞移植モデルではアロ抗原感作が生じないとの先行知見を踏まえ、患者へのcHCEC移植での免疫感作について検討した。cHCEC移植患者の移植前と移植2週後の末梢リンパ球(PBMC)を採取し、IFN- γ -ELISpotアッセイを用いてアロ応答の評価を行った。結果、アロcHCECに対する応答に有意差が見られずアロ免疫原性が低いことがわかった。また、cHCEC移植患者においてIFN- γ を産生する免疫感作は生じておらず、cHCEC移植ではアロ抗原感作が生じないと結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい再生医療である培養ヒト角膜内皮細胞(cHCEC)の前房内注入療法は拒絶応答が見られず良好な成績をあげている。マウス角膜内皮細胞移植モデルではアロ抗原感作が生じないだけでなく、免疫寛容が誘導される。今回、実際の人において、ドナーアロ抗原に対する免疫応答が増強していない結論を得た。すなわち、免疫抑制剤を用いずに拒絶反応が誘導されない移植が成立していると考えられた。本方法を他の移植へ応用出来れば、臓器移植分野における飛躍的な未来医療が実現する。

研究成果の概要(英文)：The injection of cultured human corneal endothelial cells (cHCECs) into the anterior chamber (AC) of the eye is now performed in clinical settings for patients with corneal dysfunction. We wished to evaluate the allo-sensitization after cHCECs transplantation into anterior chamber of the eye. By evaluating IFN-gamma producing cells number by ELISpot assay, allogeneic cHCECs possess low allo-antigenicity. Moreover, donor-specific IFN-gamma producing cells were not increase after allogeneic cHCECs transplantation.

研究分野：移植免疫

キーワード：移植免疫 角膜移植 培養角膜内皮細胞移植 再生医療

1. 研究開始当初の背景

角膜移植拒絶に関する機序解明や拒絶応答制御に関する基礎的研究が多数なされてきたにもかかわらず、残念なことにヒトへの応用はほぼ実現していない。偏った strain での検討であること、マウス角膜内皮細胞が増殖すること、免疫抑制剤を使用しないことなど、ヒトと異なる環境での検討結果であることが主な要因である。

今まで角膜移植においては、ヒトにおけるドナーに対するアロ感作やトレランス誘導がマウスと同様に生じているのかを検証するすべがなかった。アイバンク眼を使用するために、ドナーの細胞を使った経時的なアッセイが出来なかった事、また、マウスで行っているような遅延型過敏反応の検討を行えば移植患者様がアロ抗原に感作してしまい、拒絶応答の誘導につながるため倫理的に不可能であった。

近年、京都府立医科大学眼科において培養角膜内皮細胞移植が成功を収めている。同様に、移植に用いたドナーの残存組織から採取した角膜上皮細胞や角膜実質細胞も培養が可能となっており、継代培養や凍結保存も可能となっている。それに加え、末梢血リンパ球との免疫応答を IFN- ELISpot アッセイで評価できる方法を確立した。そこで今までなしえなかった、ヒトにおける、角膜移植における感作時期の判定、トレランス誘導の判定などが経時的に評価可能となった。また、ドナー組織のいかなる細胞がいかなる状態の時に免疫原性を発動するか、さらに、ドナーとレシピエントとの HLA の違いによる免疫原性の違いまで評価可能となった。臨床的に重要である免疫抑制剤使用については、必要十分量の免疫抑制剤投与の評価も可能であり、また、免疫調節細胞誘導が可能であるための免疫抑制剤投与スケジュールも作成可能である。これらすべて初めての検討である。

