

論文の内容の要旨

角膜移植後拒絶反応の新しい抑制法 ：動物実験モデルにおける検討

加賀谷 文絵

緒言 角膜移植は臓器移植の中で最も広く行われており、その透明治癒率、つまり成功率は65%と最も高い。その理由として角膜が無血管組織であること、前房という免疫学的に特殊な環境にあるためと考えられているが、しかし約30%は拒絶反応を起し移植片不良の原因となっている。現在臨床ではステロイドの局所及び全身投与を行ってその予防・治療を行っているが、局所投与での効果不十分、全身投与での副作用が問題となることがあり、これらを解決した治療法が望ましい。これまでにT細胞と抗原提示細胞との第二のシグナルである *costimulatory* シグナルをブロックする抗原特異的な免疫抑制が、移植後の拒絶反応抑制に有効であることが報告されている。代表的な *costimulatory* 分子として CD28/CD152-CD80/CD86 分子が知られており、他の臓器移植モデルや自己免疫疾患モデルでその効果が報告されているが、角膜移植ではまだ報告がない。本研究において、マウス異系角膜移植（アログラフト）モデルを用いその効果について検討した。一方新しく開発されたステロイド徐放剤である *Dexamethasone drug delivery system*(DEX DDS)は、デキサメサゾン 60 μg を含有するポリマーである。米国において白内障術後に患者に対する臨床治験が行われ、その有効性と安全性が確認されているものであるが、角膜移植術後ではまだ検討されていない。本研究で異種移植（ゼノグラフト）モデルを用いてその効果を検討した。

方法 用いた実験動物は、Balb/c マウス、C3H/He マウス、Lewis ラットのいずれも 6 - 8 週の雄で、すべての動物は ARVO の規定に基づいて扱われた。角膜移植は、マウス-マウスの異系移植ではドナー及びレシピエントを直径 2 mm、マウス-ラットの異種移植では直径 2.5 mm とし、11-0 ナイロン糸で 8 針単結紮した。アログラフトモデルでは 8-0 シルク糸で眼瞼縫合し、術後 2 日目に眼瞼抜糸、術後 8 日目に角膜抜糸した。2 週目より手術用顕微鏡下で移植片を観察し、角膜実質の混濁により虹彩血管の観察が困難となった時点を拒絶反応と判定した。ゼノグラフトモデルでは眼瞼縫合を行わず、翌日より毎日観察し、角膜抜糸は 10 日目に行った。経過観察中虹彩脱出、白内障、感染等の合併症を生じたものは対象外とした。

1) モノクローナル抗体 目的とする抗体を産生する細胞から得られたハイブリドーマをヌードマウスに腹腔内注射し、得られた腹水を精製し抗 CD80 抗体(anti-rat IgG; RM80)及び抗 CD86 抗体(anti-rat IgG; po.3)を得た。これをアログラフトモデルのレシピエントマウスに腹腔内投与した。

抗体投与スケジュール

- ① 非投与群 (n=10)
- ② 抗 CD80 抗体 0.1 mg, day=0,2,4,6,8 投与群(n=6)
- ③ 抗 CD86 抗体 0.1 mg, day=0,2,4,6,8 投与群(n=6)
- ④ 抗 CD80/CD86 抗体 各 0.1 mg, day=0,2,4,6,8(n=6)
- ⑤ 抗 CD80/CD86 抗体 各 0.1 mg, day=0,2,4,6, ..., 20(n=6)
- ⑥ 抗 CD86 抗体 0.25 mg, day=0,2,4,6,8 投与群(n=6)
- ⑦ 抗 CD80 抗体 0.25 mg, day=0,2,4,6,8 投与群(n=6)
- ⑧ 抗 CD80/CD86 抗体 各 0.25 mg, day=0,2,4,6,8(n=8)

移植片の生着率を、Kaplan-Meier の生存曲線、Mantel-Cox log rank test にて比較検討し、抗体投与の量及び期間の異なる各群内比較を、Fisher's protected least significant difference (PLSD)にて行った。移植後 2 週目の時点で、抗体投与群の生着例と非投与群の拒絶例それぞれ移植片の病理組織と、角膜局所、眼の所属リンパ節である頸部リンパ節、脾臓における CD80 および CD86 分子の免疫染色及びフローサイトメトリーによるリンパ球表面抗原の検出を行った。

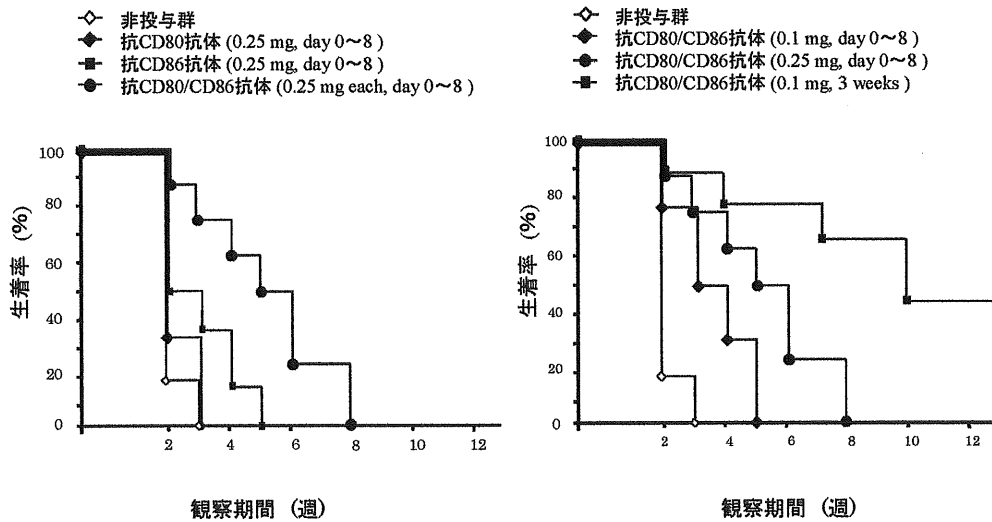
2) ステロイド徐放剤 マウス-ラットへの角膜移植の際に、DEX DDS を前房内に挿入し宿主角膜下、虹彩の前に留置した(DEX DDS 群)。コントロールとして、0.1%ベタメサゾン点眼群、無治療群の 3 群間で比較、その生着率を Kaplan-Meier の生存曲線にて検討した。4 週目の時点で、各群の眼球を摘出し、病理組織を検討した。

結果

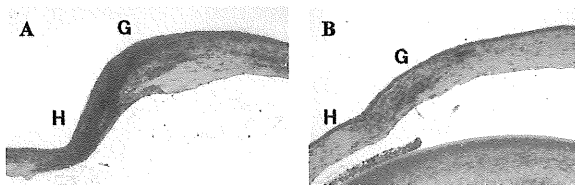
1) アログラフトモデルにおける抗 CD80/CD86 抗体の効果

Kaplan-Meier の生存曲線を示す。左;抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体の単独投与群(各 0.25 mg、day0 - 8) と併用投与群、無治療群の 4 群間において各群間に有意差を認めた

(Mantel-Cox 群間比較、 $p < 0.001$)。抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体 0.25 mg 単独投与では無治療群に比べ生着率に有意差を認めなかったが ($p = 0.0037$, $p = 0.0003$)、各抗体併用で有意に生着が延長した ($p < 0.0001$)。右; 抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体を併用した群間の比較。day 0 - 8 まで各 0.1 mg 投与した群、各 0.25 mg 投与した群及び術後 3 週間各 0.1 mg 投与した群と、無治療群の 4 群間に有意差を認めた (Mantel-Cox 群間比較、 $p < 0.001$)。各抗体を 0.1 mg 3 週間投与した群が、各 0.1 mg、8 日間投与より ($p = 0.0002$)、さらに先の各 0.25 mg、8 日間投与より ($p = 0.0129$) 生着延長に効果的であった。



病理



無治療

抗CD80/CD86抗体投与

アログラフトH-E

H; host
G; graft

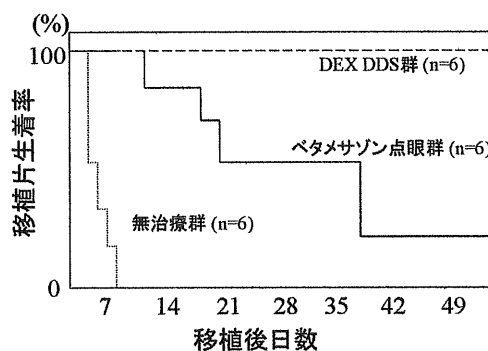
抗体非投与群の拒絶されたマウスの角膜は、そのホストグラフト接合部を中心に強い浮腫と著明な単核球浸潤が認められたが (A)、抗 CD80/CD86 抗体投与群の移植片が透明生着したマウスでは浮腫、細胞浸潤ともに抑えられていた (B)。

免疫染色 ナイーブマウスの角膜には CD80 及び CD86 の発現は認められなかったが、無治療群の拒絶されたマウスでは発現を認め (CD86 > CD80) た。リンパ節では、ナイーブマウスにわずかに CD86 の発現し、抗体非投与群では著明な CD86 とわずかな

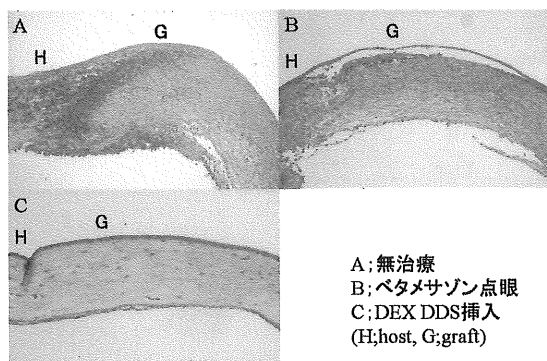
CD80 陽性細胞が胚中心に発現していた。脾臓でナイーブマウスにおいて皮質領域に CD86 の発現を認め、抗体非投与群ではマージナルゾーンに明瞭に CD86 陽性細胞が集簇していたが CD80 はほとんど見られなかった。いずれも抗体投与群(抗 CD80/CD86 抗体、各 0.25 mg、day=0 - 8)では CD80 及び CD86 の発現は減少していた。以上のリンパ節と脾臓の免疫染色の結果は、フローサイトメトリーによるリンパ球表面抗原の検出にても同様の発現と抗体投与による抑制が確認された。

2) ゼノグラフトモデルにおける DEX DDS の効果

Kaplan-Meier の生存曲線を示す。無治療群では全例 8 日以内に、点眼群では一眼を除いて 38 日目までに拒絶された。DEX DDS 群では全例、8 週以上にわたり透明性が維持された(log rank test $p < 0.001$)。



病理



無治療群の拒絶されたグラフトは著明に浮腫状で単核球を中心とした多量の細胞浸潤が認められた(A)。0.1%ベタメサゾン点眼群でも似たような所見が得られた(B)。DEX DDS 群では実質の浮腫も細胞浸潤も極わずかであった(C)。

まとめ 角膜移植後拒絶反応の新しい抑制法として、T 細胞 - 抗原提示細胞間の costimulatory シグナルである CD80/CD86 をブロックすることにより移植片生着率が延長し、拒絶反応抑制の可能性が示唆された。また拒絶反応の起こっているレシピエントにおいてこれらの分子の移植片局所、リンパ節、脾臓における発現を確認した。角膜移植における拒絶反応のメカニズムの解明へのステップとなり、全身的な副作用の少ない新しい治療法となるよう今後更に研究が進んでいくことが望まれる。もう一つの方法として新しく開発されたステロイド徐放剤を用い、異種移植における拒絶反応の抑制に有効であることを証明した。局所における効率の良いドラッグデリバリーシステムが近い将来臨床の場で応用可能となる事が期待される。