

201231063A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川崎 諭

平成25（2013）年5月

目 次

I.	班員構成	1
II.	総括研究報告	
	膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出	2
	川崎 諭	
III.	分担研究報告	
1.	膠様滴状角膜変性症に対する遺伝子治療の可能性の検討	7
	川崎 諭	
2.	膠様滴状角膜変性症の新規治療の創出のための基礎的研究	13
	村上 晶	
3.	膠様滴状角膜変性症の全層角膜移植術後再発症例に対する前眼部光干渉断層計検査による角膜体積測定	17
	天野史郎	
4.	角膜および口腔粘膜上皮シートにおけるTACSTD2遺伝子の発現	20
	辻川元一	
5.	膠様滴状角膜変性症に対する全国調査	23
	稲富 勉	
IV.	膠状滴状角膜ジストロフィ診断基準	32
V.	膠様滴状角膜ジストロフィ治療指針	33
VI.	班会議・班会議議事録	34
VII.	研究成果の刊行に関する一覧表	38
VIII.	研究成果の刊行物・別刷	39

[I]

班員構成

平成24年度 班員構成

研究者名	所属等	職名
研究代表者	川崎 諭 京都府立医科大学 眼科学教室	助 教
研究分担者	村上 晶 順天堂大学医学部 眼科学教室	教 授
	天野 史郎 東京大学医学部 眼科学教室	教 授
	辻川 元一 大阪大学医学部 眼科学教室	助 教 (7月より講師)
	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
	中川 紘子 京都府立医科大学 眼科学教室	大学院生
	篠宮 克彦 京都府立医科大学 眼科学教室	特任助教
	西田 幸二 大阪大学医学部 眼科学教室	教 授
	相馬 剛至 大阪大学医学部 眼科学教室	医 員
	海老原伸行 順天堂大学医学部 眼科学教室	前任准教授
	松田 彰 順天堂大学医学部 眼科学教室	准教授
	舟木 俊成 順天堂大学医学部 眼科学教室	准教授
	臼井 智彦 東京大学医学部附属病院 眼科学教室	助 教
	宮井 尊史 東京大学医学部附属病院 眼科学教室	助 教

[Ⅱ]

総括研究報告

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

総括研究報告書
「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

研究代表者 川崎 諭 京都府立医科大学眼科学教室 助教

【研究要旨】

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し、責任遺伝子として1999年に辻川らによってTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらその病態の詳細は未だ不明で、また希な疾患であるため臨床的にも様々な点において不明な状況が続いている。

一昨年度、角膜専門外来をもち本疾患について積極的に診断・治療を行っている本研究班の4施設（京都府立医科大学、大阪大学、順天堂大学、東京大学）において本疾患患者45例90眼について疫学背景、臨床像、治療成績についてデータを収集し、その成果として本疾患に対する標準的治療レジメンを作成した。また極めて重要な知見として、ソフトコンタクトレンズの装用が膠様滴状角膜変性症の角膜移植術後の再発抑制に極めて有効であるということが明らかとなった。また分子レベルでの膠様滴状角膜変性症の病態解明に取り組み、膠様滴状角膜変性症ではTACSTD2遺伝子の機能喪失型変異によりクローディン1および7のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかにした。

昨年度は一昨年度の結果を踏まえ、さらなる病態解明、治療法の開発に取り組んだ。その成果として、膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜上皮および結膜上皮細胞の不死化細胞の樹立に成功した。またソフトコンタクトレンズを基質として角膜上皮細胞を培養することに成功し、効率的な遺伝子導入方法の確立のための一助となった。一方でin vitroにおけるよりorganotypicな評価系確立のための基礎研究として培養角膜および口腔粘膜上皮シートにおけるTACSTD2タンパクの発現を確認した。臨床的には膠様滴状角膜変性症患者3例において新規の遺伝子変異を発見し、さらに前眼部OCTが膠様滴状角膜変性症の術後再発の評価系として有用であることを見出した。

今年度は昨年度に樹立した膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜上皮および結膜上皮細胞の不死化細胞を用いて、レンチウイルスとプラスミドによる遺伝子治療の可能性について検討した。また角膜上皮、口腔粘膜上皮シートにおけるTACSTD2の発現を解析し、臨床の場で移植治療に用いている上皮シートの上皮バリア機能との関連を見た。また臨床的な観点では、膠様滴状角膜変性症患者の角膜移植術後の検査法の確立を行い、全国調査についても行った。

研究分担者

1. 村上 晶・順天堂大学 眼科学教室・教授
2. 天野史郎・東京大学 医学部附属病院 眼科学教室・教授
3. 稲富 勉・京都府立医科大学 医学(系)研究科(研究院) 眼科学教室・助教
4. 辻川元一・大阪大学 大阪大学・医学(系)研究科(研究院) 眼科学教室・助教 (7月より講師)

