

学位授与番号：乙 3 0 8 3 号

氏 名：小笠原 幹英

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 26 年 3 月 12 日

学位論文名：

KRT12 Mutations and In Vivo Confocal Microscopy in Two Japanese Families With Meesmann Corneal Dystrophy.

（ミースマン角膜ジストロフィーの日本人 2 家系における KRT12 遺伝子変異とコンフォーカルマイクロスコーピー所見）

主論文名：

KRT12 Mutations and In Vivo Confocal Microscopy in Two Japanese Families With Meesmann Corneal Dystrophy.

（ミースマン角膜ジストロフィーの日本人 2 家系における KRT12 遺伝子変異とコンフォーカルマイクロスコーピー所見）

学位審査委員長：教授 岡部正隆

学位審査委員：教授 大橋十也 教授 岡本愛光

学 位 論 文 要 旨

論文提出者名	小笠原 幹英	指導教授名	常岡 寛 教授
<p>主 論 文 題 名</p> <p><i>KRT12</i> Mutations and In Vivo Confocal Microscopy in Two Japanese Families With Meesmann Corneal Dystrophy.</p> <p>(ミースマン角膜ジストロフィーの日本人2家系における <i>KRT12</i>遺伝子変異とコンフォーカルマイクロスコープ所見)</p> <p>ジャーナル名 : American Journal of Ophthalmology</p>			
<p>要旨</p> <p>ミースマン角膜ジストロフィーと診断された日本人の2家系5患者に対し、<i>KRT3</i>、<i>KRT12</i> 遺伝子検査、角膜上皮のフルオレセイン染色を含む細隙灯顕微鏡検査と、コンフォーカルマイクロスコープ検査を行った。</p> <p>細隙灯顕微鏡では全患者の角膜上皮内に無数のマイクロシストが見られた。若年症例にはクリアゾーンがみられ、高齢症例には淡い上皮下混濁が認められた。コンフォーカルマイクロスコープ検査では、多数の角膜上皮内マイクロシストと、変性細胞と考えられた高輝度物質がみられ、高齢患者では角膜上皮の基底層近くに確認された。浅層は拡大したマイクロシストを多く含み、深層と比較して高輝度物質は萎縮した。コンフォーカルマイクロスコープ検査で、マイクロシストと正常上皮細胞の間の境界線は明瞭に描出され、細隙灯顕微鏡で観察されたクリアゾーンの境界線と一致した。その家系での症状を持つ患者にのみ、<i>KRT12</i> 遺伝子に2つの遺伝子変異(Q130P、L140Q)をヘテロ接合で認め、そのうち1つ(L140Q)は新規変異であった。</p> <p>結論として、われわれはミースマン角膜ジストロフィーの1つの家系において <i>KRT12</i> 遺伝子に新規変異を確認し、さらにコンフォーカルマイクロスコープ検査を介し、ミースマン角膜ジストロフィー患者の生体角膜における、過去には報告されていない深度別の微細構造変化を明らかにした。</p>			

論文審査の結果の要旨

小笠原幹英氏の学位申請論文は、主論文 1 編からなり、主論文は「KRT12 Mutations and In Vivo Confocal Microscopy in Two Japanese Families With Meesmann Corneal Dystrophy.」日本語では「ミースマン角膜ジストロフィーの日本人 2 家系における KRT12 遺伝子変異とコンフォーカルマイクロスコープ所見」という題名の英文論文で、Am J Ophthalmol 誌 (IF=3.631) に発表されております。以下、論文要旨と審査委員会の審査結果をご報告いたします。

ミースマン角膜ジストロフィーは、角膜上皮内に無数のマイクロシストが存在する常染色体優性遺伝の稀な疾患です。マイクロシストは角膜表層でびらんを引き起こすため、臨床症状はドライアイとよく似ています。

小笠原氏は、ミースマン角膜ジストロフィーと診断された日本人の 2 家系 5 患者に対し、原因遺伝子として知られている KRT3、KRT12 遺伝子の検査と、角膜上皮のフルオレセイン染色を含む細隙灯顕微鏡検査、さらにコンフォーカルマイクロスコープ（共焦点レーザー顕微鏡）検査を行いました。

細隙灯顕微鏡では、全患者の角膜上皮内に無数のマイクロシストが観察されました。高齢症例には淡い角膜の上皮下混濁が認められました。マイクロシストが存在しない透明な角膜の領域、これをクリアゾーンと呼びますが、若年症例にはこのクリアゾーンが観察されました。クリアゾーンの詳細な報告は過去になく、小笠原氏は、数年の経過でクリアゾーンの所見変化を初めて観察し報告しました。

コンフォーカルマイクロスコープ検査では、多数の角膜上皮内マイクロシストとともに、変性した細胞と考えられる高輝度物質が観察されました。高輝度物質は角膜の表層に多く観察されましたが、高齢患者では角膜上皮の表層から深層の基底層近くまで認められ、高齢になるほど病変が深層まで存在することを確認しました。また、浅層は拡大したマイクロシストを多く含み、深層と比較してマイクロシスト内に存在する高輝度物質は萎縮していました。これより、角膜上皮細胞が表層へ移動していく過程で、マイクロシストは徐々に拡大するが、反対に内部の高輝度物質は縮小すると考えられました。さらに、若年症例では、細隙灯顕微鏡で観察されたクリアゾーンの境界線と、コンフォーカルマイクロスコープで観察されるマイクロシストと正常上皮細胞の間の明瞭な境界線が一致しました。

3 世代における相違点や深度別の考察を示したこと、細隙灯顕微鏡でみられたクリアゾーンの所見がコンフォーカルマイクロスコープ検査で再現されることは、どちらも小笠原氏が初めて報告したことでもあります。

ゲノム DNA を用いた遺伝子検査では KRT12 遺伝子に 2 つのヘテロ接合変異 (Q130P、L140Q) を認め、それは日本人家系では 7 例目と 8 例目の KRT12 の遺伝子変異であります。特に L140Q は新規変異でありました。

ミースマン角膜ジストロフィーの変異は、alpha-Helix Rod domain に存在しています。KRT12 変異の部位は helix-initiation motif と helix-termination motif に集中して存在し、

KRT3 変異の部位は **helix-termination motif** に認められています。本研究での KRT12 変異は **helix-initiation motif** に存在していました。変異の位置と症状の強さとの相関を過去の報告と比較検討したところ、過去のほとんどの症例で症状を有していたものの、強さの詳細な記載はなく、症例ごとの程度判定は困難で、表現型と遺伝型の相関は未だ不明であります。

去る平成26年2月26日、大橋十也教授、岡本愛光教授のご臨席のもと、公開学位審査委員会を開催し、小笠原幹英氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験を行いました。席上、

- ・角膜のターンオーバーは何日くらいなのか
- ・マイクロシストの存在で鑑別診断はどんなものがあるのか
- ・コンフォーカルマイクロスコーピーの普及率はどの程度か
- ・コンフォーカルマイクロスコーピーで観察された高輝度物質の実体はなにか
- ・本邦での頻度はどのくらいか
- ・頻度に人種差はないのか
- ・優性遺伝であるが、原因は **Dominant negative** なのか **haploinsufficiency** なのか
- ・家系内で表現型は同じなのか
- ・遺伝子改変マウスの症状とこの疾患の症状の関係はどうなっているのか
- ・変異タンパク質の構造変化の検索をしたのか
- ・クリアーゾーンが生じるメカニズムをどう考えるか
- ・この疾患で発症前診断をすることに関してどう考えるか

など多くの質問があり、小笠原氏は的確に回答いたしました。

その後、大橋十也教授、岡本愛光教授と慎重に審議した結果、本論文は、KRT12 遺伝子に新規変異を確認したこと、1つの家系の3世代を観察し病状の変化について確認したこと、コンフォーカルマイクロスコーピー検査を介し、生体角膜における深度別の微細構造変化を観察するなど、学位申請論文として十分価値があるものと認めた次第です。