

Transforming growth factor-beta induced gene 遺伝子の L 527 R 変異が みられた格子状角膜ジストロフィの組織学的検討

中川恵美子¹⁾, 崎元 暢¹⁾, 稲田 紀子¹⁾, 庄司 純¹⁾
澤 充¹⁾, 菅野 仁²⁾, 中川 滋木²⁾

¹⁾日本大学医学部眼科学教室, ²⁾日本大学医学部生化学教室

要 約

目 的 : Transforming growth factor-beta induced gene (TGFBI 遺伝子) におけるエクソン 12 の L 527 R 変異を呈する格子状角膜ジストロフィ症例の角膜組織について組織学的に検討する。

症例と方法 : 66 歳女性の格子状角膜ジストロフィ症例について, 遺伝子検査および角膜全層移植術時に得られた角膜組織について組織学的に検討した。遺伝子検査は, TGFBI 遺伝子のエクソン 4, 11, 12 についてダイレクトシーケンス法で検討した。組織学的検討は, ヘマトキシリン・エオジン染色, ダイロン染色, コンゴレッド染色による光学顕微鏡, および透過電子顕微鏡による観察を行った。

結 果 : 遺伝子検査では, TGFBI 遺伝子のエクソン 12 に L 527 R 変異があった。また, 組織学的検討によ

り, 角膜実質浅層から深層にかけて, ダイロン染色陽性, コンゴレッド陽性のアミロイド沈着があった。透過電子顕微鏡では, 角膜上皮, 上皮基底膜, Descemet 膜, 内皮には異常はなく, Bowman 膜の不整および実質内にアミロイド線維がみられた。

結 論 : L 527 R 変異による格子状角膜ジストロフィでは, 格子状角膜ジストロフィ III 型に類似した組織学的特徴を有すると考えられた。(日眼会誌 108 : 118-123, 2004)

キーワード : アミロイド, 格子状角膜ジストロフィ, L 527 R 変異, TGFBI 遺伝子, 透過電子顕微鏡

Histopathological Study of Lattice Corneal Dystrophy with L 527 R Mutation of Transforming Growth Factor-beta Induced Gene

Emiko Nakagawa¹⁾, Tooru Sakimoto¹⁾, Noriko Inada¹⁾, Jun Shoji¹⁾
Mitsuru Sawa¹⁾, Hitoshi Kanno²⁾ and Shigeki Nakagawa²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

²⁾Department of Biochemistry, Nihon University School of Medicine

Abstract

Purpose : A histopathological study of lattice corneal dystrophy with L 527 R mutation of exon 12 on transforming growth factor-beta induced gene (TGFBI).

Patient and Methods : The patient was a 66-year-old woman with lattice corneal dystrophy. Gene analysis and histopathological study of corneal tissue obtained at the corneal transplantation were performed. Mutation analysis was done for exon 4, 11, and 12 on the TGFBI gene by direct sequencing. A histological study was performed by light microscopy with hematoxylin-eosin staining, dylon staining, or congo red staining, and by electron microscopy.

Results : Gene analysis revealed L 527 R mutation of exon 12 on the TGFBI gene. Light microscopic examination showed dylon-positive and Congo red-

positive amyloid deposit from the superficial to deep layer of the corneal stroma. In transmission electron microscopy, the corneal epithelial layer, the basement membrane of the epithelium, Descemet's membrane, and the corneal endothelium were normal, but irregularity of Bowman's membrane and amyloid fibers in the corneal stroma were observed.

