

図 31 I 型コラーゲンシートを基質として作製したサル培養角膜内皮シート。

A : 細胞密度は約 2,800 個/mm<sup>2</sup>で、角膜内皮細胞として良好な形態を維持していた(アリザリン染色写真)。免疫染色により、角膜内皮細胞の機能に関連する蛋白質である zonula occludens(ZO)-1(B)および Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase(C)を発現していた(緑)。スケールバーは、50 μm(A), 30 μm(B, C)。

(文献 102 より許可を得て転載)

キャピラリー電気泳動/質量分析計などを用いる解析技術の発展により、微量検体での網羅的アミノ酸解析が可能となった。

我々は、体液中の微量アミノ酸の解析技術を確立した味の素社の研究者との共同研究により、眼表面疾患患者および年齢、性別を異にする正常ボランティアより採取した涙液、ドライアイ患者や眼精疲労モデルボランティアより採取した涙液を用いて 23 種のアミノ酸を網羅的に解析した。その結果、涙液中のアミノ酸プロファイルは血漿とはまったく異なるものであった。炎症眼において高度に発現が亢進していたアミノ酸は酸化型のレドックス応答と考えられ、眼局所の炎症を抑制する方向に涙液のアミノ酸プロファイルがシフトしていると推測された。Stevens-Johnson 症候群、化学外傷、熱傷など炎症を伴う眼表面疾患では、正常あるいは非炎症性疾患に比べて Tau, Arg, Orn, Glu, Gln, Gly, Ala, Ser の濃度が著しく増加していることが判明した。眼表面炎症疾患では Arg が arginase により Orn に代謝される酸化型レドックス応答が明瞭であった(論文投稿中)。図 30 にクラスター解析の結果を例示する。23 種アミノ酸の濃度によってクラスター解析したものであり、上位に Stevens-Johnson 症候群、化学外傷などの難治性、炎症性疾患が位置した。この中には炎症疾患であるものの、臨床所見上は炎症のない時期の症例も含まれたことは興味深い。涙液中に存在する種々のアミノ酸は血漿とは異なる濃度で存在し、炎症制御、創傷治癒、感染防御、血管新生、免疫応答に深く関与している可能性が高いと考え

られた。

眼疾患とアミノ酸発現プロファイルとの関係が詳細に明らかになれば、生体にとって安全なアミノ酸を補充することは容易であることから、眼疾患の新しい具体的治療に結びつく可能性がある。例えば、難治性の眼表面疾患の多くは重症ドライアイを伴っているが、治療のために用いられる人工涙液にはアミノ酸が配合されていない。このため人工涙液の点眼が、眼表面のホメオスタシスを大きく変動させている可能性がある。アミノ酸は、腸管粘膜上皮細胞において解明されている研究から概想すると、眼表面の感染防御や創傷治癒にも関与している可能性が高く、本研究は新規な治療用点眼薬、眼科用薬の開発につながり、新しい概念の眼科治療に結びつく可能性がある。また眼科において、全身疾患での血液検査、髄液検査に該当するように、涙液を用いたアミノ酸発現プロファイルの有用性が明らかになれば、客観的な病態把握が可能となり、眼疾患の病態あるいは疾患ステージを客観的に判断できる新しい診断技術の開発につながる可能性がある。

## VII 角膜内皮障害の治療

### 1. 研究の背景

ヒトやサルなどの霊長類の角膜内皮細胞は、生体内における増殖能がきわめて乏しいことが知られており、種々の原因によって角膜内皮細胞が広範に障害されると水疱性角膜症による重篤な視力障害を来す。水疱性角膜症は、先進諸国における角膜移植の主要原因疾患であ

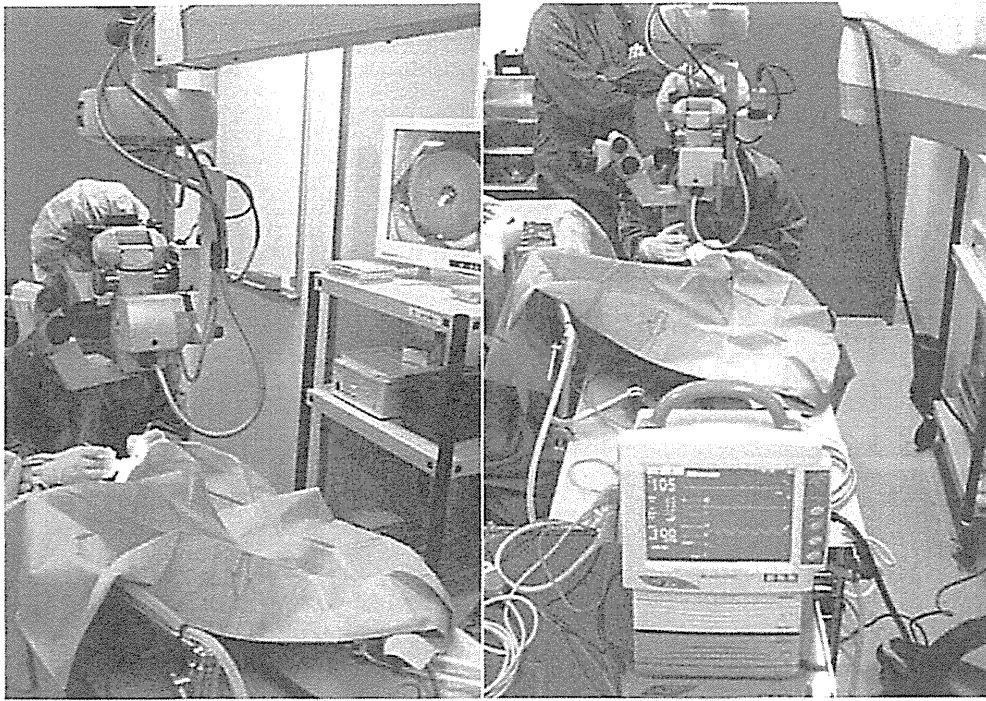


図 32 霊長類を用いた移植実験。

ヒトの角膜移植に準じる設備を用いてカニクイザルの移植実験を行っている(滋賀医科大学動物生命科学研究所にて)。

(文献 104 より許可を得て転載)

り<sup>23)</sup><sup>100)</sup>、今後ますます増加することが予想されている。水疱性角膜症に対する治療法としては、Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) あるいは Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK) と呼ばれる角膜内皮移植術が、全層角膜移植に代わる水疱性角膜症の外科的治療法として急速に広まりつつある。DSAEK や DMEK には、角膜乱視が少なく早期に視力回復が得られるメリットがある一方で、周辺部の角膜内皮細胞も障害されている水疱性角膜症においては、移植後の角膜内皮細胞密度の低下が問題となることは全層角膜移植と同様である。このような背景のもとに、我々は水疱性角膜症に対する新規治療法の開発を目指して、生体外で培養した角膜内皮細胞を用いた再生医学的治療法の開発に取り組んできた<sup>101)</sup>。特に昨今では、ヒトへの臨床応用を目指した角膜内皮研究を行うためには、生体内における角膜内皮細胞の増殖能が乏しいサルを用いた移植実験が必要であると考え、サル水疱性角膜症モデルを用いた研究を行っている<sup>102)~104)</sup>。

## 2. カニクイザル培養角膜内皮シートの作製と移植術

カニクイザルの角膜から角膜内皮細胞を採取し、コーティングを施した細胞培養用プレート上に播種して初代培養を行った。さらに 3, 4 継代培養した角膜内皮細胞を I 型コラーゲンシートに播種し、培養角膜内皮細胞シートを作製した。培養には、ウシ胎仔血清 (FBS)、bFGF (basic fibroblast growth factor) を加えた DMEM 培地を用いている。I 型コラーゲンシート上で培養した

カニクイザル角膜内皮細胞は、細胞密度約 2,800 個/mm<sup>2</sup>の六角形細胞を主とする多角形細胞からなり、角膜内皮細胞のバリアー機能およびポンプ機能に関連する蛋白質を発現していることを確認した<sup>102)</sup>(図 31)。

全身麻酔下で、カニクイザルの角膜内皮細胞を可能な限り周辺部まで機械的搔爬により除去し、直径 6 mm の培養サル角膜内皮シートを角膜裏面に移植した(図 32)。培養角膜内皮シート移植眼では、翌日にはすべての個体で培養角膜内皮シートがホストの Descemet 膜に接着しており、角膜浮腫は軽度であった。2 週間には移植した培養角膜内皮シートが前房内に脱落したにもかかわらず、ホストの角膜は良好な透明性を回復した(図 33)。我々は DiI 標識シート移植眼の観察により、DiI 陽性のドナー角膜内皮細胞が、移植後眼の Descemet 膜上に生着していることを確認した<sup>102)</sup>。本実験の結果から、間接的にはあるが、移植したドナーの角膜内皮細胞が移植後の眼内で増殖し、ホスト眼の Descemet 膜上に移動し生着した可能性が示唆された。一方、コラーゲンシートのみを移植、あるいは培養サル角膜内皮細胞の懸濁液の前房内注入を行った対照眼では、移植翌日から著明な角膜浮腫を認め、その後も角膜は透明性を回復することなく水疱性角膜症となった。このことは、過去に報告されているとおり、生体内におけるカニクイザル角膜内皮細胞の増殖能は限られており、周辺部に残存したホストの角膜内皮細胞のみからでは角膜の透明性を回復することができず、角膜内皮再生医療研究を行ううえでの有用

