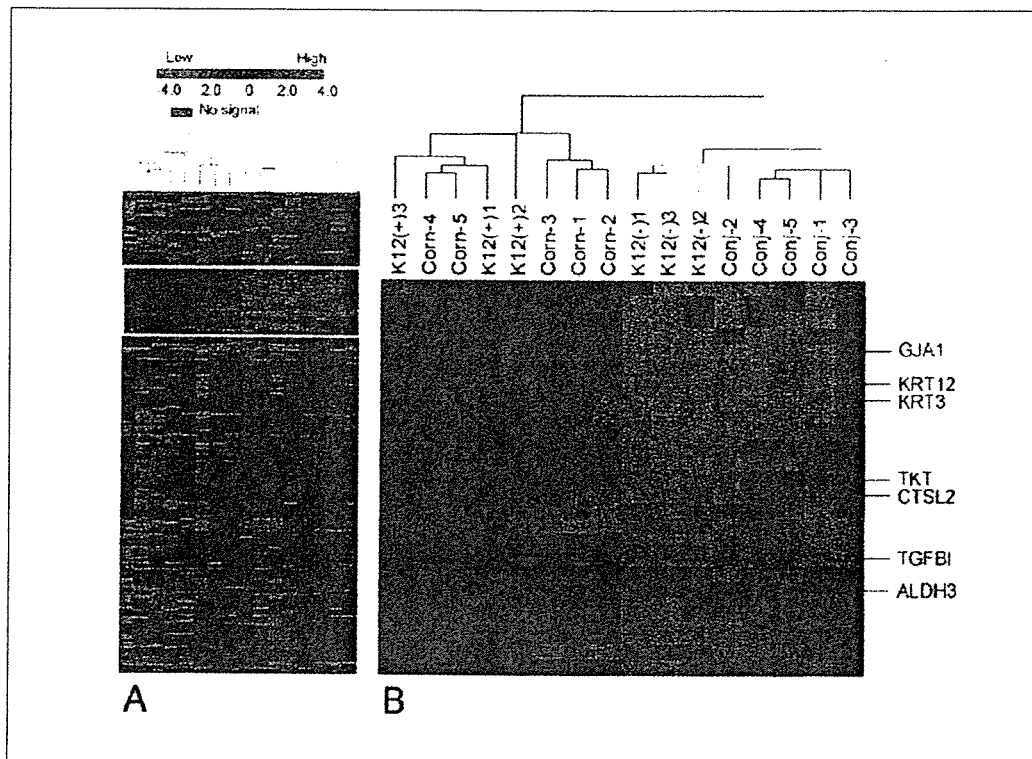


図33 結膜上皮に存在するケラチン 12 陽性細胞群の遺伝子発現パターン



結膜上皮内に存在するケラチン 12 陽性細胞群 [K12(+1), K12(+2), K12(+3)] およびケラチン 12 陰性細胞群 [K12(-)1, K12(-)2, K12(-)3] をレーザーマイクロキャプチャーにて採取して、iAFLP にて遺伝子発現解析を行い、角膜上皮細胞 (Corn-1~5) と結膜上皮細胞 (Conj-1~5) と比較した。クラスター解析によって、ケラチン 12 陽性細胞群は角膜上皮細胞と、ケラチン 12 陰性細胞群は結膜上皮細胞と同じ遺伝子発現パターンを示した。

