

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861655

研究課題名(和文) 涙液中サイトカインに基づいた角膜移植後の新しい治療指針

研究課題名(英文) New treatment guideline of the corneal transplant based on tear cytokine.

研究代表者

富田 大輔 (Tomida, Daisuke)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30615414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、角膜移植の分野でも病態にあわせたパーツ移植が施行されるようになり、移植後の治療方針に関しても、合併症のリスクなどを考慮し多様性が求められる。そこで、涙液中のサイトカインを測定して定量的に術後の炎症を把握し、病態の理解に務めた上で、最適な治療指針を作っていきたい。角膜内皮移植術後の涙液サイトカインを測定した結果、炎症による変化は手術眼のみではなく、両眼性で起こっていることがわかった。いくつかの炎症性サイトカイン・抗炎症性サイトカインの術眼は術後1ヶ月でピークを迎え、片眼は術後3ヶ月まで上がり続けるものもあった。今後、さらに長期的な経過や他の術式・疾患との比較検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Recently, not only “in part corneal transplantation” relevant to the pathophysiology of the underlying etiology but also the variability of the surgical procedures regarding the risks of complications relevant to the treatment policy is on demand. On that front, measurement and quantification of the postsurgical tear cytokines would help us in better understanding of the pathophysiological processes and in constructing the best treatment strategies. The results of our initial experiments measuring the tear cytokines after Descemet’s Stripping Automated Endothelial Keratoplasty, showed that changes of the tear cytokines occurred not only in the operated eye but also contralateral eye. Some pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines had a peak in 1 month in the operated eyes showing a gradual increase within 3 months in the contralateral eyes. Successive scientific analysis necessitates a longer follow-up and comparative studies of different etiologies and surgical methodologies.

研究分野：角膜移植

キーワード：角膜移植 涙液サイトカイン 移植免疫

1. 研究開始当初の背景

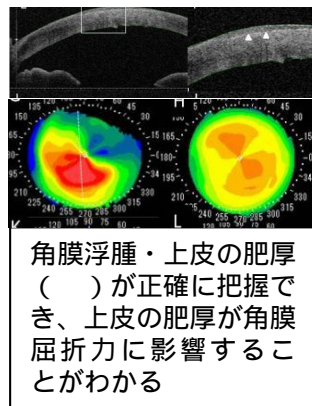
角膜移植は100年以上の歴史がある。その理由の一つに心臓や肝臓、腎臓などの全身他臓器の移植とは異なり、免疫抑制薬などの全身投与をしなくとも、拒絶反応のリスクは2~30%と高くはない。つまり、高度な免疫抑制を必要とせずとも、過半数の患者は良好な臨床経過を得ることができる。これには角膜自体が免疫寛容のある組織であるからであり、それに関与する因子に関して、VEGF-2、Regulatory T cell (Treg)、Fas-L、PD-L1などが報告されている。一方、興味深いことに角膜の拒絶反応に関わる因子として、臨床的に1) 涙液の低下、2) アトピーが知られている。近年の報告では涙液の低下は涙液サイトカインの上昇を誘導することが相次いでいるし、アトピーはアトピー性角結膜炎から恒常的に涙液サイトカインの上昇が知られている。本研究と通じて、角膜拒絶反応という移植免疫と眼表面サイトカイン~生体顕微鏡を通じて、新しい側面から病態解明につなげられることが期待される。そのための有益なアプローチとして、近年の眼科領域における大きな進歩を遂げている

1) 画像診断の進歩と、2) 精密なサイトカインの測定が挙げられる。

1) 画像診断においては、前眼部OCTの登場で角膜形状や浮腫・上皮の肥厚などが正確かつ、非侵襲的に検出できるようになった(右図)。2) また、前述のように涙液サイトカインを測定することで、様々な眼表面疾患の重症度との相関がある、という報告がされ始めてきた。

それに加え、角膜移植の分野においても、従来から施行されている全層角膜移植だけでなく、患者の疾患や病態にあわせて術式を選ぶ、パーツ移植の概念が浸透してきた。特に我が国では、欧米に比較してレーザー虹彩切開術による水疱性角膜症の患者が多く、このような患者に対して従来では全層角膜移植が施行されてきたが、近年では拒絶反応の少なさや術後の視力予後からも、角膜内皮移植術が施行されるようになってきた。

2. 研究の目的
角膜移植は他領域に比較して、拒絶反応は少ないが、それでも、移植後のドナー角膜の機能不全の最大の原因が拒絶反応であり、全体で見ると20~30%にも及び、さらに、術後長期に渡ってステロイドを使用することで、ステロイド続発性緑内障の合併や、角膜感染症などの危険性が正常人に比較して、高くなる。その結果、再移植を余儀なくされたり、あるいは、再移植の適応にならない事もある。その



角膜浮腫・上皮の肥厚()が正確に把握でき、上皮の肥厚が角膜屈折力に影響することがわかる

のため、角膜移植を施行するだけでなく、その後の効率的かつ、効果的な継続治療が必要となってくる。そこで、我々は近年、イメージングデバイスと、涙液中のサイトカインと関連性を見出し、その病態生理に適した治療を行う事で、新しい角膜移植術後の治療のスタンダードを確立できるよう本研究を進めていきたい。

3. 研究の方法

本研究における具体的な実験系を示すと、正常眼を含め、様々な疾患やそれに対する角膜移植術後の涙液中のサイトカインを測定する。前眼部OCTを用いて、形態学的な評価を行い、通常の細隙灯顕微鏡所見、フルオレセイン染色所見と、それら2つのデータをまとめて比較・検討する。

に関しては、様々な涙液採取の方法が報告されているが、本研究ではマイクロキャピラリーを用いて患者の涙液を回収する方法(右図参照)を用いて、採取後は



-80 で冷凍保存した。涙液サイトカインの解析には、Luminex法を用いて測定した。Luminex法の原理はELISAと同様で抗サイトカイン抗体を用いる方法で、涙液サイトカインの測定に近年多く用いられている。本研究では、インターロイキン(IL)-1, 1, -2~10, -17, TNF-, INF-, MCP-1を術前と術後1週間、1ヶ月、3ヶ月のタイミングで、両眼の涙液サイトカインを測定した。

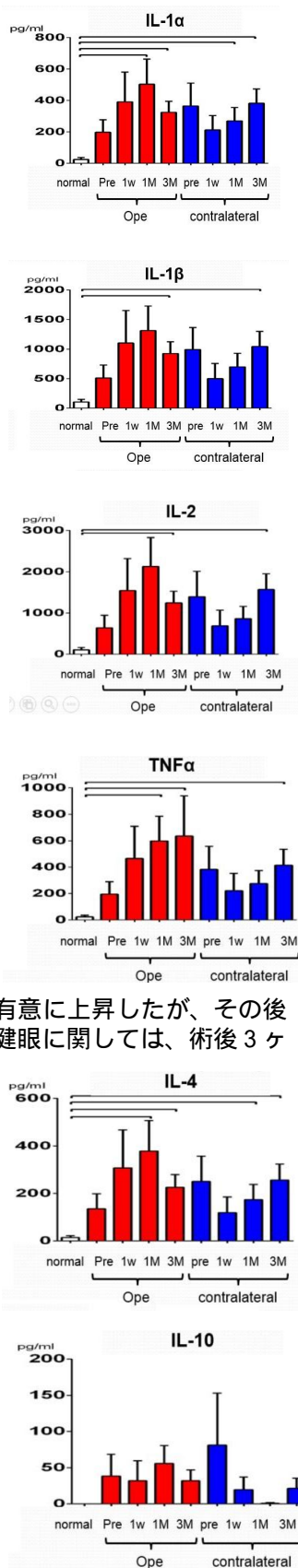
に関してはの検査と同じタイミングで、前眼部OCT CASIA (AS-OCT; SS-1000, CASIA: Tomey, Nagoya, Japan)を用いることで、非侵襲的に、瞬時に前眼部における角膜の厚みや上皮浮腫の状態を客観的に再現性をもって評価することができる。