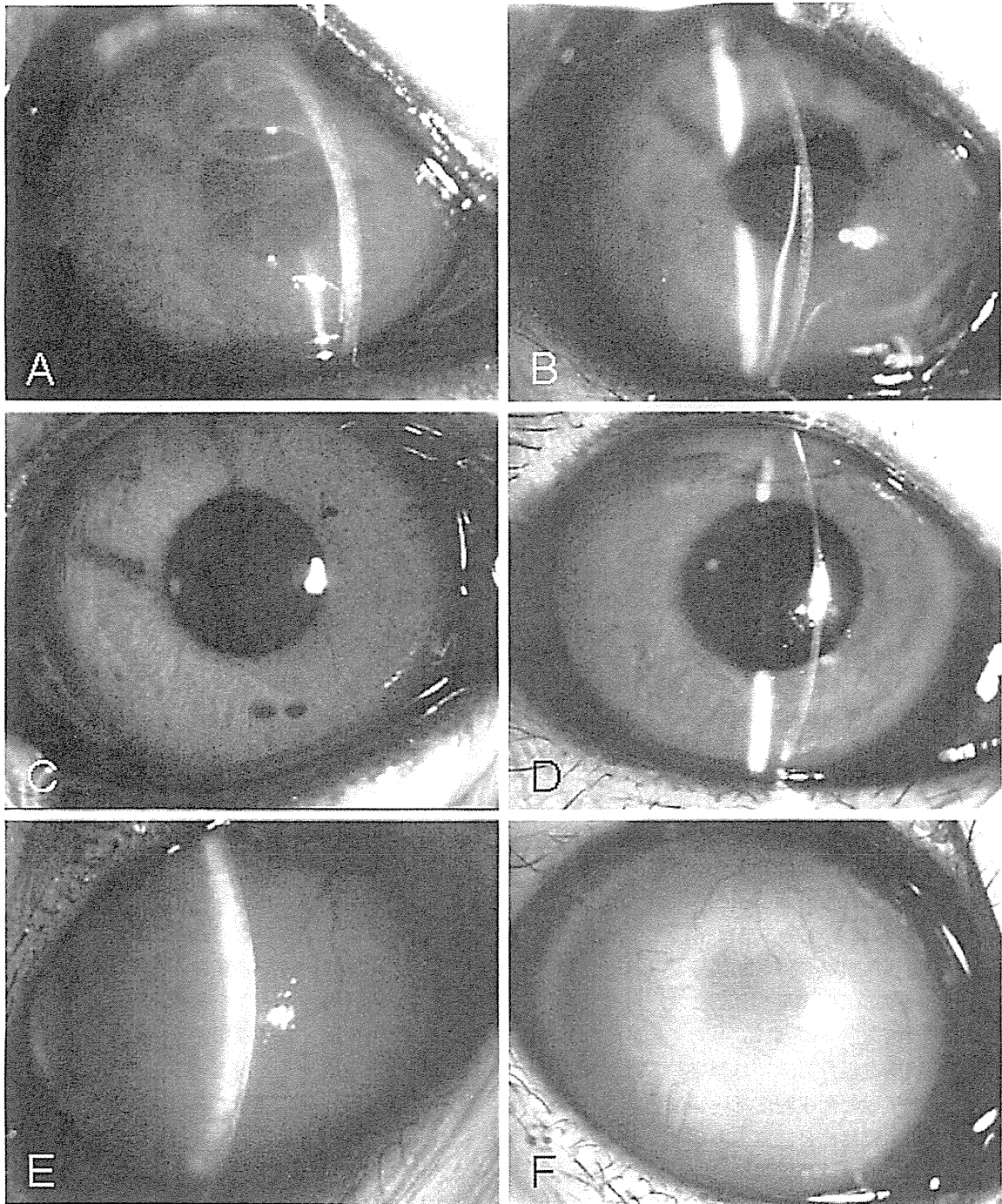


図 33 サル培養角膜内皮シート移植術.

A: 移植後の培養角膜内皮シートは角膜裏面に良好に接着し、角膜浮腫は軽度であった。B: 移植 14 日後には角膜は透明性を回復したが、培養角膜内皮シートは前房内に脱落した。C: 移植 6 か月後にも角膜は透明性を維持した(脱落したシートは摘出)。D: 培養内皮シート移植を行った別の個体でも同様の経過をたどり、6 か月まで角膜は透明性を維持した。E: コラーゲンシート移植のみを行った対照眼では、6 か月後には強い角膜浮腫と血管新生を認めた。F: 培養角膜内皮細胞の懸濁液を前房注入した対照眼でも、6 か月後には同様に強い角膜浮腫と血管新生を認めた。これらの対照眼では、いずれも手術後早期から不可逆性の角膜内皮機能不全となり、1 年以上にわたって回復することはなく、ヒトの水疱性角膜症と類似した経過となった。

(文献 102 より許可を得て転載)

な動物モデルとなることを示している。培養角膜内皮シート移植眼では、移植後 6 か月の角膜内皮スペキュラーで  $1,992 \sim 2,475$  個/mm<sup>2</sup> の正常角膜内皮細胞に類

似した多角形細胞が観察され、摘出した角膜組織の電子顕微鏡による観察でも、形態的に正常角膜に類似した多角形細胞が認められた。長期観察を行っている個体で

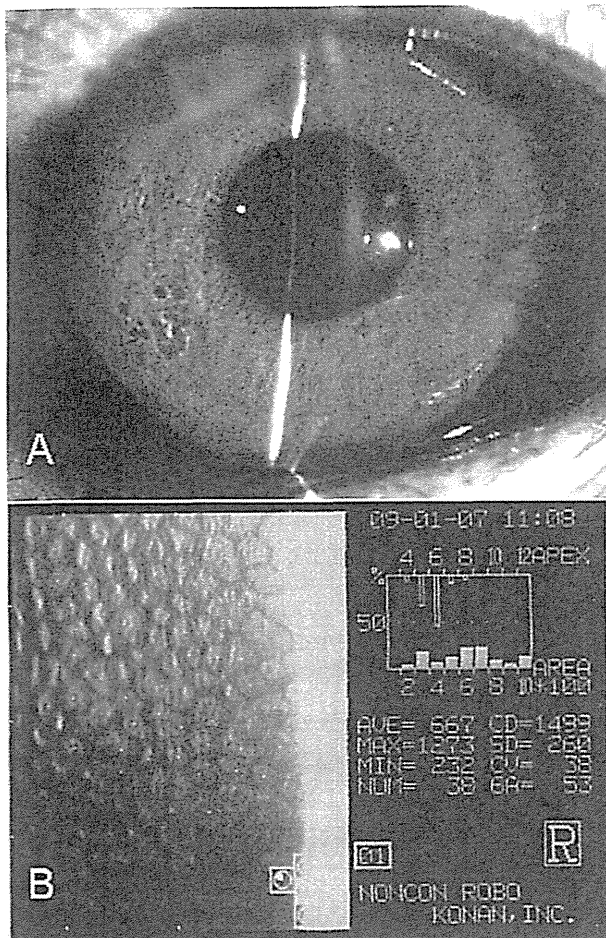


図 34 サル培養角膜内皮シート移植後 4 年の角膜所見。角膜は透明性を維持しており(A), 内皮スペキュラーでは密度約 1,500 個/mm<sup>2</sup>の角膜内皮細胞が観察された(B)。

(文献 104 より許可を得て転載)

は、移植後 4 年が経過した現在も透明角膜を維持しており、培養角膜内皮シート移植の長期の有用性を示唆している<sup>102)</sup>(図 34)。

現在我々は、マイクロケラトームを用いて作製したヒト角膜実質グラフトを基質として、DSAEK に準じる手法でサル培養角膜内皮細胞シートを移植<sup>102)</sup>する、培養 DSAEK の開発に着手しており、ウサギおよびカニクザルを用いた移植実験で角膜が透明性を回復する結果を得ている<sup>105)</sup>。培養角膜内皮シート移植では、増殖能力が高く細胞機能の良いドナー角膜内皮細胞をマスター細胞として移植用内皮シートを作製できること、高密度に培養した角膜内皮シートを移植することができること、移植後の眼内においても一定の期間、増殖能をもち続ける角膜内皮シートを移植することができること、さらに HLA を適合させることができることなどのメリットがあると考えられ、今後も臨床応用を目指した研究を進めたいと考えている。

### 3. 選択的 Rho キナーゼ阻害剤を用いた霊長類角膜内皮細胞培養法の確立

サルを用いた研究で上記のような成果が得られている一方で、我々の方法ではヒト角膜内皮培養法の確立は容易ではなかった。ヒト角膜内皮細胞を *in vitro* で培養することが可能であることは過去に報告されているが、我々の培養条件では *in vitro* で培養したヒト角膜内皮細胞を継代培養すると、容易に線維芽細胞様の形態に変化してしまった。そこで我々は、ヒト角膜内皮細胞を正常の形態を保持したまま、効率的に培養することを目指して、薬剤の併用や培養方法の改良を行っている。その一つは、ヒト胚性幹細胞の培養に対する有用性が報告されている選択的 Rho キナーゼ阻害剤の一種である Y-27632 である<sup>106)</sup>。Rho キナーゼは低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的蛋白質として同定されたセリンスレオニンリン酸化酵素である<sup>107)108)</sup>。最近の研究では、Rho キナーゼをターゲットとした種々の薬剤の開発が行われており、心血管系疾患、神経疾患、癌、緑内障などさまざまな疾患に対して選択的 Rho キナーゼ阻害剤の有用性が報告されている。そこで、我々は Rho キナーゼ阻害剤による霊長類角膜内皮細胞への影響について検討した<sup>109)</sup>。

カニクザルの角膜内皮細胞を Descemet 膜とともに剥離し、ディスペパーゼを用いて回収後、培養を行った。培地は 10% FBS と 2 ng/ml bFGF を添加した DMEM 培地を対照として用いて、選択的 Rho キナーゼ阻害剤である Y-27632 を培地に加えた。Y-27632 添加群では、対照と比べて培養開始 24 時間後の接着細胞数が有意に増加し、均一な角膜内皮細胞からなる大きなサイズのコロニーが形成され、早期にコンフルエントに到達した。細胞形態も良好で、高密度で均一な六角形細胞からなる単層細胞層が得られた(図 35)。増殖細胞のマーカである Ki 67 を用いたフローサイトメトリーによる解析では、継代後 24 時間、48 時間ともに Y-27632 添加群における Ki 67 の陽性率が有意に高く、Y-27632 は角膜内皮細胞の細胞増殖を促進することが示された(図 36)。Annexin V を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシスに対する影響の検討では、継代後 24 時間の解析で、対照群では 12.4±4.6(平均値±標準偏差)% の細胞が Annexin V 陽性のアポトーシス細胞であったのに対し、Y-27632 群では Annexin V 陽性細胞の割合は 2.0±1.6% と有意に減少しており、Y-27632 は角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制することも示された(図 37)。

我々の検討において、選択的 Rho キナーゼ阻害剤である Y-27632 は、霊長類の角膜内皮細胞に対して細胞接着の促進、細胞増殖の促進、アポトーシスの抑制といった効果を有することが明らかになった。我々は、Y-27632 を培養系に用いることでヒト角膜内皮細胞を良好な形態を維持したまま効率的に培養することができるようになっており、ヒト培養角膜内皮細胞シート移植は

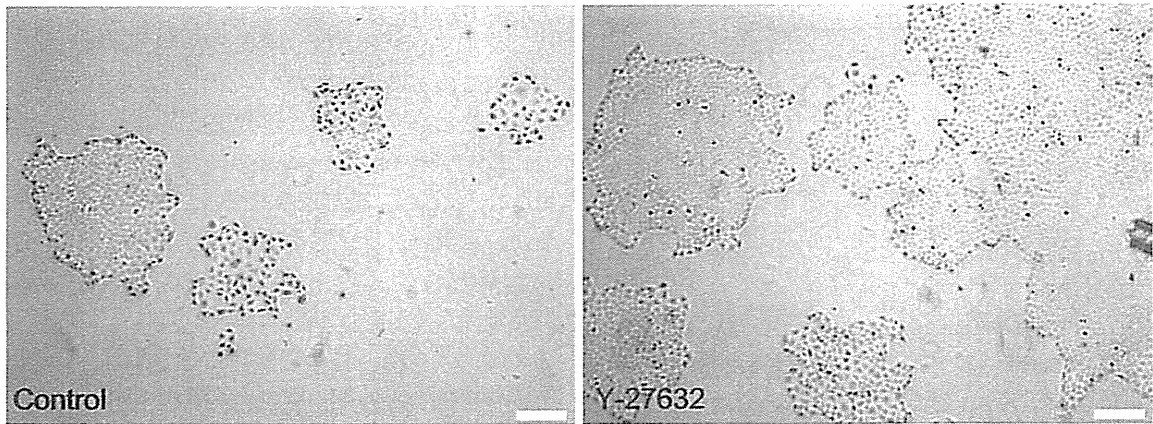


図 35 初代培養 3 日目の位相差顕微鏡写真。

Y-27632 の添加群(右)において対照(左)と比べ角膜内皮細胞のコロニーは大きく、細胞形態に特記すべき異常を認めない。スケールバーは 250 μm.

