

# 論文審査の要旨及び担当者

報告番号	(甲) 乙 第	号	氏 名	山 添 克 弥
論文審査担当者	主 査	眼科学	坪 田 一 男	
システム医学	洪 実		ゲノム医学	小 崎 健次郎
小児科学	長谷川 奉 延			
学力確認担当者 :			審査委員長 :	洪 実
			試問日 :	平成 2 7 年 1 2 月 1 6 日
( 論 文 審 査 の 要 旨 )				
論文題名 : Development of a Transgenic Mouse with R124H Human TGFBI Mutation Associated with Granular Corneal Dystrophy Type 2 (ヒトR124H変異型TGFBI遺伝子を用いた顆粒状角膜ジストロフィ2型モデルマウス作製)				
<p>顆粒状角膜ジストロフィ2型 (granular corneal dystrophy type 2: GCD2) は Transforming growth factor beta-induced (<i>TGFBI</i>) 遺伝子の変異 (R124H) により発症する常染色体優性遺伝性疾患である。本研究では、ヒトR124H変異型TGFBIのcDNAを用いてノックインマウスを作製し、ヒトと同様に加齢とともにヒアリンとアミロイド沈着を伴う特徴的な角膜混濁が生じることが示された。</p> <p>審査では、まずGCD2の疫学的知見について問われた。R124H変異によるGCD2は日本人で最も多くみられる角膜ジストロフィであり、有病率は約1000人に1人である。孤発例もみられるが、多くは常染色体優性遺伝形式に従うと回答された。次に、TGFBIの働き、遺伝子変異の影響について問われた。TGFBIは684アミノ酸からなる細胞外マトリックス蛋白であり、角膜以外にも様々な臓器に偏在的にみられる。細胞接着、遊走、増殖、分化に関与し、創傷治癒や細胞外マトリックスの維持に関係するとされるが、その役割は十分に解明されていないと回答された。GCD2の角膜実質細胞における酸化ストレス脆弱性やミトコンドリア機能障害、オートファジー機能障害が報告されているが、発症機序は明らかにされていないと回答された。Targeting vector作成について、ヒトTGFBI<sup>R124H</sup>のcDNAの作製法を問われた。ヒトcDNAライブラリーを用いてR124H遺伝子変異を含むプライマーを用いたPCR法により作成したと回答された。ノックインマウス作製について、targeting vectorのES細胞への導入効率について問われた。ES細胞へ電氣的穿孔法を用いたtargeting vector導入を6回行い、内5回においてサザンロット法及びPCR陽性クローンを得たが、各回における導入効率は計測していないと回答された。マウスとヒトのTGFBIのアミノ酸配列の差について問われ、91%は同一であり、免疫染色で両者を区別することができる抗体がないため区別は難しいと回答された。続いて、他の方法で区別が可能かを問われた。理論的にはプロテインシークエンサー方法やタンデム質量分析計 (MS/MS) を用いた方法が考えられると回答された。Cross sectional studyについて対象の除外基準について問われた。GCD2の臨床診断基準として角膜上皮下から実質浅層の境界明瞭な灰白色の顆粒状混濁がみられることと定義しており、遺伝型に関わらず、角膜浮腫や血管新生を伴う混濁、帯状角膜変性 (カルシウム沈着) による混濁は解析から除外した。除外の割合に群間差はなく、帯状角膜変性については全例ではないが組織染色でカルシウムの沈着を確認したと回答された。ホモ接合型とヘテロ接合型の重症度が臨床例と異なり明らかな差がない点に関して考えられる理由について問われた。明らかな原因は不明であるが、ヒトTGFBIをマウスに導入しており、ヒトとマウスの角膜の大きさの差が一因である可能性があるかと回答された。</p> <p>以上、本研究は今後さらに検討すべき課題が残されているものの、顆粒状角膜ジストロフィ2型のモデルマウス作製に初めて成功した点において、非常に有意義な研究であると評価された。</p>				