

自己角膜上皮幹細胞移植術の開発

分担研究者 今西二郎 京都府立医科大学・微生物学教室

研究要旨 角結膜を含めた種々の臓器・組織への *in vivo* 遺伝子導入が、合成非ウイルス性ベクターにより高率、かつ安全に可能であった。

A. 研究目的

合成非ウイルス性ベクターによる *in vivo* 遺伝子導入系の樹立を目的とした。独自の複合ベクター系 (EBV/polyplex、EBV/lipoplex) を、多くの臓器・組織を対象に検証した。

B. 研究方法

EBV-ベクターと、ポリエチレンイミン、PAMAM デンドリマー、またはカチオニック・リポソームを用いた複合ベクターを作成した。ラットおよびラビットの結膜内と前房、ラット膝関節腔、ラットおよびハムスター左心室壁、SCID マウス移植肝癌に注入し、マーカー遺伝子発現を計測した。肝癌移植マウスに TK 遺伝子を導入、GCV 投与による腫瘍増殖とマウスの寿命を計測した。心筋症ハムスター心筋に  $\beta$ 2-AR 遺伝子を導入し、心機能を心エコーで測定した。動物実験は学内の指針に準じて行った。

C. 研究結果

結膜線維芽細胞、虹彩角膜角部、腫瘍細胞、関節滑膜、心筋に有意なマーカー遺伝子発現を認めた。いずれも組織学的に細胞障害、炎症等は認めなかった。ただし、それぞれの組織に応じて適切な担体と不適切な担体があった。を選ぶと、肝癌モデルでは腫瘍の増殖抑制と担癌マウスの延命を認めた。心筋症モデルでは、心収縮率、心拍出量の増大、カテコラミン感受性の増強が見られた。

D. 考察

EBV/polyplex、および EBV/lipoplex により

*in vivo* 導入が高率に可能であることが、多彩な臓器・組織において示された。肝癌および心筋症の動物モデルで治療効果が示された。

E. 結論

安全で有効な *in vivo* 遺伝子治療に、合成非ウイルス性ベクターが利用可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Highly Efficient Suicide Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells by EBV-Based Plasmid Vector Combined with PAMAM Dendrimer. 原田他, *Cancer Gene Therapy*. 7 (1): 27-36, 2000.

2) Effective Suicide Gene Therapy *in vivo* by EBV-Based Plasmid Vector Coupled with Polyamidoamine Dendrimer. 田畑他, *Gene Ther*. 7 (1): 53-60, 2000.

3) Gene Delivery to Human Chondrocytes by an Adeno-Associated Virus Vectors. 新井他, *J. Rheumatol.* (in press)

4) Non-viral Strategies for Immuno-Gene Therapy. 松田他, *Recent Research Developments in Immunology* (in press).

2. 学会発表

1) The EBV/polyplex: an Efficient Non-viral System for *in vitro* and *in vivo* Gene Delivery. 松田他, 1999年6月 (Washington DC, USA)

G. 知的所有権の取得状況: なし

遺伝子導入による拒絶されにくい角膜組織開発の研究

分担研究者 佐野洋一郎 京都府立医科大学眼科 助手

研究要旨

角膜組織にアデノウイルスベクターを用いて mutant Fas ligand の遺伝子を導入しマウス角膜移植モデルにて移植片の生着を検討した。Mutant Fas ligand 遺伝子導入では角膜移植片の生着を促進することができず、むしろ過剰発現により移植片の早期混濁を生じることが示唆された。

A. A. 研究目的

重傷化した ocular surface 疾患に対する新しい概念の外科的治療法として「拒絶されにくい」角膜移植片の開発を目的とする。その方法として、遺伝子操作による角膜移植片の作製の可能性を検討する。

B. 研究方法

マウスを用いて全層角膜移植を施行した。ドナー角膜に soluble Fas ligand を生じない mutant Fas ligand をアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、生着率を検討した。ウイルスベクターは高濃度 ( $10^8$  pfu/ml) と低濃度 ( $10^5$  pfu/ml) の2種類で検討した。各々の濃度における遺伝子導入効率を $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み換えたアデノウイルスベクターを用いて確認した。

C. 研究結果

アデノウイルスベクターでの角膜組織への遺伝子導入は高濃度ベクター溶液で 70~90%の、低濃度ベクター溶液で 30~50%の角膜内皮細胞においてその発現が認められた。

これらのドナー角膜組織を用いて同種異系角膜移植を行ったところ、高濃度遺伝子導入では、術後早期に移植片の混濁が認められ、またこの混濁は同系ドナー角膜を用いても同様に認められた。低濃度遺伝子導入では、術後早期の混濁は認められなかったが異系移植片の生着において遺伝子非導入群と有意な差を認めなかった。

D. 考察

mutant Fas ligand のドナー角膜組織への遺伝子導

入は異系角膜移植片の生着を促進せずむしろ、高濃度では移植片の早期混濁をきたすと考えられた。

E. 結論

1) アデノウイルスベクターを用いることによりドナー角膜組織に効率良く遺伝子導入すること可能である。2) mutant Fas ligand の遺伝子導入は移植片の生着を促進することはできず、過剰な発現によりむしろ移植片破壊を促進することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S: Effects of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 on Langerhans cell migration and corneal neovascularization in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41: 154-158.

