

## 第 111 回 日本眼科学会総会 宿題報告 II

## 眼の感染と免疫

拒絶反応のない理想的な角膜移植手術を目指して  
—全層角膜移植から内皮細胞移植へ—

山上 聡

東京大学大学院医学系研究科角膜組織再生医療寄附講座(アルプラスト株式会社)

## 共同研究者

新家 眞, 天野 史郎, 臼井 智彦, 三村 達哉(東京大学大学院医学系研究科眼科・視覚矯正科)

横尾 誠一, 青山 佳世, 大沢 稔也(東京大学大学院医学系研究科角膜組織再生医療寄附講座)

上羽 悟史, 松島 綱治(東京大学大学院医学系研究科分子予防医学)

林 孝彦, 田中 香純, 水木 信久(横浜市立大学医学部眼科)

海老原伸行, 村上 晶(順天堂大学医学部眼科)

諸星 計, 宮崎 大, 井上 幸次(鳥取大学医学部眼科学)

Hamrah P, Liu Y, Dana MR(Harvard Medical School)

中野 英樹(東邦大学医学部免疫学)

羽藤 晋, 山田 昌和(東京医療センター眼科)

羽室 淳爾(慶應義塾大学医学部微生物学免疫学)

山田 潤(明治鍼灸大学眼科)

後藤 晋(後藤眼科医院)

## 研究協力者

小杉 正明, 鈴木 洋(HOYA 株式会社)

北川 全(アルプラスト株式会社)

## 要 約

角膜移植術後に拒絶反応を回避することは、良好な手術結果を得るために最も重要なことである。そこで術後に拒絶反応のない角膜移植手術を目指した検討結果を、ヒト角膜に関する知見も含めて報告する。マウス全層角膜移植モデルにおける拒絶反応発生メカニズムから白血球の移動に注目し、拒絶反応発生に機能的に関与するCCR1 および CCR7 という2つのケモカインレセプターを見出した。これらは全層角膜移植後拒絶反応抑制法につながる可能性のある新しいターゲットである。正常ヒト角膜には樹状細胞、単球系細胞などの骨髄由来の白血球が構造的に存在し、これらが直接ホストのT細胞に提示されることにより抗原の直接認識にかかわる可

能性が示唆された。水疱性角膜症のホスト角膜に培養アロ角膜内皮を移植するモデルをマウスで確立した。経過観察期間中に拒絶反応は発生せず、その理由として免疫抑制や不応答ではなく、抗原の存在が認識されない免疫無視によるものと考えられた。このことは培養アロ角膜内皮移植術を臨床の場で実現すること自体が拒絶反応のない理想的な角膜移植手術により近づくことを意味すると考えられた。(日眼会誌 112:266—278, 2008)

キーワード：角膜移植, 拒絶反応, ケモカイン, 骨髄由来細胞, 培養アロ角膜内皮細胞移植

別刷請求先：113-8655 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大学院医学系研究科角膜組織再生医療寄附講座 山上 聡  
(平成19年11月15日受付, 平成19年12月21日改訂受理)

Reprint requests to: Satoru Yamagami, M. D., Ph. D. Department of Corneal Tissue Regeneration, Tokyo University Graduate School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan.

(Received November 15, 2007 and accepted in revised form December 21, 2007)

---

## A Review

---

# Treatment Strategy for Rejection-free Corneal Transplantation —Transition from Full-thickness Corneal Transplantation to Corneal Endothelium Transplantation—

Satoru Yamagami

*Department of Corneal Tissue Regeneration, Tokyo University Graduate School of Medicine*

### Abstract

The avoidance of allograft rejection is the most critical factor for favorable surgical outcome after corneal transplantation. We report experimental data including distribution of white blood cells in human corneas for rejection-free corneal transplantation. We focused on leukocyte trafficking based on the immunological mechanism leading to allograft rejection in a mouse full-thickness corneal transplantation model.

We identified two chemokine-receptors, CCR1 and CCR7 which are functionally relevant to the occurrence of allograft rejection. These chemokine receptors can be new targets for the suppression of allograft rejection after full-thickness corneal transplantation. In the human corneas, bone marrow-derived dendritic cells and monocyte-lineage cells reside constitutively in the normal epithelium and stroma, and may be associated with direct recognition of allo-antigen after corneal transplantation. We

established a mouse model in which cultured allo-corneal endothelium was transplanted onto a bullous keratopathy recipient cornea. During the follow-up period, the transplanted cultured allo-corneal endothelium did not show any sign of allograft rejection.

Our findings demonstrated that a rejection-free mechanism is due not to suppression of immunity or to lack of response, but to failure to recognize the existence of resistance. Realization of the clinical application of cultured allo-corneal endothelium transplantation may be a shortcut to ideal rejection-free corneal transplantation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 266—278, 2008)

**Key words :** Corneal transplantation, Allograft rejection, Chemokine, Bone marrow-derived cells, Cultured allo-corneal endothelium transplantation

---

## I 緒 言

全層角膜移植手術は約 100 年の歴史をもつ組織移植で<sup>1)</sup>、他の臓器、組織移植に比べ最も多く行われている移植手術である。米国で年間 45,000 件、我が国においても 2,000 件以上施行されている。米国における移植用ドナー角膜は、概ね充足しているが、それ以外の世界中の国々では深刻なドナー角膜供給不足の状態にある。移植した角膜が手術後に混濁する原因としては、術後の拒絶反応の発生による内皮細胞数の減少が最も多い<sup>2)</sup>。したがって、移植角膜の透明性を維持するためには拒絶反応の発生を予防することが最も重要な術後管理となる。全層角膜移植後の拒絶反応発生機序の解明は主としてマウスモデルを用いて検討されてきている<sup>3)~5)</sup>。その結果として正常マウス角膜に免疫担当細胞が常に存在していること、これらの細胞が角膜移植後の免疫反応にも関与している可能性などが報告されている<sup>6)~8)</sup>。しかし、ヒト角膜に関しては免疫担当細胞の存在を体系的に示す報告はなく、角膜由来の免疫担当細胞が角膜移植後拒絶反

応にかかわる可能性があるのかについても未知である。また、研究の進んでいるマウスにおいても移植後の拒絶反応抑制の決め手になる治療法は開発されていない。

全層角膜移植手術は混濁した角膜を治療する切り札として今後も広く行われる術式であることは間違いないが、臨床の間では内皮細胞数減少眼に対する全層角膜移植手術に代わる術式として、深層角膜移植手術が行われるようになってきている<sup>9)~12)</sup>。この術式は内皮細胞だけが障害されている角膜に対して全層角膜移植手術を行うことで生じる術後の屈折異常の問題を大きく改善するため注目されている。しかし、乱視の大幅な軽減はなされるものの術後の矯正視力は必ずしも十分ではなく、また一眼に一つの角膜を使用するためドナー角膜の供給不足を補うものではない。これに対し実験的には、培養ヒト角膜内皮細胞を家兎の水疱性角膜症の治療などに用いる方法が報告されている<sup>13)~18)</sup>。この培養ヒト角膜内皮細胞移植は、世界中のドナー角膜不足を一気に解決する可能性をもつもので、近い将来実用化するものと考えられる。しかし、角膜内皮細胞だけを移植するという新しい

