

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10885

研究課題名(和文) フックス角膜内皮ジストロフィにおけるTGC反復配列伸長の病態への意義の解明

研究課題名(英文) The effect of TGC triplet repeat expansion on the pathophysiology of Fuchs endothelial corneal dystrophy

研究代表者

奥村 直毅 (Okumura, Naoki)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：10581499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：フックス角膜内皮ジストロフィ(FECD)は角膜内皮障害による視力障害を生じる疾患であるが、その病態メカニズムの詳細は不明である。近年、FECD患者の85%においてTCF4遺伝子の第3イントロンにおけるTGC反復配列の伸長が認められることが報告され、新たなトリプレットリピート病である可能性が示された。本研究ではFECD患者の角膜内皮を用いて、角膜内皮でTCF4の発現量が遺伝子レベルで亢進していることを明らかにした。さらにFECD患者由来の角膜内皮細胞においてゲノム編集技術を用いてTCF4の遺伝子編集を行い、TCF4がFECDの病態に与える影響について解析した。

研究成果の概要(英文)：Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD) is a hereditary disease with a typically autosomal dominant pattern of inheritance, though the genetic basis is not fully elucidated. Recently, it was reported that expansion of a trinucleotide repeat (TNR) in third intron of TCF4 was strongly associated with FECD, suggesting that FECD can be a TNR disorder. In the current study, we demonstrated that TCF4 mRNA is significantly upregulated in the corneal endothelium of patients with FECD regardless of the presence of TNR expansion by using quantitative PCR. We also evaluated the effect of TCF4 on pathophysiology of FECD by using genome editing.

研究分野：眼科学

キーワード：フックス角膜内皮ジストロフィ

## 1. 研究開始当初の背景

角膜内皮は角膜を透明に保つために不可欠な組織であるが障害されると角膜の混濁を生じ、重症の視力障害の原因となる。特に FECD は罹患率 3-5% (欧米、40 歳以上) であり、臨床的には 1) 角膜内皮基底膜への過剰な細胞外マトリックス (ECM; extracellular matrix) の沈着と、2) 角膜内皮細胞の障害を生じる進行性の疾患であり、重症化すると失明など重篤な視力障害に至る。組織学的にはアポトーシスによる細胞障害の可能性が指摘されているが病態メカニズムの詳細は不明である。有効な薬物治療が存在せず、唯一の治療法は角膜移植である。また、角膜移植の主たる原因疾患である。

原因遺伝子については非常に稀ではあるが COL8A2 遺伝子や ZEB1 遺伝子の変異が認められるとの報告がある。一方で、ほとんどの FECD 患者においては原因遺伝子が不明であったが、Baratz et al. (N Engl J Med. 2010, PLoS One 2012) は、TCF4 遺伝子の第 3 イントロンにおける TGC 反復配列の伸長が 85% の患者で認められることを報告した。また、複数の研究グループにより TGC 反復配列の伸長が確認されている。さらに、申請者らは Baratz らとの共同研究において日本人患者においても欧米人と同様に反復配列の伸長が認められることを明らかにした。

FECD の病態の詳細が不明である最大の原因のひとつは、研究に用いることのできる疾患モデルが存在しないことにあると言える。そこで、申請者は FECD 患者由来の角膜内皮細胞を培養して不死化した疾患細胞モデルを世界に先駆けて樹立した。疾患細胞モデルを詳細に解析することで、患者の生体と同様に、疾患細胞モデルにおいて特にフィブロネクチン、I 型コラーゲンなどの ECM の過剰な産生を認めた。さらに、フィブロネクチンおよび I 型コラーゲンの小胞体内への集積および小胞体ストレスが生じ、細胞障害をきたすことを発見した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、FECD 患者における TGC 反復配列の伸長が、疾患を引き起こす分子的機構について解明することである。特に、1. TCF4 遺伝子の転写活性に影響している、2. イントロンの切り出し部位を変えて遺伝子発現を調整している、3. TCF4 以外の遺伝子の発現に影響している、4. 異なる活性を有するタンパク質を作っているという 4 つの可能性に着目して研究を行う。

## 3. 研究の方法

上述の 4 つの可能性について疾患モデル細胞および患者角膜組織を用いて解析を行い、反復配列の伸長がこれらの可能性のうちどの機序で細胞障害および ECM の過剰産生を生じさせるのかを明らかにする。

## 4. 研究成果

Erlangen 大学 (ドイツ) にて角膜移植を行った際に文書同意を得た患者の角膜内皮および血液

ゲノムを採取した。398 人の FECD 患者の血液ゲノムを TP-PCR および Southern blotting で解析することで、315/398 人 (79%) が TCF4 遺伝子の第 3 イントロンにおける TGC 反復配列の伸長を有することを明らかにした。さらに採取した FECD 患者の角膜内皮において、TCF4 遺伝子の発現量が non-FECD の非患者のコントロールと比べて有意に亢進していることを明らかにした。事前に想定した、TGC 反復配列の伸長が疾患を引き起こす分子的機構のうち、「TCF4 遺伝子の転写活性に影響している」という仮説に合致する結果であった。