2) Suzuki T, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S: Regulatory effects of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxy-vitamin D3 on cytokine production by human corneal epithelial cells. Curr Eye Res 2000; 20: 127-130.

3) Sotozono C, Sano Y, Suzuki T, Tada R, Ikeda T, Nagata S, Kinoshita S: Soluble Fas ligand expression in the ocular fluids of uveitis patients. Curr Eye Res 2000; 20: 54-57.

2. 学会発表

1)佐野洋一郎、足立和加子、山田 潤、鈴木 智、木下 茂: Mutant Fas ligand 遺伝子導入による角膜移植拒絶反応の検討.第 29 回 日本免疫学会総会・学術集会. 京都. 1999.12.1.

# 分担研究報告書

オキユラーサーフェイスの臨床的評価法と外科的リハビリテーション法の  
開発に関する研究 (角膜への遺伝子導入法の開発に関する研究)

分担研究者 山本修士 大阪大学大学院医学系研究科 助手

**研究要旨:** 遺伝子導入に関する研究を行う上で、対象となる遺伝性角膜疾患の原因遺伝子を解析することが急務である。本研究において、遺伝性角膜変性症164家系の原因遺伝子変異を解明することができた。ケラトエピセリン関連角膜変性症では、発症前診断や遺伝カウンセリングにも、分子レベルでの診断をし、具体的に対応することが可能となった。

分担研究者 山本修士 大阪大学大学院 助手

## A. 研究目的

遺伝性角膜疾患の原因遺伝子を検索し、その病態発生メカニズムを解明することを目的とする。遺伝性角膜疾患を分子レベルで診断し、さらに新しい治療法(角膜への遺伝子導入)の開発につなげることが、最終目的である。

## B. 研究方法

900例を超える眼疾患患者さんより、承諾を得て、染色体DNA抽出のための採血に協力いただいた。候補遺伝子の存在する症例に対しては、各候補遺伝子のエクソン領域をPCR法で増幅し、変異の有無をSSCP法にて検討する。変異の有無はDNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。アミノ酸レベルでの異常がみつかった場合は、患者家族内で変異の有無が眼疾患の発症と一致しているか否かを調べた。

## C. 研究結果

格子状角膜変性症をはじめとする164家系のケラトエピセリン関連角膜変性症患者の原因遺伝子を明らかにすることができた。

格子状角膜変性症Ⅲ型の原因遺伝子変異がケラトエピセリンのP501Tであることを発見したのに続いて、この変異が本邦の創始者効果によることを連鎖解析で解明した。

新規の格子状角膜変性症の原因となる変異を発見した。従来 map-dot-finger dystrophy と診断されていた症例の中には、ケラトエピセリン遺伝子の変異によるものが存在することが分かった。

## D. 考察

ケラトエピセリンの変異による角膜変性症は、本邦でも非常に患者数が多く、角膜移植の対象になる患者が多数存在する。今回対象とした164家系の患者すべての原因遺伝子変異を突き止めた。これらの家系では、発症前診断や遺伝カウンセリングも、具体的に対応可能である。

ケラトエピセリン変異のホモ接合体症例などの重症患者に対しては、従来の角膜移植、エキシマレーザーによる治療に替わる新しい治療法の開発が望まれる。

## E. 結論

遺伝性角膜変性症164家系において、その原因となる遺伝子変異を明らかにした。分子レベルでの診断結果をふまえて、遺伝カウンセリングが可能な時代となった。

## F. 研究発表

論文発表

- ① S Yamamoto, M Okada, M Tsujikawa, et al. The spectrum of beta-ig-h3 gene mutations in Japanese patients with corneal dystrophy. *Cornea*, 2000 (in press).
- ② Y Mashima, M Yamada, M Konishi, S Yamamoto, et al. Association of autosomal dominantly inherited corneal dystrophies with BIGH3 gene mutations in Japan. *Am J Ophthalmol*, (in press).
- ③ M Okada, S Yamamoto, et al. Author Reply. *Am J Ophthalmol* 129: 412, 2000.
- ④ C Akimune, H Watanabe, N Maeda, M Okada, S Yamamoto, et al. Corneal guttata associated with the corneal dystrophy resulting from a beta-ig-h3 R124 H mutation. *Br J Ophthalmol* 84:67-71, 2000.

学会発表

- ① S Yamamoto. The spectrum of beta-ig-h3 gene mutations among patients with corneal dystrophy in Japan. ARVO meeting; May 12, 1999. Fort Lauderdale, USA.