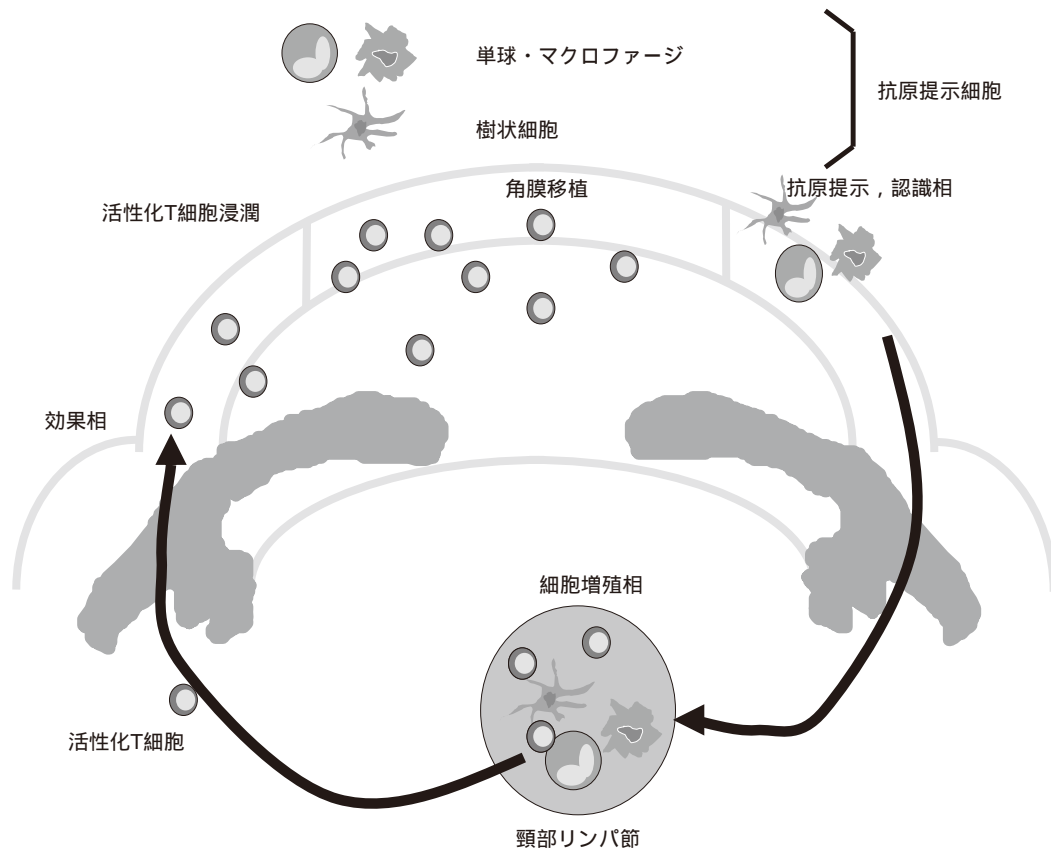


図 1 拒絶反応の発生プロセス。

- ① 抗原提示能をもった細胞が抗原情報を頸部リンパ節に運び抗原の提示, 認識が行われる抗原提示・認識相, ② 抗原特異的な T 細胞の増殖活性化が起きる細胞増殖相, ③ 活性化した T 細胞が角膜局所に浸潤して拒絶反応に導く効果相, に分けて考えることができる。

手術に伴う免疫反応についてはこれまで検討されていない。

このような状況を背景に, マウス全層角膜移植後の拒絶反応抑制法, ヒト角膜に存在する免疫担当細胞の存在と角膜移植後免疫反応にかかわる可能性, およびマウス培養アロ角膜内皮細胞移植の免疫反応の特徴について検討した。

## II マウス全層角膜移植後の拒絶反応抑制法

### 1. 拒絶反応の発生プロセス

拒絶反応の発生プロセスは, 抗原提示・認識相, 細胞増殖相, 効果相という 3 つの相に大きく分けられる (図 1)。抗原提示・認識相は, 樹状細胞などの抗原提示能をもつ細胞が, 移植された角膜のもつ外来抗原をホストの T 細胞に提示し, 認識を促す過程である。抗原提示を受けて活性化した成熟樹状細胞は遊走能を獲得し, リンパ管を経てリンパ節に到達する。したがってこの反応は, 一般に各所属リンパ節で行われると考えられている。細胞増殖相は, 体に入った抗原にだけ反応する細胞を増やす過程である。つまり抗原の提示を受けた T 細胞は, 2 番目のステップとして, Interleukin (IL)-2 や Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) といういわゆるヘルパー T

(Th)細胞の出す Th1 サイトカインを分泌しながら, 角膜移植では主として頸部リンパ節で, T 細胞自身のみならず他の T 細胞も活性化し, 移植されたアロ抗原特異的な T 細胞が増殖すると考えられる。効果相とは, ヒトの角膜移植後の拒絶反応が起き, 角膜浮腫, 豚脂様角膜後面沈着物, 前房内細胞浸潤が起きている状態を意味する。つまり移植された角膜抗原に特異的な T 細胞は, 移植片局所に移動し, 拒絶反応を引き起こすと考えられる。このとき角膜や前房水でも拒絶反応において重要な役割を果たしているのは, Th 細胞の中の Th1 と呼ばれる細胞群であり, 未分化な Th0 から IL-12 や IFN- $\gamma$  の誘導により分化し, IL-2 や IFN- $\gamma$  などのサイトカインを分泌し, 移植された角膜を拒絶に導くと考えられる<sup>19)20)</sup>。これらの反応には, 角膜や前房内局所の細胞移動, 角膜とリンパ節間の細胞移動, さらに全身の細胞移動が必須であると考えられるため, 我々は一連の細胞移動にかかわる因子としてケモカインに着目した。

### 2. ケモカイン

ケモカインは, 種々の原因によって引き起こされる炎症反応において, 局所臓器への特異的白血球浸潤を惹起する主要決定因子である<sup>21)</sup>。そもそも白血球の浸潤なくして炎症反応は起きないことから, このケモカインの重

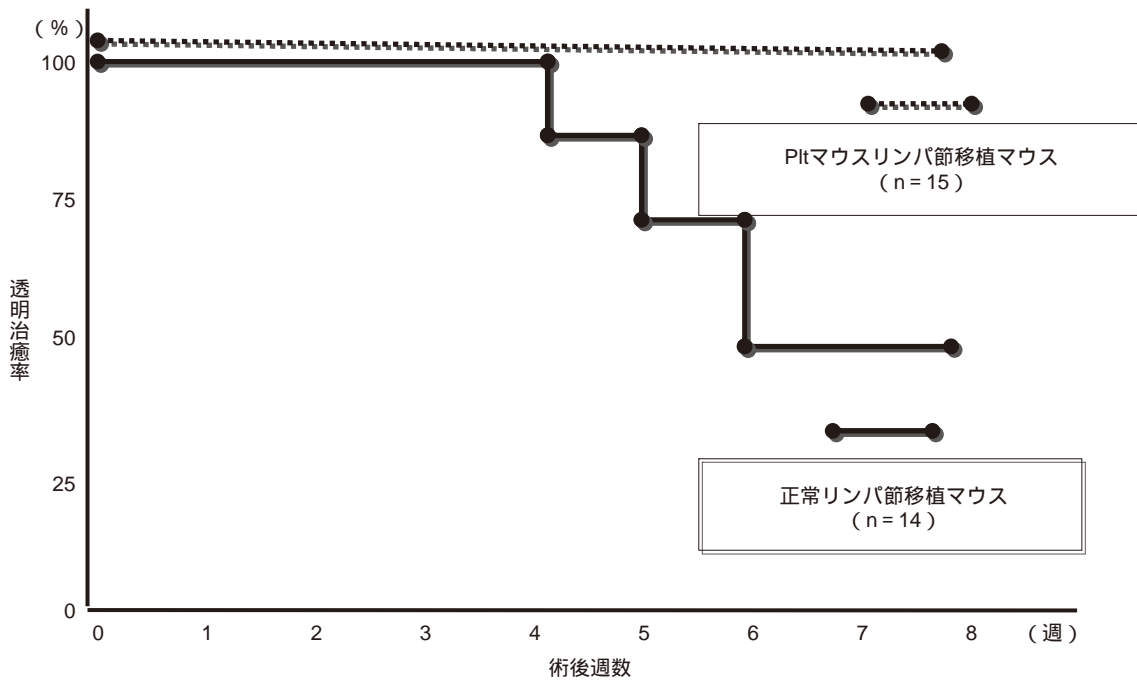


図 2 頸部リンパ節再建マウスの角膜移植後透明治癒率.