そこで、文書同意を得た FECD 患者より角膜移植中に角膜内皮を採取し、Erlangen 大学より同志社大学に輸送し培養し、hTERT および SV40 遺伝子により不死化し細胞モデルを作成した。得られた FECD 患者由来の疾患モデル細胞において、TCF4 をノックアウトした際の ECM 産生および細胞障害に与える影響を検討した。コントロールである Mock においては TGFβ による刺激により FECD 患者由来の疾患モデル細胞は、これまでの我々の報告と一致してフィブロネクチン、I 型コラーゲンなどの ECM の過剰な産生を認めた。さらに、小胞体ストレスが生じ、細胞障害を生じた。一方で興味深いことに、TCF4 をノックアウトした FECD 患者由来の疾患モデル細胞においては ECM の過剰産生は抑制された。さらには、小胞体ストレスの誘導が抑制され、最終的に細胞障害を認めなかった。これらのことは TCF4 の過剰な発現が FECD の病態の本質である可能性を示すものである。

本研究では TCF4 遺伝子と FECD の病態を結びミッシングリンクを明らかにした。今後更なる研究を進めることで、FECD の病態を完全に明らかにし、創薬ターゲットを明らかにすることで角膜移植によらない治療法の開発をも可能にすると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Okumura N, Hashimoto K, Kitahara M, Okuda H, Ueda E, Watanabe K, Nakahara M, Sato T, Kinoshita S, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Koizumi N: Activation of TGF-β signaling induces cell death via the unfolded protein response in Fuchs endothelial corneal dystrophy. Sci Rep. 2017 Jul 28;7(1):6801. doi: 10.1038/s41598-017-06924-3. 2017.7. (査読あり)

2. Okumura N, Kitahara M, Okuda H,

- Hashimoto K, Ueda E, Nakahara N, Kinoshita S, Young RD, Quantock AJ, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Koizumi N: Sustained activation of the unfolded protein response induces cell death in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Jul 1;58(9):3697-3707. doi: 10.1167/iovs.16-21023. 2017.7. (査読あり)
3. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N: The Role of Rho kinase Inhibitors in Corneal Endothelial Dysfunction. *Curr Pharm Des*. 23(4):660-666. doi: 10.2174/1381612822666161205110027. 2017.4. (査読あり)
4. Okumura N, Fujii K, Kagami K, Nakahara M, Kitahara M, Kinoshita S, Koizumi N: Activation of the Rho/Rho Kinase Signaling Pathway Is Involved in Cell Death of Corneal Endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Dec 1;57(15):6843-6851. doi: 10.1167/iovs.16-20123. 2016.12. (査読あり)
5. Okumura N, Okazaki Y, Inoue R, Nakano S, Fullwood NJ, Kinoshita S, Koizumi N: Rho-Associated Kinase Inhibitor Eye Drop (Ripasudil) Transiently Alters the Morphology of Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 56(12):7560-7567. 2015.11 (査読あり)
6. Okumura N, Minamiyama R, Ho L, Kay EP, Kawasaki S, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F, Young RD, Quantock AJ, Kinoshita S, Koizumi N: Involvement of ZEB1 and Snail1 in excessive production of extracellular matrix in the Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Laboratory Investigation*. 95(11), 1291-1304, 2015.11. (査読あり)
7. Nakano M, Okumura N, Nakagawa H, Koizumi N, Ikeda Y, Ueno M, Yoshii K, Adachi H, Aleff R, Butz M, Highsmith E, Tashiro K, Wieben E, Kinoshita S, Baratz K: Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy in Japanese. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.56(8):4865-4869, 2015.7. (co-first authors) (査読あり)
- [学会発表] (計7件)
1. Okumura N, Sato M, Nakahara M, Sato T, Kitazawa K, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse E, Koizumi N: Involvement of TCF4 in the pathophysiology of Fuchs endothelial corneal dystrophy. Gordon Research Conference(GRC), Ventura, USA, 2018.2.21. (ポスター)
2. Okumura N: Development of a pharmaceutical treatment for Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy, Stem Cells & the Eye Symposium, Cardiff, UK, 2017.11.3.
3. Okumura N, Hashimoto K, Okuda H, Ueda E, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Koizumi N: Feasibility of TGF- $\beta$  inhibition for the treatment of Fuchs endothelial corneal dystrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017, Baltimore, USA, 2017.5.8. (ポスター)
4. Okumura N: Sustained Activation of Unfolded Protein Response Induces Cell Death in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. The 5th Biennial Scientific Meeting Asia Cornea Society (ACS 2016), Seoul, Korea, 2016.12.9.

5. Okumura N: Translational Research for Corneal Endothelial Disease. Lecture in Cardiff University, Wales, UK, 2016.8.10.
6. Okumura N, Hashimoto K, Kitahara M, Nakahara M, Kinoshita S, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F, Koizumi N: Unfolded protein accumulation induced endoplasmic reticulum stress of corneal endothelial cells in Fuchs endothelial corneal dystrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2016, Seattle, USA, 2016.5.3. (一般口演)
7. Okumura N: Fuchs Corneal Dystrophy in Asia. The 30th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress. Guangzhou, China, 2015.4.4.

〔図書〕(計1件)

1. 奥村直毅: 確定診断と治療の進め方 / 角膜内皮障害と水疱性角膜症, 敵状角膜と Fuchs 角膜内皮ジストロフィ. 角膜疾患外来でこう診てこう治せ 改訂第2版 (木下 茂編), Page194-195, メジカルビュー社, 東京, 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
<http://tissue-engineering-doshisha.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥村 直毅 (OKUMURA, Naoki)  
 同志社大学・生命医科学部・准教授  
 研究者番号: 10581499

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

小泉 範子 (KOIZUMI, Noriko)  
 木下 茂 (KINOSHITA, Shigeru)  
 Keith H. Baratz  
 Ursula Schlötzer-Schrehardt  
 Friedrich Kruse  
 Andrew Quantock  
 中野 正和 (NAKANO, Masakazu)