

厚生科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

オキュラーサーフェイスの臨床的評価法と外科的リハビリテーション法の開発に関する研究

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 木下 茂

平成 13 (2001) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書

オキュラーサーフェイスの臨床的評価法と外科的リハビリテーション法の開発に関する研究 --- 1
木下 茂

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 6

III. 分担研究報告

1. 自己角膜上皮幹細胞移植術の開発 ----- 16
今西二郎
2. 遺伝子導入による拒絶されにくい角膜組織開発の研究 ----- 17
佐野洋一郎
3. 角膜への遺伝子導入法の開発に関する研究 ----- 18
山本修士
4. 角膜創傷治癒過程におけるニューロプシンの発現 ----- 19
大橋裕一
5. 前眼部形成不全における PAX6 遺伝子変異と角膜疾患の遺伝子治療に関する研究 ----- 20
東 範行
6. 重症 ocular surface 疾患に対する角膜上皮培養移植 ----- 24
坪田一男

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

（総合）研究報告書

オキュラーサーフェイスの臨床的評価法と
外科的リハビリテーション法の開発に関する研究

主任研究者 木下 茂 京都府立医科大学眼科学教室教授

研究要旨：H10-12 の本研究では、ocular surface 疾患の早期臨床評価法および診断法の確率と重症の ocular surface 疾患に対する新しい外科的治療法の開発を行った。H10 年度には涙液油層観察装置、無侵襲瞬きアナライザー、モイスチャーセンサーの開発を行い、これらの装置がドライアイの簡便かつ確な早期診断法として有用であることが示された。H11 年度には涙液メニスカス曲率半径を非侵襲的に計測できるシステム（ビデオメンスコメーター）を開発し、臨床応用にてその有用性が示された。また、重症 ocular surface 疾患に対する新しい外科的治療として羊膜を基質とした角膜上皮シートの作成に成功した。H10 年度には家兎を用いた研究によりその有効性が確認された後、16 眼の難治性の癬痕性角結膜上皮疾患に対しヒト羊膜を用いた基質移植を行い、上皮修復において良好な結果を得た。H11 年度には羊膜基質移植に死体からの角膜上皮幹細胞移植を同時に行い角膜透明治癒率および術後視力において良好な結果が得られた。H12 年度には in vitro での培養角膜上皮シートを作成し、術後より眼表面が健全な上皮により完全に被覆されている状態とすることにより、より安定した角膜上皮被覆および透明治癒率が得られた。また、拒絶されにくい角膜移植片の作成を目的とした研究における角膜組織への遺伝子導入技術の開発では、H10 年度には EVB プラスミド、HVJ-リポソームまたは PAMAM デンドリマーを用いた複合ベクターを作成し、このベクターの前房内注入による虹彩、角膜における遺伝子発現が確認された。H11-12 年度には遺伝子導入を行ったマウス角膜移植モデルを作成し、in vivo において移植角膜片での導入遺伝子の発現が確認された。さらに遺伝子操作の標的として疾患の原因遺伝子を検索した結果、H10 年度には Peters 奇形を含む前眼部形成不全 5 例で PAX6 の遺伝子変異が見いだされた。また、格子状角膜変性 III 型および Reis-Bucklers 角膜変性症においてケラトエピセリン遺伝子の変異が認められた。H11-12 年度には先天無虹彩、角膜上皮変性症 (map-dot-finger print dystrophy)、斑状角膜変性症の原因遺伝子を同定した。

H10-12 年度の 3 年間の研究の結果、ocular surface 疾患における臨床的評価法および早期診断法が開発され、ドライアイのスクリーニング法として今後この検査法が普及していくものと考えられた。さらに、我々が開発した新しい外科的治療は、多施設に普及しつつあり、これまで同疾患により視力回復が困難であった多くの人に福音をもたらすものとする。さらに、我々の研究成果が遺伝子操作による治療法の開発にむけて大きく貢献することは間違いないものと考えられる。

分担研究者

今西 二郎（京都府立医科大学微生物学教室） 大橋 裕一（愛媛大学医学部眼科）

佐野洋一郎（京都府立医科大学医学部眼科） 東 範行（国立小児病院眼科）

山本 修士（大阪大学医学部眼科）

坪田 一男（東京歯科大学眼科）

A. 研究目的

Ocular surface を障害させる疾患は多岐にわたるが、その有効な早期臨床評価法および治療法が確立していないために視覚障害者が国内外に数多く生じている。そこで全国に 1,000 万人規模で存在するとされるドライアイ患者を的確にスクリーニングすることを目的とした簡便な臨床的評価法の開発、および重症化した ocular surface 疾患に対する有効な外科的治療法として、新しい概念の生体組織を用いた角膜移植の開発とその臨床応用の可能性を探索した。具体的には、異種角膜移植の開発や、羊膜移植による基質移植や角膜上皮幹細胞移植、そして眼表面疾患の原因遺伝子を検索し、その病態発生のメカニズムを解明することにより、それらの遺伝子を標的とした遺伝子導入技術を確立し、拒絶されにくい角膜移植組織の開発という新しいタイプの ocular surface の外科的リハビリテーション法の開発を目的とした。

B. 研究方法

以下の研究において、臨床研究は Helsinki 宣言に基づき患者に対して十分な informed consent をとった上で行った。動物実験には、ARVO の規約に基づき動物愛護の精神に配慮した上で行った。

1. ドライアイのスクリーニング法の開発

1) 涙液油層を観察する装置の完成。開発した涙液表面の油層観察装置を用いてドライアイのスクリーニングが可能かどうかについて検討した。また、多施設によるプロスペクティブスタディを施行し、本装置の普遍性について検討した。2) 新しい涙液の評価法の開発。ドライアイの新しいスクリーニング法として、瞬目に着目し、無侵襲瞬きアナライザーと眼表面からの涙液蒸発量を測定するモイスチャーセンサーを開発し、正常者とドライアイ患者について眼瞼の開閉時間および涙液蒸発量を測定し、比較検討した。3) 涙液メニスカス曲率半径 (R) を非侵襲性に計測できるシステム (ビデオメニスコメーター) を開発し、その臨床応用を試みた。ドライアイ患者、健常者、および涙点プラグを挿入したドライアイ患者を対象としてビデオメニスコメーターを用

いて R を算出し、3 群の R を比較検討した。さらにドライアイ患者と健常者における R とシルマー I 法、綿糸法、および Fluorescein breakup time (F-BUT) との関係について検討した。

(2) 羊膜を基質とした外科的治療法の開発

1) 羊膜移植の基礎ならびに臨床検討。家兎羊膜上に家兎の角膜片をのせ、数日培養し羊膜をメチレンブルーで染色、伸展した家兎角膜上皮の面積を測定した。また角結膜上皮の羊膜への接着・角結膜上皮の伸展について組織学的な検討を行った。臨床検討は 1998 年 4 月から 1999 年 1 月までの間に 16 眼の難治性の瘢痕性角結膜疾患に対し、凍結保存しヒト羊膜を用いた基質移植を行い、術後、角結膜の上皮修復、結膜下組織の再増殖や瘢痕形成、視力、合併症などを検討した。2) 重症 ocular surface 疾患と角膜輪部機能障害を合わせ持つ患者に対して、死体から摘出された角膜上皮の幹細胞移植を実施し、角膜の透明治癒率および術後視力を検討した。ocular surface 組織が破壊されている場合、上皮形成のための基質として羊膜を用いた。3) 羊膜移植を施行している 4 医療機関より、凍結保存された羊膜 7 ロットを入手し、羊膜上皮の走査型電子顕微鏡および光学顕微鏡による形態観察、タネル法によるアポトーシスの検出、EGF、HGF の免疫染色と ELISA による EGF、HGF の定量を行った。4) 重症 ocular surface 疾患と角膜輪部機能障害を合わせ持つ 13 眼に対して、羊膜を基質とし親族あるいは死体から採取した角膜上皮を培養し作成した角膜上皮シートを移植し、角膜上皮再生について検討した。

2. 角膜組織への遺伝子導入法の確立

1) マーカー遺伝子を有する、EBV-プラスミドベクターと、通常のプラスミドベクターを、HVJ-リポソーム、PAMAM デンドリマー、または PEI とコンジュゲートした複合ベクターを作成した。ラットまたはウサギの結膜下と前房内にベクターを注入し、マーカー遺伝子の発現を検出した。特異性を検証する目的で、免疫組織化学にても解析した。2) マウスを用いて全層角膜移植を施行した。ドナー角膜に soluble Fas ligand を生じない mutant Fas

ligand をアデノウィルスベクターを用いて遺伝子導入し、生着率を検討した。角膜組織内における遺伝子導入効率を β -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み換えたアデノウィルスベクターを用いて確認した。マウス角膜に lamellar keratotomy を行い、MPS7 の角膜実質に分泌型酵素 β -glucuronidase 遺伝子を組み込んだアデノウィルスを注入し、角膜内の β -glucuronidase 活性の測定、凍結切片での β -glucuronidase 染色、電子顕微鏡下での角膜実質内混濁の貯留物の変化を観察した。

3. 角膜疾患原因遺伝子の検索

1) 前眼部形成不全患者 55 例、先天無虹彩 42 例および優性遺伝形式の角膜変性症患者 78 家系の末梢静脈血を採取し、ゲノム DNA を調整した。前眼部形成不全患者では各症例の PAX 6 遺伝子 14 exon を PCR 法で増幅し、SSCP 法によって変異の有無をスクリーニングした。異常バンドのみられたものに関しては、直接法および subcloning によって塩基配列を決定した。また、PAX6 とプログラム細胞死の関係を生化学的検討するため、PAX6 cDNA を強制発現プラスミドと Bcl-2 promoter あるいは Bax promoter につないだ CAT を reporter として CAT assay を行った。さらに PAX6 cDNA を強制発現プラスミドと PAX6 pair domain の binding consensus を pCATbasic に組み込みマウス embryonic carcinoma P19 細胞を用いて CAT assay を行った (dose dependent regulatory assay)。2) 角膜変性症患者ではケラトエピセリンを目標にした候補遺伝子アプローチを施行し、全症例の原因遺伝子変異を検索した。164 家系の角膜疾患患者および家族より同意を得た後、染色体 DNA 抽出用採血に協力いただいた。格子状角膜変性の原因遺伝子とされるケラトエピセリンをターゲットにした候補遺伝子アプローチ法により解析した。250 家系の斑状角膜ジストロフィ患者より採血を行い、変異遺伝子を解析した。遺伝子解析の方法は、基本的に候補遺伝子アプローチ法あるいは、ポジショナル・クランチデート法を用いて解析した。変異のスクリーニングには SSCP 法を用いて、患者さんの候補遺伝子のエクソン領域を増幅して解析した。

変異の決定は、DNA シークエンス法により、塩基配列を決定し、患者家族内で変異の有無が眼疾患の発症と一致しているか否かを検討した。

C. 研究結果

(1) ドライアイのスクリーニング法の開発

1) 涙液油層観察装置の有用性。涙液油層観察装置の実用化の可能性を検討するため、多施設でのプロスペクティブスタディを行ったところ施設間での結果の一致率は 83.9% であった。また疾患のスクリーニング法としての感度は 53.7%、特異度は 97.8% であった。従ってこの装置はドライアイのスクリーニング法として普遍性があり、特異度が高い診断法であることが示された。2) 無侵襲瞬きアナライザーとモイスチャーセンサーの有用性。無侵襲瞬きアナライザーにより一回の瞬きから次の瞬きの時間を求めた結果を比較すると、ドライアイ患者は正常者より数多く瞬きし一回の瞬き時間が短いことが示された。また、モイスチャーセンサーにより涙の蒸発量を比較すると正常者の蒸発量がドライアイ患者より多いことが明らかにされた。これらの診断法もドライアイのスクリーニング法として有用であることが示唆された。

3) 涙液メニスカス曲率半径(R)は、ドライアイ患者で有意に小さく、プラグ眼で有意に大きかった。また、R とシルマー-I 法、綿糸法、F-BUT のいずれにおいても有意な相関を認めた。さらに R のカットオフ値を 0.24 mm とすれば、感度が 92.3%、特異度が 100% となり、既存の検査に比べすぐれたドライアイの診断のパラメーターになると思われる。

(2) 羊膜を基質とした外科的治療法の開発

1) 羊膜移植の基礎ならびに臨床検討。羊膜上での角膜上皮の増殖、伸展。培養 5 日後の羊膜上の角膜上皮化面積 (cm²) は 0.031+/- 0.059 に対し上皮を除いた羊膜では 0.979+/- 0.353 であった。光学顕微鏡および電子顕微鏡にて角膜上皮の伸展および羊膜との接着構造 (ヘミデスモゾーム) の形成が認められた。2) 角膜上皮幹細胞移植後、角膜の上皮形成が全体の 51% において認められた。このうち 30% には角膜組織の浮腫が認められたが、その他の眼には角膜の透明化が確認できた。平均視力

が 0.004 から 0.02 に回復した。角膜の透明化が維持されていた眼については、最終的な平均視力が 0.11 にまで回復した。3) 羊膜移植を施行している 4 医療機関からの 7 つのロットのうち形態学的に上皮がほぼ消失しているものと脱落しているものが 1 ロットずつ、減少しているものが 2 ロット、健常のものが 2 ロットあった。タネル法では脱落しているものでほぼ 100%、減少しているもので約 50%、健常のものでわずかにアポトーシス陽性細胞を認めた。また免疫染色および ELISA で、EGF は上皮の健常性と相関したが、HGF は相関を認めなかった。各ロットの臨床経過が不良であったという情報はなかった。4) 重症 ocular surface 疾患と角膜輪部機能障害を合わせ持つ 13 眼中 8 眼 (61.5%) で術後平均 19.9 日で角膜上皮再生が認められた。うち 2 眼は上皮欠損を生じたが他の 6 眼 (46.2%) で角膜上皮は維持された。また、5 眼で結膜化、1 眼で皮膚化、1 眼は上皮がまったく再生されなかった。角膜上皮の培養移植の成功率も 46.2%に留まったことから、従来の方法と大差がないことがわかった。

(2) 角膜組織への遺伝子導入法の確立

1) 非ウイルスベクターによる遺伝子導入。ラットまたはウサギの結膜下と前房内に非ウイルスベクターを注入し、マーカー遺伝子の発現を検出した。結膜下注入では結膜線維芽細胞に、前房内注入では主として虹彩角膜角部に発現が見られた。組織学的に細胞障害、炎症像等は認めなかった。2) マウスを用いて全層角膜移植を施行した。ドナー角膜に soluble Fas ligand を生じない mutant Fas ligand をアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、生着率を検討した。アデノウイルスベクターでの角膜組織への遺伝子導入は高濃度ベクター溶液で 70~90%の、低濃度ベクター溶液で 30~50%の角膜内皮細胞においてその発現が認められた。これらのドナー角膜組織を用いて同種異系角膜移植を行ったところ、高濃度遺伝子導入では、術後早期に移植片の混濁が認められ、またこの混濁は同系ドナー角膜を用いても同様に認められた。低濃度遺伝子導入では、術後早期の混濁は認められなかったが異系移植

片の生着において遺伝子非導入群と有意な差を認めなかった。また、Fas が欠損したドナー角膜移植片に mutant Fas ligand を遺伝子導入し移植を行った場合には、mutant Fas ligand による移植片早期混濁が認められたのに対し、ホストに Fas が欠損したマウスを用いた場合には、遺伝子導入を行わない角膜移植片と同様の生着率を示し、mutant Fas ligand による早期混濁は生じなかった。ドナー角膜組織に導入した mutant Fas ligand はドナーの Fas ではなく、ホストの Fas に結合することにより、移植片の早期混濁を生じるものと考えられた。

マウス角膜に lamellar keratotomy を行い、MPS7 の角膜実質に分泌型酵素 β -glucuronidase 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを注入したところ、2日 - 2週間で生化学的に角膜内の β -glucuronidase 活性上昇がみられ、染色にて角膜実質に広汎に酵素の発現がみられた。電子顕微鏡では、角膜実質内の沈着物は顕著に減少し、術後 1 か月でも再増加の傾向はなかった。

(3) 角膜疾患原因遺伝子の検索

Peters 奇形を含む前眼部形成不全 5 例で、E31A (Ex5; A509→C)、frameshift (Ex5; insG888)、S363L (Ex12 T1504→C)、Q422R (Ex13; A1682→G)、V54D (Ex5a; T20→A) の変異が見いだされ、ヒト前眼部の形成において PAX 6 が重要であることが示された。蛋白の生化学的検討で、野生体に比べて R26G では 100 倍、V54D では 2-3 倍の結合能の変化が起こり、変異のあった部位の重要性が明らかになった。優性遺伝形式の角膜変性症において格子状角膜変性症 III 型はケラトエピセリン遺伝子の 501 番目のアミノ酸がプロリンからスレオニンへ、また Reis-Bücklers corneal dystrophy で新しい原因遺伝子として 124 番目のアミノ酸がアルギニンからロイシンへ変異することにより生じることが明らかとなった。先天無虹彩では、3 例で 11 番染色体短腕欠損、18 例で PAX6 変異がみつかった。遺伝子型と表現型に相関はなかった。PAX6 とプログラム細胞死 Bcl-2、Bax との関係を生化学的に検討したところ、CAT assay では、PAX6 は Bcl-2 を亢進し、Bax を抑制した。Peters 奇形に

みられた PAX6 変異体では、Bcl-2 においては変化がなかったが、Bax への亢進機能が抑制された。また、正常 PAX6 cDNA に比べて、paired domain の変異体 V7D は pair domain の binding consensus に対して量依存的に binding activity が低下し、転写機能が低下していることが示された。格子状角膜変性症をはじめとして 164 家系すべての家系で原因となる遺伝子変異を明らかにした。われわれの発見した格子状角膜変性症 III 型の変異 (Pro501Thr) が創始者効果によるものであることを連鎖解析にて明らかになった。従来、原因不明の角膜変性とされた疾患 (map-dot-finger dystrophy など) のなかにもケラトエピセリン遺伝子変異による症例が存在することが判明した。さらに従来原因の不明であった斑状角膜変性症の原因遺伝子が CHST6 という新しいスルフォトランスフェラーゼの異常により発症することが明らかになった。200 家系の患者さんの原因遺伝子が判明した。分子レベルでの確定診断や、遺伝カウンセリングに対応できるようになった。

D. 考察

ocular surface 疾患の早期診断法として開発した涙液油層観察装置は多施設でのプロスペクティブスタディにて施設間での結果の一致率が 83.9% と高く、また疾患のスクリーニング法としての特異度は 97.8% であり、この装置はドライアイのスクリーニング法として普遍性があり、特異度が高い診断法であることが示された。無侵襲瞬きアナライザーは一回の瞬き時間の測定によりドライアイ患者を検出することができる非常に簡便なスクリーニング法である。また、涙の蒸発量を比較するモイスチャーセンサーも有用なスクリーニング法となりうることが明らかにされた。涙液メニスカス曲率半径(R)の測定法は感度が 92.3%、特異度が 100%であり、既存の検査に比べすぐれたドライアイの診断のパラメーターになると思われた。これらのスクリーニング法はいずれもドライアイを異なる角度から検出する方法であり、これら単独あるいは複数の組み合わせにより非常にすぐれたドライアイスクリーニング法が確立されるものと考えられた。難治性 ocular

surface 疾患に対する外科的治療法として我々は羊膜を基質とした手術法を開発した。初めは基質としての羊膜のみを移植し上皮の伸展を促進させる目的であったが、角膜 stem cell 移植との併用により同時に健常な角膜上皮細胞を供給することが可能となった。さらには、in vitro で羊膜を基質として角膜上皮を培養し、シートを作成後移植する培養角膜上皮移植に発展した。このシートの作成は 2 つの意味で非常に重要である。一つは移植後より健常な上皮が眼表面を被覆し、上皮欠損のない状態、すなわち炎症が生じにくい状態を移植直後から作成することができることである。もう一つは in vitro での培養上皮が臨床応用できることより、in vitro での培養中に操作した角膜上皮シートが作成できる可能性が示唆されたことである。現在の培養角膜上皮シートでは術後拒絶反応が高率に生じることが本研究で示された k とより、今後の課題として、in vitro 培養中に拒絶されにくい角膜上皮シートを作成することが今後の大きな課題となる。その課題に対して、角膜組織への遺伝子導入法の確立を行った。遺伝子導入を行う際には導入効率と導入による副作用が問題となる。アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入では角膜組織へ非常に高率の導入効果を認めた。また、ラットまたはウサギの結膜下と前房内に非ウイルスベクターを注入したところ、結膜下注入では結膜線維芽細胞に、前房内注入では主として虹彩角膜角部に発現が見られた。組織学的に細胞障害、炎症像等は認められず、安全な導入法であることが確認された。さらに、マウスを用いて全層角膜移植や lamellar keratotomy を行い遺伝子導入を行い、導入した遺伝子の各々の疾患モデルでの役割を検討することができた。今後、種々の遺伝子を用いて同様の研究を行うことにより、我々が目指す、拒絶反応を生じにくい角膜移植片の作成に近づけるものと確信するさらに、我々が本研究で明らかにした角膜疾患の遺伝子異常は、Peters 奇形を含む前眼部形成不全、格子状角膜変性症 III 型、先天無虹彩 map-dot-finger dystrophy 斑状角膜変性症、と多岐にわたり、これらの遺伝子異常の発見は今後これら疾患群に対する遺伝子治療において非常に重要な情報

となりうること、およびこれらの疾患を有する患者さんへの遺伝カウンセリングに対応できるようになり、社会的な貢献度の高いものと考えられた。

E. 結論

H10-12 の本研究では、ocular surface 疾患の早期臨床評価法および診断法の確率と重症の ocular surface 疾患に対する新しい外科的治療法の開発を行った。涙液油層観察装置、無侵襲瞬きアナライザー、モイスチャーセンサーの開発を行い、これらの装置がドライアイの簡便かつ的確な早期診断法として有用であることが示された。さらに涙液メニスカス曲率半径を非侵襲的に計測できるシステム（ビデオメニスコメーター）を開発し、臨床応用にてその有用性が示された。また、重症 ocular surface 疾患に対する新しい外科的治療として羊膜を基質とした角膜上皮シートの作成に成功し、家兎を用いた研究によりその有効性が確認された後、16 眼の難治性の瘢痕性角結膜上皮疾患に対しヒト羊膜を用いた基質移植を行い、上皮修復において良好な結果を得た。さらにこの治療法を発展させ、羊膜基質移植に死体からの角膜上皮幹細胞移植の併用、さらには *in vitro* での培養角膜上皮シートを作成し、術後より眼表面が健常な上皮により完全に被覆されている状態とすることにより、より安定した角膜上皮被覆および透明治癒率が得られた。また、拒絶されにくい角膜移植片の作成を目的とした研究における角膜組織への遺伝子導入技術の開発では、EVB プラスミド、HVJ-リボソームまたは PAMAM デンドリマーを用いた複合ベクターを作成し、このベクターの前房内注入による虹彩、角膜における遺伝子発現が確認された。さらに遺伝子導入を行ったマウス角膜移植モデルを作成し、*in vivo* において移植角膜片での導入遺伝子の発現が確認された。さらに遺伝子操作の標的として疾患の原因遺伝子を検索した結果、Peters 奇形を含む前眼部形成不全で PAX6 の遺伝子変異が見いだされた。また、格子状角膜変性 III 型および Reis-Bücklers 角膜変性症においてケラトエピセリン遺伝子の変異が認められた。さらに先天無虹彩、角膜上皮変性症 (map-dot-finger print dystrophy)、斑状角膜変性症の原因遺伝子を同定

した。

H10-12 年度の 3 年間の研究の結果、ocular surface 疾患における臨床的評価法および早期診断法が開発され、ドライアイのスクリーニング法として今後この検査法が普及していくものと考えられた。さらに、我々が開発した新しい外科的治療は、多施設に普及しつつあり、これまで同疾患により視力回復が困難であった多くの人に福音をもたらすものと考えられる。さらに、我々の研究成果が遺伝子操作による治療法の開発にむけて大きく貢献することは間違いない物と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(木下茂)

1. Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Kinoshita S: Reflective meniscometry: a new field of dry eye assessment. *Cornea*, 2000; 19: S37-43.
2. Oguz H, Yokoi N, Kinoshita S: The height and radius of the tear meniscus and methods for examining these parameters. *Cornea*, 2000; 19: 497-500.
3. Adachi W, Okubo K, Kinoshita S: Human uroplakin Ib in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41: 2900-2905.
4. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ: Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41: 2506-2513.
5. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S: Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea*, 2000; 19: 65-71.

6. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood N, Quantock AJ, Kinoshita S: Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 2000; 20: 173-177.
7. Nakamura T, Nishida K, Dota A, Adachi W, Yamamoto S, Maeda N, Okada M, Kinoshita S: Gelatino-lattice corneal dystrophy: clinical features and mutational analysis. *Am J Ophthalmol*, 2000; 129: 665-666.
8. Nishida K, Yamanishi K, Yamada K, Dota A, Kawasaki S, Quantock AJ, Kinoshita S: Epithelial hyperproliferation and transglutaminase 1 gene expression in Stevens-Johnson syndrome conjunctiva. *Am J Pathol*, 1999; 154: 331-336.
9. Nishida K, Quantock AJ, Dota A, Choi-Miura NH, Kinoshita S: Apolipoproteins J and E co-localise with amyloid in gelatinous drop-like and lattice type I corneal dystrophies. *Br J Ophthalmol*, 1999; 83: 1178-1182.
10. Kawasaki S, Nishida K, Quantock AJ, Dota A, Bennett K, Kinoshita S: Amyloid and Pro501 Thr-mutated β (beta)ig-h3 gene product colocalize in lattice corneal dystrophy type IIIA. *Am J Ophthalmol*, 1999; 127: 456-458.
11. Adachi W, Kawamoto S, Ohno I, Nishida K, Kinoshita S, Matsubara K, Okubo K: Isolation and characterization of human cathepsin V: a major proteinase in corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39: 1789-1796.
12. Dota A, Nishida K, Honma Y, Adachi W, Kawasaki S, Quantock AJ, Kinoshita S: Gelatinous drop-like corneal dystrophy is not one of the beta ig-h3- mutated corneal amyloidoses. *Am J Ophthalmol*, 1998; 126: 832-833.
- (今西二郎)
1. Maruyama-Tabata H, Harada Y, Matsumura T, Satoh E, Cui F, Iwai M, Kita M, Hibi S, Imanishi J, Sawada T, Mazda O: Effective suicide gene therapy *in vivo* by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine dendrimer. *Gene Ther*, 2000; 7: 53-60.
2. Tanaka S, Iwai M, Harada Y, Morikawa T, Muramatsu A, Mori T, Okanou T, Kashima K, Maruyama-Tabata H, Hirai H, Satoh E, Imanishi J, Mazda O: Targeted killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cholangiocarcinoma cells by polyamidoamine dendrimer-mediated transfer of an Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vector carrying the CEA promoter. *Cancer Gene Ther*, 2000; 7: 1241-1250.
3. Tomiyasu. K, Oda, Y. Nomura, M. Satoh, E. Fushiki, S. Imanishi, J. Kondo, M. Mazda, O.: Direct Intra-cardiomuscular transfer of β 2-adrenergic receptor gene augments cardiac output in cardiomyopathic hamsters. *Gene Ther*, 2000; 7: 2087-2093.
4. Harada Y, Iwai M, Tanaka S, Okanou T, Kashima K, Maruyama-Tabata H, Hirai H, Satoh E, Imanishi J, Mazda O: Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by Epstein-Barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendrimer. *Cancer Gene Ther*, 2000; 7: 27-36.

5. Arai Y, Kubo T, Fushiki S, Mazda O, Nakai H, Iwaki Y, Imanishi J, Hirasawa Y: Gene delivery to human chondrocytes by an adeno-associated virus vector. *J Rheumatol*, 2000; 27: 979-982.

6. Mazda O, Satoh E, Hirai H, Nomura M, Imanishi J: Non-viral strategies for immunogene therapy. *in Recent Research Developments in Immunology*. Cancro MP et al. ed., Research Signpost (Trivandrum, IN), 2000; pp273-281.

7. Tomiyasu K, Satoh E, Oda Y, Nishizaki K, Kondo M, Imanishi J, Mazda O: Gene transfer *in vitro* and *in vivo* with Epstein-Barr virus-based episomal vector results in markedly high transient expression in rodent cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 253: 733-738.

8. Satoh E, Hirai H, Inaba T, Shimazaki C, Nakagawa M, Imanishi J, Mazda O: Successful transfer of ADA gene *in vitro* into human peripheral blood CD34⁺ cells by transfecting EBV-based episomal vectors. *FEBS Lett*, 1998; 441: 39-42.

(佐野洋一郎)

1. Sotozono C, Sano Y, Suzuki T, Tada R, Ikeda T, Nagata S, Kinoshita S: Soluble Fas ligand expression in the ocular fluids of uveitis patients. *Curr Eye Res*, 2000; 20: 54-57.

2. Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S: Conjunctival inflammation induces langerhans cell migration into the cornea. *Curr Eye Res*, 2000; 21: 550-553.

3. Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S: Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on Langerhans

cell migration and corneal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41: 154-158.

4. Suzuki T, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S: Regulatory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on cytokine production by human corneal epithelial cells [In Process Citation]. *Curr Eye Res*, 2000; 20: 127-130.

5. Sano Y, Osawa H, Sotozono C, Kinoshita S: Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39: 1953-1957.

(山本修士)

1. Akama TO, Nishida K, Nakayama J, Watanabe H, Ozaki K, Nakamura T, Dota A, Kawasaki S, Inoue Y, Maeda N, Yamamoto S, Fujiwara T, Thonar EJ, Shimomura Y, Kinoshita S, Tanigami A, Fukuda MN: Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene. *Nat Genet*, 2000; 26: 237-241.

2. Mashima Y, Yamamoto S, Inoue Y, Yamada M, Konishi M, Watanabe H, Maeda N, Shimomura Y, Kinoshita S: Association of autosomal dominantly inherited corneal dystrophies with BIGH3 gene mutations in Japan. *Am J Ophthalmol*, 2000; 130: 516-517.

3. Akimune C, Watanabe H, Maeda N, Okada M, Yamamoto S, Kiritoshi A, Inoue Y, Shimomura Y, Tano Y: Corneal guttata associated with the corneal dystrophy resulting from a betaig-h3 R124H mutation. *Br J Ophthalmol*, 2000; 84: 67-71.

4. Okada M, Yamamoto S, Watanabe H,

- Shimomura Y, Tano Y: Granular corneal dystrophy with homozygous mutations in the kerato-epithelin gene. *Am J Ophthalmol*, 2000; 129: 411-412.
5. Yamamoto S, Okada M, Tsujikawa M, Shimomura Y, Nishida K, Inoue Y, Watanabe H, Maeda N, Kurahashi H, Kinoshita S, Nakamura Y, Tano Y: A kerato-epithelin (betaig-h3) mutation in lattice corneal dystrophy type IIIA [letter]. *Am J Hum Genet*, 1998; 62: 719-722.
 6. Okada M, Yamamoto S, Watanabe H, Inoue Y, Tsujikawa M, Maeda N, Shimomura Y, Nishida K, Kinoshita S, Tano Y: Granular corneal dystrophy with homozygous mutations in the kerato-epithelin gene. *Am J Ophthalmol*, 1998; 126: 169-176.
 7. Okada M, Yamamoto S, Inoue Y, Watanabe H, Maeda N, Shimomura Y, Ishii Y, Tano Y: Severe corneal dystrophy phenotype caused by homozygous R124H keratoepithelin mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39: 1947-1953.
 8. Okada M, Yamamoto S, Tsujikawa M, Watanabe H, Inoue Y, Maeda N, Shimomura Y, Nishida K, Quantock AJ, Kinoshita S, Tano Y: Two distinct kerato-epithelin mutations in Reis-Bücklers corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol*, 1998; 126: 535-542.
 9. Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Okada M, Yamamoto S, Maeda N, Watanabe H, Inoue Y, Kiridoshi A, Matsumoto K, Ohashi Y, Kinoshita S, Shimomura Y, Nakamura Y, Tano Y: Homozygosity mapping of a gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy to chromosome 1p. *Am J Hum Genet*, 1998; 63: 1073-1077.
- (東 範行)
1. Azuma N, Hirakiyama A, Inoue T, Asaka A, Yamada M: Mutations of a human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene (*EYA1*) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. *Hum Mol Genet*, 2000; 9: 363-366.
 2. Shinoda K, Hirakata A, Hida T, Yamaguchi Y, Fukuda M, Maekawa S, Azuma N: Ultrastructural and immunohistochemical findings in five patients with vitreomacular traction syndrome. *Retina*, 2000; 20: 289-293.
 3. Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Hayakawa M, Kanai A, Yamada M: Missense mutation in the alternative splice region of the *PAX6* gene in eye anomalies. *Am J Hum Genet*, 1999; 65: 656-663.
 4. Negishi K, Azuma N, Yamada M: Various phenotypic expressions of familial aniridia with a *PAX6* mutation [letter]. *Br J Ophthalmol*, 1999; 83: 991-992.
 5. Nishina S, Kohsaka S, Yamaguchi Y, Handa H, Kawakami A, Fujisawa H, Azuma N: *PAX6* expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol*, 1999; 83: 723-727.
 6. Hotta Y, Fujiki K, Hayakawa M, Ohta T, Fujimaki T, Tamaki K, Yokoyama T, Kanai A, Hirakata A, Hida T, Nishina S, Azuma N: Japanese juvenile retinoschisis is caused by mutations of the *XLRS1* gene. *Hum Genet*, 1998; 103: 142-144.
 7. Azuma N, Yamada M: Missense mutation at the C terminus of the *PAX6* gene in ocular

- anterior segment anomalies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39: 828-830.
8. Azuma N, Hotta Y, Tanaka H, Yamada M: Missense mutations in the PAX6 gene in aniridia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39: 2524-2528.
9. Azuma N, Hara T, Hara T: Extracellular matrix of opacified anterior capsule after endocapsular cataract surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1998; 236: 531-536.
10. Azuma N, Tajima S, Konomi H, Hida T, Akiya S, Uemura Y: Glycosaminoglycan and collagen distribution in the developing human vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1998; 236: 679-687.
11. Tanaka N, Tajima S, Ishibashi A, Izumi T, Nishina S, Azuma N, Sado Y, Ninomiya Y: Expression of the alpha1-alpha6 collagen IV chains in the dermoepidermal junction during human foetal skin development: temporal and spatial expression of the alpha4 collagen IV chain in an early stage of development. *Br J Dermatol*, 1998; 139: 371-374.
12. 東 範行: 黄斑形成と中心視成立の分子細胞生物学. *日本眼科学会雑誌*. 2000; 104: 960-985.
13. 仁科幸子, 新井千賀子, 富田 香, 守田好江, 越後貫滋子, 赤池祥子, 千田耕基, 東 範行: 未熟児網膜症による視覚障害児の養育に関する問題点. *眼科臨床医報* 2000; 94: 529-534.
14. 東 範行: 眼の形態形成遺伝子とその異常. *現代医療*. 2000; 32: 1973-1982.
15. 東 範行: 網膜色素変性症の薬物治療. *日本の眼科*, 2000; 71:167.
16. 東 範行: 視交叉の謎. *日本の眼科*, 2000; 71:1085.
- (坪田一男)
1. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J: Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation [see comments]. *N Engl J Med*, 1999; 340: 1697-1703.
2. Tsubota K, Shimazaki J: Surgical treatment of children blinded by Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol*, 1999; 128: 573-581.
3. Tsubota K, Saito I, Ishimaru N, Hayashi Y: Use of topical cyclosporin A in a primary Sjogren's syndrome mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39: 1551-1559.
4. Tsubota K, Kaido M, Monden Y, Satake Y, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J: A new surgical technique for deep lamellar keratoplasty with single running suture adjustment. *Am J Ophthalmol*, 1998; 126: 1-8.
5. Tsubota K: Severe dry eye is caused not by simple desiccation, but by a depletion of tear components. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, 1998; 57: 313-319.
6. Tsubota K: New strategy for the management of dry eye syndrome. *Asian Medical Journal*, 1998; 41: 340-345.
7. Tsubota K: Tear dynamics and dry. *Progress in Retinal and Eye Research*. 1998; 17: 565-596.
2. 学会発表

(木下 茂)

1. Koizumi N, Inatomi T, Sano Y, Suzuki T, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S: Cultivated corneal epithelium transplantation for ocular surface reconstruction in stem cell deficiencies. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 2000.5.

2. 木下 茂、小泉範子、稲富 勉、鈴木 智、佐野洋一郎、外園千恵、横井則彦: 羊膜を用いた培養角膜上皮移植法の確立. 日本眼科手術学会. 名古屋. 2000. 1.

3. 小泉範子、稲富 勉、外園千恵、横井則彦、佐野洋一郎、鈴木 智、木下 茂: 培養角膜上皮による Ocular Surface Rehabilitation. 日本眼科手術学会. 名古屋. 2000. 1.

4. Kinoshita S: Gene expression profile for normal cornea. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 1999.5.

5. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, Quantock AJ, Kinoshita S: Expression of growth factor RNA and levels of growth factor protein in human amniotic membrane. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 1999.5.

(今西二郎)

1. Mazda O, Maruyama-Tabata H, Harada Y, Satoh E, Nomura M, Tanaka S, Hirai H, Iwai M, Okanoue T, Kashima K, Matsumura T, Sawada T, Imanishi J: The EBV/polyplex: an efficient non-viral system for *in vitro* and *in vivo* gene delivery. The Second Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Washington DC, 1999.6

2. Osawa M, Satoh E, Mazda O, Imanishi J, Kinoshita S: Efficient gene transduction *in vivo* into conjunctival fibroblasts by EBV-based vectors coupled with HVJ-cationic liposome. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 1998.5.

3. Mazda O, Satoh E, Osawa M, Tomiyasu K, Oda Y, Kondo M, Kinoshita S, Imanishi J: EBV-based episomal vectors as a tool of gene therapy. The First Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Seattle, WA, 1998.5

(佐野洋一郎)

1. Sano Y, Adachi W, Yamada J, Suzuki T, Ishino Y, Kinoshita S, Okuyama T, Azuma N: Mutant Fas ligand transfection in donor corneal tissue does not prolong graft survival. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 2000.5.

2. 佐野洋一郎: 眼組織における Fas ligand の役割. Kyoto Corneal Club. 京都. 2000. 12.

3. 佐野洋一郎、山田 潤、木下 茂: 膜結合型 Fas ligand 遺伝子導入による角膜移植拒絶での Fas の関与. 日本免疫学会総会. 仙台. 2000.11.

4. 佐野洋一郎、足立和加子、山田 潤、鈴木 智、木下 茂: Mutant Fas ligand 遺伝子導入による角膜移植拒絶反応の検討. 第 29 回日本免疫学会総会 学術集会. 京都. 1999.12.

5. Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S: Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Langerhans cell migration in mouse cornea. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 1998.5.

6. Sano Y, Miyao A, Suzuki T, Kinoshita S:

Corneal substrate transplantation using frozen xenogenic corneal tissue. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 1998.5.

(山本修士)

1. Yamamoto S, Maeda N, Watanabe H, Inoue Y, Shimomura Y, Tano Y: The spectrum of beta-ig-h3 gene mutations among patients with corneal dystrophy in Japan. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 1999.5.

2. Yamamoto S, Okada M, Tsujikawa M, Inoue Y, Watanabe H, Maeda N, Nishida K, Kinoshita S, Shimomura Y, Tana Y: Kerato-epithelin mutation in lattice corneal dystrophy type IIIA. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 1998.5.

(大橋裕一)

1. Tasaka Y, Shiraishi A, Okamoto S, Ohashi Y, Yoshida S, Shiosaka S: Expression of neuropsin in ocular surface epithelia of vitamin A deficient mice. ARVO. Ft. Lauderdale, FL, USA, 2000 5.

2. Tanaka Y, Shiraishi A, Tasaka Y, Okamoto S, Ohashi Y, Yoshida S, Shiosaka S: Expression of neuropsin during corneal wound healing. ARVO. Ft. Lauderdale, FL, USA, 2000 5.

3. 宇野敏彦、林康人、大橋裕一：羊膜移植において、羊膜上皮は角結膜上皮の伸展に抑制的に働く。第 103 回日本眼科学会総会。千葉。1999.4.

4. 宇野敏彦：角結膜の感染免疫疾患。第 36 回日本眼感染症学会。横浜。1999.7.

5. Togushige H, Watanabe N, Ogawa T, Miyamoto K, Hara Y, Ohashi Y, Maeyama K:

Effects of stem cell factor, c-kit ligand on the wound healing of rat corneal epithelium. ARVO. Ft Lauderdale, USA, 1998. 5.

(東 範行)

1. 東 範行. シンポジウム 未熟児網膜症の硝子体手術. 第 23 回日本眼科手術学会. 名古屋. 2000. 1.

2. 東 範行. シンポジウム 白内障手術における遺伝子治療の可能性. 第 104 回日本眼科学会. 京都. 2000. 4.

3. 東 範行. シンポジウム 前眼部の形態形成遺伝子とその異常. 第 104 回日本眼科学会. 京都. 2000.4.

4. 東 範行. 宿題報告 黄斑形成と中心視成立の分子細胞生物学. 第 104 回日本眼科学会. 京都. 2000.4.

5. 東 範行. シンポジウム 網膜芽細胞腫全国登録の成果. 北日本眼科学会. 仙台. 2000.6.

6. 東 範行. シンポジウム アトピー性皮膚炎の眼の合併症. 北日本眼科学会. 仙台. 2000.6.

7. 東 範行. 特別講演 黄斑形成の分子細胞生物学. 愛知眼科アカデミー. 名古屋. 2000. 6.

8. 東 範行. 形態形成遺伝子を用いた眼組織の再生. Japan Macula Club. 蒲郡. 2000. 8.

9. 東 範行. 特別講演 黄斑の形成システムと眼の進化. 東京医大臨床懇話会. 東京. 2000.10.

10. 東 範行. シンポジウム 眼の形態形成遺伝子の異常とその表現型. 第 54 回日本臨床眼科学会. 東京. 2000.10.

11. 東 範行. シンポジウム 「超難治性網膜硝子体疾患の治療」未熟児網膜症と先天網膜ひだの硝子体手術. 第 22 回日本手術学会. 東京. 1999.1.
12. 東 範行. 眼先天異常の遺伝子診断. 厚生省小児医療共同研究会. 東京. 1999.1.
13. 東 範行. PAX6 遺伝子と 11 番染色体短腕欠損を認めた先天無虹彩の 1 例. 厚生省がん克服研究会. 東京. 1999.1.
14. 東 範行. 眼の形態形成における PAX6 遺伝子の変異. 厚生省国立病院共同研究会. 東京. 1999.2.
15. 東 範行. PAX6 遺伝子の択一的スプライス部位の変異. 第 24 回日本小児眼科学会. 福岡. 1999.4.
16. 東 範行. Drosophila の eue absent 遺伝子 homologue EYA1 の前眼部異常、先天白内障における変異. 第 103 回日本眼科学会. 千葉. 1999.4.
17. 東 範行. 特別講演 「小児の眼の見方」静岡県眼科集談会. 静岡. 1999.8.
18. 東 範行. PAX6 遺伝子による WT1 の制御. がん治療学会. 広島. 1999.9.
19. 東 範行. 特別講演 眼の形態形成遺伝子とその異常. 眼先天異常研究会. 東京. 1999.10.
20. 東 範行. 眼形成異常における PAX6 遺伝子の変異. 日本人類遺伝学会. 仙台. 1999.11.
21. 東 範行. 特別講演 「眼の形態形成における PAX6 遺伝子」. 第 53 回日本臨床眼科学会眼先天異常研究会. 東京. 1999.10.
22. 東 範行. PAX6 paired domain のミスセンス変異とその生化学的検討. 第 102 回日本眼科学会. 福岡. 1998.4.
23. 東 範行. 発達期人眼における PAX6 の発言に関する免疫組織化学的研究. 第 102 回日本眼科学会. 福岡. 1998.4.
24. 東 範行. PAX6 遺伝子の C 末端に変異を認めた前眼部形成異常の 1 例. 第 23 回日本小児眼科学会. 千葉. 1998.4.
25. 東 範行. 顕著な黄斑偏位と上下斜視を認めた家族性滲出性硝子体網膜症の 1 例. 第 54 回日本弱視斜視学会. 千葉. 1998.4.
26. Azuma N, Nishina S, Yamada M, Hotta Y, Yamaguchi Y, Handa H: Missense mutations in the PAX6 paired domain and their functional analysis. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 1998.5.
27. 東 範行. シンポジウム 小児・若年者の硝子体手術. 第 37 回日本網膜硝子体学会. 仙台. 1998.5.
28. 東 範行. シンポジウム 先天白内障. 第 37 回日本白内障学会・第 13 回日本眼内レンズ屈折手術学会. 仙台. 1998.5.
29. 東 範行. 未熟児網膜症の硝子体手術予後. 第 21 回日本手術学会. 仙台. 1998.5.
30. 東 範行. 小児の眼底疾患の診方. 栃木眼科集談会獨協医科大学眼科研究会. 宇都宮. 1998.7.
31. 東 範行. Peters 奇形における PAX6 の変異. 第 52 回臨床眼科学会. 神戸. 1998.10.
32. Azuma N???: Ocular and systemic features of optic nerve aplasia. Annual Meeting of the American Academu of Ophthalmology, New Orleans. 1998.11.