角膜移植拒絶として現在有力視されている機序とヒト応用に至っていない不十分な原因についてあえて概説する

(1) ドナー組織の免疫原性について：角膜上皮・実質・内皮細胞のうち、角膜上皮に最も免疫原性があるとされてきた。上皮の高い MHC 発現、IL-1 産生や host のランゲルハンス細胞の遊走との関連、IL-1ra 点眼によるアロ感作の遅延などが示されている上、自己の角膜上皮とアロ実質内皮を用いたキメラ移植ではほぼ拒絶応答が生じない事による推定である。ところが、ヒトで角膜上皮剥離した角膜移植では生着率は変わらず、角膜実質と内皮のみを移植する DSEAK でも拒絶がみられること、マウスで MHC 適合した同様のキメラ移植でも生着率が上昇しないことから、角膜実質内皮にも十分な免疫原性がある (MHC 適合では角膜実質内のドナー樹状細胞がマイナー抗原を効率よく抗原提示すると推測している)。そこで、実際にアイバンク眼と PBMC とを用いて、角膜上皮・実質・内皮についての免疫原性がいかなる条件で成立するののかの検討が必要である。

(2) 拒絶ターゲットとなるアロ抗原について：角膜移植では HLA 適合と拒絶率との関連が多数報告されているも解明にいたっておらず、さらに臨床における適合は非現実的である。マウスにおいて、MHC のみ異なる移植が著明に生着することからマイナー抗原が拒絶の主体であるのに間違いないが、C57BL/6 マウスへの移植では MHC のみ異なる角膜でも 50% が拒絶される (マイナーも異なる場合は 90% 拒絶)。すなわち、HLA 抗原も十分なターゲットとなる。ヒトにおいて、移植後に HLA に対する免疫応答が BALB/c マウスのように十分成立していないのか、C57BL/6 マウスのように成立しているのかの情報が必要である。

(3) 拒絶担当エフェクター細胞について：ノックアウトマウスを用いた結果より、補体・抗体・細胞障害性 T 細胞・CD8 T 細胞・Th17 T 細胞は拒絶応答の主体ではなかった。結果、CD4Th1-type 細胞による遅延型過敏反応が拒絶応答の主体であると結論づけられており、Th1 抑制手法で拒絶抑制も可能となっている。しかし、C57BL/6 マウスを用いた際には Th1 抑制で十分な拒絶抑制ができない。Th2 拒絶も報告されている。ヒトでの機序解明が必要である。

(4) アクセソリー細胞に対する治療について：マクロファージ (Mp) には可塑性があり、細胞内の酸化型/還元型グルタチオンによって M1, M2 が規定されている。T 細胞と Mp との相互作用によって Th1/Th2 応答が増強されることは周知の事実であり、Mp を死滅させる治療を行うとラットにおいても全層角膜移植は拒絶されない。M1, M2 の変換によって生着率をあげる報告をしてきたが、MHC 適合が必要であることや、C57BL/6 マウスでは十分な生着率を獲得できない。人における検証が必要である。

(5) 移植後の免疫応答誘導時期に関して：マウスモデルではドナー抗原に対する遅延型過敏反応は血管新生を誘導した high-risk 眼への移植では移植 1 週間後、normal 眼への移植では約 3 週間後に陽転化する。3 週間を要す機序は依然不明である。また、BALB/c ホストでは、全例で遅延型過敏反応が陽性になるにもかかわらず、半分は拒絶されない。全身での免疫応答が角膜を拒絶するのは by chance であると想定しているがこれも証明できていない。ヒトにおけるアロの免疫応答獲得を検討必要である。

(6) ステロイドを含む免疫抑制剤の使用に関して：マウスの検討においては一切の免

疫抑制剤を使用していない。ヒトにおいては、施設によっては術後点眼のみのこともあれば、ステロイドの点滴を初期に使用する施設もある。安全性の面から過剰な免疫抑制治療が行われていることが多い。また、免疫抑制剤の使用によってエフェクター細胞を抑制するばかりか、Regulatory 細胞をも抑制してしまっている可能性が残されている。必要十分な免疫抑制にむけて、さらに、トレランスを誘導可能な免疫抑制剤の使用を検討すべきである。

