

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592618

研究課題名(和文)角膜ジストロフィーの分子メカニズムに基づく光線力学療法および予防点眼液の開発

研究課題名(英文)Photodynamic therapy on corneal dystrophy on the basis of molecular mechanism.

研究代表者

加治 優一 (Kaji, Yuichi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50361332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：角膜ジストロフィーは遺伝性・進行性・両眼性の角膜混濁疾患で、失明に至ることがある。角膜ジストロフィーの根本的な治療法は角膜移植しかないが、日本国内における角膜ドナーの減少・角膜移植後の合併症・角膜移植後も角膜ジストロフィーが再発することなどの問題があり、治療を受けられない患者も多い。我々は角膜ジストロフィーの発症メカニズムを解明するために合成ペプチドを元にしたモデルを作成し、角膜ジストロフィーを1日以内に再現することを可能にした。さらに角膜ジストロフィーの混濁物質であるアミロイドに親和性の高い蛍光試薬であるチオフラビンTが光線力学療法に使用可能であることを証明することができた。

研究成果の概要(英文)：Corneal dystrophy is genetic, progressive, and bilateral corneal disorders leading to blindness. The only therapy on the corneal dystrophy is corneal transplantation. However, some of the patients can not receive corneal transplantation because of the lack of corneal donors in Japan, post-surgical complication, and recurrence of corneal dystrophy after corneal transplantation. In the present study, we have developed in vitro model of corneal dystrophy using the synthetic peptides corresponding to corneal dystrophy. Using thioflavin T, an amyloidophilic fluorescent reagent, was effective in the breakdown of the amyloid fibrils in the in vitro model of corneal dystrophy. Thus, we have developed basic model of the photodynamic therapy on the corneal dystrophy.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜ジストロフィー 角膜混濁 アミロイド チオフラビンT 光線力学療法 角膜移植 レーザー治療

1. 研究開始当初の背景

失明につながりうる遺伝性角膜疾患である角膜ジストロフィーは、原因遺伝子である TGFBI が同定されたことがきっかけとなり、病態解明が進んだとともに、発症前の遺伝子検査を行うことも可能となった。しかしながら、その治療法については大きく変化していない。

我々のグループは、角膜ジストロフィー、加齢黄斑変性症、白内障、瞼裂斑、Climatic Driplet Keratopathy などの異常凝集疾患において異常凝集を起こす蛋白質の解析を行い、非酵素的な翻訳後修飾である蛋白糖化最終産物 (AGE) 化や D-アミノ酸形成が異常凝集の引き金となり得ることを明らかにしてきた。さらに、Alzheimer 病の引き金となるアミロイドベータに対する合成ペプチドにおけるアミロイド線維形成を *in vitro* でリアルタイムに観察する系を確立し、Alzheimer 病の分子メカニズムの解明を行ってきた。本研究は、これらの二つのアプローチを、フォールディング病の一つである角膜ジストロフィーに集約する。その結果、角膜ジストロフィーの分子レベルでの発症メカニズムを解明するとともに、新しい治療法や予防法を開発することを目的とする。本研究は、フォールディング病における異常凝集蛋白質の直接的分解を行う初めての疾患となるはずである。

2. 研究の目的

1. 角膜ジストロフィーにおける AGE 化・D-アミノ酸形成の解析

病因遺伝子の産物と、病変における異常凝集物が異なることがしばしば観察される。角膜ジストロフィーにおける異常凝集物を同定するために、角膜移植標本において異常凝集を生じている蛋白質の種類および非酵素的な翻訳後修飾 (AGE 化や D-アミノ酸形成) の有無について解析を行う。

2. 合成ペプチドを用いた角膜ジストロフィーの *in vitro* モデルの確立

正常型および変異型 TGFBI に由来する 22 アミノ酸の合成ペプチドを作成し、アミロイド化の過程を *in vitro* で評価する。

3. アミロイド親和蛍光色素とレーザーを用いた光線力学療法の開発

in vitro で異常凝集により生じたアミロイド線維のみを分解し、非凝集蛋白質には影響を与えないような光線力学療法を開発する。

4. 合成ペプチドを用いた角膜ジストロフィーの予防薬の開発およびスクリーニング

アミロイド線維形成過程抑制するようなペプチドあるいは薬剤を分子設計し、角膜ジストロフィーの予防点眼液の候補とする。

5. 合成ペプチド強制発現による角膜ジストロフィーの *in vivo* モデルの開発

6. 角膜ジストロフィーの *in vivo* モデルを用いた光線力学療法の評価

本研究 3 および 4 により得られた角膜ジストロフィーに対する光線力学療法および予防点眼液の効果について、本研究 5 で得られた *in vivo* モデルを用いて評価をする。この結果をもって、角膜ジストロフィーに対する光線力学療法と予防点眼液の臨床治験の準備とする。

