

## 第 106 回 日本眼科学会総会 特別講演 II

## 角膜疾患の病態と治療

金井 淳

順天堂大学医学部眼科学教室

## 共同研究者

中安 清夫, 村上 晶, 藤木 慶子, 横山 利幸, 太田 俊彦, 海老原伸行, 河野 博之  
 北川 均, 太田 里佳, 高橋 康造, 早津 宏夫, 橘 信彦, 藤巻 拓郎, Ha NT, 魯 文男  
 舟木 俊成, 渡部 保男, 武田美佐子, 山口 達夫, 上杉 祐子, 糸井 素純, 土屋 桜  
 細田 裕治, 矢島 照紘, 飯田 伸子, 武井 歩(順天堂大学医学部眼科学教室)  
 猪狩 淳, 山田 俊幸(順天堂大学医学部臨床病理学教室)  
 末吉 徳芳, 中村 眞二, 古旗 淳(順天堂大学医学部共同病理研究室)  
 Thanh TK, Chau HM, Cung LX(ベトナム国ハノイ国立眼科研究所)  
 澤 充, 崎元 卓, 伏見 典子(日本大学医学部眼科学教室)  
 三宅 養三, 平野 耕治(名古屋大学医学部眼科学教室), 沖坂 重邦(防衛医科大学校眼科学教室)  
 堀田 喜裕(浜松医科大学眼科学教室), 石田 誠夫(石田眼科), 古川 明博(古川眼科)

## 要 約

21 世紀の角膜疾患による失明は予防や治療が困難な疾患の相対的増加が予想されるため, これら疾患の病態, 予防, 治療に関する研究が重要となる。そこで, 円錐角膜と角膜ジストロフィの 2 疾患を取り上げ, 分子生物学的および分子遺伝学的な手法を用いて病態解明を検討した。角膜疾患の復明には角膜移植が行われるが, 提供角膜の内皮細胞の状態が透明性維持に重要な鍵となる。角膜内皮細胞の機能や細胞周期機構を遺伝子レベルで調べ, さらに保存中に提供角膜内皮細胞に遺伝子を導入することで, 一時的に増殖能を惹起させることを検討した。

1. 円錐角膜: 都内 23 区内の 141 施設に円錐角膜患者についてアンケート調査を行った。本症の発症頻度 10 万人に対して男性 12.4 人, 女性 6.7 人と推定し, その男女比は 1.7:1 であった。17 年前の報告に比べて男性患者の比率は減少した。Descemet 膜破裂は男性に有意に多く発症していた。成因: 角膜の菲薄化の成因について DNA マイクロアレイ法でアポトーシス関連 RNA の発現の差を正常角膜と円錐角膜由来の培養実質細胞で調べた。円錐角膜由来の cDNA が正常角膜より強く発現した遺伝子は tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP 6) で, 逆に insulin growth factor binding protein 5 (IGFBP 5) は弱い発現を示した。

2. 角膜ジストロフィ: Transforming growth fac-

tor beta-induced (TGFBI) 遺伝子, membrane component 1 surface marker 1 (M1S1) 遺伝子, carbohydrate sulfotransferase gene 6 (CHST 6) 遺伝子, collagen type VIII alpha-2 (COL 8 A 2) 遺伝子の 4 つの原因遺伝子に関連した角膜ジストロフィについて日本人 208 家系とベトナム人 42 家系について遺伝子解析を行い, 両国間での変異の頻度の差や臨床像の違いについて検討した。日本人では約 8 割が TGFBI 遺伝子の変異で, その 7 割が Avellino 角膜ジストロフィであった。一方, ベトナム人では TGFBI 遺伝子変異である格子状角膜ジストロフィ (遺伝子の変異型は His 626 Arg) と CHST 6 遺伝子の変異であり, 両国間での変異の頻度の差がみられた。さらに, ベトナム人の 1 家系で TGFBI 遺伝子で Asp 123 His の変異がある新しいタイプを見出した。

3. 角膜内皮細胞: 1) 遺伝子発現: 家兎角膜内皮 cDNA ライブラリーから得られたクローンの塩基配列および相同性検索から VIII 型コラーゲン  $\alpha 1$  遺伝子を含む発現頻度の高い 45 種の遺伝子が選択された。2) 遺伝子導入: ヒトの角膜内皮細胞は生体で増殖しない原因の一つに房水中の transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) が考えられる。そのシグナルをブロックする Smad 7 遺伝子を内皮細胞に導入することで房水存在下での内皮細胞を増殖させることができた。ベクターの使用に際してアデノウイルスの他に非ウイルス性ベクター

別刷請求先: 113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学医学部眼科学教室 金井 淳

(平成 14 年 8 月 15 日受付, 平成 14 年 10 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Atsushi Kanai, M. D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo. 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku Tokyo 113-8421, Japan

(Received August 15, 2002 and accepted in revised form October 11, 2002)

を用いた遺伝子導入の可能性が推定された。(日眼会誌 106 : 757-777, 2002)

キーワード : 円錐角膜, 角膜ジストロフィ, 原因遺伝子, 角膜内皮, 遺伝子導入

## A Review

# The Pathogenesis and Treatment of Corneal Disorders

Atsushi Kanai

*Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo*

### Abstract

In this 21st century, it is predicted that blindness caused by corneal disorders which are difficult to prevent or treat will increase. It is important to study the pathogenesis, prevention, and treatment of these corneal disorders. Two corneal disorders, keratoconus and corneal dystrophy, were investigated to elucidate the pathogenesis by using molecular biological or molecular genetic techniques. Corneal transplantation is performed to restore vision of patients with corneal disorders, but the condition of the donor corneal endothelium is the key to maintaining transparency of the grafted cornea. We investigated the function or cell cycle mechanism of corneal endothelium at the level of the gene, and we also studied induced genes of endothelial cells during preservation of donor corneas.

1. *Keratoconus* : We searched for keratoconus patients with questionnaires sent to 141 hospitals in the 23 Wards of Tokyo. The incidence of patients was estimated to be  $12.4 \times 10^{-5}$  for males and  $6.7 \times 10^{-5}$  for females. The male/female ratio was 1.7 : 1.0. The number of male patients was low when compared with studies reported 17 years ago. Rupture of Descemet's membrane in males was significantly higher than in females. Genesis of incidence : Apoptosis-related gene expression in thinning of the cornea was analyzed with cDNA microarrays, using mRNA isolated from cultured keratocytes of normal human corneas and keratoconus corneas. The expression of tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP 6) was more enhanced, while insulin growth factor binding protein 5 (IGFBP 5) was less expressed in keratoconus patients.

2. *Corneal dystrophy* : In corneal dystrophy related to four candidate genes such as transforming growth factor beta-induced (TGFBI) gene, membrane component 1 surface maker 1 (M1S1) gene,

carbohydrate sulfotransferase gene 6 (CHST 6), and collagen type VIII alpha-2 (COL 8 A 2) gene, 208 Japanese and 42 Vietnamese families were analyzed for the gene mutation and studied for the frequency of gene mutation and differences of clinical features. About 80% of Japanese with corneal dystrophies had mutation of the TGFBI gene and about 70% of them had Avellino corneal dystrophy. However, in Vietnamese patients, mutations were found in both the TGFBI gene (lattice corneal dystrophy ; the phenotype gene was His 626 Arg) and in the CHST gene. The difference in frequency in gene mutations was significant between the two nationalities. Moreover, a novel corneal dystrophy associated with Asp 123 His mutation in TGFBI gene was found in one Vietnamese family.

3. *Corneal endothelial cell* : 1) gene expression : We performed random sequence and homology research analysis of 1,000 clones from a rabbit corneal endothelial cDNA library. Forty-five genes, including collagen type VIII alpha-1, were listed for the frequently observed cDNA in the library. 2) gene transfection : One of the causes of a growth-arrested state in human corneal endothelium was thought to be the presence of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) in aqueous humor. The transfection of Smad 7 gene, which blocks the signal, showed proliferation of the endothelial cells in the presence of aqueous humor. This suggests that there may be a possible practical application for using gene transfection with a non-viral DNA vector or with an adenovirus vector. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 757-777, 2002)

Key words : Keratoconus, Corneal dystrophy, Gene mutation, Corneal endothelium, Gene transfection

## I 緒 言

角膜組織は ocular surface の一部を構成するとともに、眼球の光学系の重要な要素の一つでもある。我が国での角膜疾患による失明は、1898 年の宮城県全体の調査によると、膿漏性結膜炎(風眼)、無力性角膜炎(疳眼)が失明原因の 3/5 を占めていた<sup>1)</sup>。20 世紀初頭までの失明の三大原因として、膿漏眼、角結膜乾燥症、トラコーマが挙げられ、すべて ocular surface の疾患であった。中島<sup>2)</sup>は過去の文献から日本人の一般集団の失明原因の推移について、感染症や栄養障害に起因する疾患が減少し、先天要因や遺伝性要因による疾患が増加していることを報告している。視覚障害者数を施設入所者から角膜疾患患者による失明頻度の推移をみると、1986 年 5.4%、1991 年 4.4%、1996 年 3.6% と 10 年間で約 2.0% も減少している<sup>3)4)</sup>。失明予防の立場から、21 世紀は予防も治療も不可能な眼疾患の病因、予防、治療に関する研究や対策が重要となってくる。

## II 円錐角膜

円錐角膜は角膜中央部の突出、菲薄化が成長期にみられる非炎症性の疾患で、強い近視と角膜の不正乱視を生じる。本症はそれ単独で発症する以外に、アトピー性皮膚炎、喘息、春季カタルなどのアレルギー性疾患<sup>5)6)</sup>や、稀ではあるが、Down 症候群<sup>7)</sup>、Ehlers-Danlos 症候群<sup>8)</sup>、レーベル先天盲<sup>9)</sup>などの合併や他の角膜疾患<sup>10)</sup>との合併も報告されているが、その発症原因については未だ明らかではない。

### 1. 発症頻度

疾患の一般集団中の発症頻度を知ることは、医療の需要量や予防対策を立てる上で重要なことである。Rabinowitz<sup>11)</sup>は円錐角膜患者の発症頻度は 10 万人に対して 50~230 人と、かなり幅をもって報告している。我が国での円錐角膜患者の発症頻度は著者ら<sup>12)</sup>が 1982 年と 1983 年の 2 回、全国大学病院での 1 年間の本症受診者数の調査と、1962 年から 1984 年までの順天堂大学での本症新患者数を基に発症頻度を推定したところ、10 万人に対して男性 15.4 人(1/6,494)、女性 5.7 人(1/17,544)であった。近年、本症診断の有力な検査法の一つである角膜形状解析装置の普及により本症の早期診断も可能と考え、2000 年に順天堂大学を含む東京都 23 区内の 140 か所の病院施設と、コンタクトレンズを中心に診療を行っている一診療所を対象にアンケート調査を行った。調査期間は 3 か月であった。順天堂大学を受診した患者数は男性 70 人、女性 49 人、他の施設からは男性 135 人、女性 71 人で合計、男性 205 人、女性 120 人であった(表 1)。男女比は 1.7:1 であった。この調査で受診者が多かった 15~44 歳の年齢群を用いて受診率を求め補正を行った結果、3 か月間の受診者数は男性 227 人、女性

表 1 円錐角膜受診者数と都内年齢区分別人口

| 年齢    | 男性   |                 | 女性   |                 |
|-------|------|-----------------|------|-----------------|
|       | 受診者数 | 東京都<br>23 区内人口* | 受診者数 | 東京都<br>23 区内人口* |
| 10~14 | 1    | 158,303         | 0    | 151,785         |
| 15~19 | 11   | 191,201         | 7    | 183,560         |
| 20~24 | 33   | 315,292         | 15   | 296,226         |
| 25~29 | 50   | 402,600         | 20   | 375,167         |
| 30~34 | 27   | 364,934         | 14   | 327,426         |
| 35~39 | 32   | 298,212         | 20   | 268,784         |
| 40~44 | 24   | 249,284         | 12   | 230,768         |
| 45~49 | 14   | 275,957         | 8    | 256,914         |
| 50~54 | 7    | 318,573         | 8    | 306,568         |
| 55~59 | 3    | 283,367         | 4    | 291,012         |
| 60~64 | 1    | 235,548         | 3    | 260,311         |
| 65~69 | 2    | 199,964         | 5    | 234,734         |
| 70~74 | 0    | 147,476         | 3    | 193,076         |
| 75~79 | 0    | 89,388          | 0    | 145,280         |
| 80~84 | 0    | 52,127          | 1    | 95,086          |
| 合計    | 205  | 3,582,235       | 120  | 3,616,697       |

\*：東京都総務局統計部人口動態統計(1999 年 1 月現在)

113 人であった。2000 年の本症の発症頻度は 10 万人に対して男性 12.4 人(1/8,100)、女性 6.7 人(1/15,000)と推定した<sup>13)</sup>。前回の調査は全国で、今回は都内 23 区であったため直接比較することは問題があるかもしれないが、この 17 年間に本症の発症に男性が減少し、わずかながら女性の増加傾向がみられた。

円錐角膜は人種的に発症の差はないとされているが<sup>14)</sup>、Pearson ら<sup>15)</sup>は 10 万人の調査から人種的に白人系で 10 万人に対して 4.5 人、アジア系では 19.6 人と報告しており、著者の結果からも本症の発症は白人より高いことがうかがわれた。

### 2. 男女比

Barth<sup>16)</sup>の 300 例と Amsler<sup>17)</sup>の 600 例をまとめて受診患者を年代別に分けて男女比を調べてみると、1931~1953 年までは女性が多く、1957 年からは男性が多くなっていた。順天堂大学に 1961~2000 年 12 月末までに受診した 4,400 人の円錐角膜新患者を生年別に分けて男女比をみた。10~49 歳までの一般集団中の年代区分別の男女人口比率を用いて補正を行い、本症患者の生年別に男女比を比較すると、1920~1929 年生まれでは 0.9:1 と女性が男性よりも多く受診していたが、1930~1939 年生まれでは 1.2:1 とその比は逆転し、1970 年生まれになると 2.9:1 と男性の受診率が最も多くみられた。1980~1989 年生まれをみると、2.3:1 と男性の比率が低くなる傾向がみられた(表 2、図 1)。最近の多数例の報告では、Lass ら<sup>18)</sup>が本症の 65%、Tuft ら<sup>19)</sup>の 66%、Zadnik ら<sup>20)</sup>の 69% と男性に多く発症がみられている。本症の発症が男女間で年代の移行とともに変化がみられたことは大変興味あることである。他の眼疾患では年代の移行で男女間での発症の差はみられず、円錐角

