

## 膠状滴状角膜ジストロフィ 診断基準（案）

- 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、GDL D
- 疾患概念：TACSTD2 遺伝子の両アリの機能喪失性変異によって角膜上皮バリア機能の破綻が生じ、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（後期染色象が特徴的である。）
  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 常染色体劣性遺伝を示すが散発例も存在する。（約半数はいとこ婚などの血族結婚である。）
    - ② TACSTD2 遺伝子に異常を認める。

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：括弧内は Ide らの報告 (Ide T et al., Am J Ophthalmol. 2004, 1081-4) の臨床分類を示す。Typical mulberry type と Band keratopathy type が症例の大半を占める。

## 膠状滴状角膜ジストロフィ 重症度分類（案）

- 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、GDL
- 疾患概念：TACSTD2 遺伝子の両アリの機能喪失性変異によって角膜上皮バリア機能の破綻が生じ、角膜上皮下から実質にアミロイドが沈着する疾患。
- 加齢に従い角膜実質のアミロイド沈着が増加し、末期には血管侵入とともに角膜実質に脂肪成分の沈着を見る。
- 手術を行う際には重症度により術式を選択する必要がある。
- 重症度分類
  1. 膠様隆起病変
    - 0点：膠様隆起病変の数が 0 個
    - 1点：膠様隆起病変の数が 1～5 個
    - 2点：膠様隆起病変の数が 6～10 個
    - 3点：膠様隆起病変の数が 10 個以上
  2. 角膜実質混濁
    - 0点：角膜実質混濁が見られない
    - 1点：角膜実質混濁はあるが瞳孔領が全周確認できる
    - 2点：角膜実質混濁により瞳孔領が一部確認できない
    - 3点：角膜実質混濁により瞳孔領が全く確認できない

# 膠様滴状角膜ジストロフィ 治療指針（案）

## 1. 疾患概要

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、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 TACSTD2 で、この遺伝子の両アリ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、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必要となる症例が少なくない。

## 2. 治療原則

膠様滴状角膜ジストロフィを完治させる治療法は現時点では存在しない。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の対照的措置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、合併症の多い全層角膜移植術をなるべく回避するような治療計画をたてるのが肝要となる。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) 手術治療

#### ① 透過性亢進のみまたは視力低下がないか、ごく初期の膠様滴状角膜ジストロフィに対する治療

現時点でそのメカニズム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ため、これを用いることが推奨される。

#### ② 軽症に対する治療 注1

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。

#### ③ 中等症に対する治療 注2

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。

#### ④ 重症（角膜混濁が角膜実質のほぼ全層に渡り重度の視力低下を呈する症例）や、全層角膜移植術の既往やデスメ膜穿孔の既往があり DALK が施行しづらい症例に対する治療 注2、注3

全層角膜移植術（Penetrating keratoplasty、PKP）の術後にはステロイド治療を長期間行うこともあり緑内障を来しやすいことが知られている。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した場合や角膜混濁程度が強く LKP または DALK による視機能改善が期待できない場合には全層角膜移植術が必要となる。

### (イ) 手術後の再発予防に対する長期的治療

上記のすべての手術の後に、ソフトコンタクトレンズの連続装用を行うことを強く推奨する。就眠中も連続使用させる。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。

注1：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。

注2：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（リンデロン 1-2mg/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。

注3：術後に緑内障を合併すること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。

# 眼類天疱瘡 (OCP; ocular cicatricial pemphigoid) 診断基準 (案)

## 概念

基底膜に対する自己免疫疾患である瘢痕性類天疱瘡の中で、眼粘膜病変のみを呈する疾患

## 主要所見

中高年の女性に好発。1-4によって視力障害や眼痛などを呈する。

1. 急性増悪を繰り返す両眼性の充血を伴う慢性結膜炎
2. 結膜嚢の短縮と瞼球癒着、睫毛乱生症、涙点閉鎖
3. 角膜輪部疲弊症による角膜上結膜上皮細胞が侵入、最終的に眼表面上皮の角化
4. ドライアイ

## 除外

1. Stevens-Johnson 症候群
2. 偽眼天疱瘡
3. 瘢痕性天疱瘡

## 留意点

基底膜部のヘミデスモゾーム構成タンパク BP180 (XVII 型コラーゲン) やラミニン 5 の自己抗体が結膜および角膜輪部上皮基底細胞を慢性的に攻撃して角結膜の瘢痕性変化と角膜上皮幹細胞疲弊を呈する。

# 無虹彩症 (aniridia) 診断基準 (案)

## 概念

PAX6 遺伝子変異により胎生期に虹彩がほとんど形成されず虹彩欠損を呈する疾患

## 主要所見

### 1. 虹彩欠損

部分的から完全まで様々な程度の先天的虹彩欠損。通常両眼性で程度より差明を訴える。

さらに、以下の眼合併症を認め、視力低下を呈することがある。

### 2. 黄斑低形成

### 3. 緑内障

### 4. 白内障

### 5. 小眼球

### 6. 眼球振盪症

### 7. 角膜輪部疲弊症や角膜混濁などの角膜症

## 除外

### 1. ICE (iridocorneal endothelial、虹彩角膜内皮) 症候群

### 2. 外傷後または眼内手術後虹彩欠損

## 留意点

### 1. 遺伝子異常

11 番染色体遺伝子短腕に存在する転写因子 PAX6 遺伝子変異により生じる。常染色体優性遺伝、劣性遺伝、散発性などの遺伝形式をとる。

### 2. 全身合併症

PAX6 遺伝子の隣接遺伝子症候群として Wilms 腫瘍など合併する (WAGR 症候群) ことがある。PAX6 遺伝子は神経外胚葉の発達に関与するため、脳形成不全などの脳神経異常を合併することがある。

