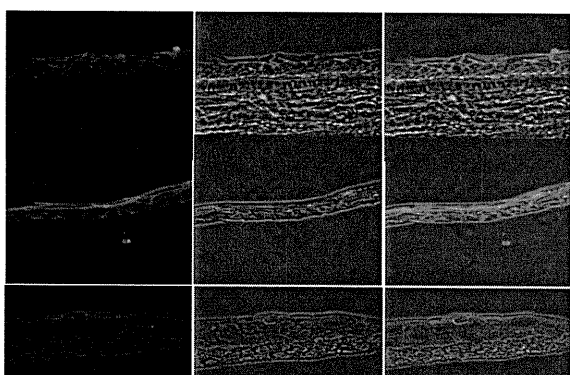


皮細胞シートに対して、anti-TACSTD2 抗体（ヤギポリクローナル）を用いて免疫組織化学染色を行った。また、各組織から RNA を抽出し、定性的な RT-PCR を行った。

C. 研究結果

1) ヒト角膜では角膜上皮の全層に発現し、特に表層細胞の apical 側に強い発現を認めた。ヒト角膜上皮シート、ヒト口腔粘膜上皮細胞シートにおいても発現を認め、シグナルの強度にヒト角膜と大きな差異を認めなかつ



た。一方、マウス角膜においては免疫組織化学のシグナルはきわめて弱か

図：ヒト角膜(上)ヒト角膜上皮細胞シート(中)ヒト口腔粘膜上皮細胞シート(下)の TACSTD2 免疫組織化学(緑)

った。しかし、RT-PCR ではマウス角膜も含め、すべての検体において TACSTD2 の転写を認めた。

D. 考案

TACSTD2 は角膜上皮再生治療に使用している細胞シートにおいても発現していた。マウスにて蛋白を検出できないのは、使用した抗体がマウス TACSTD2 を認識できないためか、あるいはマウスにおいては TACSTD2

蛋白の不安定性が存在するのか等が考えられ、今後の検討が必要である。

E. 結論

GDLD の原因遺伝子である TACSTD2 の正常角膜、治療に使用している細胞シート、また、モデルに使用する動物角膜での発現を検討した。これにより、病因の解析と標準的治療レジメの確立に貢献した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsujikawa M. Gelatinous Corneal Dystrophy. *Cornea*. in press
2. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H, Du ZJ, Xie P, Matsumura N, Fu X, Zhang R, Sonoda KH, Egashira K, Hazen SL, Kamei M. : Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration . *J Cell Sci*. in press.
3. Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Effect of 1-year lutein supplementation on macular pigment optical density and visual function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011 249:1847-54.
4. Wakabayashi T, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Intravitreal bevacizumab for

exudative branching vascular
networks in polypoidal choroidal
vasculopathy. Br J Ophthalmol.
2012 96:394-9

2. 学会発表

1. 辻川元一、大家義則、相馬剛至、
林竜平、西田幸二 ヒト細胞シートお
よびヒトとマウス角膜における
TACSTD2 遺伝子の発現解析 第 36
回日本角膜学会総会 2012 年 2 月 23

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

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全層角膜移植術
後再発症例に対する共焦点顕微鏡検査及び前眼部光干渉断層計検査」

分担研究者 天野史郎 東京大学医学部眼科学教室 教授
研究協力者 臼井智彦 東京大学医学部眼科学教室 助教
宮井尊史 東京大学医学部眼科学教室 助教

【研究要旨】

近年、科学の発達により以前では見られない角膜所見も理解することができるよう検査機器が登場してきている。代表的なものとしては、共焦点顕微鏡及び、前眼部光干渉断層計がある。共焦点顕微鏡は *in vivo biopsy* ともいわれ、生体角膜について細胞レベルでの観察を可能とした機器であり、前眼部光干渉断層計は、さまざまな方向から角膜の断層像を得ることができる機器である。膠様滴状角膜変性症（GDL D）に対する上記検査結果については報告はあるが、GDL D に対する全層角膜移植術後再発症例に対する報告は現時点では見られていない。今回は昨年報告した GDL D に対する全層角膜移植術後に長期経過観察できた症例のうち再発症例に関して、生体共焦点顕微鏡検査及び前眼部光干渉断層計検査を行ったので、その結果を報告する。

A. 研究目的

GDL D に対する全層角膜移植術後再発症例に対し、生体共焦点顕微鏡検査及び前眼部光干渉断層計検査を行うこと。

B. 研究方法

対象は GDL D に対し全層角膜移植術を行い、術後に再発のみられた症例 2 症例。症例 1 は 59 歳女性で、過去に右眼は 2 回、左眼は 1 回の角膜移植の既往がある症例で、症例 2 は 79 歳男