(文献 109 より許可を得て転載)

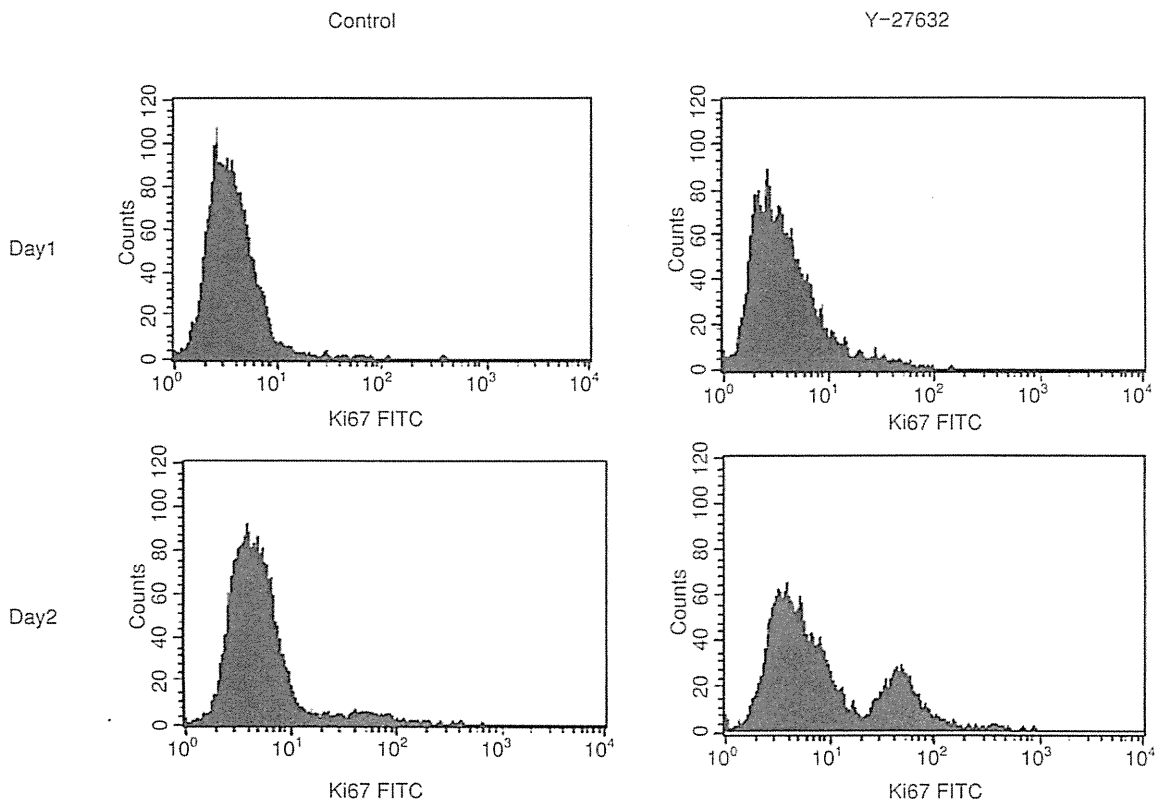


図 36 抗 Ki 67 抗体によるフローサイトメトリー。

細胞増殖のマーカーである Ki 67 の陽性率は継代後 24 時間 ( $p < 0.05$ ), 48 時間 ( $p < 0.01$ ) とともに Y-27632 群において有意に高かった。

(文献 109 より許可を得て転載)

現実味を帯びてきていると考えている。

4. 水疱性角膜症に対する新規治療法の開発の試み

我々は、水疱性角膜症を、可能であれば、低侵襲な薬物治療により治療する方法を確立したいと考えており、ある種の薬物の前房内注入や点眼投与などによる治療法の開発を試みている。ギャップジャンクションを構成する蛋白質の一つであるコネキシン 43 は、細胞結合に関

与するのみならず、さまざまな組織の創傷治癒においても重要な役割を果たしていることが知られているが、2008 年に我々のグループの中野らは、コネキシン 43 の siRNA を前房内に注入することによってラット角膜内皮細胞の創傷治癒を促進させることができることを報告した<sup>110)</sup>。コネキシン 43 siRNA の前房内投与は、角膜内皮細胞の増殖能が低いサル角膜内皮障害モデルにおい

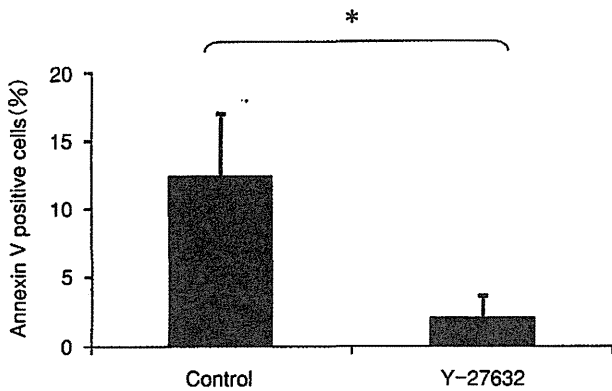


図 37 Annexin V を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシス解析。

継代後 24 時間では対照群では  $12.4 \pm 4.6$  (平均値  $\pm$  標準偏差) % の細胞が Annexin V 陽性のアポトーシス細胞であったのに対し、Y-27632 群では  $2.0 \pm 1.6$  % と有意に抑制されていた。\* :  $p < 0.01$ 。

(文献 109 より許可を得て転載)

でも同様の効果を示し、角膜内皮細胞の増殖促進、創傷治癒促進効果が認められている<sup>111)</sup>。現在、我々は、角膜内皮障害の治療に有用な新しい前房内ドラッグデリバリーシステムの開発や、先に示した選択的 Rho キナーゼ阻害剤などの細胞接着を亢進する作用をもつ薬剤を併用した、前房内細胞注入治療の開発にも着手しており、今後これらの薬物を用いた水疱性角膜症の治療が可能になると信じている。さらに、前述の選択的 Rho キナーゼ阻害剤は、*in vitro* および *in vivo* の角膜内皮障害モデルにおいて、霊長類の角膜内皮細胞を増殖させる効果があることを確認しており<sup>112)</sup>、まもなく京都府立医科大学倫理委員会の承認を得て臨床研究を開始する予定である。将来的には、角膜内皮障害を移植のみならず薬物によっても治療できる日が来ることを目標に研究を進めている。

## Ⅷ 涙液検査の近未来

### 1. 涙液量測定法の開発

ドライアイは、最近の考え方によれば、涙液と上皮の慢性疾患とされ、その上流にはさまざまなリスクファクターが存在し、眼不快感のみならず視機能異常を来すとされている<sup>113)</sup>。ドライアイの診断には、症状、涙液異常、上皮の異常の検査が必須であり、我が国では一定の診断基準が既に設けられている<sup>114)</sup>。

ドライアイの原因となる涙液異常には、量的異常と質的異常があるが、いずれも涙液の安定性の低下、ひいては眼表面の上皮障害を来す原因となる。したがって、ドライアイの的確な診断のためには、涙液の量と質の異常を正確に評価できる検査法が必要である。しかし、現行の涙液検査では、量の検査としてシルマーテスト、質の検査としてフルオレセイン BUT の測定が行われ<sup>114)</sup>、い

ずれも眼表面に対して少なからず侵襲を与える。さらに、シルマーテストは、眼表面のその場の涙液量を反映する検査法とはいいがたい。そこで、非侵襲的な涙液の評価方法として角膜形状解析や波面収差解析を応用した評価法<sup>115)116)</sup>や optical coherence tomography (OCT) を利用した涙液メニスカスの計測法<sup>117)</sup>などが開発されているが、正規のドライアイ検査に位置づけられるものとはなっていない。ごのようななかで、我々は、非侵襲かつ定量的な新しい涙液検査法の開発に取り組んできた。

まず、我々は、涙液の量的検査として、Oxford 大学との共同研究により、ビデオメニスコメトリー法を完成させた<sup>118)119)</sup>。本法は、涙液メニスカスの凹面形状に着目して、下方の涙液メニスカス中央に水平格子縞を投影し、その鏡面反射像を得る方法であり、凹面鏡の光学式に基づいて、涙液メニスカスの曲率半径(R)を非侵襲かつ非接触的に得ることができる(図 38 上段)。我々は R が、眼表面全体の涙液量と一次相関を示すことを示した<sup>118)</sup>、そのため、本法は、涙液量の検査としてドライアイに適用できるだけでなく、点眼液の薬物動態や副作用の解析にも利用できる応用範囲の広い方法と考えられる<sup>120)~122)</sup>。

### 2. 涙液油層にかかわる検査法の開発

一方、我々は、涙液油層に着目し、油層情報から、涙液の量的・質的異常を定量的に評価する方法の開発に取り組んできた。涙液油層はマイボーム腺から分泌される油脂により構成され、液層の水分蒸発を防ぐとともにその安定性を保持する働きをもつ。また、厚さ約 100 nm 程度の薄膜として振舞うため、光の反射による干渉像を得ることができる。我々は、涙液油層の干渉像を観察するための専用装置として DR-1®(興和社製)を共同開発したが、本装置により、①開瞼後の油層の伸展挙動<sup>115)</sup>、②伸展後の油層像<sup>123)</sup>(図 38 中段)、そして③開瞼維持による涙液破綻像<sup>124)</sup>の 3 つの情報を得ることができる。そこで、我々は、伸展後の油層像に着目して定性的な Grade 分類を作成し、健常眼とドライアイで Grade 分布が異なること、ドライアイの重症度と Grade との間に有意な相関があることを報告した<sup>123)</sup>。次に、開瞼維持による涙液破綻までの時間(non-invasive break-up time)を涙液の安定性の指標として、防腐剤が涙液に与える影響<sup>124)</sup>や外部環境がソフトコンタクトレンズ表面の涙液に与える影響<sup>125)</sup>の評価に応用した。

涙液油層の上方伸展は、開瞼直後に生じた油層の表面張力の勾配に基づいて引き起こされ<sup>126)</sup>、液層の厚みに依存した“粘弾性挙動”を取り、その伸展速度は  $V = (h/\mu) \cdot dT/dx$  ( $V$  = 油層の上方伸展速度、 $h$  = 液層の厚み、 $\mu$  = 液層の粘度)で記述されるという<sup>127)</sup>。一方、角膜上の涙液層の厚み(H)と涙液メニスカス曲率半径(R)の間には、 $H = 2.12 \cdot R (\mu'U/\rho)^{2/3}$  ( $H$  = 角膜上の涙液層の厚み、 $R$  = 涙液メニスカス曲率半径、 $\mu'$  = 涙液の粘度、

