

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：34318

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10529

研究課題名(和文) 眼の前房で誘導したトランスによる臓器移植生着手法の開発

研究課題名(英文) Development of the tolerance induction method by injecting the cultivated donor cells into anterior chamber of the eye

研究代表者

山田 潤 (Yamada, Jun)

明治国際医療大学・医学教育研究センター・教授

研究者番号：80351352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：「培養したドナーの細胞を用いて、ドナーアロ抗原に対するトランスを誘導し、免疫抑制剤を用いずに臓器移植を生着させる事」が最終ゴールである。マウス角膜内皮細胞を前房内に移植し生着させたマウスにおいては同じドナー由来の心臓移植を有意に生着させ、50%以上が100日以上が生着が得られる組合せも得られた。しかし、100%の生着を確証出来なかった。また、ヒトに応用すべく、培養血管内皮細胞を前房内に移植した際には前房出血が100%誘導され、視力低下を来す事が明らかとなった。結局、ドナー細胞が無治療で長期生着出来る場所や方法を再検討せざるを得ないと結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アロ移植は基本的に拒絶される。しかし、前房内に移植を行う角膜内皮細胞移植では拒絶されないだけでなく免疫寛容が誘導される。この生体の特殊な応答を臓器移植に応用できた場合には免疫抑制剤の副作用を軽減でき、安全な移植医療が実現できる。マウスモデルにおいて、角膜内皮細胞移植後に全層角膜移植は100%拒絶されなくなり、心臓移植も無治療で生着できることが判明した。人での実現に向けて、角膜移植を用いずに安全な免疫寛容誘導方法を開発することが今後必要であり、あと一歩新たな知見やアイデアが必要である。

研究成果の概要(英文)：To establish the tolerance induction method by injecting the cultivated donor cells is the goal of our aim.

Cultivated allogeneic corneal endothelial cell (CEC) injection therapy for CEC dysfunction is now available. To evaluate allogeneic response post CEC injection into the anterior chamber (AC), we developed new experimental models and examined allosensitization and acquisition of transplantation tolerance. Labeled mpCECs in the cryo-injured eyes survived for at least 1 week (N=5). C57BL/6 penetrating keratoplasty allografts at 8-weeks post mpCEC injection never displayed episodes of allogeneic rejection (N=10, 100%, $p<0.001$). Moreover, more than 50% cardiac allograft survived indefinitely after allogeneic CEC injection. However, other cells including vascular endothelial cells, but not CECs, could not survive anterior chamber of the eye. We need to find the new method for allogeneic tolerance induction.

研究分野：移植免疫

キーワード：角膜移植 臓器移植 心臓移植 角膜内皮細胞 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

臓器移植におけるアロ拒絶反応は未だ完全に克服されていない重大な合併症であり、免疫抑制剤では副作用が問題視されている。ドナーに対するトレランス誘導は移植分野における理想的な解決法であり、臨床応用可能なトレランス誘導法の開発に向けた研究が種々なされてきたが臨床応用できていない。

近年、再生医療の一つである、ヒト培養角膜内皮細胞移植が成功し、目下臨床検討中である。同時に、角膜内皮細胞を一部脱落させた後にアロ角膜内皮細胞を前房内に注入するアロ角膜内皮細胞移植マウスモデルを作成した。この移植モデルでは、ドナーに対する遅延型過敏反応が誘導されず、拒絶応答も見られなかった。さらに注目すべき事に、内皮細胞移植8週経過後にはアロに対する強いドナー抗原特異的トレランスが誘導されており、二次的な全層角膜移植が100%生着することを証明した(申請者ら Invest Ophth Vis Sci(以下 IOVS) 2016)。この現象はマウス全層角膜移植長期生着後に誘導されるトレランス(申請者ら、Transplantation 2005)と同等の現象であった。このトレランス誘導の機序や担当している regulatory T 細胞などについては今後明らかにしなくてはならない課題であるが、少なくとも眼前房内へアロ内皮細胞を移植する際には拒絶や感作を危惧せずにトレランスを誘導出来る手法として活用できる。なお、アロ角膜内皮細胞注入生着後、同じドナー由来の二次的な心臓移植が免疫抑制剤を一切使用せずに生着することまでマウスで証明できていた。