性で、右眼に 1 回、左眼に 2 回の角膜移植が行われた症例であった。

この 2 症例に対し、共焦点顕微鏡検査及び、光干渉断層計検査を行った。

C. 研究結果

共焦点顕微鏡所見では、部分的に不均一に高輝度な領域がみられ、上皮細胞間の間隙が高輝度になっていた。

前眼部光干渉断層計検査では、角膜上皮レベルで再発部に一致して高輝度になっている所見がみられ、再発部

位の深度情報を得ることができた。

D. 考案

GDLD に対する PKP では再発が起こりやすいことが知られている。今回再発によるアミロイド沈着部位に相当すると思われるところは共焦点顕微鏡及び光干渉断層計共に高輝度となっていた。今回は少数の症例での検討であるので、さまざまな表現形について今後さらなる検討が必要と考えられるが、共焦点顕微鏡では上皮細胞とアミロイドの位置関係が、前眼部 OCT では再発部位の深度についての診断が可能であると考えられた。

E. 結論

GDLD に対する PKP 術後再発症例に対して、共焦点顕微鏡検査及び、光干渉断層計検査を行いその所見を得た。今回の検討により、これら新しい検査機器は、GDLD に対する PKP 術後再発症例に対する方針決定についても役立つ情報が得られる可能性が示唆

され、膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立の一助となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuda R, Usui T, Tomidokoro A, Mishima K, Matagi N, Miyai T, Amano S, Araie M. Noninvasive observations of peripheral angle in eyes after penetrating keratoplasty using anterior segment fourier-domain optical coherence tomography. *Cornea.*;31:259-263,2012.

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

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

「膠様滴状角膜ジストロフィにおける2つの新規変異と野生型および変異型
TACSTD2の細胞内局在についての分子生物学的検討」

分担研究者 稲富 勉 京都府立医科大学眼科学教室 助教
研究協力者 福本暁子 京都府立医科大学眼科学教室 研修員
足立紘子 京都府立医科大学眼科学教室 大学院生

【研究要旨】

膠様滴状角膜ジストロフィ（膠様滴状角膜変性症、以下GDL）は常染色体劣性遺伝の遺伝形式をもち、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。この疾患の罹患者の多くは日本人であり、多くはp. Gln118Xの遺伝子変異であるが、これまで中国、インド、イラン、トルコなどにおいても様々な遺伝子変異が報告されている。本研究では、日本人における2つの新規変異として、p. Ile281SerfsX23とp. Tyr225Xを報告した。また、野生型TACSTD2と変異型TACSTD2としてp. Gln118X、および新規2変異のプラスミドを作成し、SV40 immortalized human corneal epithelial cellsに遺伝子導入し、タンパクの細胞内局在を調べた結果、野生型TACSTD2は、細胞膜と細胞内に局在しているのに対して、変異型TACSTD2は細胞内のみに存在が限局していた。

A. 研究目的

膠様滴状角膜ジストロフィ（以下GDL）は10歳代に角膜上皮下にアミロイド沈着が生じ、初期から流涙、羞明、疼痛を自覚し、比較的早期から病気が進行して視力障害を生じる。常染色体劣性遺伝を呈し発症頻度は稀であるが、1999年に辻川らによって責任遺伝子がTACSTD2遺伝子であることが同定されたが、その分子メカニズムは未だ不明である。この疾患の罹患者の多くは日本人であり、多くはp. Gln118Xの遺伝子型であるが、これまで中国、インド、イラン、トルコなどにおいても様々な遺伝子変異が報告されている。

本研究では、日本人3家系における2つの新規変異を報告した。また、野生型TACSTD2と変異型TACSTD2の細胞内局在を調べ、GDLの病態メカニズムについて検討した。

B. 研究方法

- 1) GDLと診断した3症例の遺伝子変異解析を行った。症例1と症例2については家族に対しても遺伝子変異解析を行った。症例3についてはsingle-base primer extension assayを行った。
- 2) 野生型TACSTD2と変異型

TACSTD2 として p. Gln118X、および新規 2 変異のプラスミドを作成し、不死化ヒト角膜上皮細胞に遺伝子導入し、免疫染色法によってタンパクの細胞内局在を調べた。

(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。またゲノムの個人情報に関しては、京都府立医科大学の倫理委員会承認のもと行っている。

C. 研究結果

1) 症例 1 は 30 歳の日本人男性で両親は近親婚であった。右眼は 16 歳時に左眼は 21 歳時にエキシマレーザー角膜切除術 (PTK) を受けており、両眼にアミロイド沈着が再発していた (図 1A)。TACSTD2 遺伝子に

p. Ile281SerfsX23 変異を持ち、両親も同変異をヘテロに認めた (図 2A, C)。症例 2 は 29 歳の日本人女性で両親は近親婚であった。左眼は 23 歳時に右眼は 26 歳時に PTK を受けており、両眼にアミロイド沈着が再発していた (図 1B)。TACSTD2 遺伝子に

p. Ile281SerfsX23 変異を持ち、両親、妹も同変異をヘテロに認めた (図 2A, C)。症例 3 は 83 歳日本人女性で両親は近親婚でなかった。左眼は 72 歳時に表層角膜移植術を右眼は 82 歳時に全層角膜移植術を受けており、両眼とも再発していた (図 1C)。TACSTD2 遺伝子に p. Tyr225X 変異を認めた (図 2B, D)。3 症例とも再手術を行い、症例 1 と症例 2 は術後ソフトコンタクトレンズの連続装用により再発を認めない

