

201024112A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

「膠様滴状角膜変性症の標準的治療レジメンの  
確立と新規治療法の創出」に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川崎 諭

平成23（2011）年3月

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

「膠様滴状角膜変性症の標準的治療レジメンの確立と  
新規治療法の創出」に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川崎 諭

平成23（2011）年3月

# 目 次

|      |   |    |
|------|---|----|
| I.   | 班員構成                                    | 1  |
| II.  | 総括研究報告                                  |    |
|      | 膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出           | 2  |
|      | 川崎 諭                                    |    |
| III. | 分担研究報告                                  |    |
|      | 1. 膠様滴状角膜変性症の分子病態の解明                    | 7  |
|      | 川崎 諭                                    |    |
|      | 2. 膠様滴状角膜変性新規治療の創出のための基礎的研究             | 13 |
|      | 村上 晶                                    |    |
|      | 3. 膠様滴状角膜ジストロフィの遺伝的背景                   | 17 |
|      | 西田幸二                                    |    |
|      | 4. 膠様滴状角膜変性症に対して全層角膜移植術を行った症例の長期臨床経過    | 21 |
|      | 天野史郎                                    |    |
|      | 5. 膠様滴状角膜変性症における疫学のおよび臨床的検討と標準治療レジメンの確立 | 23 |
|      | 稲富 勉                                    |    |
| IV.  | 膠様滴状角膜ジストロフィ治療指針                        | 28 |
| V.   | 班会議・班会議議事録                              | 29 |
| VI.  | 研究成果の刊行に関する一覧表                          | 40 |
| VII. | 研究成果の刊行物・別刷                             | 41 |

[ I ]

班員構成

## 班 員 構 成

| 研究者名  |       | 所 属                  | 職 名   |
|-------|-------|----------------------|-------|
| 研究代表者 | 川崎 諭  | 京都府立医科大学<br>眼科学教室    | 助 教   |
| 研究分担者 | 村上 晶  | 順天堂大学医学部<br>眼科学教室    | 教 授   |
|       | 西田 幸二 | 大阪大学医学部<br>眼科学教室     | 教 授   |
|       | 天野 史郎 | 東京大学医学部<br>眼科学教室     | 教 授   |
|       | 稲富 勉  | 京都府立医科大学<br>眼科学教室    | 助 教   |
| 研究協力者 | 福岡 秀紀 | 京都府立医科大学<br>眼科学教室    | 大学院生  |
|       | 福本 暁子 | 京都府立医科大学<br>眼科学教室    | 大学院生  |
|       | 足立 紘子 | 京都府立医科大学<br>眼科学教室    | 研修員   |
|       | 篠宮 克彦 | 京都府立医科大学<br>眼科学教室    | 特任助教  |
|       | 辻川 元一 | 大阪大学医学部<br>眼科学教室     | 助 教   |
|       | 相馬 剛至 | 大阪大学医学部<br>眼科学教室     | 医 員   |
|       | 海老原伸行 | 順天堂大学医学部<br>眼科学教室    | 先任准教授 |
|       | 松田 彰  | 順天堂大学医学部<br>眼科学教室    | 准教授   |
|       | 舟木 俊成 | 順天堂大学医学部<br>眼科学教室    | 准教授   |
|       | 臼井 智彦 | 東京大学医学部附属病院<br>眼科学教室 | 助 教   |
|       | 宮井 尊史 | 東京大学医学部附属病院<br>眼科学教室 | 助 教   |

[ Ⅱ ]

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
課題「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

総括研究報告書

「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

研究代表者 川崎 諭 京都府立医科大学眼科学教室 助教

**【研究要旨】**

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し、責任遺伝子として1999年に辻川らによってTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらその病態の詳細は未だ不明で、また希な疾患であるため臨床的にも様々な点において不明な状況が続いている。本研究では角膜専門外来をもち本疾患について積極的に診断・治療を行っている国内4施設（京都府立医科大学、大阪大学、順天堂大学、東京大学）において本疾患患者45例90眼について疫学背景、臨床像、治療成績についてデータを収集し一括して解析した。また本疾患の病態について分子レベルの解明を試みた。その成果として本疾患に対する標準的治療レジメンを作成した。また極めて重要な知見として、ソフトコンタクトレンズの装用が膠様滴状角膜変性症の角膜移植術後の再発抑制に極めて有効であるということが明らかとなった。TACSTD2遺伝子変異と膠様滴状角膜変性症の病態との関わりについては、膠様滴状角膜変性症ではTACSTD2遺伝子の機能喪失型変異によりクローディン1および7のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかとなった。

**研究分担者**

1. 村上 晶・順天堂大学 眼科学教室・教授
2. 西田幸二・大阪大学 大阪大学・医学(系)研究科(研究院) 眼科学教室・教授
3. 天野史郎・東京大学 医学部附属病院 眼科学教室・教授
4. 稲富 勉・京都府立医科大学 医学(系)研究科(研究院) 眼科学教室・助教

**A. 研究目的**

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し発症頻度は稀であるが、日本人特有の疾患であることから大阪大学の辻川らによってその責任遺伝子としてTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらTACSTD2遺伝子変異がいかんして本疾患の病態を引き起こすかについてはこれまで不明であ

った。本疾患は希な疾患であるためこれまでその疫学的情報については不明な点が少なくなかった。また本疾患は再発傾向が強く、他疾患にくらべてステロイド緑内障を合併しやすいことなどが知られていたが、その理由および予防策については明らかにされていなかった。さらに本疾患に対する外科的治療である表層角膜移植、角膜上皮移植、角膜表層切除についても、治療時期と治療法の最適な組み合わせについては明らかではなかった。そこで本研究では、TACSTD2 遺伝子変異がいかに関与するかに本疾患の病態形成に関わるかについて、分子生物学的および生化学的アプローチによって分子レベルでの解明を試みた。また我が国における本疾患の疫学、臨床像、治療成績について検討し、その結果を元に標準的治療レジメンを作成することを試みた。大阪大学、順天堂大学、東京大学においては、本研究の臨床データを採取するとともに独自の視点で膠様滴状角膜変性症の臨床的研究を行った。

## B. 研究方法

1. 我が国における膠様滴状角膜変性症の疫学、臨床像、治療経過について以下の点について検討した。

- 1) 我が国における膠様滴状角膜変性症の疫学、臨床像、治療経過についての検討  
本研究班の4施設を受診し膠様滴状角膜変性症と診断された45例90眼について、近親婚の有無、発症年齢、遺伝子変異型、臨床病型などの疫学的検討を行った。
- 2) 角膜移植術を施行された膠様滴状角膜変性症患者42例78眼（延

べ88眼）について術式毎の治療成績を合併症も含めて検討した。

- 3) 角膜移植術を施行された膠様滴状角膜変性症患者42例78眼（複数回手術施行眼で手術毎にカウントすると延べ88眼）について、ソフトコンタクトレンズ装用の有無による術後の再発の有無、再発までの期間についてKaplan-Meierの生存分析法を用いて検討した。

2. 膠様滴状角膜変性症の病態解明に関して、以下の点について検討した。（詳細は川崎の分担研究報告を参照）

- 1) TACSTD2 タンパクの発現について、様々な上皮組織（角膜、結膜、咽頭、食道、胃、小腸、結腸、膀胱、子宮頸部、膣）について検討した。
- 2) TACSTD2 タンパクがタイトジャンクション構成タンパクと直接結合するかについて免疫沈降法とProximity ligation assay（以下PLA）にて検討した。
- 3) TACSTD2 遺伝子をノックダウンし、表現型の変化を検討した。
- 4) クローニン1, 4, 7 遺伝子を上記と同じ方法でHCE-T細胞においてノックダウンし、上皮バリア機能の変化を検討した。
- 5) TACSTD2 ならびにタイトジャンクション構成タンパクのほとんどの発現を欠損し、また上皮バリア機能もほとんど認められないHeLa細胞に対してGain-of-function実験を行った。
- 6) タイトジャンクション構成タンパクの発現について正常角膜組織および膠様滴状角膜変性症患者角膜



組織で比較検討した。

- 7) TACSTD2 タンパクがデスモゾームとの間に機能的共役を持つかどうかについて検討した。
- 8) アミロイド形成過程に関して検討した。
- 9) 最小機能ペプチドによる治療可能性について検討した。

### C. 研究結果

研究代表者の川崎は膠様滴状角膜変性症の分子病態として、TACSTD2 遺伝子がクローディン1および7と結合してこれらのタンパクがユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク分解をうけるのを阻害することでタイトジャンクションの形成に促進的に働いていることを明らかにした。膠様滴状角膜変性症患者においてはTACSTD2 遺伝子の機能喪失型変異が両アリルに起こっているため、クローディンタンパクの分解が促進してタイトジャンクションの形成が障害され、涙液中のラクトフェリンが角膜実質内に侵入してアミロイドを形成することが主病態であることが強く示唆された。

研究分担者の村上は GDL D の疫学の調査、および標準的治療レジメンの確立を行うためのデータ採取の他、GDL D 患者に対するソフトコンタクトレンズ装用の有効性に関する検討を独自に行い、ソフトコンタクトレンズが表層角膜移植後の再発防止に対して有効であるとの知見を見出した。

研究分担者の西田は GDL D の疫学の

調査、および標準的治療レジメンの確立を行うためのデータ採取の他、非典型例膠様滴状ジストロフィの遺伝学的検討を行い、非典型例膠様滴状ジストロフィにおいても典型例で認められたような創始者変異を持つことを見出し、膠様滴状ジストロフィの表現型異質性は GDL D 原因遺伝子である TACSTD2 遺伝子領域以外で決定されていることを明らかにした。

研究分担者の天野は GDL D の疫学の調査、および標準的治療レジメンの確立を行うためのデータ採取の他、東京大学医学部眼科における GDL D に対する全層角膜移植術の臨床長期成績の検討し、GDL D に対する PKP は再発率が高く、手術を繰り返すほど再発期間が短くなる傾向にあった。また合併症では、高眼圧症及び拒絶反応の発症率が比較的高い傾向にあることを見出した。

研究分担者の稲富は GDL D の疫学の調査、および標準的治療レジメンの確立を行うためのデータ採取の他、本研究班4施設から得られた膠様滴状角膜変性症患者の臨床データを一括して解析し、近親婚の有無、発症年齢、遺伝子変異型、臨床病型などの疫学的検討を行った。また本疾患に対する角膜移植術について、術式毎の治療成績や合併症の有無、ソフトコンタクトレンズ装用の有無による術後の再発の有無、再発までの期間について検討した。結果として膠様滴状角膜変性症患

者のほぼ半数で近親婚がみられること、本疾患の発症年齢については80%弱が20歳までに発症すること、遺伝子型についてはp.Gln118Xが80%以上を占める事、臨床病型については、Typical mulberry typeが全体の約80%を占めることが明かとなった。術式毎の治療成績については、ほぼすべての術式で視力改善が得られたが、緑内障の合併がPTK<LTPおよびDLKP<PKPの順で高くなる傾向が明かとなった。またソフトコンタクトレンズ装用によって術後の再発が著明に抑制されることが明かとなったが、この知見は本疾患の治療を考える上で極めて重要なものと言える。これらの結果をもとに標準的治療レジメンを作成した。

#### D. 考案

1. 我が国における膠様滴状角膜変性症の疫学、臨床像、治療経過について  
本研究で、膠様滴状角膜変性症患者のほぼ半数で近親婚がみられたが、従来から言われている様に、近親婚が我が国において本疾患が多い主な理由であることがあらためて浮き彫りとなった。本疾患の発症年齢については80%弱が20歳までに発症しており、本疾患の患者のQOLに与える影響がいかに甚大かつ長期にわたるものであるかが明確となった。遺伝子型についてはp.Gln118Xが80%以上を占め、我が国においてこの遺伝子変異を持つ患者および保因者の存在が多い事が明白となった。p.Gln118X遺伝子変異

は創始者変異であることが知られており、近親婚とともに本疾患の有病率が諸外国に比べ我が国で高い理由となっているものと推察された。臨床病型については、Ideらの報告ではTypical mulberryとBand keratopathy typeが主で、それらはほぼ同程度の存在率であったが、本研究ではTypical mulberry typeが全体の約80%を占める結果となった。Ideらの検討した症例数が10例20眼であったことを考慮すると、本研究結果の方が我が国における分布としてはより真値に近いものと推察される。術式毎の治療成績については、ほぼすべての術式で視力改善が得られたが、緑内障の合併がPTK<LTPおよびDLKP<PKPの順で高くなる傾向が見られた。これは主に術後の経口ないし点眼ステロイド剤の影響であると考えられる。特にPKPの場合は角膜内皮細胞の拒絶反応を抑える必要があるため、ステロイド剤の総投与量が他の術式に比べ多くなってしまいう傾向がありこのような結果を来したものと推察される。術式の性質上、一度PKPを施行すると以後はPKPしか施行できなくなるため、安易にPKPを施行することは絶対に避けなくてはならず、可能な限り侵襲の少ない治療を選択することが合併症を防ぐ上で最も重要な要件であると考えられた。総じて、本疾患の治療の際にはアドホックな治療を場当たりの行うのではなく、治療初期から長期予後を見越した綿密な治療計画を作成すべきであると言える。ソフトコンタク

トレンズ装用によって術後の再発が著明に抑制されるという知見は本疾患の治療を考える上で極めて重要なものと言える。今回は検討できなかったが、ソフトコンタクトレンズ装用が術後の再発抑制だけではなく、本疾患の進行予防の上でも効果がある可能性が高く、今後検討すべきと項目と言える。またその治療的効果のメカニズムについては現時点では不明で、解明することでソフトコンタクトレンズの本疾患治療への最適化あるいは全く新しい治療法の開発につながる可能性がある。これらは次年度の研究計画として申請中である。

## 2. 膠様滴状角膜変性症の分子病態について

本研究によって TACSTD2 タンパクはクローディン1および7がユビキチン・プロテアソーム経路のタンパク分解を受けるのに対し阻害的に働き、これらのタンパク安定性を高めることでタイトジャンクションの形成に対し促進的に働いていることが明らかとなった。このことから膠様滴状角膜変性症の病態は、TACSTD2 遺伝子の両アリルにおける機能喪失型変異によりクローディン1および7のタンパク分解を来し、次いでタイトジャンクションの形成不全が起こり、最終的に角膜上皮バリア機能の著明な低下を来すものと推測された。このことから、プロテアソーム阻害剤を用いてクローディン1および7の分解を抑

制することで対症的ではあるものの治療効果が得られるのではないかと推測された。

## E. 結論

膠様滴状角膜変性症では TACSTD2 遺伝子の機能喪失型変異によりクローディン1および7のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかとなった。また膠様滴状角膜変性症の疫学、臨床像、治療成績について検討し、次ページに示す標準的治療レジメンを作成した。また角膜移植術後の再発抑制にはソフトコンタクトレンズの装用が極めて有効であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表（平成 22 年度）

論文発表

巻末研究成果一覧表参照

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案特許

なし

### 3. その他

なし

[Ⅲ]

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
課題「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

### 分担研究報告書

「膠様滴状角膜変性症の分子病態の解明」

研究分担者 川崎 諭 京都府立医科大学眼科学教室 助教  
研究協力者 篠宮克彦 京都府立医科大学眼科学教室 特任助教  
福岡秀紀 京都府立医科大学眼科学教室 大学院生

#### 【研究要旨】

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し、責任遺伝子として1999年に辻川らによってTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらその病態の詳細は未だ不明で、また希な疾患であるため臨床的にも様々な点において不明な状況が続いている。本研究では本疾患の病態について分子レベルの解明を試みた。その成果として膠様滴状角膜変性症ではTACSTD2遺伝子の機能喪失型変異によりクローデイン1および7のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し発症頻度は稀であるが、日本人特有の疾患であることから大阪大学の辻川らによってその責任遺伝子としてTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらTACSTD2遺伝子変異がいかんして本疾患の病態を引き起こすかについてはこれまで不明であった。そこで本研究では、TACSTD2遺伝子変異がいかんして本疾患の病態形成に関わるかについて、分子生物学的および生化学的なアプローチによって分子レベルでの解明を試みた。

#### B. 研究方法

- 1) TACSTD2タンパクの発現について、様々な上皮組織（角膜、結膜、咽頭、食道、胃、小腸、結腸、膀胱、子宮頸部、膈）に対して免疫染色にて検討した。使用した抗体はマウスモノクローナル抗TACSTD2抗体（R&D社、clone 77220）とヤギポリクローナル抗TACSTD2抗体（R&D社）である。方法は蛍光間接法とした。
- 2) TACSTD2タンパクに対するヒトパラログ遺伝子をBLASTソフトを用いて調べたところ、EpCAMが最も類似性が高いということが明らかとなった。EpCAM遺伝子についてはタイトジャンクション構成タンパクであるク

ローディン7と直接結合して癌の進展に促進的に働くことが既に知られていた。そこで TACSTD2 タンパクがタイトジャンクション構成タンパクと直接結合するかについて免疫沈降法と Proximity ligation assay (以下 PLA) にて検討した。検討したタイトジャンクション構成タンパクは角膜上皮細胞で発現していることが既に知られているクローディン1, 4, 7 およびオクルディンと ZO-1 とした。免疫沈降実験には SV40 Large T 抗原で不死化したヒト角膜上皮細胞

(HCE-T 細胞) を定法で培養したものを用いた。また PLA 実験にはヒトの角膜組織の凍結切片を用いた。使用した抗体はマウスモノクローナル抗クローディン1抗体 (Abnova 社、clone 1C5-D9)、マウスモノクローナル抗クローディン4抗体 (Zymed Laboratories 社、clone 3E2C1)、マウスモノクローナル抗クローディン7抗体 (Zymed Laboratories 社、clone 5D10F3)、ヤギポリクローナル抗オクルディン抗体 (Santa Cruz 社)、マウスモノクローナル抗 ZO-1 抗体

(Invitrogen 社、clone ZO1-1A12) である。また PLA には OLINK Bioscience 社の Duolink in situ PLA キットを用いた。