(坪田一男)

1. Tsubota K, Enomoto M, Shimmura S, Goto E, Shinozaki N, Shimazaki J. Ocular surface reconstruction by cultivated conjunctival-limbal allografts on amniotic membrane. The Association of Research for Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 2000.5.

2. 坪田一男: 重症オキュラーサーフェス疾患に対する角膜上皮のステムセル移植. 第 22 回日本眼科手術学会. 東京. 1999.1.

3. 坪田一男: 結膜上皮のステムセル移植による重症スチーブンスジョンソン症候群の治療. 第 53 回日本臨床眼科学会. 東京. 1999.10.

自己角膜上皮幹細胞移植術の開発

分担研究者 今西二郎 京都府立医科大学・微生物学教室

研究要旨 EBV エピゾーマルベクターを用いた非ウイルス導入法により、角結膜への *in vivo* 遺伝子導入が高率に可能であることが分かった。

A. 研究目的

角結膜を標的とした、*in vivo* 遺伝子導入系の確立を目的とした。昨年度までの成果で、HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) -リポソーム、PAMAM デンドリマー、およびポリエチレンイミン (PEI) が有望であることが示されたので、これらを用いた角結膜への導入を施行した。さらに、導入効率を向上する目的で、EBV-EBNA1 遺伝子と oriP を有するプラスミドベクター (EBV エピゾーマルベクター) を採用し、EBNA1 と oriP を有しない通常のプラスミドベクターと比較した。

B. 研究方法

マーカー遺伝子を有する、EBV-プラスミドベクターと、通常のプラスミドベクターを、HVJ-リポソーム、PAMAM デンドリマー、または PEI とコンジュゲートした複合ベクターを作成した。ラットまたはウサギの結膜下と前房内にベクターを注入し、マーカー遺伝子の発現を検出した。特異性を検証する目的で、免疫組織化学にても解析した。

C. 結果

EBV エピゾーマルベクターを結膜下注入した場合には、結膜線維芽細胞に有意にマーカー遺伝子の発現を認めた。導入効率は、HVJ-リポソームを用いた場合がもっとも高く、ついで PAMAM デンドリマーが高かった。しかし、HVJ-リポソームを用いても、通常のプラスミドベクターを導入した場合には遺伝子

発現は非常に低かった。前房内注入でも、同様に HVJ-リポソーム/EBV エピゾーマルベクターを用いた系が最も効率が高く、発現は主として虹彩角膜角部に認められた。

D. 考察

角結膜への非ウイルス *in vivo* 導入が可能であることが分かった。また、HVJ-リポソーム/EBV エピゾーマルベクターの複合ベクターの系が最も有効であることが示された。

E. 結論

本ベクター系が、角結膜疾患の遺伝子治療に応用できる可能性が示された。

F. 研究発表

- 1) Effective Suicide Gene Therapy *in vivo* by EBV-Based Plasmid Vectors Coupled with PAMAM Dendrimer. Maruyama-Tabata, H., 他, *Gene Ther.* 7 (1): 53-60, 2000
- 2) Targeted killing of carcinoembryonic antigen-producing cholangiocarcinoma cells by PAMAM dendrimer-mediated transfer of an EBV-based plasmid vector carrying the CEA-promoter, Tanaka, S. 他, *Cancer Gene Ther.*, 7 (9): 1241-1249, 2000
- 3) Direct Intra-cardiomuscular Transfer of β 2-Adrenergic Receptor Gene Augments Cardiac Output in Cardiomyopathic Hamsters Tomiyasu, K. 他, *Gene Ther.* 7 (24): 2087-2093, 2000

G. 知的所有権の取得状況: なし

遺伝子導入による拒絶されにくい角膜組織開発の研究

分担研究者 佐野洋一郎 京都府立医科大学眼科 助手

研究要旨

Mutant Fas ligand を遺伝子導入した角膜移植片の早期拒絶の機序として Fas ligand が結合する Fas 分子の関与を検討した。ドナー細胞に Fas を欠損させた移植片では同様に早期拒絶が生じたのに対し、ホスト細胞が Fas を欠損した場合には早期拒絶がみられなかったことより、mutant Fas ligand 遺伝子導入での移植片破壊にはホストの Fas の関与が考えられた

A. A. 研究目的

重傷化した ocular surface 疾患に対する新しい概念の外科的治療法として「拒絶されにくい」角膜移植片の開発を目的とする。その方法として、遺伝子操作による角膜移植片の作製の可能性を検討する。

B. 研究方法

マウスを用いて全層角膜移植を施行した。ドナー角膜に soluble Fas ligand を生じない mutant Fas ligand をアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、生着率を検討した。ウイルスベクターは高濃度 (10^8 pfu/ml) で検討した。一群ではドナーに Fas 欠損マウス (lpr マウス) を用い、他群ではホストに lpr マウスを用いて移植片の生着率を検討した。

C. 研究結果

Fas が欠損したドナー角膜移植片に mutant Fas ligand を遺伝子導入し移植を行った場合には、mutant Fas ligand による移植片早期混濁が認められたのに対し、ホストに Fas が欠損したマウスを用いた場合には、遺伝子導入を行わない角膜移植片と同様の生着率を示し、mutant Fas ligand による早期混濁は生じなかった。

D. 考察

ドナー角膜組織に導入した mutant Fas ligand はドナーの Fas ではなく、ホストの Fas に結合することにより、移植片の早期混濁を生じるものと考えられた。

E. 結論

mutant Fas ligand の遺伝子導入は移植片の生着を促進することはできず、過剰な発現によりむしろ移植片破壊を促進することが示唆された。さらに、その移植片の破壊にはホストの細胞上に発現している Fas 分子を介して生じるものと考えられ得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S: Conjunctival inflammation induces Langerhans cell migration into the cornea. *Curr Eye Res Curr Eye Res* 21 (1) 550-553 2000.

2. 学会発表

1) Sano Y, Adachi W, Yamada J, Suzuki T, Ishino Y, Kinoshita S, Okuyama T, Azuma N: Mutant Fas ligand transfection in donor corneal tissue does not prolong graft survival. ARVO. Ft. Lauderdale, FL, USA, 2000 5.1.

2) Yamada J, Sano Y, Kinoshita S: Corneal re-graft survival in long-term acceptor mice. ARVO. Ft. Lauderdale, FL, USA, 2000 5.3.

3) 佐野洋一郎、山田 潤、木下 茂: 膜結合型 Fas ligand 遺伝子導入による角膜移植拒絶での Fas の関与. 日本免疫学会総会. 仙台. 2000.11.14.

4) 山田 潤、佐野洋一郎、木下 茂: Donor-specific tolerance induced by long-term accepted corneal allograft. 日本免疫学会総会. 仙台. 2000.11.14.

角膜への遺伝子導入法の開発に関する研究

分担研究者 山本修士 大阪大学大学院医学系研究科 講師

研究要旨

遺伝子導入に関する研究を行う上で、対象となる遺伝性角膜ジストロフィの原因遺伝子を解明することが必要である。本研究において、斑状角膜変性症の原因遺伝子発見を含めて約200家系の角膜ジストロフィの原因遺伝子を明らかにすることができた。原因遺伝子解明により、分子レベルでの診断とカウンセリングが可能になった。

A. 研究目的

遺伝性角膜ジストロフィの原因遺伝子を検索し、その病態発生のメカニズムを解明し、将来の遺伝子治療を含めた新しい治療法の開発に結びつけることが最終目的である。

B. 研究方法

250家系の角膜ジストロフィ患者さんより、承諾を得て、染色体DNA抽出のための採血に協力いただいた。遺伝子解析の方法は、基本的に候補遺伝子アプローチ法あるいは、ポジショナル・キャンデデート法を用いて解析した。変異のスクリーニングにはSSCP法を用いて、患者さんの候補遺伝子のエクソン領域を増幅して解析した。変異の決定は、DNAシーケンス法により、塩基配列を決定し、患者家族内で変異の有無が眼疾患の発症と一致しているか否かを検討した。

C. 研究結果

従来原因の不明であった斑状角膜変性症の原因遺伝子がCHST6という新しいスルフォトランスフェラーゼの異常により発症することが明らかになった。

200家系の患者さんの原因遺伝子が判明した。分子レベルでの確定診断や、遺伝カウンセリングに対応できるようになった。

D. 考察

斑状角膜変性症は、常染色体劣性遺伝形式で遺伝する重篤な変性症である。原因遺伝子としてC

HST6という新しいスルフォトランスフェラーゼの異常で発症することを明らかにした。本疾患は、膠様滴状角膜変性と並び、将来の遺伝子治療の対象となる代表的眼疾患である。本遺伝子は、角膜で効率よく発現しているため、このプロモーター領域を遺伝子導入用のベクターに利用することが可能と考えられる。CHST6遺伝子のプロモーター領域の詳細な検討をする必要がでてきた。日常診療で遭遇するほとんどの角膜ジストロフィの原因遺伝子が明らかになった。前眼部の所見だけでは診断できなかった症例に対しても遺伝子診断が有効であることを証明した。さらに、初期病変の診断、将来発症の有無の決定にも分子診断が有効と考えられた。

E. 結論

斑状角膜変性症の原因遺伝子発見を含めて、約200家系の角膜ジストロフィの遺伝子変異を解明した。分子レベルでの診断が可能時代を迎えた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. T Akama, K Nishida et al. Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene. Nat Genet. 26:237-241,2000.

2. Y Mashima, S Yamamoto et al. Association of autosomal dominantly inherited corneal dystrophies with BIGH3 gene mutations in Japan. Am J Ophthal. 130:516-517,2000.

角膜創傷治癒過程におけるニューロプシンの発現

分担研究者 大橋裕一 愛媛大学眼科 教授

研究要旨

ニューロプシンは新たに発見されたプロテアーゼであり、その働きはいまだ解明されていない。本研究では角膜上皮の創傷治癒過程にニューロプシンが関与していることが示された。今後その役割についてさらなる検討を加えることにより角膜上皮の恒常性および病態についての解明に寄与するものと考えられる。

A. A. 研究目的

生体機能調節因子としてのプロテアーゼの重要性が最近再び注目されており、その治療への有用性より詳細な機能の解明が期待されている。近年分離されたセリン型プロテアーゼであるニューロプシン（NP）は神経、皮膚での役割が解明されつつあり、眼科領域でもその機能につき検討が待たれている。そこで角膜上皮創傷治癒過程における NP の役割について検討をおこなった。

B. 研究方法

角膜上皮における役割につき検討するため、マウスおよびラット角膜上皮剥離モデルを作製し角膜創傷治癒過程における NP の発現を免疫染色法にて観察し、NPmRNA の発現を northern blot および in situ hybridization 法をもちいて検討した。

C. 研究結果

マウス、ラットとも創傷負荷後 4 日目までに創は再生上皮で覆われ、一ヶ月後までにはほぼ正常角膜上皮の形態をとっていた。Northern blot 法においては NPmRNA の発現が 1 および 2 日目に強く増強していた。In situ hybridization 法では NPmRNA は再生角膜上皮と基底細胞層に発現が認められ、上皮欠損後 1、2、4 日目には特に強いシグナルが観察された。免疫組織染色法では上皮欠損後 NP は角膜実質に広範に認められ、特に上皮欠損後 1、2 日目には基底膜下で著明に増強していた。NPmRNA、NP の発現ともに創傷治癒に伴って経時的にその発現は減弱した。

D. 考察

NPmRNA の発現が創傷治癒過程早期に増強することが示され、移動している再生角膜上皮にその発現が強く認められ、また免疫染色法でも基底膜下に強く NP が局在していたことは、角膜上皮の移動に NP が関与していることを示唆するものである。また正常でも NPmRNA は基底細胞層に発現しており角膜上皮の恒常性の維持に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

E. 結論

ニューロプシンが角膜上皮の恒常性または病的状態に関与している可能性が示され、今後さらなる検討を加え将来的に角結膜疾患の病態の理解と治療に新しい展開をもたらすと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
角膜カンファ
ARVO

厚生科学研究費補助金（感覚器研究事業）

分担研究報告書

オキュラーサーフェイスの臨床的評価法と外科的リハビリテーション法の開発に関する研究
-前眼部形成不全における PAX6 遺伝子変異と角膜疾患の遺伝子治療に関する研究-

分担研究者 東 範行 国立小児病院眼科医長

研究要旨 先天前眼部形成不全（Peters 奇形を含む）54 例で染色体検査と PAX6 遺伝子変異の検索を行った。9 例（家族性 1 家系、孤発例 8 例）で PAX6 変異が見つかった。遺伝子型と表現型に相関はなく、これは Pax6 が下流に膨大な遺伝子に従え、その発現様式に差があるためと思われた。CAT アッセイでは、PAX6 paired domain に存在した変異体は、paired domain の binding consensus に対する binding activity が低下していた。従来、角膜実質への遺伝子導入は困難とされていたが、マウスの動物実験で lamellar keratotomy を行うことによって、アデノウイルスによる実質細胞への効率良い導入に成功した。そして、ムコ多糖症 VII 型モデルマウス(MPS7)において分泌型酵素 β -glucuronidase 遺伝子を導入し、角膜混濁を長期にわたって軽減させることに成功した。遺伝子発現を恒常的にすれば、前眼部疾患を遺伝子治療によって根本的に治療することが期待される。

A. 研究目的

PAX6 遺伝子は、眼形成の master control 遺伝子であり、ヒトでは先天無虹彩などの前眼部疾患で変異が見つかっている。これまでに、我々は多くの眼疾患で PAX6 の変異を発見してきた。今回は、前眼部形成不全における PAX6 変異の遺伝子型と変異型の関係、および PAX6 変異体蛋白の生化学的検討を行った。これら転写因子遺伝子の異常は、発生過程で発現するために遺伝子治療が難しい。しかも角膜では、従来点眼による上皮あるいは前房内注入による内皮への導入は成功したが、実質への導入はできなかった。今回、我々は lamellar keratotomy を行うことによって、角膜実質においてアデノウイルスによる遺伝子導入に成功した。そして、先天性角膜疾患に対する治療として、ムコ多糖症 VII 型モデルマウス(MPS7)において分泌型酵素 β -glucuronidase 遺伝子を導入し、角膜混濁の治療を試みた。

B. 研究方法

1. 先天前眼部形成不全の PAX6 変異

インフォームドコンセントをとった後、先天前眼部形成不全（Peters 奇形を含む）54 例の末梢血を採取し、まず染色体検査を行った。さらに余剰血液からゲノム DNA を調整した。これらの DNA を用いて、PAX6 遺伝子の各 exon を PCR-SSCP 法でスクリーニングした。band shift が認められたものは subcloning を行い、塩基配列を決定した。

2. PAX6 変異体の生化学的研究

正常 PAX6 cDNA あるいは paired domain の変異体 (V7D) を強制発現プラスミド pCAGGS に組み込み effector とした。PAX6 paired domain の binding consensus を pCATbasic に組み込み reporter とした。マウス embryonic carcinoma P19 細胞を用い、0.25-4.0 μ g 濃度を変えた effector プラスミドと、0.5 μ g の reporter プラスミドを co-transfection し、蛋白を回収して CAT assay を行った (dose dependent regulatory assay)。

3. lamellar keratotomy による角膜実質への遺伝子導入