オキュラーサーフェイスの臨床的評価法と外科的リハビリテーション法の開発に関する研究

分担研究者 大橋裕一 愛媛大学医学部眼科 教授

### 研究要旨

羊膜移植は眼表面再建術の一法であり、羊膜上皮が付着した羊膜が使用されている。本研究ではこの羊膜上皮がむしろ眼表面の創傷治癒に抑制的に働く可能性が示唆された。今後羊膜移植の奏功機序について羊膜上皮の果たす役割についてさらに検討する必要がある。

#### A. 研究目的

近年羊膜移植の登場により、瘢痕性角結膜上皮疾患の治療が可能となりつつあるが、さらに良い臨床の結果を得るための羊膜の状態や保存方法など検討すべき課題は多い。結膜上皮が被覆しやすいのはどのような羊膜かという疑問を解明するため、羊膜上皮細胞に残存する EGF, HGF 等の growth factor と羊膜上皮細胞のアポトーシスとの関係についての検討をおこなった。

#### B. 研究方法

現在羊膜移植を施行している医療機関より、凍結保存された羊膜7ロットを入手し、羊膜上皮の走査型顕微鏡および光学顕微鏡による形態観察、タネル法によるアポトーシスの検出、EGF, HGF の免疫染色と ELISA による EGF, HGF の定量をおこなった。

#### C. 研究結果

羊膜上の羊膜上皮の形態について、一部に羊膜上皮の脱落しているものがあり、上皮が健常であったものは2ロットであった。タネル法において、健常な2ロットでわずかに陽性染色を認めるのみであったが、その他のロットでは50%以上の羊膜上皮が陽性であり、羊膜上皮の形態とアポトーシスの間に一定の相関関係が示唆された。

羊膜内 HGF の定量では、HGF が 3.5 - 20.8 (平均 10.9) pg/μg protein で羊膜上皮の状態との相関は見られなかった。一方 EGF は羊膜上皮が脱落しているもので検出限界以下であり、検出された6ロットで 0.2 - 2.0 pg/μg protein であった。

免疫染色では、EGF はほぼ羊膜上皮に限局して見られたが、HGF は羊膜上皮および実質に見られた。

#### D. 考察

羊膜上皮の健常性は保存方法やおそらく母体・胎児の状態によるロット差が大きいことが考えられた。また、羊膜上皮の脱落アポトーシスによって起こっていることが示唆された。羊膜内の EGF 濃度は羊膜上皮の健常性に依存しているが、HGF 濃度は羊膜上皮の状態とは無関係に存在していることが示された。

#### E. 結論

各施設で使用している羊膜には特に羊膜上皮の健常性に大きな差があった。この原因として上皮のアポトーシスとの関係が考えられた。羊膜内の EGF 濃度は羊膜上皮の健常なものに多く認められる傾向にあった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし。

## 厚生科学研究費補助金（感覚器研究事業）

### 分担研究報告書

オキュラーサーフェイスの臨床的評価法と外科的リハビリテーション法の開発に関する研究  
-前眼部形成不全における PAX6 遺伝子変異に関する研究-

分担研究者 東 範行 国立小児病院眼科医長

**研究要旨** 先天無虹彩 4 2 例で染色体検査と PAX6 遺伝子変異の検索を行った。3 例で 1 1 番染色体短腕欠損があり、1 8 例（家族性 4 家系、孤発例 1 4 例）で PAX6 変異が見つかった。3 例で初めて missense 変異が見いだされた。遺伝子型と表現型に相関はなく、これは Pax6 が下流に膨大な遺伝子に従え、その発現様式に差があるためと思われる。PAX6 とプログラム細胞死に関与するシグナル分子 Bcl-2、Bax との関係を生化学的に検討したところ、PAX6 は Bcl-2 を亢進し、Bax を抑制しており、PAX6 はプログラム細胞死を抑制する方向に働くと考えられた。Peters 奇形にみられた PAX6 変異体でこの PAX6 と Bcl-2、Bax の関係の変化を検討すると、Bcl-2 においては変化がなかったが、Bax への亢進機能が抑制され、プログラム細胞死を起こす方向にあることが示されて、本疾患の発生機転の説明になると考えられた。

#### A. 研究目的

PAX6 遺伝子は、眼形成の master control 遺伝子であり、ヒトでは先天無虹彩、Peters 奇形などの前眼部疾患で変異が見つまっている。しかし、その遺伝子型と変異型の関係に関する検討は少なく、まして PAX6 蛋白の生化学的検討や in vivo の研究は僅かしか行われていない。今年度は、先天無虹彩の PAX6 変異を検索して遺伝子型と変異型の関係を検討した。また、これら前眼部形成異常においては、細胞の増殖分化とともに、プログラム細胞死が関与していると言われており、PAX6 とプログラム細胞死の関係を生化学的に検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 先天無虹彩の PAX6 変異

インフォームドコンセントをとった後、先天無虹彩 4 2 例の末梢血を採取し、まず染色体検査を行った。さらに余剰血液からゲノム DNA を調整した。これらの DNA を用いて、PAX6 遺伝子の各 exon を PCR-SSCP 法でスクリーニングした。band shift が認められたものは subcloning

を行い、塩基配列を決定した。

##### 2. PAX6 とプログラム細胞死の生化学的検討

PAX6 cDNA を強制発現プラスミド pCAGGS (bata-actin promoter) に組み込み、これを effector とした。Apoptosis 抑制としては Bcl-2 の promoter を、亢進としては Bax の promoter を選び、おのおのの C 末端に chloramphenicol acetyltransferase (CAT)をつないで reporter とした。マウス embryonic carcinoma P19 細胞を用い、0,25-4.0ug 濃度を変えた PAX6 強制発現プラスミドと、Bcl-2 あるいは Bax promoter-CAT を co-transfection し、蛋白を回収して CAT assay を行った (dose dependent regulatory assay)。ついで、Peters 奇形にみられた変異体 R26G、S363L を組み込んだ PAX6 cDNA 強制発現プラスミドを作成し、同様に CAT assay を行って変異の効果を検討した。