[V]

班會議議事録

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
「希少難治性角膜疾患の疫学調査」  
第一回研究会議 議事録

作成：井村亜矢

日時：平成26年7月5日（土）18:00～20:00

場所：東京国際フォーラム 4階ガラス棟G407会議室

参加者：19名（敬称略）

西田幸二、山上 聡、村上 晶、島崎 潤、宮田和典、前田直之、川崎 諭、臼井智彦、横井則彦、外園千恵、稲富 勉、白石 敦、鄭 暁東、重安千花、山田知美、山本紘司、高 静花、相馬剛至、大家義則

### 1) 研究代表者の挨拶

研究代表者の西田幸二より今回の研究事業の目的について説明の後、出席者の自己紹介を簡単に行なった。

### 2) 分担金の使用、研究の概要説明

研究分担者の川崎諭より分担金の使用にあたっての注意、利益相反、IRB審査、来年度継続申請書作成や2月末提出予定の報告書作成についての説明がなされた。

### 3) 班構成・役割分担の説明

- 西田幸二より各ワーキンググループリーダーを中心に研究を進めることについての提案があった。  
>>特に異議なく承認された。
- 西田幸二により6つのワーキンググループ（角膜内皮症、角膜形状異常症、先天性角膜混濁、特発性周辺部角膜潰瘍、角膜上皮肝細胞疲弊症）とそれぞれのリーダー、サブリーダーを提案があった。  
>>特に異議なく承認された。
- 西田幸二より研究分担者の山田昌和との事前懇談を行ったとの報告があり、その中で先天性角膜混濁ワーキンググループでは小児眼科学会とも協力していく方向性を考えているとの話があった。
- 研究分担者の村上晶から、角膜ジストロフィのサブリーダーとして研究分担者の川崎諭が指名された。>>特に異議なく承認された。
- 角膜上皮幹細胞疲弊症については、Cornea Societyが出している診断基準を参考にすることとなった。>>特に異議なく承認された。
- 研究協力者の山本紘司より、本事業で使用するデータ収集システム REDCap (Research Electric Data Capture) の概要説明があり、入力項目の決定などを早めに決めて欲しいとの意見があった。またすべての領域に共通する入力項目を設けることで省力化を図りたいとの意見もあった。  
>>特に異議なく承認された。
- 西田幸二より、REDCapを担当するデータベース構築・解析班（新谷、山田、山本）には、すべてのワーキンググループのミーティングにできる限り参加してもらいたいとの依頼があった。  
>>特に異議なく承認された。
- 研究協力者の山田知美より、個人情報 匿名化番号の対応表についての話があった。



- 西田幸二より、ワーキンググループごとの研究の進め方、役割分担は、ワーキンググループのリーダー、サブリーダーに一任してはどうかとの提案があった。各ワーキンググループのミーティング頻度は各リーダーに一任する。ミーティングはリーダーが所属する機関で行なう可能性が高いがそれについてもワーキンググループに一任する。>>特に異議なく承認された。
- ワーキンググループのリーダーとサブリーダー以外のメンバーをどう選定するかについては一覧表にて希望を募ることとするが、できうるかぎり積極的にワーキンググループに参加するように西田幸二より分担者、協力者に依頼があった。
- 現時点で研究協力者に登録していないものでも、随時登録可能であるので、各施設で可能な限り増やして欲しいと西田幸二より分担者、協力者に依頼があった。
- 川崎諭より本会議に関する資料の電子ファイルを各分担者に送付することとなった。
- 研究協力者の外園知恵よりワーキンググループの構成については、積極的に参加するコアメンバーとそれよりは積極性の低い、データ収集等に参加するサブメンバーに分けてはとの提案があった。送付するエクセルファイルはそれに対応したものとする事となった。  
>>特に異議なく承認された。

#### 4) 次回・次々回の班会議開催日時について

- 第二回班会議 2014年11月13日(木) 18時～20時  
場所：神戸ポートピアホテル
- 第三回班会議 2015年2月12日(木) 18時～20時  
場所：高知市文化プラザカルポート

#### 5) 第二回班会議で発表していただくこと

- ワーキンググループ構成(役割など)
- 症例データ項目の決定
- REDCap データベース構築の進捗状況
- REDCap データベースの使い方などの説明
- 論文執筆の見据えた研究ロードマップの作成

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
「希少難治性角膜疾患の疫学調査」  
第二回研究班会議 議事録

作成：西田 希

日時：平成26年11月13日（木）18:00～20:00

場所：神戸国際会議場会議室401号室

参加者：26名（敬称略）

西田 幸二、山上 聡、木下 茂、大橋 裕一、島崎 潤、山田 昌一、前田 直之、川崎 諭、外園 千恵、白石 敦、井上 智之、原 祐子、榛村 重人、羽藤 晋、松田 彰、舟木 俊成、子島 良平、重安 千花、辻川 元一、橋田 徳康、高 静花、相馬 剛至、大家 義則、三田村 勇人、山田 知美、関 季子