A. 研究目的

膠様滴状角膜変性症は 10 歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し発症頻度は稀であるが、日本人特有の疾患であることから大阪大学の辻川らによってその責任遺伝子として TACSTD2 遺伝子が同定された。しかしながら TACSTD2 遺伝子変異がいかんして本疾患の病態を引き起こすかについてはこれまで不明であった。本疾患は希な疾患であるためこれまでその疫学的情報については不明な点が少なくなかった。また本疾患は再発傾向が強く、他疾患にくらべステロイド緑内障を合併しやすいことなどが知られていたが、その理由および予防策については明らかにされていなかった。さらに本疾患に対する外科的治療である表層角膜移植、角膜上皮移植、角膜表層切除についても、治療時期と治療法の最適な組み合わせについては明らかではなかった。

このような背景のもと、一昨年度我々は本研究班の 4 施設を受診し膠

様滴状角膜変性症と診断された 45 例 90 眼について臨床データを採取し、疫学的検討と術式毎の治療成績およびソフトコンタクトレンズ装用の有無による術後の再発の有無について検討し意義深い結果を得た。また本疾患の原因遺伝子である TACSTD2 遺伝子の機能喪失性変異がどのような機序で本疾患の病態のカギとも言える上皮バリア機能の低下を来すのかについて極めて意義深い結果を得た。

昨年度は疾患モデルとして、膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜上皮細胞の樹立を行った。また全国調査のための準備を行うとともに、各大学の分担者においては、独自の視点で膠様滴状角膜変性症の基礎的または臨床的研究を行った。

今年度は膠様滴状角膜変性症に対する新しい治療法の確立を目的として、樹立した疾患モデル細胞を用いてレンチウイルスとプラスミドによる遺伝子治療の可能性について検討した。また臨床的観点から膠様滴状角膜変性症に対する角膜移植後の新しい術後評価法の検討と、角膜および口腔粘膜上皮シートにおける TACSTD2 遺伝子の発現をヒトとウサギにおいて検討した。また全国調査を行い、膠様滴状角膜変性症の疫学と治療成績について一昨年度の結果との比較を行った。

B. 研究方法

1. 昨年度に樹立に成功した膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞を用いて遺伝子治療の

可能性についての検討を行った。(詳細は川崎の分担研究報告を参照)

2. コンタクトレンズ (P-CL) をデバイスとしたプラスミドによる遺伝子治療の可能性について検討した。(詳細は村上の分担研究報告を参照)
3. 膠様滴状角膜変性症患者に対する SCL 装用による再発抑制メカニズムについて検討した。(詳細は村上の分担研究報告を参照)
4. ヒトおよびウサギの角膜上皮、口腔粘膜上皮シートにおける TACSTD2 の発現を解析した。(詳細は辻川の分担研究報告を参照)
5. Swept source 型前眼部光干渉断層計に内蔵した自動角膜体積測定機能を用いて膠様滴状角膜変性症患者の角膜移植後の状態について検討した。(詳細は天野の分担研究報告を参照)
6. 膠様滴状角膜変性症患者の疫学および臨床成績について全国調査を行った。(詳細は稲富の分担研究報告を参照)

C. 研究結果

研究代表者の川崎は昨年度に膠様滴状角膜変性症のモデル細胞として膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および上皮細胞の不死化細胞の樹立に成功した。今年度はこの不死化細胞

を用いてレンチウイルスによる遺伝子治療の可能性について検討した。結果として、野生型 TACSTD2 遺伝子を膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および上皮細胞の不死化細胞に遺伝子導入すると、クロロゲン 1 および 7 の発現量の増加と細胞内局在の正常化が認められた。しかしながら上皮バリア機能についてはわずかな改善しか認められず、その原因として、導入遺伝子の発現量が細胞毎に大きくばらついていることが考えられた。FACS によるソーティングによってこの点は解決できる可能性がある。

研究分担者の村上は昨年度よりコンタクトレンズを用いて本疾患の原因遺伝子である TACSTD2 遺伝子をプラスミドの形で患者角膜に継続的に移入することを検討している。ソフトコンタクトレンズはリン酸基を側鎖に有するハイドロゲルからなり (P-CL)、DNA と結合し、徐放効果を示す。研究代表者の川崎が樹立した膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および上皮細胞の不死化細胞に対し、野生型 TACSTD2 遺伝子を発現するプラスミドを P-CL に含侵させて遺伝子導入した。結果として研究代表者の川崎がレンチウイルスで確認したのと同様の結果、すなわちクロロゲン 1 および 7 タンパクの発現量の増加と細胞内局在の正常化を認めた。一般的には上皮細胞は線維芽細胞などの間葉系細胞よりも遺伝子導入効率が悪いために裸のプラスミドを与えただけでは高い遺伝子導入効率が得られないこと

が多い。ソフトコンタクトレンズが徐放の足場として働いたためにこのような高い遺伝子導入効率が得られたものと考えられる。

研究分担者の辻川は実際の角膜上皮再生治療に使われる角膜上皮ないし口腔粘膜上皮シートにおけるTACSTD2 遺伝子の発現について、ヒトとウサギで検討した。結果として、角膜上皮ないし口腔粘膜上皮シートにおける TACSTD2 遺伝子の発現は *in vivo* における発現の 1/10 程度に減少していた。このことは臨床で使用する角膜上皮ないし口腔粘膜上皮シートの上皮バリア機能が弱いことと関係しているものと考えられた。

