

199. ニューロペプチドによる角膜移植片の生存期間の延長

山口 剛史

Key words : 角膜移植, 角膜内皮細胞, VIP

東京歯科大学 眼科学教室

緒 言

角膜疾患は世界的に失明の主要な原因であり, 角膜混濁など角膜重症疾患の根本的な治療は角膜移植となる. 眼には免疫寛容があり角膜移植は他の臓器移植と比較すると急性拒絶反応が少なく 90%以上が透明治癒するため予後はよいと考えられている¹⁾が, 10 年生存率は 50%程度で決して長期予後は良好ではない²⁾. その理由に, ①角膜内皮細胞数の減少, ②拒絶反応による移植片機能不全があげられる. 角膜の透明性は角膜内皮細胞機能に依存し, 角膜内皮細胞密度が一定水準より下がると混濁し視力低下をきたす. 一般に角膜移植後には直後から数年かけて年角膜内皮細胞数が減少し, 術後 3 年で移植時の 60%以下になる症例が多い. これまでその原因は「術後の炎症」と考えられてきたが, 術後の炎症は術後 1 か月後には沈静化するため, 角膜内皮細胞の生存に他の因子が関与しているはずである.

角膜は体内でもっとも神経密度が高い組織であり, 組織中のサブスタンス P, Calcitonin-gene related peptide (CGRP), Vasoactive intestinal peptide (VIP), alpha-Melanocyte stimulation hormone (α MSH) 濃度が高いことが知られている. 近年, VIP が実験動物およびヒトで角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制し, 臨床的にも有効であるという報告がされた³⁾. そこで我々は角膜神経切断モデルを作製, そのモデルで角膜内皮細胞が減少し⁴⁾ニューロペプチドがそれを抑制する現象を観察した. 本研究では, 実際のマウスの角膜移植モデルでこれらの VIP が角膜内皮細胞密度の温存に効果があるか, その検証を行った.

方法および結果

1. 角膜移植モデルでの角膜内皮細胞減少

神経障害のある場合とない場合における角膜移植モデルの内皮細胞の減少を定量した. 方法は生後 6 から 8 週の BALBc で神経障害があるマウス, ないマウスに, BALB c をドナーとする移植 (アイソ移植) を施行した. その後, 正常眼および, 移植 7 日目で角膜を摘出し, 角膜移植片と角膜周辺部 (ホスト角膜) での角膜内皮細胞密度を抗 ZO-1 抗体で染色し定量した.

角膜中央および角膜移植片内の角膜内皮細胞密度は, 正常のマウスでは $2,970 \pm 101$ cell/mm² に対し, 神経障害のない角膜移植片では $1,221 \pm 109$ cell/mm², 神経障害のある角膜移植片では 125 ± 125 cell/mm² と, 正常眼に比べ, 有意に両群で角膜内皮細胞密度が低下していた (図 1).

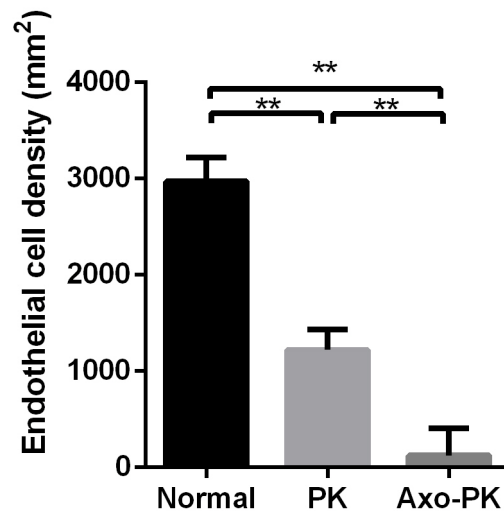


図1. 角膜移植後の角膜移植片内の角膜内皮細胞密度.

Normal: 正常, PK: 角膜移植後, Axo-PK: 神経障害後の角膜移植. ** $P < 0.001$ (ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test, *compared with normal group).

角膜周辺部および角膜周辺部のホストの角膜内皮細胞密度は, 正常のマウスでは $2,718 \pm 133$ cell/mm² に対し, 神経障害のない角膜移植片では $1,762 \pm 325$ cell/mm², 神経障害のある角膜移植片では $1,524 \pm 231$ cell/mm² と, 正常眼に比べ, 有意に両群で角膜内皮細胞密度が低下していた (図2).

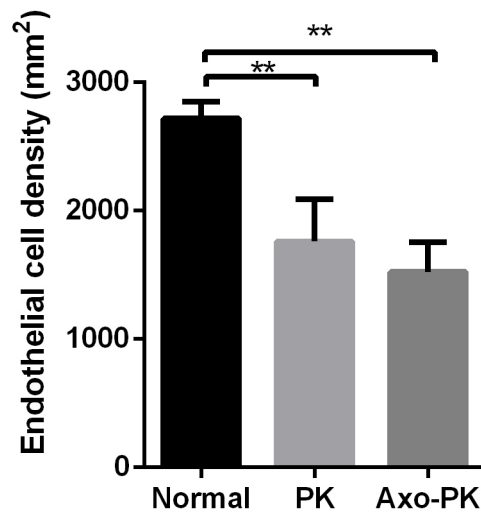


図2. 角膜移植後の周辺部ホスト角膜内の角膜内皮細胞密度.

Normal: 正常, PK: 角膜移植後, Axo-PK: 神経障害後の角膜移植. ** $P < 0.001$ (ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test, *compared with normal group).

2. 角膜移植後のVIPの定量

まず、角膜神経切断後の角膜内の VIP のタンパク量を定量した。神経障害後 1 日、3 日、7 日後の角膜および虹彩組織を摘出し、組織を破碎し上清液中の VIP の量を ELISA によって定量した。その結果、角膜神経切断後 1 日、3 日、7 日において角膜神経および虹彩の VIP 濃度が有意に低下することが分かった (図 3)。

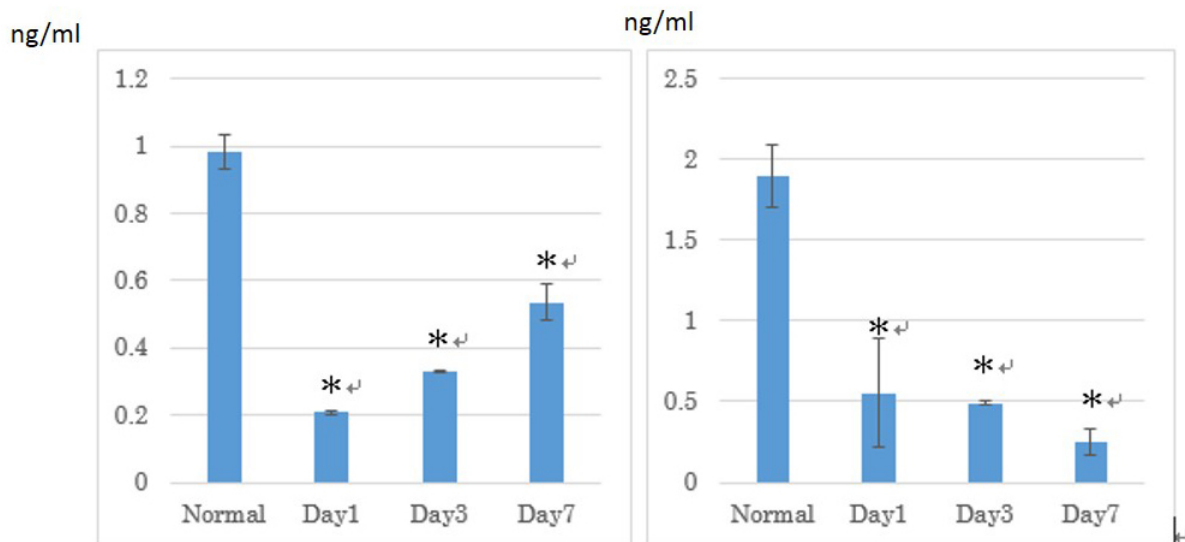


図 3. 神経障害後 VIP 濃度.

左：角膜内 VIP 濃度，右：虹彩内 VIP 濃度。* $P < 0.05$ (ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test, *compared with normal group).

1 と同様に生後 6 から 8 週の BALBc をドナーとする BALBc への移植を施行し、角膜移植後 1 日、3 日、7 日後のグラフトおよび周辺部宿主角膜を摘出し、組織を破碎し上清液中の VIP の量を ELISA によって定量した。その結果、移植後 1 日、3 日、7 日においてグラフトの VIP 濃度が有意に低下することが分かった。また、周辺部のホストの角膜の VIP は術後 1 日で低下するが、術後 3 日目以降増加することがわかった (図 4)。

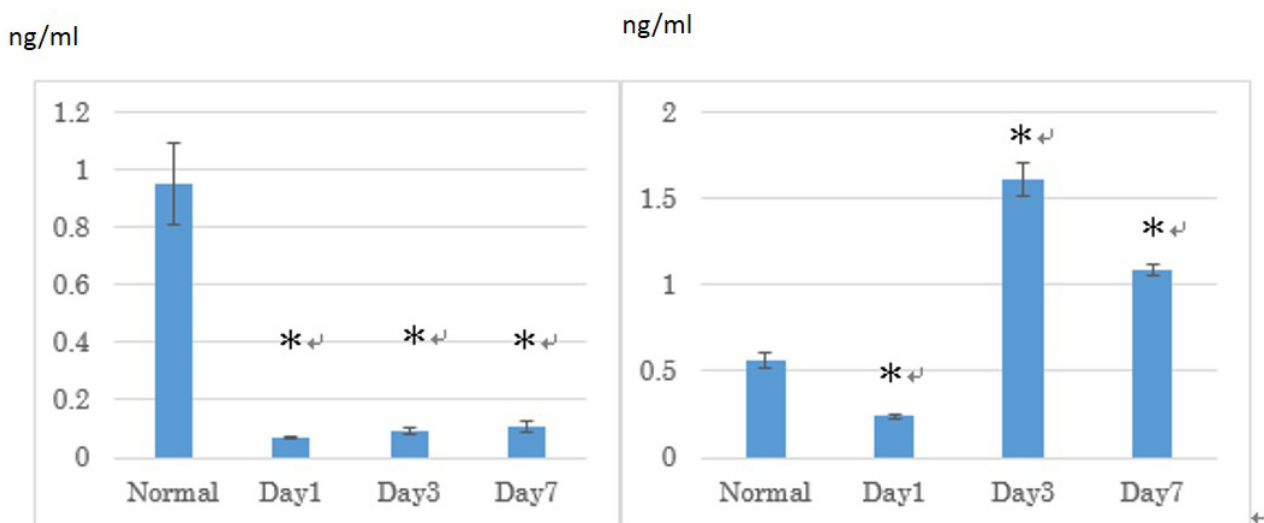


図 4. 角膜移植後 VIP 濃度.

左：グラフト内 VIP 濃度，右：周辺部ホスト VIP 濃度.

* $P < 0.05$ (ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test, *compared with normal group).

3. VIP を介した角膜内皮細胞減少の治療的抑制効果の検討

角膜神経障害と角膜移植を1, 2同様にを行い, VIP を連日腹腔内投与する. その後移植7日目で角膜を摘出し, 角膜移植片と角膜周辺部 (ホスト角膜) での角膜内皮細胞密度を抗 ZO-1 抗体で染色し定量した.

その結果, 角膜移植後と神経障害で角膜内皮細胞密度は減少することがわかったが VIP の投与は角膜移植後および神経障害+角膜移植後の内皮細胞減少に治療的効果がないことがわかった (図 5, 6).

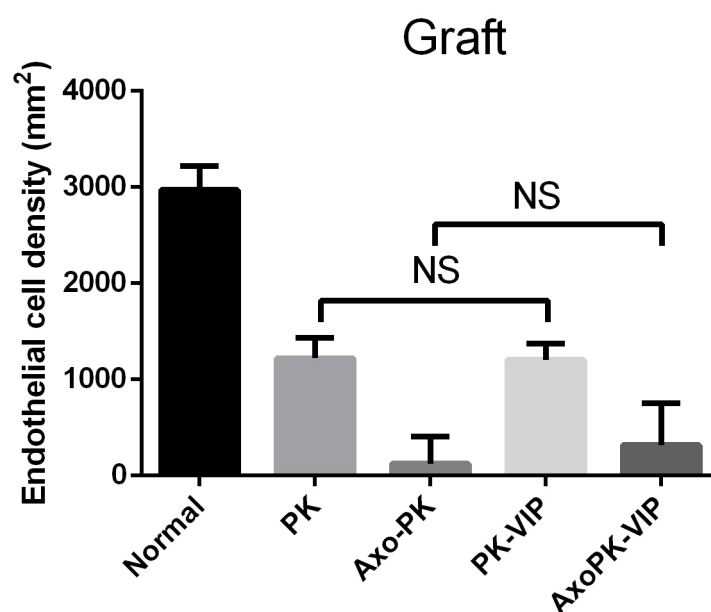


図 5. 角膜移植後の角膜移植片内の角膜内皮細胞密度減少に対する VIP の効果.

Normal : 正常, PK : 角膜移植後, Axo-PK : 神経障害後の角膜移植, VIP : VIP 投与.

NS: not significant (ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test).

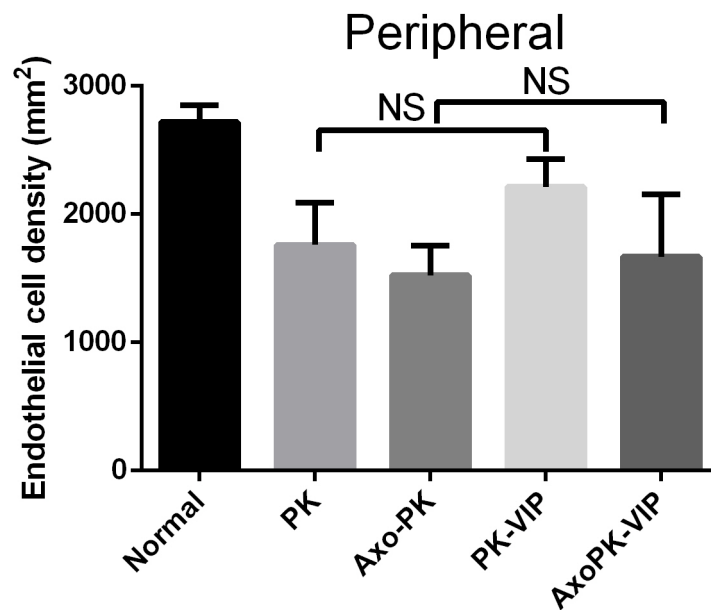


図 6. 角膜移植後の周辺部ホスト角膜内の角膜内皮細胞密度減少に対する VIP の効果.

Normal : 正常, PK : 角膜移植後, Axo-PK : 神経障害後の角膜移植, VIP : VIP 投与.

NS: not significant (ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test).

考 察

本研究から角膜神経障害, および角膜移植後のグラフトでは VIP 濃度が低下することがマウスの実験において示された. また, 角膜神経障害後の角膜移植ではグラフト内の角膜内皮細胞密度が有意に減少することがわかった. ただ, VIP の腹腔内投与 (1 nM/0.1 cc 連日投与) では, これまでヒトの移植前の VIP 投与で報告されているような角膜内皮細胞の保護効果が認められなかった. 今回の VIP 投与経路と投与量が感染性角膜炎のマウスのモデルでの治療的效果で有効とされた投与方法を⁵⁾採用したが, その投与方法が感染性角膜炎のモデルでは有効だったが, 本モデルには治療的效果を発揮するには薬剤移行濃度が不十分であった可能性がある. 角膜内皮細胞は角膜神経から分泌される VIP 以外に, 角膜内皮細胞自体の自己分泌や前房水を介して虹彩からの VIP 分泌を受けている可能性がある. 今回用いた角膜神経障害モデルは角膜の神経障害を起こすと同時に虹彩神経も障害する. そのため, 虹彩内 VIP 濃度が激減したこともそれと矛盾しない. その仮説で, 本研究で用いた腹腔内投与後の角膜内および虹彩内の VIP 濃度を投与後 9 時間後と 24 時間後で測定したところ, 組織内の VIP 濃度の上昇は見られなかった. その後, コンタクトレンズを用いた VIP 投与濃度の 9 時間後および 24 時間後の VIP の組織内移行性を検討したところ, ある VIP 投与濃度で十分な濃度維持が確認された. 今後はこの投与方法を用いて, 角膜移植後の角膜内皮細胞減少に対する VIP の治療的效果の検討を行っていく予定である.

本稿を終えるにあたり, 本研究を御支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます.

文 献

- 1) Niederkorn, J. Y. : Corneal transplantation and immune privilege. *Int. Rev. Immunol.*, **32** : 57-67, 2013.
- 2) Tan, D. T., Janardhanan, P., Zhou, H., Chan, Y. H., Htoon, H. M., Ang, L. P. & Lim, L. S. : Penetrating keratoplasty in Asian eyes: the Singapore Corneal Transplant Study. *Ophthalmology*, **115** : 975-982, 2008.
- 3) Koh, S. W. : Corneal endothelial autocrine trophic factor VIP in a mechanism-based strategy to enhance human donor cornea preservation for transplantation. *Exp. Eye Res.*, **95** : 48-53, 2012.

- 4) Yamaguchi, T., Turhan, A., Harris, D. L., Hu, K., Prüss, H., von Andrian, U. & Hamrah, P. : Bilateral nerve alterations in a unilateral experimental neurotrophic keratopathy model: a lateral conjunctival approach for trigeminal axotomy. *PLoS One*, **8** : e70908, 2013.
- 5) Jiang, X., McClellan, S. A., Barrett, R. P., Zhang, Y., Foldenauer, M. E. & Hazlett, L. D. : The role of VIP in cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53** : 7560-7566, 2012.