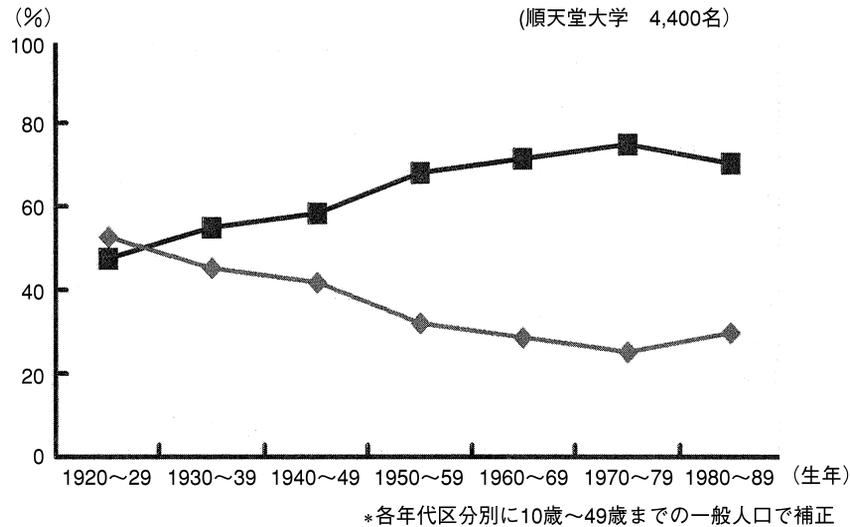


図 1 円錐角膜患者の出生年別比率。

10～49 歳までの一般集団中の年代区分別の人口比率を用いて補正を行い、円錐角膜患者の生年別に男女比を比較すると出生年 1920 年～1939 年の間で男女比が逆転し、以後男性の比率が増加し、1980 年から女性の比率の増加傾向がみられる。■：男性\*、◆：女性\*

表 2 順天堂大学円錐角膜新患者受診状況(生年別・男女別)

| 生年      | 男    | 女    | 合計   | 男女比     |
|---------|------|------|------|---------|
| 1900～09 | 0    | 1    | 1    |         |
| 1910～19 | 4    | 6    | 10   |         |
| 1920～29 | 19   | 22   | 41   | 0.9 : 1 |
| 1930～39 | 83   | 70   | 153  | 1.2 : 1 |
| 1940～49 | 355  | 240  | 595  | 1.5 : 1 |
| 1950～59 | 869  | 394  | 1263 | 2.2 : 1 |
| 1960～69 | 916  | 357  | 1273 | 2.6 : 1 |
| 1970～79 | 687  | 237  | 924  | 2.9 : 1 |
| 1980～89 | 97   | 42   | 139  | 2.3 : 1 |
| 1990～99 | 1    | 0    | 1    |         |
| 合計      | 3031 | 1369 | 4400 | 2.2 : 1 |

膜の発症が環境の変化や性ホルモンなどの種々の因子が関与しているのではないかと考えられるが、今後のさらなる研究が必要である。

### 3. Descemet 膜破裂

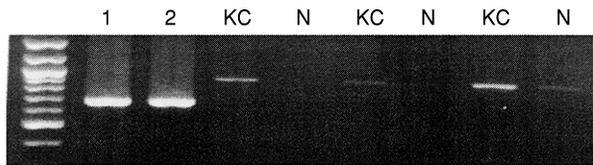
円錐角膜は角膜の菲薄化が進むと、時には Descemet 膜の破裂を起こし角膜実質の浮腫混濁を生じるが、1 か月後には角膜後面膜を形成、瘢痕化され角膜も扁平化される。順天堂大学の症例 4,400 人中 207 人(4.7%)に Descemet 膜の破裂が経過観察中にみられた。男女別でみると、男性は 3,031 人中 164 人(5.4%)、女性は 1,369 人中 43 人(3.1%)と男性の方に Descemet 膜破裂症例が有意に多くみられ、都内 23 区の調査<sup>13)</sup>でも男性 9.6%、女性 1.9%と男性に多く発症していた。諸外国での報告では、Amsler ら<sup>17)</sup>は 600 例中 2.6%、Tuft ら<sup>19)</sup>は 2,723 名中 2.7%と日本人より Descemet 膜の破裂を生じる症例が少ない。この理由として、進行した症例に対して外

国の方が早期に角膜移植が施行されるためか、あるいは日本人の方が重症化しやすいためではないかと思われる。

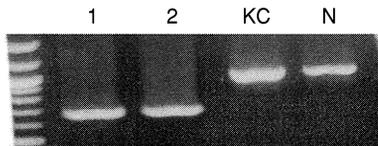
### 4. 発症 成 因

円錐角膜の発症原因については未だ明確にされていない。遺伝的研究からは、Ihalainen<sup>21)</sup>は北フィンランドで家族性円錐角膜の発症が高頻度でみられ、常染色体優性遺伝を推定している。一方、Waardenburg ら<sup>22)</sup>は常染色体劣性遺伝を推定している。一卵性双生児での本症発症から、環境的因子より遺伝的因子を支持する報告もみられている。我が国では田辺ら<sup>23)</sup>が多因子遺伝を推定している。本症は他の遺伝性全身の疾患や他の疾患との合併も知られており、特にアトピーとの合併に関する報告<sup>24)25)</sup>が多数みられる。Rahi ら<sup>26)</sup>はアトピーとの合併は対照 12% に比べて円錐角膜では 35% の合併がみられ、血清 IgE、IgG、IgM の上昇をみ、森本ら<sup>25)</sup>もアトピー性疾患の既往のある本症では IgE が高値を示していることを報告している。

円錐角膜が菲薄化する成因についても種々の仮説が立てられている。その一つには電子顕微鏡的観察から Teng<sup>27)</sup>は上皮基底膜の変性の関与を指摘し、さらに、Pouliquen<sup>28)</sup>はボウマン膜に電子密度の高い物質をみ、この変化がボウマン膜の断裂を生じる初期変化であるとしている。さらに、実質膠原線維の薄葉数の減少や薄葉の厚さの減少、単位面積当たりの膠原線維数の減少が角膜の菲薄化や角膜の脆弱化、突出につながるのではないかと報告している。高橋ら<sup>29)</sup>も角膜移植の際に得られた 13 眼の円錐角膜について調べ、単位面積内の実質細胞数は減少し、薄葉総数は有意に正常角膜に比べて薄くなっていることを報告している。円錐角膜に限らず角膜実



1 : KC/GAPDH ; 2 : N/GAPDH  
 KC : 円錐角膜由来実質細胞, 62 y.♂M)/TNFAIP6  
 N : 正常角膜由来実質細胞, 94 y.♂M)/TNFAIP6  
 GAPDH : glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase

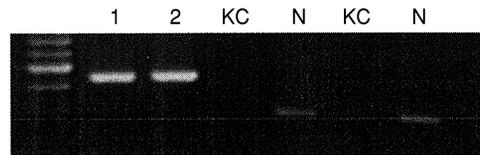


1 : KC/GAPDH ; 2 : N/GAPDH  
 KC : 円錐角膜由来実質細胞, 30 y.♂M)/TNFAIP6  
 N : 正常角膜由来実質細胞, 74 y.♂M)/TNFAIP6  
 GAPDH : glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase

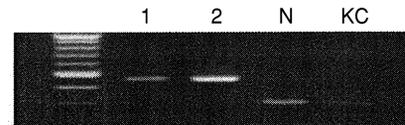
図 2 Tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6) の reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) で TNFAIP 6 は円錐角膜実質細胞で正常角膜より強く発現している。

質が菲薄化する場合、慢性的な上皮障害を伴うことが知られている。Wilson ら<sup>30)</sup>はボウマン膜の断裂のみられた円錐角膜では断裂下の実質前層にアポトーシスの存在をみ、さらに Kim ら<sup>31)</sup>は TUNEL 法を用いて円錐角膜の実質細胞において正常眼や角膜ジストロフィの実質細胞に比べて有意にアポトーシスの増加をみたことから、円錐角膜の実質細胞のアポトーシスが角膜菲薄化に関与していることを推測している。円錐角膜の実質細胞のアポトーシスが角膜の菲薄化に関与しているかどうかについて、マイクロアレイ技術を用いてヒト正常角膜と円錐角膜由来の実質細胞についてそれぞれのアポトーシス関連遺伝子 RNA 発現の差を検索し、本症の成因に実質細胞のアポトーシスが関与しているかどうかについて検討した。剖検の際に得られた正常眼と円錐角膜の中央部から得られた第二代培養実質細胞を用い、それぞれの実質細胞から RNA を抽出した後、さらに Poly A(+)RNA を精製し本実験に供した。蛍光色素 Cy 3 または Cy 5 で上記 2 種の細胞の cDNA を標識し DNA マイクロアレイ法を用いて、両細胞の発現 RNA の差を検討した。DNA チップは 164 のアポトーシス関連遺伝子を乗せた Human apoptosis chip version 1.1 (IntelliGene, Takara 社) を用いてチップ上で競合ハイブリダイゼーションを行い、合計 4 回実験を繰り返した。アレイ上の蛍光シグナルはサンプルを変えてマイクロアレイレーザースキャナー (Affymetrix 418, Takara Shuzo 社) を用いて検出した。

円錐角膜由来の cDNA が正常角膜由来のものに比べ、より発現の増加を示したものは tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6), P 450 (Cyto-



1 : KC/GAPDH ; 2 : N/GAPDH  
 KC : 円錐角膜由来実質細胞, 62 y.♂M)/IGFBP6  
 N : 正常角膜由来実質細胞, 94 y.♂M)/IGFBP6  
 GAPDH : glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase



1 : N/GAPDH ; 2 : KC/GAPDH  
 N : 正常角膜由来実質細胞, 74 y.♂M)/IGFBP5  
 KC : 円錐角膜由来実質細胞, 30 y.♂M)/IGFBP5  
 GAPDH : glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase

図 3 Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP 5) の RT-PCR で IGFBP 5 は円錐角膜実質細胞で正常角膜より弱く発現している。

chrome) oxidoreductase, tumor protein p 53-binding protein 2, mitogen-activated protein kinase 3, LPS-induced TNF-alpha factor で、特に TNFAIP6 は正常角膜に比べて 3 倍以上の強い発現を示した。一方、正常角膜から発現の低下を示したものは human insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) と insulin-like growth factor binding protein 2 (somatomedin A), insulin-like growth factor binding protein 3, syndecan で、特に IGFBP 5 および syndecan が強く発現の低下を示していた。さらに、円錐角膜由来の実質細胞に発現量の多かった TNFAIP6 について、正常角膜および円錐角膜の各実質細胞を材料として reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) および real time PCR を施行した。円錐角膜実質細胞で TNFAIP6 の発現が強くみられ (図 2), real time PCR では円錐角膜は正常角膜に比べて約 3.3 倍量の TNFAIP6 の発現がみられた。また、IGFBP5 についても RT-PCR (図 3) および real time PCR を試みたが、DNA チップの結果同様、円錐角膜でその発現量が約 1/14 に減少していた。

### III 角膜ジストロフィ

近年の分子遺伝学の進歩には著しいものがあり、眼科領域においても多数の遺伝性眼疾患の原因遺伝子が同定されてきた。角膜ジストロフィでも 1996 年連鎖解析が Stone ら<sup>32)</sup>によって初めて報告され、Reis-Bücklers 角膜ジストロフィ、Avellino 角膜ジストロフィ、顆粒状角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィの 4 つの角膜ジストロフィが 5 番染色体長腕 (5q31) に位置することが明らかとなった。さらに、1997 年には Munier ら<sup>33)</sup>により、いずれも kerato-epithelin をコードする trans-

表 3 原因遺伝子解析を行った日本人  
角膜ジストロフィ(1961年~2001年  
12月)

| 疾患名      | 家系数 | 患者数 | 正常家族 | 計   |
|----------|-----|-----|------|-----|
| 輪状       | 7   | 10  | 1    | 11  |
| Avellino | 116 | 130 | 8    | 138 |
| 顆粒状      | 6   | 8   | 4    | 12  |
| 格子状      | 42  | 59  | 18   | 77  |
| 膠様滴状     | 14  | 20  | 21   | 41  |
| 斑状       | 13  | 14  | 6    | 20  |
| Fuchs    | 7   | 8   | 0    | 8   |
| 後部多形性    | 3   | 3   | 0    | 3   |
| 合計       | 208 | 252 | 58   | 310 |

forming growth factor beta-induced gene (*TGFBI*) 遺伝子の異常により生じることが明らかになった。このように変異の解析によって疾患の診断をはじめ疾患発症の分子機構の解明、さらに、将来の治療・予防への研究につながる突破口を開くことができた。角膜ジストロフィ症例は順天堂大学をはじめ、その関連病院、日本大学、名古屋大学の協力を得て 208 家系 310 人についてインフォームド・コンセントを得た上で採血し摂取したゲノム DNA の解析を行った(表 3)。さらに、ベトナムハノイの国立眼科研究所との共同研究によって 1986 年から同研究所を受診していたベトナム人の角膜ジストロフィ 42 家系 127 人について共同で臨床診断を行い、インフォームド・コンセントを得た上で、末梢血から摂取した DNA をベトナム保健省と順天堂大学倫理委員会の許可のもと順天堂大学で解析を行った(表 4)。今回観察した症例は、ハノイ市を中心にその郊外に住んでいる北ベトナム地区の症例で、南ベトナム地区からの症例は 1 家系のみであった。4 つの原因遺伝子に関連した角膜ジストロフィについて解析し、さらに両国の人種の違いによる各疾患の変異の違いや臨床像の特徴について検討を加えた。

### 1. *TGFBI* 遺伝子

#### 1) Avellino 角膜ジストロフィと顆粒状角膜ジストロフィ

臨床的に顆粒状角膜ジストロフィと診断されていたものが、今日では *TGFBI* 遺伝子の Arg 124 His 変異による Avellino 角膜ジストロフィと Arg 555 Trp の変異による顆粒状角膜ジストロフィとに分けられている。Avellino 角膜ジストロフィは、これまで我が国では顆粒状角膜ジストロフィと診断されていたもので、臨床的には角膜上皮から発症し、実質中層まで境界鮮明な灰白色調の輪状あるいは顆粒状の混濁を呈し、時には刺状、樹枝状の混濁を呈している。一方、顆粒状角膜ジストロフィは我が国では非定型的なタイプとしていわれていたもので、角膜上皮下の混濁は小さい薄い顆粒状の混濁を呈している。順天堂大学の症例で遺伝子解析の結果、Avel-

表 4 原因遺伝子解析を行ったベトナム人角膜ジストロフィ

| 疾患名      | 家系数 | 患者数 | 正常家族 | 計   |
|----------|-----|-----|------|-----|
| 輪状       | 0   | 0   | 0    | 0   |
| Avellino | 2   | 5   | 14   | 19  |
| 顆粒状      | 6   | 16  | 0    | 16  |
| 格子状      | 12  | 34  | 7    | 41  |
| 膠様滴状     | 4   | 4   | 1    | 5   |
| 斑状       | 18  | 33  | 13   | 46  |
| 合計       | 42  | 92  | 35   | 127 |

lino 角膜ジストロフィ 116 家系、顆粒状角膜ジストロフィ 6 家系と 95% が Avellino 角膜ジストロフィであった。ベトナムでは 8 家系中 1 家系が Avellino 角膜ジストロフィで、6 家系(75.0%)が顆粒状角膜ジストロフィであった。Avellino 角膜ジストロフィの家系では発端者である 31 歳の母親と 2 人の子供とを観察することができた。7 歳と 11 歳の 2 人の子供の角膜の上皮下にはすでに白色調の細かい顆粒状の混濁が密に両眼で相同性にみられ、遺伝子解析では Arg 124 His の変異をホモ接合体で持っており、我が国での報告例<sup>34)35)</sup>と同様な臨床所見を呈していた(図 4)。さらに、ベトナム家系で Avellino 角膜ジストロフィと臨床診断した 1 家系の遺伝子解析で Asp 123 His の変異が見出された。この発端者の症例は 42 歳の女性で、両眼角膜の実質前から中層に小さい白色の点状混濁が散在していた(図 5)。本症例(発端者)の母親、5 人の兄弟・姉妹中 3 人と、発端者の子供の 1 名について細隙灯顕微鏡学的観察と DNA 解析を行ったところ、母親と 1 人の兄、20 歳の子供に Asp 123 His の変異がみられたが、角膜には何ら異常所見がみられなかった(図 6)。また、ベトナム人正常者 50 人についての遺伝子解析や他の角膜ジストロフィ患者の遺伝子解析でも Asp 123 His 変異はなかった。さらに、我々の今回の日本人家系での患者および 50 人の正常者の解析でもこの変異は見出されていない。このことから、この症例は浸透率の低い late onset の新しいタイプの角膜ジストロフィではないかと推測している。著者らはハノイ型角膜ジストロフィと提唱したい。以前、Ha ら<sup>36)</sup>は膠様滴状角膜ジストロフィの家系で、発端者とその父親と発端者の 2 人の子供に *TGFBI* 遺伝子の Pro 501 Thr の変異を持った症例を経験した。*TGFBI* 遺伝子の Pro 501 Thr の変異は格子状角膜ジストロフィの IIIA 型として報告されているが、本家系の父親(85 歳)と発端者の 2 人の子供とも角膜には何ら異常所見をみなかったことから、Pro 501 Thr の変異は浸透率の低い格子状角膜ジストロフィであると報告している。今回のベトナム人にみられた *TGFBI* 遺伝子の Asp 123 His の変異を持つハノイ型角膜ジストロフィも浸透率の低い角膜ジストロフィであると考えられる。

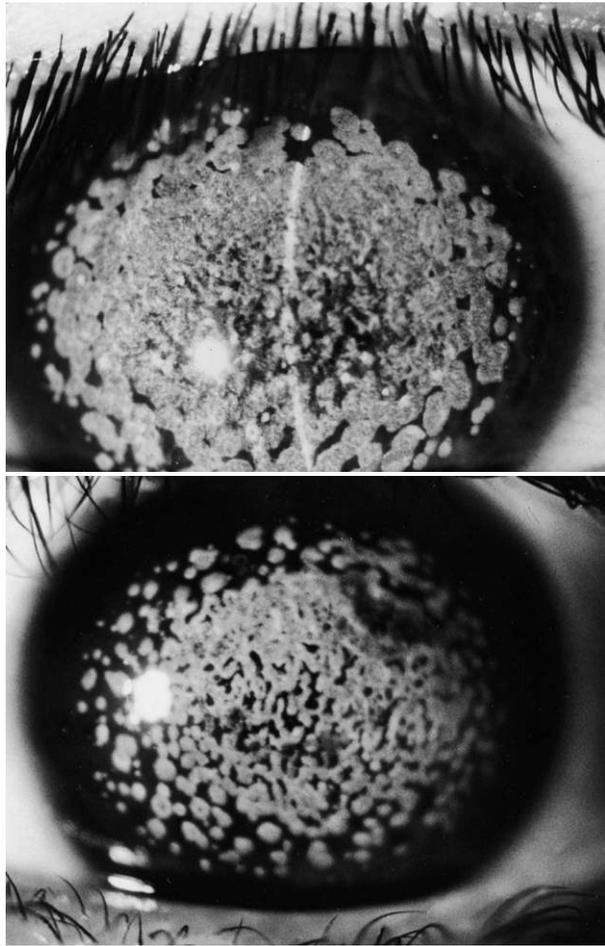


図 4 Avellino 角膜ジストロフィ。  
TGFBI 遺伝子, Arg 124 His 変異のホモ接合体。  
上図：日本人(14 歳), 下図：ベトナム人(7 歳)で上皮下  
に白色の顆粒状混濁が密に存在し, 一部融合している。

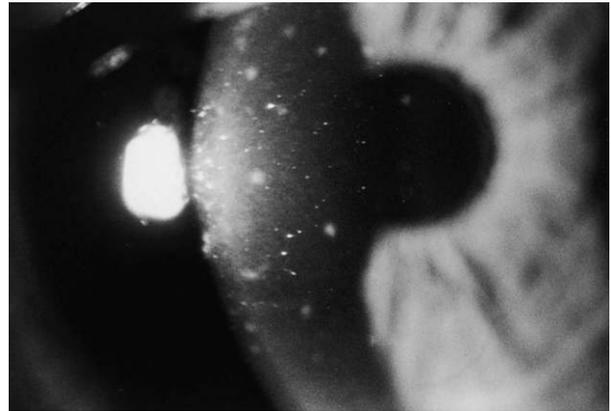


図 5 ハノイ型角膜ジストロフィ。  
両眼角膜実質前～中層にかけて白色の小斑点状の混濁が  
散在している。

遺伝子解析で軽度の円錐角膜を合併した *TGFBI* 遺伝子 Arg 555 Trp 変異を持つ顆粒状角膜ジストロフィと診断した日本人の 75 歳の女性の症例は, 両眼角膜は定型的な上皮下の薄い白色の顆粒状の混濁とともに実質深層から Descemet 膜付近にやや大きな不整形の強い白色混濁がみられた(図 7)。1979 年右眼<sup>37)</sup>, 2000 年左眼に全層角膜移植を施行した際に得られた両角膜組織について病理組織学的に検索した。両角膜組織とも上皮下と Descemet 膜前の実質深層の沈着部位でヘマトキシリン・エオジン染色でエオジンに染まり, Masson trichrome 染色で赤く染まったが, 1979 年に移植された右眼の角膜は Congo red 染色では薄くしか染まらなかった。しかし, 21 年経過後の 2000 年に移植された左眼の角膜では Congo red 染色では右眼に比べて強く染まり明らかに陽性を呈していたが, 右眼と同様に偏光顕微鏡下や

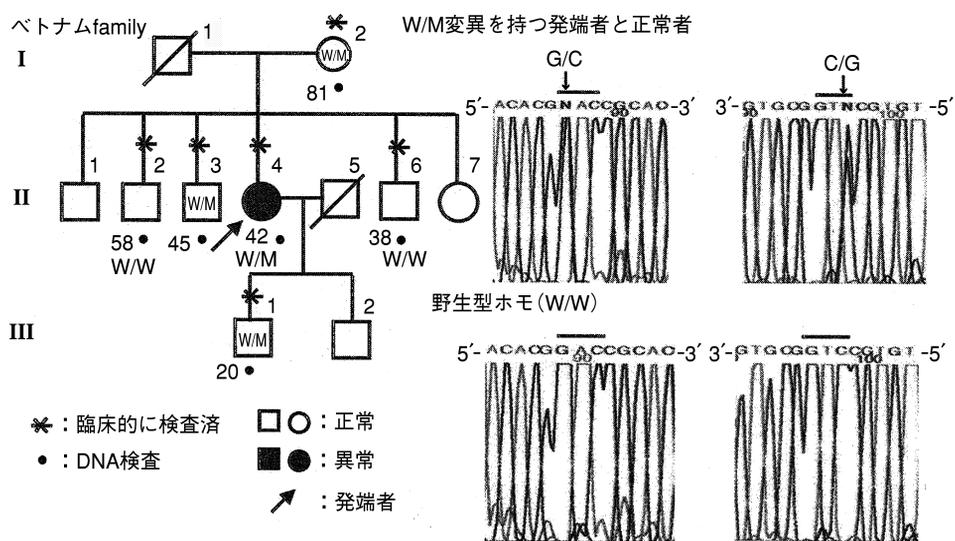


図 6 ハノイ型角膜ジストロフィの家系図とシーケンス。  
左, 家系図：I-2, II-3, II-4, II-6, III-1 は Asp 123 His(GAC → CAC) 変異のヘテロ接合体(W/M)。  
右, コドン 123 の周りのシーケンス。上段：変異型ヘテロ, 下段：正常野生型ホモ。左右はセンス側から  
とアンチセンス側からの結果を示す。

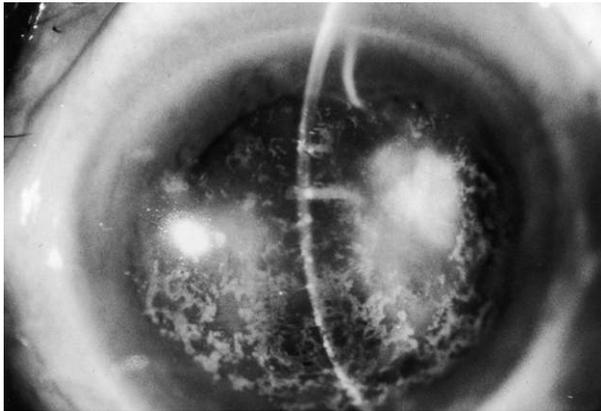


図 7 顆粒状角膜ジストロフィ (Arg 555 Trp).  
上皮下に薄い白色の細かい顆粒状の混濁とともに実質深層にも不正形の強い白色混濁が存在。

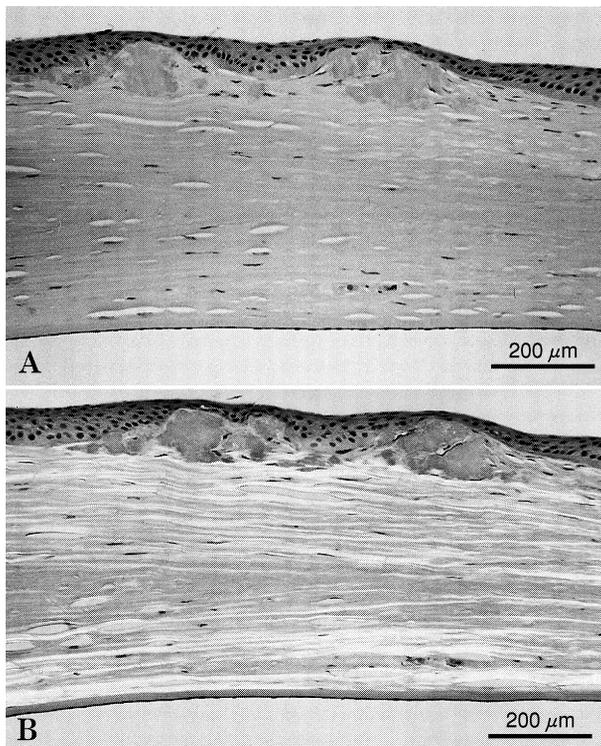


図 8 顆粒状角膜ジストロフィ.  
A: Congo red 染色, 上皮下と実質深層に陽性がみられる。  
B: 過マンガン酸カリウム処理後の Congo red 染色, 偏光顕微鏡での観察では黄緑色を呈していない。

過マンガン酸カリウム処理後の Congo red 染色での偏光顕微鏡下では黄緑色を呈していなかった(図8)。電子顕微鏡下での観察では上皮下と Descemet 膜前の沈着物質は電子密度の高い悍状構造物としてみられ, さらに Descemet 膜前の沈着部位にはアミロイド線維の集合物(図9)も観察された。

Avellino 角膜ジストロフィと顆粒状角膜ジストロフィとの鑑別は, 原因遺伝子の変異の違いと臨床像の他に

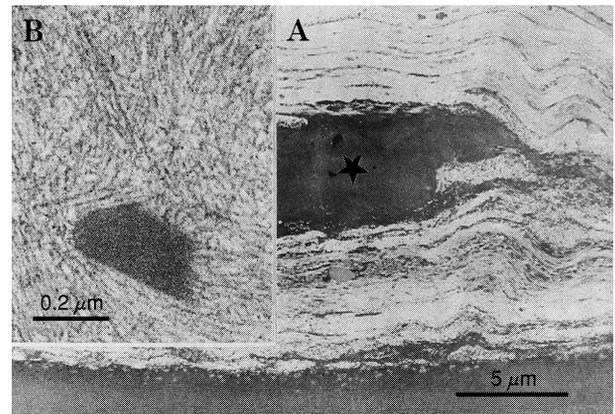


図 9 顆粒状角膜ジストロフィ.  
A: 実質深層の電子密度の高い沈着物質(星印)がみられる。  
B: 強拡大下での観察ではアミロイド線維がみられる。

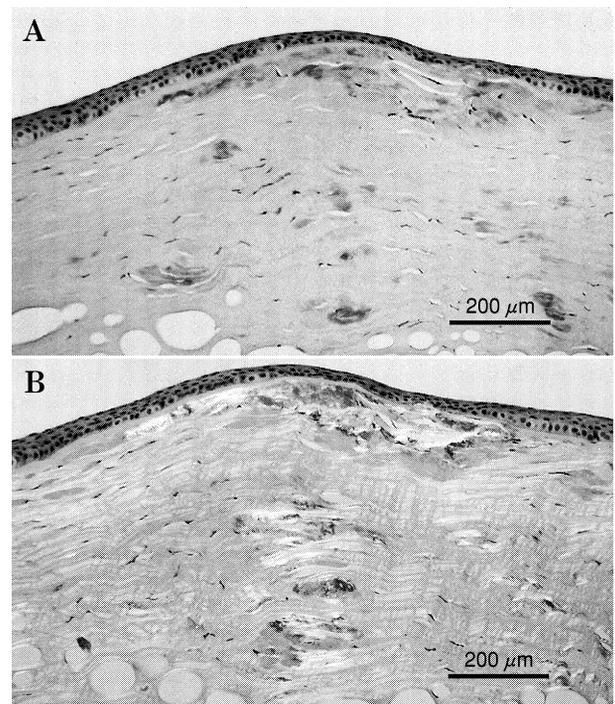


図 10 Avellino 角膜ジストロフィ.  
A: Congo red 染色, 上皮下および実質中に陽性がみられる。  
B: 過マンガン酸カリウム処理後の Congo red 染色, 偏光顕微鏡下で黄緑色を呈している。