Conclusion : Lattice corneal dystrophy due to L 527 R mutation showed histopathological findings similar to those of lattice corneal dystrophy type III. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 108 : 118-123, 2004)

Key words : Amyloid, Lattice corneal dystrophy, L 527 R mutation, TGFBI gene, Transmission electron microscopy

別刷請求先 : 173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 庄司 純
(平成 14 年 12 月 27 日受付, 平成 15 年 6 月 24 日改訂受理)

Reprint requests to : Jun Shoji, M. D. Department of Ophthalmology, Nihon University, School of Medicine, 30-1 Oyaguchikami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan

(Received December 27, 2002 and accepted in revised form June 24, 2003)

I 緒 言

格子状角膜ジストロフィは、角膜実質を中心にアミロイド物質が沈着し、格子状の角膜混濁を生じるジストロフィであるが、角膜混濁の特徴や遺伝形式、全身性アミロイドーシスの合併の有無などから、その臨床病型は I 型 (Biber-Haab-Dimmer 型)^{1)~3)}、II 型 (Meretoja 型)⁴⁾、III 型⁵⁾、III A 型⁶⁾に分類されている。

一方、常染色体優性遺伝を呈する格子状角膜ジストロフィ I 型および III A 型の原因遺伝子は、transforming growth factor-beta induced gene (TGFB1 遺伝子) であることが報告⁷⁾⁸⁾されて以来、格子状角膜ジストロフィにおける TGFB1 遺伝子変異は、I 型における Arg 124 Cys⁷⁾、Leu 518 Pro⁹⁾、III A 型における Pro 501 Thr⁸⁾、His 626 Arg¹⁰⁾などが報告されている。常染色体優性遺伝である I 型および III A 型に対して、III 型は常染色体劣性遺伝の可能性が指摘されている⁵⁾。また、遺伝子検査の導入により、これまでの分類である I 型、III 型および III A 型には分類不能な臨床所見を呈する症例も報告されている。1999 年に、Fujiki ら¹¹⁾は Leu 527 Arg (L 527 R) 変異の格子状角膜ジストロフィについて報告し、その特徴として晩発発症の孤発例で、角膜混濁の進行に左右差がみられ、角膜混濁が実質浅層から深層まで存在するという特徴があり、これまでの臨床病型とは異なる角膜所見を呈することを指摘した。

今回、我々は TGFB1 遺伝子 L 527 R 変異の格子状角膜ジストロフィの 1 例に対して、角膜移植術を施行した際に得られた病変部角膜組織について組織学的検討を行ったので報告する。

II 症例と方法

1. 症 例

症 例：66 歳，女性。

主 訴：右眼視力低下。

現病歴：1991 年，58 歳頃から右眼の視力低下を自覚していたが放置していた。徐々に視力低下が進行したため，1993 年 3 月 1 日に近医眼科を受診し，同年 3 月 11 日に精査目的で当科紹介受診となった。

既往歴：特記事項なし。

家族歴：特記事項なし。

初診時所見：視力は右眼 0.2 (0.3 × +0.5 D)，左眼 0.5 (1.0 × +1.0 D ⊂ cyl +1.5 D Ax 180°)。眼圧は右眼 18 mmHg，左眼 17 mmHg であった。前眼部所見は，右眼角膜の瞳孔領下方に，角膜上皮から角膜実質深層にかけて白色あるいは半透明の小滴状の角膜混濁があった。これらの混濁は，格子状様の分布をしていたが，明らかな格子状混濁はなかった。左眼角膜は右眼と同様に瞳孔領のやや鼻側の角膜実質深層に小滴状の混濁があったが，右眼に比べて軽度で，明らかな左右差が存在した

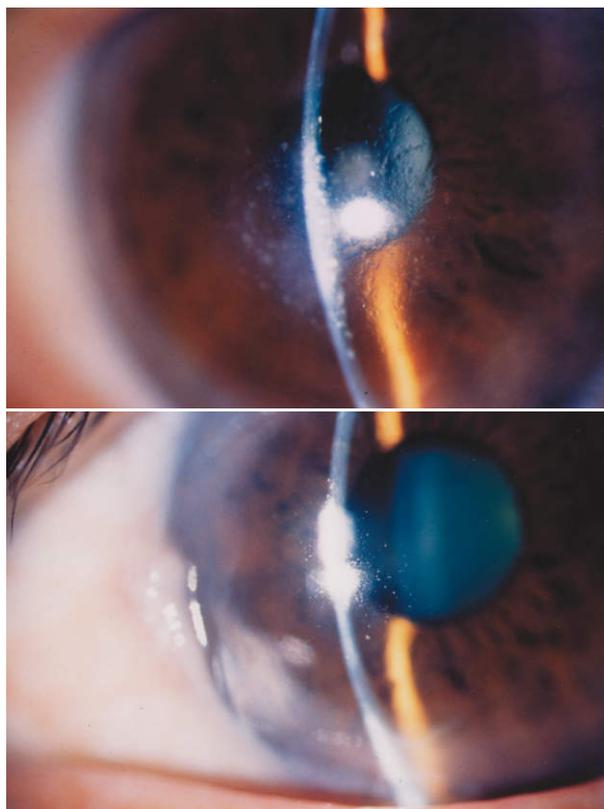


図 1 初診時前眼部写真。

両眼とも角膜中央部の瞳孔領域や下方に白色または半透明の斑状混濁が実質内に集簇しているが，角膜混濁の左右差は著しい。上段：右眼，下段：左眼

(図 1)。両眼ともに角膜輪部には異常がなく，再発性角膜上皮びらんの所見および既往はなかった。家族で診察可能であったのは，娘 1 例と孫 1 例の計 2 例で両者とも女性であったが，角膜に異常所見はなかった。

臨床経過：右眼の視力低下および角膜混濁が進行したため，1996 年 11 月 15 日，全層角膜移植術施行した。

2. 方 法

1) 遺伝子解析方法

遺伝子解析方法は，患者に対してインフォームド・コンセントを得た上で採血し，白血球から DNA を抽出した。TGFB1 遺伝子のエクソン 4，11，12 に特異的なプライマー⁷⁾を用い，polymerase chain reaction (PCR) 法によって増幅し，ダイレクトシーケンス法で自動シーケンサー (ABI 377, Applied Biosystems, CA, 米国) を用いて直接塩基配列を決定した。

2) 組織学的検討方法

全層角膜移植術時に摘出された角膜組織片を半切りし，一方を光学顕微鏡用試料，他方を透過電子顕微鏡用試料とした。光学顕微鏡用試料は，20% ホルマリンで固定後，アルコール系列で脱水，パラフィン包埋し，約 4 μm の薄切切片を作製した。組織切片は，ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色，ダイロン染色，コンゴレッド染色で染色後，光学顕微鏡 (BX 60, OLYMPUS) で観

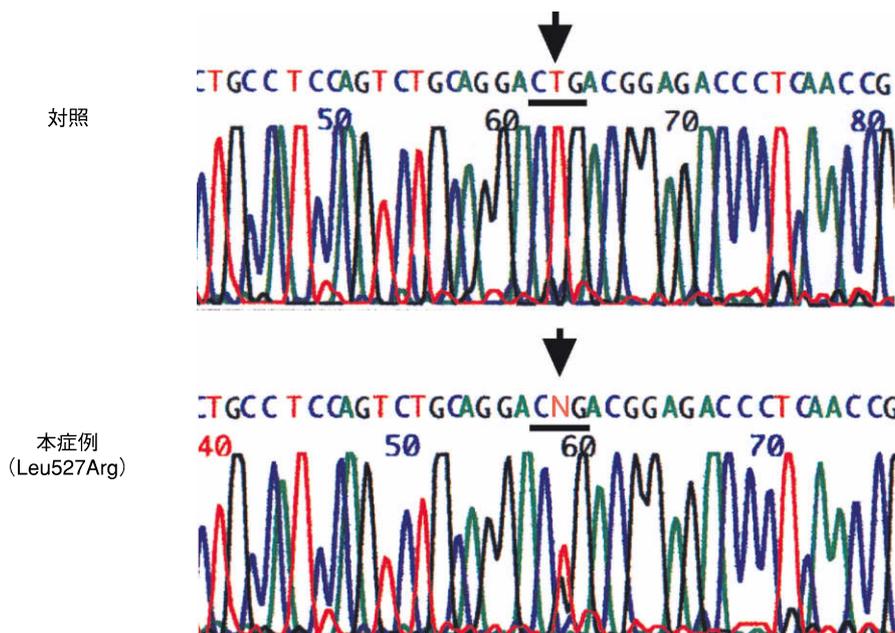


図 2 Transforming growth factor-beta induced gene (TGFBI) 遺伝子エクソン 12 の解析。上段が対照，下段が本症例。本症例ではコドン 527 (矢印) に，ヘテロ接合体の missense mutation がある。

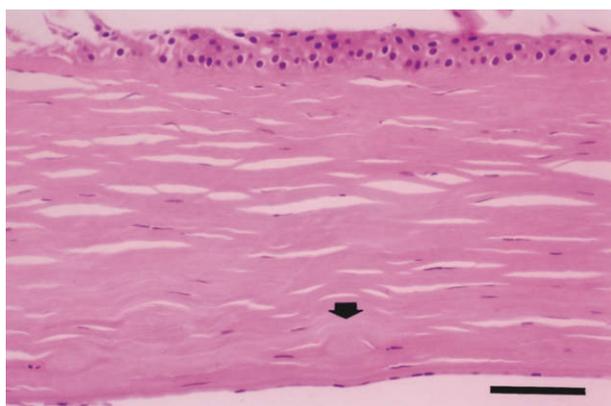


図 3 角膜組織：ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色 1. 角膜実質にエオジン好性を示す塊状の沈着物(矢印)がある。特に，Descemet 膜直上の実質深層にエオジン好性の塊状沈着物を認める点特徴的である。バーは 50 μ m

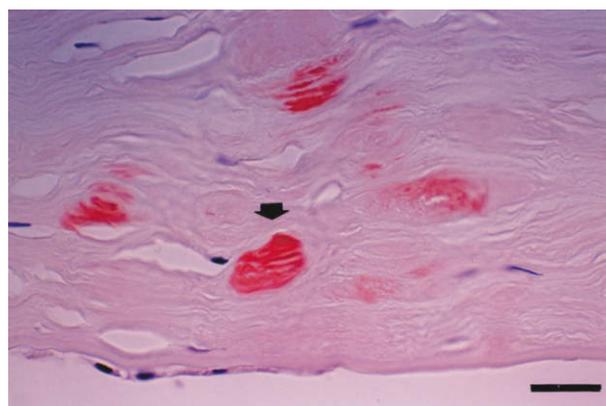


図 4 角膜組織：ダイロン染色。角膜実質内の塊状沈着物は，赤色に染色される無構造物質で，ダイロン染色陽性であることから，アミロイドの沈着と考えられる。バーは 20 μ m

察した。透過電子顕微鏡用試料は，2.5% グルタルアルデヒド溶液による固定，1% 四酸化オスミウムによる後固定後，アルコール系列で脱水，エポキシ樹脂に包埋し，超薄切片を作製した。超薄切片は，酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛の二重染色後，透過電子顕微鏡(JE-OL-1200 EX, 日本電子)で観察した。

III 結 果

本症例は，角膜ジストロフィの臨床診断で以下の遺伝子解析，病理学的検討を行い，格子状角膜ジストロフィと確定診断した。

1. 遺伝子解析

TGFBI 遺伝子解析で，エクソン 12 のコドン 527 の

ロイシンがアルギニンに変異した Leu 527 Arg の missense mutation があった(図 2)。エクソン 4 および 11 には遺伝子変異はなかった。

2. 組織学的検討

光学顕微鏡による観察において，HE 染色標本では，上皮および Bowman 膜に異常はなかったが，浅層から Descemet 膜直上の角膜実質にエオジン好性を示す塊状の沈着物があった(図 3)。ダイロン染色標本では，角膜実質内の塊状沈着物は赤色に染色される無構造物質で，ダイロン染色陽性であった(図 4)。コンゴレッド染色標本では，上皮直下の角膜実質浅層から Descemet 膜直上の実質深層にわたり，実質の線維に沿って赤橙色に染色される沈着物があった(図 5 A)。また，コンゴレッ

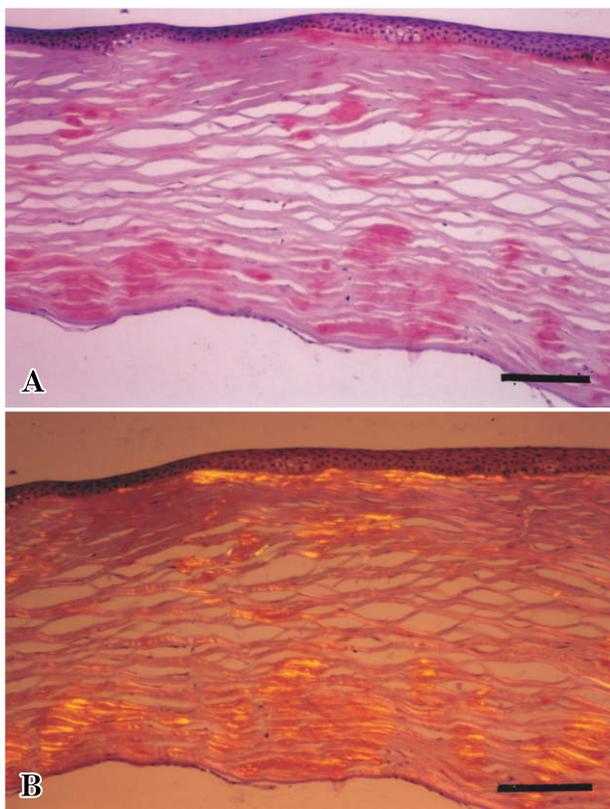


図 5 角膜組織：コンゴレッド染色。

A(上段)：角膜実質の浅層から深層にかけて、角膜実質の層間に沿って、赤橙色に染色される沈着物がみられた。バーは 100 μm

B(下段)：コンゴレッド染色切片の偏光フィルタを用いた観察では、コンゴレッド陽性部分が黄橙色に変化し、複屈折がみられた。バーは 100 μm

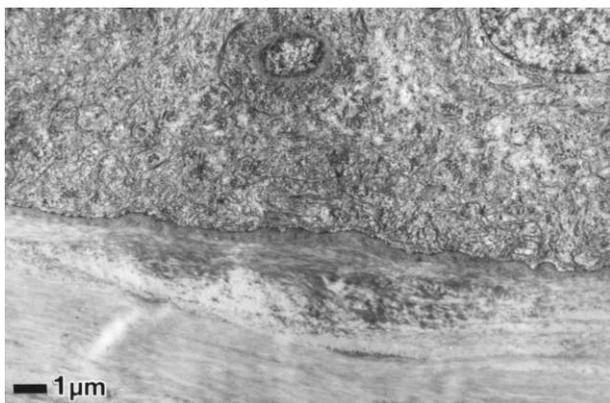


図 6 角膜上皮・Bowman 膜・実質浅層の透過電子顕微鏡写真。

上皮基底膜に異常を認めなかったが、Bowman 膜直下にアミロイド沈着がみられ、Bowman 膜の一部が不整となっている。

ド染色標本を偏光フィルタで観察すると、コンゴレッド陽性部分が黄橙色に変化し、複屈折像を呈した(図 5 B)。また、角膜実質内の塊状沈着物もコンゴレッド陽性であった。