が、症例 3 はソフトコンタクトレンズの装用が困難であり、アミロイド沈着の再発を認める。



図 1 A: 症例 1 の前眼部写真。上皮下にアミロイド沈着を認め、mulberry-type を示す。B: 症例 2 の前眼部写真。mulberry-type を示す。C: 症例 3 の前眼部写真。血管新生を伴う kumquat-like type を示す。

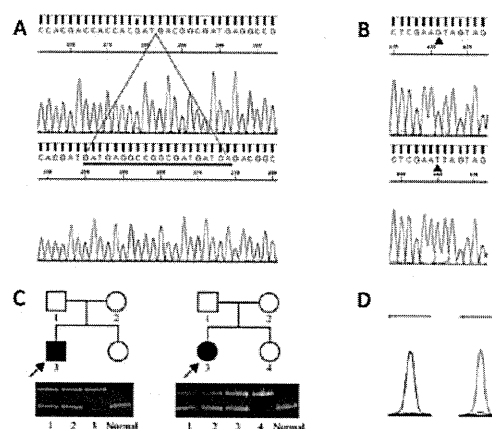


図 2 A: 症例 1、および症例 2 のシーケンス解析。上段が正常、下段が症例 1、2。ヌクレオチド 840 番と 841 番の間に 20 塩基の挿入を認める。B: 症例 3 のシーケンス解析。上段が正常、下段が症例 3。ヌクレオチド 675 番に置換変異を認める。C: 症例 1 (左) と症例 2 (右) の家族における PCR 結果。家族においては挿入のあるアレルをヘテロに持つ。D: 症例 3 における 1-base primer extension 解析。

2) V5 タグを付加された野生型 TACSTD2 プラスミドと変異型 TACSTD2 プラスミドが HCE-T に遺伝子導入され

た。免疫染色法によって、野生型 TACSTD2 は、細胞膜と細胞内に局在しているのに対して、変異型 TACSTD2 は細胞内のみが存在が限局していることが明らかとなった (図 3A, B, C, D)。変異型 TACSTD2 を遺伝子導入した細胞は、0.1% Tween-20 によって界面活性剤処理を行うと免疫陽性細胞が増加することにより細胞内に局在していることが証明された (図 3E, F, G, H, I, J)。

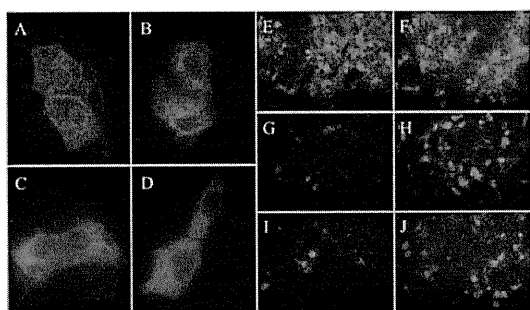


図 3 遺伝子導入実験の免疫染色
野生型 TACSTD2 (A) は細胞膜と細胞内に局在を認めた。p. Ile281SerfsX23 (B)、p. Tyr225X (C)、p. Gln118X (D) は細胞内のみで局在していた。0.1% Tween-20 によって界面活性剤処理を行う (E, G, I) と野生型 TACSTD2 では免疫陽性細胞が変化しないが (E, F)、p. Ile281SerfsX23 (G, H)、p. Tyr225X (I, J) は免疫陽性細胞が増加した。

D. 考案

本研究において日本人 3 症例における 2 つの新規変異を報告した。2 症例にみられた 20 塩基挿入は膜貫通ドメイン内にフレームシフトを起こし (p. Ile281SerfsX23)、1 症例にみられた置換変異はサイログロブリンドメインと膜貫通ドメインの間にナンセ

ンス変異を起こす (p. Tyr225X)。膜貫通ドメインは膜結合に必要なドメインであるが、このドメイン構造はコンピューターで予測されているものであった。本研究により、野生型 TACSTD2 と変異型 TACSTD2 の細胞内局在が実験的に証明された。

E. 結論

GDLD の新規 2 変異と細胞内局在を報告した。本研究が GDLD の病態解明へのステップになると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 23 年度)

1. 論文発表

1. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. Prostaglandin E receptor subtype EP3 expression in human conjunctival epithelium and its changes in various ocular surface disorders. PLoS One. 2011;6(9):e25209. Epub 2011
2. 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(11):7888-93, 2011.
3. Takeda K, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Watanabe A,

Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using the combination of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation and eyelid surgery for severe ocular surface disease.

Am J Ophthalmol.

152(2):195-201,2011.

4. Higashihara H, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S.

The blood-aqueous barrier breakdown in eyes with endothelial decompensation after argon laser iridotomy. Br J Ophthalmol.

95(7):1032-4,2011.

5. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. Br J Ophthalmol. 2011 Jul;95(7):942-6.

2. 学会発表

1. Tsutomu Inatomi, Takahiro Nakamura, Noriko Koizumi, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita:

Update of Ocular Surface Reconstruction Using Cultivated Epithelial Sheet Transplantation. The 24th Asia-Pacific Association of Cataract and Refractive Surgeons, Seoul, 2011.10.14.

2. Tsutomu Inatomi, Hiroko Adachi, Osamu Hieda, Chie Sotozono, Norihiko Yokoi, Shigeru

Kinoshita: Corneal Endothelial Cell Alteration Following

Descemet-Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. ARVO, Fort Lauderdale, 2011.5.1-5.

3. Hiroko Nakagawa, Tsutomu Inatomi, Osamu Hieda, Chie Sotozono, Norihiko Yokoi, Shigeru Kinoshita: Safety and Efficacy of Using an Internationally

Transported Precut Donor Cornea for DSAEK. American Academy of Ophthalmology, Orland, 2011.10.22-25.

4. 稲富 勉、外園 千恵、中村 隆宏、小泉 範子、都田 桂子、松山 琴音、木下 茂. 自家培養口腔粘膜上皮シート移植による結膜嚢再建効果の検討. 第 65 回日本臨床眼科学会、東京国際フォーラム、2011. 10. 8.

5. 中川 紘子、稲富 勉、稗田 牧、外園 千恵、横井 則彦、山崎 俊秀、木下 茂. 角膜内皮移植眼における角膜内皮細胞密度の中長期変化の検討. 第 65 回日本臨床眼科学会、東京国際フォーラム、2011. 10. 9.

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

[IV]

膠様滴状角膜ジストロフィ治療指針

膠様滴状角膜ジストロフィ治療指針

厚生労働省科学研究費補助金（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」に関する研究による成果物
京都府立医科大学、順天堂大学、大阪大学、東京大学 眼科学教室による合同研究（2011年度改正版）

1. 疾患

膠様滴状角膜ジストロフィ（膠様滴状角膜変性症、Gelatinous drop-like dystrophy）は常染色体劣性遺伝形式の遺伝性角膜ジストロフィで、10歳代に角膜上皮下にアミロイドが沈着し、著しい視力低下を来す疾患である。原因遺伝子は Tumor associated calcium transducer 2 (TACSTD2)で、この遺伝子の機能喪失型変異によってタイトジャンクションの形成不全が生じるため、涙液中のラクトフェリンが角膜内に侵入しアミロイドを形成すると考えられている。視力不良患者には視力改善の目的で角膜移植術が行われるが、高率に再発するため度重なる移植手術が余儀なくされる症例が少なくない。また角膜移植後には緑内障を合併しやすいことが知られている。

2. 治療原則

現時点では膠様滴状角膜ジストロフィを完治させる治療法はない。そのため治療の目標は膠様滴状角膜ジストロフィの進行を遅らせる、視力が低下した場合には手術等の処置で改善させる、手術治療後の再発抑制を行う等によって失明を予防し患者の生涯にわたる QOL を維持することにある。以下に示すように疾患の進行程度に合わせて適切な術式を選択すべきであるが、基本的な考え方としては、できうる限り侵襲の少ない術式を選択しなるべく全層角膜移植術を回避するような治療計画をたてることが肝要となる。またソフトコンタクトレンズの装用に角膜移植後の再発を有意に遅らせる効果があることが明らかとなっており、これを積極的に用いることが推奨される。

3. 治療指針

(ア) 膠様滴状角膜ジストロフィに対する手術治療

- ① 透過性亢進のみまたは視力低下がないが、軽度の膠様滴状角膜ジストロフィに対する治療
現時点でその効果は明かとなっていないが、ソフトコンタクトレンズに疾患進行抑制効果がある可能性があり、これを用いることが推奨される。
- ② 軽症に対する治療
軽症例には治療的表層角膜切除術（Phototherapeutic keratectomy、PTK）を使用して角膜アミロイドを部分切除する方法が推奨される。アミロイド沈着による突出が少ない場合は、照射径を小さくして沈着部位毎に切除するが、突出が多い場合には機械的搔爬とレーザー照射を併用する。術後は感染予防、炎症抑制のために抗生剤点眼剤と低濃度ステロイド剤を漸減しながら3ヶ月程度使用する。
- ③ 中等症に対する治療
治療的表層角膜切除術では取り除けない程アミロイド沈着が強い場合や、角膜実質混濁が強い場合は表層角膜移植術（Lamellar keratoplasty、LKP）を行い、特に全層の角膜混濁を呈する症例には深層表層角膜移植術（Deep anterior keratoplasty、DALK）を行う。この場合、移植片由来の正常角膜上皮が再発抑制効果をもつため、可能な限り角膜上皮の状態が良好な新鮮ドナー角膜を用いる事が望ましい。また術後には抗炎症治療として経口ステロイド（プレドニン10-20mg/日程度）を2週間程度行うとともに感染予防、炎症抑制のために局所投与として抗生剤点眼剤とステロイド点眼剤を長期的に使用する。
- ④ 重症（全層角膜移植術の既往のある場合、DALK の手術中にデスメ膜穿孔を来した場合や重度の視力低下を呈する症例）に対する治療
全層角膜移植術（Penetrating keratoplasty、PKP）の術後には緑内障を来しやすいことが知られており、そのため可能な限り中等症までの治療にとどめ、全層角膜移植術はなるべく回避することが望まれる。しかし既に全層角膜移植術の既往のある場合、DALK の手術中にデスメ膜穿孔を来した場合や重度の視力低下を呈する場合には全層角膜移植術が必要となる。この場合も、中等症に対する手術と同様、移植片由来の正常角膜上皮が再発抑制に重要な役割を持つため、可能な限り角膜上皮の状態の良好な新鮮ドナー角膜を用いる事が望ましい。また内皮細胞の状態にも、一般的な全層角膜移植術と同様注意すべきである。術後には抗炎症治療（リンデロン2mg/日程度）を2週間程度行い、感染予防、炎症抑制のために抗生剤点眼剤と低濃度ステロイド剤を使用する。緑内障の合併が多いため眼圧の推移には十分注意し、眼圧上昇が見られる場合にはステロイド剤を中止して免疫抑制剤への変更を考慮する。

(イ) 手術後の再発予防に対する長期的治療

すべての手術後においてソフトコンタクトレンズの連続装用を強く推奨する。若年者でソフトコンタクトレンズの自己管理が可能であっても就眠中も連続使用の方が再発予防効果が高いと考えられる。また感染予防と炎症抑制を目的として、抗生剤点眼と低濃度ステロイド点眼剤を併用することが望ましい。

[V]

膠状滴状角膜ジストロフィ診断基準

膠状滴状角膜ジストロフィ診断基準

- 疾患名：膠状滴状角膜ジストロフィ、膠状滴状角膜変性症、Gelatinous Drop-Like Dystrophy
- 疾患概念：TACSTD2 遺伝子の機能喪失性変異によって角膜上皮下から実質にアミロイドが沈着する疾患。
- 診断基準：
 1. 臨床所見
 - ① 両眼性 注1
 - ② 角膜実質沈着物 注2
 - i. 灰白色隆起上の角膜上皮下沈着物 (Typical mulberry type)
 - ii. Band keratopathy 様の角膜上皮下カルシウム沈着 (Band keratopathy type)
 - iii. 角膜実質混濁 (Stromal opacity type)
 - iv. 角膜実質に黄色物質の沈着 (Kumquat-like type)
 - ③ フルオレセインによる角膜上皮透過性の亢進
 2. 症状
 - ① 羞明
 - ② 異物感
 - ③ 流涙
 - ④ 視力低下
 3. 家族歴・遺伝子異常
 - ① 血族結婚 (いとこ婚など) が約半数に見られる。
 - ② TACSTD2 遺伝子 (かつては M1S1 や Trop2 などとも呼ばれていた。) に異常を認める。

注1：片眼性あるいは左右で程度に著明な差のある症例がまれに存在する。

注2：Ideらの報告の分類を使用。Typical mulberry type と Band keratopathy type が症例の大半を占める。

[VI]

研究成果の刊行に関する一覧表

論文一覽

1. Kawasaki S, Kinoshita S. Clinical and basic aspects of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Dev Ophthalmol*. 2011;48:97-115.
2. Kawasaki S, Yagi H, Yamasaki K, et al. A novel mutation of the TGFBI gene causing a lattice corneal dystrophy with deep stromal involvement. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:150-151.
3. Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, et al. Two novel mutations of TACSTD2 found in three Japanese gelatinous drop-like corneal dystrophy families with their aberrant subcellular localization. *Mol Vis*. 2011;17:965-970.
4. Iwamoto S, Ebihara N, Hori K, et al. Filaggrin mutation are not associated with chronic allergic keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. In Press
5. Hori K, Matsuda A, Ebihara N, et al. Involvement of plasminogen activator inhibitor-1 in the pathogenesis of atopic cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:1846-1851.
6. Inomata T, Ebihara N, Funaki T, et al. Perlecan-deficient mutation impairs corneal epithelial structure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:1277-1284.
7. Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, Matsuda H, Murakami A. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;52:8549-8557.
8. Fukuda R, Usui T, Tomidokoro A, et al. Noninvasive observations of peripheral angle in eyes after penetrating keratoplasty using anterior segment fourier-domain optical coherence tomography. *Cornea*. 2012;31:259-263.
9. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. Prostaglandin E receptor subtype EP3 expression in human conjunctival epithelium and its changes in various ocular surface disorders. *PLoS One*. 2011;6:e25209.
10. Hatou S, Shimmura S, Shimazaki J, et al. Mathematical projection model of visual loss due to fuchs corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:7888-7893.
11. Takeda K, Nakamura T, Inatomi T, et al. Ocular surface reconstruction using the combination of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation and eyelid surgery for severe ocular surface disease. *Am J Ophthalmol*. 2011;152:195-201 e191.
12. Higashihara H, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. The blood-aqueous barrier breakdown in eyes with endothelial decompensation after argon laser iridotomy. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:1032-1034.
13. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:942-946.
14. Tsujikawa M. Gelatinous Corneal Dystrophy. *Cornea*. in press (in press のため別冊なし)
15. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H, et al. Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. *J Cell Sci*. 2012 in press (in press のため別冊なし)
16. Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Effect of 1-year lutein supplementation on macular pigment optical density and visual function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249:1847-1854.
17. Wakabayashi T, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Intravitreal bevacizumab for exudative branching vascular networks in polypoidal choroidal vasculopathy. *Br J Ophthalmol*. 2012;96:394-399.

[VII]

研究成果の刊行物・別刷



Lisch W, Seitz B (eds): Corneal Dystrophies.
Dev Ophthalmol. Basel, Karger, 2011, vol 48, pp 97–115

© S. Karger AG, Basel
**PROOF Copy
for personal
use only**
ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

Clinical and Basic Aspects of Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy

Satoshi Kawasaki · Shigeru Kinoshita

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

Abstract

Gelatinous drop-like corneal dystrophy (GDLD) was first reported in 1914 as a peculiar corneal dystrophy with an autosomal recessive inheritance mode. GDLD is rare in many countries, but relatively prevalent in Japan. The typical finding of GDLD is grayish, mulberry-like, protruding subepithelial depositions with a prominent hyperfluorescence of the cornea. Histologically, GDLD corneas are characterized by subepithelial amyloid depositions that were identified as lactoferrin by amino acid sequencing analysis. In 1998, the TACSTD2 gene was identified as a causative gene for this disease through a linkage analysis and a candidate gene approach. To date, 14 reports have demonstrated 21 mutations comprised of 9 missense, 6 nonsense, and 6 frameshift mutations from 9 ethnic backgrounds. Currently, it is hypothesized that the loss of TACSTD2 gene function causes decreased epithelial barrier function, thereby facilitating tear fluid permeation into corneal tissue, the permeated lactoferrin then transforming into amyloid depositions via an unknown mechanism. For the visual rehabilitation of patients with GDLD, ophthalmologists currently employ various types of keratoplasties; however, almost all patients will experience a recurrence of the disease within a few years after such interventions. Wearing of a soft contact lens is sometimes considered as an alternative treatment for GDLD.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Gelatinous drop-like corneal dystrophy (GDLD, MIM No. 204870) was first described in 1914 as a rare, inheritable corneal dystrophy characterized by subepithelial amyloid depositions [1]. This disease has notable features compared to other inherited corneal dystrophies. Firstly, there is a wide range of clinical appearances of GDLD, while the range of clinical appearances of most of the other inheritable corneal dystrophies is limited. Also, while the amyloid depositions of other corneal amyloidoses are derived from mutated protein of their causative genes, those of GDLD are not derived from the protein products of its causative gene but from other proteins. In addition, this disease is much more prevalent in Japan than in other countries, possibly due to the high frequency of consanguineous marriage in Japan. Here, we describe the clinical and basic aspects of GDLD.



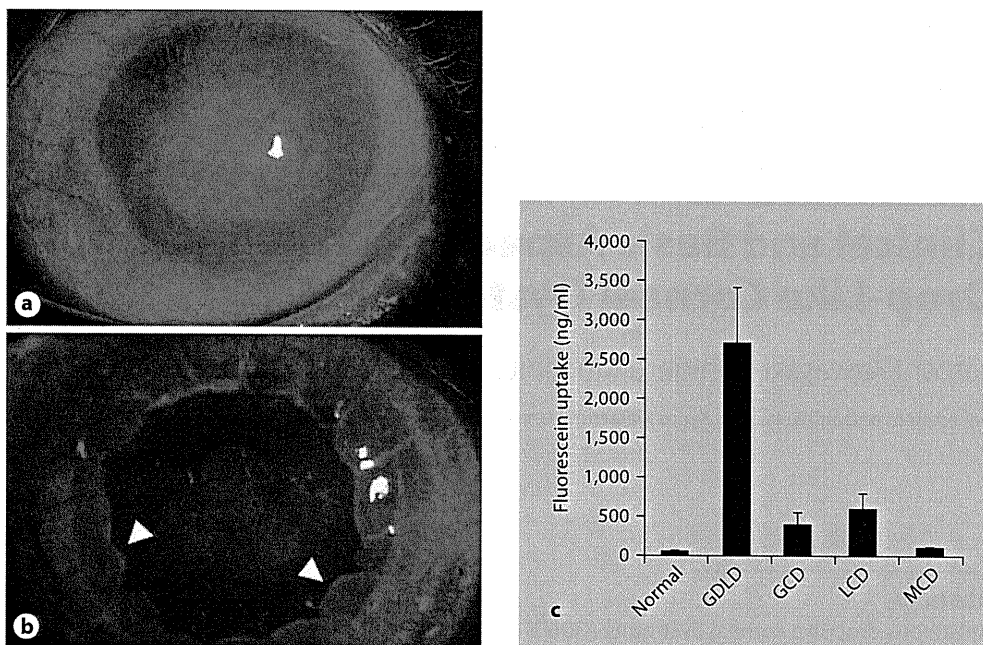


Fig. 1. **a** A slit lamp microscope photograph of the hyperfluorescence of the cornea in a GDL D patient. Note that the hyperfluorescent region covers almost the entire cornea as well as the limbus. **b** A slit lamp microscope photograph demonstrating a GDL D cornea that underwent keratoplasty. The triangle represents the boundary between the host corneal epithelium and the donated corneal epithelium. Note that the host corneal epithelium demonstrates hyperfluorescence while that of the donated cornea does not. **c** A bar graph demonstrating fluorescein uptake among several corneal dystrophies. GCD = Granular corneal dystrophy; LCD = lattice corneal dystrophy type I; MCD = macular corneal dystrophy. Note that fluorescein uptake is significantly increased in the GDL D cornea.

Clinical Features

General Clinical Properties

Clinical symptoms of GDL D include significant decrease in vision, photophobia, irritation, redness, and tearing. This disease is rare in many countries, but predominant in Japan. The prevalence rate of this disease was estimated as 1 in 31,546 from the frequency of parental consanguinity [2, 3], and the inheritance mode of this disease is autosomal recessive. The typical finding of this disease is grayish, mulberry-like, protruding subepithelial depositions which are mainly located at the central region of bilateral corneas. The onset of this disease characteristically occurs between the first and second decade of the patient's life. Typically, the corneal lesions will gradually increase in size and number and coalesce with age [4, 5]. Neovascularization of the subepithelial and superficial stroma frequently becomes evident in the very later stages [6]. One of the most prominent clinical features of this disease is increased fluorescence permeation of the corneal epithelium (fig. 1) [7], and it is almost always observed in this disease.

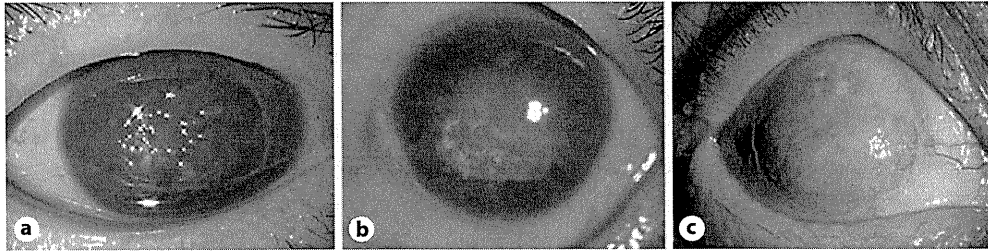


Fig. 2. An array of slit lamp microscope photographs demonstrating phenotypic variations of GDLN corneas: mulberry type (a), band keratopathy type (b), and kumquat-like type (c).

Subclassification of GDLN

It has been reported that GDLN can be clinically divided into 4 subtypes by the appearance of corneal opacities [8]. These subtypes include the mulberry type (fig. 2a), the band keratopathy type (fig. 2b), and the kumquat-like type (fig. 2c). Among them, the 2 predominant clinical forms are the mulberry type and the band keratopathy type. As to the causative factors of such phenotypic variations, the varying sites of mutation were initially thought to be the reason; however, in that report the authors found no apparent difference among these 4 subtypes. In addition, there have been reports demonstrating the existence of GDLN patients who have one phenotype in one eye yet a different phenotype in their other eye [8, 9]. Moreover, a previous report demonstrated the existence of a patient with band keratopathy that changed into GDLN over a 2-year period [10]. Furthermore, a previous report demonstrated the existence of a GDLN family with 1 member suffering from 1 GDLN subtype and another member suffering from a different GDLN subtype [11]. There has also been a report demonstrating a phenotypic transition from the band keratopathy type to the typical mulberry type GDLN 2 years after lamellar keratoplasty [12]. These observations strongly support the notion that the critical factors for determining the GDLN phenotype may hinge on environmental factors rather than genetic backgrounds. Some unknown factors may interfere with the process of amyloid formation, thereby affecting the phenotype of GDLN corneas. It is also speculated that such phenotypic variations are reflective of differences in the stage of GDLN. The mulberry type and the band keratopathy type tend to occur in the early to intermediate stage, while the kumquat-like type tends to occur in the very later stage.

Differential Diagnosis

The diagnosis of GDLN is frequently difficult and even cornea experts may make a misdiagnosis because its clinical appearance is not always typical but sometimes widely varied as mentioned above. The band keratopathy type GDLN exhibits an appearance that is easily confused with 'true' band keratopathy, and hence it is very probable that most patients with this GDLN subtype are misdiagnosed as such



common corneal dystrophy. In addition, this GDLD subtype is sometimes misdiagnosed as spheroid degeneration, a rare corneal dystrophy which mainly affects men who work outdoors [13]. The kumquat-like type GDLD may sometimes be misdiagnosed as lipid degeneration of the cornea from the appearance of its corneal opacity. Gelatino-lattice corneal dystrophy, a rare form of TGFBI-related corneal dystrophy [14], also clinically resembles GDLD. Secondary amyloidosis sometimes presents an appearance that is confused with that of GDLD.

For the accurate diagnosis of GDLD differentially from these confusing diseases, the most important clinical manifestation appears to be hyperfluorescence of the cornea, as GDLD corneas always present a prominent finding and the diseases that GDLD is confused with do not. However, there are some misleading conditions which demonstrate a hyperfluorescence of the cornea at a level comparable to that of GDLD. One such example is drug toxicity. GDLD patients are sometimes misdiagnosed with drug toxicity, especially when they do not present apparent amyloid depositions in their corneas. However, there are various ways to discriminate between drug toxicity and GDLD. Superficial punctate keratopathy is generally found in drug toxicity but not in GDLD. In addition, in GDLD, the hyperfluorescent area not only covers the whole cornea but also extends to some areas of the limbus, while the limbus is not involved in drug toxicity. Moreover, cases of drug toxicity frequently involve the administration of multiple drugs, while those of GDLD normally do not.

For the discrimination of GDLD from the gelatino-lattice corneal dystrophy, mutation analysis of the TACSTD2 and TGFBI genes is valuable. Most secondary amyloidosis patients present the amyloid depositions in one eye while GDLD normally affects both eyes. In addition, eyelash adherence to the area of the amyloid depositions is frequently found in patients with this disease, and hence that finding is of great diagnostic value.

Examination

Routine examinations such as slit lamp biomicroscopy, visual acuity testing, and tonometry are not sufficient for the diagnosis of GDLD. For an accurate diagnosis of this disease differentially from the above-mentioned confusing diseases, the most reliable and valuable examination is undoubtedly the mutation analysis of the TACSTD2 gene. If the detected mutation is one of which was previously reported (table 1) [15] or one that may lead to potentially pathological protein alteration, the diagnosis will almost assuredly be that of GDLD. Therefore, the molecular diagnosis should be performed as thoroughly as possible (Appendix). However, and quite unfortunately, this type of examination is not available in most hospitals, even in advanced countries.

Another important examination is the above-mentioned fluorescent permeation test. This test is easily performed in a standard clinical setting, with minimal invasion for the patient, and thus should be performed prior to performing the molecular diagnosis. When the fluorescent dye is applied to a conjunctival sac of patients with this disease, the dye will immediately permeate into the corneal tissue of GDLD, even



**Table 1.** A list of mutations of the TACSTD2 gene that have been reported to date

Nucleotide change	Amino acid change	Original description	Ethnic origin	References
c.2T→G	p.MET1Arg	M1R	India	22
c.198C→A	p.Cys66X	C66X	Iran	15
c.250A→T	p.Lys84X	K84X	Japan	30
c.322T→C	p.Cys108Arg	C108R	Japan	30
c.341T→G	p.Phe114Cys	F114C	Iran	15
c.352C→T	p.Gln118X	Q118X	Japan, China	11, 21, 24, 26, 27, 29, 31
c.352C→G	p.Gln118Glu	Q118E	India	22
c.355T→A	p.Cys119Ser	C119S	Tunisia	22
c.493_494insCCACCGCC	p.Gly165AlafsX15	9-bp ins	India	22
c.509C→A	p.Ser170X	S170X	Japan	21
c.519dupC	p.Ala174ArgfsX43	520insC	Estonia	32
c.551A→G	p.Tyr184Cys	Y184C	China	27
c.557T→C	p.Leu186Pro	L186P	Japan, Iran	15, 29
c.564delC	p.Lys189SerfsX82	870delC	Europe	22
c.581T→A	p.Val194Glu	V194E	India	22
c.619C→T	p.Gln207X	Q270X	Japan	21
c.632delA	p.Gln211ArgfsX60	632delA	Japan	21
c.653delA	p.ASP218ValfsX53	c.653delA	Turkey	28
c.679G→A	p.Glu227Lys	E227K	Iran	15
c.772_783delATC TATTACCTGinsT	p.Lle258X	772 to 783del(ATCTAT TACCTG) + 772insT	Vietnam	31
c.811delA	p.Lys271SerfsX26	1117delA	Tunisia	22

Notational conventions for the nucleotide change and amino acid change follow the guidelines for mutation nomenclature proposed by the Human Genome Variation Society.

