

機関番号：22701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791698

研究課題名 (和文) 培養角膜内皮細胞を用いた拒絶反応のない理想的な角膜移植術の開発

研究課題名 (英文) Development of rejection-free corneal transplantation using cultured corneal endothelial cell

研究代表者

林 孝彦 (HAYASHI TAKAHIKO)

横浜市立大学・医学研究科・特別研究員

研究者番号：20527931

研究成果の概要 (和文) : 近年角膜移植は全層角膜移植から DSAEK などのパーツ移植にシフトしつつあるが、世界的なドナー不足は解決されておらず、ドナー角膜を使用しない培養角膜内皮細胞移植が期待されている。今回マウスモデルを使用し、培養角膜内皮細胞移植の免疫学的特徴を検討したところ、拒絶反応が起こらず、免疫反応も検出されなかった。培養角膜内皮細胞移植は、ドナー不足の問題に加えて拒絶反応の問題も解決する将来有望な方法であると考えられた。

研究成果の概要 (英文) : To resolve severe worldwide shortage of donors, we established a mouse model in which cultured allocorneal endothelium was transplanted onto a recipient mouse cornea. During the follow-up period, the transplanted cultured allo-corneal endothelium did not show any sign of allograft rejection. Realization of the clinical application of cultured allo-corneal endothelium transplantation may be a shortcut to ideal rejection-free corneal transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

本邦では年間、約 2、600 眼の角膜移植が行われているが、移植手術を必要とする患者数に対して、提供角膜数が圧倒的に不足しており、実際に手術を受けるまで平均 2 年間は待

機する必要があった。さらに長期待機後に角膜移植が施行されても、移植後拒絶反応が発症すると、再び角膜混濁の状態になることも稀ではない。術後副腎皮質ステロイドホルモン剤の点眼治療を行っても、角膜移植術後の

拒絶反応発生率は 10-30%程度とされ、拒絶反応を抑制することは術後管理上最も重要なことである。このように、角膜移植における課題は、(1)ドナー不足の解消と(2)拒絶反応の抑制の二点に集約されるものと考えられる。

培養角膜内皮細胞移植は、動物実験での成功が報告されており、将来有望な水疱性角膜症に対する治療法である。本法が臨床応用されれば、水疱性角膜症に対してドナー角膜を直接使用する必要がなくなるため、数少ないドナー角膜の有効利用が可能となる。さらに過去の報告では、前房内に置かれた角膜内皮は免疫学的にも拒絶反応を起しにくい場所であるとされ、培養角膜内皮細胞移植は拒絶反応を防ぐという意味でも有利である可能性が考えられる。角膜移植免疫において、これまでに、数多くの研究が行われ、その研究成果が報告されてきた。

しかし、これらは全層角膜移植に関する研究であり、角膜内皮細胞移植の免疫学的特徴に関する研究はない。今後は、全層角膜移植よりも、角膜パーツ移植が主流になっていくものと思われる。

我々はドナーとして C3H 系統の培養角膜内皮細胞、C3H 系統のマウス、ホストとして BALB/c のマウスを用いて、世界で初めてマウス水疱性角膜症眼に対するアロ培養角膜内皮細胞移植モデルを作成することができた。さらに、このモデルを用いて、アロ全層角膜移植の経過と比較したところ、アロ角膜内皮細胞移植は拒絶反応を起しにくいことがわかった (Hayashi T, et al, Cornea, Jul; 27, 699-705, 2008.)。マウスモデルの最大の利点は、純系マウスでは抗原性が画一化されているため、免疫学的検討が容易となる点である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、培養角膜内皮移植術の免疫学的特性を明らかにし、拒絶反応のない理想的な角膜移植術を開発し、先にも述べた(1)ドナー不足の解消と(2)拒絶反応の抑制を解決することである。さらには、アロ培養角膜内皮細胞移植免疫学的機序の解明、さらに拒絶反応の少ない低リスク手術法の開発である。本研究が、現在の移植医療全般にわたる問題を解決する糸口になることを期待している。