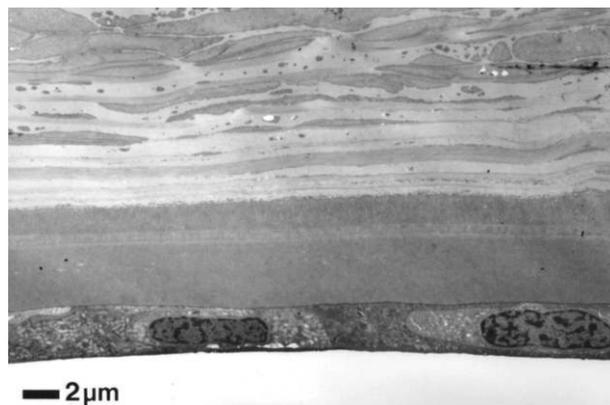


図 7 角膜実質深層・Descemet 膜・内皮の透過電子顕微鏡写真。

アミロイドの沈着は角膜実質深層にみられるが、Descemet 膜、内皮に異常はない。

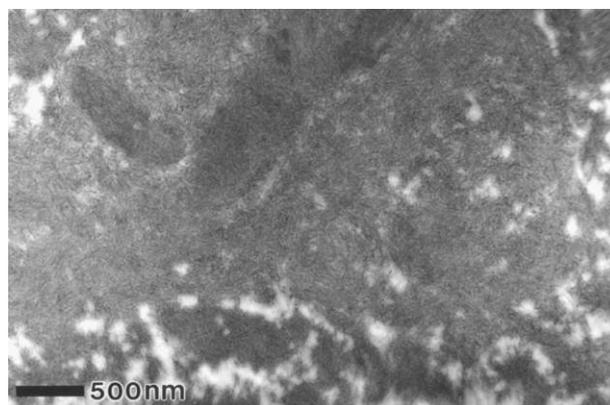


図 8 角膜実質内アミロイド沈着部位の透過型電子顕微鏡写真 2。

実質の沈着物にはアミロイド線維と考えられる約 10 nm の細線維が存在している。

透過電子顕微鏡では、角膜上皮基底細胞、上皮基底膜に異常はなかった。Bowman 膜直下の実質浅層にアミロイド線維と考えられる高電子密度の沈着物がみられる部位が存在した。Bowman 膜の厚さは不整で、一部は肥厚、一部は菲薄化して、実質との境界が不明瞭になっている部位が存在した(図 6)。また、アミロイドの沈着は角膜実質深層までみられたが、Descemet 膜、内皮に異常はなかった(図 7)。実質内沈着物の透過電子顕微鏡写真では、実質の膠原線維の間隙に約 10 nm の細線維が不規則に存在し、アミロイド線維と判断した(図 8)。

IV 考 按

格子状角膜ジストロフィの臨床病型は、I、II、III、IIIA 型に分類されているが、近年個々の病型における原因遺伝子の解明が進んでいる。すなわち、常染色体優性遺伝を示す I 型および IIIA 型は TGFBI 遺伝子であり、家族性アミロイドポリニューロパチーに合併する II 型はゲルブリン遺伝子が原因遺伝子であることが報告さ

れている。さらに、I型ではTGFBI遺伝子エクソン4におけるR124C変異、IIIA型ではエクソン12のP501T変異が代表的な変異であるとされてきた。これに対して、L527R変異は晩発発症の孤発例で、角膜病変の進行程度に左右差がみられ、角膜混濁は角膜実質深層にまで及ぶことが指摘されている¹¹⁾。今回、遺伝子診断によりTGFBI遺伝子のL527R変異がみられた本例は、症状出現時期が58歳ごろであり晩発発症であると考えられること、検索し得た家族の中には同様の角膜疾患を有する症例がみられないことから孤発例であると考えられること、角膜混濁の進行に左右差がみられ、混濁が角膜実質深層にみられることなどの特徴を有していた。これらの臨床所見は、Fujikiら¹¹⁾が報告したL527R変異格子状角膜ジストロフィ症例と比較して、多数の類似点を有すると考えられることから、本症例はL527R変異格子状角膜ジストロフィの典型例であると考えられた。また、角膜病変は、白色または半透明の小滴状混濁が主体で格子状混濁がほとんど観察されなかったが、この所見は角膜中央のびまん性混濁と微細なヒトデ状混濁と表現されるI型および角膜周辺部の太い格子状混濁と表現されるIII型とは異なる角膜混濁の特徴を有していると考えられた。

今回、本例に対して角膜全層移植術を行い、手術時に得られた角膜組織について組織学的に検討した。格子状角膜ジストロフィの組織学的所見に関する報告では、I型またはIII型の組織学的特徴を明確にした報告は少ないが、I型とIII型では、上皮細胞、上皮基底膜およびBowman膜に相違がみられることが指摘されている¹²⁾。I型格子状角膜ジストロフィにおける上皮およびBowman膜の特徴として、電子顕微鏡学的には、基底膜の欠損、ヘミデスモゾームの消失の他、アミロイドの沈着によるBowman膜の断裂や変形があることが指摘されている^{12)~14)}。これに対して、Hidaら¹⁵⁾は上皮下には部分的にアミロイド沈着が存在するが極めて菲薄であり、上皮の厚さは比較的一定を保ち、Bowman膜の破壊はほとんどみられない所見がIII型格子状角膜ジストロフィの特徴として報告した。また、III型格子状角膜ジストロフィでは、ごく微細なアミロイド線維が実質側のBowman膜内にみられる症例や実質浅層のアミロイド沈着によりBowman膜と実質との境界が不明瞭となる症例も存在するとされている¹²⁾。一方、金井ら¹⁶⁾は格子状角膜ジストロフィの孤発例について報告しており、アミロイドの沈着が実質内および一部の症例で上皮細胞とBowman膜との間に存在しているとしている。上皮基底膜およびBowman膜の変化は、临床上、再発性角膜上皮びらん発症の有無を決定する重要な変化と考えられているが、これらの特徴を本症例と比較してみると、本症例はBowman膜直下にアミロイドの沈着と考えられる高電子密度の線維がみられる部位が存在し、上皮基

底膜に変化がみられなかったこと、Bowman膜の厚さに不整がみられたことは、III型の特徴と一致すると考えられた。また、実質におけるアミロイド沈着物の特徴としては、I型でBowman直下の実質浅層に層板状の沈着物がみられる他、上皮下実質浅層から中層にかけての塊状沈着が観察されるとされている。これに対してIII型は、上皮と内皮との中間部実質に塊状混濁を生じやすく、I型と比較してIII型の方が大きな沈着物になるとされ¹⁵⁾、比較的小さな塊状沈着物や層間の沈着物は実質浅層から実質深層までみられるとされている¹²⁾。本症例における実質内の沈着物は、比較的大きな塊状の沈着物を形成している部位と実質の層間にびまん性に沈着している所見が存在したが、どちらの沈着物もダイロン染色陽性およびコンゴレッド陽性を示したことからアミロイド沈着であると考えられた。また、上皮直下の実質浅層からDescemet膜直上の実質深層まで塊状のアミロイドの沈着が存在したことは、III型格子状角膜ジストロフィの特徴に類似した所見と考えられた。また、I型およびIII型格子状角膜ジストロフィでは電子顕微鏡学的にDescemet膜および内皮に異常所見は存在しないとされている^{12)~16)}が、本症例でもDescemet膜および内皮に異常所見はなかった。

一方、Hiranoら¹⁷⁾はL527R変異を有する格子状角膜ジストロフィ症例に対してdeep lamellar keratoplastyを行い、手術時に得られた角膜組織を病理学的に検討したところ、アミロイドの沈着は主に実質深層に存在したが、一部Bowman膜直下にも存在していたこと、および角膜上皮とBowman膜はほぼ正常であったことを報告している。これらのHiranoらが報告した病理学的所見は、今回の我々が経験した症例の病理学的特徴に極めて類似する所見であることから、今回報告した病理学的所見はL527R変異格子状角膜ジストロフィの代表的な病理学的所見であると考えられた。

TGFBI遺伝子におけるL527R変異の格子状角膜ジストロフィ症例について検討した結果、角膜の臨床所見はこれまでに報告されているI、III型とは異なる所見を呈したが、組織学的にはIII型として報告されている格子状角膜ジストロフィに極めて類似した組織学的特徴を有すると考えられた。