3. 研究の方法

研究計画・方法 (概要)

1. 角膜ジストロフィーの切除検体における異常凝集物の組成と非酵素的翻訳後修飾の検出

角膜ジストロフィーの角膜病理検体より Laser Microdissection を用いて異常凝集蛋白質を切り出し、2 次元電気泳動と、そのスポットの質量分析解析を行うことにより、異常凝集物を構成する蛋白質の種類を同定する。同時に異常凝集蛋白質の 2 次元電気泳動後に抗 AGE 抗体および抗 D-アミノ酸含有蛋白質抗体を用いて Western Blot を行うことに

より、AGE 化あるいは D-アミノ酸を含んだ蛋白質を同定する。同定された蛋白質が多い場合には、蛋白質の中で AGE 化された領域および L-D-アミノ酸に変換された部位を同定する。

2. 合成ペプチドを用いた角膜ジストロフィーの in vitro モデルの確立

正常型および変異型 TGFBI に由来する 20 アミノ酸の合成ペプチドを作成し、アミロイド化の過程を in vitro で評価する。具体的には、アミロイド親和蛍光色素である Thioflavin T を用いて、溶液中のアミロイドの量をリアルタイムに計測する。

3. アミロイド親和蛍光色素とレーザーを用いた光線力学療法の開発

アミロイドと結合することにより特異的な蛍光を発する Thioflavin T を用いてアミロイドを標識し、440nm の波長を有するレーザーを照射することによりアミロイド線維を特異的に分解する。

4. 合成ペプチドを用いた角膜ジストロフィーの予防薬の開発およびスクリーニング

正常型 TGFBI 由来合成ペプチド、およびその N/C 末端を修飾した産物を合成し、変異型 TGFBI のアミロイド線維形成を抑制できるかどうかを in vitro で評価する。

5. 合成ペプチド強制発現による角膜ジストロフィーの in vivo モデルの開発

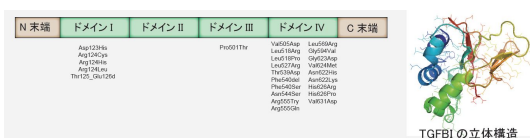
変異型 TGFBI のペプチドを角膜において強制発現させることにより、角膜ジストロフィーの動物モデルを作成する。

6. 角膜ジストロフィーの in vivo モデルを用いた光線力学療法の評価

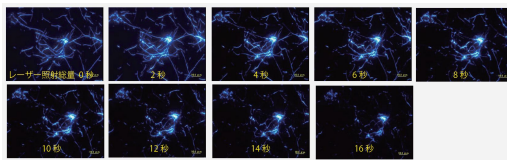
本研究 3 および 4 により得られた角膜ジストロフィーに対する光線力学療法および予防点眼液の効果について、本研究 5 で得られた in vivo モデルを用いて評価をする。この結果をもって、角膜ジストロフィーに対する光線力学療法と予防点眼液の臨床治験の準備とする。

4. 研究成果

角膜ジストロフィーにおける遺伝子変異と生じるアミロイドの関係より、アミロイド症性の中心部位を同定した。さらにアミロイド形成に関わる TGFBI 遺伝子の中で 22 個のペプチドを合成した。角膜ジストロフィーは動物モデルがないことや、ヒトでは発症するまでに数十年の時間が必要という問題があるが、我々の in vitro モデルを用いることにより 24 時間以内にアミロイド生成を再現することができた。すなわち、角膜ジストロフィーの in vitro モデルを完成することができた。

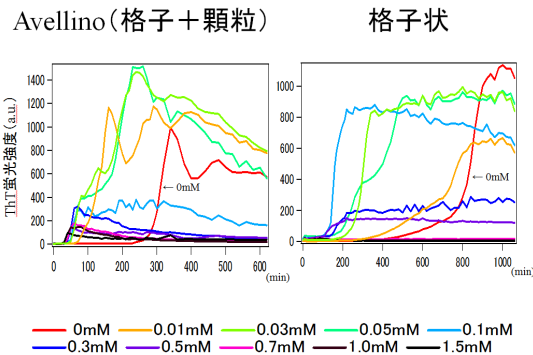


アミロイド線維に親和性のある色素の中でチオフラビン T に着目した。チオフラビン T はアミロイドと特異的に結合し、蛍光を発することによりアミロイドの生成量を定量する場合や、アミロイド線維の微細携帯の把握に役立つ。さらに我々はチオフラビン T で標識したアミロイド線維に対してグリーンレーザーを照射することにより、経時的にアミロイド線維を分子レベルで断片化させることに成功した。すなわち、従来は角膜移植しか治療手段のなかった角膜移植に対して、光線力学療法が加納であることを in vitro で証明することができた。



