

マウス角膜に lamellar keratotomy を行い、層間に lacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを注入して創を閉じた。術後、1週間—1か月に眼球を摘出して凍結切片を作成し、X-gal 染色によって lacZ の発現を確認した。

4. アデノウイルスによるムコ多糖症Ⅶ型モデルマウス(MPS7)の角膜混濁の治療

マウス MPS7 の角膜に lamellar keratotomy を行い、層間に分泌型酵素β-glucuronidase 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを注入して創を閉じた。術後翌日—1か月に適宜眼球を摘出した。角膜内のβ-glucuronidase 活性を測定し、凍結切片でβ-glucuronidase 染色を行い、さらに電子顕微鏡下で角膜実質内混濁の貯留物の変化を観察した。

C. 研究結果

1. 先天前眼部形成不全の PAX6 変異

染色体異常はみいだされなかったが、54例中9例(家族性1家系、孤発例8例)で以下のPAX6変異がみつかった。Ex5; A509→C (アミノ酸置換 E31A)、insG888 (frameshift)、3'intron 10塩基挿入、Ex5a; T20→A (V7D)、Ex11; 5' C-7'intron →T、Ex12; T1504→C (S363L)、Ex13; A1682→G (Q422R)。V7Dは3例の異なる家系にみられた。これらに遺伝子型と表現型に相関はなかった。

2. PAX6 変異体の生化学的研究

正常 PAX6 cDNA に比べて、paired domain の変異体 V7D は paired domain の binding consensus に対して、量依存的に binding activity が低下し、転写機能が低下していることが示された。

3. lamellar keratotomy による角膜実質への遺伝子導入

lacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを注入し角膜層間にて創を閉じた。術後翌日—2週間では、角膜実質細胞内に X-gal 染色陽性が確認された。1か月後では染色がみられなかった。

4. アデノウイルスによるムコ多糖症Ⅶ型モデ

ルマウス(MPS7)の角膜混濁の治療

マウス MPS7 の角膜は、電子顕微鏡で多数の沈着物の蓄積がみられた。分泌型β-glucuronidase 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを注入後2日—2週間で生化学的に角膜内のβ-glucuronidase 活性上昇がみられ、染色にて lamellar keratotomy 創周囲のみならず、角膜実質に広汎に酵素の発現がみられた。電子顕微鏡では、角膜実質内の沈着物は顕著に減少し、術後1か月でも再増加の傾向はなかった。

D. 考察

1. 先天前眼部形成不全の 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。前眼部形成不全でもわずかながら変異が発見されているが、今回多くの症例で変異がみつかった。変異の見つからなかった例は染色体検査レベルで検出できない PAX6 遺伝子領域の microdeletion があることが考えられるが、前眼部形成には膨大な遺伝子が関与しており他の遺伝子が関与していると思われる。複数の症例で同一変異が見られた V7D 変異は、CAT アッセイで明らかな PAX6 の転写活性低下がみられた。複数例で同一変異がみつかったことは founder effect も否定はできないが、明らかな孤発例にもみられているので、変異の起こりやすい hot spot であると考えられる。

前眼部形成異常でこれまで報告された変異はいずれも missense であり、一方先天無虹彩にみられる変異は一般に nonsense、frameshift、splice error で重篤である。先天無虹彩の PAX6 変異は片側の allele が機能しない haploinsufficiency で起こり、一方 missense では両 allele 合計の量不足あるいは dominant negative の機転が働いていると考えられている。今回、前眼部不全で frameshift がみつかったが、これは遺伝子型と表現型が必ずしも一致しないとも考えられるが、重症無虹彩

と Peters 奇形は角膜が混濁すれば臨床的には区別が付きにくくなっていることも考えられる。PAX6 は眼発生の上流に発現し、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臨床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. 先天角膜疾患の遺伝子治療

従来、角膜では点眼による上皮へあるいは前房内注入による内皮への導入は成功していたが、実質への導入はできなかった。今回我々は、lamellar keratotomy を行いアデノウイルスを使って、角膜実質への遺伝子導入に成功した。そして、この方法を使い、ムコ多糖症Ⅶ型モデルマウス(MPS7)角膜に分泌型酵素β-glucuronidase 遺伝子を導入し、角膜混濁を治療した。