## 3. 研究の方法

今回水疱性角膜症のマウスモデルを作成し、培養角膜内皮細胞移植の免疫学的特徴を検討した。ドナー角膜として、内皮を剥離した

BALB/c 角膜に不死化した培養 C3H マウス角膜内皮細胞を接着させたキメラ再構築角膜(内皮細胞移植群)と C3H 全層角膜(全層角膜移植群)を用い、塩化ベンザルコニウムで作製した BALB/c マウス水疱性角膜症眼への移植後の免疫反応の経過を比較した。以下の項目について検討を行った。

### I. 「アロ培養角膜内皮移植の細胞性免疫反応の検討」

#### (i) 遅延型過敏反応の測定

術後 4 週目に全ての群の DTH を測定する。具体的には、左耳朶に  $1 \times 1,000,000$  個の C3H 脾細胞を、右耳朶には PBS を注射し、24 時間後の耳朶の厚みを測定。陰性対照としては未処置の BALB/c マウスを、陽性対照としては 1 週間前  $1 \times 10,000,000$  個の C3H 脾細胞を背中に皮下注射した BALB/c マウスを用いる。すなわち、陰性対照、陽性対照、アロ全層角膜移植群、アロ角膜内皮細胞移植群の耳朶の厚みを測定した。耳朶注射の 24 時間後、マイクロメーター(ミットヨ、東京、日本)で耳朶の厚みを測定する。特異的 DTH は(24 時間後の左耳朶の厚み - 24 時間後の右耳朶の厚み) - (0 時間後の左耳朶の厚み - 0 時間後の右耳朶の厚み) (単位;  $\mu\text{m}$ ) として求めた。

### II. 「アロ培養角膜内皮移植後の組織学的検討」

移植後 4 週目に角膜中央部を直径 2mm のトレンパンで打ち抜き、角膜内皮面を 5% Alzarin red S で染色後、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡で観察。移植角膜上の PKH26 で蛍光標識した角膜内皮細胞の観察を行い、角膜内皮細胞密度の測定を行う。浸潤細胞の有無を CD4、CD8 の免疫染色で評価した。

### III. 「アロ培養角膜内皮移植後の抗原認識に関する検討」

#### (i) アロ培養角膜内皮移植後における ACAID の関与の検討

角膜裏面に移植された培養角膜内皮細胞が ACAID を誘導するか否かにつき、検討を行った。

#### (ii) 「アロ培養角膜内皮移植における制御性 T 細胞の関与の検討」

培養角膜内皮移植の生着に制御性 T 細胞が関与するかどうかを検討し、全層角膜移植の場合との比較を行った。具体的には、Adoptive transfer 法 (Plskova J et al. BMC. Ophthalmol. 4: 3, 2004.) を用いて検証した。

#### (iii) 「アロ培養角膜内皮移植の抗原感作後の変化の検討」

抗原感作後、アロ培養角膜内皮移植を行い、生着するかどうかを検討し、生着をもたらす機序が免疫制御 (tolerance) なのか免疫無視 (ignorance) なのかを検証した。

#### 4. 研究成果

我々は、グラフトには C3H マウスの全層角膜、C3H の培養角膜内皮細胞、そのコントロールとして、BALB/c の全層角膜、内皮細胞を剥離した BALB/c 角膜を用いており、ホストとしては全て内皮を傷害した BALB/c マウス角膜を用いるなど全て純系のマウスを用いている。観察期間中、同種同系全層角膜移植群では角膜の透明性は維持され、同種同系角膜内皮障害群では透明性が回復することはなかった。このことはわれわれのモデルが水疱性角膜症のモデルとして成立していることを示している。

本研究で我々は組織学的評価を行い、内皮障害による角膜内皮機能不全と免疫学的な拒絶反応を明確に区別した。アロ全層角膜移植群で 79% が拒絶反応を起こしたのに対して、アロ角膜内皮細胞移植群では拒絶反応はみられず、遅延型過敏反応も陰性で、組織学的にも炎症細胞の浸潤が無く、結果として角膜内皮細胞数も保持されていた。このことから、内皮細胞のみがアロ抗原となるアロ角膜内皮細胞移植群は免疫学的には、アロ全層角膜移植群より優れていることを強く示唆している。実際に、アロ角膜内皮細胞移植群では拒絶反応を示唆する細胞浸潤や角膜後面沈着物、フィブリン沈着、炎症反応などは全く見られなかった。また、免疫染色では、アロ角膜内皮細胞移植群は実質浮腫の有無にかかわらず、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞は陰性で、拒絶反応発生中に中心的役割を果たすと考えられる T 細胞による免疫反応が起こっていないことが示唆された (非公開データ)。しかしながら、このようなアロ角膜内皮細胞移植群の免疫反応からの回避がいかにかに生ずるのかは不明である。一つの可能性として、樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞がデスメ膜を通過できないために抗原提示細胞は前房を介する以外の経路から、角膜内皮細胞のアロ抗原を認識することができず、ホスト T 細胞を十分に感作することができないことが原因として考えられる。次に、仮に前房側から内皮細胞のアロ抗原が認識されたとしても、前房という特殊な環境下では TGF- $\beta$  などの免疫抑制因子、前房関連免疫偏位 (anterior chamber associated immune deviation; ACAID)、Fas-FasL システム、B7H1 の発現などによって炎症が抑制される可能性もある。

今回の検討からは培養角膜内皮細胞を用

いた移植が免疫学的に有利であることが示された。

結果として内皮細胞移植群では観察期間中、拒絶反応がみられず、全層角膜移植群より免疫反応は有意に低下していた。拒絶反応が起きにくい免疫学的機序として、免疫抑制や免疫寛容ではなく、免疫無視が考えられた。培養角膜内皮細胞移植は、移植される抗原量が少なく、解剖学的にもホストからの認識を回避しやすい場所にあるため、拒絶反応を減らすことができた可能性がある。このように培養角膜内皮細胞を用いた角膜内皮移植は、ドナー不足の問題に加えて拒絶反応の問題も解決する将来有望な方法であるという新たな知見を得た。

内皮細胞移植群では観察期間中、拒絶反応がみられず、各種実験系においても全層角膜移植群より免疫反応 (遅延型過敏反応、混合リンパ球培養試験) は有意に低下していた。免疫反応が低い理由として、ACAID は術後 4 週においても 8 週においても成立しておらず、局所における抑制はかかっていると考えられた。さらに、制御性 T 細胞の養子移入の実験において、養子移入後も生着率は向上せず、トレランスは関与していないと考えられた。さらに、C3H 脾臓細胞による抗原感作後、培養角膜内皮移植術を行ったところ、遅延型過敏反応は陽性を示しているにも関わらず、拒絶反応が起こらなかった。術後 4 週でも 8 週でも、内皮細胞移植群では前房関連免疫偏位を獲得おらず、トレランスもかかっておらず、拒絶反応が有意に低い理由として、免疫抑制ではなく、解剖学的バリアーによる免疫無視の可能性が考えられた。角膜パーツ移植では、移植される抗原量が少なく、また、解剖学的にもホストからの認識を回避しやすい場所にあるため、拒絶反応を減らすことができたと考えられた。培養角膜内皮細胞を用いた角膜内皮移植が実現できれば、拒絶反応の問題もドナー不足の問題も解決できるであろう。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Hayashi, T., Yamagami, S., Tanaka, K., Yokoo, S., Usui, T., Amano, S., Mizuki, N. Immunologic mechanisms of corneal allografts reconstituted from cultured allogeneic endothelial cells in an immune-privileged site. Invest Ophthalmol Vis Sci; 50, 3151-3158, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 孝彦 (HAYASHI TAKAHIKO)  
横浜市立大学・医学研究科・特別研究員  
研究者番号：20527931

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：