OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Long-term survival in non-human primates of stem cell-derived, MHC-unmatched corneal epithelial cell sheets
Author(s)	吉永, 優
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91784
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	吉永　優
論文題名 Title	Long-term survival in non-human primates of stem cell-derived, MHC-unmatched corneal epithelial cell sheets （幹細胞由来、MHC不適合角膜上皮細胞シートの非ヒト霊長類における長期生着）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

角膜上皮幹細胞疲弊症（LSCD）に対して、従来よりアイバンクを利用した他家角膜輪部移植が実施されているが、拒絶反応、およびドナー不足の問題がある。この問題を解決する方法として自己角膜輪部上皮細胞シート（上皮シート）移植が実用化されたが、両眼性疾患には不適応となる。その後、両眼性疾患に対しては自己口腔粘膜上皮シート移植が実用化されたが、角膜内に新生血管が生じるという問題がある。これらの問題を解決する新規治療法として、iPS細胞から作製した角膜上皮シート移植の臨床応用に我々は取り組んできた。自己のiPS細胞を使用すれば拒絶反応を回避できるが、製造期間が長く、膨大な費用がかかる。一方、他家のiPS細胞を使用すれば製造期間を短くし、費用を抑えることができる。他家移植にはHLA適合移植と不適合移植があり、HLA不適合移植であれば適応は限定されないが、拒絶反応が課題となる。そのため多くの臓器移植はHLAを適合させて実施されるが、拒絶反応が少ない角膜移植は、HLAを適合させずに実施される。しかし、角膜上皮シート移植ではHLA適合による効果については明らかになっていない。そこで本研究では、角膜上皮シート移植におけるMHC適合、不適合に起因する免疫反応の差を検討することを目的に、in vitroの試験としてリンパ球混合試験(MLR)を、in vivoの試験としてカニクイザルへの角膜上皮シート移植を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

MLRとして、iPS細胞由来角膜上皮シートと、この角膜上皮シートに対してHLA適合、もしくはHLA不適合の末梢血単核球細胞を7日間共培養し、培養上清中のIFN-γ、および培養細胞のCD8-Ki67共陽性細胞数を計測した。その結果、HLA適合、不適合ともにIFN-γ、およびCD8-Ki67共陽性細胞割合の著明な上昇を認めなかった。この結果から、角膜上皮シートに対する免疫反応はHLA適合・不適合ともに、ほとんどないと考えられた。カニクイザルを用いた検討では、作製したLSCDモデルに対しHLA適合および不適合で角膜上皮シート移植を実施し、移植後3カ月、または6カ月で組織学的解析を行った。免疫反応の差異を明瞭にするため、周術期のみステロイドの全身投与を行い、周術期以降は実臨床と異なり、局所ステロイドを含めて免疫抑制を行わなかった。その結果、MHC適合移植（3頭）では拒絶反応を生じなかった。MHC不適合移植（4頭）では、術後免疫抑制を行わなかったにも関わらず、拒絶反応を生じたのは1頭のみであった。拒絶反応を生じなかったMHC不適合移植の免疫反応は、MHC適合移植と比較して、移植後3カ月では同程度であり、移植後6カ月ではやや強かった。加えて、臨床を想定し、MHC不適合移植(1頭）を実施し、術後に局所ステロイドの継続投与を行った。結果、当該個体における術後6カ月での免疫反応は、MHC不適合移植よりも弱く、MHC適合移植と同程度であった。以上より、角膜上皮シート移植ではMHC適合、不適合移植の免疫反応の差は小さいこと、そしてMHC不適合移植でも免疫反応は弱く、局所ステロイド投与によりMHC適合移植と同程度に制御可能である可能性が示された。これらのin vitro, in vivoの結果から、角膜上皮シート自体が免疫抑制作用のある分子を発現している可能性が考えられた。この事を検証するため、ヒトiPS細胞、および体細胞由来角膜上皮シートのRNA-sequencingを行った。その結果、前眼部の細胞表面に発現する免疫抑制分子の中で、rIFN-γ添加により、いずれの角膜上皮シートにおいてもPD-L1の発現が上昇する事を見出した。また、Flow cytometryによる解析では、rIFN-γ添加により、両者で同程度PD-L1の発現が増加した。免疫染色でも両者でrIFN-γ添加によりPD-L1の発現を全層に認めた。これらの結果から、PD-L1は炎症状態時にHLA不適合角膜上皮シートに対する免疫反応の抑制に関与している分子の一つであると考えられた。

〔総　括(Conclusion)〕

角膜上皮シート移植におけるMHC適合、不適合に起因する免疫反応の差は小さく、MHC不適合移植における免疫反応は継続的な局所ステロイド投与により制御できる可能性が示された。本研究により、他家iPS細胞から作製した角膜上皮による再生医療をはじめ、他家角膜上皮シート移植におけるHLA適合の影響について重要な基礎データが得られた。今後は、PD-L1発現を含めた角膜上皮シートの免疫学的特性のさらなる研究により、角膜上皮シート移植における免疫反応機序の解明が期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　吉永　優

論文審査担当者	（職）	氏　名	
主　査	大阪大学教授	西田幸二	署　名
副　査	大阪大学教授	熊ノ郷淳	署　名
副　査	大阪大学教授	宮川繁	署　名

論文審査の結果の要旨

角膜上皮幹細胞疲弊症の新規治療法として、他家iPS細胞から作製した角膜上皮細胞シート（上皮シート）移植の臨床応用に筆者らは取り組んできた。他家移植において、HLA不適合移植であれば適応は限定されないが、拒絶反応が問題となる。しかし、角膜上皮シート移植におけるHLA適合による効果については明らかになっていない。本研究では、リンパ球混合試験を実施し、角膜上皮シートに対する末梢血単核球細胞の免疫反応はHLA適合・不適合ともにほとんど認めない、という結果を得た。またカニクイザルへの角膜上皮シート移植では、MHC不適合移植でも免疫反応は弱く、局所ステロイド投与によりMHC適合移植と同程度に制御可能である可能性が示された。さらには炎症状態の角膜上皮シートに発現する免疫抑制分子の一つとして、PD-L1を同定した。著者らの研究により、他家iPS細胞から作製した角膜上皮による再生医療をはじめ、他家角膜上皮シート移植におけるHLA適合の影響について重要な基礎データが得られたことから、本研究の業績は学位に値するものと認める。