遺伝子の発現は lamellar keratotomy 創周囲に限られていたが、産生された蛋白が細胞外に拡散するために、角膜全体に拡がり、混濁の原因となる沈着物を広汎に消退させることが可能であった。細胞内で働く転写因子や内在性酵素などでは

この方法では限局性の効果しか得られないが、細胞外で働く分泌型酵素やシグナル伝達物質の遺伝子を導入する方法としては、有効である。今回はアデノウイルスを用いたので、遺伝子発現は約2週間であったが、角膜混濁の軽減は1か月に及んだ。しかし、以後は徐々に混濁が再発することが危惧される。lamellar keratotomy を何回も繰り返して行うことはできないので、今後はレトロウイルスあるいはレンチウイルスを用いて導入し、恒常的に遺伝子を発現させることを検討すべきである。

E. 結論

先天前眼部形成不全54例で染色体検査とPAX6

遺伝子変異の検索を行い、9例で変異がみつかった。PAX6 paired domain の変異体は生化学的に転写活性が低下していることが確認された。遺伝子型と表現型に相関はなかったが、Pax6 の発現様式の差とともに類縁疾患との間に臨床像の区別が付きにくい境界例があるためと思われた。従来、角膜実質への遺伝子導入は困難とされていたが、マウス角膜に lamellar keratotomy を行って、アデノウイルスにより実質細胞へ効率良い導入に成功した。そして、ムコ多糖症Ⅶ型モデルマウス(MPS7)の角膜に分泌型酵素β-glucuronidase 遺伝子を導入し、角膜混濁を長期にわたって軽減させることに成功した。遺伝子発現を恒常的にすれば、前眼部疾患を遺伝子治療によって根本的に治療することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Azuma N, Yamada M. et al. Mutations of a human homologue of the Drosophila eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataract and ocular anterior segment anomalies. Hum Mol Genet 2000 9:363-366.
- 2) Shinoda K, Azuma N. et al. Ultrastructural and immunohistochemical findings in five patients with vitreomacular traction syndrome. Retina 2000; 20:289-293.
- 3) 仁科幸子・東 範行・他. 未熟児網膜症による視覚障害児の養育に関する問題点. 眼臨医 2000; 94:529-534.
- 4) 東 範行. 眼の形成遺伝子とその異常. 現代医療 2000;32:1973-1982.
- 5) 東 範行. 膠様滴状角膜ジストロフィの原因遺伝子. 日本の眼科 1999; 70:923-924.
- 6) 東 範行. 視交叉の謎. 日本の眼科 2000; 71:1085.

2. 学会発表

- 1) 東 範行. 特別講演 眼の形態形成遺伝子とその異常. 眼先天異常研究会 1999年10月(東京)
- 2) 東 範行. シンポジウム 未熟児網膜症の硝子体手術. 日本眼科手術学会 2000年1月(名古屋)
- 3) 東 範行. シンポジウム 白内障手術におけ

- る遺伝子治療の可能性. 日本眼科学会 2000年4月(京都)
- 4) 東 範行. シンポジウム 前眼部の形態形成遺伝子とその異常. 日本眼科学会 2000年4月(京都)
- 5) 東 範行. 宿題報告 黄斑形成と中心視成立の分子細胞生物学. 日本眼科学会 2000年4月(京都)
- 6) 東 範行. シンポジウム 網膜芽細胞腫全国登録の成果. 北日本眼科学会 2000年6月(仙台)
- 7) 東 範行. シンポジウム アトピー性皮膚炎の眼の合併症. 北日本眼科学会 2000年6月(東京)
- 8) 東 範行. 特別講演 黄斑形成の分子細胞生物学. 愛知眼科アカデミー 2000年6月(名古屋)
- 9) 東 範行. 形態形成遺伝子を用いた眼組織の再生. Japan Macula Club 2000年8月(蒲郡)
- 10) 東 範行. 特別講演 黄斑の形成システムと眼の進化. 東京医大臨床懇話会 2000年10月(東京)
- 11) 東 範行. シンポジウム 眼の形態形成遺伝子の異常とその表現型. 日本臨床眼科学会 2000年10月(東京)