#### C. 研究結果

##### 1. 先天無虹彩の PAX6 変異

4 2 例中 3 例で 1 1 番染色体短腕欠損があり、さらに他の 1 8 例（家族性 4 家系、孤発例 1 4

例) で PAX6 変異が見つかった。その内訳は以下の通りである。

Exon 5 : frameshift(ins527G) ; S24F (C488→T) ; Q27X (C496→T) ; R44 (G548→A) ; N17S (A467→G) I29V (A502→G) 3' intron 12塩基挿入 (以上3つは同一症例) ; 3' splice error (別個に2例)

Exon 8 : Q178H (G951→T) ; frameshift(ins969G) ; R203X (C1024→T) (別個に2例)

Exon 9 : R240X (C1135→T) (別個に2例)

Exon 10 : Q277X (C1246→T)

Exon 11 : frameshift(dell434→T)

これらの遺伝子型と表現型(虹彩欠損の程度、角膜混濁、白内障、緑内障、黄斑低形成、視神経低形成の有無、視力)を比較検討したが、明らかな相関はなかった。家族性のものでも、虹彩の欠損が完全であったり、一部分であったり、臨床像が多彩であった。しかし、同一症例の左右眼では、臨床像はほぼ同一であった。

## 2. PAX6 とプログラム細胞死の生化学的検討

CAT assay によって Bcl-2 と Bax に対する PAX6 の影響を検討したところ、PAX6 は dose dependent に Bcl-2 を亢進し、Bax を抑制した。したがって、PAX6 はプログラム細胞死を抑制する方向に働くことが示唆された。次に、Peters 奇形にみられた PAX6 変異体 R26G、S363L の Bcl-2 と Bax に対する変化を、同様に CAT assay を行って変異の効果を検討した。Bcl-2 においては変化がなかったが、Bax では R26G、S363L が PAX6 野生体に比べて CAT 反応の亢進が抑制されており、プログラム細胞死を起こす方向にあることが示された。

## D. 考察

### 1. 先天無虹彩の PAX6 変異

PAX6 は先天無虹彩の原因遺伝子として 1991 年に positional cloning によって発見され、以来多くの変異が見いだされてきた。今回も、ほぼ半数症例に該当領域の染色体異常ないしは PAX6 変異が見つかった。変異の見つからなかった例は、他の遺伝子が関与している可能性もあるが、

むしろ PAX6 遺伝子領域が欠損しているものの、染色体検査レベルでは検出できない microdeletion である可能性が高い。別症例で同一変異が見られたものがあり、これは founder effect も否定はできないが、両親に変異のない明らかな孤初例でもあったので、変異の起こりやすい hot spot であると考えられる。

先天無虹彩の PAX6 変異は、これまでの報告ではいずれも nonsense、frameshift、splice error であった。これにより、片側の allele が機能しないために疾患が起こる haploinsufficiency 説が支持されてきた。しかし、今回3例で missense 変異が見つかったことは、本疾患の成立に dominant negative のような他の機転が働いていることを示唆している。

変異の遺伝子型と表現型の間には相関がなかった。これは、染色体異常であっても、軽度の missense 変異であっても同様の無虹彩症を起こすこと、家族性でも臨床像が多彩であることから裏付けられる。PAX6 は眼発生のさまざまな時期に発現し、しかも下流に膨大な遺伝子を支配していると思われるので、これらのわずかな発現様式の差が表現型の違いを起こすと思われる。しかし、その様式は、本来同一個人では同じであり、このため一症例の左右眼の所見には差がなかったと説明できる。

### 2. PAX6 とプログラム細胞死の生化学的検討

今回、PAX6 と Bcl-2、Bax の関係を生化学的に検討したところ、PAX6 は Bcl-2 を亢進し、Bax を抑制しており、PAX6 はプログラム細胞死を抑制する方向に働くことが判明した。近年、眼の形成においてさまざまな転写因子が発見され、その発現様式が検討されているが、PAX6 は発生初期の眼形成の field 決定に働き、個々の細胞の運命が決まった後は、その細胞固有の遺伝子に役割をわたすと考えられるようになった。発生におけるプログラム細胞死は、細胞の運命が決まった後にそれが過剰に作られ、不要な分が除かれる時に起こる。初期の運命づけの時期にプ

プログラム細胞死が起こっては困るので、PAX6 がプログラム細胞死を抑制することはうなずける。

Peters 奇形では、発生初期における角膜と水晶体の分離不全が原因であると考えられている。水晶体は、角膜の原基である表面外胚葉から陥入、分離するのであるが、この分離の際にはプログラム細胞死が関与していると思われる。そこで次に、Peters 奇形にみられた PAX6 変異体でこのプログラム細胞死における PAX6 と Bcl-2、Bax の関係が変化しているかを検討した。その結果、Bcl-2 においては大きな変化がなかったが、Bax では PAX6 野生体に比べて CAT 反応の亢進が抑制されており、プログラム細胞死を起こす方向にあることが示された。このような異常なプログラム細胞死が本疾患の発生機転に関与していることが示唆された。