角膜ジストロフィーの in vitro モデルが完成したことにより、角膜ジストロフィーの発症に関わる生活環境を同定することも可能となった。我々は市販の点眼薬の多くに含まれる防腐剤である塩化ベンザルコニウムは、ごく低濃度であったとしてもアミロイド生成を促進させることを発見した。このことによ

り、角膜ジストロフィ患者に対しては塩化ベンザルコニウムを含まない点眼液を使用すべきであると考えられた。



角膜ジストロフィの原因となる TGFBI 遺伝子に変異を加え、マウスの TGFBI 遺伝子にノックインした動物を作成した。この遺伝子変異マウスの一部には角膜混濁を生じることより、角膜ジストロフィに対する治療法の評価に使用できると考えられる。

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 14 件)

Kaji Y, Oshika T, Nejima R, Mori S, Miyata K, Fujii N. Immunohistochemical localization of d-β-aspartic acid-containing proteins in pterygium. J PharmBiomed Anal. 2015 Feb 7. pii: S0731-7085(15)00096-5. 査読有
doi:10.1016/j.jpba.2015.01.057.

Segawa H, Kaji Y, Leproux P, Couderc V, Ozawa T, Oshika T, Kano H. Multimodal and multiplex spectral imaging of rat cornea ex vivo using a white-light laser source. J Biophotonics. 2014 Nov 6;9999(9999). 査読有
doi: 10.1002/jbio.201400059.

Kato Y, Yagi H, Kaji Y, Oshika T, Goto Y. Benzalkonium chloride accelerates the formation of the amyloid fibrils of corneal dystrophy-associated peptides. J Biol Chem.

288(35):25109-25118, 2013. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M113.477695.

Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Fujii N. Co-localisation of advanced glycation end products and D-β-aspartic acid-containing proteins in gelatinous drop-like corneal dystrophy. Br J Ophthalmol. 96(8):1127-1131, 2012. 査読有

Kaji Y, Yamashita M, Sakakibara J, Oshika T. Visualization of irrigation fluid flow and calculation of its velocity distribution in the anterior chamber by particle image velocimetry. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 250(7):1023-1027, 2012. 査読有

[学会発表](計 33 件)

Yuichi Kaji, Tetsuro Oshika, Ryohei Nejima, Saiyo Mori, Kazunori Miyata, Noriko Fujii. Immunohistochemical localization of D-β-aspartic acid-containing proteins, a molecular marker of aging, in pterygium. Asia Association of Research in Vision and Ophthalmology 2015 年 2 月 16 ~ 19 日, パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川県。

加治優一, 子島良平, 森洋斉, 宮田和典, 大鹿哲郎. 翼状片における過酸化脂質の沈着と喫煙との関係筑波眼科集談会, 2015 年 2 月 8 日, 筑波国際会議場, つくば市, 茨城県

加治優一. 喫煙が誘発する異常蛋白凝集疾患におけるアクロレインの沈着. 第 4 回蛋白質の異常凝集研究会. 2014 年 12 月 11 日, 京都大学原子炉実験所, 泉南郡, 大阪府。

加治優一. 角膜ジストロフィー治療の新

展開．石川オキュラーサーフェス研究会
2014年11月20日，ホテル日航金沢，石
川県

Yuichi Kaji. Protein-based inhibitors of
corneal amyloidosis. JSPS Japan
Hungary Joint Seminar. Mechanism and
regulation of aberrant protein
aggregation. 2014年11月18日～20日(発
表は18日)大阪大学蛋白質研究所ホール，
大阪市．

加治優一，子島良平，森洋斉，宮田和典，
大鹿哲郎．翼状片における脂質過酸化最終
産物の一種 アクロレインの局在．第24回
日本メイラード学会年会．2014年11月7～
8日．本市国際交流会館(熊本市，熊本県)

加治優一，赤松恵，富所康志，玉岡晃，
加納英明，大鹿哲郎．シンポジウム「白内
障基礎の最前線」水晶体はアルツハイマー
病の早期診断に利用可能か？第53回日本
白内障学会総会．2014年9月27～28日
TKP ガーデンシティ品川(品川区，東京都)

加治優一．角膜ジストロフィと塩化ベン
ザルコニウム．第25回日本緑内障学会総
会．2014年9月19～21日．大阪国際会議
場(大阪市，大阪府)