3) TACSTD2 遺伝子をノックダウンし、表現型の変化を検討した。ノックダウンには short hairpin RNA 発現カセットを内在するレンチウイルスベクター (Sigma 社、pLKO.1) を用い、各々の遺伝子に対する shRNA 発現用のオリゴヌクレオチドを合成、挿入したのちにクローニングして 293T 細胞をパッケージング細胞として定法にて作成した。ウイルスを HCE-T 細胞に感染後、上皮バリア機能、タイトジャン

クション関連タンパクの発現および細胞内局在について検討した。ノックダウンの成否については、リアルタイム PCR および免疫染色にて検討した。上皮バリア機能については HCE-T 細胞を 12 ウェル、 $0.4\mu\text{m}$  ポアサイズのトランスウェルに播種し、volt-ohm メーター (World Precision Instruments 社、EVOM) を用いて上下ウェル間の Trans-epithelial resistance を測定した。またタイトジャンクション構成タンパクの発現および細胞内局在については免疫染色およびウエスタンブロット法で検討した。ウエスタンブロットは化学発光法にて検出した。

4) クローディン1, 4, 7 遺伝子を上記と同じ方法で HCE-T 細胞においてノックダウンし、上皮バリア機能の変化を検討した。

5) TACSTD2 ならびにタイトジャンクション構成タンパクのほとんどの発現を欠損し、また上皮バリア機能もほとんど認められない HeLa 細胞に対して Gain-of-function 実験を行った。各々の遺伝子のフルコーディング配列を含む cDNA を PCR にて増幅し、レンチウイルスベクター (Invitrogen 社、pLenti6.3\_V5-TOPO) に挿入、クローニングして 293T 細胞をパッケージング細胞として定法にて作成した。導入遺伝子は TACSTD2、クローディン1, 4, 7 とした。HeLa 細胞に感染後、それら遺伝子の発現を免疫染色にて検討した。また HeLa 細胞にクローディン1, 4, 7 を遺伝子導入した後に、プロテアソーム阻害剤である MG-132 で処理し、それらのタンパクの発現を免疫染色およびウエスタンブロットで検討した。

6) タイトジャンクション構成タンパクの発現について正常角膜組織

および膠様滴状角膜変性症患者角膜組織で免疫染色とウエスタンブロットおよびリアルタイムPCRを用いて比較検討した。リアルタイムPCRに用いたRNAは角膜凍結切片からLaser microcapture法にて選択採取した上皮細胞とした。

7) TACSTD2タンパクがデスモゾームとの間に機能的共役を持つかどうかについて免疫染色、PLA法、免疫電子顕微鏡にて検討した。使用した抗体はマウスモノクローナル抗デスモプラキン抗体(Progen社、clone DP I/II 236.23.1)、マウスモノクローナル抗デスモコリン抗体(LifeSpan BioSciences社、clone 3G130)、マウスモノクローナル抗デスモグレイン抗体(American Research Products社、clone G129)である。

8) ラクトフェリンタンパクを様々な条件下でチオフラビンTとともにインキュベーションして、アミロイド形成過程をモニタリングする。

9) TACSTD2タンパクの膜貫通領域のペプチドを蛍光標識し、DMSOなどの両親媒性試薬に溶解したうえでHCE-T細胞に投与して細胞膜に組み込まれるかどうかについて検討する。

### C. 研究結果

TACSTD2は角膜を含む重層扁平上皮細胞ではほぼ全層の細胞膜にその発現を認めたが、胃、結腸などの単層上皮や膀胱などの移行上皮では発現していなかった。

免疫沈降およびPLA実験ではTACSTD2はクロードイン1および7と結合することが明らかとなった。

Loss-of-function実験にてTACSTD2をHCE-T細胞においてノック

ダウンすると、クロードイン1および7の発現低下を認め、その他のタイトジャンクション構成タンパクについては細胞内局在が変化していた。

Gain-of-function実験において、クロードイン1および7をHeLa細胞に遺伝子導入しても低レベルの発現しか得られなかったが、TACSTD2とともに共導入するとそれらの発現量は著明に増加した。またクロードイン1および7を導入したHeLa細胞をプロテアソーム阻害剤であるMG-132にて処理するとそれらの発現が著明に増加した。(図1参照)

膠様滴状角膜変性症患者の角膜組織では、正常角膜組織と比較しタイトジャンクション構成タンパクの発現はタンパクレベルでは著明に低下していたが、mRNAレベルではほぼ同じであった。またTACSTD2タンパクとデスモゾームとの機能的共役については免疫電子顕微鏡およびPLAの結果から否定的であった。