今後は、これらの変異体を用いた *in vivo* の系で、疾患の成立機転に関する研究を行う必要がある。

## E. 結論

先天無虹彩 4 2 例で染色体検査と PAX6 遺伝子変異の検索を行った。3 例で 11 番染色体短腕欠損があり、18 例（家族性 4 家系、孤発例 14 例）で PAX6 変異がみつかった。3 例で初めて missense 変異が見いだされた。遺伝子型と表現型に相関はなく、これは Pax6 が下流に膨大な遺伝子に従え、その発現様式に差があるためと思われた。

PAX6 とプログラム細胞死に関与するシグナル分子 Bcl-2、Bax との関係を生化学的に検討したところ、PAX6 は Bcl-2 を亢進し、Bax を抑制しており、PAX6 はプログラム細胞死を抑制する方向に働くと考えられた。Peters 奇形にみられた PAX6 変異体でこの PAX6 と Bcl-2、Bax の関係の変化を検討すると、Bcl-2 においては変化がなかったが、Bax への亢進機能が抑制され、プログラム細胞死を起こす方向にあることが示されて、本疾患発生機転の説明になると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Missense mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in eye anomalies. *Am J Hum Genetics* 65:656-663, 1999.
2. Missense mutation in the PAX6 gene in aniridia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2524-2528, 1998.
2. Mutations of a human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataract and ocular anterior segment anomalies. *Hum Molec Genetics* 9:363-366, 2000.
4. PAX6 expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol* 83:723-727, 1999.
5. Various phenotypic expressions of familial aniridia with a PAX6 mutation. *Br J Ophthalmol* 83 :991-992, 1999.
6. 網膜の水平細胞とアマクリン細胞に見つかった新しい光受容器. *日本の眼科* 70:275-276, 1999.
7. 膠様滴状角膜ジストロフィの原因遺伝子. *日本の眼科* 70:923-924, 1999.
2. 学会発表
1. シンポジウム「超難治性網膜硝子体疾患の治療」未熟児網膜症と先天網膜ひだの硝子体手術. 日本眼科手術学会. 1999年1月 東京
2. PAX6 遺伝子の択一的スプライス部位の変異. 日本小児眼科学会. 1999年4月 福岡
3. *Drosophila* の eyes absent 遺伝子 homologue EYA1 の前眼部異常、先天白内障における変異. 日本眼科学会. 1999年4月 千葉
4. 特別講演「小児の眼の見方」静岡県眼科集談会 1999年8月 静岡
5. PAX6 遺伝子による WT1 の制御. がん治療学会. 1999年9月 広島
6. 眼形成異常における PAX6 遺伝子の変異. 日本人類遺伝学会. 1999年11月 仙台
7. 特別講演「眼の形態形成における PAX6 遺伝子」 日本臨床眼科学会眼先天異常研究会 1999年10月 東京

## 分担研究報告書

分担研究者 坪田一男 東京歯科大学眼科 教授

**研究要旨** 重症化したocular surface疾患に対する適切な外科的治療法の一つとして、角膜上皮幹細胞移植の有用性を確認した。

### A. 研究目的

当研究の目的に、従来の同種移植では対処が不可能な難治性のocular surface疾患を完治することがある。スティーブンジョンソン症候群、眼類天疱瘡、ならびに熱化学外傷のような角膜輪部が破壊される病態は、角膜上皮の幹細胞を枯渇させることがあるので、その結果正常な透明角膜に瘢痕化と混濁化が起こる。このような機能的失明は、従来の標準的な角膜移植では治療することができない。そのため新しい概念の生体組織を用いた手術方法の開発と臨床応用が必要となる。

### B. 研究方法

重症ocular surface疾患と角膜輪部機能障害を併せもつ患者39例、43眼に対して、死体から摘出された角膜上皮の幹細胞移植を70件実施し、その評価をおこなった。これらの患者のすべてにおいて薬物治療が無効であった。患部眼の術前平均視力は0.004（検査者が示した指の数を数えられるだけの視力）であったが、この視力は多くの国々の法的盲目の基準を満たすものである。また、28眼に対しては、標準的な角膜移植も同時に実施した。最初の移植の治療成績が不十分であった場合には、最大で1眼に対して4回の幹細胞移植を行った。結果、2回以上の移植を行ったのは19眼であった。患者の経過観察は、移植後少なくとも1年間は実施した。

また、スティーブンジョンソン症候群の小児患者に対する移植の検討も行った。角膜上皮の幹細胞移植を4例5眼に対して行った。患部眼のocular surfaceと結膜上皮細胞の観察にスリットランプとimpression cytologyを、涙腺機能の観察にはシルマーテストを用いた。

Ocular surface組織が破壊されている場合、上皮形成の基質として羊膜を用いた。羊膜採取にあたっては、妊婦に十分なインフォームド・コンセントを行い同意書に署名をもらった上で、帝王切開時において出産の後に採取した。それらの組織検査でHIV、CおよびB型肝炎すべてにおいて陰性であることを確認した。

### C. 研究結果

幹細胞移植後の平均観察期間が1163日において、角膜の上皮形成が43眼中22眼（51%）において認められた。この22眼のうち7眼には角膜組織の浮腫が認められたが、15眼には角膜の透明化が確認できた。平均視力が0.004から0.02（1m離れた試視力表の最大の記号を十分に識別できる視力）に回復した