図34 ヒト羊膜上におけるヒト結膜上皮細胞の培養

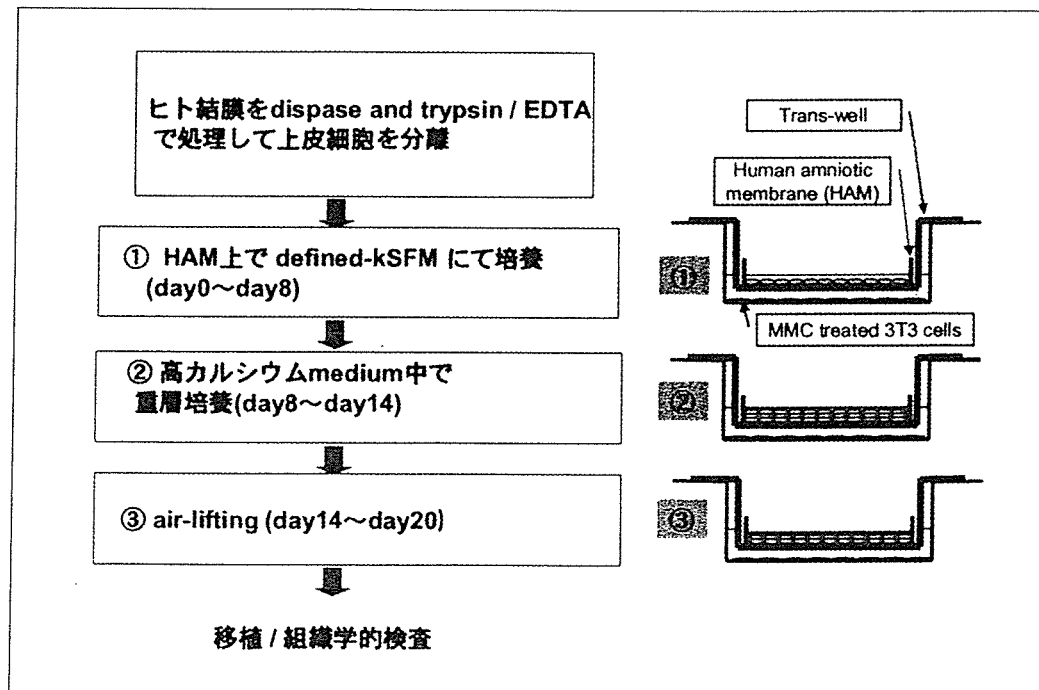
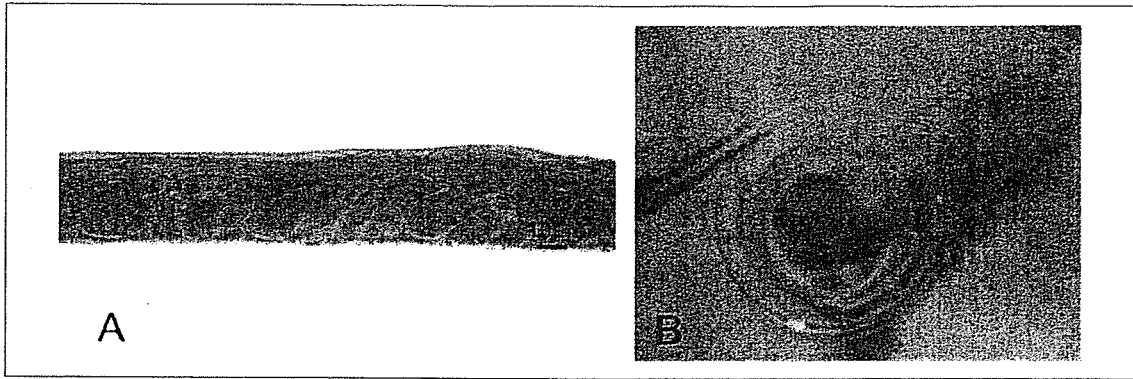
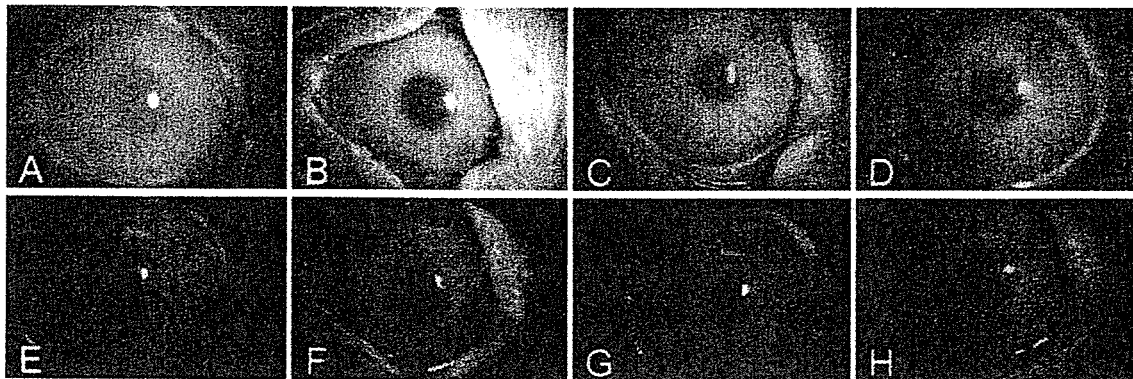


図35 培養ヒト結膜上皮シート



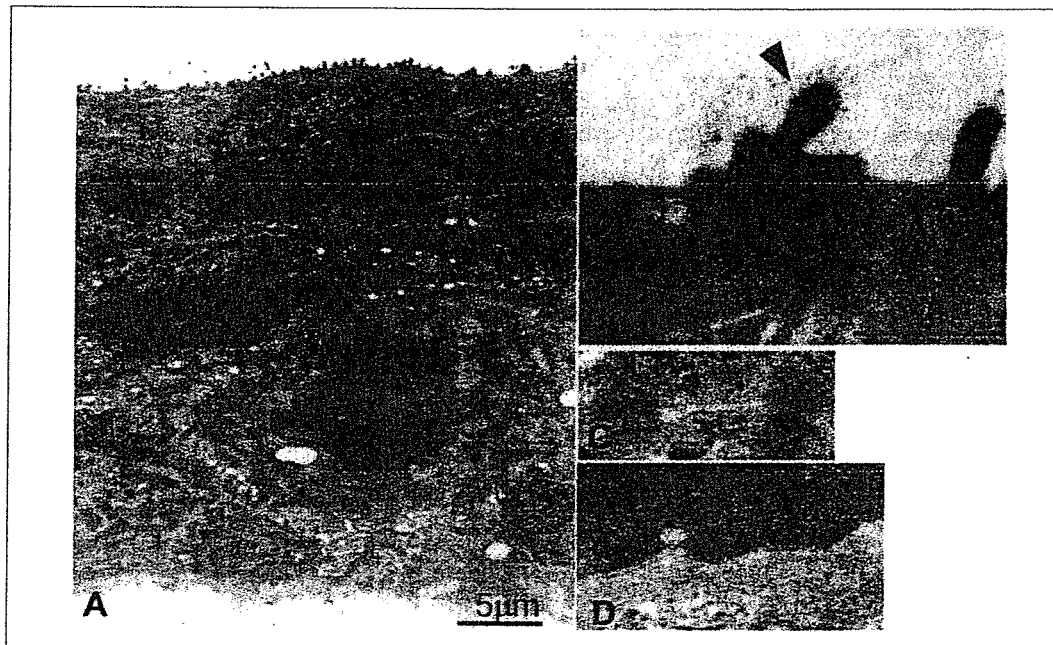
ヒト結膜上皮細胞は4-5層に重層化しており (A: トルイジンブルー染色), 透明性は良好である (B).

