

# 主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	山 添 克 弥
<b>主 論 文 題 名</b> 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)				
<b>(内容の要旨)</b> 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 (TGFBI) 遺伝子の変異により発症する常染色体優性遺伝性の角膜ジストロフィである。角膜中央部にヒアリン及びアミロイド沈着による実質混濁を呈する。年齢とともに緩徐に進行し、特にホモ接合体では混濁が強い。また、日本人において最も頻度の高い角膜ジストロフィである。これまでGCD2の疾患モデルマウスは存在せず、発症促進因子や予防法の研究は十分なされていない。本研究はGCD2の病態解析のため遺伝子組換えマウスを作製し、その表現型の解析、発症因子の探求を目的とした。 マウスTGFBI遺伝子をR124H変異型ヒトTGFBI遺伝子cDNAで置き換えたノックインマウスを作製した。ホモ接合型マウスの組織を用いてRT-PCRによりヒトTGFBI遺伝子の発現を確認した。また、免疫染色でヒトTGFBIタンパク質が作製したマウス角膜に存在することを確認した。 作製したマウス全226匹 (ホモ接合型23匹、ヘテロ接合型106匹、野生型97匹) の角膜病変の有無を横断的に確認したところ、一部のマウスで角膜中央部に血管新生を伴わない顆粒状または格子状の混濁が観察された。混濁発症率はホモ接合型45.0%、ヘテロ接合型19.4%で、発症率は有意にホモ接合型が高かった (p=0.02)。野生型ではGCD2に特徴的な混濁はみられなかった。混濁率はホモ接合型、ヘテロ接合型いずれにおいても年齢とともに高まる傾向がみられた。ホモ接合型において混濁のみられたマウスの角膜を組織染色したところ、角膜上皮下沈着部に一致してマッソントリクローム染色及びコンゴールレッド染色陽性像が確認され、GCD2の特徴であるヒアリンとアミロイドの存在が確認された。また、チオフラビンT染色においてもアミロイドの存在が確認された。GCD2患者の線維芽細胞においてautophagyが障害されていると報告されているが、本モデルにおいてもautophagosomeが蓄積した様子が免疫染色で確認された。また、電子顕微鏡による観察では角膜上皮下に沈着物が確認され、その近傍にautophagosomeがみられた。 次に、発症因子検討のために以下の介入実験を行った。角膜の切開と実質切除を伴う屈折矯正手術後のGCD2発症が知られていることから角膜上皮及び実質に障害を加える介入実験を行ったが、発症促進には至らなかった。また、プロテアーゼ阻害剤投与やアミロイド沈着を促進するとされる塩化ベンザルコニウムの局所投与を行ったが、発症促進には至らなかった。加齢とともに発症率が高まるものの全例で発症するわけではなく、遺伝因子に加え、いくつかの環境要因が関与している可能性が考えられた。 R124H変異型ヒトTGFBI遺伝子を組み込んだノックインマウスを作製し、その表現型を確認したところ、角膜混濁所見及び組織染色所見はGCD2の特徴的な所見を示した。また、臨床例と同様に加齢に伴い発症率は高まる傾向がみられ、これまでに存在しなかったGCD2のマウスモデル作製に成功した。				