（ $p < 0.001$ ）。角膜の透明化が維持されていた15眼については、最終的な平均視力が0.11（5m離れた試視力表の最大の記号を十分に識別できる視力）にまで回復した。初回移植の合併症としては26眼に角膜上皮欠損の持続が認められ、16眼に高眼圧症、角膜移植を行った28眼のうち13眼に角膜移植片の拒絶反応が認められた。この上皮欠損は、2眼を除くすべてにおいて治癒した。

また、スティーブンジョンソン症候群小児5眼のうち、2眼は上皮形成が認められ角膜の透明化が確認できた。他の3眼との差は、2眼はもともと結膜上皮細胞でGoblet細胞が認められ涙腺機能も正常であったのに対して、回復しなかった3眼では、ocular surfaceは皮膚化し涙腺機能が破壊されていた。

### D. 考察

スティーブンジョンソン症候群、眼類天疱瘡、ならびに熱化学外傷のような難治性のocular surface疾患に対して、角膜上皮幹細胞移植が有用であることが示唆された。

### E. 結論

角膜上皮幹細胞の移植は、一部の重症ocular surface疾患の患者の視力を十分に回復させることができる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Tsubota, K, Satake, Y, Kaido, M, Shinozaki, N, Shimmura, S, Bissen-Miyajima, H, Shimazaki, J: Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelium stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 340:1697-1703 (1999)

2) Tsubota, K, Shimazaki, J. Surgical treatment of children blinded by Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1999;128:573-581.

#### 2. 学会発表

1) 重症オキキュラーサーフェス疾患に対する角膜上皮のステムセル移植. 第22回日本眼科手術学会 1999年1月 東京

2) 結膜上皮のステムセル移植による重症スティーブンジョンソン症候群の治療. 第53回日本臨床眼科学会 1999年10月 東京

### G. 知的所有権の取得状況

なし。

## 7. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書

研究費の名称=厚生科学研究費

研究事業名=感覚器障害研究事業

研究課題名= オキュラサーフェイスの臨床的評価法と  
外科的リハビリテーション法の開発に関する研究

国庫補助金精算所要額=30,000,000

研究期間=1998-2000

研究年度=1999

主任研究者名=木下 茂（京都府立医科大学医学部）

分担研究者名= 今西二郎（京都府立医科大学医学部微生物学教室），  
佐野洋一郎（京都府立医科大学医学部眼科），山本修士（大阪大学医学部眼科），  
大橋裕一（愛媛大学医学部眼科），東 範行（国立小児病院眼科），  
坪田一男（東京歯科大学眼科）

研究目的=Ocular surfaceを障害させる疾患は多岐にわたるが、その有効な早期臨床評価法および治療法が確立していないために視覚障害者が国内外に数多く生じている。そこで全国に1,000万人規模で存在するとされるドライアイ患者を的確にスクリーニングすることを目的とした簡便な臨床的評価法の開発、および重症化したocular surface疾患に対する有効な外科的治療法として、新しい概念の生体組織を用いた角膜移植の開発とその臨床応用の可能性を探索する。具体的には、異種角膜移植の開発や、羊膜移植による基質移植や角膜上皮幹細胞移植、そして眼表面疾患の原因遺伝子を検索し、その病態発生のメカニズムを解明することにより、それらの遺伝子を標的とした遺伝子導入技術を確立し、拒絶されにくい角膜移植組織の開発という新しいタイプのocular surfaceの外科的リハビリテーション法の開発を目的とする。

研究方法=1) 涙液メニスカス曲率半径 (R) を非侵襲性に計測できるシステム (ビデオメニスコメーター) を開発し、その臨床応用を試みた。ドライアイ患者、健常者、および涙点プラグを挿入したドライアイ患者を対象としてビデオメニスコメーターを用いてRを算出し、3群のRを比較検討した。さらにドライアイ患者と健常者におけるRとシルマーI法、綿糸法、およびFluorescein breakup time(F-BUT)との関係について検討した。2) 重症ocular surface疾患と角膜輪部機能障害を合わせ持つ患者に対して、死体から摘出された角膜上皮の幹細胞移植を実施し、角膜の透明治癒率および術後視力を検討した。ocular surface組織が破壊されている場合、上皮形成のための基質として羊膜を用いた。3) 羊膜移植を施行している4医療機関より、凍

結保存された羊膜7ロットを入手し、羊膜上皮の走査型電子顕微鏡および光学顕微鏡による形態観察、タネル法によるアポトーシスの検出、EGF、HGFの免疫染色とELISAによるEGF、HGFの定量を行った。4) マウスを用いて全層角膜移植を施行した。ドナー角膜にsoluble Fas ligandを生じないmutant Fas ligandをアデノウィルスベクターを用いて遺伝子導入し、生着率を検討した。ウィルスベクターは高濃度 (108 pfu/ml) と低濃度 (105 pfu/ml) の2種類で検討した。各々の濃度における遺伝子導入効率を $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み換えたアデノウィルスベクターを用いて確認した。5) 先天無虹彩42例においてPAX6の変異をPCR-SSCP法、塩基配列決定によって検索した。また、PAX6とプログラム細胞死の関係を生化学的検討するため、PAX6 cDNAを強制発現プラスミドとBcl-2 promoterあるいはBax promoterにつないだCATをreporterとしてCAT assayを行った。さらにPeters奇形にみられた変異体R26G、S363のCAT assayにおける変化を検討した。6) 164家系の角膜疾患患者および家族より同意を得た後、染色体DNA抽出用採血に協力いただいた。格子状角膜変性の原因遺伝子とされるケラトエピセリンをターゲットにした候補遺伝子アプローチ法により解析した。7) ポリエチレンイミン、PAMAM dendrimer、またはカチオンック・リポソームとEBVベクターの複合ベクター (EBV/polyplex、およびEBV/lipoplex) を作成した。ラットおよびラビットの結膜内と前房、ラット膝関節腔、ラットおよびハムスター左心室壁、SCIDマウス移植肝癌に注入し、マーカー遺伝子発現を計測した。肝癌移植マウスにTK遺伝子を導入、GCV投与による腫瘍増殖とマウスの寿命を計測した。心筋症ハムスター心筋にb2-AR遺伝子を導入し、心機能をエコーで測定した。