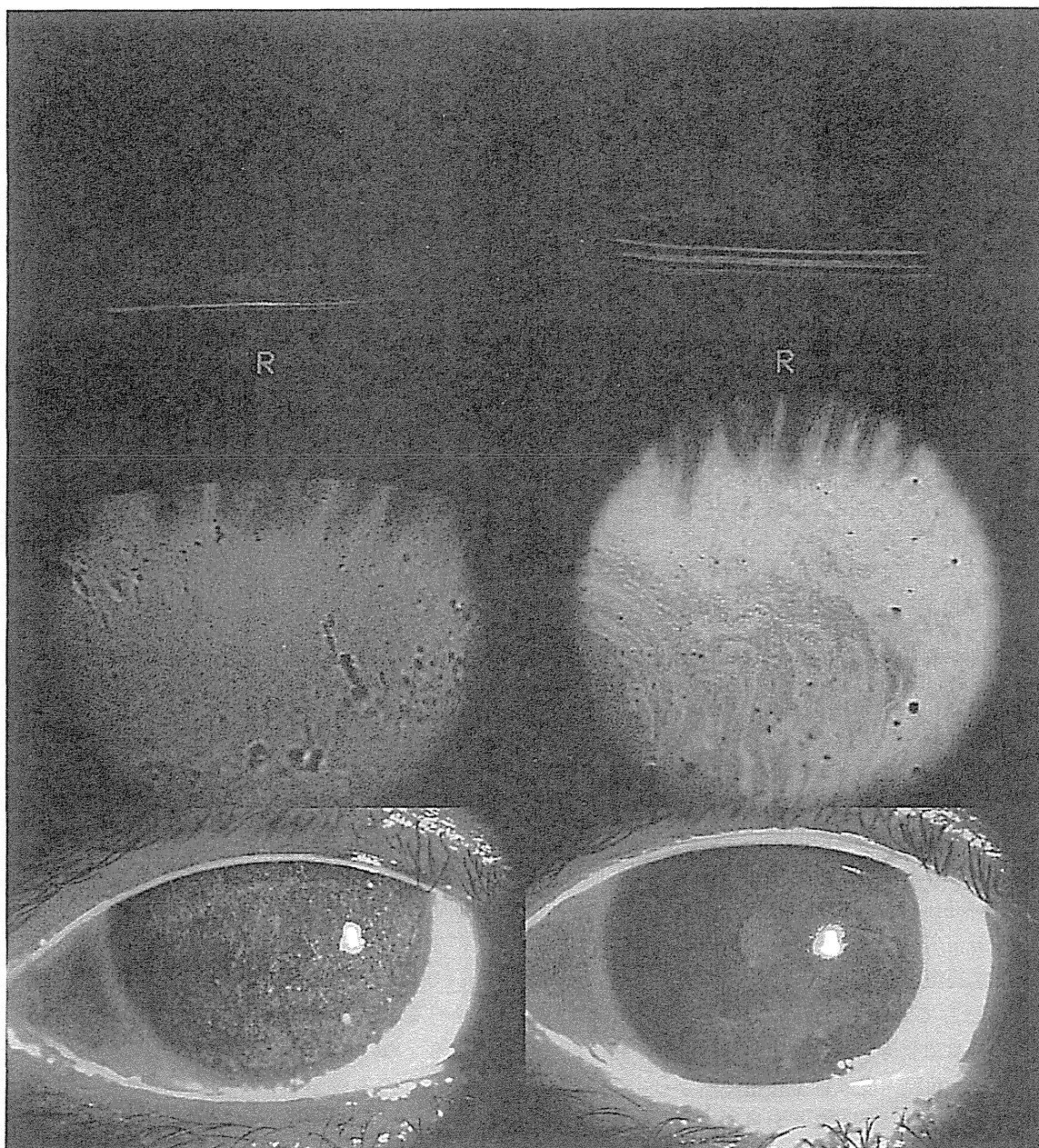


図 38 上・下の涙点プラグ挿入前(左列)・後(右列)におけるメニスコメトリーにおけるイメージ(上段)、涙液油層像(中段)、および、フルオレセイン染色像(下段)。  
涙点プラグを上・下涙点に挿入することにより、涙液貯留量は増加し〔左上段：涙液メニスカス曲率半径(R)=0.11 mm, 右上段：R=0.22 mm〕、プラグ挿入前にみられなかった(左中段)涙液油層像がみられるようになり(右中段)、高度の角膜上皮障害(左下段)が消失している(右下段)ことが分かる。

$U$  = 開眼速度,  $\rho$  = メニスカス涙液の表面張力の関係がある<sup>125)</sup>ため、 $H \approx h$  の関係から  $V = 2.12 \cdot R(\mu U / \rho)^{2/3} \cdot (dT/dx) / \mu$  の関係が得られる。そしてこのことは、油層伸展の解析により、 $R$ 、ひいては、角膜上の涙液厚の情報が得られる可能性を示している。我々は、涙液油層が粘弾性挙動を取るという仮説<sup>127)</sup>に基づいて、粘弾性挙動を取り扱う分野であるレオロジーのモデルの1つ〔Voigtモデル(図39上段)〕を涙液油層の解析に応用した。その結果、油層の上方伸展距離  $H(t)$  は、きわめて良好に Voigtモデルで近似されることが明らかになった

〔 $H(t) = \rho(1 - e^{-t/\lambda})$  ;  $H(t)$  : 伸展油層距離(mm),  $\rho$  : 定数,  $t$  : 時間(秒),  $\lambda$  : 緩和時間(秒)〕 (図39中段)。そして、油層の伸展初速度  $H'(0)$  と  $R$  の間に有意な相関があることが示された<sup>129)</sup> (図40)。このことは、涙液油層伸展に関する基礎理論<sup>127)</sup>の証明になるとともに、涙液油層の伸展挙動の Voigtモデルによる解析によって、角膜上の涙液の厚み情報が得られうる可能性を示したことになる。

ドライアイにおいては、一般に涙液と上皮の相互作用に悪循環が生じ、その悪循環の上流にさまざまなリスク

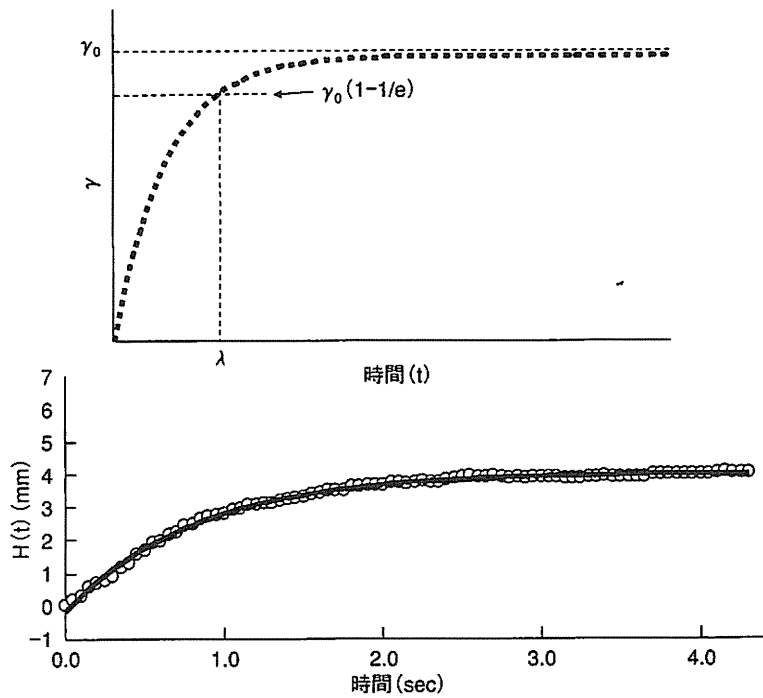


図 39 レオロジーの Voigt モデル(上段)と代表症例における開瞼後の涙液油層の上方伸展距離の経時変化(下段)。

下段グラフの実線は、Voigt モデルで描かれるグラフ。上段において、 $\gamma = \gamma_0 [1 - e^{-(t/\lambda)}]$  [ $\gamma$ : バネの伸び,  $\gamma_0$ :  $t = \infty$  のときの  $\gamma$ ,  $\lambda$ : 遅延時間 =  $\gamma_0(1-1/e)$ ]。下段において、涙液油層の上方伸展距離は、Voigt モデルとよく一致することが分かる。本症例の油層の伸展初速度は  $H'(0) = 5.04 \text{ mm/sec}$  となった。

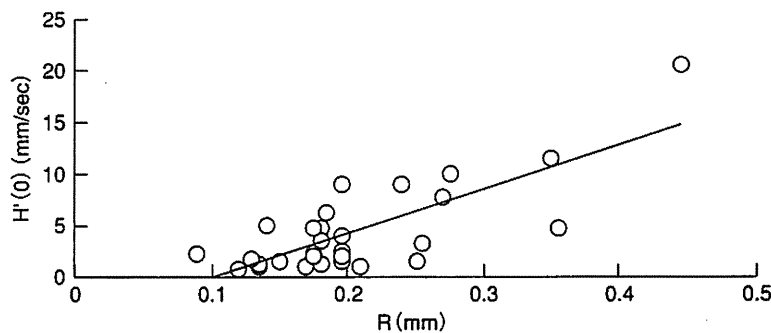


図 40 涙液メニスカス曲率半径(R)と涙液油層の上方伸展初速度 [ $H'(0)$ ] の相関。  
両者間には、有意な相関がみられた [ $r = 0.573 (p = 0.003)$ ].  
(文献 129 より許可を得て転載)

ファクターが存在する<sup>113)</sup>。なかでも涙液減少は最も大きなリスクファクターであり、日常臨床において、涙液減少のスクリーニング、すなわち、涙液の量的検査は、ドライアイ診断に不可欠といっても過言ではない。その究極の検査は、角膜上の涙液の液層の厚みを計測できる方法であるが、現在までのところ、ドライアイに応用できるまでには至っていない<sup>126)</sup>。油層動態解析は、角膜上の涙液の量と質の情報を低侵襲(白色光を当てるのみ)、定量的(ともに数値として得られる)に得ることのできる、近未来の検査法と考えられ、涙液の量と質の異常によるドライアイを一つの検査法で鑑別できるポテンシャルをもつと考えられる。今後のこの領域の研究の進

歩が新しいドライアイ検査法の確立につながると考えている。

### IX おわりに

角膜疾患の未来医療に向けた我々の研究を 7 項目に分けて概説したため、その内容は一見羅列した研究紹介のように感じられたかもしれない。しかしながら、これは、難治な眼表面疾患そして角膜内皮疾患の治療を長年にわたって行ってきて、多方面からの研究開発アプローチが必須であることを身に沁みて感じてきたためである。ご理解いただきたい。さらに、眼表面の自然免疫、細胞内レドックス状態とアミノ酸代謝、Stevens-Johnson



