

201128208A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

偽落屑角膜内皮症の実態把握と
診断基準確立のための研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大橋 裕一

平成 24 (2012) 年 5 月

偽落屑角膜内皮症の実態把握と診断基準確立のための研究

班員構成

研究者		所属等	職名
研究代表者	大橋 裕一	愛媛大学大学院医学系研究科 視機能外科学	教授
研究分担者	井上 幸次	鳥取大学医学部眼科	教授
	外園 千恵	京都府立医科大学医学部眼科	講師
	天野 史郎	東京大学医学部眼科	教授
	布施 昇男	東北大学医学部眼科	准教授
	相馬 剛至	大阪大学医学部眼科	医員
	宮田 和典	宮田眼科	院長
研究協力者	白石 敦	愛媛大学大学院医学系研究科 視機能再生学	准教授
	鄭 曉東	愛媛大学大学院医学系研究科 視機能外科学	助教
	臼井 智彦	東京大学医学部眼科	助教
	子島 良平	宮田眼科	医員
	増田 綾美	宮田眼科	医員

目 次

I. 総括研究報告

- 偽落屑角膜内皮症の実態把握と診断基準確立のための研究……………1
代表研究者 大橋 裕一

II 分担研究報告

1. PEX 内皮症の生態共焦点顕微鏡による組織学的検討 ……………5
大橋 裕一
2. 角膜内皮の異物に対する分子制御・免疫制御に関する研究……………9
井上 幸次
3. 偽落屑症候群における角膜内皮細胞に関する研究……………12
外園 千恵
4. アスコルビン酸2リン酸によるヒト角膜内皮細胞の増殖に関する研究……………14
天野 史郎
5. 偽落屑症候群における角膜内皮密度に関する研究 ……………17
相馬 剛至
6. 偽落屑角膜内皮症の実態把握と診断基準確立のための研究……………20
布施 昇男

- III 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 25

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

偽落屑角膜内皮症の実態把握と診断基準確立のための研究

研究代表者 大橋 裕一 愛媛大学眼科学 教授

研究要旨 落屑症候群:Pseudoexfoliation (PEX) syndrome は、眼内組織に落屑物質が付着し、続発性緑内障などの眼合併症を引き起こすことが良く知られている。一方で、偽落屑症候群による角膜内皮細胞減少(偽落屑角膜内皮症:**PEX 内皮症**)の実態についてはまったく解明されていない。本研究の目的は、日本における**PEX 内皮症**の実態を調査し、診断基準を確立し、治療方針を提案することである。

研究計画の骨子は、1) **PEX 内皮症**の実態調査として、①原因不明の水疱性角膜症の患者数に関する実態調査を行い、次に個々の症例の臨床・検査所見、診断と治療に関する情報を入手しレトロスペクティブ解析を行うこと。②白内障術前患者の内皮細胞数を計測し、内皮細胞減少者の頻度・原因についてプロスペクティブな解析を行うこと。2) **PEX 内皮症**の病態の解明に関する研究として、**PEX 内皮症**患者の血液を採取し、遺伝子 検索を行う。また患者角膜を組織学的に検討すること。3)「**PEX 内皮症**診断基準」の作成すること。の3つからなっている。

本年は、①水疱性角膜症の患者数に関する実態調査を行いレトロスペクティブに解析を行った。②白内障術前患者のうち、内皮細胞減少者の頻度・原因についてプロスペクティブな解析を行った。

研究分担者

井上幸次（鳥取大学医学部・教授）

外園千恵（京都府立医科大学医学部・講師）

天野史郎（東京大学医学部・教授）

布施昇男（東北大学医学部・准教授）

相馬剛至（大阪大学医学部・医員）

宮田和典（宮田眼科・院長）

①**PEX 内皮症**の実態調査:水疱性角膜症症例に関するレトロスペクティブ検討

A. 研究目的

偽落屑症候群は比較的頻度の高い疾患であるが、偽落屑症候群による角膜内皮細胞減少(偽落屑角膜内皮症:**PEX 内皮症**)は1998年、Naumannらにより提唱されるまではnon-guttata FuchsというFuchs 角膜変性症以外の角膜内皮機能不全の中に含まれていた。**PEX 内皮症**に関する認識はほとんどされておらず、原因不明とされている水疱性角膜症の中に**PEX 内皮症**が含まれている可能性は高い。本研究の目的は、**PEX 内皮症**の実態把握を目的に、角膜移植を施行した水疱性角膜症を対象に全国多施設調査を行い、BKの原因疾患の

分布、治療状況について検討することを目的とした。

B. 研究方法

PEX 内皮症研究班参加施設(愛媛大学、宮田眼科、鳥取大学、大阪大学、京都府立大学、

東京大学、東北大学)において2008～2010年の3年間に角膜移植術を施行したBK症例209症例(男性80例、女性129例;平均年齢は72.8±10.6歳)について、BKの発症原因、治療術式についてレトロスペクティブなアンケート調査を行った。

(倫理面への配慮)

この調査研究は「疫学研究に関する倫理指針」(平成19年8月16日)に従って実施された。調査は個人情報を除いてデータを収集し、解析されており、治療研究を伴わない観察研究であるため、患者への危険性はない。

C. 研究結果

1) 病因別では内眼手術(41.5%)が最も多く、レーザー虹彩切開術(LI)後(22.6%)、原因不明(14.5%)、感染、炎症(8.3%)、ジストロフィ(7.5%)、外傷(5.6%)であった。年度別ではLI後の症例は減少傾向にあり、内眼手術による症例は増加傾向であった。

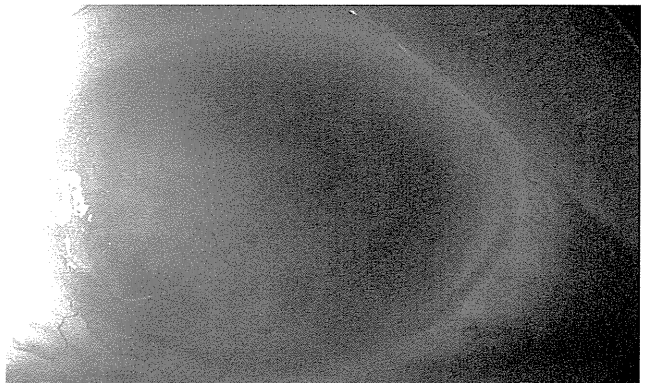
2) 術式では、全層角膜移植術(PKP)91例に対して内皮移植術は118例と優位に多く、内皮移植術の中ではnon-stripping DSAEKの割合は9%, 19%, 33%と増加傾向にあった。また、白内障合併例に対する先行白内障手術の割合は62%, 66%, 70%と増加傾向を示していた。

3) 原因不明症例とされていた症例は30症例

(14.4%)あり、その内で偽落屑症候群が認められた症例によるものは半数の15例(7.2%)を占めていた。

PEX 角膜内皮症による水疱性角膜症症例、全層角膜移植術を施行、代表例の術前前眼部細隙灯所見と術後病理結果を示す。(図1～3)

図1 PEX 水疱性角膜症、高度角膜全面浮腫、視



力=0.07(矯正不能)

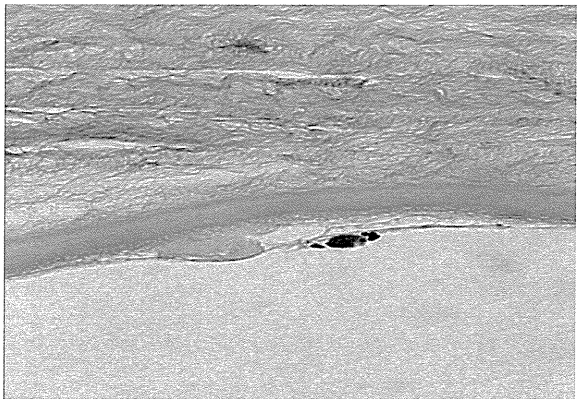


図2 角膜内皮細胞の線維細胞化所見 (HE original magnification x 200)

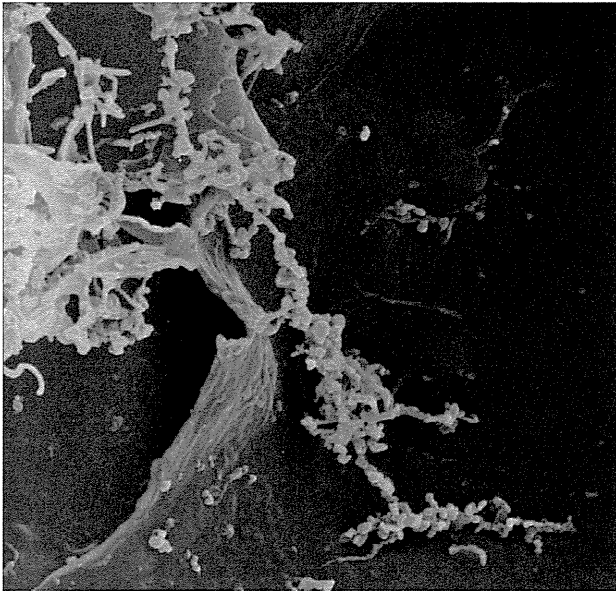


図3 PEX 内皮症の走査電顕所見(x5000)
内皮細胞の破壊と PEX 物質の付着を認めた

D. 考察

水疱性角膜症 (bullous keratopathy, BK) の発症原因について欧米では Fuchs 角膜変性が最も多いのに対して日本では白内障手術を初めとした内眼手術後、レーザー虹彩切開術後のものが多い傾向があることが再確認された。また、内眼手術の進歩に伴い手術適応が広がり以前より手術症例が増えたこともあり、内眼手術後のBK症例が増加していると推測された。一方で、レーザー技術の進歩により、LI 後 BK 症例は減少傾向にあると推測された。

原因不明の BK 症例のうち、PEX 症例が50%と高率に認められ、PEX内皮症が水疱性角膜症の一因であることが確認された。

角膜移植術式は全層角膜移植に代わって内皮移植が主流となりつつある現状が確認された。

E. 結論

今回調査した角膜移植を行った水疱性角膜症全 209 例中、15 例(7.2%)がPEX内皮症であり、PEX内皮症が水疱性角膜症の一因であることが確認された。

②PEX 内皮症の実態調査:術前患者における、内皮細胞減少者の頻度・原因についてのプロスペクティブ検討

A. 研究目的

①PEX 内皮症の実態調査にて、水疱性角膜症症例に関するレトロスペクティブ検討を行ったが、症例数は限られ多調査である。そこで本研究では、さらに PEX 内皮症の発症頻度、分布状況について検討する目的に多施設調査を行い白内障術前患者における角膜内皮減少の原因分布について検討した。

B. 研究方法

対象:愛媛大学病院及び関連施設合計8施設において、各施設白内障術前症例につき連続100例を調査した。

角膜内皮密度2000以下の症例を角膜内皮障害とし、内皮減少の原因を分類して調査票に記入した。

(倫理面への配慮)

本研究は各参加施設において倫理委員会の承認されており、被検者全員に本研究の目的、検討方法について担当医が詳細に説明し同意を習得している。

C. 研究結果

参加施設愛媛大学病院及び関連施設合計8施設より800例にたいして白内障術前角膜内皮検査を行った。内皮障害(角膜内皮密度2000以下)を認めた症例は12例(1.5%)であった。

原因別に分類すると、

虹彩レーザー切開術後:3例(0.375%)

コンタクトレンズ使用:2例(0.25%)

炎症感染後:2例(0.25%)

原因不明5例(0.625%)

原因不明症例中3例(0.375%)が PEX であった。

D. 考察

多施設における白内障術前角膜内皮障害状況を調査し、角膜内皮障害の原因、分布状況を明らかにした。原因不明とされた角膜内皮障害症例は5例(0.625%)存在しており、その内 PEX 角膜内皮障害と考えるべき症例は3例(0.375%)存在し、虹彩レーザー切開術後の3例(0.375%)と頻度は同じであり、水疱性角膜症には至らないPEXによる内皮障害はある程度の頻度で存在している可能性が示された。

今回愛媛県調査結果から全国範囲の調査、検討の必要性が示唆され、地域条件によって角膜内皮減少の状況、分布の違いなどについてさらに解明する必要はあると思われた。

E. 結論

愛媛県多施設調査を行い角膜内皮障害原因、分布状況を検討した水疱性角膜症には至らないPEXによる内皮障害はある程度の頻度で存在している可能性が示された。今後、当研究班参加施設関連病院においても同様の多施設調査を行う予定である。

F. 研究発表 (平成 22 年度)

論文発表

各分担の項および巻末に記載した

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

PEX 内皮症の生態共焦点顕微鏡による組織学的検討

研究分担者 大橋裕一

研究要旨 落屑症候群:Pseudoexfoliation (PEX) syndrome は、眼内組織に落屑物質が付着し、散瞳不良、チン氏帯脆弱、続発性緑内障などの眼合併症を引き起こすことが良く知られている。一方で、偽落屑症候群による角膜内皮細胞減少(偽落屑角膜内皮症:PEX 内皮症)の実態についてはまったく解明されていない。本研究の目的は、日本における PEX 内皮症の実態を調査し、診断基準を確立し、治療方針を提案することである。本年度愛媛大学においては、生体共焦点顕微鏡を用いて、PEX眼の角膜についての組織学的検討を行った。その結果、PEX 眼では角膜上皮、実質、内皮層の細胞密度はすべて減少しており、その Fellow 眼でも PEX 眼に類似した形態変化を有していることが判明した。PEX は両眼発症する疾患で、角膜内皮以外角膜全層に渡って病変を来しうる可能性が示された。

A. 研究目的

偽落屑症候群:Pseudoexfoliation (PEX) syndrome は、眼内組織に落屑物質が付着し、散瞳不良、チン氏帯脆弱、続発性緑内障などの眼合併症を引き起こすことが良く知られている。一方で、本疾患は眼内のみならず全身に偽落屑物質が沈着することが知られている。本研究の目的は PEX 眼において角膜内皮層を含め、角膜の上皮層、実質層、基底細胞下神経線維叢の形態変化を解明することである。

B. 研究方法

対象:片眼性 PEX 症例27例を以下三群に分けた。
検討対象の年齢範囲は60-90歳(平均74.4±6.3歳)

- 1) PEX 眼群(27眼)
- 2) 僚眼群(27眼)
- 3) 正常コントロール群(27眼)

方法:

生体レーザー共焦点顕微鏡(IVCM)観察
Rostock Corneal Module of Heidelberg Retina Tomograph II (HRTII-RCM) 共焦点顕微鏡を用いて角膜中央部を観察した。

角膜知覚測定

Cochet-Bonnet nylon thread esthesiometerを用いて中央角膜の知覚を測定した。

Image Analyses

症例毎に3枚 RCM 画像を無作為に選択し解析を行った。平均値にて統計学検討をした。

細胞密度解析:

角膜の上皮基底細胞、実質浅層、中間層、深層、内皮層の細胞密度を HRTII-RCM 内蔵ソフトにて計測し一画像に > 50個細胞を計測とした。

基底細胞下神経線維叢密度、蛇行率の解析

LNFD (long nerve fiber density) と NBD(nerve fiber density)を用いて神経密度を解析した。蛇行率は grade 1(almost straight) ~ grade 4 (very tortuous) 半定量方法にて解析した。

統計学方法

JMP (version 8.0 for windows; SAS Japan)を用いて行った。PEX 眼群と Fellow 眼群は paired *t*-test, PEX 眼群/Fellow 眼群と正常眼群には two-tailed Student's *t*-

testを用いた。角膜知覚とLNFD, BNDおよび上皮細胞密度の相関解析は Spearman's correlationを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は愛媛大学倫理委員会の承認されており、被検者全員に本研究の目的、検討方法について担当医が詳細に説明し同意を習得している。

C. 研究結果

PEX 眼群、Fellow 眼群および正常眼群において年齢、性差は認めなかった。

角膜知覚

PEX 眼、Fellow 眼、正常眼はそれぞれ 47.8 ± 5.6 mm、 53.7 ± 4.9 mm、 55.6 ± 4.7 mmであった。PEX 眼は Fellow 眼 ($P = 0.005$)、正常眼 ($P < 0.0001$)より有意に低下した。Fellow 眼は正常眼より有意に変化はなかった ($P = 0.378$)。

細胞密度

角膜上皮、実質、内皮細胞密度結果は図1に示した。正常眼より PEX 眼の上皮基底細胞、実質、内皮細胞の密度は有意に減少していた。

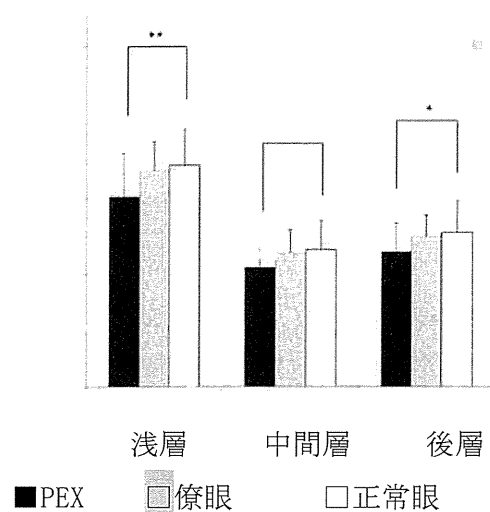


図 1

基底細胞下神経線維叢の形態変化

PEX 眼において正常眼より有意に LNFD, NFD が低下し、蛇行率が増大した。

著明に密度減少、蛇行した神経叢に炎症細胞浸潤、PEX 物質と思われる所見が見られた。

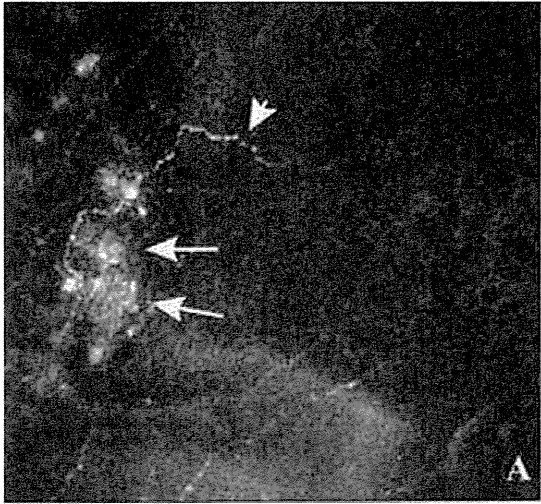


図2
PEX 眼では基底細胞下神経線維叢の蛇行、密度減少がみられ、付近 PEX 物質と思われる沈着が確認された。

D. 考察

眼内以外、結膜、皮膚、心、脳など組織にも PEX 物質が検出されていたため、PEX は全身疾患であること示唆されている。

本研究は初めて角膜各層の細胞密度を定量的検討した。実質細胞密度減少は PEX 症例の角膜厚低下している報告に裏付けデータになると考えた。また、角膜内皮以外実質浅層、基底細胞神経線維叢付近 PEX 物質も確認され、神経線維の密度減少、蛇行率増大、さらに、角膜知覚低下の原因と思われた。

Fellow 眼にも PEX 眼に類似した所見を有し、PEX の preclinical stage の可能性を示唆された。

E. 結論

PEX 眼において角膜上皮、実質、内皮層の細胞密度はすべて減少した。Fellow 眼は PEX 眼に類

似した形態変化を有した。PEX 症例の角膜知覚低下は上皮基底細胞密度減少、神経密度減少、蛇行率増大に related した。

PEX は両眼発症する疾患で、角膜内皮以外角膜全層に渡って病変を来しうる可能性が示された。

F. 研究発表 (平成 22 年度)

論文発表

1. Zheng X, Shiraishi A, Okuma S, Mizoue S, Goto T, Kawasaki S, Ohashi Y. et al. In vivo confocal microscopic evidence of keratopathy in patients with pseudoexfoliation syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52:1755-1761.
2. Zheng X, Sakai H, Goto T, Namiguchi K, Mizoue S, Shiraishi A, Sawaguchi S, Ohashi Y. Anterior Segment Optical Coherence Tomography Analysis of Clinically Unilateral Pseudoexfoliation Syndrome: Evidence of Bilateral Involvement and Morphological Factors Related to Asymmetry. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Jul 29;52(8):5679-84.
3. Hatou S, Shimmura S, Shimazaki J, Usui T, Amano S, Yokogawa H, Kobayashi A, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y. Inatomi T, Tsubota K. Mathematical projection model of visual loss due to fuchs corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Oct 7;52(11):7888-93

学会発表

1. 鄭 暁東、浪口孝治、五藤智子、溝上志朗、白石 敦、酒井 寛、澤口昭一、大橋裕一
片眼性偽落屑症候群における前眼部 OCT：
非対称病態に関与するリスクファクターの検討
第 115 回日本眼科学会総会(東京)5/12-5/15,
2011.
 2. 鄭 暁東、浪口孝治、永原國宏、五藤智子、
溝上志朗、原 祐子、鈴木 崇、山口昌彦、
宇野敏彦、白石 敦、大橋裕一
偽落屑症候群における白内障術後角膜内皮
細胞形態の変化
 3. 鄭 暁東、布施昇男、西田幸二、井上幸次、
宮田和典、木下 茂、天野史郎、大橋裕一
水疱性角膜症に対する角膜移植の多施設サ
ーバランス:病因と術式の検討
 4. 角膜カンファランス 2012 (東京) 2/23-2/25,
2012.
- G. 知的所有権の取得状況**
4. 特許取得：なし
 5. 実用新案登録：なし
- その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

角膜内皮の異物に対する分子制御・免疫制御に関する研究

研究分担者 井上 幸次 鳥取大学視覚病態学 教授

研究要旨 偽落屑が角膜内皮に障害を与える機序については不明だが、confocal microscope で偽落屑物質が直接内皮面に認められることから、内皮に異物である偽落屑物質が直接ついて何らかの反応を起こしている可能性が考えられる。そこで今回生体にとって異物である1型単純ヘルペスウイルス(HSV-1)の *in vitro* でのヒト角膜内皮細胞感染を一つのモデルとして、その分子制御について検証した。

その結果、角膜内皮細胞は、toll-like receptor (TLR)9 を介して NF κ B, CRE, C/EBP により誘導される一連の炎症性サイトカインの発現を介して HSV-1 感染に対抗する炎症性プログラムを開始し、一方で、TLR9 を介した NF κ B の活性化が HSV-1 の複製に使用されていることが判明した。また、角膜内皮細胞は抗原提示機能を有し、TLR9 を介して indoleamine 2,3-deoxygenase を活性化し、CD4 陽性の抗原特異的調節性 T リンパ球を誘導することができ、免疫応答を制御する機能をもつことが判明した。

A. 研究目的

偽落屑が角膜内皮に障害を与える機序については不明だが、confocal microscope で偽落屑物質が直接内皮面に認められることから、内皮にとっては異物である偽落屑物質が内皮に直接ついて何らかの反応を起こしている可能性が考えられる。そこで今回生体にとって異物である1型単純ヘルペスウイルス(HSV-1)の *in vitro* でのヒト角膜内皮細胞感染を内皮細胞の異物に対する反応のモデルとして、その分子制御について検証した。

特に近年、innate immunity を担う分子として注目されている toll-like receptor (TLR) と、

HSV-1 感染後の全ゲノム転写解析においてもっとも発現が増強された因子の一つである indoleamine 2,3-deoxygenase (IDO) の免疫制御に果たす役割を合わせて検討した。

B. 研究方法

不死化ヒト角膜内皮細胞 (HCEn) を用いて TLR の発現を FACS にて調べた。HSV-1 感染後の炎症性サイトカインの発現レベルは、real-time RT-PCR とプロテインアレイアナリシスにより測定した。HSV-1 の複製への TLR9 の関与については、real-time PCR とプラークアッセイにより検証した。TLR9 阻害の検証には、TLR9 阻害

オリゴヌクレオチドまたは TLR9 siRNA を用いた。シグナル伝達経路活性化の検証のために、経路特異的転写因子レポーターを誘導した HCEn 細胞で、プロモーター活性を測定した。

また、IDO の発現、機能、その免疫調節活性誘導能を HSV 感染角膜内皮と HSV 特異的アロリンパ球との刺激試験で検討し、合わせて TLR9 との関連を調べた。

(倫理面への配慮)
該当しない。

C. 研究結果

HCEn 細胞内において、TLR9 が強く発現していた。TLR9 のリガンドである CpG オリゴヌクレオチドは、HCEn 細胞において NF κ B 活性を刺激した。HSV 感染も NF κ B を刺激し、同時に RANTES, IP-10, MCP-2, MIF, MCP-4, MDC, MIP-3 α , IL-5, TARC, MCP-1, IL-6 などの NF κ B 関連炎症性サイトカインを誘導した。これらのサイトカインの誘導は TLR9 活性の遮断により著しく減少した、さらに、HCEn 細胞内でのウイルスの複製は TLR9 の阻害により減少したものの、NF κ B カスケードの同時活性化により回復した。異なる HSV-1 誘導性炎症カスケードに関連する転写因子のうち、TLR9 は、NF κ B, サイクリック AMP 応答エレメント (CRE)、及び CCAAT エンハンサー結合蛋白質 (C/EBP) を活性化することが判明した。

一方、HSV 感染後、IDO 転写のみならず IDO タンパクおよび酵素活性の顕著な増大を感染 12 時間後から認めた。HSV 感染角膜内皮と HSV 特異的アロリンパ球との刺激試験では、CD4 陽性 T 細胞が IL-10 を産生した。HSV 感染角膜内

皮と 72 時間混合培養したアロ CD4 陽性 T 細胞は、末梢血由来の抗原提示細胞による HSV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖反応を抑制することができ、HSV 感染角膜内皮は、抗原特異的調節性 T リンパ球 (Treg) 誘導活性を持つことが判明した。この作用は、角膜内皮の IDO 発現を IDO 特異的 siRNA transfection により抑制すると減弱した。さらに、プラスミドの transfection により IDO の過剰発現をさせたヒト角膜内皮では、HSV 特異的な IL-10 産生性 CD4 陽性 Treg の誘導活性が増大した。

TLR9 を阻害オリゴヌクレオチドで抑制すると IDO の転写はほぼ完全に抑制された。

D. 考察

ヒト角膜内皮細胞において TLR9 刺激は IDO の主たる誘導因子ということになり、TLR9 は IDO の制御にも関わる重要な役割をはたし、その IDO は CD4 陽性 Treg を誘導することから、TLR9 を介した反応が生体にとって不利なウイルス増殖、生体にとってウイルスを排除する上では有利だが、内皮を守る上では不利な炎症性サイトカインを誘導するとともに、逆に生体にとってウイルスを排除する上では不利だが、内皮を守る上では有利な調節性 T 細胞の誘導に働いていることがわかった。

このように角膜内皮は一つの分子をめぐる反応をみても 2 面性のある大変複雑な反応を引き起こしていることがわかった。今後、偽落屑と内皮の interaction について感染ではない異物を用いた系で検討が必要であると思われる。

E. 結論

角膜内皮細胞は、TLR9 を介して NF κ B, CRE, C/EBP により誘導される一連の炎症性サイトカインの発現を介して HSV-1 感染に対抗する炎症性プログラムを開始する。その一方で、TLR9 を介した NF κ B の活性化は HSV-1 の複製にも使用される。

一方、角膜内皮は、HSV 感染後、TLR9 を介して IDO を活性化し、CD4 陽性調節性 T リンパ球を誘導することができ、感染に対する免疫応答を制御する機能をもつことが判明した。

F. 研究発表（平成 22 年度）

論文発表

1. Miyazaki D, Haruki T, Takeda S, Sasaki S, Yakura K, Terasaka Y, Komatsu N, Yamagami S, Touge H, Touge C & Inoue Y: Herpes simplex virus type 1-induced transcriptional networks of corneal endothelial cells indicate antigen presentation function. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:4282-4293,2011.

2. Takeda S, Miyazaki D, Sasaki S, Yamamoto Y, Terasaka Y, Yakura K, Yamagami S, Ebihara N, & Inoue Y: Roles played by toll-like receptor-9 in corneal endothelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:6729-6736, 2011.

学会発表

1. 川口亜佐子、武信二三枝、魚谷瞳、矢倉慶子、宮崎大、井上幸次、中山哲夫、吉川哲史、八田史郎：ムンプスウイルスの関与が疑われた成人の劇症角膜内皮炎の 1 例。第 84 回鳥取大学眼科研究会，米子，2011/9/17
2. 春木智子、宮崎大、稲田耕大、佐々木慎一、山本由紀美、矢倉慶子、唐下千寿、唐下泰一、井上幸次、山上聡：Indoleamine 2,3-deoxygenase による角膜内皮の免疫制御作用。角膜カンファレンス 2012(第 36 回日本角膜学会総会・第 28 回日本角膜移植学会)，東京 2012/2/23-2/25

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

偽落屑症候群における角膜内皮細胞に関する研究

研究分担者 外園千恵 京都府立医科大学眼科学 講師

研究要旨 細隙灯顕微鏡を用いた観察で、無散瞳下に虹彩上もしくは水晶体前囊に落屑物質が認められた症例(14例、平均年齢 69.2±3.6歳)を対象とし、落屑物質と角膜内皮細胞障害との関連を検討した。落屑物質の付着量の多い眼(PE群)は、正常あるいは落屑物質の付着量の少ない眼(PE僚群)よりも角膜内皮細胞密度の少ない傾向があった。また、角膜内皮細胞密度はPE群において正常群よりも加齢に伴い早く減少する傾向にあった。偽落屑症候群では落屑物質の付着量と年齢を考慮し、角膜内皮細胞障害を観察すること有用である。

A. 研究目的

偽落屑症候群(Pseudoexfoliation syndrome: PEX)における角膜内皮細胞障害について海外での既報があるが、日本人において詳細を検討した報告はない。そこで今回、偽落屑症候群での角膜内皮細胞の変化とその影響因子について検討した。

B. 研究方法

細隙灯顕微鏡を用いた観察で、無散瞳下に虹彩上もしくは水晶体前囊に落屑物質が認められた14例28眼(平均年齢 69.2±3.6歳)を対象とし、落屑物質が認められる16眼をPE群、落屑物質が認められない12眼をPE僚群とした。緑内障性変化を認める、抗緑内障点眼薬を使用、眼内手術既往のいずれかに該当する患者は除外した。

年齢分布を一致させた正常群22例43眼(平均年齢 67.5±5.2歳)をコントロールとして以下の項

目についてPE群、PE僚群と比較し内皮細胞変化との関連性を検討した。

【検討項目】

- ・角膜内皮細胞密度(CD)
 - ・平均細胞面積(AVE)
 - ・変動係数(CV)
 - ・六角形細胞出現頻度(6A)
 - ・角膜厚(μm)
- (スペキュラーマイクロスコープ(TOMEY、EM-3000)により計測)
- ・眼圧(mmHg)
 - ・前房深度(mm)と隅角角度(°)

C. 研究結果

- ①PE群の角膜内皮細胞密度は正常群に比べて有意な減少が認められた(図1)。
- ②PE僚群の角膜内皮細胞密度は正常群とPE群の中間値であったが両者との有意差は認めなかつ

た(図1)。

③角膜厚、前房深度、隅角角度、眼圧について3群間で有意差を認めなかった。

同一患者では落屑物質優位眼の方が非優位眼に比べて角膜内皮細胞密度が減少傾向にあったが、有意差を認めなかった。他の検討項目においても同様に有意差を認めなかった。

角膜内皮細胞密度はPE群において正常群よりも加齢に伴い早く減少する傾向にあった。

D. 考察

角膜内皮細胞密度は正常群に比べてPE群で有意差をもって減少しており、PE僚群との比較からも、落屑物質の付着量と角膜内皮細胞障害の程度が相関関係にあると推測された。また加齢に伴いPE群で、角膜内皮細胞密度が正常者よりも早く減少することから、偽落屑症候群では経時的に角膜内皮細胞密度を観察する必要があると考えられた。偽落屑症候群における角膜内皮細胞障害は、落屑物質による角膜内皮細胞への直接的な変化に加え、角膜内皮細胞自体の viability の違い(一次的変化)や前房環境の変化に伴う二次的変化などの多因子が関与している可能性がある。

E. 結論

偽落屑症候群では落屑物質の付着量と年齢を考慮し、角膜内皮細胞障害について観察すること

が有用である。

F. 研究発表(平成23年度)

論文発表

1. Nakatsukasa M, Sotozono C, Shimbo K, Ono N, Miyano H, Okano A, Hamuro J, Kinoshita S. Amino Acid profiles in human tear fluids analyzed by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. Am J Ophthalmol. May;151(5):799-808.e1., 2011.

学会発表

1. 水野連太郎、稲富勉、中川絃子、外園千恵、上野盛夫、池田陽子、森和彦、木下茂. 落屑症候群における角膜内皮細胞の検討. 第36回日本角膜学会総会、第28回日本角膜移植学会、東京、2012.2.24.

著書・総説

なし

G. 知的所有権の取得状況

(ア) 特許取得:

なし

(イ) 実用新案登録:

なし

(ウ) その他:

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

アスコルビン酸 2 リン酸によるヒト角膜内皮細胞の増殖に関する研究

研究分担者 天野史郎 東京大学眼科学 教授

研究要旨 培養角膜内皮細胞を用いた再構築角膜による角膜移植実現の為には、効率のよく高品質な細胞を安定して供給可能な培養方法の開発が必須である。本研究では抗酸化物質であるアスコルビン酸 2 リン酸(Asc-2P)に着目し、Asc-2P のヒト角膜内皮細胞培養に対する影響を検討した。Asc-2P を用いて培養した HCEC は高い増殖能と継代安定性を示し、角膜内皮に重要な機能分子や構造分子は組織角膜内皮とほぼ同等の発現量と同様の発現分布を認めた。このメカニズムとして、細胞内の酸化ストレスを減少させることによる細胞寿命の延長や HGF の発現亢進による細胞増殖促進について明らかにした。

A. 研究目的

効率の良いヒト培養角膜内皮細胞の樹立のため、アスコルビン酸 2 リン酸(Asc-2P)の培養ヒト角膜内皮細胞に対する増殖能やそのメカニズムを解析すること。

B. 研究方法

様々な年齢のドナーから採取したヒト角膜内皮細胞(HCECs)を Asc-2P を含む培養液を用いてアテロコラーゲンシート上で培養した。Asc-2P を含まない培養液で培養した HCECs をコントロール群として用いた。検討項目としてまず Asc-2P による HCECs への増殖能、継代安定性を確認し、指摘培養条件を検討した。次に角膜内皮に発現する重要な構造分子、機能分子の発現を蛋白レベル、分子レベルで評価した。DNA 酸化損傷の指標である 8-OHdG、脂質過酸化指標のマロンジアルデヒド(MDA)の発現も評価した。さらに Asc-2P によるコラーゲンの誘導や、マイクロアレイを用いて Asc-2P

によって誘導される各種細胞増殖因子についても検討を行った。

C. 研究結果

アテロコラーゲンを基質とし、Asc-2P と bFGF 存在下で培養することにより、初代培養ほどの年齢帯においても良好な増殖を示し、継代を重ねても高い増殖能と角膜内皮細胞特有の敷石状の形態を維持した。ZO-1, N カドヘリン、コネキシン 43 といったジャンクション蛋白、ならびに水輸送に関連するアクアポリン 1、Na/K ATPase、NBC などは組織のヒト角膜内皮と同等の発現量や類似した細胞内分布を示した。コントロール群では 8-OHdG と MDA は継代ごとにその生成が増加したが、Asc-2P を添加して培養した群ではそれらの生成が抑制されていた。

コラーゲンの誘導実験では、Asc-2P 刺激により HCECs から可溶性 1 型コラーゲン(プロコラーゲン)の誘導を促進したが、1型、3型、4型コラーゲンの

沈着は促進しなかった。マイクロアレイ及び ELISA の結果、Asc-2P 刺激により HCECs から肝細胞増殖因子 (HGF) が大量に誘導された。HCECs を HGF 添加して培養すると、その増殖が有意に促進された。Asc-2P による HCECs 増殖促進効果は抗 HGF 中和抗体および cMet 特異的阻害剤の添加によって消失した。

D. 考察

今回の種々の検討により、Asc-2P を添加して HCECs を培養することは非常に効果的であることが判明し、将来 HCECs を用いた移植を臨床応用する際大変有効であると考えられた。培養の細胞源は主に高齢者の角膜から採取するが、今回の検討では 70 代の高齢者ドナーからの培養であっても Asc-2P を培養液に添加することで、40 代や 50 代から採取した細胞からの培養細胞の増殖能と遜色がなかった。このことは HCEC の安定供給を考えた場合にも非常に有益である。また増殖のみならず継代しても高い増殖能、形態、機能を維持可能であったことも、好ましい効果である。

アスコルビン酸自体はコラーゲン合成の補酵素であるため、Asc-2P 添加による培養によってコラーゲンの沈着が懸念されたが、一部の可溶性コラーゲン合成は促進するものの、沈着を促進しなかった。このメカニズムは不明であり、今後の検討を要するが、これも将来 HCEC を実際の移植医療に用いる際に望ましい結果であることは間違いない。

Asc-2P による角膜内皮細胞に対する効果の作用機序についても今後検討を重ねる必要があるが、今回マイクロアレイの検討から増殖にかかわる因子の一つとして HGF の関与を知ることができた。HGF は前房水にも含まれており、眼内の様々な病

態や恒常性維持に重要な役割を果たすことが過去に報告されている。今後もこのような検討を重ねることにより、Asc-2P を用いた培養によってより安全で効果的な移植治療が可能となると考える。

E. 結論

Asc-2P を用いて培養した HCEC は高い増殖能と継代安定性を示し、角膜内皮に重要な機能分子や構造分子は組織角膜内皮と遜色のない発現量と発現分布を認めた。このメカニズムとして、細胞内の酸化ストレスを減少させることによる細胞寿命の延長や HGF の発現亢進による細胞増殖促進について明らかにした。

F. 研究発表 (平成 22 年度)

論文発表

1. Hatou S, Shimmura S, Shimazaki J, Usui T, Amano S, Yokogawa H, Kobayashi A, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Inatomi T, Tsubota K: Mathematical projection model of visual loss due to Fuchs corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:7888-7893, 2011
2. Higa A, Sakai H, Sawaguchi S, Iwase A, Tomidokoro A, Amano S, Araie M: Prevalence of and risk factors for cornea guttata in a population-based study in a southwestern island of Japan. The Kumejima study. Arch Ophthalmol 129:332-336, 2011
3. Hotehama A, Mimura T, Usui T, Kawashima H, Amano S: Sudden onset of amantadine-induced reversible bilateral corneal edema in an elderly patient: Case report and literature review. Jpn J Ophthalmol 55:71-74, 2011

学会発表

1. 島 伸行、木本美和、山口昌大、天野史郎、山上聡

アスコルビン酸2リン酸(Asc-2P)を用いたヒト角膜
内皮細胞の培養

第36回角膜カンファレンス 2012

2012年2月25日

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

偽落屑症候群における角膜内皮密度に関する研究

研究分担者 相馬 剛至 大阪大学医学部附属病院眼科 医員

研究要旨 偽落屑症候群 (PEX) における角膜内皮細胞密度 (ECD) の減少について検討した。対象は当院を受診した片眼性 PEX 患者 21 人。対照症例は連続白内障術前患者 19 人。落屑物を認める眼を患眼、対眼を瞭眼、対照症例の右眼を正常眼とし 3 群の ECD を比較した。結果、ECD は患眼 (平均 2288 cells/mm²) が瞭眼、正常眼 (2647、2774) より有意に減少していた。瞭眼と正常眼で ECD、に有意な差は認めなかった。以上より、片眼性 PEX では、患眼のみ角膜内皮細胞密度が減少していた。

A. 研究目的

偽落屑症候群 (PEX) は瞳孔縁や水晶体前面にふけ様落屑物質が沈着する疾患であり、アジアでは人口の 1% に発症するとされている。原因遺伝子として LOXL1 遺伝子多型の報告がある。他の臨床所見としてチン氏帯の脆弱性や散瞳不良、緑内障の合併があげられる。本疾患における角膜内皮障害については 1980 年代から報告があるが、2000 年に Naumann らが PEX による水疱性角膜症に対して角膜移植を施行した症例を報告している。このように臨床的には重症度が高いが、その詳細な機序は不明である。

そこで今回、我々は当科における偽落屑症候群患者の角膜内皮細胞密度について検討した。

B. 研究方法

対象は、2004 年 10 月から 2010 年 12 月に大阪大学医学部附属病院を受診し、片眼性の PEX と

診断された 21 人。男性 16 人、助成 5 人で年齢は 74.6 ± 1.9 歳 (平均 ± 標準偏差)。対照として 2010 年 12 月から 2011 年 1 月に当院を受診した他の眼疾患の合併がない連続白内障症例 19 人 (男性 8 人、助成 11 人、平均年齢 72.6 ± 2.0 歳) を用いた。PE を認める眼を患眼、対側眼を瞭眼と定義し、角膜内皮細胞密度を測定した。測定にはそれぞれ SPECULAR MICROSCOPE SP・3000P (Topcon) を用いた。

(倫理面への配慮)

角膜内皮細胞密度測定は非侵襲的検査であり、検査を行うことによる不利益は生じない。

C. 研究結果

代表症例を提示する。66 歳男性、右眼の落屑緑内障にて当院を紹介受診。右眼は散瞳不良で、虹彩縁に落屑物質を認めた。角膜内皮密度は患眼で 2144 cells/mm²、瞭眼で 2792 cells/mm² と明ら