結果と考察=1) 涙液メニスカス曲率半径(R)は、ドライアイ患者で有意に小さく、プラグ眼で有意に大きかった。また、RとシルマーI法、綿糸法、F-BUTのいずれにおいても有意な相関を認めた。さらにRのカットオフ値を0.24 mmとすれば、感度が92.3%、特異度が100%となり、既存の検査に比べすぐれたドライアイの診断のパラメーターになると思われた。2) 角膜上皮幹細胞移植後、角膜の上皮形成が全体の51%において認められた。このうち30%には角膜組織の浮腫が認められたが、その他の眼には角膜の透明化が確認できた。平均視力が0.004から0.02に回復した。角膜の透明化が維持されていた眼については、最終的な平均視力が0.11にまで回復した。3) 7つのロットのうち形態学的に上皮がほぼ消失しているものと脱落しているものが1ロットずつ、減少しているものが2ロット、健常のものが2ロットあった。タネル法では脱落しているものでほぼ100%、減少しているもので約50%、健常のものでわずかにアポトーシス陽性細胞を認めた。また免疫染色およびELISAで、EGFは上皮の健常性と相関したが、HGFは相関を認めなかった。各ロットの臨床経過が不良であったという情報はなかった。4) アデノウィルスベクターでの角膜組織への遺伝子導入は高濃度ベクター溶液で70~90%の、低濃度ベクター溶液で30~50%の角膜内皮細胞においてその発現が認められた。これらのドナー角膜組織を用いて同種異系角膜移植を行ったところ、高濃度遺伝子導入では、術後早期に移植片の混濁が認められ、またこの混濁は同系ドナー角膜を用いても同様に認められた。低濃度遺伝子導入では、術後早期の混濁は認められなかったが異系移植片の生着において遺伝子非導入群と有意な差を認めなかった。5) 先天無虹彩では、3例で11番染色体短腕欠損、18例でPAX6変異がみつかった。遺伝子型と表現型に相関はなかった。PAX6とプログラム細胞死Bcl-2、Baxとの関係を生化学的に検討したところ、CAT assayでは、PAX6はBcl-2を亢進し、Baxを抑制した。Peters奇形にみられたPAX6変異体では、Bcl-2においては変化がなかったが、Baxへの亢進機能が抑制された。6) 格子状角膜変性症をはじめとして164家系すべての家系で原因となる遺伝子変異を明らかにした。われわれの発見した格子状角膜変性症Ⅲ型

の変異(Pro501Thr)が創始者効果によるものであることを連鎖解析にて明らかになった。従来、原因不明の角膜変性とされた疾患 (map-dot-finger dystrophyなど) のなかにもケラトエピセリン遺伝子変異による症例が存在することが判明した。7) 結膜線維芽細胞、虹彩角膜角部、関節滑膜、心筋、腫瘍細胞に高率にマーカー発現を認め、細胞障害や炎症像等を認めなかった。肝癌モデルでは腫瘍の増殖抑制と担癌マウスの延命を、心筋症モデルでは心収縮率、心拍出量の増大、カテコラミン感受性の増強を認めた。

結論=1) ビデオメニスコメーターは、非接触性に涙液貯留を反映すると考えられる下眼瞼涙液メニスカスのRの検査値を与えるため、簡便で有用なドライアイの診断法となり、ocular surface疾患のスクリーニング法として活用できる。2) 種々のocular surface疾患での原因遺伝子の同定および角膜組織への遺伝子導入技術の確立により、難治性疾患に対する遺伝子治療の可能性が期待できる。角膜上皮幹細胞移植や羊膜基質移植、角膜組織への遺伝子導入技術の確立は、「拒絶されにくい」角膜組織の制作へ応用でき、その結果として重症ocular surface疾患に対する新しい外科的リハビリテーションを提供することができると考える。

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Curr Eye Res 20: 173-177. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane.	2000年3月	Swets&Zeitlinger	Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S
Cornea 19: 65-71. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits.	2000年1月	Lippincott-Raven Publishers	Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S
Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 2430-2434. Effect of metalloproteinase inhibitor on corneal cytokine expression after alkali injury.	1999年9月	Association for research in vision and ophthalmology	Sotozono C, He J, Tei M, Honma Y, Kinoshita S
Am J Pathol. 54: 331-336. Epithelial hyperproliferation and transglutaminase 1 gene expression in Stevens-Johnson syndrome conjunctiva.	1999年2月		Nishida K, Yamanishi K, Yamada K, Dota A, Kawasaki S, Quantock AJ, Kinoshita S
Br J Ophthalmol. 83: 1178-1182. Apolipoproteins J and E co-localise with amyloid in gelatinous drop-like and lattice type I corneal dystrophies.	1999年10月	BMJ publishing group	Nishida K, Quantock AJ, Dota A, Choi-Miura NH, Kinoshita S
Am J Ophthalmol. 127: 456-458. Amyloid and Pro501 Thr-mutated (beta)ig-h3 gene product colocalize in lattice corneal dystrophy type IIIA.	1999年4月	Elsevier science	Kawasaki S, Nishida K, Quantock AJ, Dota A, Bennett K, Kinoshita S
Exp Eye Res. 69: 705-708. Clusterin in human corneal endothelium and aqueous humor.	1999年12月	Academic Press	Dota A, Nishida K, Quantock A, Kinoshita S
Cancer Gene Ther. 7: 27-36. Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by epstein-barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendrimer.	2000年1月	Stockton Press	Harada Y, Iwai M, Tanaka S, Okanou T, Kashima K, Maruyama-Tabata H, Hirai H, Satoh E, Imanishi J, Mazda O
Gene Ther. 53-60. Effective suicide gene therapy in vivo by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine dendrimer.	2000年1月	Stockton Press	Maruyama-Tabata H, Harada Y, Matsumura T, Satoh E, Cui F, Iwai M, Kita M, Hibi S, Imanishi J, Sawada T, Mazda O
J Rheumatol. (in press) Gene delivery to human chondrocytes by an adeno-associated virus vectors	in press	The Journal of Rheumatology Publishing Company Limited	Arai Y, Kubo T, Fushiki S, Mazda O, Nakai H, Iwaki Y, Imanishi J, Hirasawa Y
Recent Research Developments in Immunology (in press) Non-viral strategies for immuno-gene therapy.	in press	Eaton Publishing	Mazda O, Satoh E, Hirai H, Nomura M, Imanishi J

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Invest Ophthalmol Vis Sci. 41: 154-158. Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on Langerhans cell migration and corneal neovascularization in mice.	2000年1月	Association for research in vision and ophthalmology	Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S
Curr Eye Res. 20: 127-130. Regulatory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on cytokine production by human corneal epithelial cells.	2000年2月	Swets&Zeitlinger	Suzuki T, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S
Curr Eye Res. 20: 54-57. Soluble Fas ligand expression in the ocular fluids of uveitis patients.	2000年1月	Swets&Zeitlinger	Sotozono C, Sano Y, Suzuki T, Tada R, Ikeda T, Nagata S, Kinoshita S
Cornea. 18: 233-236. Peripheral lamellar keratoplasty for corneoscleral cyst: three case reports.	1999年3月	Lippincott-Raven Publishers	Sano Y, Okamoto S, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S
Br J Ophthalmol . 84: 67-71. Corneal guttata associated with the corneal dystrophy resulting from a betaig-h3 R124H mutation.	2000年1月	BMJ publishing group	Akimune C, Watanabe H, Maeda N, Okada M, Yamamoto S, Kiritoshi A, Inoue Y, Shimomura Y, Tano Y
Arch Ophthalmol . 118: 93-96. X-linked retinoschisis with point mutations in the XLRS1 gene.	2000年1月	American Medical Association	Inoue Y, Yamamoto S, Okada M, Tsujikawa M, Inoue T, Okada AA, Kusaka S, Saito Y, Wakabayashi K, Miyake Y, Fujikado T, Tano Y
Am J ophthalmol.. 412. Author reply	2000年3月	Elsevier science	Okada M, Yamamoto S, Watanabe H, Shimomura Y, Tano Y
Hum Mol Genet. 9: 363-366. Mutations of a human homologue of the drosophila eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies.	2000年2月	Oxford University Press	Azuma N, Hirakiyama A, Inoue T, Asaka A, Yamada M
Br J Ophthalmol. 83: 991-992. Various phenotypic expressions of familial aniridia with a PAX6 mutation [letter].	1999年8月	BMJ publishing group	Negishi K, Azuma N, Yamada M
Am J Hum Genet. 65: 656-663. Missense mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in eye anomalies.	1999年9月	The american society of human genetics	Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Hayakawa M, Kanai A, Yamada M

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Br J Ophthalmol. 83: 723-727. PAX6 expression in the developing human eye.	1999年6月	BMJ publishing group	Nishina S, Kohsaka S, Yamaguchi Y, Handa H, Kawakami A, Fujisawa H, Azuma N
日本の眼科. 70: 923-924. 膠様敵情角膜ジストロフィの原因遺伝子	1999年8月	日本眼科医会	東 範行
日本の眼科. 70:275. 網膜の水平細胞とアマクリン細胞にみつかった新しい光受容器	1999年3月	日本眼科医会	東 範行
N Engl J Med. 340: 1697-1703. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation.	1999年6月	Massachusetts Medical Society	Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J
Am J Ophthalmol. 128: 573-581. Surgical treatment of children blinded by Stevens-Johnson syndrome.	1999年11月	Elsevier science	Tsubota K, Shimazaki J