病理組織化学的な染色性の違いとされている。両角膜ジストロフィとも Masson trichrome 染色に赤く染まり, Luxol fast blue 染色で青く染まるが, Congo red 染色で Avellino 角膜ジストロフィは陽性を示すが, Arg 555 Trp の変異を持った顆粒状角膜ジストロフィでは Congo red 染色は陰性であるとされている<sup>38)</sup>。著者らの行った遺伝子解析で, Arg 124 His の変異を持った Avellino 角膜ジストロフィ症例(65歳)の移植例では Congo red 染色で陽性を示し, 過マンガン酸カリウム処理後の

表 5 遺伝子解析出来た格子状角膜ジストロフィ

| タイプ  | 遺伝子変異        | 日本人家系<br>(患者数) | ベトナム人家系<br>(患者数) |
|------|--------------|----------------|------------------|
| I    | Arg 124 Cys  | 15(29 名)       | 3( 5 名)          |
|      | Leu 518 Pro  | 3( 5 名)        | 0                |
| IIIA | Pro 501 Thr  | 1( 1 名)        | 0                |
| IIIB | His 626 Arg  | 0              | 9(29 名)          |
| IV   | Leu 527 Arg* | 14(14 名)       | 0                |
|      | Asn 544 Ser  | 1( 1 名)        | 0                |

\* : Fujiki K, et al., Hum Genet 103 : 236-289, 1998.

表 6 我が国における各タイプ別格子状角膜ジストロフィの頻度

| タイプ  | 遺伝子変異       | 金井    | 真島他*  | 合計    |
|------|-------------|-------|-------|-------|
| I    | Arg 124 Cys | 15 家系 | 23 家系 | 38 家系 |
|      | Leu 518 Pro | 3     | 0     | 3     |
| IIIA | Pro 501 Thr | 1     | 10    | 11    |
| IV   | Leu 527 Arg | 14    | 1     | 15    |
|      | Asn 544 Ser | 1     | 1     | 2     |
| 合計   |             | 34    | 35    | 69    |

\* : Mashima Y, et al., Am J Ophthalmol 130 : 516-517, 2000.

Congo red 染色後の偏光顕微鏡下での観察でも黄緑色を呈していたが(図 10), 顆粒状角膜ジストロフィの症例(75 歳)では Congo red 染色で陽性をみたが, 過マンガン酸カリウム処理後の Congo red 染色後の偏光顕微鏡下での観察では黄緑色を呈さなかった. このことから, 両角膜ジストロフィでみられたアミロイド物質の主要構成蛋白は異なった蛋白に由来するものではないかと推定される. 顆粒状角膜ジストロフィの症例は高齢者であり, 加齢的变化も加わり二次的にアミロイド線維の沈着が生じてきたものと思われる.

2) 格子状角膜ジストロフィ

格子状角膜ジストロフィは, 1977 年著者らがアミロイド線維の分布や太さの違いによって 2 つのタイプに分類できることを報告<sup>39)</sup>したが, その後, 1987 年 Hida ら<sup>40)</sup>は全身性アミロイドーシスである Meretoja 症候群を加えた 3 つのタイプに分類し, 以後今日までこの分類が用いられている. 格子状角膜ジストロフィの I 型は常染色体優性遺伝形式を示し, 幼少期から再発性上皮びらんを繰り返し, 10 代後半から細かいアミロイド線維が瞳孔領実質から徐々に角膜輪部付近まで沈着してくる. 再発性上皮びらんは幼少期に比べて成人になると発作の回数も少なくなるが, 上皮下の混濁や瞳孔領部の角膜実質全体に薄いびまん性の混濁が加わってくる. III 型は弧発例で, 太いアミロイド線維が角膜中心から周辺部に向けて放射状に分布しているが, 角膜輪部にはアミロイド線維は存在しない. 1991 年 Stock ら<sup>41)</sup>は III 型に臨床像が類似し優性遺伝形式を呈するタイプを IIIA 型とし, その後, 我が国でこの IIIA 型の変異を持った症例が Yamamoto ら<sup>42)</sup>によって報告された.

今回解析した格子状角膜ジストロフィの変異は, 日本人ではタイプ I 型である Arg 124 Cys の変異を持った症例が 15 家系, I 型の亜型である Leu 518 Pro の変異を持った症例が 3 家系, 西日本に多いといわれた IIIA 型の Pro 501 Thr が 1 家系, Klintworth<sup>43)</sup> が IV 型と命名した Leu 527 Arg の変異を持った症例が 14 家系, IV 型の亜型の Asn 544 Ser の変異を持った症例が 1 家系であった. ベトナム人ではタイプ I 型の Arg 124 Cys 変異は 3 家系で, IIIA 型に類似した臨床像を示す His 626 Arg 変異が 8 家系にみられ, 2 国間でその変異の頻度に差が

みられた(表 5). 日本人は Arg 124 Cys と Leu 527 Arg の変異を持った症例が多くみられ, Mashima ら<sup>44)</sup>の報告でも Arg 124 Cys の変異を持った I 型の症例が最も多く, 次に Pro 501 Thr の変異を持った症例があったことから, 著者の報告を加えると格子状角膜ジストロフィと診断された症例のうち, I 型が半数以上を占めることになる(表 6). 以前, 教室の Fujiki ら<sup>45)</sup>が報告した Leu 527 Arg の変異を持った症例は, すべて弧発例で臨床像も IIIA 型とは明らかに異なる. すなわち, アミロイド沈着が実質中から深層にかけて角膜瞳孔領部で白色調の点状の集合体や点状の集合体に細く長い格子状のアミロイド線維が混じって存在していたり, 細かい線状のアミロイド線維の集合体が Descemet 膜前に分布しており(図 11), その角膜所見も多様であった. 一方, ベトナム人で格子状角膜ジストロフィと臨床診断した約 7 割が日本で報告のない優性遺伝を呈す His 626 Arg の変異を持った症例であった. これらの症例は 30 代で既に角膜実質内に I 型より太く長い IIIA 型に似たアミロイド線維が角膜輪部付近まで分布し(図 12), 多くの症例で再発性上皮びらんの既往はなく, 上皮下や実質中の混濁はみられず透明であった. 角膜の変化は両眼非相同性を示していた. この変異を持った症例はフランス人の 1 家系<sup>46)</sup>, イギリス人<sup>47)</sup>の 2 家系のみで, その発症は 60~80 代と, ベトナム人の症例に比べて遅く, また再発性上皮びらんの既往がみられない. 一方, これまで IIIA 型として報告された Pro 501 Thr の変異を持った症例は発症が 70 代以降で, 臨床的所見としては再発性上皮びらを生じることから, ベトナム人の His 626 Arg の変異を持った症例は IIIA 型とは明らかに異なることことから, IIIB 型とすべきではないかと考える.

2. Membrane component 1 surface marker 1 (MIS1) 遺伝子

膠様滴状角膜ジストロフィは, 1914 年中泉<sup>48)</sup>によって最初に報告された. 1932 年に清沢<sup>49)</sup>が膠様滴状角膜変性の名称で報告し, それ以後, 本症はこの名称で報告されるようになった. 久保木<sup>50)</sup>が 1919 年に兄弟例を報告し, 樋口<sup>51)</sup>は血族結婚のある 2 家系を報告し遺伝形式

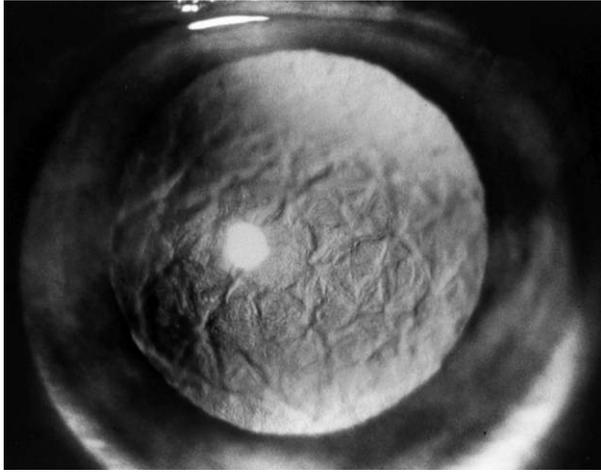


図 11 格子状角膜ジストロフィ (IV型).  
瞳孔縁角膜 Descemet 膜前の実質深層に細かいアミロイド線維の集積がみられる。

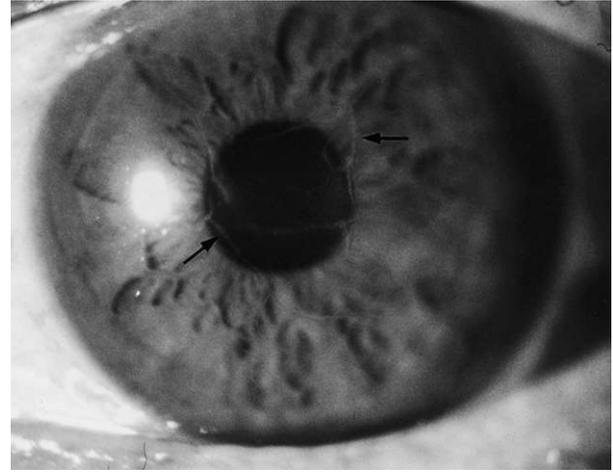


図 12 格子状角膜ジストロフィ (III B 型).  
ベトナム人の症例で角膜実質中に I 型より太く長い III 型より細かいアミロイド線維 (矢印) が散在している。

は劣性遺伝を初めて推定した。本症は臨床診断するまでの間に多くの症例で種々の角膜変化を伴うことがある<sup>52)</sup>。順天堂大学でも初診時に本症と正確に診断できた症例は約半数であった<sup>53)</sup>。他の角膜ジストロフィに比べて刺激症状が強く、時には血管侵入を伴うことや両眼非相同性の角膜変化を示すことがその理由の一つと思われる。著者も角膜の初期所見として spheroidal degeneration に類似した本症を報告<sup>54)</sup>している。本症の定型的臨床像は膠様半透明半球状の沈着物が上皮下に出現する。この沈着物の好発部位は角膜中央よりやや下方から鼻側輪部附近で、大きさは直径約 0.3~0.5 mm 程度であり、進行とともに角膜中央部にも波及する。上眼瞼部で被われた部位の上方の角膜周辺部は最後まで冒されにくい。眼瞼裂に一致した部位には黄色調の微細な顆粒の沈着も伴うことがある。諸外国に比べて我が国での報告は多く、河野ら<sup>55)</sup>は本症の発症頻度は約 10 万人に 3 人と推定している。本症の原因遺伝子は、Tsujikawa ら<sup>56)</sup>によって 1 番染色体短腕上に存在する *MISI* 遺伝子であることが同定され、4 種の変異が報告された。*MISI* 遺伝子は gastro-intestinal tumor-associated antigen をコードする 323 個のアミノ酸から成る単エクソンの遺伝子<sup>57)</sup>で、角膜のみならず、肝臓、肺、胎盤、脾臓、前立腺などでも発現しているが、その機能は未だ不明である。

臨床診断した日本人 14 家系とベトナム人 4 家系について遺伝子解析を行い、日本人 13 家系とベトナム人 1 家系で変異が見出された。日本人では 13 家系中 10 家系はこれまでに報告されていた Gln 118 Stop の変異であったが、3 家系に新しい変異を見出した。すなわち、Gln 118 Stop/938 delA と Lys 84 Stop/Cys 108 Arg の複合ヘテロ接合体の 2 家系と Cys 108 Arg をホモに持つ 1 家系であった。ベトナム人では我が国で報告のない del(Tyr 259-Leu 261)+insT であった。日本人の 1 家

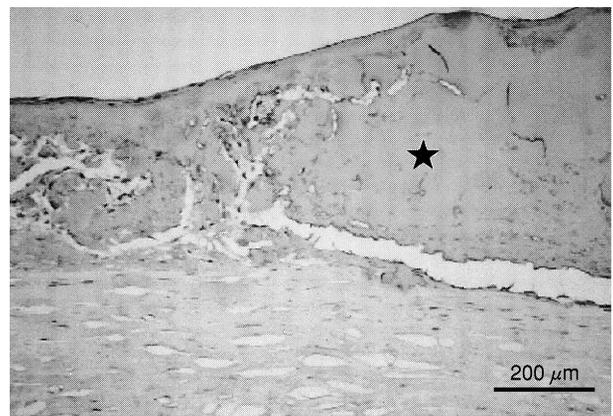


図 13 膠様滴状角膜ジストロフィ。  
抗ラクトフェリン抗体染色で上皮細胞層と上皮下のアミロイド沈着部位 (星印) が陽性に染まる。

系 2 人でミスセンス変異の症例の発症があり、このことから、これまでに報告された変異がストップコドンになるものだけでなく、ミスセンスでも本症の発症がみられることがわかった。

上皮下の沈着物に対する病理組織学的検索ではアミロイド沈着であることが報告<sup>58)~60)</sup>されている。今回の症例のうち、5 例で角膜移植の際に得られた角膜片について病理組織化学的に検索を行った。上皮下の沈着部位には Congo red 染色陽性所見をみた。抗ラクトフェリン抗体染色でもアミロイド沈着部位に陽性所見をみ、さらに 5 例中 2 例では上皮細胞でも抗ラクトフェリン抗体で陽性を示した (図 13)。Klintworth ら<sup>61)</sup>はアミロイド沈着部位にラクトフェリンがみられたことは、上皮バリア機能の障害による涙液由来の可能性もあるとしているが、上皮細胞自身からの分泌もその一つと考えられるのではないかと推定している。

表 7 斑状角膜ジストロフィにおける CHST 6 遺伝子変異

| 日本人                     |     | ベトナム人                   |     |
|-------------------------|-----|-------------------------|-----|
| 遺伝子変異                   | 家系数 | 遺伝子変異                   | 家系数 |
| Pro 204 Gln(ホモ接合体)      | 1   | Leu 59 Pro(ホモ接合体)       | 2   |
| Arg 205 Leu(ホモ接合体)      | 1   | Val 66 Leu(ホモ接合体)       | 1   |
| Arg 211 Trp(ホモ接合体)      | 2   | Val 76 Met(ホモ接合体)       | 1   |
| Arg 211 Trp/Arg 177 His | 1   | Arg 211 Gln(ホモ接合体)      | 8   |
| Arg 211 Trp/Arg 217 Thr | 1   | Gly 232 Ser(ホモ接合体)      | 1   |
| Arg 211 Trp/?           | 5   | V 125(ins 7 bp)(ホモ接合体)  | 1   |
|                         |     | Ser 51 Leu/Tyr 268 Ser  | 1   |
|                         |     | Arg 211 Gln/Gln 82 Stop | 1   |
|                         |     | Tyr 268 Ser/?           |     |
| 不明                      | 2   | 不明                      | 1   |
| 計                       | 13  | 計                       | 18  |

? : もう一方のアレルのアミノ酸コード領域に変異見出せず。

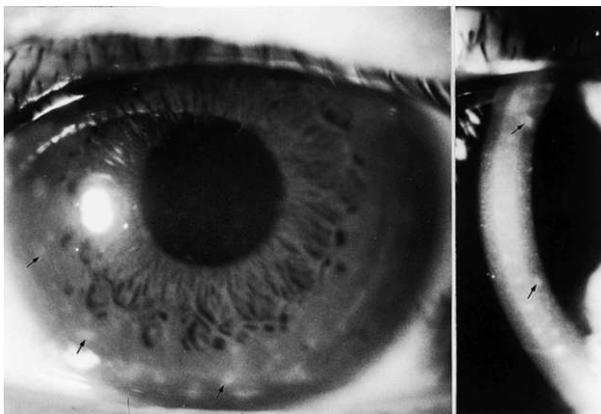


図 14 斑状角膜ジストロフィ。

角膜周辺部の内皮面に白色の小斑点状の混濁(矢印)が散在している(ベトナム人)。

### 3. CHST6 遺伝子

斑状角膜ジストロフィは常染色体劣性の遺伝性疾患であり、疾患は 10 代後半から両眼相同性に角膜中央部表層の小斑点状白色混濁として始まる。この混濁は次第に角膜周辺部や実質全体に進展し、びまん性の混濁となるために著しい視力低下をもたらし、約 30 代で全層角膜移植の適応となる。

本症の角膜では実質細胞が合成する成熟ケラタン硫酸プロテオグリカンに代わり低硫酸化ケラタン硫酸プロテオグリカンが合成されていることが報告され、角膜実質の主要な構成成分であるケラタン硫酸プロテオグリカン合成における硫酸化機構の異常が考えられてきた<sup>62)63)</sup>。Hasegawa ら<sup>64)</sup>は角膜移植時に得られた本症の角膜片から抽出液を作製し、ケラタン硫酸合成の硫酸化反応の一つである *N*-GlcNAc 6-*O*-sulfotransferase 活性が患者角膜抽出液中で低下していることを明らかにし、これにより *N*-GlcNAc 6-*O*-sulfotransferase 酵素異常が本症の原因となる可能性が推定された。本症の原因遺伝子座は連鎖解析によって 16 番染色体長腕(16q22)にある

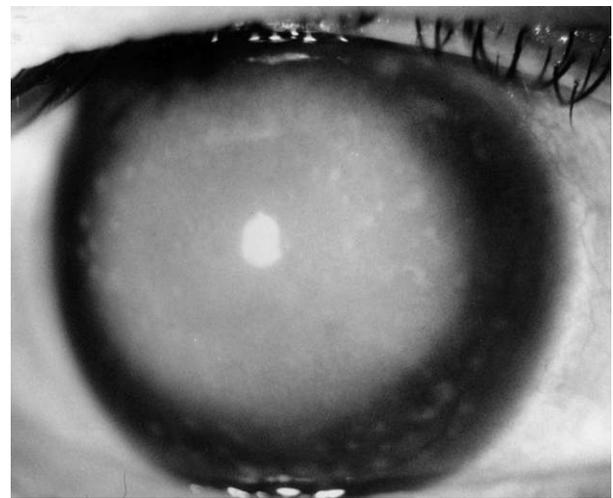


図 15 斑状角膜ジストロフィ。

角膜瞳孔領実質全体にびまん性の白色混濁と上皮下に白色の濃い斑点状の混濁がある(ベトナム人)。

ことが<sup>65)</sup>報告されていたが、2000 年 Akama ら<sup>66)</sup>によって原因遺伝子として carbohydrate sulfotransferase gene 6(CHST6)が同定された。この遺伝子は主に角膜に発現し、corneal GlcNAc 6-*O*-sulfotransferase をコードし、keratan sulfate Gal-6-sulfotransferase(hKS Gal 6 ST)遺伝子とともにケラタン硫酸プロテオグリカン合成の硫酸化反応に関与していると考えられている。斑状角膜ジストロフィと臨床診断した日本人 13 家系とベトナム人 18 家系で変異の解析ができた(表 7)。日本人とベトナム人で共通の変異はみられなかったが、コドン 211 の部位の変異が両国人でみられ、この部位は変異のホットスポットの一つといえると思われた。

ベトナム人の症例で変異の異なった 2 家系で、親子で本症を発症していた。その 1 家系では 43 歳の母親の両眼角膜は上皮下から実質全体が透明であったが、小さい白色の斑点状の混濁が Descemet 膜から内皮面にのみ散在していた(図 14)。遺伝子解析では Arg 211 Gln 変異

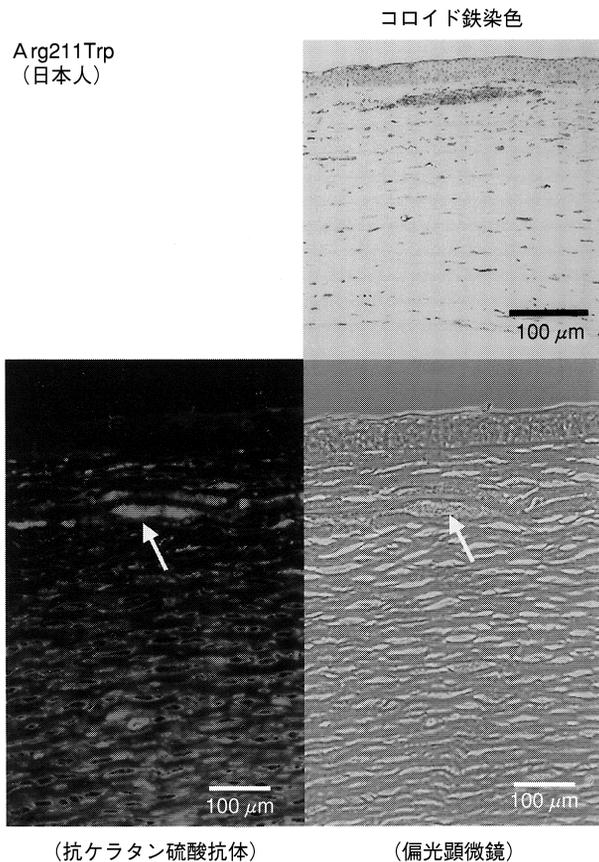


図 16 斑状角膜ジストロフィ. Arg 211 Trp の変異をホモに持つ症例.

右上: コロイド鉄染色, 左下: 抗ケラタン硫酸抗体染色, 右下: 偏光顕微鏡.

実質前層の沈着部位に陽性を示すが, 細胞外基質ではわずかに陽性を示す部分がみられる.

のヘテロで, もう一方のアレルのアミノ酸コード領域に変異は見出されなかった. 2人の子供のうち, 16歳の男子は瞳孔縁の角膜上皮下から実質層にびまん性の白色混濁と上皮下に小さい白色の濃い斑点状の混濁が両眼にみられた(図15). この症例の遺伝子型は Arg 211 Gln/Gln 82 Stop の複合ヘテロ接合体であった. 他の1家系では, 発端者と, その3人の弟, 発端者の19歳の息子が本症を発症しており, 発症者全員に第1067番塩基対以降に7塩基の挿入がホモ接合でみられた.

斑状角膜ジストロフィは成熟ケラタン硫酸の硫酸基を特異的に認識する抗ケラタン硫酸抗体への反応性により, 3つのタイプに分類されている. すなわち, 角膜実質・血清に成熟ケラタン硫酸がみられないもの(タイプI), 角膜実質・血清には成熟ケラタン硫酸がみられないが, 角膜実質細胞内にはみられるもの(タイプIa), 角膜実質・血清に成熟ケラタン硫酸がみられるもの(タイプII)である. 全層角膜移植の際に得られた日本人4例の角膜片について抗ケラタン硫酸抗体染色を行った結果, 上記分類に一致しない染色性を2例でみた. すなわち, Arg 211 Trp ホモ接合体の症例では角膜実質層間に沈着

物が存在し, 実質細胞とともに抗体に陽性に反応するが, 実質細胞外基質の抗体反応性は著しく低下していた(図16). Arg 211 Trp/Ala 217 Thr 複合ヘテロ接合体の症例では実質層間の沈着物と実質細胞が抗体に陽性に反応するが, 実質細胞外基質は抗体に反応しなかった. これらは実質層間の沈着物が抗ケラタン硫酸抗体に陽性に反応する点でタイプI, Iaと異なり, また, 実質細胞外基質の反応性が陰性あるいは著しく低下している点でタイプIIとも異なる特異な亜型を呈していた.

CHST6 を含む多くの膜結合型糖鎖硫酸転移酵素では, そのアミノ酸配列について常に保存されている部位が存在する. それらは硫酸供与体として働く 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) と酵素との結合部位であることが構造的に明らかになり, この部位は硫酸転移酵素活性の発現に必須の部位として理解されている<sup>67)</sup>. Arg 211 Trp 変異はC末端側の PAPS 結合部位に隣接して存在している. Akama ら<sup>68)</sup>はこの変異を有する CHST6 を hKSGal 6 ST とともに Hela 細胞に強制発現させると, 抗ケラタン硫酸抗体で検出されない低硫酸ケラタン硫酸が合成されるのが観察され, N-GlcNAc 6-O-sulfotransferase 酵素活性が失われたと報告している. しかし, 免疫組織化学所見を考慮すると, この変異では酵素活性がすべて消失するのではなく, 活性が著しく低下したか, あるいは酵素の不安定化や細胞内での mislocalizationなどを引きケラタン硫酸合成が不十分となり, その結果生じた低硫酸化ケラタン硫酸プロテオグリカンが実質細胞から排除され層間に沈着する可能性があると考えられる. 症例の角膜における低硫酸化ケラタン硫酸は抗体への反応性が一部残存し, このような亜型を呈したものと推測している.

#### 4. COL8A2 遺伝子

角膜内皮ジストロフィとして, Fuchs 角膜ジストロフィ, 後部多形性角膜ジストロフィ, 先天性角膜ジストロフィが挙げられるが, Biswas ら<sup>69)</sup>によってその一部 Descemet 膜を構成するVIII型コラーゲンの  $\alpha 2$  鎖をコードする遺伝子 (COL8A2) の変異によることが報告された. 日本人の10家系の症例について遺伝子解析を行い, Fuchs 角膜ジストロフィの1例で Arg 155 Gln の変異をみた(図17), この変異は既に報告している変異に含まれているものであった. しかし, 9家系では COL8A2 遺伝子の変異は検出されなかったことから, 他にいくつかの原因遺伝子があるのではないかと思われる.

角膜内皮ジストロフィの原因遺伝子, あるいは角膜内皮細胞の組織特異性に高い発現を示す遺伝子の検索を Fujimaki ら<sup>69)</sup>が家兎角膜内皮 cDNA ライブラリーから1,000個のクローンをランダムにシーケンスして解析した結果, VIII型コラーゲン  $\alpha 1$  遺伝子を筆頭に45種の遺伝子由来の cDNA が多く存在していることを明らかにした. 角膜内皮ジストロフィの原因として,  $\alpha 1$  鎖の

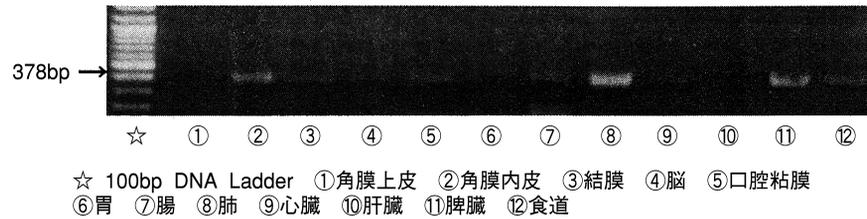


図 18 Polydomain-protein の RT-PCR.  
角膜内皮, 肺, 脾臓に 378 bp のバンドが濃くみられる。

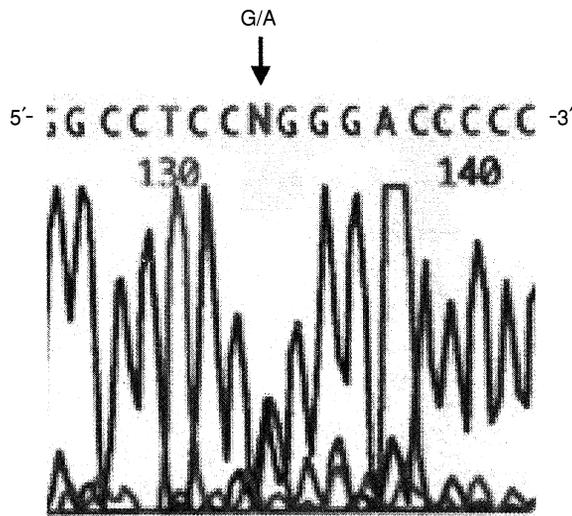


図 17 Fuchs 角膜ジストロフィ症例のシーケンス.  
コラーゲンⅧ型  $\alpha 2$  鎖 (COL8A2) 遺伝子の Arg 155 Gln (CGG  $\rightarrow$  CAG) 変異を示す。

変異検索も今後の研究課題である。Fuchs 角膜ジストロフィは 20 番染色体短腕 (20 p 13) にもマップされていることから、COL8A2 遺伝子以外にも原因遺伝子があると推定される。橘ら<sup>70)</sup>はヒトゲノム情報をもとに相同性の検索を行い、2 種類の cDNA について解析を行った。一つは C 82954 でヒト 2 番染色体上にマップされ、esophageal cancer related gene 4 protein (ECRG4) に相同性を見、RT-PCR での検索では解析したすべての臓器において発現が確認された。他の一つは C 83005 でマウスの polydomain-protein (polydom) と部分的に相同性を見、ヒト 9 番染色体上にマップされていた。RT-PCR で角膜内皮、結膜、口腔粘膜、腸、肺、脾臓、食道に発現 (図 18) がみられ、*in situ* ハイブリダイゼーションでは、角膜では角膜内皮細胞に、脾臓ではリンパ球に、polydom は 34 complement control protein (CCP) モジュール、pentraxin (PTX) ドメイン、von Willebrand factor タイプドメインや EGF 類似の繰り返しから構成されていた。これらの構成要素から、polydom 分子は細胞接着および免疫機構に働いている可能性はある。

#### IV 角膜内皮細胞の遺伝子の導入

角膜内皮細胞に特定の遺伝子を人工的に導入して細胞

表 8 全層角膜移植成績 (1958 年 1 月  
～2000 年 12 月, 順天堂大学)

| 手術時期             | 1958.1～2000.12 |
|------------------|----------------|
| 透明眼数/手術眼数 (%)    |                |
| 円錐角膜             | 678/719 (94.3) |
| 角膜白斑             | 241/331 (72.8) |
| 水疱性角膜症           | 70/139 (50.4)  |
| 角膜ジストロフィ         | 66/81 (81.5)   |
| 再移植              | 99/247 (40.1)  |
| その他              | 20/80 (25.0)   |
| 1174/1597 (73.5) |                |

の性質を変えることが可能であれば、角膜疾患の治療に大きな前進をもたらすことができる。ヒトの角膜内皮細胞は生後ほとんど増殖能を有さず、逆に加齢や内眼手術によって細胞密度は減少し、内皮障害が強いと水疱性角膜症を発症することもある。水疱性角膜症の治療は現在、全層角膜移植術が唯一の治療法であるが、手術侵襲や拒絶反応、さらに提供眼が高齢者の場合には移植片角膜が長期に透明性を維持することが不可能なケースが多くみられる。順天堂大学での 1958 年 1 月～2000 年 12 月までの全層角膜移植の術後 1 年以上経過観察できた症例をみても、水疱性角膜症に対する移植術後の透明治療成績は 50% であった (表 8)。特に、佐藤式近視手術後の水疱性角膜症の移植眼の透明期間を Kaplan-Meier 生命表法で調べてみると、移植後の経過年数が長くなるにつれて多くの症例が移植片角膜内皮細胞の機能不全を生じてきている (図 19)。

ヒト角膜内皮細胞の機能には未だ解明されていない部分が残されている。すなわち、*in vivo* では生後何故内皮細胞は増殖しないのか、内皮細胞自身に増殖能力がないのか、それとも内皮細胞を取り巻く環境、つまり Descemet 膜と房水に挟まれているという微小環境が内皮細胞の増殖を抑制しているのか、生体内では増殖しない内皮細胞でも *in vitro* においては適切な培養条件下では増殖可能である<sup>71)</sup>。すなわち、内皮細胞自身には増殖能力があるが、微小環境が増殖を抑制している可能性がある。そこで、房水中に存在する transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>72)</sup> の角膜内皮細胞への作用に注目し *in vitro*, *ex vivo* で検討を加えた。

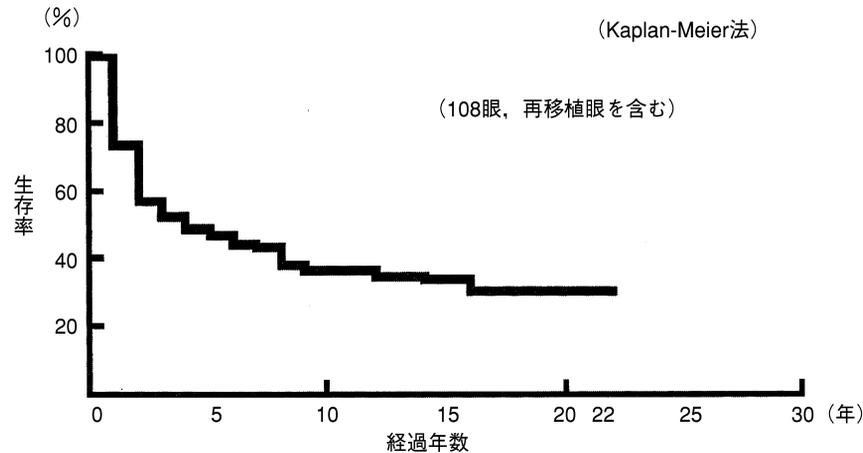


図 19 佐藤式近視手術後水疱性角膜症の全層角膜移植眼の透明期間。

TGF- $\beta$  は細胞増殖抑制, 細胞外基質の産生, 免疫抑制, 創傷治癒, 発生, 癌化などへの関与が知られている。最近 TGF- $\beta$  の細胞内シグナル伝達系が解明され, Smad という蛋白が同定された<sup>73)</sup>。TGF- $\beta$  がレセプターに結合すると細胞質内の Smad 2, 3 がリン酸化され Smad 4 と結合し, 複合体を形成し核内へ移動し標的遺伝子に結合し, TGF- $\beta$  のシグナルを伝達する。一方, 逆に TGF- $\beta$  のシグナルを抑制する Smad 蛋白も存在する。TGF- $\beta$  のシグナルが核内まで伝達されると Smad 7 蛋白が核から細胞質へ移行し, Smad 2, 3 のリン酸化をブロックすることで TGF- $\beta$  のシグナル伝達を阻止する<sup>74)</sup>。すなわち, TGF- $\beta$  によるシグナル伝達には Smad 2, 3, 4 による伝達促進系と Smad 6, 7 による伝達抑制系が存在する。実際に培養家兎角膜内皮細胞での Smad 遺伝子と蛋白の発現を RT-PCR と western blots 法で調べると, Smad 2, 3, 4, 7 の発現をみ, さらに TGF- $\beta$  で刺激をすると Smad 2 のリン酸化がみられた (図 20)。培養家兎角膜内皮細胞では Smad 遺伝子と蛋白が発現し, TGF- $\beta$  のシグナルが伝達されることがわかる。

最近, 細胞周期を進行させる蛋白である cyclin, cyclin dependant kinase (CDK), また, それを停止させる cyclin dependant kinase inhibitor (CDKI) が明らかになってきている<sup>75)</sup>。細胞が G1 期から S 期に進行するためには, cyclin E の発現が高まり, CDKI の p27 の発現が低下することが必要である。実際にヒト角膜内皮細胞を p27, cyclin E で免疫組織染色すると両方とも強く染まった。このことは, 角膜内皮細胞は *in vivo* では cyclin E の発現を高め, S 期への進行への準備ができているが, p27 の発現が強いため S 期へ入らず G1 期で停止している (G1 arrest) と考えられる。そこで一つの仮説を立てた。房水中の TGF- $\beta$  が内皮細胞に p27 の発現を誘導し, 内皮細胞を G1 期に停止させているのではないか。家兎培養角膜内皮細胞を用いて検討を行った。<sup>3</sup>[H] thymidine 取り込み試験を用いて, TGF- $\beta$

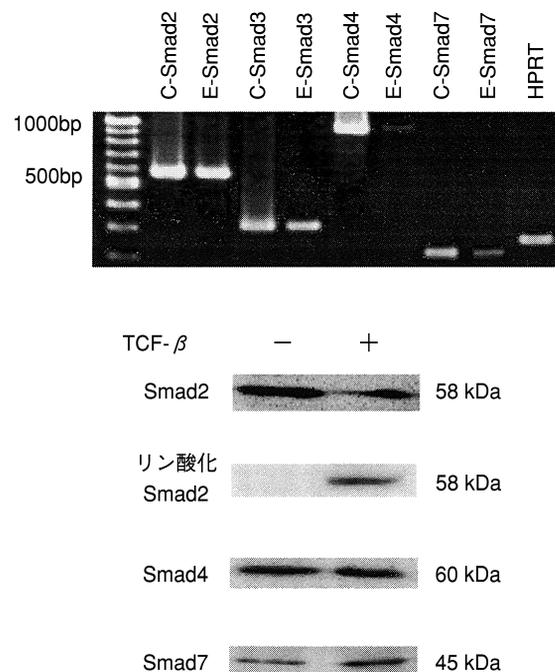


図 20 家兎培養角膜内皮細胞における Smad の発現。  
上図: RT-PCR, 下図: western blot

または房水存在下での培養家兎角膜内皮細胞の増殖能を検討した。TGF- $\beta$  存在下では dose-dependent に増殖抑制を示していた。また, 家兎の房水を添加すると対照と比較して約 50% の増殖抑制を示した。さらに, TGF- $\beta$  に対する中和抗体と房水を一緒に添加すると増殖抑制が解除された (図 21)。このことは, TGF- $\beta$ , または房水中の TGF- $\beta$  が家兎培養角膜内皮細胞の増殖を抑制していると考えられる。さらに, TGF- $\beta$  刺激によって p27 の発現が増強することも確認している (データ未発表)。

次に, TGF- $\beta$  シグナルを抑制する蛋白である Smad 7 の遺伝子を家兎角膜内皮細胞に導入して強発現させ, TGF- $\beta$  のシグナル伝達を阻止し, TGF- $\beta$  または, 房水存在下での細胞増殖抑制が解除できるか試みた。アデノ

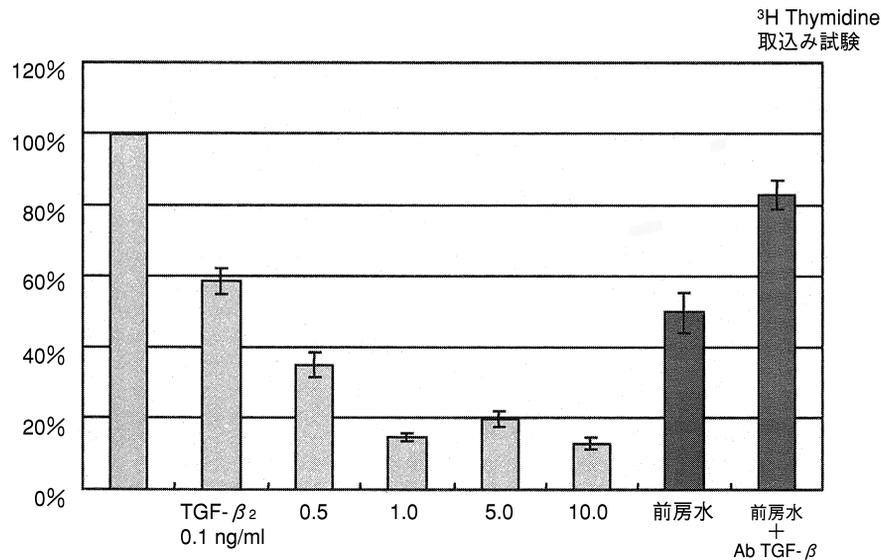


図 21 家兎培養角膜内皮細胞の増殖能に対する transforming growth factor-beta (TGF-β) と房水の影響。

TGF-β 存在下では dose-dependent に内皮細胞の増殖抑制がみられる。房水添加では約 50% の細胞増殖抑制がみられるが、TGF-β に対する中和抗体を加えると細胞増殖抑制が解除される。

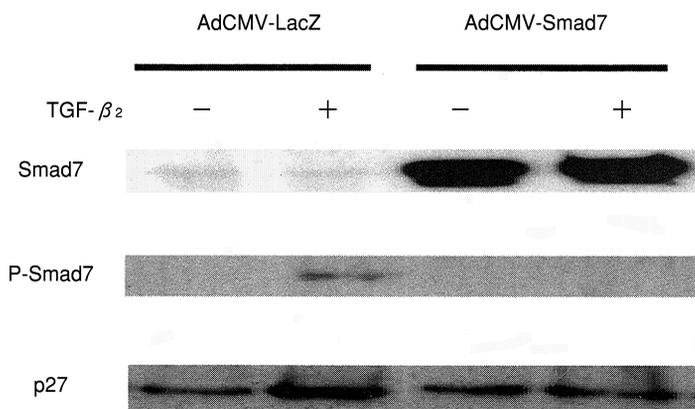


図 22 Smad 7 遺伝子導入細胞の TGF-β に対する反応(western blot)。

ウィルスベクター<sup>76)</sup>を使用し、家兎培養角膜内皮細胞に遺伝子導入を行った。Smad 7 を遺伝子導入した内皮細胞を western blots 法で検討すると、Smad 7 の強発現をみ、TGF-β を添加しても Smad 2 のリン酸化や p 27 の発現増強もみられなかった(図 22)。すなわち、この細胞においては、TGF-β に対するシグナル伝達が阻止されている。そこで、この Smad 7 導入内皮細胞の増殖能について先ほどと同様に、TGF-β または房水存在下における<sup>3</sup>[H] thymidine 取り込み試験を行った。対照は LacZ 遺伝子導入した内皮細胞を使用した。Smad 7 遺伝子導入内皮細胞においては TGF-β 存在下での増殖抑制は解除され、房水存在下では対照に比べ 160% の増殖を呈していた(図 23)。これは、房水中の TGF-β の細胞増殖抑制の作用がなくなり、房水中の増殖因子が内皮細胞に働いたためと思われる。すなわち、Smad 7 遺伝子を導入すると、房水存在下においても角膜内皮細胞

を増殖させることができた。

次に、Smad 7 遺伝子を導入した培養角膜内皮細胞と創傷治癒について検討を行った。まず、家兎角膜内皮細胞を confluent に培養した後、ピペットヘッドで培養細胞に傷を作製し、その創傷治癒過程を経時的に調べた。房水存在下での創傷後 15 時間後では対照である LacZ 遺伝子を導入したものでは創傷後残存面積が 80% であるのに対して、Smad 7 遺伝子を導入したものでは約 40% まで閉鎖していた(図 24)。これは、房水中に含まれた TGF-β の作用が阻止されたため、内皮細胞が増殖し創傷治癒を促進したものと考えられる。

さらに、*ex vivo* における Smad 7 導入内皮細胞の動態を検討する目的で、家兎眼を摘出し強角膜片を作製し 12 穴シャーレに角膜保存液オプチゾール GS<sup>®</sup> を入れ、その中に強角膜片を内皮面を上にして、アデノウイルスをベクターとして Smad 7 遺伝子と対照としての LacZ