2. 研究の目的

トレランス誘導の現象を近い将来のヒト生体肝移植や生体腎移植で活用されることを最終目標に据え、現段階での想定として「親子間の生体臓器移植待機中にホスト前房にドナー培養血管内皮細胞を移植し、トレランス誘導確認後、二次的な臓器移植を免疫抑制剤なしで長期生着させる」ことを掲げた。この可能性の実現に向け、トレランス誘導条件を確定し、腎臓移植や肝臓移植に対する有効性の検証が本研究の主目的である。ロードマップに従い、各々の目的を簡単に示す。

- (1)角膜内皮細胞以外の細胞移植を用いたトレランス誘導方法の開発：ドナー由来の角膜内皮細胞の採取は临床上不可能であるため、ドナー由来の他の細胞を用いる。
 - (2)トレランス誘導の機序解明を行い、前房を用いないトレランス誘導の検討：正常な眼球を損傷することとなり、視力障害などの合併症が生じうる行為はできれば避けたい。
 - (3)親子間の関係である HLA セミ適合、その他 HLA 部分適合などでの拒絶抑制の検証：臓器移植のドナー細胞を臓器移植の数ヶ月前に準備することは非現実的である。生体肝移植や予定された移植の場合にのみドナー細胞の準備が可能である。角膜移植においては、HLA 適合した方が拒絶のリスクが上昇する状態が存在する(マウスの検討)。よって、MHC 適合での安全性も検証必要である。
 - (4)肝臓移植、腎臓移植へのチャレンジ：動物実験において移植臓器の生着が明瞭に判定できる心臓移植を第一に行うが、臨床の第一号は生体肝移植となるであろうことから、心臓移植生着の後は肝臓・腎臓移植の拒絶判定を行う。なお、ドナー抗原提示細胞の移入が拒絶免疫応答を助長すると考えられるため、心臓移植で生着したとしても肝臓・腎臓移植は生着するかどうかは明らかでない。
 - (5)ヒト角膜内皮細胞移植後にドナー感作がされているかを明らかにする。
 - (6)霊長類を用いた移植検討を経て、ヒト応用へつなげる。
- 以上を本検討の目的とした。

3. 研究の方法

- (1)角膜内皮細胞以外の細胞移植を用いたトレランス誘導方法の開発：ヒトでドナーから角膜内皮細胞を採取できないため、類似細胞として血管内皮細胞(VECs)を用いた。VECs の培養方法(変性、老化率が低くなる手法)の確立を行うとともに、VECs の眼前房への移植においても同等のトレランス誘導の有無を判定した。また、その他の細胞(線維芽細胞・脾細胞・角膜上皮細胞・末梢リンパ球など)を用いた検討も必要に応じて行った。
- (2)トレランス誘導の機序解明を行い、前房を用いないトレランス誘導の検討：前房水には高濃度の TGF- β が存在しており、TGF- β に暴露された抗原提示細胞が様々な免疫寛容に重要であることが分かっている。TGF- β に暴露したアロ脾細胞を静脈注射することで角膜移植拒絶を抑制出来る事が一部の条件で分かっている。様々な strain を用いて検証すること、そして、臓器移植にも応用可能かどうかを検証した。
- (3)親子間の関係である HLA セミ適合、その他 HLA 部分適合などでの拒絶抑制の検証：心臓移植の生着は現在 MHC 適合で成功したばかりであり、親子間の関係である MHC セミ適合でも、もしくは MHC 不適合でも生着可能な手法を模索した。申請者の経験では、MHC 適合と MHC セミ適合では同等の拒絶抑制効果が得られる結果があり(申請者ら Transplantation 2007)、本トレランス誘導は親子間の移植にまで適応が広げられると信じている。
- (4)肝臓移植、腎臓移植へのチャレンジ：実験的に拒絶判定が容易な心臓移植を実施してい

るが、腎臓移植や肝臓移植での検討を行った。

4. 研究成果

(1) 基本的な移植結果

アロ角膜内皮細胞移植 8 週間後のマウスに、同じドナー由来の全層角膜移植は 100% 生着した。この拒絶抑制はドナーアロ抗原特異的であり、naive マウスへの adoptive transfer を用いた検討でも生着延長することから、regulatory 細胞の誘導が抑制機序とわかっている。次に、アロ角膜内皮細胞移植 8 週間後のマウスに、同じドナー由来の心臓移植を行ったところ優位な生着延長がみられ、一部で 100 日以上完全な生着が得られた (C57BL/6 BALB/c、25% 生着 n=8)。また、MHC 適合の組合せ (B10.D2 BALB/c) を用いた同じ検討を行った場合、50% の完全生着がみられた (n=8)。いずれも免疫抑制剤を全く用いていない。

ただ、100 日以上生着した移植心臓を包埋し、組織学的に検討したところ、炎症細胞浸潤が存在し、微弱な拒絶応答が存在する可能性は否定できなかった。また、C57BL/6 や C3H をホストとして用いた場合には拒絶率が上昇することが分かり、移植直後の抗炎症治療などの必要性が考えられた。最終的に、アロ角膜内皮細胞移植を行った後に確実に生着していると考えられるマウスを用い、MHC 適合の組合せ (B10.D2 BALB/c) で移植する事によって、70% の生着は得られるようになった。移植実験は他の目的達成のため一旦延期とした。

(2) 角膜内皮細胞以外の細胞移植を用いたトレランス誘導方法の開発

ヒトでドナー由来の角膜内皮細胞を採取できないため、類似細胞として血管内皮細胞 (VECs) を用いる事を想定した。VECs の培養方法 (変性、老化率が低くなる手法) の確立を始めた。マウスモデルにおいて、角膜内皮細胞ではなく、VECs の眼前房への移植を行い、トレランス誘導の有無を判定した。しかし、VECs を前房内に注入すると、100% 前房出血が生じる事が判明し、VECs を前房内に移植する事は不適切である事が判明した。そこで、A) VECs を眼内以外で生着させる試み、B) VECs を TGF- β 処理して静脈注射して免疫寛容を誘導する試み、C) VECs 以外の細胞 (線維芽細胞・脾細胞・角膜上皮細胞・末梢リンパ球など) を前房内に注入して免疫寛容を誘導する試みをそれぞれ行った。A) アロの VECs を安定して眼内以外 (結膜下・腎被膜下・皮下) で生着させる事は出来なかった。B) 前房水には高濃度の TGF- β が存在しており、TGF- β に暴露された抗原提示細胞が様々な免疫寛容に重要であることが分かっている。TGF- β に暴露したアロマクロファージを静脈注射することで角膜移植拒絶を抑制出来る事が一部の条件で分かっている。TGF- β 処理を行った VECs、マクロファージを静脈注射したところ、アロに対する免疫調節は誘導でき、全層角膜移植の拒絶は有意に抑制されたものの、一部の strain の組合せにおいてのみの結果であるため、臨床応用に持ち込むことは現在のところ不向きと結論づけた。C) 前房内に脾細胞を入れた際には ACAID と呼ばれる免疫寛容が誘導されるが、アロ拒絶抑制は出来なかった。前房内に生着させるため、冷凍凝固法を施行した際には ACAID は誘導されず、また前房内での長期生着を勝ち取ることは出来なかった。

今後、アロ角膜内皮細胞移植で誘導出来ているトレランスを他の手法で誘導できる方法、アイデアの開発が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toda M, Yukawa H, Yamada J, Ueno M, Kinoshita S, Baba Y, Hamuro J	4. 巻 60
2. 論文標題 In vivo fluorescence visualization of anterior chamber injected human corneal endothelial cells labeled with quantum dots	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 4008-4020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1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

1. 発表者名 戸田宗豊, 湯川博, 山田潤, 上野盛夫, 外園千恵, 馬場嘉信, 木下茂, 羽室淳爾
2. 発表標題 量子ドット標識ナノ技術による前房内注入培養ヒト角膜内皮細胞の生体内動態の解析
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

1. 発表者名 Yamawaki T, Ito E, Yamada J, Kinoshita S, Sotozono C, Hamuro J
2. 発表標題 Investigation of the interactions between macrophages and retinal pigment epithelium (RPE) cells in AMD
3. 学会等名 89th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----