

平成 21年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19592946

研究課題名 (和文) アロを用いた再生医療に応用可能な、拒絶反応抑制方法の開発

研究課題名 (英文) The development of immunosuppressive strategy for regenerative corneal allograft survival

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・准教授

研究者番号：80351352

研究成果の概要：角膜移植拒絶は主に T ヘルパー 1 型 T 細胞 (Th1) が誘導するため、臨床応用に向けた Th1 制御方法を開発してきた。しかし、BALB/c マウスで有効であった Th1 制御による拒絶抑制は B6 マウスでは無効であったため、拒絶における Th1 以外の免疫応答の関与を検討した。結果、Th1 応答が欠如した状態では、Th17 応答ではなく、Th2 応答が主体となって拒絶が生じることがわかった。免疫学的拒絶制御を臨床応用する際には B6 マウスでの制御方法の開発が必須である。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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：Th17 免疫応答、Th1/Th2、角膜移植拒絶反応、主要組織適合抗原 (MHC)、マイナー抗原、免疫特権

1. 研究開始当初の背景

近年、培養角膜上皮移植を用いた再生医療が成功をおさめ、スチーブンス・ジョンソン症候群や化学外傷における重篤な角結膜障害に対する治療が可能となってきた。この培養角膜には自己の細胞 (角膜や口腔粘膜由来) を使用出来るメリットがあるが、現実にはアロの培養角膜を余儀なく選択する場合が増えている。アロを用いた移植では強い免疫抑制剤を使用していても拒絶反応が生じる症例が散見され、感染・眼圧上昇などの副作用とともに、重篤な合併症の一つとして問題となっている。現在のところ、培養角膜移植における手法だけでなく、ハイリスク眼における全層角膜移植・角膜輪部移植・結膜移植 (粘膜移植) でさえ、臨床応用可能な拒絶抑制に向

けた免疫学的拒絶制御手法は未だ開発段階であり、臨床応用出来る有用な手法には至っていない。そこで、近年わかってきた新たな知見をもとに、拒絶の機序をもう一度見直し、拒絶抑制手法を改良し、アロ培養角膜移植への臨床応用につなげる必要があった。

拒絶制御における主なアプローチには (a) 拒絶反応の誘導経路の遮断、(b) 抗原性、免疫原性の少ないドナー組織の提供、(c) ドナー抗原に対するトレランスの誘導、があげられる。これらを複合して処理することで、BALB/c マウスを宿主に用いた場合には、アロ角膜移植における拒絶制御が可能となってきた。すなわち、(a) 主たる拒絶応答誘導経路とされている、アロのマイナー抗原に対する T ヘルパー 1 型 (Th1) 応答を抑制するアプローチがなさ

れてきた。我々においても、Th1 制御の臨床展開を目指して、Th1 抑制による拒絶抑制(山田ら、J Immunol, 1999, Invest Ophthalmol Vis Sci(以下 IOVS), 2003)や、抗原提示細胞内のグルタチオンレドックス制御による臨床応用可能な Th1 環境抑制(山田ら、IOVS, 2004)によって著明な拒絶抑制を可能にした。(b)また、Th1 抑制による拒絶抑制手法では MHC 適合を施行することにより効果的な拒絶制御が可能となっている。(c)最後に、アロ角膜を長期生着している無治療マウスには強いトレランスが誘導されていることを確認した(山田ら、Transplantation, 2005)。ドナー抗原に対するトレランス誘導が恒久的な角膜生着に向けての理想である。以上のように、BALB/c マウスをホストとするモデル実験の結果からは、臨床展開が可能で安全な拒絶制御手法が、ある条件下では成立した。

2. 研究の目的

(1) Th1 制御による拒絶制御方法には MHC 適合が必須であった。臨床応用に向けて、MHC 非適合の系においても成立する拒絶抑制法の創出を第一目的とした。

(2) 異なったマウス系統では同様の成績を得ることができない場合がある。我々は、臨床適用の蓋然性を更に確実にするために、基礎研究者が殆ど用いない、角膜移植技術の困難な C57BL/6 マウスをホストにする系での検討を目的とした。