図36 家兎角膜上への培養結膜上皮シート移植後の前眼部所見



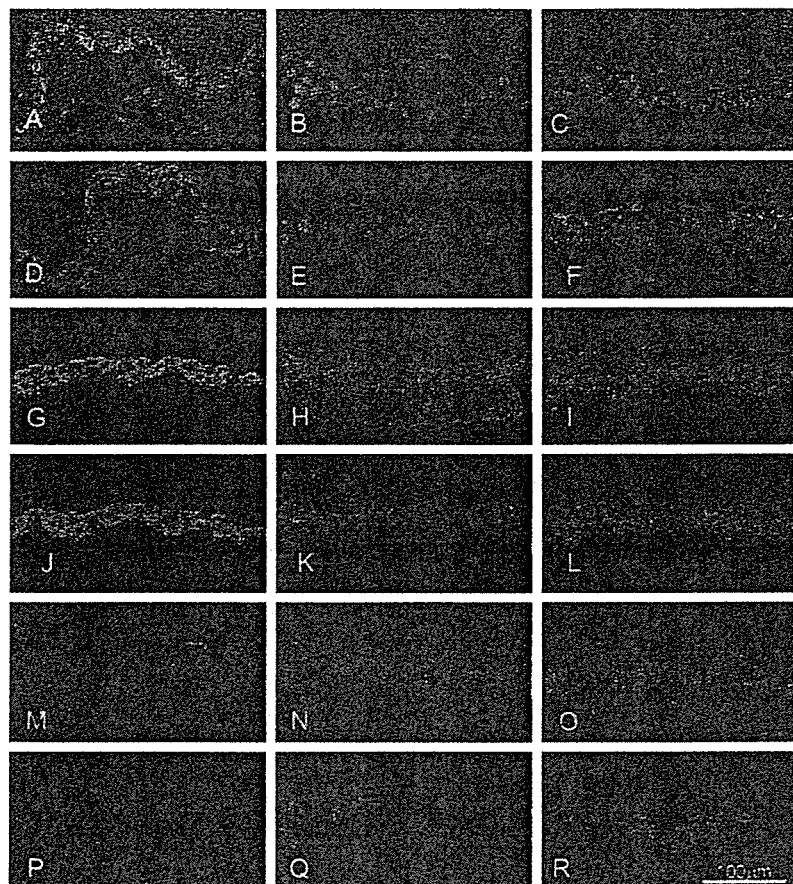
培養結膜上皮シート移植直後 (A・E), 4日後 (B・F), 14日後 (C・G) および1ヵ月後 (D・H). 全観察期間を通じて上皮欠損を認めなかった (下段はフルオレセイン染色).

図37 家兎眼に移植した後に摘出した上皮の透過型電子顕微鏡観察像



A: 生着上皮全体像, B: 矢頭 マイクロビリ, 矢印 タイトジャンクション様構造, C: デスマソーム, D: ヘミデスマソーム

図38 培養結膜上皮シートおよび生着上皮の免疫組織学的検討



*in vivo* 結膜上皮 (A・D・G・J・M・P), 培養結膜上皮 (B・E・H・K・N・Q), 生着上皮 (C・F・I・L・O・R), 蛍光免疫染色 (緑): Muc 5AC (A-C), Muc 4 (D-F), CK13 (G-I), CK4 (J-L), CK3 (M-O), CK12 (P-R), 対比染色 (赤) プロピジウムアイオダイド

を introduced amplified fragment length polymorphism (iAFLP) 法で比較し, その後 real time PCR, *in situ* hybridization 法, 免疫染色法, 免疫電顕法で確認を行った. iAFLP の結果, thrombospondin-1 (TSP-1) の発現のみが角膜上皮において有意に亢進しており, この結果は real time PCR などで確認された. TSP-1 の局在は, 角膜上皮基底細胞内基底側, 角膜上皮下角膜膜に認められたが, 結膜上皮には認めなかった. 単一の血管新生抑制因子の欠落では角膜血管新生はきたさないとの報告もあり, 角膜無血管は種々血管新生関連因子の発現バランスにより制御されていると推測されるが, 主要血管新生抑制因子のひとつである TSP-1

が, 結膜には存在せず, 角膜上皮下に存在することは非常に興味深いことである. また, この TSP-1 は種々細胞外マトリックスと高い親和性を持つことが報告されており, 角膜上皮基底細胞から分泌された TSP-1 がボウマン膜中の細胞外マトリックスに結合し, 角膜の無血管性維持に寄与している可能性が示唆される<sup>84)</sup>.