加治優一，加納英明，瀬川尋貴，大鹿
哲郎．白色レーザーを用いたコヒーレン
ト・ラマン分光による *ex vivo* 角膜の非染
色マルチカラー・イメージング．角膜カ
ンファランス2014．2014年1月30日～2
月1日，沖縄コンベンションセンター(那
覇市，沖縄県)

加治優一．角膜ジストロフィー：日本
発の新規治療法をめざして．第19回北陸
眼科シンポジウム．2014年3月2日．福
井商工会議所(福井市，福井県)

Yuichi Kaji, Takahiro Hiraoka, Tetsuro
Oshika. Ambisome in patients who cannot
tolerate conventional topical formulations
(Fungizone). World Ophthalmic Conference

2014 TOKYO 2014年4月2～6日 東京国
際フォーラム(中央区，東京都)

加治優一，大鹿哲郎．白内障手術が加齢
黄斑変性症に及ぼす影響に関する新しい解
釈．第118回日本眼科学会総会

2014年4月2～6日．東京国際フォーラム
(中央区，東京都)

加治優一．医学系シンポジウム『メイ
ラード反応と疾患』AGE 沈着病としての
眼疾患．第23回日本メイラード学会

2013年11月29日．ナレッジキャピタル
コングレコンベンションセンター(大阪
市 大阪府)

加治優一，高澤豊，深山正久，藤井紀
子．椎間板変性におけるD-アミノ酸含有
蛋白質の局在．第6回タンパク質の異常
凝集とその防御・修復機構に関する研究
2013年11月14日～15日．京都大学原子
炉実験所事務棟会議室(泉南郡，大阪府)

Hiroki Segawa, Yuichi Kaji, Hideaki Kano,
Takeaki Oazwa . Development of
multi-modal multi-photon spectral
microscope for three-dimensional imaging of
rat cornea *ex vivo*. RSC Tokyo International
Conference 2013- Analytical Biochemistry
& Biophysics -September 5 - 6, 2013 ,
RSC(Royal Society of Chemistry) Tokyo
International Conference

Hiroki Segawa, Yuichi Kaji, Hideaki Kano,
Takeaki Oazwa . *Ex vivo* Multimodal
Nonlinear Spectral Imaging of Rat Cornea
Using a White-light Supercontinuum. 7th
International Conference on Advanced
Vibrational Spectroscopy. August 25-30,
Kobe Conventional Center, Kobe, Japan.

Yuichi Kaji, Hisashi Yagi, Yusuke Kato,
Yuji Goto, Tetsuro Oshika. Benzalkonium
chloride accelerates amyloid fibril
formation in corneal dystrophies *in vitro*.
Association for Research in Vision and

Ophthalmology.5月5日~9日(発表は8日),(シアトル,アメリカ)

加治優一.オキュラーサーフェスに生じる加齢性変化の病態と対策.西日本オキュラーサーフェスクラブ20132013年4月13日,ホテル日航福岡(福岡市,福岡県)

〔図書〕(計 11件)

加治優一.高血糖で悪玉物質「AGE」が増えると目の網膜に蓄積し黄斑変性のゆがみが起こる.健康365,「黄斑変性・緑内障」54-56ページ 総170ページ,2014年10月号,H&I出版 編集者 安田高弘.

加治優一「AGEs とドライアイとの関連性は何を示されていますか」老化物質 AGEs ワールドに迫る!アンチエイジングのための100の質問.編集 山岸昌一.メディカルレビュー社.168-169ページ,総227ページ,2014年6月発刊.

加治優一 AGEs と糖尿病網膜症 AGEs と老化 糖化制御からみたウェルエイジング 117-124ページ,総278ページ.2012年12月,メディカルレビュー社(太田博明監修,山岸昌一編集)

加治優一.角膜ジストロフィに対する新しい治療.臨床眼科増刊号「オキュラーサーフェス診療」66(11):375-378,2012 総378ページ,2012年11月号,医学書院,編集者:天野史郎

加治優一.糖化・酸化による目の老化の代表が白内障で紫外線が AGE の水晶体沈着を助長.健康365,「黄斑変性・緑内障・白内障」30-31ページ,総162ページ,2012年4月号,H&I出版,編集者 安田高弘.

加治優一.加齢黄斑変性は網膜の中心に AGE が沈着して起こり喫煙者は特に発症しやすい.健康365,「黄斑変性・緑

内障・白内障」32-33ページ,総162ページ,2012年4月号,H&I出版,編集者 安田高弘.

〔産業財産権〕

出願状況(計 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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://kajiyuichi.jimdo.com/>

6.研究組織

(1)研究代表者

加治 優一 (KAJI, YUICHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号:50361332

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: