



Title	T cell-mediated immune responses in alloepithelial rejection after murine keratoepithelioplasty
Author(s)	宮崎, 大
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41857
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	宮崎 大
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 3 1 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	T cell-mediated immune responses in alloepithelial rejection after murine keratoepithelioplasty (マウス角膜上皮形成術モデルにおける角膜上皮型拒絶反応の T 細胞性免疫反応について)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田 野 保 雄 (副査) 教 授 不 二 門 尚 教 授 吉 川 邦 彦

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

同種型角膜移植は、一般にレシピエントの角膜に新生血管が浸潤していない限り、臨床上、拒絶反応の発生率はかなり低率である。しかし、慢性の ocular surface disorder である化学腐食や Stevens-Johnson syndrome などの疾患群においては、移植片透明維持率は極めて低く、治療のためには異なったアプローチを必要とする。それらの眼表面の再建のためには健康な角膜上皮細胞や角膜上皮の幹細胞を効率的に移植する必要があるが手術手技として角膜上皮形成術（以下 KEP）が行われている。KEP は短冊状のドナーの角膜上皮片をレシピエントの角膜輪部に沿って縫着する手技であり、これにより、角膜表面にドナー由来の上皮を移植することが可能であるが、上皮型拒絶反応に対し長期の免疫抑制剤の局所投与などが必要となる。現在のところ、KEP 後の拒絶反応は主として上皮を標的としており、角膜内皮が標的となる通常の角膜移植とは異なった免疫反応を生じていることが判明している。本研究は、KEP 後の拒絶反応に関与する T 細胞性免疫反応の関与をマウスの KEP モデルを用いて検討することを目的とした。

【方法ならびに成績】

レシピエントとして BALB/c (H-2^d)、ドナーとしては、MHC 及び minor histocompatibility loci とともに異なる C3H/He (H-2^k) を用いて KEP を施行した。具体的には、ドナーの角膜片より 1.0mm×2.5mm の lenticule を作成し、次に、角膜上皮を完全に除去したレシピエントの角膜周囲に 3 枚の lenticule を縫着した。拒絶反応は手術顕微鏡下にて観察し拒絶反応スコアにより評価した。KEP 後、移植片に対する遅延型過敏反応（以下 DTH）及び細胞傷害性反応（以下 CTL）を測定し、拒絶反応スコアとの関連を検討した。

移植抗原に対する DTH 反応は KEP 後 1 週にて認められ術後 2 週に最大となり、術後 4 週においても有意に認められた。拒絶反応に対する DTH の関与を検討するため、術後 2 週にて Spearman's correlation analysis を行った結果、DTH は拒絶反応スコアと有意な相関を示した。（相関係数 $r = 0.55$ ）。

次に移植抗原に対する CTL 反応を測定した結果、強い CTL 反応が術後 2 週にて惹起され、さらに 4 週においても認められた。同様の組み合わせで皮膚移植を行った結果 KEP 群は術後 2 週にて皮膚移植群より有意に高い CTL 活性を認めた。次に CTL における killer 活性をもつ subset を検討した。CD 4 あるいは CD 8 抗体により in vitro で T cell subset を除去した結果、KEP 後の CTL 活性は CD 4 subset ではなく、CD 8 subset に完全に mediate されていることが判明した。CTL における Natural Killer (NK) の関与を YAC-1 細胞を target として測定した結果弱い

NK 活性が術後 2 週にて認められたにすぎなかった。そこで CTL 活性が拒絶反応にいかに関与しているかを検討するため、Spearman's correlation analysis を行った。その結果、CTL 活性は、拒絶反応スコアと正の相関は認めず、むしろ逆に負の相関の傾向を認めた（相関係数 = -0.36, $p=0.076$ ）。

次に DTH 反応の拒絶反応に対する関与をさらに検討するため、ドナー抗原に対する ACAID を誘導させた後 KEP を施行した。その結果 ACAID 誘導により、DTH は KEP 後有意に抑制された。さらに拒絶反応も有意に抑制され、DTH 反応が拒絶反応に強く関与することが示唆された。

CD 8 陽性細胞の拒絶反応への関与をさらに検討するため、CD 8 抗体を継続的に腹腔内投与することにより、CD 8 陽性細胞を除去した状態で KEP を施行した。この状態では CTL 反応を全く認めなかったにもかかわらず、除去していないと同様、100% の拒絶反応率を認め、むしろ逆に拒絶反応スコアは術後 3 週では非除去群より高い傾向を認めた。（ $p=0.11$ ）。

拒絶反応後の角膜を免疫染色にて検討したところ、interferon γ 陽性細胞の浸潤を角膜上皮内に認めたものの、interleukin 4 陽性細胞の浸潤は認めず、拒絶反応が DTH 反応に mediate されていることがさらに示唆された。

【総括】

KEP 後の拒絶反応は、主として遅延型過敏反応に mediate されていると考えられ、CTL 反応は拒絶反応の進行を修飾する役割があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、眼科臨床上難治性の角結膜表面疾患に広く用いられている角膜上皮形成術または角膜上皮の幹細胞移植に関与する細胞性免疫をマウスモデルを用いて、解析したものである。それらの拒絶反応のメカニズムについては、拒絶反応の発症率が全層角膜移植とは異なり非常に高率であるにもかかわらず、ほとんど判明していない。本研究は、急性期の拒絶反応に寄与する遅延型過敏反応及び細胞障害性反応の抑制によるあらたな免疫抑制療法の可能性を検討している。今回の結果によれば、角膜上皮形成術後の拒絶反応は遅延型過敏反応に媒介されているが、むしろ細胞障害性反応は拒絶反応を抑制する方向に働いている。さらに CD 4 サブセット除去により、遅延型過敏反応の抑制とともに早期の拒絶反応の抑制を認めている。このことは、遅延型過敏反応を特異的に抑制することの可能な前房関連性免疫偏位の誘導によっても拒絶反応が抑制可能という今回の結果からもうらうちされている。サプレッサー T 細胞を生体外で誘導する試験管内での前房関連性免疫偏位を誘導させる系を用いれば、免疫抑制剤を使用することのない幹細胞移植後の長期マネジメントが臨床上可能かもしれない。以上より本研究はより有用かつ負担の少ない拒絶反応の抑制法の可能性を模索する上で不可欠な基礎的データを提供するものであり、学位に値すると思う。