## 1. 研究代表者の挨拶

研究代表者の西田 幸二より指定難病についての説明と、研究目的についての再説明が行われた。

- ・指定難病については、難病の患者に対する医療等に関する法律が成立したことを受けて、現在新たな医療費助成の対象となる指定難病についての検討を、厚生科学審議会疾病対策部会指定難病検討委員会において行っているところである。
- ・今回の研究の目的は、診断基準等について学会主導、つまり学会員にアクセプトしてもらい、周知することである。
- ・これまで行われてきた研究をさらにブラッシュアップする。（例えば症例数を増やす、別の内容を入れる、診断基準等のなかったものについては今回作成する等）

## 2. 各ワーキンググループの進捗報告、今後の方針、およびディスカッション

### 角膜内皮症（リーダー：西田 幸二、サブリーダー：山上 聡）

症例ごとに進捗報告が行われ、今後の方針等についてディスカッションがなされた。

- Fuchs 角膜内皮ジストロフィについて（羽藤 晋）
  - ・視機能とguttataによる診断基準、重症度分類を想定している。
  - ・年齢と内皮細胞密度がその後の視機能予後に大きく影響する。
  - ・既存のデータについてもきっちりとしたデータベースにすべきである。
- PEX 内皮症について（白石 敦）
  - ・原因不明の水疱性角膜症の約5%がPEXによるもの。
  - ・落屑で水疱性角膜症に至ったもの、という定義とするのがいいのではないか。
- 特発性角膜内皮炎（外園 千恵）
  - ・前回の研究で100例近い症例が集積された。
  - ・ガンシクロビル点眼剤の治験を予定している。

### 角膜形状異常症（リーダー：島崎 潤、サブリーダー：前田 直之）

グループリーダーの島崎 潤より進捗報告が行われ、今後の方針等についてディスカッションがなされた。

- ・円錐角膜とペルーシド辺縁変性を対象疾患とする。

- ・定義、診断基準、重症度分類、ガイドラインを作成する。
- ・現時点では円錐角膜、ペルーシド辺縁変性ともにしっかりとした定義はない。
- ・教科書的な記述を手始めとしてバージョンアップしていくという方向性で行う。
- ・診断基準に一番力を入れたい。（診断基準は重症度によって大きく異なる。）
- ・重症のものはスリットランプで診断可能。
- ・軽症のものはトポグラフィ、トモグラフィ、バイオメカニクスの定量データも駆使して行わないと難しい。
- ・用語の混乱もある。

#### 先天性角膜混濁（リーダー：山田 昌和、サブリーダー：宮田 和典）

グループリーダーの山田 昌和より進捗報告が行われ、今後の方針等についてディスカッションがなされた。

- ・平成21年度の厚労省研究班にて全国調査を行った。
- ・前眼部形成異常症と輪部デルモイドが多かった。
- ・生育医療センターにて140例くらいの前眼部形成異常症の患者を持っている。
- ・視力0.1以下の社会的失明の患者が全体の35%と無視できない頻度でいる。
- ・推定される先天性角膜混濁の年間発症数は120～140例、出生8000～9000人に一人の頻度。
- ・視覚障害の認定を受けるのは10～15%。
- ・前回のデータは無記名のデータであり、掘り起こすのは不可能。
- ・もう一度生育医療センターの協力を得て再調査したい。
- ・小児学会や緑内障学会とも関係するので、西田幸二より呼びかけを行う。

#### 特発性周辺部角膜潰瘍（リーダー：木下 茂、サブリーダー：坪田 一男）

サブメンバーの外園 千恵より進捗報告が行われ、今後の方針等についてディスカッションがなされた。

- ・過去の全国調査にて120例を集積した。
- ・モーレン潰瘍は治る人はきれいに治ってしまうので、患者集積の際問題点となる。
- ・診断基準はあくまで急性期のもの。
- ・ステロイド治療が既に行われていると細胞浸潤がマスクされて判断しにくい。
- ・診断基準についてはもっと意見を集めて、より良いものにしたい。
- ・学会に入っていない先生方へ周知するために、もっと広い形で出してはどうか。
- ・今まで症例を見たことのない先生でも診断できるように、シンプルでも良いのでガイドラインがあれば良いのでは。
- ・シクロスポリンの保険承認をなんとかしたい。（現在は保険がきかないことから、使わずに失明された方もいる）

#### 角膜ジストロフィ（リーダー：村上 晶、サブリーダー：川崎 諭）

サブリーダーの川崎 諭より進捗報告が行われ、今後の方針等についてディスカッションがなされた。

- ・他のグループと同様、診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの作成及び学会での承認、啓蒙を最終目標とする。
- ・対象疾患としては膠様滴状角膜ジストロフィのみとする。
- ・データベースについては臨床疫学講座の先生方と話し合いながらREDCapにて構築を進めている。(90%程度の進捗状況。12月には症例データ入力開始予定。)
- ・診断基準作成にあたって、診断そのもののクオリティを上げるため遺伝子の変異検査をすることとした。(事業計画変更申請については承認済み。学内のヒトゲノム研究についても1~2ヶ月以内に承認される見込み)
- ・遺伝子検査については、大阪大学および東京大学より提供された試料を、大阪大学にて遺伝子解析することとしているが、他大学でも試料提供が可能であれば協力をお願いしたい。
- ・診断基準、重症度分類、診療ガイドライン作成用データベースへの入力項目を決定した。
- ・診療ガイドラインに関しては、介入というイベントが発生した時に、その介入ごとにデータ入力することとした。

### 角膜上皮幹細胞疲弊症 (リーダー：大橋裕一、サブリーダー：川崎 諭)

コアメンバーの井上 智之より進捗報告が行われ、今後の方針等についてディスカッションがなされた。

- ・Aniridiaについては遺伝子診断スクリーニング等について検討する必要があると考えている。
- ・緑内障外来もしくは小児といったところにAniridiaの疾患データが集積されている可能性があり、どのように症例をインクルードしていくか、意見を聞いて決めていきたい。
- ・OCPについても、どのような基準でインクルードしていくのか決める必要あり。
- ・日本での罹患率をきちんと示していく事に主眼を置きたい。
- ・症例の集積方法や項目を細かく詰めるとともに、現行治療法等についても情報を集め、どのような対応になっているかを明らかにしたい。
- ・症例の集積について、まずは角膜学会から呼びかけ、さらに他学会にも呼びかける。Aniridiaについては小児学会や緑内障学会とも関係するので西田 幸二より呼びかけを行う。

### 3. REDCapデモンストレーション

- ・関 季子より、膠様滴状角膜ジストロフィのデータベースを用いたREDCapのデモンストレーションが行われた。
- ・日本語の説明書については現在作成中である。

### 4. 全体ディスカッション

- ・グループリーダー主導でミーティングを開催し、疾患ごとに研究を進めて行く。
- ・次回班会議にて各グループの進捗を報告する。
- ・グループでの連絡用にメーリングリストを作成する。
- ・今後のデッドラインまたはタイムラインを作成する。
- ・指定難病の要件について答えられるような調査を行う。

[VI]

研究成果の刊行に関する一覧表

## 論文・書籍一覧

### 英文論文

1. Hatou S, Yamada M, Akune Y, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko T, Nishida T, Tsubota K. Role of insulin in regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010;51(8):3935-3942.
2. Yamaguchi T, Negishi K, Yamaguchi K, Dogru M, Uchino Y, Shimmura S, Tsubota K. Comparison of anterior and posterior corneal surface irregularity in Descemet stripping automated endothelial keratoplasty and penetrating keratoplasty. *Cornea* 2010;29(10):1086-1090.
3. Tsubota K. Anti-aging in ophthalmology. *Ophthalmic research* 2010;44(3):145.
4. 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. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52(11):7888-7893.
5. Hatou S. Hormonal regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Cornea* 2011;30 Suppl 1:S60-66.
6. Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PloS one* 2012;7(1):e29677
7. Asada Y, Ebihara N, Funaki T, Yokoi N, Murakami A, Matsuda A. Vernal keratoconjunctivitis with giant papillae on the inferior tarsal conjunctiva. *Cornea* 2014;33(1):32-34.
8. Nakatani S, Murakami A. Three-year outcome of Descemet stripping automated endothelial keratoplasty for bullous keratopathy after argon laser iridotomy. *Cornea* 2014;33(8):780-784
9. Fuchihata M, Maeda N, Toda R, Koh S, Fujikado T, Nishida K. Characteristics of corneal topographic and pachymetric patterns in patients with pellucid marginal corneal degeneration. *Japanese journal of ophthalmology* 2014;58(2):131-138.
10. Maeda N, Nakagawa T, Higashiura R, Fuchihata M, Koh S, Nishida K. Evaluation of corneal epithelial and stromal thickness in keratoconus

- using spectral-domain optical coherence tomography. Japanese journal of ophthalmology 2014;58(5):389-395.
11. Maeda N, Nakagawa T, Kosaki R, Koh S, Saika M, Fujikado T, Nishida K. Higher-order aberrations of anterior and posterior corneal surfaces in patients with keratectasia after LASIK. Investigative ophthalmology & visual science 2014;55(6):3905-3911.
  12. Oie Y, Kamei M, Matsumura N, Fujimoto H, Soma T, Koh S, Tsujikawa M, Maeda N, Nishida K. Rigid gas-permeable contact lens-assisted cataract surgery in patients with severe keratoconus. Journal of cataract and refractive surgery 2014;40(3):345-348.
  13. Hiratsuka Y, Yamada M, Akune Y, Murakami A, Okada AA, Yamashita H, Ohashi Y, Yamagishi N, Tamura H, Fukuhara S, Takura T. Assessment of vision-related quality of life among patients with cataracts and the outcomes of cataract surgery using a newly developed visual function questionnaire: the VFQ-J11. Japanese journal of ophthalmology 2014;58(5):415-422.
  14. Shigeyasu C, Hirano S, Akune Y, Yamada M. Diquafosol Tetrasodium Increases the Concentration of Mucin-like Substances in Tears of Healthy Human Subjects. Current eye research 2014;1-6.
  15. Fukui M, Yamada M, Akune Y, Shigeyasu C, Tsubota K. Fluorophotometric Analysis of the Ocular Surface Glycocalyx in Soft Contact Lens Wearers. Current eye research 2015;1-6.
  16. Kawasaki R, Akune Y, Hiratsuka Y, Fukuhara S, Yamada M. Cost-utility analysis of screening for diabetic retinopathy in Japan: a probabilistic Markov modeling study. Ophthalmic epidemiology 2015;22(1):4-12.

#### 和文論文

1. 吉川晴菜, 池田陽子, 外園千恵, 森和彦, 上野盛夫, 木下茂. 先天角膜混濁の超音波生体顕微鏡所見と臨床診断および眼圧の関係. 日眼会誌 2015;119(1):16-21.
2. 吉川晴菜, 池田陽子, 外園千恵. 小児の角膜. 臨床眼科 2014;68(11)増刊号:352-354.
3. 外園千恵. 特発性周辺部角膜潰瘍の多施設調査について教えてください. 専門医のための眼科診療クオリファイ 2014;25:137-138.
4. 羽藤晋, 坪田一男. 角膜再生の現状と課題. Organ Biology 2010;17(1):51-60.
5. 稗田牧. 円錐角膜に対するマイクロ波による角膜熱形成後のジグザグ全層角膜移植術. あたらしい眼科 2015;32(1):109-110.

6. 東原尚代, 稗田牧. 円錐角膜, 屈折矯正術後の不正乱視の治療. あたらしい眼科 2015;31(1):39-45.
7. 前田直之. 円錐角膜 診断. 眼科 2014;56(11):1277-1283.

#### 書籍

1. 東原尚代, 百武洋子. 円錐角膜の捉え方. 角膜疾患 (改訂第2版) 2015;182-183.
2. 東原尚代, 百武洋子. 円錐角膜. 角膜疾患 (改訂第2版) 2015;184-187.
3. 東原尚代, 百武洋子. ペルーシド角膜変性. 角膜疾患 (改訂第2版) 2015;188-189.
4. 東原尚代, 百武洋子. 球状角膜. 角膜疾患 (改訂第2版) 2015;190.



[VII]

研究成果の刊行物・別刷

# Role of Insulin in Regulation of Na<sup>+</sup>-/K<sup>+</sup>-Dependent ATPase Activity and Pump Function in Corneal Endothelial Cells

Shin Hatou,<sup>1,2</sup> Masakazu Yamada,<sup>1</sup> Yoko Akune,<sup>1</sup> Hiroshi Mochizuki,<sup>1</sup> Atsushi Shiraishi,<sup>3</sup> Takeshi Joko,<sup>3</sup> Teruo Nishida,<sup>4</sup> and Kazuo Tsubota<sup>2</sup>

**PURPOSE.** The Na<sup>+</sup>-/K<sup>+</sup>-dependent ATPase (Na,K-ATPase) expressed in the basolateral membrane of corneal endothelial cells plays an important role in the pump function of the corneal endothelium. The role of insulin in the regulation of Na,K-ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells was investigated.

**METHODS.** Confluent monolayers of mouse corneal endothelial cells were exposed to insulin. ATPase activity was evaluated by spectrophotometric measurement of phosphate released from ATP with the use of ammonium molybdate; Na,K-ATPase activity was defined as the portion of total ATPase activity sensitive to ouabain. Pump function was measured with the use of a Ussing chamber; pump function attributable to Na,K-ATPase activity was defined as the portion of the total short-circuit current sensitive to ouabain. Western blot analysis and immunocytochemistry were performed to measure the expression of the Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit.

**RESULTS.** Insulin increased the Na,K-ATPase activity and pump function of cultured corneal endothelial cells. These effects were blocked by protein kinase C (PKC) inhibitors and protein phosphatases 1 and 2A inhibitor. Western blot analysis indicated that insulin decreased the ratio of the inactive Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit. Immunocytochemistry indicated that insulin increased the cell surface expression of the Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit.

**CONCLUSIONS.** These results suggest that insulin increases the Na,K-ATPase activity and pump function of cultured corneal endothelial cells. The effect of insulin is mediated by PKC and presumably results in the activation of PP1, 2A, or both, which are essential for activating Na,K-ATPase by  $\alpha_1$ -subunit dephosphorylation. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3935-3942) DOI:10.1167/iovs.09-4027

From the <sup>1</sup>Division for Vision Research, National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan; the <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan; the <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Ehime University Graduate School of Medicine, Ehime, Japan; and the <sup>4</sup>Department of Ophthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Yamaguchi, Japan.

Supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

Submitted for publication May 23, 2009; revised September 17 and December 12, 2009, and February 2, 2010; accepted February 27, 2010.

Disclosure: S. Hatou, None; M. Yamada, None; Y. Akune, None; H. Mochizuki, None; A. Shiraishi, None; T. Joko, None; T. Nishida, None; K. Tsubota, None

Corresponding author: Shin Hatou, Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan; tr97469@zc4.so-net.ne.jp.

Clinical observations of a higher incidence of persistent corneal edema after vitrectomy and other surgical procedures for patients with diabetes mellitus have suggested that there is abnormal corneal endothelial function associated with diabetes mellitus.<sup>1-6</sup> Specular microscopic studies have shown morphologic abnormalities such as less endothelial cell density and increased endothelial pleomorphism in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus.<sup>6-15</sup> Some clinical studies have shown that patients with diabetes tend to have slightly thicker corneas and reduced recovery rates from hypoxia-induced corneal edema.<sup>16-19</sup>

The Na<sup>+</sup>-/K<sup>+</sup>-dependent ATPase (Na,K-ATPase), expressed in the basolateral membrane of corneal endothelial cells, is primarily responsible for the pump function of the corneal endothelium.<sup>20</sup> Herse and Adams<sup>21,22</sup> have shown that functional abnormalities, such as increased corneal thickness and decreased ability to recover from corneal edema in alloxan-induced diabetic rabbits, are associated with decreased Na,K-ATPase activity in the corneal endothelium. Whikehart et al.<sup>23</sup> have reported that elevated glucose levels reduce Na,K-ATPase activity in cultured bovine corneal endothelial cells. McNara et al.<sup>24</sup> have shown that acute hyperglycemia affects corneal hydration control in humans. These results suggest that a high glucose level itself is responsible for reduced Na,K-ATPase activity.