文 献

- 1) Biber H : Über einige seltenere Hornhauterkrankungen. Die oberflächliche gittrige Keratitis. Inaugural Dissertation. Zurich, A Diggelmann, 35-42, 1890.
- 2) Haab A : Die gittrige Keratitis. Z Augenheilkd 2 : 235-246, 1899.
- 3) Dimmer F : Über oberflächliche gittrige Hornhauttrübung. Z Augenheilkd 2 : 354-361, 1899.
- 4) 浅岡哲生, 天野史郎, 砂田芳秀, 澤 充 : 家族

- 性アミロイドーシス IV 型に伴った格子状角膜変性症 II 型の 1 家系. 日眼会誌 97 : 1332—1336, 1993.
- 5) **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.
 - 6) **Stock EL, Feder RS, O'Grady RB, Sugar J, Roth SI** : Lattice corneal dystrophy type IIIA. *Arch Ophthalmol* 109 : 354—358, 1991.
 - 7) **Munier FL, Korvatska E, Djemai A, Paslier DL, Zografos L, Pescia G, et al** : Kerato-epithelium mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nature Genet* 15 : 247—251, 1997.
 - 8) **Yamamoto S, Okada M, Tsujikawa M, Shimomura Y, Nishida K, Inoue Y, et al** : A keratopithelin(β ig-h 3) mutation in lattice corneal dystrophy type IIIA. *Am J Hum Genet* 62 : 719—722, 1998.
 - 9) **Endo S, Ha NT, Fujiki K, Hotta Y, Nakayasu K, Yamaguchi T, et al** : Leu 518 Pro mutation of the β ig-h 3 gene causes lattice corneal dystrophy type I. *Am J Ophthalmol* 128 : 104—106, 1999.
 - 10) **Stewart H, Black GCM, Donnai D, Bonshek RE, McCarthy J, Morgan S, et al** : A mutation within exon 14 of the TGFBI(BIGH3) gene on chromosome 5q31 causes an asymmetric, late-onset form of lattice corneal dystrophy. *Ophthalmology* 106 : 964—970, 1999.
 - 11) **Fujiki K, Hotta Y, Nakayasu K, Yokoyama T, Takano T, Yamaguchi T, et al** : A new L 527 R mutation of the β IGH 3 gene in patients with lattice corneal dystrophy with deep stromal opacities. *Hum Genet* 103 : 286—289, 1998.
 - 12) 伊地知洋, 樋田哲夫, 福田 稔, 坪田一男, 尾形徹也 : 格子状角膜変性症 I 型と III 型の電子顕微鏡的比較. *眼紀* 42 : 2004—2008, 1991.
 - 13) **Skrypuch OW, Willis NR** : Lattice dystrophy of the cornea : A clinicopathological case report. *Can J Ophthalmol* 22 : 181—185, 1987.
 - 14) 今泉雅資, 田村充弘, 山之内卯一, 横山繁生 : 格子状角膜変性症の 1 家系. —臨床的・組織学的研究—. *眼臨* 79 : 2253—2259, 1985.
 - 15) **Hida T, Proia AD, Kigasawa K, Sanfilippo FP, Burchette JL, Akiya S** : Histopathologic and immunochemical features of lattice corneal dystrophy type III. *Am J Ophthalmol* 104 : 249—254, 1987.
 - 16) 金井 淳, 田中 稔, 丹羽康雄, 金子 寛, 中島章 : 格子状角膜変性症の臨床的及び組織学的観察. *日眼会誌* 77 : 357—367, 1973.
 - 17) **Hirano K, Hotta Y, Nakamura M, Fujiki K, Kanai A, Yamamoto N** : Late-onset form of lattice corneal dystrophy caused by Leu 527 Arg mutation of the TGFBI gene. *Cornea* 20 : 525—529, 2001.
-