(3) T 細胞レパートリーの観点からみた拒絶応答の必要十分条件についての検討を目的とした。Th1 応答を完全に抑制できていると考えられる INF- γ KO マウスをホストに用いた検討を行い、Th1 以外 (TH17 免疫応答を含む) の拒絶機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) MHC 非適合の系での Th1 制御手法の創出においては、下記の移植を行った。抗原提示細胞の細胞内グルタチオン量を減少させ Th1 応答を抑制する N, N'-ジアセチルシスチンジメチルエステル(NM2)をドナー・レシピエント双方の結膜下(8 μ g)に投与した(移植 7, 4, 1 日前)。BALB/c(H-2d)マウスの新生血管誘導眼に、B10.D2(H-2d), C57BL/10(H-2b), もしくは CBF1(H-2b/d)ドナー角膜を移植した。また、同様に CBF1(H-2b/d)マウスに C3B6F1(H-2b/k)を移植した。

(2) C57BL/6 マウスをホストに用いて同様の効果が得られるかどうかについて検討を行った。MHC 非適合移植、MHC 適合移植の双方について検討した。

(3) IFN- γ ノックアウトマウス、IFN- γ レセプターノックアウトマウス、IL-17 ノックアウトマウスをホストに用いた移植を検討した。MHC 非適合移植、MHC 適合移植の双方について検討した。また、拒絶組織における HE 染色では多核白血球の存在を形態学的に観察してお

り、免疫学的検討を行った。拒絶組織への浸潤細胞を CD11b, CD11c, Gr-1 等を用いて染色し、好中球浸潤割合を比較検討した。Wild-type C57BL/6 ホストにおける拒絶と比較検討するとともに、拒絶早期から後期までの浸潤像を経時的に観察した。

(4) 局所における拒絶応答の成立機序、炎症細胞浸潤に関わるケモカイン産生を検討すべく、移植後 7 日(拒絶前)と 21 日(拒絶直後)のドナー角膜(D)、ホスト角膜(H)、頸部所属リンパ節(LN)を採取した。角膜組織においてはさらに、EDTA を用いて上皮(E)と実質(S)に分離した。それぞれの組織で、Th1 関連サイトカイン(IL-12p35, IL-15, IL-18, INF- γ)、Th2/Th17 関連サイトカイン(IL-12/23p40, IL-10, IL-23p19, IL-6, IL-17f)、Th1 関連ケモカイン(CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL5) Th2 関連ケモカイン(CCL1, CCL11, CCL17)、Th17 関連ケモカイン(CCL22, CXCL2)の遺伝子発現について、RT-PCR法を用いて測定し、normal マウスと比較した。

4. 研究成果

(1) MHC 非適合の系における Th1 制御拒絶抑制系の確立をおこなった。MHC 適合、部分適合での対照群ではドナー角膜は早期に拒絶されるモデルを使用した(B10.D2: MST = 15.4 \pm 0.6, C57BL/10: MST = 16.1 \pm 1.1, CBF1: MST = 20.2 \pm 1.6)。NM2 投与により、MHC 適合した B10.D2 角膜は有意に永久生着した(71.4%, $p < 0.0001$)。MHC+マイナー抗原非適合の C57BL/10 角膜は生着延長したが(MST = 43.6 \pm 1.5, $p < 0.001$)、最終的に 100%拒絶された。セミ同系の CBF1 角膜は著明に永久生着した(86.6%, $p < 0.0001$)。親子間移植モデルの C3B6F1 角膜も対照群ではすべて拒絶されたが(MST = 18.9 \pm 1.1)、NM2 投与群では有意に永久生着した(50.0%, $p < 0.0001$)。すなわち結論として、NM2 治療において、対立遺伝子の片方の適合は、MHC 適合と同等の拒絶抑制を誘導することがわかり、臨床における MHC 適合や親子間の移植は治療条件によって永久生着を促すことが示唆された。臨床においては HLA-DR 適合による拒絶率低下などが報告されており、MHC の部分適合においても Th1 制御手法が有効であることが十分示唆された。

(2) もとより高頻度、且つ、強い拒絶応答を生じる C57BL/6 マウス(山田ら、Transplant Immunol, 1998)をホストに用いた Th1 制御手法の拒絶制御効果について、検証を行った。まず、KLH 抗原に対する強い Th2 応答を誘導しながら角膜移植を行う手法(Yamada et al. J. Immunol 1999)について、C57BL/6 マウスをホストに用いて検証した。結果、MHC と minor 抗原の異なる BALB/c ドナー角膜についてはコントロールと同様、100%拒絶され、また、拒絶時期についても有意差は見られなかった。

しかし、MHCマッチングを行った129マウスのドナー角膜はKLH免疫によって100%拒絶から50%拒絶に有意に拒絶制御を行うことが出来た。依然、50%が拒絶されていることから、拒絶機序の解明や、制御方法の改善の必要性があった。次に、酸化型マクロファージを誘導することによるTh1制御 (Yamada et al. IOVS 2004, Transplantation, 2007) がC57BL/6ホストで有効かどうかを検証したところ、MHC適合移植でもMHC非適合移植でも拒絶率を減らすことは出来ず、拒絶時期を遅らすことも出来なかった。実は、C57BL/6マウスでは酸化型マクロファージを誘導することが細胞レベルでも難しいことがわかってきており、酸化型マクロファージ誘導が十分でなかった可能性が最も考えられている。ちなみに、C57BL/6とC3HマウスのF1であるB6C3F1マウスをホストに用いた際には、無治療のコントロールでは100%拒絶されるのに対し、酸化型マクロファージ誘導によって有意な拒絶抑制が可能であったことから(Yamada et al. Transplantation, 2007)、種々のstrainで成立する拒絶制御手法であること、C57BL/6ホストだけでは成立が困難であることが明らかとなった。依然、100%の拒絶制御は出来ておらず、また、ヒトにおいてC57BL/6ホストのような無効例の存在も否定出来ていないことから、臨床応用に向けたさらなる検証の必要性が明らかとなった。

そこで、局所における拒絶応答の成立機序、つまり、アロ角膜移植拒絶の主体である、マイナー抗原に対するTh1応答が決定される機序を検討した。B6、もしくはB10. D2ドナー角膜をBALB/cマウスに移植し、24h後、および7日後にドナー角膜(D)、ホスト角膜(H)、頸部所属リンパ節(LN)を摘出した。角膜はEDTAを用いて上皮(E)と実質(S)に分離した。それぞれの組織で、Th1関連サイトカイン(IL-12, IL-15, IL-18, INF- γ)遺伝子発現をRT-PCR法を用いて測定し、normalマウスと比較した。結果、MHCとマイナー抗原が異なるB6を移植後24hでは強いIL-12, IL-15発現増強がDSで、IL-12発現増強がHSで見られた。IL-18, INF- γ 発現は変化なかった。移植後7日ではIL-12発現増強がDS, HS, 及びHE, LNでも見られ、INF- γ 発現増強がDS, HS, LNで見られた。しかし、マイナー抗原のみ異なるB10. D2を移植後7日ではIL-12発現増強がDS, HS, HEで見られ、INF- γ 発現増強がDS, HS, DEで見られたが、LNでの変化がなかった。すべての組織における移植後7日でのIL-15, IL-18発現増強はなかった。従って、移植後早期の角膜由来抗原提示細胞のIL-12発現が示唆された。MHC適合/非適合にかかわらず、移植後7日後では角膜局所におけるTh1応答が示唆されたが、LNにおけるTh1反応はMHC非適合移植でのみ認

められた。ドナーマイナー抗原に対するTh1応答誘導は移植局所においてすでに決定されていることが推測された。

(3)強い拒絶応答を示すB6マウスを用いて、INF- γ 非依存性の拒絶応答の有無を検討した。すなわち、129マウス(minor Hのみ非自己)の角膜ドナーを、B6マウス(WT)・B6-INF- γ KOマウス・B6-INF- γ -receptor KOマウスのホストへそれぞれ全層角膜移植した。拒絶角膜に対してギムザ染色と免疫染色(CD11b, CD11c, Gr1, B220)を行った。移植7日後の角膜と頸部所属リンパ節におけるTh1/Th17関連サイトカイン(IL-12p35, IL-12/23p40, IL-15, IL-18, INF- γ , IL-10, IL-23p19, IL-6, IL-17f)遺伝子発現をreal time PCR法を用いて測定し、normalマウスと比較した。その結果、INF- γ KOマウスも(90%拒絶, n=20)、INF- γ -receptor KOマウスも(100%拒絶, n=10)、高率に129マウス角膜を拒絶した(対照拒絶率100%)。拒絶角膜に好酸球やB細胞の浸潤がなかったのに対し、好中球やマクロファージの浸潤が見られた。移植7日後の角膜では、WTではIL-12p35, IL-12/23p40, IL-23p19, IL-6, IL-17fの発現が増強していたのに対し、INF- γ KOではIL-6, IL-17fのみ発現増強が見られた。リンパ節では双方とも、IL-6の発現増強のみがみられた。結論として、マイナー抗原に対するINF- γ 非依存性の拒絶が存在し、好中球浸潤を伴う非Th2応答の拒絶が見られた。