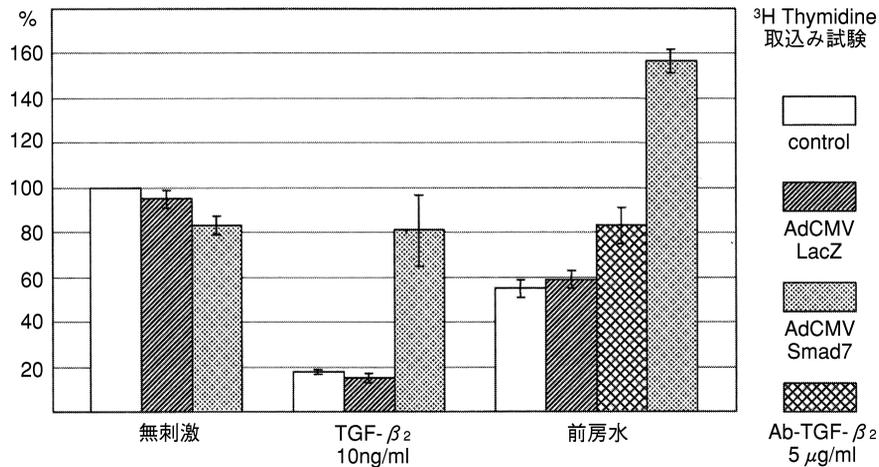


図 23 Smad 7 遺伝子導入家兎培養角膜内皮細胞における増殖能に対する TGF-β と房水の影響。培養内皮細胞に Smad 7 遺伝子を導入することで、TGF-β 存在下でも増殖抑制は解除され、また房水存在下でも対照に比べ 160% の細胞増殖がみられる。

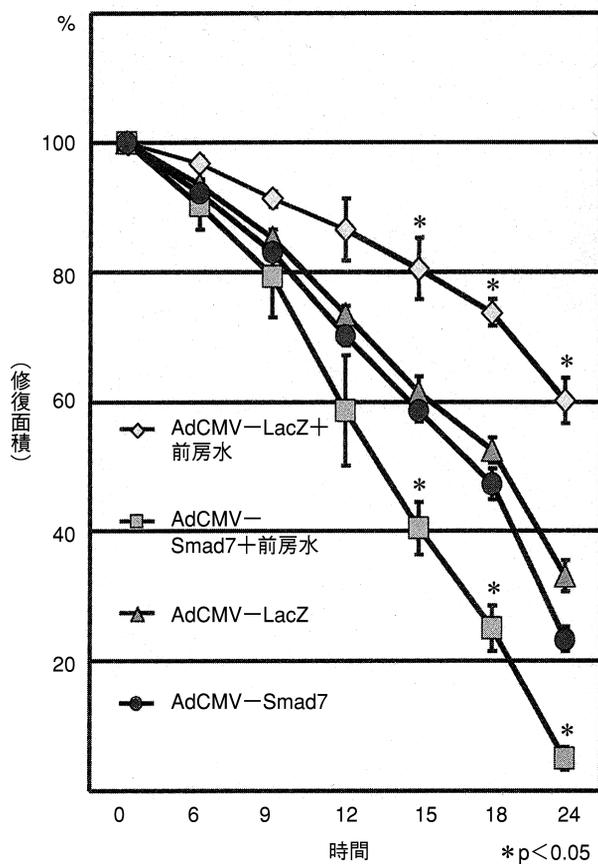


図 24 Smad 7 遺伝子導入家兎培養角膜内皮細胞の創傷治癒。

遺伝子を添加し、37°C 5% の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間保存し遺伝子導入を行った。Smad 7, LacZ 遺伝子が発現するまでに数日かかるため、移植片を家兎眼に全層角膜移植した。2 日後に眼球を摘出し蛍光抗体法で導入の有無について調べてみると、Smad 7 遺伝子は角膜内皮細胞のみに発現をみ、角膜実質細胞や上皮細胞ではみなかった。Smad 7 遺伝子の内皮細胞への導入

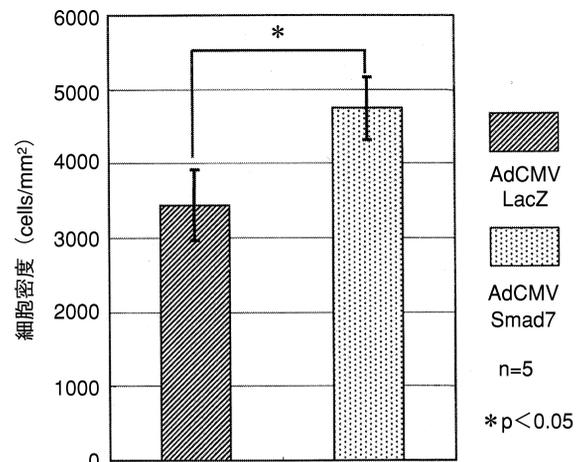


図 25 Smad 7 遺伝子導入角膜片の全層角膜移植後の内皮細胞密度。Smad 7 遺伝子を導入した角膜内皮細胞の方が対照 (LacZ 遺伝子導入) に比べて有意に細胞密度の増加がみられる。

の確認ができたことから、Smad 7 遺伝子を導入した角膜を用いて全層角膜移植を施行し手術後 1 週間後にスペキュラマイクロスコープで角膜内皮細胞の細胞密度、変動係数、六角形細胞発現頻度を調べた。Smad 7 遺伝子を導入した角膜内皮細胞の方が有意に細胞密度の増加がみられた(図 25)。この結果から、*in vitro* と同様に *in vivo* でも角膜内皮細胞を増殖させる可能性が示された。

遺伝子治療の目的でウイルスをベクターとして用いた方法は既にヒトに用いられている<sup>77)</sup>が、まだその取り扱いが煩雑で安全性も確立されていない。一方、ウイルスを用いない方法として、membrane integrins<sup>78)</sup>, poly-amidoamine dendrimer<sup>79)</sup>や electric pulse<sup>80)</sup>などの種々の方法が試みられているが、細胞毒性は低く、取扱いは簡単である利点がある反面、導入効率が一般に低いという欠点がある。角膜内皮細胞に非ウイルスベクターで

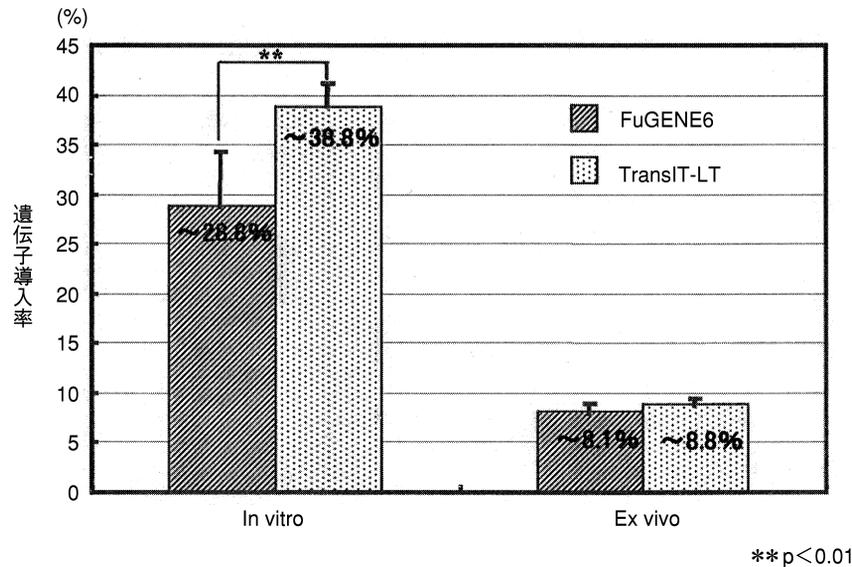


図 26 角膜内皮細胞への FuGENE 6 と TransIT-LT の遺伝子導入効率。

どの程度遺伝子の導入ができるかについて検討を行った。導入する遺伝子は、緑色蛍光蛋白 (GFP) の遺伝子を組み込んだ plasmid EGFP-C 1 (CLONTECH 社) をレポーター遺伝子として用いた。ベクターとしては Transferrin-polyethylenimine (PEI) 接合体 (DuoFect-kit, Quantum Biotechnologies) と新しい脂質を用いた FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemical 社) と liposome である TransIT-LT (Mirus Corporation 社) の 3 種類を試みた。遺伝子導入は *in vitro* の培養細胞と角膜移植で用いるような角膜全層ごと培養液に保存した *ex vivo* の条件下で行った。培養細胞でも全層の角膜片でも蛍光を発する細胞がみられ遺伝子の導入は可能であった。最も効率のよかった TransIT-LT では、培養細胞で約 40%、全層角膜片で 8% であった (図 26)。*In vitro* での EGFP 発現を経時的に調べると、transfection 後 3~5 日に最大の蛍光を観察し、約 2 週間は蛍光がみられた。また、transfection 3 日目の走査電子顕微鏡による観察でも対照と同様、FuGENE 6 や Trans 1 IT-LT でも細胞表面の異常をみなかった。角膜内皮細胞への遺伝子導入は非ウイルスベクターでも可能であることが示された<sup>81)</sup>。細胞毒性はほとんどみられず、効率は十分高いとはいえないが、*ex vivo* でも可能であったことから、eye bank のドナー角膜を保存中に増殖能や免疫能などを誘導する遺伝子を発現させることも可能であると思われる。

## V 結 語

我々がこれまで研究していた角膜疾患のうち、円錐角膜、角膜ジストロフィと角膜内皮細胞の遺伝子発現と遺伝子導入の研究結果について述べた。疫学的調査は未だ病因が未明確な円錐角膜に対する病態解明の第 1 歩となる。進行防止の薬物治療に将来応用するために角膜菲薄化の成因を実質細胞のアポトーシス関連遺伝子の発現の

面から検討を加えた。角膜ジストロフィの原因遺伝子は解明されつつあり、遺伝子診断も可能となってきた。しかし、未だ変異が未知の角膜ジストロフィもあり、また、人種的に明らかな変異の頻度の差もみられる。遺伝子変異の解明は将来臨床分類から遺伝子変異型による分類の確立や遺伝子治療を行うために、さらなる遺伝子解析の研究が重要である。

角膜移植は提供眼の状態によってその成績は異なってくる。若年者の提供眼が少ない今日、内皮細胞数の少ない高齢者の提供眼をより有効に用いるためには内皮細胞に一時的に増殖能を持たせることである。提供眼の保存期間中の内皮細胞に増殖能や免疫能などを誘導する遺伝子の導入によって角膜移植の透明治癒率を向上させ、また、角膜内皮疾患への治療の応用もできることから、この方面でのさらなる研究が必要である。

## 文 献

- 1) 高橋甲蔵：雑件、宮城県盲目取調表。日眼会誌 2：46—48, 1898.
- 2) 中島 章：失明予防と眼遺伝。日眼会誌 86：1834—1858, 1982.
- 3) 菊入 昭, 築島謙次, 石田みさ子, 菅野和子, 朝鍋まり枝, 津川康二：全国の視覚障害者更正施設入所者の失明などの調査結果について。眼紀 39：1084—1087, 1988.
- 4) 石田みさ子, 築島謙次, 久保昭夫, 大津あかね, 菊入 昭：過去 10 年における視覚障害者更正施設入所者の原因調査について。眼紀 49：187—190, 1998.
- 5) Ridley F：Contact lenses in treatment of keratoconus. Br J Ophthalmol 40：295—304, 1956.
- 6) Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B：Atopy and keratoconus：A multivariate analysis. Br J Ophthalmol 84：834—836, 2000.
- 7) Clullen JF, Butler HG：Mongolism (Down's syn-

- drome) and Keratoconus. *Br J Ophthalmol* 47 : 321—330, 1963.
- 8) **Robertson I** : Keratoconus and the Ehlers-Danlos syndrome : A new aspect of keratoconus. *Med J Aust* 1 : 571—573, 1975.
  - 9) **Elder MJ** : Leber congenital amaurosis and its association with keratoconus and keratoglobus. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 31 : 38—40, 1994.
  - 10) **Kayazawa F, Nishimura K, Kodama Y, Tsuji T, Itoi M** : Keratoconus with pellucid marginal corneal degeneration. *Arch Ophthalmol* 102 : 895—896, 1984.
  - 11) **Rabinowitz YS** : Keratoconus. *Surv Ophthalmol* 42 : 297—319, 1998.
  - 12) **金井 淳, 藤木慶子, 小川昭彦, 田辺歌子, 中島章** : 円錐角膜の発症頻度. *あたらしい眼科* 6 : 855—858, 1985.
  - 13) **太田里佳, 藤木慶子, 中安清夫** : 東京都 23 区における円錐角膜の受療率と罹患率の推定. *日眼会誌* 106 : 365—372, 2002.
  - 14) **Lawless M, Coster D. J., Phillipps A. J., Loane M** : Keratoconus : diagnosis and management. *Austral. New Zealand J Ophthalmol* 17 : 33—60, 1989.
  - 15) **Pearson AR, Soneji B, Sarvananthan N, Sandford-Smith JH** : Does ethnic origin influence the incidence or severity of keratoconus?. *Eye* 14 : 625—628, 2000.
  - 16) **Barth J** : Statistisches über 300 Keratoconus föhlen 555 befallenen augen. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 159 : 602—608, 1971.
  - 17) **Amsler M** : Quelques donnees du problem du Keratocone. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 129 : 331—354, 1961.
  - 18) **Lass JH, Lembach RG, Park SB, Hom DL, Fritz ME, Svilar GM, et al** : Clinical management of keratoconus. A multicenter analysis. *Ophthalmology* 97 : 433—445, 1990.
  - 19) **Tuft SJ, Moodaley LC, Gregory WM, Davison CR, Buckley RJ** : Prognostic factors for the progression of keratoconus. *Ophthalmology* 101 : 439—447, 1994.
  - 20) **Zadnik K, Barr JT, Gordon MO, Edrington TB** : Biomicroscopic signs and disease severity in keratoconus. Collaborative longitudinal evaluation of keratoconus (CLEK) Study Group. *Cornea* 15 : 139—146, 1996.
  - 21) **Ihalainen A** : Clinical and epidemiological features of keratoconus genetic and external factors in the pathogenesis of the disease. *Acta Ophthalmol (Suppl)* 178 : 1—64, 1986.
  - 22) **Waardenburg PJ, Franceschetti A, Klein D** : Genetics and Ophthalmology, Charles CT Thomas Springfield, 452—456, 1961.
  - 23) **田辺歌子, 藤木慶子, 金井 淳, 糸井素一** : 円錐角膜の多因子遺伝分析. *日眼会誌* 89 : 670—675, 1985.
  - 24) **竹内 勉, 大野重昭, 長田康平, 松田英彦** : 円錐角膜におけるアトピー性素因の検索. *日眼会誌* 84 : 152—155, 1980.
  - 25) **森本厚子, 金井 淳, 中島 章** : 円錐角膜とアトピー性疾患および血中 IgE に関する検索. *眼紀* 37 : 469—472, 1986.
  - 26) **Rahi A, Davies P, Ruben M, Lobascher D, Menon J** : Keratoconus and coexisting atopic disease. *Br J Ophthalmol* 61 : 761—764, 1977.
  - 27) **Teng CC** : Electron microscopic study of the pathology of Keratoconus. *Am J Ophthalmol* 55 : 18—47, 1963.
  - 28) **Pouliquen Y** : Dooyne lecture keratoconus. *Eye* 1 : 1—14, 1987.
  - 29) **高橋昭宏, 中安清夫, 沖坂重邦, 金井 淳** : 円錐角膜の実質コラーゲン線維に関する適量分析. *日眼会誌* 94 : 1068—1073, 1990.
  - 30) **Wilson SE, Kim WJ** : Keratocyte apoptosis : Implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 220—226, 1998.
  - 31) **Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE** : Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res* 69 : 475—481, 1999.
  - 32) **Stone EM, Mathers WD, Rosenwasser GO, Holland EJ, Folberg R, Krachmer JH, et al** : Three autosomal dominant corneal dystrophies map to chromosome 5q. *Nat Genet* 6 : 47—51, 1994.
  - 33) **Munier FL, Korvatska E, Djemai A, Le Paslier D, Zografos L, Pescia G, et al** : Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nat Genet* 15 : 247—251, 1997.
  - 34) **Mashima Y, Konishi M, Nakamura Y, Imamura Y, Yamada M, Ogata T, et al** : Severe form of juvenile corneal stromal dystrophy with homozygous R124H mutation in the keratoepithelin gene in five Japanese patients. *Br J Ophthalmol* 82 : 1280—1284, 1998.
  - 35) **Fujiki K, Hotta Y, Nakayasu K, Kanai A** : Homozygotic patient with beta-igh 3 gene mutation in granular dystrophy. *Cornea* 17 : 288—292, 1998.
  - 36) **Ha NT, Fujiki K, Hotta Y, Nakayasu K, Kanai A** : Q118X mutation of M1S1 gene caused gelatinous drop-like corneal dystrophy : The P501T of BIGH3 gene found in a family with gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 130 : 119—120, 2000.
  - 37) **吉田 博, 船橋正員, 金井 淳** : 顆粒状角膜変性症と円錐角膜を合併した症例, その組織学的検索. *眼紀* 31 : 218—223, 1980.
  - 38) **Konishi M, Yamada M, Nakamura Y, Mashima Y** : Varied appearance of cornea of patients with corneal dystrophy associated with R124H mutation in the BIGH3 gene. *Cornea* 18 : 424—429, 1999.
  - 39) **Kanai A, Tanaka M, Yamaguchi T, Nakajima**

- A : A typical lattice dystrophy of the cornea. A clinical and histological study. *Doc Ophthalmol Proc Series* 200 : 181—191, 1978.
- 40) **Hida T, Tsubota K, Kigasawa K, Murata H, Ogata T, Akiya S** : Clinical features of a newly recognized type of lattice corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 104 : 241—248, 1987.
  - 41) **Stock EL, Feder RS, O'Grady RB, Sugar J, Roth SI** : Lattice corneal dystrophy type IIIA. Clinical and histopathologic correlations. *Arch Ophthalmol* 109 : 354—358, 1991.
  - 42) **Yamamoto S, Okada M, Tsujikawa M, Shimomura Y, Nishida K, Inoue Y, et al** : A keratopithelin(beta-igh 3)mutation in lattice corneal dystrophy type IIIA. *Am J Hum Genet* 62 : 719—722, 1998.
  - 43) **Klintworth GK** : Advances in the molecular genetics of corneal dystrophies. *Am J Ophthalmol* 128 : 747—754, 1999.
  - 44) **Mashima Y, Yamamoto S, Inoue Y, Yamada M, Konishi M, Watanabe H, et al** : Association of autosomal dominantly inherited corneal dystrophies with BIGH 3 gene mutations in Japan. *Am J Ophthalmol* 130 : 516—517, 2000.
  - 45) **Fujiki K, Hotta Y, Nakayasu K, Yokoyama T, Takano T, Yamaguchi T, et al** : A new L 527 R mutation of the betaIGH 3 gene in patients with lattice corneal dystrophy with deep stromal opacities. *Hum Genet* 103 : 286—289, 1998.
  - 46) **Schmitt-Bernard CF, Guittard C, Arnaud B, Demaille J, Argiles A, Claustres M, et al** : BIGH 3 exon 14 mutations lead to intermediate type I /IIIA of lattice corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1302—1308, 2000.
  - 47) **Stewart H, Black GC, Donnai D, Bonshek RE, McCarthy J, Morgan S, et al** : A mutation within exon 14 of the TGFBI(BIGH 3)gene on chromosome 5 q 31 causes an asymmetric, late-onset form of lattice corneal dystrophy. *Ophthalmology* 106 : 964—970, 1999.
  - 48) 中泉行徳 : 稀有なる角膜変状について. *日眼会誌* 18 : 949—950, 1914
  - 49) 清沢又四郎 : 一種の家族性角膜変性(膠様滴状角膜変性)に就きて. *日眼会誌* 36 : 1634—1645, 1932.
  - 50) 久保木敏涛 : 一種の角膜変性症. *日眼会誌* 23 : 871—879, 1919.
  - 51) 樋口一郎 : 家族性汎発性膠様滴状角膜変性症. *日眼会誌* 48 : 121—150, 1944.
  - 52) 真鍋禮三, 村井保一, 小山直子 : 膠様滴状角膜変性症. *眼紀* 25 : 771—879, 1974.
  - 53) 金井 淳 : 膠様滴状角膜変性症の臨床像. *あたらしい眼科* 4 : 1669—1675, 1987.
  - 54) **Kanai A, Kaufman HE** : Electron microscopic studies of primary band-shaped keratopathy and gelatinous, drop-like corneal dystrophy in two brothers. *Ann Ophthalmol* 14 : 535—539, 1982.
  - 55) 河野博之, 藤木慶子, 金井 淳 : 膠様滴状角膜ジストロフィの発症頻度. *あたらしい眼科* 9 : 1879—1882, 1992.
  - 56) **Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Nishida K, Shimomura Y, Tano Y, et al** : Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat Genet* 21 : 420—423, 1999.
  - 57) **Linnenbach AJ, Wojciorowski J, Wu SA, Pyrc JJ, Ross AH, Dietzschold B, et al** : Sequence investigation of the major gastrointestinal tumor-associated antigen gene family, GA 733. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 27—31, 1989.
  - 58) **Akiya S, Ito K, Matsui M** : Gelatinous drop-like dystrophy of the cornea : Light and electron microscopic study of superficial stromal lesion. *J Clinical Ophthalmology* 26 : 815—826, 1972.
  - 59) 中馬祐一, 田中 稔, 沖坂重邦, 金井 淳, 桑原紀之 : 膠様滴状角膜変性症の再発について. *眼紀* 32 : 1588—1594, 1981.
  - 60) **Takahashi T, Kondo T, Isobe T, Okada S** : A case of corneal amyloidosis. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 61 : 150—156, 1983.
  - 61) **Klintworth GK, Valnickova Z, Kielar RA, Baratz KH, Campbell RJ, Enghild JJ** : Familial subepithelial corneal amyloidosis—a lactoferrin-related amyloidosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2756—2763, 1997.
  - 62) **Hassell JR, Newsome DA, Krachmer JH, Rodrigues MM** : Macular corneal dystrophy : Failure to synthesize a mature keratan sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 3705—3709, 1980.
  - 63) **Nakazawa K, Hassell JR, Hascall VC, Lohmander LS, Newsome DA, Krachmer J** : Defective processing of keratan sulfate in macular corneal dystrophy. *J Biol Chem* 259 : 13751—13757, 1984.
  - 64) **Hasegawa N, Torii T, Kato T, Miyajima H, Furuhashi A, Nakayasu K, et al** : Decreased GlcNAc 6-O-sulfotransferase activity in the cornea with macular corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3670—3677, 2000.
  - 65) **Vance JM, Jonasson F, Lennon F, Sarrica J, Damji KF, Stauffer J, et al** : Linkage of a gene for macular corneal dystrophy to chromosome 16. *Am J Hum Genet* 58 : 757—762, 1996.
  - 66) **Akama TO, Nishida K, Nakayama J, Watanabe H, Ozaki K, Nakamura T, et al** : Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene. *Nat Genet* 26 : 237—241, 2000.
  - 67) **Kakuta Y, Pedersen LG, Pedersen LC, Negishi M** : Conserved structural motifs in the sulfotransferase family. *Trends Biochem Sci* 23 : 129—130, 1998.
  - 68) **Biswas S, Munier FL, Yardley J, Hart-Holden N, Perveen R, Cousin P, et al** : Missense mutations in COL 8 A 2, the gene encoding the alpha 2 chain of type VIII collagen, cause two forms of

- corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet* 10 : 2415—2423, 2001.
- 69) **Fujimaki T, Hotta Y, Sakuma H, Fujiki K, Kanai A** : Large-scale sequencing of the rabbit corneal endothelial cDNA library. *Cornea* 18 : 109—114, 1999.
- 70) 橋 信彦, 藤巻拓郎, 中村真二, 舟木俊成, 村上晶 : 角膜内皮遺伝子発現プロファイルの検討. *順天堂医学* 48 : 216—225, 2002.
- 71) **Engelmann K, Bednarz J, Bohnke M** : Endothelial cell transplantation and growth behavior of the human corneal endothelium. *Ophthalmologe* 96 : 555—562. Review. German, 1999.
- 72) **Jumpel HD, Roche N, Slark WJ, Roberts AB** : Transforming growth factor- $\beta$  in human aqueous humor. *Corn Eye Res* 9 : 963—969, 1990.
- 73) **Massague J** : How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 : 169—178 Review, 2000.
- 74) **Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R**, et al : Identification of Smad 7, a TGF-beta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389 : 631—635, 1997.
- 75) **Sherr CJ** : Cancer cell cycles. *Science* 274 : 1672—1677 Review, 1996.
- 76) **Larkin DF, Oral HB, Ring CJ, Lemoine NR, George AJ** : Adenovirus-mediated gene delivery to the corneal endothelium. *Transplantation* 61 : 363—370, 1996.
- 77) **Cannon PM, Anderson WF** : Part I Viral Delivery and Therapeutic Strategies. Retroviral vectors for gene therapy. In : Templeton NS, et al (Eds) : *Gene Therapy*. Marce Dekker, New York, 1—16, 2000.
- 78) **Shewring L, Collins L, Lightman SL, Hart S, Gustafsson K, Fabre JW** : A nonviral vector system for efficient gene transfer to corneal endothelial cells via membrane integrins. *Transplantation* 64 : 763—769, 1997.
- 79) **Hudde T, Rayner SA, Comer RM, Weber M, Isaacs JD, Waldmann H**, et al : Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium. *Gene Ther* 6 : 939—943, 1999.
- 80) **Oshima Y, Sakamoto T, Yamanaka I, Nishi T, Ishibashi T, Inomata H** : Targeted gene transfer to corneal endothelium *in vivo* by electric pulse. *Gene Ther* 5 : 1347—1354, 1998.
- 81) **Ha NT, Murakami A, Fujiki K, Kanai A** : Tranferrin-polyethlenimine conjugate, FuGENE 6 and transIT-LT as nonviral vectors for gene transfer to the corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol* 46 : 140—146, 2002.
-

**Comment : 秋谷 忍**

我が国の角膜領域における研究の伝統ある教室の統帥として角膜疾患に関し数々の世界的業績を挙げてこられた金井 淳教授の特別講演に相応しい充実した内容である。今回は円錐角膜を含めた角膜ジストロフィの病態と治療に焦点を合わせており、この領域に興味を持つ者にとっては興奮と感銘の念をもって接せざるを得ない。疾患の病態解明と治療開発の方法論として、一般には難解な遺伝子解析的方法を各所で駆使しているため、そのすべてを完全に理解することは困難であるが、意図することは十分理解できる。臨床的に比較的単純な症状を示す円錐角膜の成因に関しては実質細胞のアポトーシスの関与が示唆されている。本研究では正常眼と円錐角膜眼からの培養実質細胞に関して、DNA マイクロアレイ法を用いてアポトーシス関連物質の発現 RNA を比較した。その結果、円錐角膜において、死の方向に関与する物質の発現増加とともに生の方向に関与する物質の発現減少を認めた。角膜実質の菲薄化を説明するには極めて合理的な結果である。症例の追加を期待したい。

多種類の多数例における角膜ジストロフィの遺伝子解析は圧巻である。TGFBI 遺伝子関連ジストロフィにおいては、ハノイ型角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィ III B 型の提唱を行い、膠様滴状角膜ジストロフィの MIS1 遺伝子では新しい変異を発見している。我が国で 1914 年に記載された本疾患に関して、90 年間に本邦研究者により着々とその本態に迫りつつあることは喜ばしい。生化学的解明が最も進んでいる斑状角膜ジストロフィにおいては多くの変異と共にこれまでに報告のない亜型を発見している。遺伝子解析により角膜ジストロフィは種類が急増し、その分類が益々複雑多岐になりつつある。やがては何かの基準のもとに系統的に統一される日が来るであろう。その成因に関しても一つの遺伝子の変異のみですべてを解決することには無理がある。遺伝子側の問題とともに、角膜側の何らかの条件が疾患を大きく演出しているに違いない。

この意味では水疱性角膜症の治療目的である、遺伝子工学的手法を用いた角膜内皮の分裂能遺伝子の導入研究はウサギですでに成功しており、近い将来に臨床で応用される可能性を秘めた貴重な研究成果である。最後に今回の対象となった疾患の本態解明への大きな障害として動物モデルの欠如が挙げられる。モデルの作成と発見も今後の大きな課題の一つとして考慮すべき点と思われる。