正常頸部リンパ節移植マウスを宿主としたマウスでは、通常の BALB/c マウスと同様に 50% の C57BL/6 マウスの角膜を拒絶したが、CCL21, CCL19 機能不全の Plt マウスのリンパ節移植マウスでは、拒絶反応は起きなかった。

要性は容易に理解できる。またケモカインの白血球遊走特異性が、各白血球表面上のケモカイン受容体発現レベルで決定されていることも明らかにされてきており、多くの免疫現象との密接なかかわりが検討されてきている。一方、治療という観点からは、特異的白血球浸潤を抑制する安全な方法を提供できれば、従来の薬剤とは異なる方法で多くの疾患治療が可能になると考えられる。

### 3. 角膜移植後の抗原提示・認識相とケモカイン

正常リンパ節には CCL21/secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) や CCL19/EBI1 ligand chemokine (ELC) というケモカインが発現しており、成熟樹状細胞やナイーブ T 細胞が発現する CCR7 というレセプターをもった細胞に対する遊走因子である<sup>22)23)</sup>。そこでこのケモカイン、ケモカインレセプターの関係が角膜移植後の抗原提示、認識相に関与しているとの仮説を立てた。過去に我々は、マウスから予め頸部リンパ節を切除するとマウス全層角膜移植モデルでは全く拒絶反応が起らなくなることを、そのマウスと同種同系マウスのリンパ節を切除直後に移植しておく、そのマウスは正常に拒絶反応を起こすことを報告した<sup>24)25)</sup>。また、Plt/plt マウス (BALB/c バックグラウンド) は CCL21/SLC や CCL19/ELC の機能不全マウスでリンパ節のホーミングや樹状細胞の局在の異常をもつマウスであることが知られていた<sup>26)</sup>。そこでこのリンパ節移植モデルに全身の CCL21/SLC や CCL19/ELC の機能不全 Plt/plt マウスのリンパ節を移植した後、全層角膜移植術を行った。結果として

対照として行った群での 50% の拒絶反応発生率に対して、CCL21/SLC や CCL19/ELC の機能不全 Plt/plt マウスのリンパ節を移植した群では拒絶反応が発生しなかった (図 2)。このことは頸部リンパ節の CCL21/SLC や CCL19/ELC が拒絶反応発生に重要な役割を果たしていることを意味していた。

次に治療応用を目的として抗体によるブロッキングを行った。まず結膜下注射による抗体投与が頸部リンパ節への CCR7 陽性細胞の流入をブロックできるか否かの検討を行うために、全層角膜移植後 0, 1, 3, 5 日目に抗 CCL21/SLC + CCL19/ELC 抗体 4  $\mu$ g または対照 IgG 4  $\mu$ g をマウスの結膜下に注射し、移植後 6 日目に頸部リンパ節での CCR7 mRNA の発現量および CCR7 陽性成熟樹状細胞 (CD11C<sup>+</sup> MHC クラス II<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> 細胞) 数をフローサイトメーターにて比較した。図 3A, B に示すように抗体の結膜下注射により、CCR7 mRNA の発現量および CCR7 陽性成熟樹状細胞数は有意に減少していた (図 3)。そこで移植後 0, 1, 3, 7, 10, 14 日目に抗体を結膜下注射により投与し臨床経過を比較した。術後 8 週目に対照抗体投与群で 40% (n=15) であった拒絶反応非発生率は、抗 CCL21 + CCL19 抗体投与群で 83% (n=18) に有意に上昇した。これらの結果は、CCL21/SLC や CCL19/ELC が角膜移植後拒絶反応発生に重要な役割を果たしており、新たな治療のターゲットとなる可能性があることを示している。さらに、ブロッキング抗体の結膜下注射で頸部リンパ節の CCR7 陽性

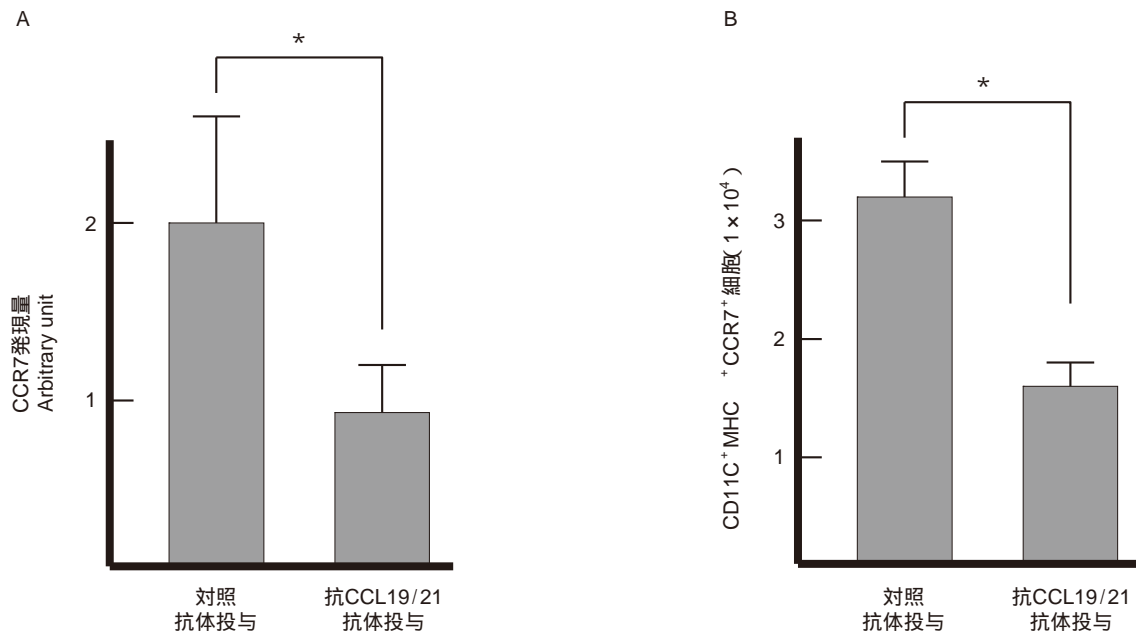


図3 頸部リンパ節のCCR7 mRNA 発現量とCCR7陽性成熟樹状細胞数。

全層角膜移植後に抗CCL21+CCL19抗体投与群、対照抗体投与群での頸部リンパ節のCCR7 mRNA 発現量とCCR7陽性成熟樹状細胞数を比較した。A：半定量的polymerase chain reaction(PCR)法で比較した。頸部リンパ節におけるCCR7 mRNA 発現量は、抗CCL21+CCL19抗体投与群で対照抗体投与群に比し有意に減少した。B：フローサイトメーターによりCCR7陽性成熟樹状細胞(CD11c<sup>+</sup>MHCクラスII<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>細胞)数を比較した。頸部リンパ節におけるCCR7陽性成熟樹状細胞数は、抗CCL21+CCL19抗体投与群で対照抗体投与群に比し有意に減少した。\*：p<0.01。

細胞数を減少させ、拒絶反応を抑制できたという事実は、結膜下注射という投与方法が頸部リンパ節に対する薬剤投与方法として治療効果をもつということも意味している。頸部リンパ節の切除で角膜移植後の拒絶反応が全く起きないことから明らかに<sup>19)20)</sup>、所属リンパ節である頸部リンパ節が拒絶に導く中心的な役割を果たしていることは間違いない。これまで一般に結膜下注射という投与方法は眼局所の薬剤濃度を上げるために用いられているが、所属リンパ節に対する薬剤投与方法としても有用であると考えられた。