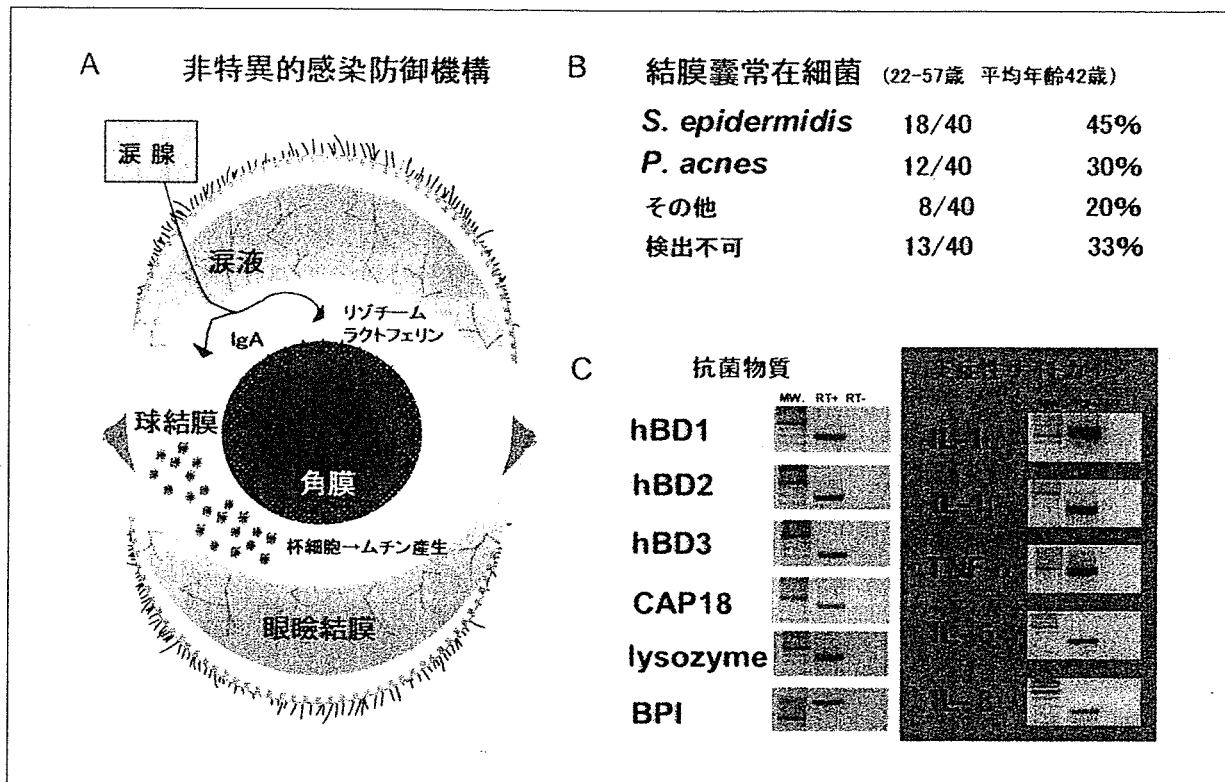
#### IV 眼粘膜免疫に関する検討

##### IV-1 眼粘膜における自然免疫

##### IV-1.1 Ocular surface の非特異的感染防御機構ならびに常在細菌の存在

Ocular surface は角膜上皮と結膜上皮で構成される粘膜であり, 常に外界と接触し, 外界か

図39 眼表面における常在細菌の存在と非特異的感染防御機構



A：眼表面の非特異的感染防御機構， B：眼表面の常在細菌， C：角膜上皮細胞の RT-PCR

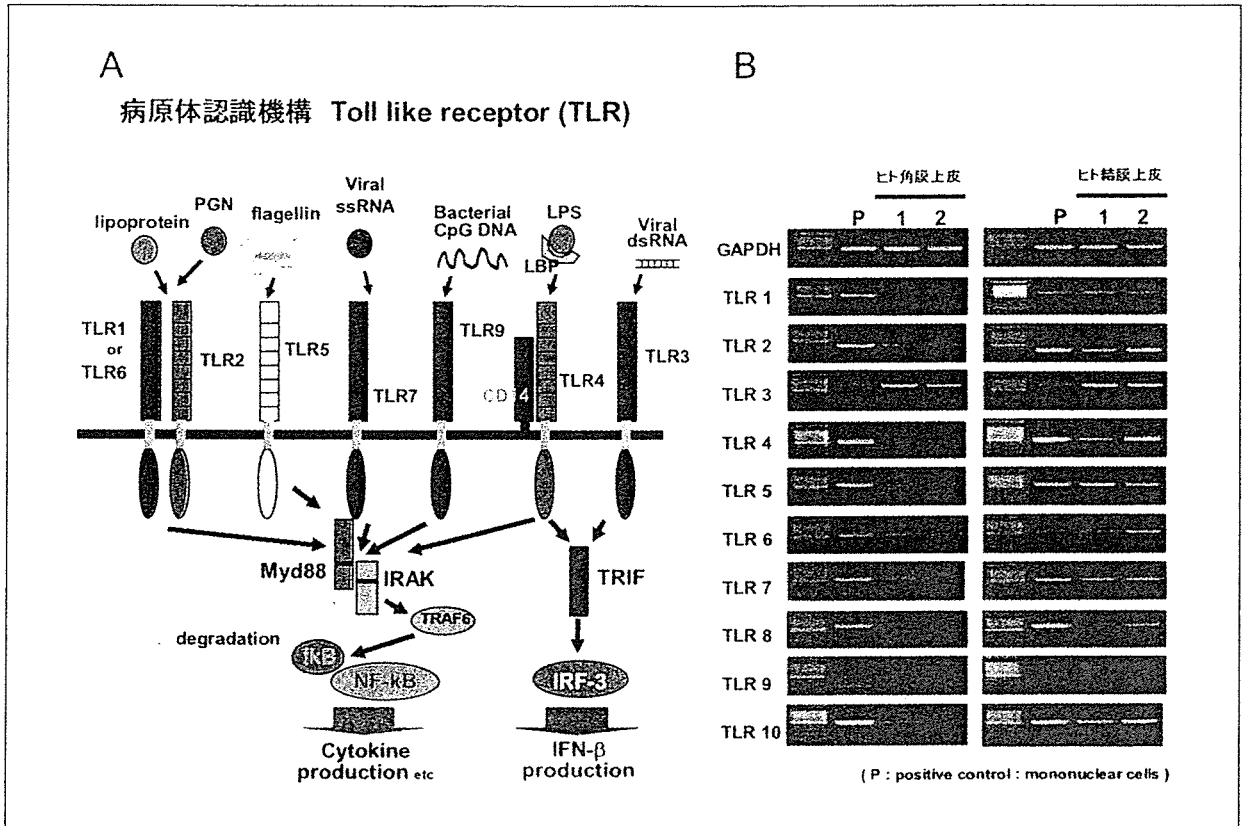
らの異物や微生物の侵入の危険にさらされている。涙液中には IgA, リゾチーム, ラクトフェリンなどの抗菌物質が存在し, また結膜杯細胞からムチンが産生され, 細菌・異物の除去に働いている。このように眼表面には, 非特異的感染防御機構が存在する (図39A)。その一方で, 眼表面には常在細菌が存在する。我々は, 22歳から57歳 (平均年齢42歳) の健康人40人における結膜嚢の細菌検出率を調べたところ, 45% に表皮ブドウ球菌が, 30% にアクネ菌が検出された (図39B)。従来より粘膜上皮は, 主として物理的バリアーとして働くと思われていたが, 最近では上皮細胞自身が, 各種のサイトカインや抗菌物質を産生し, 生体防御の第一線を担っていることが明らかとなってきた。角膜上皮細胞自身も, 抗菌物質や炎症性サイトカインを産生する能力を有し (図39C), IL (interleukin)-1 $\alpha$  の刺激により IL-6, IL-8 や  $\beta$ -defensin 2 の産生が亢進される<sup>85)</sup>。しかし, 眼表面には常在細菌が存在するにもかかわらず,

健康状態では炎症を認めない。このことは, マクロファージやリンパ球などの免疫担当細胞が, 細菌の菌体成分に反応して炎症を惹起するのは対照的である。

#### IV-1.2 Ocular surface 上皮の自然免疫と TLRs

細菌やウイルスなどの病原微生物の侵入に対する感染防御機構は, 自然免疫と獲得免疫に分類される。獲得免疫は, 抗原特異的 Tリンパ球と Bリンパ球によって誘導されるが, クローン増殖する必要があるために, 機能するまでに数日かかる。これに対して自然免疫は, 獲得免疫が働く前の感染早期に働く防御機構である。これまで自然免疫とは, 好中球やマクロファージなどの貪食細胞, 補体, 抗菌物質などを中心とした非特異的防衛機構であると考えられてきた。しかし近年, TLRs が微生物の構成成分を特異的に認識し, 自然免疫において重要な役割を担っていることが明らかとなった<sup>86)</sup>。

図40 Toll like receptors (TLRs)



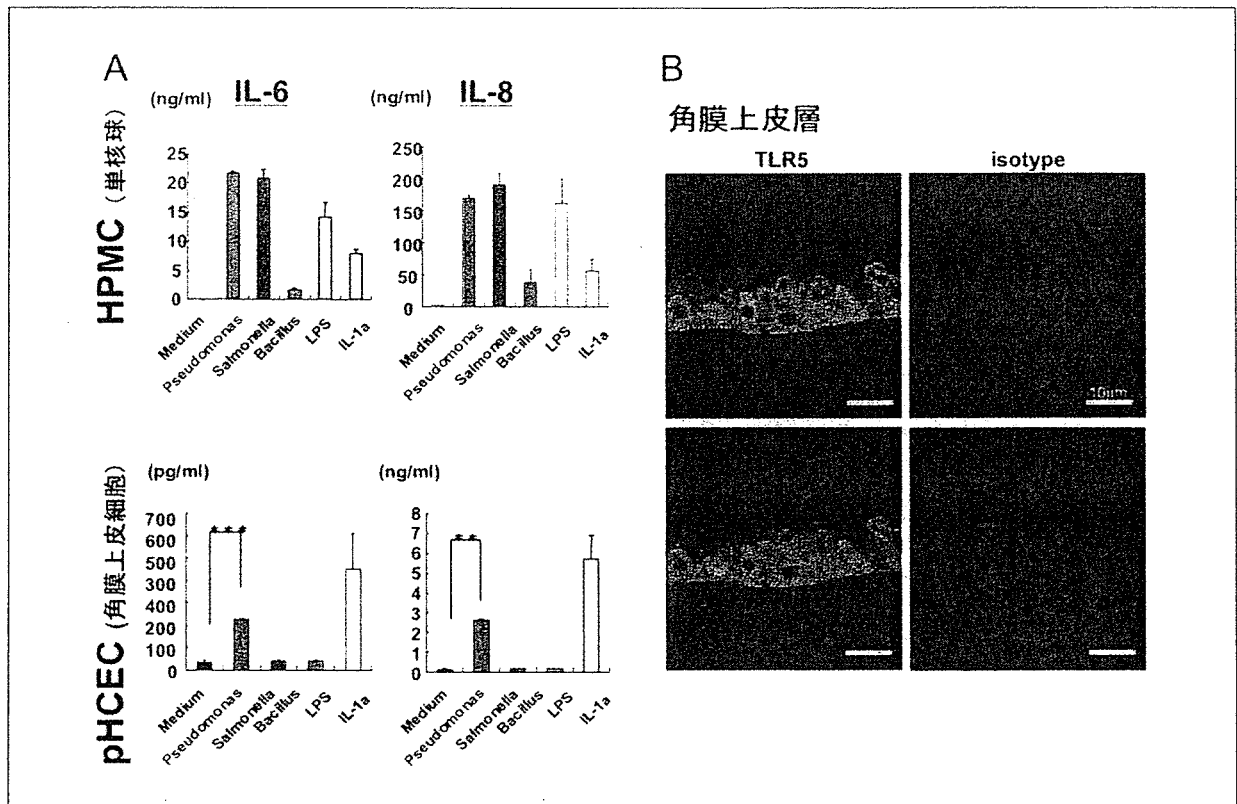
A：病原体認識機構としての各 TLR， B：眼表面上皮における TLRs の発現

TLRs は、タンパク質結合モチーフであるロイシンに富む領域 (leucin-rich repeat : LRR) を細胞外に有し、LRR を介して細菌、ウイルス、または真菌といったさまざまな病原微生物の構成成分を認識する (図40A)。ヒトでは 11 種類 (TLR1-TLR11) の TLRs が同定され、グラム陽性菌の細胞壁に多量に含まれるペプチドグリカン (PGN) の一成分であるリポタンパク質や真菌の細胞壁成分であるチモザン (zymosan)、鞭毛の構成成分であるフラジェリン、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS)、ウイルスの構成成分を認識している。さらに最近では、これらの TLRs が病原微生物を認識し宿主自然免疫応答を惹起することで、獲得免疫系を効果的に活性化することも明らかとなった<sup>86)</sup>。

近年この TLRs が、免疫担当細胞だけでなく腸管上皮などの粘膜上皮細胞に発現していることが報告された。我々は、眼表面上皮にお

ける TLRs の発現について解析を行ったところ、遺伝子発現レベルでは TLR1-10 のうち、結膜上皮はすべてを発現し、角膜上皮では TLR8 以外の全てが発現していた (図40B)。また、培養角膜上皮細胞を用いてタンパクレベルでの発現や菌体成分による刺激実験を行ったところ、グラム陰性菌の菌体成分である LPS で刺激した角膜上皮細胞は、炎症性サイトカイン IL-6, IL-8 を産生しなかった。角膜上皮細胞では、TLR4 の発現は細胞内に局在し、そのことが炎症反応を惹起しないことに参与していると考えられた<sup>85)</sup>。PGN で刺激した角膜上皮細胞も、同様に炎症性サイトカインを産生せず、これは TLR4 同様に TLR2 発現が角膜上皮細胞では細胞内に局在するためであると考えられた<sup>85)</sup>。また我々は、細菌の鞭毛成分であるフラジェリンに対して、角膜上皮細胞が炎症性サイトカインを産生するかどうか解析した。その結果、眼表面の病原菌である緑膿菌 (*Pseudo-*

図41 角膜上皮とTLR5



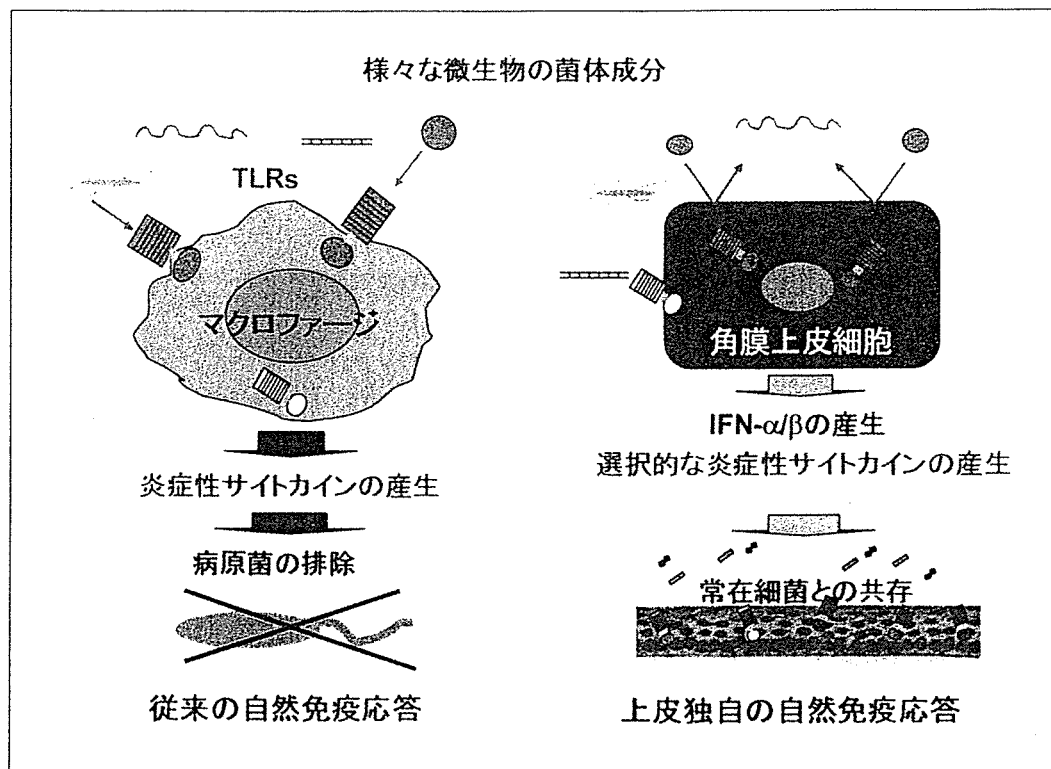
A：細菌の鞭毛成分フラジェリンに対する角膜上皮細胞の反応性

B：角膜上皮層における TLR5 局在（免疫染色）

*monas aeruginosa*) 由来のフラジェリンに対しては炎症性サイトカインを産生するが、眼表面とは無関係のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) や眼表面の常在細菌であるバチルス菌 (*Bacillus subtilis*) のフラジェリンに対しては、角膜上皮細胞が炎症性サイトカイン IL-6, IL-8 を産生しないことを解明した<sup>87)</sup>(図41A)。さらに、角膜上皮の免疫染色を行ったところ、表層細胞層には TLR5 のタンパクの発現を確認できず、主に基底細胞層に TLR5 のタンパクの発現が確認された<sup>87)</sup>(図41B)。このことは結膜上皮においても同様であった。この結果より、眼表面上皮細胞は TLR5 を介して眼表面の病原菌由来のフラジェリンに対して炎症性サイトカインを産生するが、上皮欠損のない健全な眼表面では TLR5 は機能していないと考えられる。上記で使用した LPS, PGN, Pam<sub>3</sub>CSK4, 緑膿菌ならびにサルモネラ菌, バチルス菌由来のフラジェリンは、いずれも末梢血単核球では

著しい炎症性サイトカインの産生を誘導することを確認できており、角膜上皮細胞と免疫担当細胞では、同じように TLRs を発現しているもその局在や機能が異なることが示唆された<sup>85)87)88)</sup>。ウイルスによって合成される二本鎖 RNA を認識する TLR3 を、角膜上皮は発現していたが、単核球などの免疫担当細胞が細胞内に TLR3 を発現しているのとは対照的に、角膜上皮細胞では TLR3 を細胞表面に発現していた<sup>88)</sup>。また、二本鎖 RNA と相同性を示す polyI:C で刺激したとき、角膜上皮細胞は炎症性サイトカイン IL-6, IL-8 を産生するだけでなく、IFN- $\beta$  mRNA を結膜線維芽細胞の約 10 倍、末梢血単核球の約 500 倍発現した<sup>88)</sup>。IFN- $\beta$  は、抗ウイルス作用だけでなく抗炎症作用もあり、我々は眼表面が常在細菌に対して容易に炎症を起こさない機構に、この TLR3 が関与している可能性について現在検討している。さらに我々が結膜上皮細胞についても検討したとこ