症候群の遺伝子多型とサイトカイン・ストームなどといった新しい視点については、一部の新規データ(未公表)を示していないため、我々の統合的な考え方が十分にご理解いただけなかったかもしれない。いずれ別の機会に、生物学、免疫学、微生物学を踏まえた我々の統合的な概念を示す予定である。

本稿を終えるにあたり、第113回日本眼科学会総会における特別講演の機会を賜りました日本眼科学会特別講演選考委員ならびに日本眼科学会評議員の皆様、第113回日本眼科学会総会会長の澤 充先生、本講演の座長の労をお取りいただきました西田輝夫先生に感謝申し上げます。

恩師の大阪大学名誉教授眞鍋禮三先生、故大阪大学教授田野保雄先生には長年にわたるご厚情に、そして京都府立医科大学眼科学教室の全教室員ならびに明交会諸氏には温かいご支援に深甚なる謝意を表します。また、共同研究者の一人ではありますが、貴重なご助言とご指導を賜りました羽室淳爾先生に御礼を申し上げます。最後に、第11代大阪大学総長であった山村雄一先生から私が学位授与時にいただいた言葉を若手研究者に伝え、筆を置きたいと思います。

夢みて行い、考えて祈る。人生には必要なものが3つある。それは夢とロマンと反省だ。

#### 文 献

- 1) 中泉行徳：稀有ナル角膜變状ニ就テ附右病理組織標本供覧。日眼会誌 18 : 949—950, 1914.
- 2) Mondino BJ, Rabb MF, Sugar J, Sundar Raj CV, Brown SI : Primary familial amyloidosis of the cornea. *Am J Ophthalmol* 92 : 732—736, 1981.
- 3) Weber FL, Babel J : Gelatinous drop-like dystrophy. A form of primary corneal amyloidosis. *Arch Ophthalmol* 98 : 144—148, 1980.
- 4) Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Nishida K, Shimomura Y, Tano Y, et al : Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat Genet* 21 : 420—423, 1999.
- 5) Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Okada M, Yamamoto S, Maeda N, et al : Homozygosity mapping of a gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy to chromosome 1p. *Am J Hum Genet* 63 : 1073—1077, 1998.
- 6) Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, et al : High expression of TROP 2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 99 : 1290—1295, 2008.
- 7) Fong D, Spizzo G, Gostner JM, Gastl G, Moser P, Krammel C, et al : TROP 2 : a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Mod Pathol* 21 : 186—191, 2008.
- 8) Muhlmann G, Spizzo G, Gostner J, Zitt M, Maier H, Moser P, et al : TROP 2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 62 : 152—158, 2009.
- 9) Ripani E, Sacchetti A, Corda D, Alberti S : Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. *Int J Cancer* 76 : 671—676, 1998.
- 10) Klintworth GK, Valnickova Z, Kielar RA, Baratz KH, Campbell RJ, Enghild JJ : Familial subepithelial corneal amyloidosis—a lactoferrin-related amyloidosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2756—2763, 1997.
- 11) Nishida K, Quantock AJ, Dota A, Choi-Miura NH, Kinoshita S : Apolipoproteins J and E colocalise with amyloid in gelatinous drop-like and lattice type I corneal dystrophies. *Br J Ophthalmol* 83 : 1178—1182, 1999.
- 12) Kinoshita S, Nishida K, Dota A, Inatomi T, Koizumi N, Elliott A, et al : Epithelial barrier function and ultrastructure of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Cornea* 19 : 551—555, 2000.
- 13) Quantock AJ, Nishida K, Kinoshita S : Histopathology of recurrent gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Cornea* 17 : 215—221, 1998.
- 14) Takaoka M, Nakamura T, Ban Y, Kinoshita S : Phenotypic investigation of cell junction-related proteins in gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1095—1101, 2007.
- 15) Thoft RA : Conjunctival transplantation. *Arch Ophthalmol* 95 : 1425—1427, 1977.
- 16) Thoft RA : Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* 97 : 1—6, 1984.
- 17) Kinoshita S, Ohashi Y, Ohji M, Manabe R : Long-term results of keratoepithelioplasty in Mooren's ulcer. *Ophthalmology* 98 : 438—445, 1991.
- 18) Kenyon KR, Tseng SC : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96 : 709—722 : discussion 722—703, 1989.
- 19) Tsai RJ, Tseng SC : Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 13 : 389—400, 1994.
- 20) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349 : 990—993, 1997.
- 21) Tsai RJ, Li LM, Chen JK : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 343 : 86—93, 2000.
- 22) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108 : 1569—1574, 2001.
- 23) Shimazaki J, Amano S, Uno T, Maeda N, Yokoi N : National survey on bullous keratopathy in Japan. *Cornea* 26 : 274—278, 2007.
- 24) Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, et al : Sterilized, freeze-dried amniotic membrane : a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol*

- Vis Sci 45 : 93—99, 2004.
- 25) Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, et al : Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 72 : 1478—1485, 2001.
  - 26) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77 : 379—385, 2004.
  - 27) Maruyama K, Yamada J, Sano Y, Kinoshita S : Th 2-biased immune system promotion of allogeneic corneal epithelial cell survival after orthotopic limbal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4736—4741, 2003.
  - 28) Friend J, Kinoshita S, Thoft RA, Eliason JA : Corneal epithelial cell cultures on stromal carriers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23 : 41—49, 1982.
  - 29) Ohji M, SundarRaj N, Hassell JR, Thoft RA : Basement membrane synthesis by human corneal epithelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 479—485, 1994.
  - 30) Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S : Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 19 : 65—71, 2000.
  - 31) Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, et al : An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2114—2121, 2002.
  - 32) Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S : Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 20 : 173—177, 2000.
  - 33) Koizumi N, Kinoshita S : Ocular surface reconstruction, amniotic membrane, and cultivated epithelial cells from the limbus. *Br J Ophthalmol* 87 : 1437—1439, 2003.
  - 34) Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K, et al : Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245 : 123—134, 2007.
  - 35) Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ : Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2506—2513, 2000.
  - 36) Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, et al : Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* 76 : 735—743, 2003.
  - 37) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S : Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 119 : 298—300, 2001.
  - 38) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S : Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* 82 : 468—471, 2004.
  - 39) Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, et al : The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 106—116, 2003.
  - 40) Nakamura T, Kinoshita S : Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 22 : S 75—80, 2003.
  - 41) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S : Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 88 : 1280—1284, 2004.
  - 42) Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S : Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 141 : 267—275, 2006.
  - 43) Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S : Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 142 : 757—764, 2006.
  - 44) Nakamura T, Ang LP, Rigby H, Sekiyama E, Inatomi T, Sotozono C, et al : The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 909—916, 2006.
  - 45) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Yokoi N, et al : Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 113 : 1765—1772, 2006.
  - 46) Ang LP, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, et al : Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplants for severe ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 124 : 1543—1551, 2006.
  - 47) Nakamura T, Sekiyama E, Takaoka M, Bentley AJ, Yokoi N, Fullwood NJ, et al : The use of trehalose-treated freeze-dried amniotic membrane

- for ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 29 : 3729—3737, 2008.
- 48) Nakamura T, Inatomi T, Sekiyama E, Ang LP, Yokoi N, Kinoshita S : Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand* 84 : 401—405, 2006.
- 49) Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S : Porcine corneal epithelial cells consist of high- and low-integrin  $\beta$ 1-expressing populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 3951—3954, 2004.
- 50) Nakamura T, Endo K, Kinoshita S : Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p 75 and the role of neurotrophin/p 75 signaling. *Stem Cells* 25 : 628—638, 2007.
- 51) Nakamura T, Ohtsuka T, Sekiyama E, Cooper LJ, Kokubu H, Fullwood NJ, et al : Hes 1 regulates corneal development and the function of corneal epithelial stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26 : 1265—1274, 2008.
- 52) Stevens AM, Johnson FC : A new eruptive fever associated with Stomatitis and ophthalmia. *Am J Dis Child* 24 : 526—533, 1922.
- 53) Auquier-Dunant A, Mockenhaupt M, Naldi L, Correia O, Schroder W, Roujeau JC : Correlations between clinical patterns and causes of erythema multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis : results of an international prospective study. *Arch Dermatol* 138 : 1019—1024, 2002.
- 54) 外園千恵 : Stevens-Johnson 症候群と眼障害. あたらしい眼科 25 : 465—469, 2008.
- 55) 外園千恵 : SJS と TEN の眼合併症. 最新皮膚科学体系 2008-2009. 中山書店, 東京, 182—188, 2008.
- 56) Kaido M, Dogru M, Yamada M, Sotozono C, Kinoshita S, Shimazaki J, et al : Functional visual acuity in Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 142 : 917—922, 2006.
- 57) Kawasaki S, Nishida K, Sotozono C, Quantock AJ, Kinoshita S : Conjunctival inflammation in the chronic phase of Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* 84 : 1191—1193, 2000.
- 58) 木下 茂, 外園千恵, 稲富 勉, 中村隆宏, 小泉 範子, 川崎 諭, 他 : 再生医学による重症角膜疾患の新規治療法開発への戦略的研究(ベルツ章受賞論文). 最新医学 62 : 132—180, 2007.
- 59) Ang LP, Sotozono C, Koizumi N, Suzuki T, Inatomi T, Kinoshita S : A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 143 : 178—180, 2007.
- 60) Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Grueterich M, Espana EM, et al : Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 109 : 1159—1166, 2002.
- 61) 木下 茂, 切通 彰, 大路正人, 大橋裕一, 眞鍋 禮三 : Palisades of Vogt の消失する角膜疾患. 臨眼 40 : 363—366, 1986.
- 62) Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, et al : Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 20 : 639—673, 2001.
- 63) Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, et al : New grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 114 : 1294—1302, 2007.
- 64) Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, Shirakata Y, Ikezawa Z, et al : Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology* 116 : 685—690, 2009.
- 65) Araki Y, Sotozono C, Inatomi T, Ueta M, Yokoi N, Ueda E, et al : Successful treatment of Stevens-Johnson syndrome with steroid pulse therapy at disease onset. *Am J Ophthalmol* 147 : 1004—1011, 2009.
- 66) Ueta M, Iida T, Sakamoto M, Sotozono C, Takahashi J, Kojima K, et al : Polyclonality of *Staphylococcus epidermidis* residing on the healthy ocular surface. *J Med Microbiol* 56 : 77—82, 2007.
- 67) Sotozono C, Inagaki K, Fujita A, Koizumi N, Sano Y, Inatomi T, et al : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections in the cornea. *Cornea* 21 : S 94—101, 2002.
- 68) Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Tashiro K, Hamuro J, et al : Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in Japanese patients with Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* 91 : 962—965, 2007.
- 69) Ueta M : Innate immunity of the ocular surface and ocular surface inflammatory disorders. *Cornea* 27 : S 31—40, 2008.
- 70) Ueta M, Hamuro J, Yamamoto M, Kaseda K, Akira S, Kinoshita S : Spontaneous ocular surface inflammation and goblet cell disappearance in  $I\kappa B\zeta$  gene-disrupted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 579—588, 2005.
- 71) Ueta M, Kinoshita S : Innate immunity of the ocular surface. *Brain Research Bulletin* 81 : 219—228, 2010.
- 72) Ueta M, Hamuro J, Ueda E, Katoh N, Yamamoto M, Takeda K, et al : Stat 6-independent tissue inflammation occurs selectively on the ocular surface and perioral skin of  $I\kappa B\zeta^{-/-}$  mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 3387—3394, 2008.
- 73) Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Hamuro J, Kinoshita S : Association of IL4R polymorphisms with Stevens-Johnson syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 120 : 1457—1459, 2007.
- 74) Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Hamuro J, Kinoshita S : Association of combined IL-13/IL-4R signaling pathway gene polymorphism

- with Stevens-Johnson syndrome accompanied by ocular surface complications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 1809—1813, 2008.
- 75) Ueta M, Hamuro J, Kiyono H, Kinoshita S : Triggering of TLR 3 by polyI : C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 331 : 285—294, 2005.
- 76) Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Hamuro J, Kinoshita S : Association of Fas Ligand gene polymorphism with Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* 92 : 989—991, 2008.
- 77) Ueta M, Sotozono C, Tokunaga K, Yabe T, Kinoshita S : Strong association between HLA-A\* 0206 and Stevens-Johnson syndrome in the Japanese. *Am J Ophthalmol* 143 : 367—368, 2007.
- 78) Ueta M, Tokunaga K, Sotozono C, Inatomi T, Yabe T, Matsushita M, et al : HLA class I and II gene polymorphisms in Stevens-Johnson syndrome with ocular complications in Japanese. *Mol Vis* 14 : 550—555, 2008.
- 79) Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, et al : HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Pharmacogenomics* 9 : 1617—1622, 2008.
- 80) Sotozono C, Ueta M, Kinoshita S : Systemic and local management at the onset of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Am J Ophthalmol* 149 : 354, 2010.
- 81) Sotozono C, Ueta M, Kinoshita S : The severity and management of ocular complications of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Arch Dermatol* 145 : 1336—1337, 2009.
- 82) Ueta M, Nakamura T, Tanaka S, Kojima K, Kinoshita S : Development of eosinophilic conjunctival inflammation at late-phase reaction in mast cell-deficient mice. *J Allergy Clin Immunol* 120 : 476—478, 2007.
- 83) Ueta M, Matsuoka T, Narumiya S, Kinoshita S : Prostaglandin E receptor subtype EP 3 in conjunctival epithelium regulates late-phase reaction of experimental allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 123 : 466—471, 2009.
- 84) Ueta M, Uematsu S, Akira S, Kinoshita S : Toll-like receptor 3 enhances late-phase reaction of experimental allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 123 : 1187—1189, 2009.
- 85) Murata Y, Shimamura T, Hamuro J : The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 14 : 201—212, 2002.
- 86) Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, Endou K, Hamuro J, Murata Y, et al : c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages : role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol* 171 : 628—635, 2003.
- 87) Koike Y, Hisada T, Utsugi M, Ishizuka T, Shimizu Y, Ono A, et al : Glutathione redox regulates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37 : 322—329, 2007.
- 88) Ono A, Utsugi M, Masubuchi K, Ishizuka T, Kawata T, Shimizu Y, et al : Glutathione redox regulates TGF- $\beta$ -induced fibrogenic effects through Smad 3 activation. *FEBS Lett* 583 : 357—362, 2009.
- 89) Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka F : Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. *Nature* 222 : 687—688, 1969.
- 90) Murata Y, Shimamura T, Tagami T, Takatsuki F, Hamuro J : The skewing to Th 1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. *Int Immunopharmacol* 2 : 673—689, 2002.
- 91) Yamada J, Hamuro J, Hatanaka H, Hamabata K, Kinoshita S : Alleviation of seasonal allergic symptoms with superfine  $\beta$ -1, 3-glucan : a randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 119 : 1119—1126, 2007.
- 92) Yamada J, Hamuro J, Terai K, Kinoshita S : Major histocompatibility complex semi-matching improves murine corneal allograft survival under oxidative macrophage dominance. *Transplantation* 84 : 899—907, 2007.
- 93) Yamada J, Maruyama K, Sano Y, Kinoshita S, Murata Y, Hamuro J : Promotion of corneal allograft survival by the induction of oxidative macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 448—454, 2004.
- 94) Yamada J, Yoshida M, Taylor AW, Streilein JW : Mice with Th 2-biased immune systems accept orthotopic corneal allografts placed in "high risk" eyes. *J Immunol* 162 : 5247—5255, 1999.
- 95) Broer S : Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev* 88 : 249—286, 2008.
- 96) Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al : Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136 : 521—534, 2009.
- 97) Gukasyan HJ, Kim KJ, Lee VH, Kannan R : Glutathione and its transporters in ocular surface defense. *Ocul Surf* 5 : 269—279, 2007.
- 98) Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HM, Okumura A, Namekata K, et al : The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest* 117 :

- 1763—1770, 2007.
- 99) Katragadda S, Talluri RS, Pal D, Mitra AK : Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter, ASCT 1, in rabbit corneal epithelial cell culture and rabbit cornea. *Curr Eye Res* 30 : 989—1002, 2005.
  - 100) Darlington JK, Adrean SD, Schwab IR : Trends of penetrating keratoplasty in the United States from 1980 to 2004. *Ophthalmology* 113 : 2171—2175, 2006.
  - 101) 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.
  - 102) Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Okahara N, Tsuchiya H, Torii R, et al : Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 4519—4526, 2007.
  - 103) Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Tsuchiya H, Torii R, Cooper LJ, et al : Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate : possible future clinical application in corneal endothelial regenerative medicine. *Cornea* 27 : S 48—55, 2008.
  - 104) 小泉範子 : 霊長類を用いた角膜内皮再生医療の開発. *日眼会誌* 113 : 1050—1059, 2009.
  - 105) Koizumi N, Okumura N, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, Okahara N, et al : Cultivated monkey corneal endothelial cell transplantation using a corneal lamellar graft. *ARVO, Fort Lauderdale*, 2009.
  - 106) Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al : A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25 : 681—686, 2007.
  - 107) Hall A : Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279 : 509—514, 1998.
  - 108) Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S : ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 392 : 189—193, 1996.
  - 109) Okumura N, Ueno M, Koizumi N, Sakamoto Y, Hirata K, Hamuro J, et al : A ROCK inhibitor enhances survival of primate corneal endothelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 3680—3687 : 2009.
  - 110) Nakano Y, Oyamada M, Dai P, Nakagami T, Kinoshita S, Takamatsu T : Connexin 43 knock-down accelerates wound healing but inhibits mesenchymal transition after corneal endothelial injury *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 93—104, 2008.
  - 111) Koizumi N, Nakano Y, Sakamoto Y, Okumura N, Dai P, Tsuchiya H, et al : Corneal endothelial cell proliferation is enhanced by a single injection of connexin 43 siRNA in a primate endothelial injury. *ARVO, Fort Lauderdale*, 2008.
  - 112) Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, et al : A ROCK inhibitor enhances corneal endothelial wound healing in both an *in vitro* and *in vivo* model. *ARVO, Fort Lauderdale*, 2009.
  - 113) No authors listed : The definition and classification of dry eye disease : report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop *Ocul Surf* 5 : 75—92, 2007.
  - 114) 島崎 潤(ドライアイ研究会) : 2006年度ドライアイ診断基準. *あたらしい眼科* 24 : 181—184, 2007.
  - 115) Goto E, Tseng SC : Kinetic analysis of tear interference images in aqueous tear deficiency dry eye before and after punctal occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 1897—1905, 2003.
  - 116) Koh S, Maeda N, Hirohara Y, Mihashi T, Bessho K, Hori Y, et al : Serial measurements of higher-order aberrations after blinking in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 133—138, 2008.
  - 117) Shen M, Li J, Wang J, Ma H, Cai C, Tao A, et al : Upper and lower tear menisci in the diagnosis of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 2722—2726, 2009.
  - 118) Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Maruyama K, Komuro A, Kinoshita S : Relationship between tear volume and tear meniscus curvature. *Arch Ophthalmol* 122 : 1265—1269, 2004.
  - 119) Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Kinoshita S : Reflective meniscometry : a new field of dry eye assessment. *Cornea* 19 : S 37—43, 2000.
  - 120) Yokoi N, Komuro A : Non-invasive methods of assessing the tear film. *Exp Eye Res* 78 : 399—407, 2004.
  - 121) Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S : Comparison of the effects of topical levobunolol and timolol solution on the human ocular surface. *Cornea* 22 : 709—715, 2003.
  - 122) Ishibashi T, Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Komuro A, Kinoshita S : Retention of reversibly thermo-gelling timolol on the human ocular surface studied by video meniscometry. *Curr Eye Res* 27 : 117—122, 2003.
  - 123) Yokoi N, Takehisa Y, Kinoshita S : Correlation of tear lipid layer interference patterns with the diagnosis and severity of dry eye. *Am J Ophthalmol* 122 : 818—824, 1996.
  - 124) Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S : Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and without benzalkonium chloride. *J Glaucoma* 12 : 486—490, 2003.
  - 125) Maruyama K, Yokoi N, Takamata A, Kinoshita S : Effect of environmental conditions on tear dynamics in soft contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2563—2568, 2004.

- 126) King-Smith PE, Fink BA, Hill RM, Koelling KW, Tiffany JM : The thickness of the tear film. *Curr Eye Res* 29 : 357—368, 2004.
- 127) Berger RE, Corrsin S : A surface tension gradient mechanism for driving the pre-corneal tear film after a blink. *J Biomech* 7 : 225—238, 1974.
- 128) Creech JL, Do LT, Fatt I, Radke CJ : *In vivo* tear-film thickness determination and implications for tear-film stability. *Curr Eye Res* 17 : 1058—1066, 1998.
- 129) Yokoi N, Yamada H, Mizukusa Y, Bron AJ, Tiffany JM, Kato T, et al : Rheology of tear film lipid layer spread in normal and aqueous tear-deficient dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 5319—5324, 2008.
-

### 3. 遺伝子診断

— Genetic diagnosis of glaucoma —

池田陽子\* 中野正和\*\* 田代啓\*\*  
森和彦\* 木下茂\*

#### はじめに

緑内障には家族歴があることが臨床上知られていた。家系調査から莫大な時間と手間をかけ緑内障との関連が判明したのが *Myocilin*<sup>1)</sup>, *Optineurin*<sup>2)</sup>, *WDR36*<sup>3)</sup> などの遺伝子である<sup>4)</sup>。並行して候補遺伝子関連解析も行われたので、これらの時代を第1期：家系調査/候補遺伝子解析期(図1)とすると、家系に頼らずゲノムワイドDNAマイクロアレイ<sup>註1)</sup>(以下、アレイ)を用いた全ゲノム関連解析による落屑緑内障の *LOXLI* 同定<sup>5)</sup>以降の時代を第2期：ゲノムワイド関連解析期(図1)と呼ぶのがふさわしい。ゲノム研究の急発展の前提となる重大なプロジェクトとして、ヒトゲノム上の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP; “スニップ”と発音する)をすべて列挙しようとする国際HapMapプロジェクト<sup>6)</sup>が大きな役割を果たした。このおかげで遺伝子解析の技術革新と解析費用の価格崩壊が起こり、急発展した。ア

レイ技術の進歩のテンポは早く、2005年の加齢黄斑変性の100Kアレイから始まって、2007年の *LOXLI* の報告には300Kアレイ、2009年の筆者らによる広義の原発開放隅角緑内障の報告<sup>7)</sup>には500Kアレイが使用され、現在は1000Kアレイ実験が進行中である。それと時期的に重複しながら独自の役割をカバーする第3期：次世代(第二世代)シーケンス期(図1)が誕生しようとしている。第二世代シーケンサー<sup>註2)</sup>は短時間で広範なゲノム領域を一挙に塩基配列決定する機器である。眼科領域においても今後は660Kアレイや1000Kアレイのゲノムワイド関連解析報告のみならず、第二世代シーケンサーを用いた報告が数多く発表されると予想される。これらの背景を受け、緑内障の遺伝子診断を目指す研究は急速に進歩している。本稿では、遺伝子診断を目指す研究のこれまで(過去)、今(現在)、これから(未来)について概説する。

#### 1. これまでの遺伝子診断を目指す研究

疾患に関連するゲノム領域を同定する方法として古典的手法に分類される連鎖解析は、そもそも単一遺伝子上の変異に起因するメンデル遺伝病の責任遺伝子を同定するために有効な遺伝学的解析法である。連鎖解析では、疾患に罹患

\* Yoko IKEDA, Kazuhiko MORI, Shigeru KINOSHITA 京都府立医科大学大学院医学研究科視覚機能再生外科学

\*\* Masakazu NAKANO, Kei TASHIRO 京都府立医科大学大学院医学研究科ゲノム医科学

Key words: バリエント, マイクロアレイ, 次世代シーケンサー, SNP, GWAS, POAG

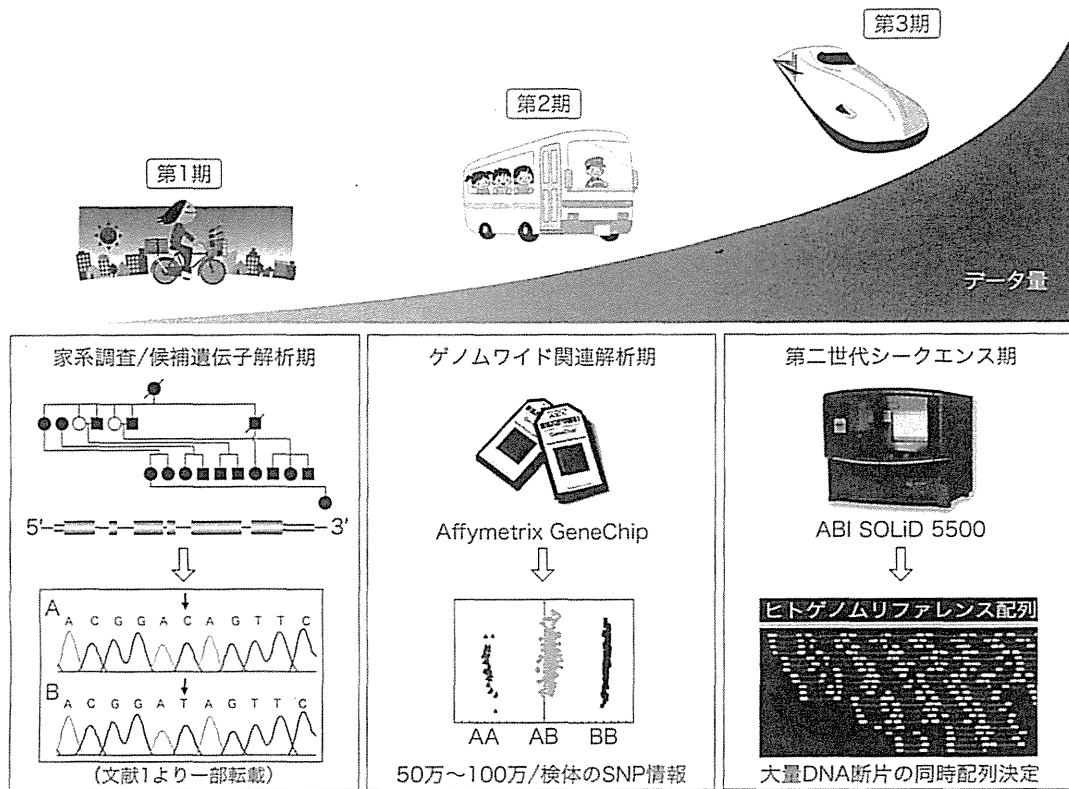


図1 緑内障遺伝子診断を目指す研究の変遷

遺伝子診断の基礎となる有用なバリエーションを同定する技術はここ数年間で急速に発展している。第1期である家系調査/候補遺伝子解析期に比べて、第2期のゲノムワイド関連解析期では取得できる塩基配列情報の量が、第3期の第二世代シーケンス期では取得できる塩基配列情報の量と質が劇的に進歩している。ただし、それぞれの方法には捨てがたい特長があるので、これらは共存し続ける。

している血縁者を多く含む何世代にもわたる大家系サンプルを用いて、ゲノム上に高度に保存されている繰り返し配列などを位置の目印(マーカー)に疾患と連鎖して代々受け継がれているゲノム領域を特定していく。その後、特定された領域に存在する複数の遺伝子と疾患との関係を精査していき、時として責任遺伝子に辿り着くこともある。緑内障においても、家系を用いた連鎖解析によって、若年性の開放隅角緑内障(juvenile open angle glaucoma: JOAG)に関連する領域としてヒト1番染色体上の1q21-1q31領域が1993年に初めて報告された<sup>8)</sup>。さらに連鎖解析は、糖尿病や高血圧症に代表される“common disease (ありふれた疾

患)”(生活習慣病や成人病と訳されることもある。また、しばしば多因子疾患とも呼ばれる)に関連するゲノム領域を探索する手段としても応用されている。多治見スタディ<sup>9)</sup>によって本邦の40歳以上の有病率が約3.9%であることが判明してありふれた疾患の代表格のひとつとして考えられている広義の原発開放隅角緑内障(primary open angle glaucoma: POAG)についても連鎖解析が実施されてきた。その結果、1990年代後半から現在までにPOAGに関連する14カ所におよぶゲノム領域(GLC1A-GLC1N)が同定され(表1)、その内の3領域からはミオシリン遺伝子(MYOC)<sup>1)</sup>、オプチニューリン遺伝子(OPTN)<sup>2)</sup>、WD repeat do-



表 1 連鎖解析によって同定された緑内障関連ゲノム領域\*

同定された年	領域名**	染色体位置	遺伝子	病型
1993	GLC1A	1q23-1q24	MYOC	JOAG, POAG
1996	GLC1B	2cen-2q13	-	POAG
1997	GLC1C	3q21-3q24	-	POAG
1998	GLC1D	8p23	-	POAG
1998	GLC1E	10p13-10p15	OPTN	POAG, NTG
1999	GLC1F	7q35-7q36	-	POAG
2003	GLC1G	5q22.1	WDR36	POAG, NTG
2000	GLC1H	2p16.3-2p15	-	POAG
2005	GLC1I	15q11-15q13	-	POAG
2004	GLC1J	9p22	-	JOAG
2004	GLC1K	20p12	-	JOAG
2005	GLC1L	3p22-3p21	-	POAG
2006	GLC1M	5q22.1-5q32	-	JOAG
2004	GLC1N	15q22-15q24	-	JOAG

\* The Glaucoma Book : A Practical, Evidence-Based Approach to Patient Care. Paul N. Schacknow, John R. Samples 編, Springer, 2010 から一部転載。

\*\*命名法 : GLC, glaucoma ; 1, 開放隅角緑内障 ; A-N, 同定されたアルファベット順 (一部前後している)。

JOAG : juvenile open angle glaucoma, POAG : primary open angle glaucoma

main 36 遺伝子 (*WDR36*)<sup>3)</sup> が緑内障関連遺伝子として報告されている。しかしいずれの報告も、多数の遺伝因子と環境因子とが複雑に作用しあって発症する多因子疾患である POAG を解析対象としながら、一般集団における有病率よりも高く、かつ一部 JOAG 症例も含まれている可能性のあるバイアスのかかった大家系を用いて単一遺伝子の同定に至っていることから、これらの結果を直ちに一般集団における POAG の遺伝子診断には利用できない。現に *MYOC*, *OPTN*, *WDR36* 上のバリエーション<sup>注3)</sup> は、POAG 全患者の数%でしか検出できていない<sup>4)</sup>。また、連鎖解析により同定された遺伝子上のバリエーションは比較的最近(数世代前)に何らかの要因で生じた変異<sup>注3)</sup> がその家系特有に継承されてきた可能性も否定できない。したがって、これまでの連鎖解析によって同定されたバリエーションはごく一部の POAG 患者にとっては有用な情報であるものの、現時点では残念ながら一般の緑内障遺伝子診断の基盤情報になった例はない。

一方、連鎖解析とは対象とする母集団と解析

方法が異なる遺伝学的解析法として、一般集団から表現型の異なる 2 つのグループを準備してグループ間で有意差のあるバリエーションを検出するケース・コントロール関連解析(相関解析)がある。相関解析には、全ゲノムを客観的に調べるゲノムワイド関連解析法と、文献の知識から候補遺伝子を絞って調べる候補遺伝子解析法がある。アレイを用いた網羅的な解析技術が登場してゲノムワイド関連解析が可能になるまでは、眼科的臨床所見または基礎研究の成果から緑内障の病態との関係が推測されるさまざまな遺伝子(候補遺伝子)の蛋白質に翻訳される領域(コーディングエクソン、以下、単にエクソンと略す)上の塩基配列をサンガー法によるダイレクトシーケンシング<sup>注4)</sup>などによって決定し、その配列データを用いた相関解析が精力的に実施された<sup>4)</sup>。たとえば、緑内障の最終的な臨床病態として網膜神経節細胞が選択的に障害されることが判明している<sup>10)</sup>ことから、中枢神経系のアルツハイマー病にも関与している apolipoprotein E 遺伝子(*APOE*)やアポトーシスを引き起こす p53 遺伝子(*TP53*)などが解析された。

また、前房水の排出障害による眼圧の上昇が緑内障の最大のリスク因子である<sup>10)</sup>ことから、線維柱帯における細胞接着因子であるカドヘリン遺伝子(*CDH-1*)なども解析された。他にも、主要なシグナル伝達系や免疫系の遺伝子など解析対象は多岐にわたっている。しかし、これまでの候補遺伝子の関連解析研究例では、統計学的な検出力が十分な大規模集団での検討が見受けられないので、遺伝子診断に結びつく再現性の高い知見が得られていない。緑内障のマーカー候補 SNP が他の多因子疾患と同様に 1.2 から 1.5 程度の危険度しかないことが判明しつつあり、その危険度のマーカー SNP を検出する統計学的検出力を確保するためには、少なくともケース 500 例対コントロール 500 例、できれば 1,000 例ずつ以上の症例数が必要である。これまでに発表されたほぼすべての緑内障候補遺伝子研究は、小規模な症例数で実施されたために検出力不足であり、おそらく大規模研究では再現困難であることが惜まれる。検出力不足に陥った要因として、候補遺伝子によっては蛋白質の活性中心が複数の異なるエクソン上に分かれて存在したり、エクソン自体のサイズが大きいことで塩基配列決定の領域が大きくなり、第一世代のシーケンス決定方法ではたちまちコストや労力の許容量を超えてしまうため検体数を増やせなかったことが挙げられる。このように、候補遺伝子解析では解析したい標的配列を増やそうとすると検体数を絞らなければならないので検出力不足に見舞われるというジレンマが常につきまとっている。また、最近のアレイを用いた解析結果が裏づけているように、多因子疾患に関連するバリエントは必ずしもエクソン上に存在するとは限らないことから、イントロン上や遺伝子の上流、下流に存在する転写調節配列も含めた網羅的な解析ができるような技術革新が以前から望まれていた。

## II. 現在の遺伝子診断を目指す研究

ヒトゲノム全塩基配列決定国際プロジェクトに引き続き 2002 年に開始された国際 HapMap プロジェクト<sup>6)</sup>(<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>)は、白人(コーカサス人)とアフリカ人それぞれ 30 組のトリオ(父、母、子)とアジア人として非血縁者の日本人と中国人それぞれ 45 人ずつ、総計 3 人種・270 人分のハプロタイプ地図を構築することを目標に発足した。ここでいうハプロタイプとは、複数の SNP の間で遺伝的に連鎖している連鎖不平衡(linkage disequilibrium: LD)<sup>15)</sup>状態にあることが統計学的に算出された組み合わせのことをいう。ハプロタイプ情報を取得するためには、人種ごとにゲノム上の SNP を高密度に決定(ジェノタイピング)し、個々の SNP のアレル頻度<sup>16)</sup>情報を取得する必要がある。網羅的なジェノタイピング技術の開発が不可避であった。

アフィメトリクス社が開発したアレイは、十万個以上のオリゴヌクレオチドプローブを基盤(チップ)上に固層化し(半導体のシリコンウエハーチップと全く同じ基盤を用いるところから、DNA チップ<sup>17)</sup>とも呼称される)、それぞれのプローブに相補的にハイブリダイズ<sup>18)</sup>するヒトゲノム由来の DNA 断片を検出する。すなわち、十万枚以上のサンプロット解析が 1 回の実験で完了する画期的な技術である。この技術は 1980 年代後半から開発されはじめたが、国際 HapMap プロジェクトにより莫大な資金と労力が投入されたことによって、①アレイに搭載できるプローブの高密度化、②プロジェクトの進展に伴う SNP 情報の更新によるプローブの質の向上、③アレイあたりの解析コストの劇的な低下、がもたらされ急速に進歩した。この技術革新は、2007 年のサイエンス誌の“Breakthrough of the Year”<sup>11)</sup>にも選ばれたように、SNP をマーカーとする一連のケース・コ

ントロール関連解析, いわゆる“ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study : GWAS : “ジークス”と発音する)”の成果につながっている。現在までに実に450以上のGWAS研究が実施され多種多様な多因子疾患に関連する2,000以上ものSNPが同定されている<sup>12)</sup>。その先駆けとなった2005年のGWAS第一報は奇しくも眼科領域からの報告であった。この報告では、約10万個のSNPが搭載された100Kアレイを用いて、加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration : AMD) の白人のケース96例とコントロール50例のGWASが実施された<sup>13)</sup>。その結果、有意なマーカーSNPが同定され、そのSNPと連鎖しているSNPを調べたところ、補体系の調節因子のひとつであるH因子 (complement factor H : CFH) 遺伝子上のアミノ酸置換を伴うSNPを同定することに成功したのである<sup>13)</sup>。その後、AMDに関連する遺伝子はCFHの他に新たに3種類同定されている<sup>14)</sup>。全身の免疫系に関連するCFHをはじめ、これらの遺伝子とAMD発症のメカニズムとの関連性はいまだ解明されていないが、遺伝子診断への応用としてこれら4つの遺伝子上のSNPの情報を組み合わせることで発症の危険度が有意に上昇することが示されている<sup>15)</sup>。現在米国では、この研究成果に基づき、AMD発症のリスク判定ゲノム診断薬を実用化する試みが米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) の監督のもとに進められており、2011年には眼科領域のゲノム診断薬第1号として上市されるとの報道もある。

医学全体を見渡すとゲノム診断薬実用化は始まっている。検査薬としての認可の有無は別にして、正式な医療機関の医師が倫理委員会の承認のもとに関与して患者が利用しているという意味で実用化された例は、癌化学療法時の効果と有害事象発現予測による個人最適化医療のた

めのUGT1A1遺伝子<sup>16)</sup>、BRCA1・2遺伝子<sup>17)</sup>、HER2遺伝子<sup>18)</sup>、EGFR遺伝子<sup>18)</sup>のゲノム診断とチトクロームP450遺伝子多型による消化器病薬や抗うつ剤などの薬剤効果予測<sup>19)</sup>と、以下に概説するC型肝炎の治療方針決定のゲノム診断などがある。さらに、厚労省の高度先進医療の指定を受けている例は、先天性難聴と低身長症と進行性筋ジストロフィと筋緊張性ジストロフィ症と多発性内分泌腫瘍症2型と先天性血液凝固異常症と網膜芽細胞種と角膜ジストロフィと先天性高インスリン血症と色素性乾皮症と先天異常に対する包括的遺伝子診断など十指に余るほどに増加している。その一方で早くも美容や英才教育のための遺伝子検査という宣伝文句で科学的根拠のない詐欺行為を堂々と実施するビジネスが誕生して放置されていることには戸惑いを禁じ得ない。医学に根ざした注目すべき有望な例として、2009年の本邦の基礎研究に基づくC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus : HCV) の標準治療法であるインターフェロン (IFN)  $\alpha$  とリバビリンの併用療法に対する薬剤抵抗性のゲノム診断がある。薬剤抵抗性を規定する宿主側の因子としてIL28B上のSNPが同定された<sup>20)</sup>。IFN療法には有害事象 (副作用) が伴うので、HCV感染症例の中から治療効果が期待されないHCV感染者をあらかじめ選別し、無駄な治療を回避する「個人最適化医療」の先駆けのひとつとなった成果である (図2)。現在、IFNの治療効果を予測する遺伝子診断として複数の検査会社が受託検査として請け負うまでに商業化されており、遺伝子診断による個人最適化医療のニーズの高さがうかがわれる。

AMDやIFN療法抵抗性の例のように、ケース・コントロール群がそれぞれ100検体未満の小規模なGWASで遺伝子まで辿り着けたのは、同定されたSNPの危険度 (オッズ比) が高かった (> 2.0) ために危険度の関数である検出力が不足しなかったからに他ならず、他の大

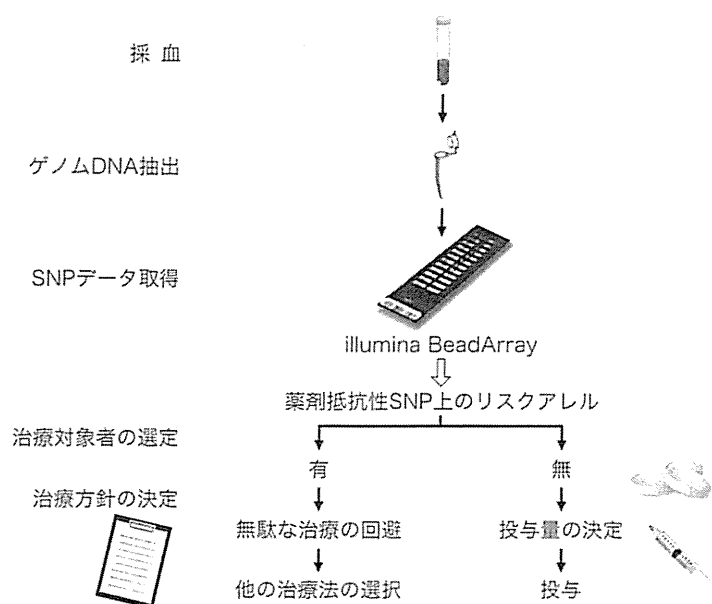


図2 遺伝子診断で薬剤投与の方針を判定する個人最適化医療

血液から抽出したゲノム DNA を用いて、薬剤に対する抵抗性を規定する SNP のジェノタイプングデータを取得し、薬剤抵抗性アレルの有無を判定することによって、薬剤を投与すべきか他の治療法を選択すべきか判断する。治療効果の期待できない患者に対して無駄な治療を行わないことは、患者の QOL の改善だけでなく医療費の削減にもつながる。

多数の多因子疾患における GWAS の結果からは、当初の過度な期待とは裏腹に個々の疾患の発症機序の解明に直結するような遺伝子の同定や診断への応用が期待される SNP の同定には至っていない(図3)。同定されたマーカー SNP それ自体、あるいはマーカー SNP と連鎖している SNP を調べても危険度が小さい(オッズ比で 1.2~1.5 程度)うえに、そもそも大多数の SNP が近傍に遺伝子が存在しない、いわゆる“gene desert (遺伝子砂漠)”領域から同定されたからである<sup>21)</sup>。したがって、世界中の GWAS 研究者がこれらの SNP をいかに生化学的な疾患発症機序と結びつけ、実用可能な遺伝子診断マーカーを同定していくかを模索しているのが現状である。

緑内障についての GWAS の報告をまとめた(表2)。第一報は、2007年に北欧のグループから落屑緑内障 (exfoliation glaucoma : XFG) に

関連する遺伝子として、弾性線維であるエラスチンの重合を触媒する *LOXLI* が報告された<sup>5)</sup>。GWAS で同定されたマーカー SNP と連鎖している SNP を精査した結果、*LOXLI* の第一エクソン上にアミノ酸置換を伴う2つの SNP が見出された。実に落屑緑内障患者の99%がこれら2つの SNP のアレルの特定の組み合わせ(リスクハプロタイプ)を有していることが判明した<sup>5)</sup>。しかし、落屑緑内障ではない一般集団の25%でも同一のリスクハプロタイプを保有していることから、遺伝子診断マーカーとして実用化するためにはさらなるマーカー SNP を同定して特異度を上げる必要があると考えられている<sup>4)</sup>。これらの SNP は、日本人落屑緑内障患者においても再現性が確認された<sup>22)~24)</sup>。しかし、このうちのひとつの SNP では、アジア人と白人とでリスクアレルが逆転しており、危険と保護の正反対の作用を有していることが判明