However, there might be another mechanism of reduced Na,K-ATPase activity in the corneal endothelia of persons with diabetes. It is well known that a lack of insulin plays a principal role in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus and that the intracellular insulin signal is reduced because of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus.<sup>25,26</sup> Several studies have shown that insulin directly enhances Na,K-ATPase activity in skeletal muscle, liver, kidney, adipocytes, lymphocytes, avian salt glands, and many other cells and organs.<sup>27-37</sup> Insulin is present in the aqueous humor of rabbits at a concentration of approximately 3% of that in plasma, and the aqueous humor insulin concentration of alloxan-induced diabetic rabbits after feeding is lower than that of normal control animals.<sup>38,39</sup> Anderson and Fischberg<sup>40</sup> have reported that insulin has a significant effect on transendothelial fluid transport in rabbit cornea. Therefore, we hypothesized that a lack of insulin or a reduced level of intracellular insulin signaling may have a direct effect on the Na,K-ATPase activity of the corneal endothelial cells. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) have been reported to stimulate DNA synthesis and cell proliferation in corneal endothelium by insulin receptor or IGF-I receptor,<sup>41,42</sup> whereas the effect of insulin on the Na,K-ATPase activity of corneal endothelial cells remains unknown.

Insulin and several other hormonal agents activate signaling pathways, including those mediated by protein kinases such as protein kinase C (PKC). A direct effect of PKC on Na,K-ATPase activity has been demonstrated in various tissues.<sup>27,43</sup> To date,

PKC is regarded to trigger the rapid action of insulin on the Na,K-ATPase and to be involved in the stimulation of the Na,K-ATPase by insulin in muscle cells.<sup>27</sup>

To investigate the role of insulin in the control of the Na,K-ATPase in corneal endothelial cells, we examined the effects of insulin activation on the enzymatic activity and pump function of Na,K-ATPase in cultured mouse corneal endothelial cells. We also examined whether PKC and its related enzymes, protein phosphatase 1 and 2A, might mediate the insulin activation of Na,K-ATPase.

## METHODS

### Chemicals

Ammonium molybdate reagent (Biomol Green) and phosphate standards were obtained from Biomol Research Laboratories (Plymouth, PA). Mammalian protein extraction reagent (M-PER) and BCA protein assay kit were obtained from Pierce Biotechnology (Rockford, IL). Anti-Na,K-ATPase  $\alpha_1$  antibody was obtained from Cosmo Bio (Tokyo, Japan). Anti-phospho-Na,K-ATPase  $\alpha_1$  (Ser18) antibody was obtained from Cell Signaling (Danvers, MA). Anti- $\beta$ -actin antibody (AC-15) was obtained from Abcam (Cambridge, MA). ABC rabbit IgG kit (Vectastain Elite) was obtained from Funakoshi (Tokyo, Japan). Western blot analysis detection reagent (ECL Plus) was obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Reagent (ProLong Gold Antifade) with DAPI and signal enhancer (Image iT) were obtained from Life Technologies Japan (Tokyo, Japan). Insulin, ouabain, staurosporine, okadaic acid, and other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Water-insoluble compounds were dissolved in a minimal volume of methanol or dimethyl sulfoxide, with equal amounts of these solvents added to control solutions; the final concentration of methanol or dimethyl sulfoxide in incubations was  $<0.3\%$  and was found to have no effect on adenosine triphosphate (ATP) hydrolysis or short-circuit current (data not shown).

### Cell Culture

A simian virus 40 (SV40)-transformed mouse corneal endothelial cell line (C3H derived) was the kind contribution of the late J. Wayne Streilein (Harvard Medical School). The cells were cultured under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100  $\mu$ g/mL). The cells were passaged at a split ratio of 1:2 to 1:4, at which they become confluent in 4 to 7 days.

Experiments examining PKC activity or Na,K-ATPase activity were performed with cells cultured in 24-well culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark). Ussing chamber experiments were performed with confluent monolayers of cells cultured on six-well polycarbonate inserts (Snapwell; Corning, Acton, MA) with a membrane pore size of 0.4  $\mu$ m. The insert membrane growth area was 4.67 cm<sup>2</sup>. All experiments were performed with cell monolayers within 1 day of the cells reaching confluence and with the cells maintained in the culture incubator at 37°C.

### Measurement of Na,K-ATPase Activity

The culture medium was removed from cell monolayers, ultrapure distilled water (150  $\mu$ L) was added to each well, and the culture plate was then placed in liquid nitrogen for 10 seconds before the addition to each well at room temperature of 150  $\mu$ L solution containing 80 mM histidine, 20 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, alamethicin (2  $\mu$ g/mL), 30  $\mu$ M digitonin, and 200 mM NaCl at pH 7.4.<sup>44</sup> To duplicate wells, 10  $\mu$ L of 30 mM ouabain (final concentration, 1 mM) or vehicle were added, and the plate was incubated for 30 minutes at 37°C. After the further addition of 10  $\mu$ L of 300 mM ATP (final concentration, 10 mM), the reaction mixtures were incubated for an additional 30 minutes at 37°C. The ATP hydrolysis reaction was terminated by the addition of 75  $\mu$ L of 50% trichloroacetic acid to each well. The con-

tents of each well were then centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at room temperature.