研究分担者の天野は全層角膜移植を行った膠様滴状角膜変性症に対し swept source 型前眼部光干渉断層計 SS-1000, CASIA (TOMEY 社) による検査を行い、角膜体積測定を行った。本装置は角膜混濁眼の撮像が可能であるという特性があり、膠様滴状角膜変性症のような角膜混濁眼でも角膜厚や角膜体積の測定を行うことができ、手術成績のさらなる詳細な検討が可能となるものと考えられる。

研究分担者の稲富は膠様滴状角膜変性症患者の疫学および臨床成績について全国調査を行った。一昨年度に行った研究班の4施設の結果とは大局的には同質であったと言えるが、手術成績などについては、研究班の4施設よりも不良な傾向がみられた。

D. 考按

本研究によって膠様滴状角膜変性症患者に対し遺伝子治療が効果的である可能性が示唆された。野生型 TACSTD2 遺伝子をレンチウイルスにて遺伝子導入するとクローディン1および7タンパクの発現量と細胞内局在が概ね正常化し、生化学的レベルでは遺伝子治療は効果的であると考えられた。しかしながら上皮バリア機能はわずかにしか改善が得られず、治療レベルには程遠い結果となった。今後の課題としては、FACS による選択的ソーティングを用いることでこのことは解決できる可能性があると考えられた。

本疾患に対する遺伝子治療のもう一つのアプローチとして、プラスミドによる遺伝子治療の可能性を昨年度にも検討していた。今年度は昨年度に樹立した膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞を用いて、プラスミドによる遺伝子治療の効果を実際に検討した。昨年と同様、プラスミドを徐放させる目的でソフトコンタクトレンズをキャリアに用いている。結果として、レンチウイルスによる遺伝子治療で認められたように、野生型 TACSTD2 遺伝子を発現するプラスミドによる遺伝子治療によっても、クローディン1および7タンパクの発現量の増加と細胞内局在の正常化が得られた。しかしながら上皮バリア機能が改善するかどうかについては検討できていない。

レンチウイルスはゲノムにインテグレーションされるために、癌遺伝子の近位に挿入された場合は癌遺伝子の発現を強く亢進させることがあり、また癌抑制遺伝子の内部に挿入された場合は癌抑制遺伝子を破壊することがあり、癌発生に関わる可能性があると考えられている。そのため、より安全

であると考えられるプラスミドによる遺伝子治療は安全性の観点から望ましいオプションであると考えられる。通常、プラスミドを点眼しただけでは角膜上皮細胞への遺伝子導入はほとんど得られないものと考えられる。ソフトコンタクトレンズにプラスミドを静電的に結合させ徐放させることでレンチウイルスに匹敵するほどの遺伝子導入効率を得られたことは極めて画期的であると言える。

当初考えていたプロテアソーム阻害剤による治療可能性について、今年度も膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞を用いて検討を試みたが、プロテアソーム阻害剤の最低有効濃度でも細胞毒性によって細胞が死に絶えたために検討することができなかった。

全国調査については疫学的には一昨年度に行った研究班4施設における結果とほぼ同様であった。手術成績などについては、研究班4施設とは異なる治療手段を用いている場合が多く、再発率が高い傾向がみられた。

E. 結論

膠様滴状角膜変性症患者由来の不死

化ヒト角膜および結膜上皮細胞を用いて遺伝子治療の可能性について検討した。生化学的レベルでは遺伝子治療はレンチウイルスでもプラスミドによってもかなり効果的であると考えられた。しかしながら上皮バリア機能のレベルではわずかな改善にとどまり、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成24年度）

論文発表

巻末研究成果一覧表参照

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

[Ⅲ]

分担研究報告

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

分担研究報告書

「膠様滴状角膜変性症に対する遺伝子治療の可能性の検討」

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

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し、責任遺伝子として1999年に辻川らによってTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらその病態の詳細は未だ不明で、また希な疾患であるため臨床的にも様々な点において不明な状況が続いている。平成22年度、我々は本疾患の病態について分子レベルの解明を試みた。その成果として膠様滴状角膜変性症ではTACSTD2遺伝子の機能喪失型変異によりクローデイン1および7のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかとなった。平成23年度には膠様滴状角膜変性症患者より得た角膜上皮細胞と結膜上皮細胞に対し不死化操作を行い、疾患モデル細胞として樹立することに成功した。今年度はこれらの不死化細胞を用い、遺伝子治療の可能性について検討した。

A. 研究目的

膠様滴状角膜変性症は10歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し発症頻度は稀であるが、日本人特有の疾患であることから大阪大学の辻川らによってその責任遺伝子としてTACSTD2遺伝子が同定された。しかしながらTACSTD2遺伝子変異がいかにして本疾患の病態を引き起こすかについてはこれまで不明であった。一昨年度、我々は本疾患の病態について、TACSTD2遺伝子変異がい

かに本疾患の病態形成に関わるかについて、分子生物学的および生化学的なアプローチによって分子レベルでの解明を試みた。結果として膠様滴状角膜変性症ではTACSTD2遺伝子の機能喪失型変異によりクローデイン1および7のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかとなった。昨年度はさらに詳細な病態の解明および治療法の開発を目的として、膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞の樹立を試み、成功

した。(図 1)

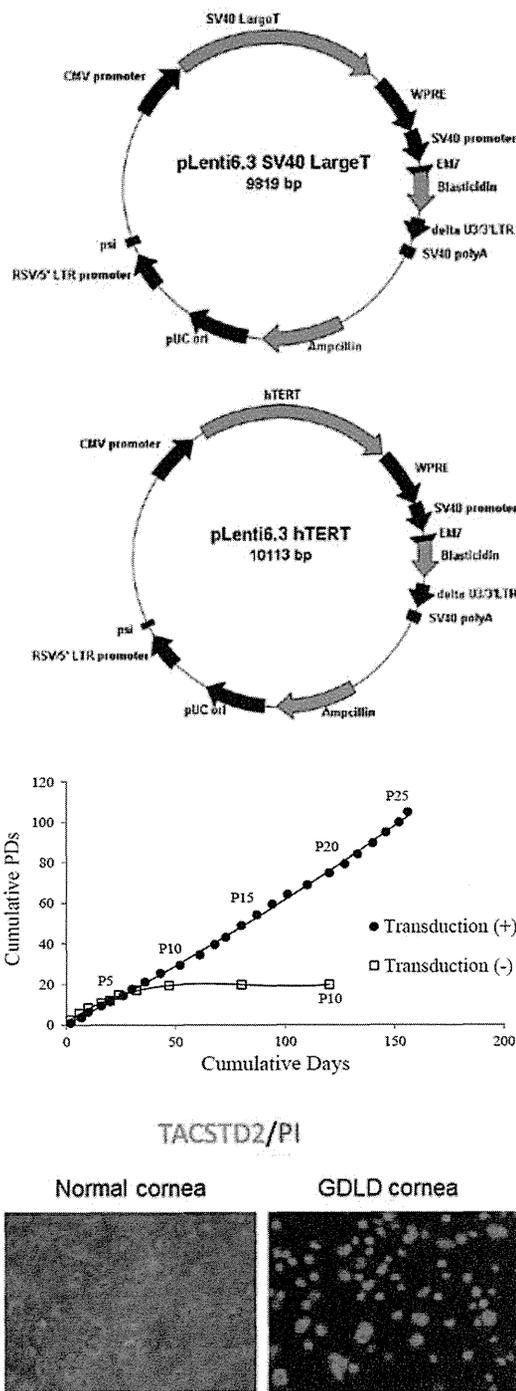


図 1
SV40 large T 抗原遺伝子と hTERT 遺伝子をレンチウイルスにて GDLN 患者由来の角膜および結膜上皮細胞に導入した。得られた細胞は PD100 を超えて増殖し、不死化していることが確認できた。またそれらの細胞は TACSTD2 タンパクを発現していないことを確認した。

本疾患は先に記述した通り常染色体劣性遺伝を呈する疾患であり、TACSTD2 遺伝子の両アリの機能喪失性変異が原因であると考えられている。そのため TACSTD2 遺伝子を補充するだけで治療できる可能性が高い。そこで今年度はそれらの不死化細胞を用い、遺伝子治療が可能かどうかについての検討を行った。

B. 研究方法

1) PCR にて TACSTD2 遺伝子の cDNA を増幅してレンチウイルスベクター (plenti6.3 V5/TOPO) に組み込んだ。シーケンスを確認後、これをヘルパーベクターとともに 293T 細胞にトランスフェクトしてレンチウイルスベクターを作製した。(図 2)

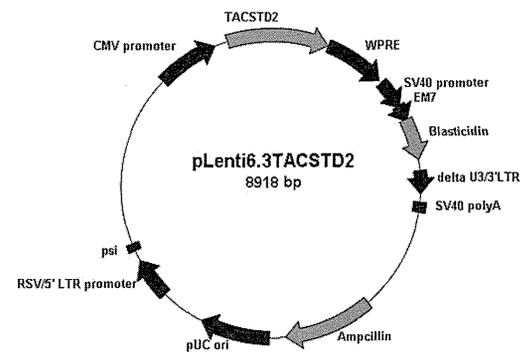


図 2
TACSTD2 遺伝子を発現するレンチウイルスベクター

2) 膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞に対して 1 で作成したウイルスを感染させた。

3) 上記の操作を行った細胞に対し免疫染色、FACS、ウエスタンブロット、免疫沈降、上皮バリア機能の測定を行った。

(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。また不死化細胞の樹立は京都府立医科大学および順天堂大学の倫理委員会の承認のもと行っている。

C. 研究結果

膠様滴状角膜炎患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞に対して野生型 TACSTD2 遺伝子をレンチウイルスで遺伝子導入しウエスタンブロットを行ったところ、クロードイン1および7タンパクの発現量が正常細胞由来の不死化角膜および結膜上皮細胞と同等レベルまで回復した。(図3) また免疫染色でクロードイン1および7タンパクの局在を調べたところ、膠様滴状角膜炎患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞では本来細胞膜上に局在すべきこれらタンパクが細胞質内にドット状のシグナルとして局在していた。一方で膠様滴状角膜炎患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞に対して野生型

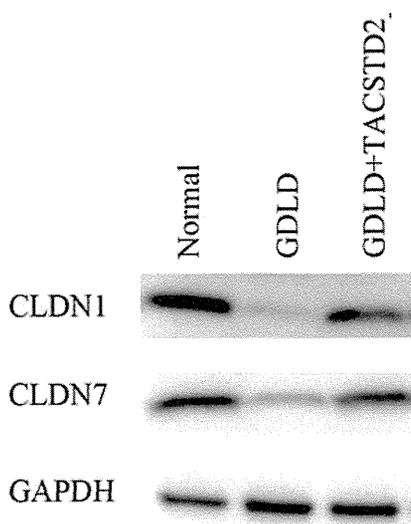


図3 膠様滴状角膜炎患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞ではクロードイン1および7タンパクの発現が正常者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞と比較し著しく低下する。野生型 TACSTD2 遺伝子を導入するとこれらの発現量が正常レベルにまで回復した。

TACSTD2 遺伝子を導入すると本来の細胞膜上の局在パターンに回復した。

(図4) また膠様滴状角膜炎患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞に対して TACSTD2 に対する抗体で免疫沈降を行ったところ、野生型

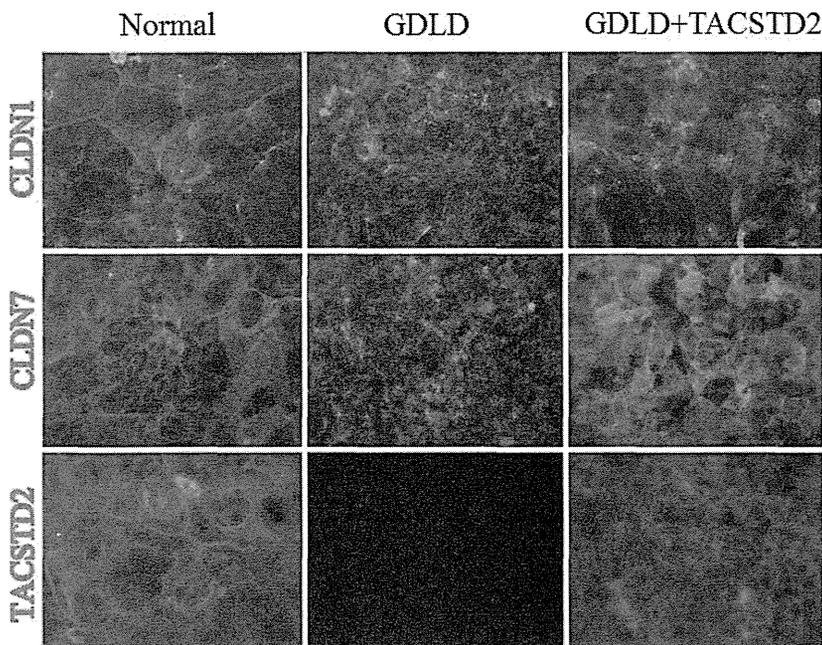


図4 正常者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞ではクロードイン1および7タンパクは細胞膜上に局在していたが、膠様滴状角膜炎患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞ではクロードイン1および7タンパクは細胞質内にドット状に局在していた。野生型 TACSTD2 遺伝子を導入すると本来の細胞膜上の局在パターンに回復した。

TACSTD2 遺伝子を導入した後はクローデイン1 および7タンパクが共沈した。(図5)

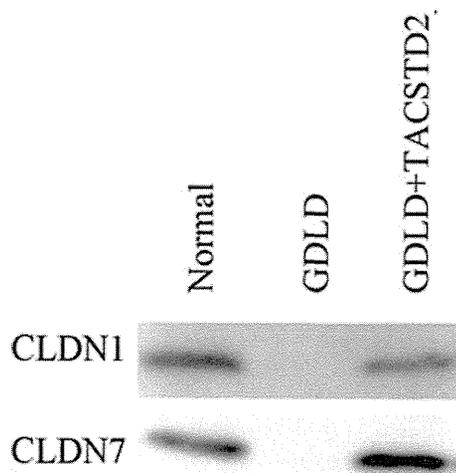


図5 膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞では TACSTD2 に対する抗体で免疫沈降してもクローデイン1 および7タンパクは共沈しなかったが、野生型 TACSTD2 遺伝子を導入した後はクローデイン1 および7タンパクが共沈した。このことは遺伝子導入した外来性の TACSTD2 タンパクがクローデイン1 および7タンパクと細胞内で結合していることを示す。

膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞では正常者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞と比較して上皮バリア機能が著しく低下していた。レンチウイルスにて野生型 TACSTD2 遺伝子を導入した後は、統計学的に有意な上皮バリア機能の改善が見られたが、その程度はわずかであり治療レベルからは程遠いレベルのものであった。(図6)

FACS を行ったところ、野生型 TACSTD2 遺伝子を導入した後にも約 50%程度の細胞が TACSTD2 遺伝子陰性であり、それらの細胞の存在が、遺伝子治療を行った後にも上皮バリア機能があまり改善しない原因であると考えられた。

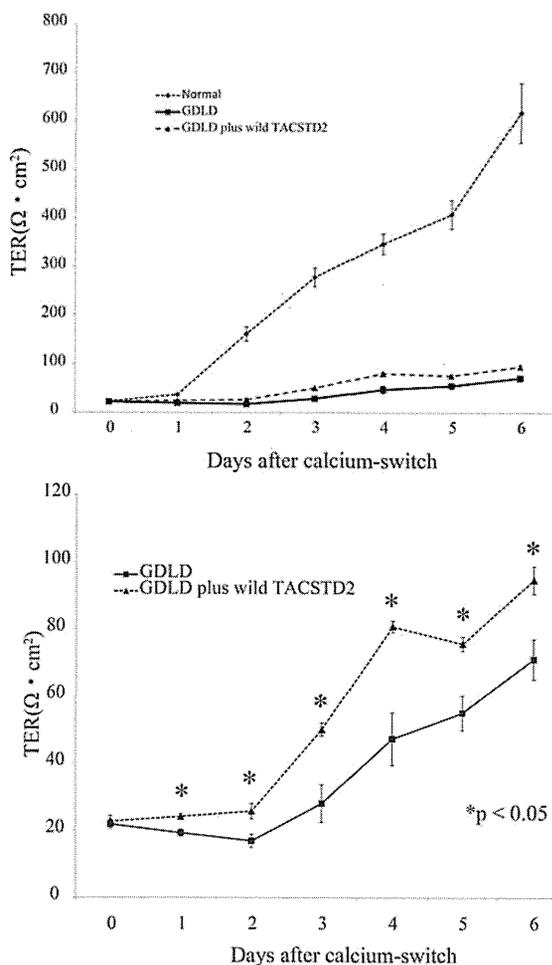


図6 膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞では正常者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞と比較して上皮バリア機能が著しく低下していた。膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞に野生型 TACSTD2 遺伝子を導入するとわずかではあるが上皮バリア機能が改善した。(上グラフ)すべてのタイムポイントで、野生型 TACSTD2 遺伝子前後の上皮バリア機能に有意差が認められた。(下グラフ)

またレンチウイルスを感染させた細胞は、感染させていない細胞よりも大きくなる傾向があり、さらに感染後の細胞増殖スピードも落ちる傾向があった。恐らく外来遺伝子が細胞内に導入されたことによって内在的な防御機構(たとえば p53-p21 経路)が働き

細胞老化を引き起こしたのではないかと考えられる。このことについては今年度中には検討できなかったが、実際の遺伝子治療の際には無視できない問題となる可能性があるため今後検討すべき課題であると考ええる。

D. 考按

本研究で我々は、昨年度に樹立した膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜上皮細胞および結膜上皮細胞を用いて遺伝子治療の可能性について検討した。レンチウイルスによる遺伝子導入は、感染、逆転写、ゲノムへのインテグレーション、転写翻訳という数段階プロセスをたどるが、恐らくそれらのすべての段階で細胞毎の不均一性が生じ、結果としてTACSTD2遺伝子の発現量が細胞毎に大きくばらつくこととなる。このことが最終的に上皮バリア機能が思ったほどには改善しない原因となっているものと考えられる。このことは、FACSによって陽性細胞だけを選択的にソーティングすることで、ある程度解決するものと考えられ、今後の検討課題と考えている。

E. 結論

昨年度樹立した膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化角膜上皮細胞および結膜上皮細胞を用いてレンチウイルスによる遺伝子治療の可能性について検討した。生化学的レベルでは遺伝子治療は十分な効果が得られたと言えるが、機能レベルではまだまだ効果があるとは言えない結果となった。今後はウイルスによる遺伝子補充療

法とは別に、たとえばZinc Finger Nuclease等の人工制限酵素を用いて遺伝子を直接修復する方法についても検討することを考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成24年度)

1. 論文発表

1. Kawasaki S, Yamasaki K, Nakagawa H, et al. A novel mutation (p.Glu1389AspfsX16) of the phosphoinositide kinase, FYVE finger containing gene found in a Japanese patient with fleck corneal dystrophy. *Mol Vis* 2012; 18: 2954-60.
2. Kinoshita S, Kawasaki S, Kitazawa K, et al. Establishment Of A Human Conjunctival Epithelial Cell Line Lacking The Functional TACSTD2 Gene. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2012; 110: 166-177.
3. Hieda O, Kawasaki S, Wakimasu K, et al. Clinical outcomes of phototherapeutic keratectomy in eyes with Thiel-Behnke corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 2013; 155: 66-72 e1.

2. 学会発表

1. Induction Of Corneal Epithelial Cells From Human-induced Pluripotent Stem Cells On The Amniotic Membrane Matrix. Morio Ueno, Yoshinori Nakai, Michiru Matsumura, Satoshi Kawasaki, Yoshiki Sasai, Shigeru Kinoshita; ARVO May 6, 2012, Florida, USA
2. Establishment Of Immortalized Corneal And Conjunctival Epithelial Cells Lacking The Functional Tacstd2 Gene. Koji Kitazawa, Satoshi Kawasaki, Katsuhiko Shinomiya, Akira

- Matsuda, Toshinari Funaki, Mina Nakatsukasa, Kenta Yamazaki, Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami, Shigeru Kinoshita; ARVO May 7, 2012, Florida, USA
3. Three-dimensional Culture Of N-cadherin-expressing Conjunctival Epithelial Cells. Hideki Fukuoka, Satoshi Kawasaki, Norihiko Yokoi, Shigeru Kinoshita; ARVO May 8, 2012, Florida, USA
 4. Preferential Expression Of Periostin In Conjunctival Tissue And Its Roles For Chronic Allergic Conjunctivitis. Takenori Inomata1, Akira Matsuda, Nobuyuki Ebihara, Toshinari Funaki, Kanji Hori, Tsutomu Inatomi, Satoshi Kawasaki, Norihiko Yokoi, Akira Kudo, Akira Murakami; ARVO May 8, 2012, Florida, USA
 5. Filaggrin Mutations Do Not Associate With Chronic Allergic Keratoconjunctivitis. Satoshi Iwamoto, Akira Matsuda, Nobuyuki Ebihara, Kanji Hori, Toshinari Funaki, Norihiko Yokoi, Satoshi Kawasaki, Akira Murakami; ARVO May 8, 2012, Florida, USA
 6. Interleukin-25 expression in Chronic Allergic Keratoconjunctivitis. Yosuke Asada, Akira Matsuda, Nobuyuki Ebihara, Toshinari Funaki, Kanji Hori, Tsutomu Inatomi, Satoshi Kawasaki, Norihiko Yokoi, Akira Murakami; ARVO May 8, 2012, Florida, USA
 7. The Molecular Mechanism Of The Tacstd2 Protein In Regulating The Subcellular Localization And Protein Stability Of Claudin Proteins. Satoshi Kawasaki, Mina Nakatsukasa, Kenta Yamasaki, Koji Kitazawa, Katsuhiko Shinomiya, Shigeru Kinoshita; ARVO May 9, 2012, Florida, USA
 8. Establishment of Immortalized Corneal Epithelial Cells Lacking the Functional TACSTD2 Gene as an in vitro Model for Gelatinous Drop-Like Dystrophy. Satoshi Kawasaki, Koji Kitazawa, Katsuhiko Shinomiya, Akira Matsuda, Toshinari Funaki, Kenta Yamasaki, Mina Nakatsukasa, Hideki Fukuoka, Nobuyuki Ebihara2), Akira Murakami, and Shigeru Kinoshita; ISER July 23, 2012, Berlin, Germany
 9. Three-Dimensional Cultures of N-cadherin-Expressing Conjunctival Epithelial Cells. Hideki Fukuoka, Satoshi Kawasaki, Norihiko Yokoi, Shigeru Kinoshita; ISER July 22, 2012, Berlin, Germany
- 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新規治療の創出のための基礎的研究」

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

【研究要旨】

膠様滴状角膜ジストロフィ（以下 GDLD）は常染色体劣性遺伝の遺伝形式をもち、重篤な視力障害をきたす遺伝病である。GDLD の責任遺伝子は TACSTD2 であり、TACSTD2 の変異が角膜上皮細胞のタイトジャンクション形成能に影響することで、角膜上皮細胞間の透過性が亢進し、上皮直下にアミロイド沈着が生じる。角膜移植術などによる治療法に抵抗性を示し、術後数年で再発を認めるが、再発抑制にはソフトコンタクトレンズ（以下 SCL）を装用することが有効であると報告されている。しかし、再発抑制における CL の因果関係に関する詳細は不明であり、再発抑制の新規治療法が期待される。そこで本研究においては、CL 装用による GDLD 再発抑制のメカニズムを探索するため、アミロイドの原因タンパク質の主成分であるラクトフェリンの CL に対する付着に関して評価した。また、新たに開発したリン酸基を側鎖に有するハイドロゲルからなるコンタクトレンズ（P-CL）をデバイスとして、GDLD 患者から採取した角膜上皮細胞を用いた TACSTD2 遺伝子の導入及びその機能発現に関する基礎研究を行った。

A. 研究目的

1. GDLD 患者に対する SCL 装用による再発抑制メカニズムの探索

GDLD は角膜移植術などによる治療法に抵抗性を示し、術後数年で再発を認めるが、再発抑制には SCL を装用することが有効であると報告されている。角膜上皮下に沈着するアミロイドは、ラクトフェリンが原因タンパクの

主成分であることも判明しているが、再発抑制における CL の因果関係に関する詳細は不明である。そこで、SCL 装用による GDLD 再発抑制のメカニズムを探索するため、アミロイドの原因タンパク質の主成分であるラクトフェリンの SCL に対する付着に関して評価した。

2. GDLD 患者に対する P-CL を用い

た遺伝子導入のための基礎研究

TACSTD2 遺伝子が GDL D の責任遺伝子として同定されており、治療法として角膜移植術などが行われている。しかし、抵抗性を示し、再発傾向にあることから、再発抑制の新規治療法が期待されている。そこで、遺伝子導入用デバイスとして P-CL を合成し、GDL D 患者から採取した角膜上皮細胞に対する TACSTD2 遺伝子導入の検討及び遺伝子導入による機能発現に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. GDL D 患者に対する SCL 装用による再発抑制メカニズムの探索

SCL へのラクトフェリンの付着性を評価するため、*in vitro*において、ラクトフェリン溶液及びラクトフェリンとリゾチームの混合溶液に SCL を浸漬後、SCL に付着した LAC を抽出し、ELISA 法にて定量した。また、GDL D 患者が装用していた SCL を回収し、抗ラクトフェリン抗体及び抗リゾチーム抗体を用いてホールマウント免疫染色後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察を行った。

2. GDL D 患者に対する P-CL を用いた遺伝子導入のための基礎研究

遺伝子導入用デバイスとして P-CL を合成し、pLenti6.3_V5-TOPO ベクタ

ーに TACSTD2 遺伝子を組み込んで得られたプラスミド DNA (TACSTD2-V5) と、カルシウムイオンを介して複合体 (DNA-CL) を形成させた。GDL D 患者から採取された角膜上皮細胞を不死化処理した GDL D 角膜上皮 (imHCE-T_GDL D) 細胞を、得られた DNA-CL と共培養することで遺伝子導入を行い、TACSTD2 の発現を観察及び、クローディング (CLDN) の観察を行なった。

(倫理面への配慮)

GDL D 患者由来の不死化角膜上皮細胞の作成は、順天堂大学研究倫理審査委員会の承認を得て、承認事項を遵守して施行された。

C. 研究結果

1. GDL D 患者に対する SCL 装用による再発抑制メカニズムの探索

*in vitro*における SCL へのラクトフェリンの付着は、ラクトフェリンとリゾチームの混合溶液に付着した際において、ラクトフェリン単体の溶液に浸漬した場合と比較して有意に増加した。また、GDL D 患者の装用していた SCL のベースカーブ面 (角膜側) において、一面にタンパク質の付着が観察され、ラクトフェリンの付着の多くは、SCL 表面に付着したリゾチームの付着層の表層に観察された (図 1)。

2. GDL D 患者に対する P-CL を用いた遺伝子導入のための基礎研究

抗 TACSTD2 抗体を用いた免疫染色において、imHCE-T_GDLD 細胞においては発現が認められなかったが、DNA-CL と共培養した imHCE-T_GDLD 細胞においては、細胞質における蛍光が観察された。同様に、抗 CLDN1 抗体及び抗 CLDN7 抗体による免疫染色においても、DNA-CL と共培養した imHCE-T_GDLD 細胞においてのみ、CLDN1 及び CLDN7 の局在化が観察された (図 2)。

D. 考按

GDLD 患者における角膜移植術後の SCL 装用は、角膜上皮バリアー機能を補い、上皮の脱落を抑制すると共に、原因タンパクでもあるラクトフェリンをトラップすることで、アミロイドの沈着を抑制し、再発を抑制する上で有用である。また、遺伝子導入用デバイスとして開発した P-CL を用いた遺伝子導入において、imHCE-T_GDLD 細胞 1. に対し TACSTD2 遺伝子の導入及び機能発現が DNA-CL により認められたことから、非侵襲的な方法での遺伝子導入が可能であり、新規治療法としての有用性が示唆された。

E. 結論

SCL 装用により、ラクトフェリンをトラップする事は、再発抑制として有用であり、より効率的にトラップすることの出来る SCL を使用することでの、再発抑制との関連に関する評価を行う予定である。また、P-CL による

TACSTD2 遺伝子の導入が可能であることから、遺伝子導入後角膜上皮細胞の角膜上皮移植を、ウサギを用いて検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

舟木俊成、松永透、渡部保男他、膠様滴状角膜ジストロフィに対するコンタクトレンズ装用による再発抑制メカニズム、日本臨床眼科学会総会、2012 年月日 京都

松永透、山崎健太、北澤耕司他、膠様滴状角膜ジストロフィ角膜上皮細胞への TACSTD2 遺伝子導入・機能発現、角膜カンファランス、2013 年

2. 論文発表

1. Iwamoto S, Asada Y, Ebihara N, et al. Interaction between conjunctival epithelial cells and mast cells induces CCL2 expression and piecemeal degranulation in mast cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. in Press.

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