(7) 移植後のトレランスに関して：マウスでは BALB/c、C57BL/6、その他のマウス strain においてもアロ角膜が 8 週間生着した際には同じドナーからのアロ全層角膜移植を拒絶せず、Regulatory T 細胞が関与するトレランスが生じている。また、角膜内皮細胞移植を行った際にも同様のトレランスが生じ、全層角膜移植を拒絶しない。この現象はヒトで全く証明できていない。ELISpot アッセイでの陰転化によりトレランスが誘導されると推定出来る。これが証明されればすべての免疫抑制治療を中止でき、角膜移植医療に多大な利益が得られることは間違いない。

(8) ヒトにおける慢性的な内皮細胞減少に関して：マウスでは内皮細胞が増殖するため、ヒトで見られる長期的な内皮細胞減少に関する検討を行う事が出来ない。過去に用いたネコの検討においても内皮細胞増殖が見られ、他の研究機関ではサルにおいても増殖すると言われている。ヒトにおいて、拒絶応答の臨床像を一切呈さず、数年以上かけてただらと内皮細胞が減少していく現象に関しては、慢性拒絶であるのか、組織的な原因であるのか、全く不明である。ドナー抗原に対する免疫応答の有無と内皮減少との比較検討が、ヒトにおける慢性内皮細胞減少の機序解明の鍵となり、予防治療方針も開発できる。

2. 研究の目的

ヒト臨床におけるアロ免疫応答を明らかにし、基礎研究実績をヒトへ、早期応用を目指すことが目的である。ドナー細胞を培養保存可能となった昨今、ヒトの末梢血リンパ球 (PBMC) を用いたヒト IFN- ELISpot アッセイによって、ヒトでのアロ応答を経時的に *in vitro* で評価出来る系を立ち上げた。今回、ドナー組織の部位ごとにおける免疫原性の評価、移植後のドナー抗原感作やトレランス誘導に関する評価、術後の必要十分な免疫抑制剤使用の評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

Th1 に関連した拒絶の誘導には、IFN- に関連した免疫原性の誘導が必須である。そこで、ヒト IFN- ELISpot アッセイを用いて免疫原性の評価方法を立ち上げた。ヒト末梢血 PBMC を用い、ドナー細胞 (残存輪部組織からの培養細胞を含む) に対する IFN- 産生評価に成功した。

4. 研究成果

アロ PBMC に対する spot 数 (41.9 ± 15.5 , 以下、 $\text{mean} \pm \text{SE}$) は無刺激コントロール (3.8 ± 1.7) と比較して有意に増加していたが ($p < 0.001$)、アロ cHCEC に対する spot 数 (5.4 ± 3.0) には有意差が見られなかった ($n=5$, $p < 0.001$)。cHCEC 移植患者の PBMC において、移植に用いたものと同じドナー cHCEC に対する術前の spot 数 (5.1 ± 2.3) と術後 2 週後の spot 数 (3.0 ± 1.1) には有意差が見られず、無刺激とも有意差が見られなかった ($n=7$)。ただ、アロ PBMC に対する spot 数は術後 2 週の PBMC において有意に減少していた (17.7 ± 24.7 , $p < 0.05$)。

結論として、cHCEC はアロ免疫原性が低く、直接 IFN- 産生を誘導しない。cHCEC 移植 2 週後でもドナー抗原に対して IFN- を産生する免疫感作は生じておらず、cHCEC 移植ではアロ抗原感作が生じないと結論付けた。なお、液性免疫の増強効果の欠如は別報で確認済である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田潤, 三好淳一郎, 戸田宗豊, 上原朝子, 上野盛夫, 外園千恵, 木下茂, 羽室淳爾
2. 発表標題 ヒト培養角膜内皮細胞移植後のアロ感作応答の検定技術
3. 学会等名 角膜カンファランス2019 第43回日本角膜学会総会・第35回日本角膜移植学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----