The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【111】

氏　　名	宮　崎　　大（みやざき　だい）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15316　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り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。CD4あるいはCD8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CD4 subsetではなく、CD8 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。

CD8陽性細胞の拒絶反応への関与をさらに検討するため、CD8抗体を継続的に腹腔内投与することにより、CD8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CD4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ー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、学位に値すると考える。