アミロイド形成過程の検討については、チオフラビンTを使ったアミロイド形成過程のリアルタイム観察の準備を行っている段階で、まだ有意な結果は得られていない。また最小機能ペプチドによる治療可能性についての検討については、ペプチドデザイン(クロードインタンパクとの結合能を持つと考えられるAxxxGモチーフを含む膜貫通領域に膜透過配列として知られるTAT配列を融合させたもの)を終えたが、その効果を判定するためのTACSTD2非発現上皮細胞の樹立において難航している。当初、TACSTD2遺伝子を内因性に発現する角膜上皮細胞の不死化細胞株であるHCE-T細胞にTACSTD2遺伝子のshRNA発現レンチウイルスを感染させて目的の細胞とす

る予定であったが、TACSTD2 遺伝子のノックダウンによって同細胞の細胞増殖能が低下することが判明し樹立には至っていない。現在 SV40 large T antigen 遺伝子と hTERT 遺伝子のレンチウイルスによる遺伝子導入でヒト結膜上皮細胞の不死化が効率的に行えることを確認しており、膠様滴状角膜変性症患者の角膜ないし結膜上皮細胞をこの手法で不死化することで目的の細胞を得られるものと考えている。(図 2 参照)

#### D. 考案

本研究によって TACSTD2 タンパクはクロードイン 1 および 7 がユビキチン・プロテアソーム経路のタンパク分解を受けるのに対し阻害的に働き、これらのタンパク安定性を高めることでタイトジャンクションの形成に対し促進的に働いていることが明らかとなった。このことから膠様滴状角膜変性症の病態は、TACSTD2 遺伝子の両アリルにおける機能喪失型変異によりクロードイン 1 および 7 のタンパク分解を来し、次いでタイトジャンクションの形成不全が起こり、最終的に角膜上皮バリア機能の著明な低下を来すものと推測された。このことから、プロテアソーム阻害剤を用いてクロードイン 1 および 7 の分解を抑制することで対症的ではあるものの治療効果が得られるのではないかと推測された。

#### E. 結論

膠様滴状角膜変性症では TACSTD2 遺伝子の機能喪失型変異によりクロードイン 1 および 7 のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不

全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表 (平成 22 年度)

##### 1. 論文発表

1. Fukuoka H, Kawasaki S, Yamasaki K, et al. Lattice corneal dystrophy type IV (p.Leu527Arg) is caused by a founder mutation of the TGFBI gene in a single Japanese ancestor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:4523-4530.

2. Kawasaki S, Yagi H, Yamasaki K, Matsuda A, Takeda K, Kinoshita S. A novel mutation of the TGFBI gene causing a lattice corneal dystrophy with deep stromal involvement. *Br J Ophthalmol.* 95:150-151.

3. Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, et al. Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Am J Pathol.* 177:1344-1355.

##### 2. 学会発表

1. Kawasaki S, Nakatsukasa M, Yamasaki K, Fukuoka H, Matsuda A, Tsujikawa M, Tanioka H, Hamuro J, Kinoshita S TACSTD2 Protein Directly Binds to Claudin



Proteins and is Required for the Proper Subcellular Localization of Tight Junction-Related Proteins; Roles of TACSTD2 Protein in the Pathogenesis of Gelatinous Drop-Like Dystrophy. ARVO

2010.5.5 Florida USA

2. 中司美奈、川崎諭、山崎健太、福岡秀紀、松田彰、辻川元一、谷岡秀敏、永田真帆、羽室淳爾、木下茂

TACSTD2のタイトジャンクションにおける機能的意義 第114回日本眼科学会総会 2010年4月16日 名古屋

3. 川崎諭、中司美奈、山崎健太、福岡秀紀、木下茂、松田彰、辻川元一

TACSTD2遺伝子の膠様滴状角膜ジストロフィーにおける分子病理学的意義 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会

2010年12月10日 神戸

4. Kawasaki S Functional Association of the TACSTD2 with Tight Junction Proteins. The 2<sup>nd</sup> Asia Cornea Society 2010.12.2 Kyoto Japan

5. 中司美奈、川崎諭、山崎健太、福岡秀紀、松田彰、辻川元一、谷岡秀敏、羽室淳爾、木下茂 TACSTD2 遺伝子の膠様滴状角膜ジストロフィーにおける分子病理学的意義 第35回日本角膜学会総会 2011年2月17日 東京