4. 研究成果

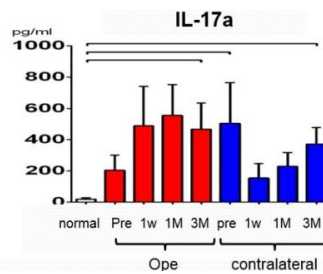
本研究に関しては、東京歯科大学市川総合病院にて倫理委員会の承認を得た上で、患者に説明し、同意を得た後に施行した。今回、18症例の水疱性角膜症の患者に、角膜内皮移植術を施行し、その結果を解析した。対象は平均年齢75.7±7.4歳であり、基礎疾患は、白内障術後が4症例、フックス角膜ジストロフィーが3症例、レーザー虹彩切開術後が5症例、水晶体偽落屑症候群が1症例、角膜内皮炎症後が1症例、その他原因不明が4症例であった。全例で透明治癒を得ることができ、術前矯正視力(LogMar 視力)は術前が1.25±0.12から、3ヶ月後には0.30±0.05と有意に改善した。またCASIAによる角膜厚の推移をみても、術前の角膜厚が738.7±22.34 μmであったのに対し、術後3ヶ月で625.1±20.58 μmと有意に厚みが軽減した。これらの視力や角膜厚、術後合併症などの術後成績に関しては、過去の報告と比較して、特に遜色のない良好な術後結果であった。また涙液

サイトカインにの測定結果では、炎症性サイトカインである IL-1、-1、-2、TNF- α に関しては、右図に示す。術眼に関しては、術後一ヶ月でピークを迎え有意に上昇しており、3ヶ月には低下していることがわかる。さらに、非常に興味深い事に、手術をしていない健眼に関しても、術後の炎症性サイトカインが上昇しており、術後3ヶ月までは徐々に上昇して、術後三ヶ月で有意に高かった。また抗炎症性サイトカインである IL-4、-10、-17a に関しても、炎症性サイトカインと同様の動態を示しており、術眼では術後1ヶ月でピークを認め IL-4、-17a は有意に上昇したが、その後減少した。一方で健眼に関しては、術後3ヶ月まで上昇し続けている。

さらに、術前より炎症性サイトカインが高い傾向にあり、これは水疱性角膜症と角膜上皮内にある角膜神経や樹状細胞への影響、角膜上皮障害による創傷治療の影響が考えられ、炎症性サイトカインと角膜上皮の関連性が示唆された。このように涙液サイトカインが増加する原因としては、移植による手術の侵襲や炎症と、移植片に対する免疫応答が考えられる。術眼における涙液サイトカインの動態を考えると、術後1ヶ月でピークを迎え、3ヶ月目には漸減しているという動態からは、術後の侵襲や炎症が手



術1ヶ月を経て落ち着いてくる、と考えられる。また両眼性にサイトカインの動態が変化する



ことに関しては、眼局所で感作され、リンパ節を経て活性化された T-cell が血行性に片眼を含む全身に波及する、というメカニズムが考えられる。

今後は術後の侵襲や免疫応答に関して、術式による涙液サイトカインの動態を比較検討したり、更に長期間の経過を確認したり、術後長期間安定している症例の涙液サイトカインを測定したりすることで、涙液サイトカインから考える安定した状態、というものを測定・解析する必要がある。そして、その上で基礎疾患や術式による涙液サイトカインの差異を比較検討する。その結果、術後の炎症の程度と、涙液サイトカインの解析に基づいた目標の安定状態に至るまでの期間や点眼薬の種類や回数などを比較・検討していくことで、症例や術式による最適な術後治療戦略を導けると信じている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第31回日本角膜移植学会、平成27年2月12日、高知
角膜内皮移植術後の涙液サイトカインの動態

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 大輔 (Tomida Daisuke)
東京歯科大学市川総合病院 眼科 助教
研究者番号：30615414

(2) 研究分担者

島崎 潤 (Shimazaki Jun)
東京歯科大学市川総合病院 眼科 教授
研究者番号：40170930

佐竹 良之 (Satake Yoshiyuki)
東京歯科大学市川総合病院 眼科 講師
研究者番号：60385143

山口 剛史 (Yamaguchi Takefumi)
東京歯科大学市川総合病院 眼科 講師
研究者番号：20383771