重症 ocular surface 疾患に対する角膜上皮培養移植

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、角膜上皮細胞の培養移植の有用性を確認した。

A. 研究目的

ステーブンスジョンソン症候群、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ため、従来の角膜移植では治療することができない。そのため羊膜移植や角膜輪部幹細胞の移植が試みられている。しかし、その長期的成功率は約 50%にとどまっておき、確実な治療法とはいえない。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。従来の羊膜移植や角膜輪部幹細胞移植の術後合併症として最も多いものは、角膜上皮細胞の欠損であることから、角膜上皮細胞の培養移植の効果について検討した。

B. 研究方法

上皮細胞培養の基質としてコラーゲンシートがひとつの可能性であるが、我々は過去の経験から羊膜を用いた。羊膜は、採取後 10%アンモニア処理して上皮を取り除き-80 度で凍結保存する。前日に解凍し表面を乾燥させた後再度-80 度で凍結する。一方、上皮細胞の採取は、自己、親族、死体、いずれかの角膜をドナーとする可能性がある。今回我々は、20 歳～51 歳の男 6 女 7 の 13 眼について検討を行った。そのうち 8 眼がステーブンスジョンソン症候群、3 眼が眼類天疱瘡、2 眼が熱化学外傷による角膜上皮欠損であった。患者および家族への十分なインフォームドコンセントを行い、両者の HLA タイピングも行った。13 眼のうち 6 眼が親族から、7 眼が死体からの上皮細胞を採用した。羊膜上に採取した上皮細胞をのせ、患者血清を加えた SHEM 培養液を用いた。その内容は、DMEM/F12、NaHCO₃、insulin、human EGF、cholera toxin、DMSO、抗生物質（ペニシリン G、ストレプトマイシン）と 15%患者血清である。37 度で培養し、細胞が 70%コン

フルエントになったところで、Medium165 (human EGF、ハイドロコーチゾン、insulin) +10%患者血清に交換する。培養された上皮細胞の移植だが、まず眼表面の瘢痕性組織を切除し強角膜を露出し、そこへ培養上皮細胞を羊膜ごと強膜部は 8-0 バイクリル糸にて、角膜上は 10-0 ナイロン糸にて縫合する。培養組織を障害しない様に術中はヒアルロン酸を羊膜上に用いる。縫合後は、他の羊膜または治療用ソフトコンタクトレンズをカバーして保護する。術後は、ヒアルロン酸、自己血清、防腐剤抜きのステロイド、抗生物質の点眼により、経過を観察した。

C. 研究結果

上皮細胞は、約 14 日間の培養期間ではほぼコンフルエントとなり、組織学的に 2～3 の層を成し羊膜に接着していた。移植後 8 眼 (61.5%) で平均 19.9 日かけて角膜上皮再生がみとめられた。このうち 3 眼はのちに部分的に結膜化をおこし、2 眼は上皮欠損がみとめられた。最終的に 6 眼(46.2%)において角膜上皮再生がみとめられた。ドナーの内訳別には、親族 3 (50%)、死体 3 (42.9%) で上皮化が得られた。他の 7 眼においては、5 眼で結膜化、1 眼で皮膚化、1 眼は上皮がまったく再生されなかった。角膜穿孔、感染性角膜潰瘍や緑内障などの合併症もみられた。

D. 考察

我々の研究において、従来の羊膜移植や角膜輪部移植の長期予後の成功率は 50%を越えない。角膜上皮の培養移植の成功率も 46.2%に留まったことから、従来の方法と大差がないことがわかった。ドナーの違い（親族・死体）は結果に大きな差をおよぼさないが、角膜潰瘍や穿孔などの合併症は親族をドナーとした方がやや高い傾向があ

った（発症率 親族 50.0%、死体 28.6%）。自己の細胞採取の検討を行っていないが、患者自身の細胞を用いることがよい結果を導く一つの要因になると考えられる。

E. 結論

従来の角膜移植では治療できなかった眼表面の再建に角膜上皮細胞を培養し移植する方法は有用であると考えられるが、培養方法や長期予後の更なる改善が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Tsubota K, Enomoto M, Shimmura S, Goto E, Shinozaki N, Shimazaki J. Ocularsurface reconstruction by cultivated conjunctival-limbal allografts onamniotic membrane. The Association of Research for Vision and Ophthalmology,2000年5月, Fort Lauderdale, USA.