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案特許  
なし
3. その他  
なし

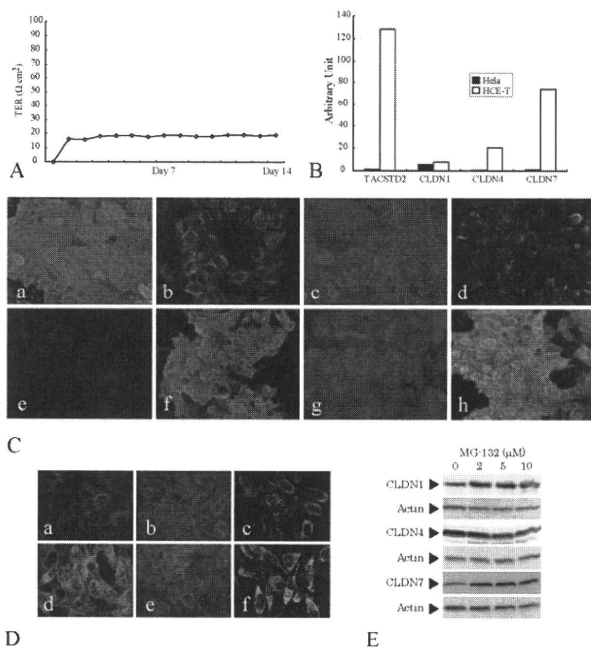


図 1

A: HeLa 細胞では上皮バリア機能はほとんど認められない。B: HeLa 細胞ではタイトジャンクション構成タンパクのほとんどの発現を欠損している。C: TACSTD2 遺伝子の共導入によって (f, g, h) クローディン1 (b, f)、7 (d, h) の発現は著明に増加したがクローディン4 (c, g) については変化は認められなかった。D: MG-132 の処理 (d, e, f) によってクローディン1 (a, d)、7 (c, f) の発現は著明に増加したがクローディン4 (b, e) については変化は認められなかった。E: D のウェスタンブロットによるバリデーション実験でも同様の結果が得られた。

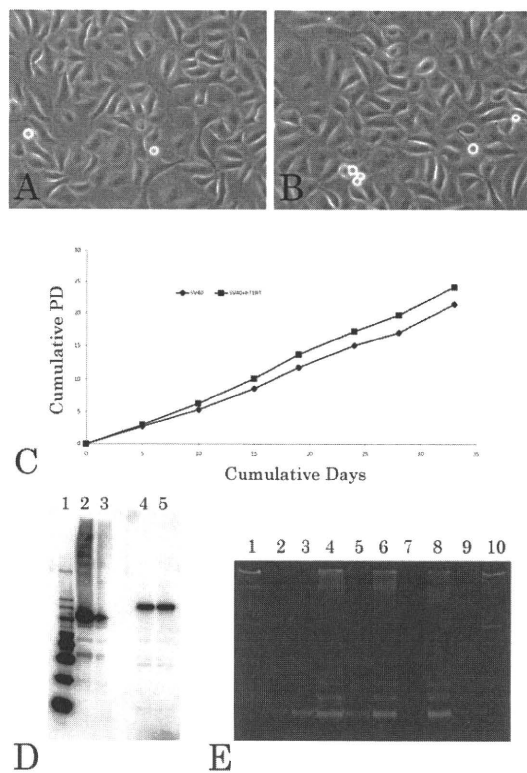


図 2

A: 結膜上皮細胞を酵素処理して分散し、抗 N-cadherin 抗体を用いて幹細胞フラクションをソーティングし SV40 large T antigen 遺伝子発現レンチウイルスを感染させた。B: A と同様に調整した結膜上皮幹細胞に SV40 large T antigen 遺伝子および hTERT 遺伝子発現レンチウイルスを共感染させた。C: A および B の細胞の Population Doubling 解析。両細胞ともに通常の上皮細胞の培養限界をはるかに超えて培養できている。D: A および B の細胞における hTERT および SV40 large T antigen 遺伝子の発現をウェスタンブロットで確認した。(1: サイズマーカー、2, 4: SV40 large T antigen 遺伝子を導入した結膜上皮細胞、3, 5: SV40 large T antigen および hTERT 遺伝子を導入した結膜上皮細胞、2, 3 は SV40 large T antigen に対してブロット、4, 5 は hTERT に対してブロットした。) hTERT 遺伝子を導入しなくても hTERT 遺伝子の自然獲得が認められた。E: A および B の細胞におけるテロメラーゼ活性を TRAP アッセイにて検出した。(1, 10: サイズマーカー、2: Dw、3, 5, 7: heat denatured samples、4: SV40 large T antigen 遺伝子を導入した結膜上皮細胞、6: SV40 large T antigen および hTERT 遺伝子を導入した結膜上皮細胞、8: HaCaT 細胞)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
「膠様滴状角膜変性背用の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