The resultant supernatants were diluted 50-fold with ultrapure distilled water, and portions (50  $\mu$ L) of the diluted samples were added to tubes containing 100  $\mu$ L ammonium molybdate reagent (Biomol Green; Biomol Research Laboratories) for determination of phosphate content by measurement of absorbance at 640 nm. Phosphate solutions of 0 to 40  $\mu$ M were used as standards. The Na,K-ATPase activity was calculated as the difference in ATPase activity between cells exposed to ouabain and those not exposed and was expressed as millimoles of ATP hydrolyzed per milligram of protein per hour. The protein concentration of the reaction mixtures was determined by the method of Lowry et al.,<sup>45</sup> with bovine serum albumin as the standard.

### Measurement of Pump Function

The pump function of confluent monolayers of corneal endothelial cells was measured with the use of a Ussing chamber basically as described previously.<sup>46,47</sup> The cells cultured on inserts (Snapwell; Corning) were placed in a Ussing chamber (EM-CSYS-2; Physiologic Instruments, San Diego, CA). The endothelial cell surface side was in contact with one chamber, and the insert membrane side was in contact with another chamber. The chambers were carefully filled with Krebs-Ringer bicarbonate (120.7 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.6 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 mM glucose bubbled with a mixture of 5% CO<sub>2</sub>, 7% O<sub>2</sub>, and 88% N<sub>2</sub> to pH 7.4). The chambers were maintained at 37°C by an attached heater. The short-circuit current was sensed by narrow polyethylene tubes positioned close to either side of the insert, filled with 3 M KCl and 4% agar gel, and connected to silver electrodes. These electrodes were connected to a computer through a Ussing system (VCC-MC2; Physiologic Instruments) and research grade recorder (iWorx 118; iWorx Systems, Dover, NH), and the short-circuit current was recorded (Lab-scribe 2 Software for Research; iWorx Systems). After the short-circuit current had reached steady state, ouabain (final concentration, 1 mM) was added to the chamber, and the short-circuit current was measured again. The pump function attributable to Na,K-ATPase activity was calculated as the difference in short-circuit current measured before and after the addition of ouabain.

### Measurement of PKC Activity

After removal of the culture medium, cells were washed with phosphate-buffered saline and lysed in 1 mL solution containing 20 mM MOPS (pH 7.4), 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50 mM NaF, 1 mM sodium vanadate, 5 mM EGTA, 1% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM benzamide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin (10  $\mu$ g/mL), and aprotinin (10  $\mu$ g/mL). The lysates were centrifuged at 13,000 rpm for 15 minutes at 4°C, and the resultant supernatants were assayed for PKC kinase activity with the use of a PKC kinase activity assay kit (Assay Designs, Ann Arbor, MI) based on a solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay that recognizes the phosphorylated form of the substrate. PKC activity was expressed as nanograms of phosphorylated substrate formed per milligram of protein. The protein concentration of lysate supernatants was assayed by the method of Lowry et al.,<sup>45</sup> with bovine serum albumin as the standard.

### Western Blot Analysis of Na,K-ATPase $\alpha_1$ -Subunit

The culture medium was removed from cell monolayers and then lysed with M-PER. The supernatant was collected, and total protein in each sample was measured with the use of a protein assay reagent (Advanced; Cytoskeleton, Inc., Denver, CO) BCA protein assay kit. Approximately 1  $\mu$ g of each sample was separated on a 7.5% polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate and then was transferred to polyvinylidene membranes. After blocking with 1% normal goat or bovine serum and 0.1% Tween-20 in TBS, the membrane was incubated with anti-Na,K-ATPase  $\alpha_1$  antibody (1:5000 dilution with TBS), anti-phospho-Na,K-ATPase  $\alpha_1$  (Ser18) antibody (1:2000 dilution with TBS), or anti- $\beta$ -actin (AC-15) antibody (1:2000 dilution with TBS).

overnight at 4°C. Incubation with biotinylated secondary antibodies was followed with the use of elite reagent (Vectastain ABC; Vector Laboratories) for 30 minutes at room temperature. Positive immunoreactions were made visible by an enhanced chemiluminescence Western blot analysis reagent detection system (ECL Plus; Amersham Pharmacia Biotech). A densitometer (ChemiDoc XRS; Bio-Rad, Hercules, CA) was used for quantization of band intensities.

### Immunocytochemistry

The Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit was studied by indirect immunocytochemistry. Corneal endothelial cells cultured on four-well chamber slides were fixed at room temperature for 15 minutes in 4% formaldehyde in PBS. After three PBS washes, the specimens were incubated for 30 minutes in signal enhancer (Image iT; Life Technologies Japan). After two PBS washes, the specimens were incubated for 30 minutes in 10% normal goat serum to block nonspecific binding. This was followed by overnight incubation at 4°C with 1:500-diluted rabbit anti-Na,K-ATPase  $\alpha_1$  antibody (final concentration, 2  $\mu$ g/mL) and three washes in PBS. Corneal endothelial cells were then incubated for 1 hour in a 1:500 dilution of FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody and again washed three times in the dark. Specimens were mounted on glass slides with anti-fading mounting medium containing 4',6-diamino-2-phenylindole (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI; Life Technologies Japan), and the slides were inspected with a confocal microscope (Radiance 2100; Bio-Rad).

### Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SD and were compared by Student's *t*-test with the use of spreadsheet software (Excel 2003; Microsoft, Redmond, WA). *P* < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Effect of Insulin on Na,K-ATPase Activity

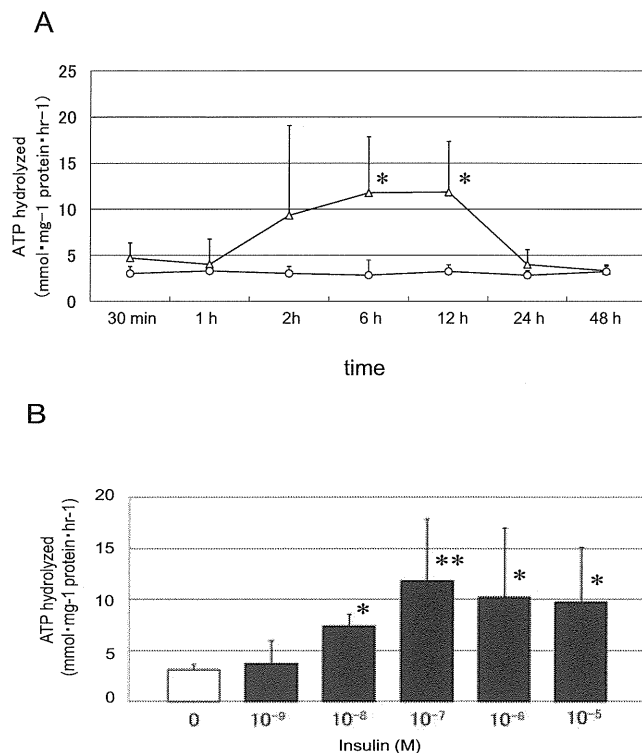
To determine whether insulin affects Na,K-ATPase activity in corneal endothelial cells, we exposed the cells to 0.1  $\mu$ M insulin for various times, and ouabain-sensitive ATP hydrolysis was measured. Insulin had a transient, stimulatory effect on Na,K-ATPase activity that was significant at 6 hours and 12 hours; after that, Na,K-ATPase activity returned to the baseline (Fig. 1A). The stimulatory effect of insulin on Na,K-ATPase activity was also concentration dependent and was apparent at 0.01 to 10  $\mu$ M (Fig. 1B).

### Effect of Insulin on Pump Function

We next examined whether insulin affects the pump function of corneal endothelial cells. Tracings of short-circuit current obtained with a Ussing chamber revealed that insulin at 0.1  $\mu$ M increased the ouabain-sensitive pump function of the cells compared with that observed for control cells (Fig. 2A). This effect of insulin was statistically significant at 6 hours, similar to the results obtained from Na,K-ATPase activity measurements (Fig. 2B). The stimulatory effect of insulin on pump function was concentration dependent and was apparent at 0.01 to 10  $\mu$ M (Fig. 2C).

### Activation of PKC by Insulin in Corneal Endothelial Cells

To examine whether insulin activates PKC in cultured mouse corneal endothelial cells, we measured PKC activity in cell extracts after treatment of the cells with various concentrations of insulin for 30 minutes. Insulin indeed increased PKC activity in a concentration-dependent manner; this effect was significant at concentrations of 0.1 to 10  $\mu$ M (Fig. 3).



**FIGURE 1.** Effect of insulin on Na,K-ATPase activity in cultured mouse corneal endothelial cells. (A) Cells were incubated in the absence (open circles) or presence (open triangles) of 0.1  $\mu$ M insulin for the indicated times and then assayed for Na,K-ATPase activity. Data are mean  $\pm$  SD of values of four replicates from a representative experiment. \**P* < 0.05 compared with the corresponding value for cells incubated without insulin (Student's *t*-test). (B) Cells were incubated with the indicated concentrations of insulin for 6 hours and then assayed for Na,K-ATPase activity. Data are mean  $\pm$  SD of values of four replicates from four representative experiments. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 for the indicated comparisons (Student's *t*-test).

### Effect of Insulin on Na,K-ATPase $\alpha_1$ -Subunit Phosphorylation

To determine whether insulin affects Na,K-ATPase expression in corneal endothelial cells, we exposed the cells to 0.1  $\mu$ M insulin for 6 hours and then measured expression of the total Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit and the phospho-Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit by Western blot analysis (Fig. 4A). We used 0.1  $\mu$ M phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu), which is an established specific and strong activator for PKC and immediately phosphorylates Ser18 of Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit, for 30 minutes as a positive control to confirm that the phospho-Ser18 antibody works. The phosphorylation of Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit by PDBu was decreased at 6 hours. Ser18 phosphorylation triggers the endocytosis of the Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit and results in the inhibition of Na,K-ATPase activity.<sup>48,49</sup> Thus, the phospho-Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit is considered to be the inactive state of the Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit. Expression of the Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit and phospho-Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit were measured as the ratio of the signal intensity to  $\beta$ -actin. Although there were no statistically significant differences in the expression of total Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit (Fig. 4B), insulin significantly decreased the ratio of phospho-Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit expression to the total Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit (Fig. 4C). These results indicate that insulin decreases the ratio of the inactive state (i.e., increases the ratio of the active state of the Na,K-ATPase  $\alpha_1$ -subunit). In the presence of staurosporine and GF109203X, an established PKC inhibitor, and okadaic acid, an