CD4+ T細胞がC57BL/6マウスにおいても拒絶応答の要であり(山田ら、IOVS, 1999)、そして、INF- γ KOマウスにおけるminor抗原に対する局所拒絶応答は好中球浸潤が主体であったことから、好中球浸潤を特徴とするTh17応答が拒絶応答の主体ではないかと仮定した。しかし、IL-17KOマウスをホストに用いても、さらにIL-17KOマウスに抗INF- γ 抗体による抗体治療を施した場合でさえも100%拒絶され、依然、好中球主体の拒絶応答がみられた(IOVS 2009 in press)。従って、INF- γ /IL-17非依存性の好中球主体の拒絶に関しては、臨床展開を行う前に拒絶応答の機序解明と拒絶制御手法の開発が必要と考えるに至った。

(4)そこで、局所で誘導されたケモカイン同定による、拒絶免疫反応の病態解明と制御の試みた。拒絶組織の形態学的検討により、角膜移植拒絶は遅延型過敏反応(DTH)で生じていると考えられる。M ϕ 中心の炎症とされてきたDTHに好中球の関与などが議論されている(Steinmanら、Nat Med. 2006)。実際、IL-17によって好中球主体の反応が誘導されると言われているが、IL-17KOマウスにおいても、依然、好中球主体の拒絶応答が観察された。よって、INF- γ /IL-17非依存性のTh1/Th17応答をも想定し、移植後の角膜組織におけるケモカインを経時的に同定した。すなわち、129

ドナー角膜(MHC適合)をINF- γ ノックアウト(GKO)、もしくはC57BL/6(WT)マウスに移植し、移植後早期、拒絶発症時期に角膜、所属頸部リンパ節を採取した。採取した角膜はドナー・ホスト、そして、角膜上皮・角膜実質に分離した。Th1関連(CXCL10:IP-10, CXCL9:Mig, CCL5: RANTES, CXCL11: I-TAC), Th2関連(CCL11: Eotaxin, CCL17: TARC, CCL1: TCA-3, I-309), および、Th17関連(CCL22: MDC, CXCL2)ケモカインをReal-time PCR法を用いて遺伝子発現上昇を検討した。その結果、WT, GKOともにリンパ節での発現上昇はなかった。角膜では、WTの7日後、21日後、ともにTh1, Th17関連のすべてにおいて10-500倍の発現上昇がみられたが、Th2関連の上昇はなかった。一方、GKOホストではTh1関連のCXCL9, 10, 11が抑制されていたが、CCL5とTh17関連はWTと同等の発現上昇がみられた。また、Th2関連のうち、CCL1とCCL17において10-100倍の発現上昇がみられた。結論として、INF- γ 抑制におけるMHC適合移植においては、INF- γ に関連したCXCL9, CXCL10, CXCL11発現が低下した。しかし、CCL5によるTh1炎症、CCL11 (Eotaxin)以外のTh2ケモカイン発現による好酸球浸潤のないTh2応答、Th17応答による好中球遊走、が関与しうる状態であると考えられた。拒絶応答の制御には、代償する免疫応答を誘導しないような、時期・抑制強度・新規の戦略などが必要と思われた。

申請者の知る限りにおいて、角膜移植拒絶や角膜創傷治療にチオールレドックス制御を関連付けた報告は国内外を含め皆無である。細胞内チオールレドックス制御を介する拒絶制御と角膜透明性維持は、免疫抑制剤などの副作用を最小限に抑えることができ、理想的な拒絶制御療法を実現するものと予想される。また、本研究は臓器移植の拒絶制御にも応用可能であり、移植分野において先駆的な意味合いを持つと考えている。さらに、Th17応答やTreg誘導に関するアクセソリー細胞のレドックス動態が明らかになれば、炎症応答全般における局所の応答がさらに明らかとなり、極めて広い分野での応用が可能となるため、本研究の意義は大きいと考えている。

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 6 件)

1. Yamada J, Hamuro J, Hatanaka H, Hamabata K, Kinoshita S: Alleviation of seasonal allergic symptoms with superfine beta-1, 3-glucan: A randomized study. *J Allergy Clin Immunol.* 119:1119-1126, (2007)、査読有り