#### 4. 角膜移植後の効果相とケモカイン

次に拒絶反応発生の効果相、すなわち拒絶反応発生時に着目した検討を行った。まず効果相において重要なケモカインレセプターを決定するため、以下の4群の眼球で発現量の多いケモカインレセプターを決定した。ホストはC57BL/6、グラフトはBALB/cを用いて、手術眼は同種異系移植群で約半数が拒絶される術後3.5週目に摘出した。

- ① 正常マウス眼
- ② 同種同系角膜移植後マウス眼
- ③ 同種異系角膜移植後の移植片生着眼
- ④ 同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼

結果として図4に示すように同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼においてのみ、CCR1 mRNA、CCR2 mRNA およびCCR5 mRNA が過剰発現していた<sup>27)</sup>。そこで機

能的に重要なケモカインレセプターを決定するためにCCR1、CCR2およびCCR5ノックアウトマウスをホストとする全層角膜移植術を行った。結果としてCCR1ノックアウトマウスをホストとした全層角膜移植の生着率は、60%(n=10)で対照の20%(n=10)に比し有意に高かった<sup>27)</sup>。このCCR1ノックアウトマウスでは対照マウスに比べて、CD3陽性T細胞の浸潤が少なく(術後12日目)、角膜におけるTh1サイトカイン(IL-2、IFN- $\gamma$ )のmRNA発現レベルが低かった。角膜移植後の細胞性免疫反応では、細胞障害性T細胞反応より遅延型過敏反応が重要であるため<sup>28)</sup>遅延型過敏反応を検討したところ低値を示した<sup>27)</sup>。以上のことからCCR1というケモカインレセプターは、全層角膜移植後拒絶反応発生に機能的にかかわることが明らかとなった。

次に治療応用が可能かどうかを検討するためにCCR1アンタゴニスト(A4B7、Novartis社)の経口投与(30mg/kg 術後毎日1日2回投与)を行って移植角膜の生着率を検討した(ホスト：C57BL/6マウス、グラフト：BALB/cマウス)。基剤投与群で17%(n=6)であった生着率が、CCR1アンタゴニスト投与によって52%(n=27)と有意に高い生着率であった(未発表データ)。この結果からCCR1が全層角膜移植術後拒絶反応抑制の治療のターゲットとなりうるものと考えられた。本研究は効果相に発現するケモカインレセプターから重要な因子の絞り込みを行ったものであるが、CCR1陽性樹状細胞

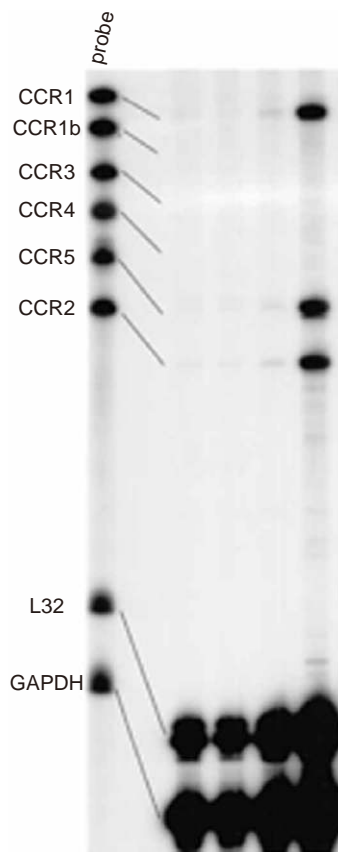


図 4 Ribonuclease protection assay (RPA) 法によるケモカインレセプターのスクリーニング。

大きさの異なる複数のプローブを用いることで 1 サンプル中の複数の mRNA の定量を行う方法。同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼で、CCR1 mRNA、CCR2 mRNA および CCR5 mRNA が過剰発現している。

- ① 正常マウス眼、② 同種同系角膜移植後マウス眼、③ 同種異系角膜移植後の移植片生着眼、④ 同種異系角膜移植後の移植片拒絶眼

は角膜移植後早期から発現しており<sup>27)</sup>、CCR1 のリガンドの RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP) 1a も術後早期から発現していることから<sup>29)</sup>、CCR1 というレセプターは効果相のみならず抗原提示、認識相にも関与しながら拒絶反応発生にかかわっているものと考えられる。

### Ⅲ ヒト角膜に存在する免疫担当細胞の存在と角膜移植後免疫反応にかかわる可能性

#### 1. ヒト角膜に存在する免疫担当細胞

マウスに関しては角膜移植モデルを用いた検討から上述のような機序が明らかになってきているが、ヒトの角膜においてはそもそも抗原提示能をもった細胞が正常の角膜に存在するのか、最近進歩した各種細胞マーカーを用いて系統立った研究は報告されていない。もちろんマウスモデルでのような機能解析をヒトで行うことはできないが、ヒトの角膜に存在している抗原提示能をもつ細胞をまず明らかにすることでマウスモデルでの現象がヒ

トにも当てはまる可能性があるか否かが明らかになる。そこでまず各種の白血球マーカーを用いて角膜に存在する白血球の同定、分類を試みた。結果としてヒト角膜上皮層には、3つのフェノタイプからなる未熟樹状細胞が<sup>30)</sup>、角膜実質層には、樹状細胞、マクロファージを含めた単球系細胞が<sup>31)</sup>、結膜下にはマクロファージ系細胞を中心とした細胞<sup>32)</sup>が構造的に分布していた。

#### 2. ヒト角膜実質免疫担当細胞の分布メカニズム

無血管の正常角膜実質における白血球がどのようにして分布するのかは明らかでない。しかし分化した白血球が角膜で自己複製することは考えにくく、周辺部の血管から遊走してくることに疑問の余地はないと考えられた。そこで角膜実質細胞と上皮細胞が何らかのケモカインを発現し、特異的ケモカインレセプターをもつ白血球を角膜の中央部まで集めているとの仮説を立てた。まずヒト角膜実質細胞と単球系細胞を分離してそれぞれの細胞を検討するため、米国アイバンクの研究用角膜実質から磁気ビーズによる細胞の分離を行った。方法は、角膜実質を一晩コラゲナーゼ処理して細胞成分を採取した。磁気ビーズ付き抗 CD45 抗体を反応させ、ヒト角膜実質細胞と白血球を分離した。次にヒト角膜実質単球系細胞のケモカインレセプター mRNA の発現を検討するため、multiplex polymerase chain reaction (PCR) システムを用いて多数のケモカインレセプターの中から発現しているケモカインレセプターを検討したところ、ヒト角膜実質単球系細胞は CCR2 mRNA と CCR7 mRNA を発現していることが明らかになった<sup>33)</sup>。またこれらの細胞は、免疫細胞化学的に抗 CCR2 抗体陽性であったことから、CCR2 が角膜実質中の細胞分布を決定する候補因子と考えられた。CCR2 は CCL2 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) ケモカインのレセプターであるので、今度は角膜実質・上皮細胞が、CCR2 の走化性因子の CCL2 (MCP-1) を発現するかどうかを検討した。結果としてヒト角膜実質細胞、ヒト角膜上皮細胞は、CCL2 (MCP-1) mRNA を発現し、フローサイトメーターでも角膜実質・角膜上皮細胞が CCL2 (MCP-1) 蛋白質を発現していることが明らかとなった<sup>33)</sup>。

そこで角膜由来の細胞がもつケモカイン・ケモカインレセプターが実際に機能しているかを明らかにするため、ボイデン・チャンバーによる走化性の検討を行った。CCL2 (MCP-1) に対するヒト角膜実質の CD45 (汎白血球マーカー) 陽性細胞の走化性を検討したところ、ヒト角膜実質の CD45 陽性細胞は有意に CCL2 (MCP-1) に対して走化性を示した (図 5A)。次にヒト角膜実質細胞の培養上清に対するヒト角膜実質の単球系細胞の走化性を同じくボイデン・チャンバーによって検討した。ヒト角膜実質細胞培養上清に対して有意に高い走化性を示したヒト角膜実質の単球系細胞は、抗 CCL2 (MCP-1) 抗体を加えたヒト角膜実質細胞培養上清に対しては走化性が

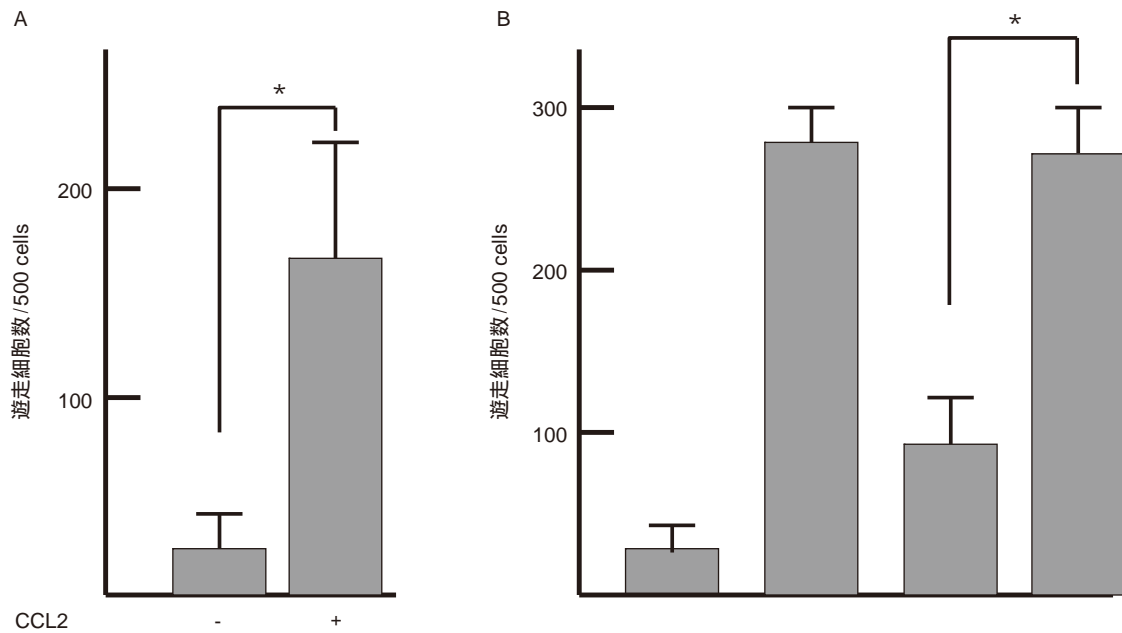


図 5 ボイデン・チャンバーによる走化性の検討.

ボイデン・チャンバーは、ケモカインなどの走化性因子がどの程度の細胞を移動させるかをみることで走化性を定量的に評価する方法。A：ヒト角膜実質由来 CD45(汎白血球マーカー)陽性細胞の CCL2(MCP-1)に対する走化性。CCL2(MCP-1)は、CCL2(MCP-1)を反応させない場合に比べて有意にヒト角膜実質由来 CD45 陽性細胞を遊走させた。B：ヒト角膜実質細胞の培養上清に対するヒト角膜実質由来 CD45 陽性細胞の走化性。以下の4つの溶液の走化性を検討した。① Mediumのみ、② ヒト角膜実質細胞培養上清、③ ヒト角膜実質細胞培養上清+抗 CCL2 抗体、④ ヒト角膜実質細胞培養上清+対照抗体。ヒト角膜実質細胞培養上清に対して有意に高い走化性を示したヒト角膜実質由来 CD45 陽性細胞は、抗 CCL2(MCP-1)抗体を加えたヒト角膜実質細胞培養上清に対しては走化性が低下している。\*： $p < 0.01$ 。

低下し、対照 IgG を加えたヒト角膜実質細胞培養上清に対しては、ヒト角膜実質細胞培養上清と同程度の走化性を示した(図 5B)。以上の機能解析から、単球系細胞がヒト角膜実質中に分布するメカニズムに CCL2—CCR2 が関与している可能性が考えられた。

### 3. ヒト角膜の免疫担当細胞による直接認識の可能性

抗原認識パターンには2つある。それは移植片中のドナー由来の組織適合抗原 (major histocompatibility, MHC) 分子を直接 T 細胞レセプターが認識する「直接認識」とレシピエント抗原提示細胞によって処理された抗原ペプチドがレシピエント MHC によって提示され、T 細胞レセプターに認識される「間接認識」の2つである。通常の臓器移植では臓器自体に MHC 陽性細胞が多数存在しているため直接認識が中心とされているが、角膜移植では角膜自体に MHC 陽性の細胞がほとんど存在しないとされていたこともあり間接認識が中心であろうと考えられていた<sup>34)</sup>。しかし、マウス角膜の中央部でも抗原提示能をもつ細胞が存在することが報告された<sup>6)~8)</sup>。そのため角膜に存在する MHC 分子をもった細胞を直接 T 細胞が認識する「直接認識」によるパターンもありうるのではないかと考えられるようになってきた。実際にマウス角膜移植後には頸部リンパ節でドナー角膜由来の MHC クラス II 陽性の樹状細胞が検出され、抗原の直接

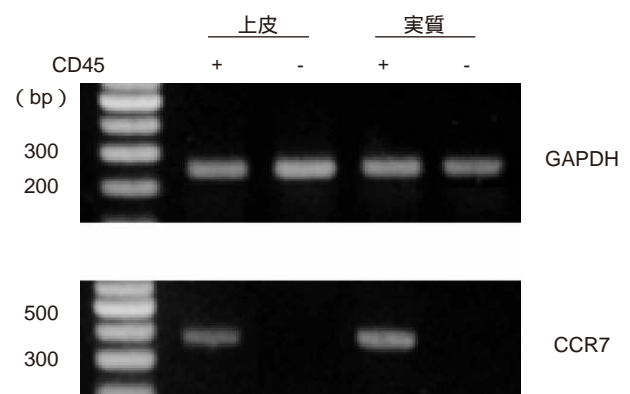


図 6 ヒト角膜上皮、実質由来 CD45 陽性細胞の CCR7 mRNA の発現.

CD45 陽性磁気ビーズで分離した白血球と各組織由来細胞の CCR7 mRNA の発現を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により検討した。すべてのサンプルで house keeping gene の GAPDH は検出された。ヒト角膜上皮、実質ともに CD45 陽性磁気ビーズで分離した白血球に CCR7 mRNA を発現している。

認識も実際に起こっていることが示された<sup>35)</sup>。角膜移植においてこのようなグラフトからホストに至る白血球の動態が直接証明されたことはこれまでになく興味深い。

そこでマウスで示された抗原の直接認識がヒトの角膜移植後にも起きる可能性があるのか否かを検討した。ヒトではもちろんマウスのような機能解析は不可能であるため、角膜上皮、実質に存在する抗原提示細胞がリンパ節に存在する CCL21/SLC や CCL19/ELC に対して遊走能をもつ、すなわち CCR7 を発現するのか、また上皮に存在する未熟樹状細胞が成熟樹状細胞化するかどうかを調べることで、ドナー角膜由来の細胞がホストのリンパ節に到達し抗原提示にかかわるのか否かを検討した。図 6 に示すようにヒト角膜から CD45 陽性磁気ビーズで分離した角膜上皮、実質由来の白血球は、CCR7 mRNA を発現していた。また同じく分離した角膜上皮の未熟樹状細胞では、活性型表面マーカーの CD40, CD86 は陰性であった。これを Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (20 ng/ml) およびリポ・ポリサッカライド (LPS, 100 ng/ml) で 3 日間培養刺激したところ CD40, CD86 陽性の成熟樹状細胞に変化した<sup>30)</sup>。これらはまだ証拠として十分ではないが、ヒトの角膜においても角膜由来の抗原提示細胞が抗原の直接認識にかかわる可能性があることを示すものと考えられた。

#### IV マウス培養アロ角膜内皮細胞移植の免疫反応の特徴

##### 1. 角膜内皮細胞移植

水疱性角膜症という角膜内皮細胞のみの障害に対してこれまで全層角膜移植が行われていた。これに対し最近、臨床、研究の分野で内皮細胞のみを移植しようという試みがなされてきている。臨床的には、角膜内皮に加えてごく薄い実質をドナー角膜より除去して同様に内皮細胞と実質を除去した水疱性角膜症眼に移植する方法、Descemet 膜のみを除去した角膜に移植する方法が行われている<sup>12)</sup>。研究の分野では、ヒト角膜内皮細胞の前駆細胞を注射で前房内へ入れてうつ伏せ姿勢を維持することで内皮面に貼り付ける方法、培養ヒト内皮細胞単独のシートを作製し、全層打ち抜いた角膜内皮に貼り付ける方法、薄いコラーゲンを Descemet 膜の代わりとしてその上に培養ヒト角膜内皮細胞を播種し、シートを作製する方法<sup>13)~18)</sup>などが報告され、臨床応用目前と考えられる。しかしながら内皮細胞のみを移植するという術式は新しいもので、これまでアロ抗原をもつ内皮細胞のみを移植した場合の免疫反応に関する知見は明らかになっていなかった。そこでマウスの角膜内皮細胞のセルラインをマウス角膜の裏面に接着させ移植するモデルを作製し、マウスの全層移植モデルとの免疫反応の差を明らかにする検討を行った<sup>36)</sup>。

##### 2. マウス培養アロ角膜内皮細胞移植モデルの作製と拒絶反応発生率

まず 0.05% 塩化ベンザルコニウムを前房内へ注入し、ホストの角膜内皮細胞を除去することでホスト角膜が水

表 1 拒絶反応発生率(術後 6 週目)

群	眼数	拒絶反応発生率(%)
同系全層	14	0
同系内皮除去	13	0
アロ全層	19	74
培養アロ内皮	15	0
シャム手術	14	79

同系内皮除去群の 7 週目に移植片の浮腫改善例がみられたため、術後経過観察期間を 6 週間とした。培養アロ内皮群では 3 眼で透明性の維持できない眼があったが、組織学的に細胞浸潤を認めなかったため内皮細胞数減少による角膜浮腫とした。

疱性角膜症となる病態モデルをはじめて作製した。これは従来の正常マウス角膜に移植するモデルとは異なり、今回はじめて我々が行った臨床の水疱性角膜症に近いマウス角膜移植モデルである。次に不死化した培養マウス角膜内皮細胞(C3H マウス由来)を Pkh 染色し、内皮細胞を除去した BALB/c マウス角膜の Descemet 膜上に播種、遠心後、2 日間培養し、再構築角膜とした。これにより内皮細胞だけが C3H で実質と上皮が BALB/c マウス由来の角膜が作製できた。ホストはすべて水疱性角膜症の BALB/c マウス、グラフトは C3H マウス、BALB/c マウスおよびこれらのキメラ角膜を用いた。グラフトとして以下の 5 つを用いて全層角膜移植を行った

- ① ホストと同種同系の BALB/c マウス角膜を移植した同系全層群
- ② BALB/c マウスの角膜内皮除去角膜を移植した同系内皮除去群
- ③ ホストと同種異系の C3H マウス角膜を用いたアロ全層群
- ④ BALB/c マウスの角膜実質と上皮に培養 C3H 角膜内皮細胞を付着させ移植した培養アロ内皮群
- ⑤ C3H マウスの角膜実質と上皮に培養 C3H 角膜内皮細胞を付着させ移植したシャム手術群

拒絶反応発生の定義は、角膜実質の混濁のため虹彩血管の透見困難な状態としたが、角膜浮腫のみで実質混濁を伴わないものは、組織学的に単核球の浸潤を認めた場合に拒絶反応発生とした。浸潤を認めない場合は内皮細胞数減少による角膜浮腫として拒絶反応には含めなかった。5 群の拒絶反応発生率を表 1 に示す。マウスの角膜内皮細胞は除去しても再増殖を起こすため、まず同系内皮除去群において何週間の経過で角膜浮腫が消失するかを検討した。その結果、術後 6 週までは全例で浮腫が持続したが、7 週日以降で角膜浮腫の回復する角膜が存在したため、本モデルでの臨床経過の観察期間を 6 週間と定めた。経過観察期間中、同系全層群ではすべて透明性



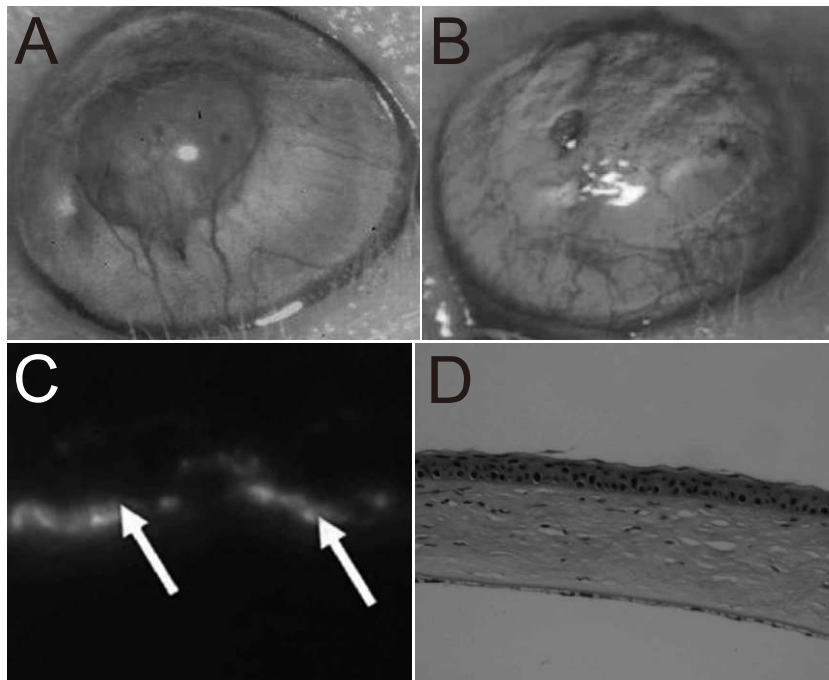


図 7 前眼部写真および組織所見(術後4週目).

A: アロ全層群の前眼部写真. 移植角膜は浮腫により盛り上がって見え, 前房内が透見困難となっている. B: 培養アロ内皮群の前眼部写真. 角膜浮腫はなく透明性を維持している. C: 培養アロ内皮群の内皮面の組織所見. 角膜内皮は Pkh 染色で赤く染色されている(矢印). D: 培養アロ内皮群のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色所見. グラフト内に浸潤細胞はほとんどみられず, 拒絶反応は発生していないと考えられる.

を維持した. アロ全層群とシャム手術群はほぼ同様に拒絶反応を起こしていたが, 培養アロ内皮群では拒絶反応が起きなかった. 代表的なアロ全層群と培養アロ内皮群の前眼部写真と培養アロ内皮群の組織所見を示す(図7). これらの群について術後4週目に遅延型過敏反応を検討し, さらに各群のマウスの脾臓を摘出し, C3Hの脾細胞に対する混合リンパ球培養試験を行ったところ, 培養アロ内皮群では角膜の臨床経過によく一致し, どちらも陽性所見を示さない結果となった. 以上のように, 培養アロ角膜内皮細胞移植では *in vivo*, *in vitro* ともに全層角膜移植とは異なり, 拒絶反応発生を示す所見は全く認められなかった.

### 3. 培養アロ角膜内皮細胞移植後の拒絶反応非発生メカニズム

一般にアログラフトに対して拒絶反応が起きない主な理由として以下の3つの可能性が考えられる. それらは, アロ抗原に対し特異的な抑制をかける免疫抑制(suppression), アロ抗原を認識しているが反応を起こさない不応答(nergy), アロ抗原を認識していない免疫無視(ignorance)である. そこで培養アロ角膜内皮細胞移植後の拒絶反応非発生メカニズムの検討を行った.

#### 1) 養子移入法による制御性 T 細胞(免疫抑制能をもつ T 細胞)産生の検討

培養アロ角膜内皮細胞移植後8週目および正常マウス

の脾細胞由来の単一細胞を正常 BALB/c マウスの静脈に注射した( $5 \times 10^7$ 個/匹). これらのマウスに C3H マウス角膜の全層移植を行い, 両群の術後拒絶反応発生率を比較した. 培養アロ角膜内皮細胞移植後に制御性 T 細胞(免疫抑制能をもつ T 細胞)が産生されていれば養子移入マウスで拒絶反応発生率が低下するはずだからである. 結果として培養アロ角膜内皮細胞移植後の脾細胞養子移入マウスで拒絶反応発生率は対照に比べて低下せず, 制御性(免疫抑制性)T 細胞は産生されていない, すなわち培養アロ角膜内皮細胞移植により免疫抑制は起きていないものと考えられた. この結果は免疫抑制がかかることされる全層角膜移植後長期生着眼における結果<sup>37)</sup>とは異なっていた. また前房内に上皮を剥離した角膜を入れると前房関連免疫偏位(anterior chamber-associated immune deviation, ACAID)により免疫抑制がかかることの報告<sup>38)</sup>を踏まえて培養アロ内皮細胞移植後に ACAID の誘導を検討したが, 本モデルでは ACAID は誘導されていなかった.

#### 2) アロ抗原感作後の培養アロ角膜内皮細胞移植

予めアロ(C3Hの脾細胞)抗原感作( $1 \times 10^7$ 個/匹の細胞を皮下に注射)を行った BALB/c マウスに培養アロ角膜内皮細胞移植術を行い, 正常 BALB/c マウスに培養アロ角膜内皮細胞移植術を行った群と拒絶反応非発生率を検討した. 結果として角膜内皮細胞に反応する T 細胞

が予め存在しても拒絶反応は発生しないことから、培養アロ角膜内皮細胞は移植されていてもその存在を宿主角膜が認識していない免疫無視の可能性が高いと考えられた。しかし、まだアロ抗原感作後の内皮細胞移植によって不応答が得られた可能性も完全には否定できなかったため、さらに術後 8 週目に遅延型過敏反応の有無を検討したところ、移植されたアロ角膜内皮細胞は拒絶されていないにもかかわらず遅延型過敏反応は検出された。すなわち間違いなく抗原の認識された状態で細胞性免疫反応が検出されたことから、本モデルにおいて不応答は誘導されていないことが明らかとなった。

以上の結果より培養アロ角膜内皮細胞を移植して拒絶反応が発生しない理由は、免疫抑制や不応答によるのではなく、アロ抗原を認識しない免疫無視によっていると考えられた。角膜内皮は前房水に面した角膜裏面という特異な解剖学的な位置に存在している。この位置では Descemet 膜を白血球が通過できない可能性が高いことを考慮すると抗原認識可能な経路は前房水だけとなるため、ホストに認識される確率が極端に下がる可能性がまず考えられる。また Fas をもつ浸潤細胞にアポトーシスを起こす FasL (CD95 L)<sup>39)40)</sup> や T 細胞の活性化を抑制する B7-H1 (PD-L1)<sup>41)</sup> を角膜内皮細胞がもつという細胞自体の特殊性も、培養アロ角膜内皮細胞移植において免疫無視という特殊な状態を起こしている原因ではないかと考えられる。

## V まとめ

マウス全層角膜移植モデルにおける拒絶反応発生メカニズムから白血球の移動に注目し、拒絶反応発生に機能的に関与する CCR1 および CCR7 という 2 つのケモカインレセプターを見出した。これらは全層角膜移植後拒絶反応抑制法につながる可能性のある新しいターゲットとして臨床応用が期待される。さらに結膜下注射という投与方法が単に眼局所の薬剤濃度を上げるだけでなく、所属リンパ節に対するドラッグデリバリー法ともなっているということも付け加えておきたい。次に 2 つめのテーマとして取り上げた正常ヒト角膜に存在している樹状細胞、単球系細胞をはじめとする白血球の存在は重要である。今回述べた拒絶反応発生にかかわりうること以外に、外来抗原のパターン認識レセプター、toll-like receptor を発現し<sup>31)</sup>、無血管の角膜において細菌防御の first line として重要な役割を果たしていると考えられる。細隙灯顕微鏡での前眼部観察という日常診療においても意識しておきたい事実である。最後に取り上げた培養アロ角膜内皮移植の免疫反応については、抗原の存在自体が認識されない免疫無視により拒絶反応が起きにくいことを報告した。角膜内皮細胞は角膜の透明性を維持する最も重要な細胞であり、また角膜移植を必要とする原因疾患も角膜内皮細胞数減少が最も多い。角膜内皮細胞は、Descemet 膜と前房水に挟まれる解剖学的位置関係やこの細胞のもつ免疫学的な性質から得られる全身の組織の中でも類まれな細胞である。この特異な細胞の免疫特権を最大限に利用するためにも、培養アロ角膜内皮移植術を臨床の場で実現すること自体が今回の報告のテーマである「拒絶反応のない理想的な角膜移植手術」により近づくことになるものと私は考えている。

## 文 献

- 1) **Zirm EK** : Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg* 5 : 258—261, 1989.
- 2) **Yamagami S, Suzuki Y, Tsuru T** : Risk factors for graft failure in penetrating keratoplasty. *Acta Ophthalmol Scand* 74 : 584—588, 1996.
- 3) **Streilein JW** : Immunobiology and immunopathology of corneal transplantation. *Chem Immunol* 73 : 186—206, 1999.
- 4) **Niederhorn JY** : The immune privilege of corneal grafts. *J Leukoc Biol* 74 : 167—171, 2003.
- 5) **Hori J, Niederhorn JY** : Immunogenicity and immune privilege of corneal allografts. *Chem Immunol Allergy* 92 : 290—299, 2007.
- 6) **Brisette-Storkus CS, Reynolds SM, Lepisto AJ, Hendricks RL** : Identification of a novel macrophage population in the normal mouse corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2264—2271, 2002.
- 7) **Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Dana MR** : Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 639—646, 2002.
- 8) **Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR** : The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 581—589, 2003.
- 9) **Melles GR, Eggink FA, Lander F, Pels E, Rietveld FJ, Beekhuis WH** : A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 17 : 618—626, 1998.
- 10) **Melles GR, Lander F, van Dooren BT, Pels E, Beekhuis WH** : Preliminary clinical results of posterior lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incision. *Ophthalmology* 107 : 1850—1856, 2000.
- 11) **Terry MA, Ousley PJ** : Rapid visual rehabilitation after endothelial transplants with deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK). *Cornea* 23 : 143—153, 2004.
- 12) **Gorovoy MS** : Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 25 : 886—889, 2006.
- 13) **Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al** : Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial

- cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 800—806, 2004.
- 14) **Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al** : Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2992—2997, 2004.
  - 15) **Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, Shinozaki N, Taguchi T, Kobayashi H, et al** : Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br J Ophthalmol* 89 : 134—137, 2005.
  - 16) **Mimura T, Yamagami S, Usui T, Ishii Y, Ono K, Yokoo S, et al** : Long-term outcome of iron-endocytosed cultured corneal endothelial cells transplantation with magnetic attraction. *Exp Eye Res* 80 : 149—157, 2005.
  - 17) **Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, et al** : Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3128—3135, 2005.
  - 18) **Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, et al** : Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3637—3644, 2005.
  - 19) **Yamagami S, Kawashima H, Endo H, Tsuru T, Shibui H, Kagawa Y, et al** : Cytokine profiles of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. *Transplantation* 66 : 1504—1510, 1998.
  - 20) **Sano Y, Osawa H, Sotozono C, Kinoshita S** : Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 1953—1957, 1998.
  - 21) **Luster AD** : The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14 : 129—135, 2002.
  - 22) **Yoshida R, Nagira M, Kitaura M, Imagawa N, Imai T, Yoshie O** : Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* 273 : 7118—7122, 1998.
  - 23) **Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST** : Cutting edge : secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162 : 2472—2475, 1999.
  - 24) **Yamagami S, Dana MR** : The critical role of lymph nodes in corneal alloimmunization and graft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1293—1298, 2001.
  - 25) **Yamagami S, Dana MR, Tsuru T** : Draining lymph nodes play an essential role in alloimmunity generated in response to high-risk corneal transplantation. *Cornea* 21 : 405—409, 2002.
  - 26) **Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, et al** : Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189 : 451—60, 1999.
  - 27) **Hamrah P, Yamagami S, Liu Y, Zhang Q, Vora SS, Lu B, et al** : Deletion of the chemokine receptor CCR1 prolongs corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1228—1236, 2007.
  - 28) **Yamada J, Ksander BR, Streilein JW** : Cytotoxic T cells play no essential role in acute rejection of orthotopic corneal allografts in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 386—392, 2001.
  - 29) **Yamagami S, Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Huq S, Dana MR** : Early ocular chemokine gene expression and leukocyte infiltration after high-risk corneal transplantation. *Mol Vis* 11 : 632—640, 2005.
  - 30) **Yamagami S, Yokoo S, Yamagami H, Amano S, Ebihara N** : Distinct population of dendritic cells in normal human donor corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 4489—4494, 2005.
  - 31) **Yamagami S, Ebihara N, Usui T, Yokoo S, Amano S** : Bone marrow-derived cells in normal human corneal stroma. *Arch Ophthalmol* 124 : 62—69, 2006.
  - 32) **Yamagami S, Yokoo S, Amano S, Ebihara N** : Characterization of bone marrow derived cells in the substantia propria of the human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 4476—4481, 2007.
  - 33) **Ebihara N, Yamagami S, Yokoo S, Amano S, Murakami A** : Involvement of CCL2-CCR2 interaction in monocyte-lineage cell recruitment of normal human corneal stroma. *J Immunol* 178 : 3288—3292, 2007.
  - 34) **Sano Y, Ksander BR, Streilein JW** : Langerhans cells, orthotopic corneal allografts, and direct and indirect pathways of T-cell allorecognition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1422—1431, 2000.
  - 35) **Liu Y, Hamrah P, Zhang Q, Taylor AW, Dana MR** : Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts. *J Exp Med* 195 : 259—268, 2002.
  - 36) **Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, et al** : A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. *Cornea* 2007 (in press).
  - 37) **Yamada J, Hamuro J, Sano Y, Maruyama K, Kinoshita S** : Allogeneic corneal tolerance in rodents with long-term graft survival. *Transplantation* 79 : 1362—1369, 2005.
  - 38) **Yamada J, Streilein JW** : Induction of anterior chamber-associated immune deviation by corneal allografts placed in the anterior chamber. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2833—2843, 1997.

- 39) **Yamagami S, Kawashima H, Tsuru T, Yamagami H, Kayagaki N, Yagita H**, et al : Role of Fas-Fas ligand interactions in the immunorejection of allogeneic mouse corneal transplants. *Transplantation* 64 : 1107—1111, 1997.
- 40) **Hori J, Joyce NC, Streilein JW** : Immune privilege and immunogenicity reside among different layers of the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3032—3042, 2000.
- 41) **Hori J, Wang M, Miyashita M, Tanemoto K, Takahashi H, Takemori T**, et al : B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J Immunol* 177 : 5928—5935, 2006.
-

### Comment : 西田 輝夫

角膜移植に関する法体制が整備され、ほぼ現在と同じような角膜移植が我が国でも行われるようになって丁度 50 年が経過した。今日では、一つの確立した視機能回復手術として角膜移植が行われており、その術後成績もある程度満足できるところに到達してきている。しかしながら、提供角膜の絶対的な不足という社会的な問題に加え、拒絶反応や眼圧管理など、よりよい術後成績のためにまだまだ解決せねばならない医学的問題が山積している。幸い角膜の移植に関しては、心臓や肝臓など他の臓器の移植に比し拒絶反応の発生頻度は比較的少なく、またほとんどの例で副腎皮質ステロイドによりある程度抑制できるものの、今回の宿題報告で山上 聡氏がその演題名に掲げられているように「拒絶反応のない理想的な角膜移植手術」は、我々の夢でもある。いくつかの方策が考えられるが、一つは全く人工的な角膜の開発であり、もう一つは拒絶反応の免疫学的な機序を明らかにして術後に特異的な免疫反応の抑制をかけることである。また、現在急速に開発されているように、全層の角膜を移植するのではなく必要な角膜の部分のみを移植することも、拒絶反応の頻度を下げること役立つと考えられる。

山上氏は、マウス全層角膜移植モデルを用いてエレガントな方法で、拒絶反応には所属リンパ節で発現されるケモカインである CCL21 と CCL19 が関与していることを明らかにし、さらに角膜実質中の関与するケモカイン受容体が CCR1 および CCR7 であることを示された。このように移植された角膜実質中の細胞を中心に、ホストの所属リンパ節に至る白血球の動態およびその移動に関与するケモカイン系を明確にすることにより、今後角膜移植後の拒絶反応の抑制という治療法を開発する際の分子標的を示された。

今まで角膜実質の主たる構成細胞である線維芽細胞に加え、樹状細胞や単球系細胞などの生理的な機能はあまり明確にされていなかったが、今回の報告で、所属リンパ節での抗原認識のみならず、角膜内で直接抗原が提示され認識される可能性を示された。

一方、パーツ移植の一つの例として角膜内皮移植の動物モデルを確立され、きわめて興味深いことに、培養アロ角膜内皮移植では拒絶反応が生じないことを示された。内皮移植では、その解剖学的な特性から異種抗原を認識しない免疫無視であると考えておられる。角膜は皮膚とその発生を同じにする組織であるが、透明性の獲得と交換にさまざまな生体防護反応を失っていると考えられる。今回示されたこともきわめて興味ある現象であり、今後より深くその機序を解明されていくことを期待する。

山上氏は、角膜を中心とする前眼部における免疫反応を中心に、細胞のレベル、サイトカインのレベルあるいは今回のようにケモカインのレベルで、今まで多くの業績を積み重ねてきておられる。今回、宿題報告で提示された知見をもとに今後さらに理想の角膜移植手術を目指して研究を深めていかれ、いつの日か我々が実際の臨床の場で拒絶反応を克服して角膜移植を行う日が来ることを心より希望する。