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
Cornea 19: S37-43. Reflective meniscometry: a new field of dry eye assessment	2000年1月	Lippincott-Raven Publishers	Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Kinoshita S
Cornea 19: 497-500. The height and radius of the tear meniscus and methods for examining these parameters.	2000年4月	Lippincott-Raven Publishers	Oguz H, Yokoi N, Kinoshita S
Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 2900-2905 Human uroplakin Ib in ocular surface epithelium.	2000年9月	Association for research in vision and ophthalmology	Adachi W, Okubo K, Kinoshita S
Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 2506-2513 Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane.	2000年8月	Association for research in vision and ophthalmology	Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ
Curr Eye res 20: 173-177 Growth factir 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
Am J Ophthalmol 129: 665-666. Gelatio-lattice corneal dystrophy: clinical features and mutational analysis.	2000年5月	Elsevier science	Nakamura T, Nishida K, Dota A, Adachi W, Yamamoto S, Maeda N, Okada M, 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, Okanoue 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
Cancer Gene Ther 7: 1241-1250. Targeted killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cholangiocarcinoma cells by polyamidoamine dendrimer-mediated transfer of an Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vector carrying the CEA promoter.	2000年9月	Stockton Press	Tanaka S, Iwai M, Harada Y, Morikawa T, Muramatsu A, Mori T, Okanoue T, Kashima K, Maruyama-Tabata H, Hirai H, Satoh E, Imanishi J, Mazda O

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
Gene Ther 7: 2087-2093 Direct Intra-cardiomuscular transfer of b2-adrenergic receptor gene augments cardiac output in cardiomyopathic hamsters.	2000年12月	Stockton Press	Tomiyasu, K, Oda, Y, Nomura, M, Satoh, E, Fushiki, S, Imanishi, J, Kondo, M, Mazda, O
J Rheumatol 27: 979-982. Gene delivery to human chondrocytes by an adeno-associated virus vectors	2000年4月	The Journal of Rheumatology Publishing Company Limited	Arai Y, Kubo T, Fushiki S, Mazda O, Nakai H, Iwaki Y, Imanishi J, Hirasawa Y
Research Signpost (Trivandrum, IN) pp273-281. Non-viral strategies for immuno-gene therapy. <i>in</i> Recent Research Developments in Immunology.	2000年	Eaton Publishing	Mazda O, Satoh E, Hirai H, Nomura M, Imanishi J
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
Curr Eye Res 20: 127-130 Conjunctival inflammation induces Langerhans cell migration into the cornea.	2000年7月	Swets&Zeitlinger	Suzuki T, Sano Y, 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
Nat Genet 26: 237-241. Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene.	2000年10月	Macmillan Magazines	Akama TO, Nishida K, Nakayama J, Watanabe H, Ozaki K, Nakamura T, Dota A, Kawasaki S, Inoue Y, Maeda N, Yamamoto S, Fujiwara T, Thonar EJ, Shimomura Y, Kinoshita S, Tanigami A, Fukuda MN
Am J Ophthalmol 130: 516-517. Association of autosomal dominantly inherited corneal dystrophies with BIGH3 gene mutations in Japan.	2000年4月	Elsevier science	Mashima Y, Yamamoto S, Inoue Y, Yamada M, Konishi M, Watanabe H, Maeda N, Shimomura Y, Kinoshita S

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
Am J Ophthalmol 129: 411-412. Granular corneal dystrophy with homozygous mutations in the kerato-epithelin gene.	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
Retina 20: 289-293. Ultrastructural and immunohistochemical findings in five patients with vitreomacular traction syndrome.	2000年11月	Lippincott Williams & Wilkins	Shinoda K, Hirakata A, Hida T, Yamaguchi Y, Fukuda M, Maekawa S, Azuma N
日本眼科学会雑誌 104: 960-985. 黄斑形成と中心視成立の分子細胞生物学.	2000年12月	日本眼科学会	東 範行
眼科臨床医報 94: 529-534. 未熟児網膜症による視覚障害児の養育に関する問題点.	2000年4月	眼科臨床医報会	仁科幸子, 新井千賀子, 富田 香, 守田好江, 越後貫滋子, 赤池祥子, 千田耕基, 東 範行
現代医療 32: 1973-1982. 眼の形態形成遺伝子とその異常.	2000年8月		東 範行
日本の眼科 71:167. 網膜色素変性症の薬物治療.	2000年2月	日本眼科医会	東 範行
日本の眼科 71:1085. 視交叉の謎.	2000年9月	日本眼科医会	東 範行