分担研究報告書

「膠様滴状角膜変性新規治療の創出のための基礎的研究」

|       |       |               |     |
|-------|-------|---------------|-----|
| 分担研究者 | 村上晶   | 順天堂大学医学部眼科学教室 | 教授  |
| 研究協力者 | 海老原伸行 | 順天堂大学医学部眼科学教室 | 准教授 |
|       | 松田彰   | 順天堂大学医学部眼科学教室 | 准教授 |
|       | 舟木俊成  | 順天堂大学医学部眼科学教室 | 准教授 |

**【研究要旨】**

膠様滴状角膜ジストロフィ（以下 GDL D）は常染色体劣性遺伝の遺伝形式をもち、重篤な視力障害をきたす遺伝病である。この疾患の罹患者の多くは日本人であるが、我々は、これまでに中国人家系とベトナム人家系にも GDL D 患者が存在することを遺伝学的解析も含めて報告しており、GDL D は少なくともアジア人種に共通してみられる疾患であると考えられ、我々日本人がその病態メカニズムを解明することの波及効果は大きいものと考えられる。本研究では順天堂医院に通院歴のある GDL D 患者の臨床像、遺伝的解析の結果を明らかにし、班全体として GDL D の臨床像、治療方法を中心とした疫学的情報を得ることに貢献し、さらに治療法の一つとして、臨床的に試みられているソフトコンタクトレンズ装用の有効性について少数例のプレリミナリーな解析を試みた。

**A. 研究目的**

- 1) 順天堂大学医学部眼科における膠様滴状ジストロフィ（以下 GDL D）の臨床的検討  
希少な疾患である GDL D の疫学の調査、および標準的治療レジメの確立を行うため、順天堂大学医学部眼科における GDL D 症例をレトロスペクティブに調査した。
- 2) GDL D 患者に対するソフトコンタクトレンズ装用の有効性に関する検討

GDL D は、角膜実質に混濁が進行すれば、表層角膜移植術の適応となる。しかし表層角膜移植を行っても術後 1～2 年で再発を認めることが多い。術後の再発の抑制にはソフトコンタクトレンズを装用することが、有効であるとされてきた。本研究では、表層角膜移植後ソフトコンタクトレンズ装用の有無と再発までの期間について 5 例 10 眼について、検討をおこなった。

**B. 研究方法**

1) 順天堂大学医学部眼科における GDL D の臨床的検討  
順天堂大学眼科における GDL D に対する臨床像、治療方法等を本研究事業における研究代表者が指定したフォーマットに従い調査し、報告した。また、遺伝子解析の結果も臨床像と合わせて報告した。

2) GDL D 患者に対するソフトコンタクトレンズ装用の有効性に関する検討

TACSTD2 遺伝子変異をもった 5 家系 5 症例 10 眼（男性 3 例、女性 2 例：平均 48.6 歳）について、角膜表層移植術の回数、ソフトコンタクトレンズ使用の有無、再発（層間の混濁、血管侵入）までの期間について Retrospective に検討した。

（倫理面への配慮）

本研究では患者への介入は一切行っておらず、研究による危険性は一切ないと言える。

### C. 研究結果

1) 順天堂大学医学部眼科における GDL D 患者の臨床的検討  
順天堂大学に通院中である GDL D 患者は 8 名で、うち 7 名が p.Gln118X 変異であり、残る 1 名が p.Lys84X と p.Cys108Arg のヘテロ接合コンパウンド変異であった。これら 8 人について、その時点の臨床像および経時的データを入手、記載した。

2) GDL D 患者に対するソフトコンタクトレンズ装用の有効性に関する検討

表層角膜移植の回数は平均 2.8 回（1~4 回）であった。平均再発期間はソフトコンタクトレンズを装用していない群では 489±200 日、装用している群では 618±217 日と装用していない群で再発が早期に起こる傾向が認められた。また装用群では、2 例 2 眼において現在でも再発を認めていない。（表 1、図 1 を参照）

### D. 考案

1) 詳細は総合研究報告書にゆずるが、GDL D の原因変異として、TACSTD2 遺伝子における p.Gln118X が 8 例中 7 例において認められた。

2) ソフトコンタクトレンズは表層角膜移植後の再発防止に対して有効であろうことがしめされた。

### E. 結論

当科に通院歴のある GDL D 患者の臨床像と治療歴のデータを収集し、病因の解析と標準的治療レジメの確立に貢献した。また GDL D 患者に対する治療としてソフトコンタクトレンズが有用である可能性が少数例の検討から示唆された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 学会発表

1. Ohtomo K, Ebihara N, Matsuda A, Tokura T, Funaki T, Murakami A. Role of TGF- $\beta$  in tissue eosinophilia