2. Yamada J, Hamuro J, Terai K, Kinoshita S: MHC semi-matching improves murine corneal allograft survival under oxidative macrophage dominancy. *Transplantation.* 84:899-907, 2007、査読有り
3. Fukushima A, Sumi T, Ishida W, Yamada J, Iwakura Y, Ueno H: Endogenous IL-17 does not play a significant role in the development of experimental murine allergic conjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 147:206-212, 2008、査読有り
4. Yamada J, Hamuro J, Fukushima A, Ohteki T, Terai K, Iwakura Y, Yagita H, Kinoshita S: MHC-matched corneal allograft rejection in an IFN-gamma/IL-17-independent manner in C57BL/6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009. in press、査読有り
5. Fujishima H, Fukagawa K, Takano Y, Tanaka M, Okamoto S, Miyazaki D, Yamada J, Fukushima A, Uchio E, Nakagawa Y: Comparison of efficacy of bromfenac sodium 0.1% ophthalmic solution and fluorometholone 0.02% ophthalmic suspension for the treatment of allergic conjunctivitis. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* 2009, in press、査読有り
6. Fukushima A, Ishida W, Kajisako M, Sumi T, Yamada J, Tsuru E, Miyazaki J, Tominaga A, Yagita H: Participation of CD11b and F4/80 molecules in the conjunctival eosinophilia of experimental allergic conjunctivitis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2009, in press、査読有り

[学会発表] (計 12 件)

1. Yamada J, Hamuro J, Ohteki T, Terai K, Kinoshita S: The role of neutrophil mediated corneal allograft rejection in C57BL/6-IFN-gamma KO hosts. 81th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). 2009.5.4 Fort Lauderdale. Florida. U.S.A.
2. Terai K, Yamada J, Kinoshita S: Development of a new method for the measurement of corneal rigidity. 81th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). 2009.5.5 Fort Lauderdale. Florida. U.S.A.
3. Yamada J, Hamuro J, Fukushima A, Terai K, Ohteki T, Iwakura Y, Kinoshita S:

- Corneal allograft rejection by an IFN-gamma-independent immune response. 80th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). 2008. 4. 30. Fort Lauderdale. Florida. U. S. A.
4. Hamuro J, Yamada J, Kinoshita S: MHC semi-matching improves corneal allograft survival by local skewing of intracellular redox status in antigen presenting cells to an oxidative form. 50th SOE (European Society of Ophthalmology). 2007. 6. 9. Vienna. Austria.
 5. Terai K, Saika S, Yamada J, Kinoshita S, Kao W: The Role of TGF-beta and Activin Signals in Corneal Epithelium Wound Healing in Organ Culture Experiment. 79th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). 2007. 5. 8. Fort Lauderdale. Florida. U. S. A.
 6. Yamada J, Hamuro J, Terai K, Mochida C, Endo K, Ohteki T, Kinoshita S: IL-15 Plays an Important Role in the Induction of Experimental Autoimmune Uveoretinitis. 79th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). 2007. 5. 8. Fort Lauderdale. Florida. U. S. A.
 7. 山田潤, 羽室淳爾, 樗木俊聡, 寺井和都, 木下茂. INF- γ 非依存性の拒絶における、Th1/Th2/Th17 ケモカイン発現の検討, 第 33 回角膜カンファレンス・第 25 回日本角膜移植学会, 2009. 2. 19, 大阪,
 8. 山田潤, 羽室淳爾, 寺井和都, 福島敦樹, 中西憲司, 安田好文, 樗木俊聡, 木下茂. IL-12/IL-18 非依存性の全層角膜移植拒絶反応の検討. 第 112 回日本眼科学会総会, 2008. 4. 18, 横浜
 9. 山田潤, 羽室淳爾, 福島敦樹, 石田わか, 樗木俊聡, 寺井和都, 木下茂. マイナー抗原に対する INF- γ 非依存性の全層角膜移植拒絶反応の検討. 第 32 回角膜カンファレンス・第 24 回日本角膜移植学会, 2008. 2. 28, 千葉
 10. 山田潤, 羽室淳爾, 中西憲司, 安田好文, 樗木俊聡, 寺井和都, 木下茂. IL-12/IL-18 非依存性の全層角膜移植拒絶反応の検討. 第 37 回日本免疫学会, 2007. 11. 20, 東京
 11. 山田潤, 横井則彦, 羽室淳爾, 寺井和都, 木下茂. ドライアイにおける結膜上皮表層細胞のチオール酸化還元機能. 第 61 回臨床眼科学会, 2007. 10. 11, 京都
 12. 山田潤: 細胞内チオールレドックス状態の制御からみた眼加齢医学. 第 7 回抗加

齢医学会総会, 2007. 7. 21, 京都

6. 研究組織

(1) 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・
准教授

研究者番号: 8 0 3 5 1 3 5 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし