

201231063B

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23年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 川崎 諭

平成25（2013）年5月

目 次

I.	はじめに	1
II.	班員構成	
	平成22年度	2
	平成23年度	3
	平成24年度	4
III.	疾患概要	
	日本語版	5
	英語版	6
IV.	総括研究報告	
	平成22年度	7
	平成23年度	12
	平成24年度	17
V.	診断基準	22
VI.	治療指針	23
VII.	研究成果の刊行に関する一覧表	
	平成22年度	24
	平成23年度	25
	平成24年度	26
VIII.	代表的な研究成果の刊行物・別刷	27

[I]

はじめに

はじめに

膠様滴状角膜変性症（Gelatinous Drop-Like Dystrophy）は1914年に日本人医師である中泉によって世界で初めて報告された疾患である。その後1999年には辻川によって責任遺伝子が発見され、2010年には中司らによって分子病態が解明された。日本人研究者はこの疾患の謎の解明において世界で最も貢献していると言っても過言ではない。

本疾患の標準的治療レジメンの確立と新規治療法の創出という課題で平成22年度に厚生労働省の難治性疾患克服研究事業に採択されてから、平成24年度までの3年間の研究期間のなかで、偉大な先生方と多くの仲間達の協力のもと、辛うじてこの課題の当初の想定少なくとも半分程度は達成できたのではないかと考えている。

本疾患は稀であるとはいえ、現時点の治療法をもってしても視機能を維持することが困難な疾患であり、多くの患者は慢性的な低視機能状態とそれを維持するために繰り返し行われる外科的治療を受け入れざるを得ないのが現状である。本研究班の成果として平成22年度には分子病態の解明に成功し、さらに平成23年度には患者由来の不活化細胞を樹立することに成功した。さらに平成24年度にはその不活化細胞を用いて、遺伝子治療の可能性についてレンチウイルスとプラスミドの両面から検討した。

本疾患は両アリの機能喪失性変異が原因であることから、遺伝子治療が根治的治療となることは早くから予想されていたが、それをこの3年のなかで検討することができたのは大変意義深いと考えている。遺伝子治療によって上皮バリア機能の正常化を行うという最終ゴールまでは残念ながら到達することができなかったが、生化学的レベルではほとんど正常化していると考えられることもでき、遺伝子治療はやはり本疾患において治療の第一候補となりえるものと考えられた。本研究事業はこの報告書をもって終了となるが、本疾患に対する研究、特に遺伝子治療を含めた治療法の開発については今後も引き続き行っていきたいと考えている。

最後にお世話になった研究分担者の先生方、研究協力者の先生方、京都府立医科大学の経理の担当の方々、そして厚生労働省と国立保健医療科学院の担当の方々に感謝の意を表したいと思う。

平成25年5月

研究代表者 川崎 諭

[Ⅱ]

班員構成

平成22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	西田 幸二	大阪大学医学部 眼科学教室	教 授
	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
	稲富 勉	京都府立医科大学 眼科学教室	助 教
研究協力者	福岡 秀紀	京都府立医科大学 眼科学教室	大学院生
	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	研修員
	篠宮 克彦	京都府立医科大学 眼科学教室	特任助教
	辻川 元一	大阪大学医学部 眼科学教室	助 教
	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

平成23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
	稲富 勉	京都府立医科大学 眼科学教室	助 教
	辻川 元一	大阪大学医学部 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	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
	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

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

[Ⅲ]

疾患概要

疾患概要

【疾患名】	膠様滴状角膜変性症
【患者数】	日本では31,546人に1人
【概要】	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著明な視力低下を来す常染色体劣性遺伝疾患として1914年に中泉によって初めて報告された。本疾患は世界的に見るとまれであるが、日本では比較的頻度が高く、本疾患の責任遺伝子であるTACSTD2遺伝子も日本人研究者によって同定された(Nat Genet, 1999)。原因遺伝子は解明されたものの、遺伝子変異から疾患表現型にいたるメカニズムについては不明である。またまれな疾患であるため、未だその疫学的記述や治療も含めた臨床的記述についても不十分な点が多い。
【原因の解明】	責任遺伝子はTACSTD2遺伝子であることが既に解明されており、この遺伝子両アレルの機能喪失によって疾患が生じ、片アレルだけが異常の場合には発症しない。本疾患では角膜上皮のバリア機能が著しく低下していることが判明している。また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おり、バリア機能が低下した角膜上皮を通して涙液が角膜内に侵入した結果であると推測される。TACSTD2遺伝子の機能喪失によってクローニン1と7のタンパク分解が促進され、結果としてタイトジャンクションの形成不全が生じることが明らかとなっている。しかしながらどのようなメカニズムによって涙液中では可溶性であるラクトフェリンが角膜中ではどのようなメカニズムで不溶性のアミロイド線維と変化するのかについては未だ不明である。
【主な合併症】	進行例では角膜新生血管が見られる。また角膜移植術後に投与するステロイド剤による緑内障発症の頻度が高く、アミロイドの線維柱帯への沈着による影響ではないかと推測されている。
【主な治療法】	アミロイド沈着による視力低下が進行してしまった場合には角膜移植術が適応となるが、再発性であること、ステロイド緑内障を来しやすいことなどを考慮し、通常可能な限り侵襲の少ない術式を選択する。アミロイド沈着が軽度または見られない場合にはソフトコンタクトレンズ装用が効果的であることが我々の予備検討で明らかになっている。
【研究班】	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班

Disease Summary

【Name of the disease/symptom】	Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy (GDLN)
【Number of Patients】	The frequency of GDLN cases among the Japanese population is estimated to be 1 in 31,546.
【Background】	GDLN was first reported by Nakaizumi in 1914. This disease is inherited in an autosomal recessive fashion. The responsible gene for GDLN was discovered by Tsujikawa et al in 1999 by the use of linkage analysis and subsequent candidate gene mutation analysis. It is said that the relative dominance of GDLN in Japan is attributable to the fact that consanguineous marriage is allowed by law and is an accepted practice by people in Japan.
【Cause】	The biallelic loss of function mutation of the TACSTD2 gene is the primary cause of this disease. Such mutation causes the attenuated stability of claudins 1 and 7 in corneal epithelial cells, leading to the absence of the tight junction and a severely compromised epithelial barrier function. Through such loosened epithelial barrier, tear proteins permeate into the cornea and amyloids will form by the polymerization of lactoferrin, which is the major component of tear protein. However, the precise mechanism of the formation of the amyloids is still unclear.
【Major symptoms】	The major symptoms of GDLN include irritation, lacrimation, and severe loss of vision in individuals around 10–20 years of age. GDLN is also known to have various clinical phenotypes, including typical mulberry, band keratopathy type, cumquat-like type, and stromal opacity type.
【Major complications】	The major complication associated with GDLN is glaucoma, especially following surgical intervention. Penetrating keratoplasty is the surgical procedure most prone to cause GDLN-associated glaucoma. Infection is sometimes observed, possibly due to the occasionally occurring epithelial defects.
【Major treatments】	Various kinds of keratoplasties, including phototherapeutic keratectomy, have been thought to be effective treatments for GDLN. The wearing of contact lenses has recently been found to be effective for the prevention of GDLN recurrence following surgical intervention.
【Contact information】	The Study Group for the establishment of a standard treatment regimen and the development of new treatment strategies for GDLN.

[IV]

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」

平成 22 年度 総括研究報告書
「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

研究代表者 川崎 諭 京都府立医科大学眼科学教室 助教

【研究要旨】

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

研究分担者

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

A. 研究目的

膠様滴状角膜変性症は 10 歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し発症頻度は稀であるが、日本人特有の疾患であることから大阪大学の辻川らによってその責任遺伝子として TACSTD2 遺伝子が同定された。しかしながら TACSTD2 遺伝子変異がいか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。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。そこで本研究では、TACSTD2 遺伝子変異がいかに関与するかに本疾患の病態形成に関わるかについて、分子生物学的および生化学的なアプローチによって分子レベルでの解明を試みた。また我が国における本疾患の疫学、臨床像、治療成績について検討し、その結果を元に標準的治療レジメンを作成することを試みた。大阪大学、順天堂大学、東京大学においては、本研究の臨床データを採取するとともに独自の視点で膠様滴状角膜変性症の臨床的研究を行った。

B. 研究方法

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

べ88眼）について術式毎の治療成績を合併症も含めて検討した。

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

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

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

組織で比較検討した。

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

C. 研究結果

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

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

研究分担者の西田は GDL D の疫学の

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

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

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

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

D. 考按

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

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

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

2. 膠様滴状角膜変性症の分子病態について

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 22 年度）

論文発表

巻末研究成果一覧表参照

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

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」

平成 23 年度 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。

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・治療を行っている国内 4 施設（京都府立医科大学、大阪大学、順天堂大学、東京大学）において本疾患患者 45 例 90 眼について疫学背景、臨床像、治療成績についてデータを収集し、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。

今年度はそれらの結果を踏まえ、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。

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

A. 研究目的

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

このような背景のもと、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。

今年度は疾患モデルの作製として、本疾患患者由来の不死化角膜上皮細胞の作製を行った。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。

B. 研究方法

1. 詳細な病態の解明および治療法の開発を目指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) をデバイスとした角膜上皮細胞培養及び細胞移入の検討を行った。(詳細は村上の分担研究報告を参照)
3. 角膜および口腔粘膜上皮シートおよびマウス角膜における TACSTD2 の発現を解析した。(詳細は辻川の分担研究報告を参照)
4. GDLD 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った。(詳細は天野の分担研究報告を参照)
5. 3 人の膠様滴状角膜変性症患者より 2 つの新規変異として、p. Ile281SerfsX23 と p. Tyr225X を発見し、それらの病的意義について in vitro で

解析した。(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本疾患のモデル細胞として本疾患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。この不死化細胞は本疾患患者角膜において認められる上皮バリア機能の低下、クローディン1および7タンパク発現の低下などの特徴を有しており、本疾患のさらなる病態解明ならびに治療法の開発に極めて有用な細胞であると考えられた。

研究分担者の村上は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 遺伝子を患者角膜に継続的に移入することを考えており、そのための基礎的検討として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) をデバイスとした角膜上皮細胞培養及び細胞移入の検討を行った。結果として、*in vitro*におけるCL上に対するHCE-Tの培養は材質により異なり、P-CLにおいては、GFP トランスジェニックラビットの角膜輪部から採取した細胞の増殖も良好であり、免疫染色による未分化細胞マーカー (p63) の発現も認められた。また、CL上に単層培養したCLを装着させた日本白色家兎眼においても、細胞の移行が認められた。

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検討し

た。結果として、ヒト角膜では TACSTD2 タンパク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った。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 RNA レベルでの発現を認めた。

研究分担者の天野は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 (OCT) を行い、再発によるアミロイド沈着部位に相当する部位に高輝度のシグナルを観察した。前眼部 OCT は膠様滴状角膜変性症の全層角膜移植術後の再発に対する高感度な評価法として有用であり、またアミロイドの沈着過程を客観的、半定量的に評価できるという利点があることがわかった。

研究分担者の稲富は GDLN の新規変異を2つ発見している。この変異は c. 840_841insTCATCATCGCCGGCCTCATC と c. 675C>A で各々フレームシフト変異 (p. Ile281SerfsX23) とノンセンス変異 (p. Tyr225X) をおこして本疾患を引き起こすと考えられた。これまで報告がなく、また CpG ジヌクレオチド部位の変異ではないことから日本人において発生した創始者変異であると考えられた。さらに稲富はこれらの