

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09730

研究課題名（和文）角膜移植におけるエクソソームの役割と治療応用

研究課題名（英文）Role and clinical application of exosome in corneal transplantation

研究代表者

山上 聡（YAMAGAMI, Satoru）

日本大学・医学部・教授

研究者番号：10220245

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）：マウスを用いて、角膜移植における同種移植片の拒絶反応における細胞外小胞の役割を調べた。角膜移植モデルマウスにおいて、移植片由来の細胞外小胞が頸部リンパ節に排出される様子を、金コロイドをマーカーとして透過型電子顕微鏡で可視化した。移植片由来の細胞外小胞に感作されたリンパ節細胞は、混合リンパ球反応において培養角膜実質細胞に暴露されると高い増殖を示した。培養角膜実質細胞から抽出した細胞外小胞の投与は、移植片の生存率を有意に低下させた。これらの知見は、移植片由来の細胞外小胞が頸部リンパ節に捕捉され、角膜移植における同種移植片拒絶反応の促進に寄与するという半直接的な経路を初めて証明するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜移植に関連する主な抗原提示経路は2つある。直接認識は、ドナー角膜由来の樹状細胞が直接レシピエントの頸部リンパ節に流入し抗原を提示する経路で、間接経路による抗原提示は、移植片のペプチドを介して、ドナー角膜の抗原提示細胞（APC）を介してT細胞に抗原を提示するものである。本研究は、角膜移植片由来の細胞外小胞が宿主への抗原提示に役割を果たしていることを、in vivoとin vitroの両方で証明したものである。100年の歴史を持つ角膜移植の常識を塗り替えた論文である。

研究成果の概要（英文）：We aimed to investigate the role of extracellular vesicles in a mouse corneal transplantation model. We used transmission electron microscopy to visualize the drainage of extracellular vesicles derived from the graft into the cervical lymph nodes using gold colloids as markers. Lymph node cells sensitized to graft-derived extracellular vesicles exhibited high proliferation when exposed to cultured corneal stromal cells in a mixed lymphocyte reaction. Notably, extracellular vesicles carrying graft-derived IA antigens were detected in cervical lymph nodes within a maximum of 6 h postoperatively. Moreover, administration of extracellular vesicles extracted from cultured corneal stromal cells significantly reduced the graft survival rate. These findings provide the first evidence of a semi-direct pathway in which graft-derived extracellular vesicles are captured in cervical lymph nodes and contribute to the promotion of allograft rejection in corneal transplantation.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜移植 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

角膜移植に関連する主な抗原提示経路は2つある。直接認識は、ドナー角膜由来の樹状細胞が直接レシピエントの頸部リンパ節に流入し抗原を提示する経路で、間接経路による抗原提示は、移植片のペプチドを介して、ドナー角膜の抗原提示細胞 (APC) を介して T 細胞に抗原を提示するものである。この2つの経路のうち、角膜移植では間接経路がより重要な役割を果たしていると考えられてきた。他の臓器移植では、細胞外小胞 (EV) が宿主 APC に認識される半直接的な抗原提示経路が報告されている。

2. 研究の目的

30 ~ 1000nm の EV は、細胞間のタンパク質や RNA の交換を促進することが知られている。マウスの心臓移植に関する研究では、移植片由来のエクソソームが抗原提示に関与していることが示されている。宿主の DC が無血管の非リンパ性角膜に移動し、間接的な経路で抗原を認識する可能性はほとんどないことを考慮すると、我々は、移植片由来の EV が宿主の CLN に直接移動し、抗原認識を高める可能性があるとの仮説をたてた。本報告では、宿主 CLN における移植片由来の EV を同定し、角膜移植における EV の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス角膜移植モデルおよび培養マウス角膜実質細胞を用いた *in vitro* のモデルで角膜移植における細胞外小胞の機能を検討した。

4. 研究成果

(1) EV クオリティ

超遠心分離によって適切に精製された EV が得られるかどうかを調べるため、マウス CSC の培養液 (図 2) を超遠心分離し、ナノ粒子追跡分析を使って分析した。CSCs 由来の培養液から超遠心法によって抽出された EV の直径は 187.0 ± 6.1 nm、総濃度は $3.5 \pm 0.1 \times 10^9$ particles/mL であり、精製粒子は EV の定義を満たしていた。

(2) MLR を用いた EV によるアロ感作の評価

B6 CSC 由来の EV が免疫反応を促進するかどうかを調べるため、培養 B6 CSC、BALB/c マウス由来の CLN、培養 B6 CSC 由来の EV を用いた XTT 細胞増殖アッセイで MLR を行った。図 1 に示すように、CSC + CLN 群と CSC + CLN + EV 群の 450nm と 630nm の吸光度の差は、共培養開始時には有意差はなかった ($p = 0.98$)。24 時間後、吸光度の差は CSC + CLN 培養で 0.05 ± 0.16 、CSC + CLN + EV 培養で 0.40 ± 0.14 と測定され、EV 感作群は CSC + CLN 群と比較して有意な増加を示した ($p < 0.0001$; $\alpha = 0.05$; 図 1)。MLR による *in vitro* のデータから、B6 CSC 由来の EV が BALB/c CLN 由来の細胞のアロ抗原に対する免疫反応を促進することが明らかになった。

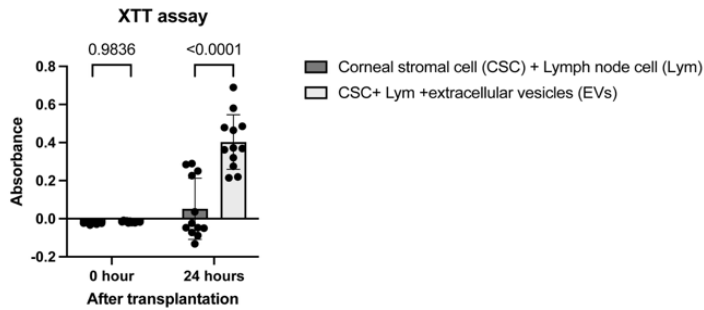


図 1 EV によるアロ感作の XTT アッセイによる評価

(3)金コロイドを用いたグラフト由来 IA^b -陽性粒子の透過型電子顕微鏡による検出

移植片由来の EV が宿主 CLN に移動したかどうかを調べるため、宿主マウス由来の CLN を角膜移植の 3 日後に採取し、評価した。透過型電子顕微鏡を用いて、抗マウス IA^b (移植片由来 MHC クラス II) 抗体で標識した 50nm の金コロイドを持つ CLN を検出した (図 2 A)。抗マウス IA^b 抗体で標識された金コロイドは、宿主 CLN の細胞外 EV 上には検出されたが、細胞上や細胞内には検出されなかった。対照的に、抗マウス IA^d (宿主由来 MHC クラス II) 抗体で標識した金コロイドは、主に CLN の表面に付着した (図 2 B)。これらの所見は、移植片由来の IA^b -陽性 EV が角膜移植の 3 日後に宿主 CLN に移動したことを示している。

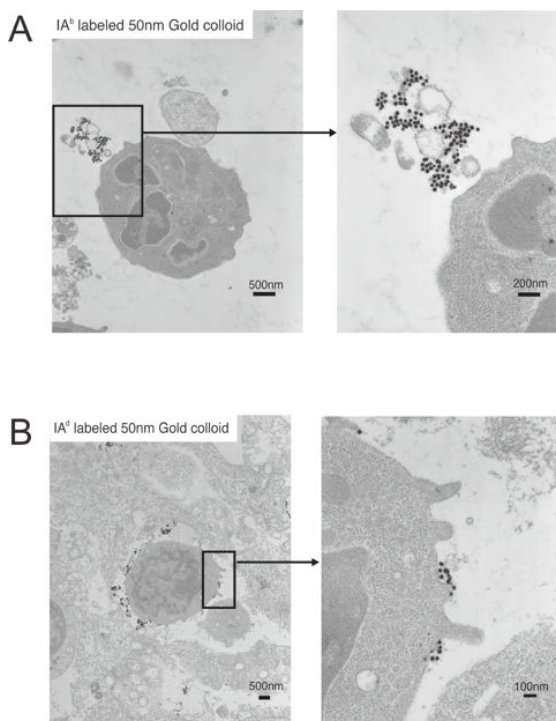


図 2 マウス頸部リンパ節での頸部透過電子顕微鏡による IA^b IA^d 抗原の検出

(4)FCM による移植片由来 EV の割合の評価

移植片由来 EV は 3 日目に透過型電子顕微鏡で検出されたので、角膜移植後の宿主 CLN における移植片由来 EV の存在を FCM で評価した。特異的エクソソーム抗原である CD63 は、角膜移植の有無にかかわらず、宿主由来 CLN の上清中に検出された。角膜移植の 6 時間後、宿主由来の CLN で CD63 と IA^b の二重陽性 EV が検出され、角膜移植の有無にかかわらず、宿主由来の IA^d 陽性 EV の数が多かった (図 3 A)。角膜移植後 6 時間および 24 時間の CLN における移植片由来 IA^b

(B6)の陽性 EV の割合は、角膜移植の有無にかかわらず、それぞれ $0.33 \pm 0.12\%$ 、 $0.015 \pm 0.07\%$ 、 $0.08 \pm 0.02\%$ であった。図 3 B に示すように、角膜移植後 6 時間における IA^b -陽性 EV の割合は、他の 2 群に比べて有意に高かった (6 時間 vs. コントロール、 $p < 0.0001$ 、6 時間 vs. 24 時間、 $p = 0.0009$ 、コントロール vs. 24 時間、 $p = 0.27$)。

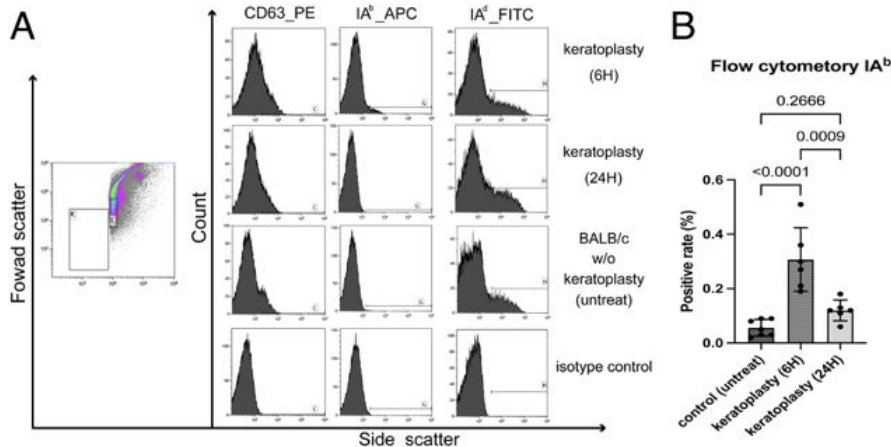


図 3 FCM による移植片由来 EV の検出結果

(5) 移植片由来 EV の宿主細胞への取り込み

移植片由来の EV は術後早期に宿主の頸部リンパ節に入ることが判明したため、移植片由来の EV が宿主リンパ節細胞に取り込まれ、抗原を発現するかどうかを評価した。FCM の結果、CD3 陽性細胞および IA^b -陽性細胞は、アイソタイプ対照群 ($0.03 \pm 0.03\%$) に比べ、PKP 群 ($0.13 \pm 0.03\%$) および EV 注入群 ($0.15 \pm 0.03\%$) に多く存在した (アイソタイプ対 PKP、 $p = 0.007$; アイソタイプ対 EV 注入、 $p = 0.03$)。 (図 4)

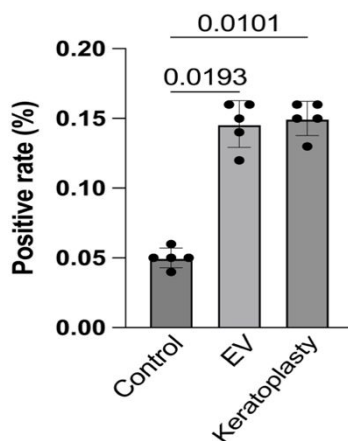


図 4 頸部リンパ節における CD3 および IA^b 陽性細胞の検出

(6) 硝子体膜下に EV を注入した全層角膜移植術後の生存率

次に、ドナー-CSC 由来の EV が、マウス角膜移植モデルにおいて移植片の生存率に影響を及ぼすかどうかを検証した。手術当日の EV の機能を解析するため、角膜移植において B6 (All o) 由来 EV、BALB/c (Iso) 由来 EV、または DMEM (基剤) を鼻孔膜下に注入した。培養 CSCs から単離された EV は、MHC クラス II 抗体陽性であった (IA^b または IA^d)。IsoEV 群は 43.3%の生存率を

示したが、これは基剤群と有意差はなかった。対照的に、AlloEV 群では、IsoEV 群およびコントロール群よりも有意に低い生存率が観察され（それぞれ $p=0.04$ および $p=0.02$ ）マウス角膜移植モデルにおいて、AlloEV の結膜下注射が拒絶反応を有意に促進することが示された。

考按

臨床的には、角膜実質の容積が大きい全層角膜移植は、角膜実質の容積が小さいデスメ膜移植や角膜内皮移植に比べ、同種移植片拒絶反応の可能性が高くなる。そこで本研究では、移植片に由来する CSCs の EV が、アロ抗原認識に大きく寄与している可能性に着目した。本研究では、B6 および BALB/c マウスの CSC において、B6 CSC 由来の EV が MLR を介して評価される免疫反応を増強することを示した。免疫電子顕微鏡を用いて、移植片由来の IA^b 陽性 EV の CLN への移動を観察した。さらに免疫染色を行ったところ、細胞成分を含まない EV を結膜に注入した場合、移植片由来の MHC クラス II (IA^b) と宿主由来の MHC クラス II (IA^d) 陽性の CD11c 陽性細胞が認められた。FCM を用いて、マウスの角膜移植から 6 時間後の CLN において、IA^b を持つ EV が多かった。さらに、BALB/c マウスではなく、B6 マウスの CSCs 由来の EV を結膜下に注入すると、移植片の拒絶反応が急速に頻発した。これらの知見は、移植片由来の EV が術後早期から CLN に移行し、角膜移植時の移植片拒絶反応を促進するという半直接的な経路を初めて証明するものである。移植片の生存率 (52.2%) は、基剤群の過去の報告と一致していた。

本研究は、角膜移植片由来の EV が宿主への抗原提示に役割を果たしていることを、in vivo と in vitro の両方で証明するものである。具体的には、角膜移植のマウスモデルにおいて、移植片由来の EV が術後わずか 6 時間以内にリンパ節に移動することを証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水俊輝 林孝彦 山上聡
2. 発表標題 角膜移植後の細胞外小胞が関与する拒絶反応の機序
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水俊輝 林孝彦 山上聡
2. 発表標題 角膜移植における細胞外小胞による抗原提示機構の解明
3. 学会等名 角膜カンファランス2024（第48回日本角膜学会総会）
4. 発表年 2024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
研究分担者	林 孝彦 (HAYASHI Takahiko) (20527931)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------