図42 粘膜上皮細胞独自の自然免疫機構の存在



ろ、結膜上皮細胞も角膜上皮細胞と同じ自然免疫応答を示した。角膜とは構造的に異なった結膜上皮細胞も角膜上皮と同様に、免疫担当細胞である末梢血単核球とは異なった自然免疫応答を有することは、これら ocular surface 上皮細胞が、ocular surface に常在細菌が存在するにもかかわらず健全な眼表面には炎症が生じない機構に大きく関与している可能性を示すものである。マクロファージなどの免疫担当細胞では、様々な菌体成分を TLRs を介して認識し、炎症を惹起し、病原菌を排除する。これは従来から考えられている自然免疫応答である。しかし、眼表面上皮などの常在細菌と接している粘膜上皮では、マクロファージとは、TLRs の局在もその機能も異なっていることが明らかとなってきたことより、これらの粘膜上皮細胞独自の自然免疫機構が、常在細菌と共存する上で必要不可欠なものであるに違いないと我々は考えている (図42)。

IV-2 重症薬疹：Stevens-Johnson 症候群に対する取り組み

IV-2.1 臨床的解析

Stevens-Johnson 症候群と中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrolysis,) は全身の皮膚・粘膜傷害と高熱で発症する重篤な疾患である。Stevens-Johnson 症候群の約 60%, 中毒性表皮壊死症の約 90% は薬剤が誘因とされることから、これらは重症薬疹、すなわち皮膚以外の臓器にも重篤な症状を発現する薬疹として位置づけられている。いずれも致死的なことがあり得ることから、発症時には全身管理が主体となる。この二つの疾患は、同じ範疇の疾患と理解され、眼科領域では併せて広義の Stevens-Johnson 症候群と呼称している。急性期には、角膜穿孔や角膜感染症など重篤な眼合併症を招き、重篤な視力障害をもたらす。全身の炎症が沈静化した慢性期にも、瞼球癒着や角膜混濁などの瘢痕性変化が高頻度に生じ、視力障害とドライアイが持続する<sup>89)90)</sup>。病態は未だ不明であり、有効な治療法も確立していない。

図43 Stevens-Johnson 症候群の視力と眼所見

眼所見	相関係数	p値
血管侵入	-0.8097	<.0001
角膜混濁	-0.7839	<.0001
結膜侵入	-0.7260	<.0001
瞼球癒着	-0.6485	<.0001
生体染色 (SPK)	-0.6014	<.0001
輪部上皮消失	-0.5502	<.0001
涙点閉鎖	-0.5180	<.0001
マイボラインの異常	-0.4875	<.0001
角化	-0.4765	<.0001
M腺圧出油脂の異常	-0.4531	<.0001
充血	-0.3833	<.0001
睫毛乱生	-0.3585	<.0001
上皮欠損	-0.1691	0.0473

我々は慢性期 Stevens-Johnson 症候群患者の視力に影響する因子を明らかにするため、多施設スタディとして眼科に通院する慢性期患者 73 名 [男性 33 名, 女性 40 名, 年齢 10~83 歳 (平均 48 歳)] の病歴, 視力, 眼所見を解析した<sup>9)</sup>。これらの発症年齢は 2~69 歳 (平均 28 歳), 罹患期間は 1~54 年 (平均 19 年) であった。このうち, 眼表面再建術を実施していない 138 眼の視力は, 0.01 未満が 42 眼, 0.01 以上 0.1 未満が 32 眼, 0.1 以上 1.0 未満が 36 眼, 1.0 以上が 28 眼であり, 約半数が 0.1 未満と極めて低視力であった。これらの結果より, 若年期に本症を発症して視力障害に陥り, その後長く眼科に通院する患者の多いことが明らかとなった。眼合併症 13 項目を 4 段階にスコア化して評価したところ, すべての項目が視力と相関し, なかでも角膜血管侵入, 角膜混濁, 結膜侵入が高い相関を示した (いずれも  $P < 0.0001$ ) (図43)。興味深いことには, 輪部上皮 (palisades of Vogt) の消失, 言い換えれば角膜上皮幹細胞の喪失が, 該当率, 重症度ともに最も高く (図44), さらに多変量解析の結果より輪部上皮消失が視力低下に大きく影響することが判明した。輪部上皮の消失は本症の急性期に生

じるため, 急性期に輪部上皮の消失を回避することが, 良好な視力予後につながることを考えられた。慢性期の持続炎症を検討するために, 患者より涙液を採取し, 炎症に関わる因子として IL-8 の濃度を測定したところ, 本症では他疾患に比べて極めて高い値を示した (図45)。今後の詳細な検討が必要な分野である。

Stevens-Johnson 症候群は角膜上皮幹細胞疲弊症を示す代表的な眼疾患である。本症を角膜再生医療的アプローチで治療するとともに, 自然免疫異常の病態を明かすことができれば, 本疾患の予後を改善するのみならず, あらゆる重症 ocular surface 疾患治療のストラテジーを解き明かす鍵になると考えられる。

#### IV-2.2 自然免疫異常

Stevens-Johnson 症候群の ocular surface に認められる易感染性, そして結膜囊細菌の増殖が関係すると考えられる異常炎症所見は, 炎症性腸疾患と類似していると考えられる。炎症性腸疾患の病態には, 常在細菌に対する異常な炎症反応, すなわち自然免疫応答異常が関与することがわかってきている<sup>33)34)</sup>。例えば, TLRs の重要なシグナル因子である Myd88 欠損マウ



図44 眼所見 13 項目のうち該当率, 重症度率の高かった項目

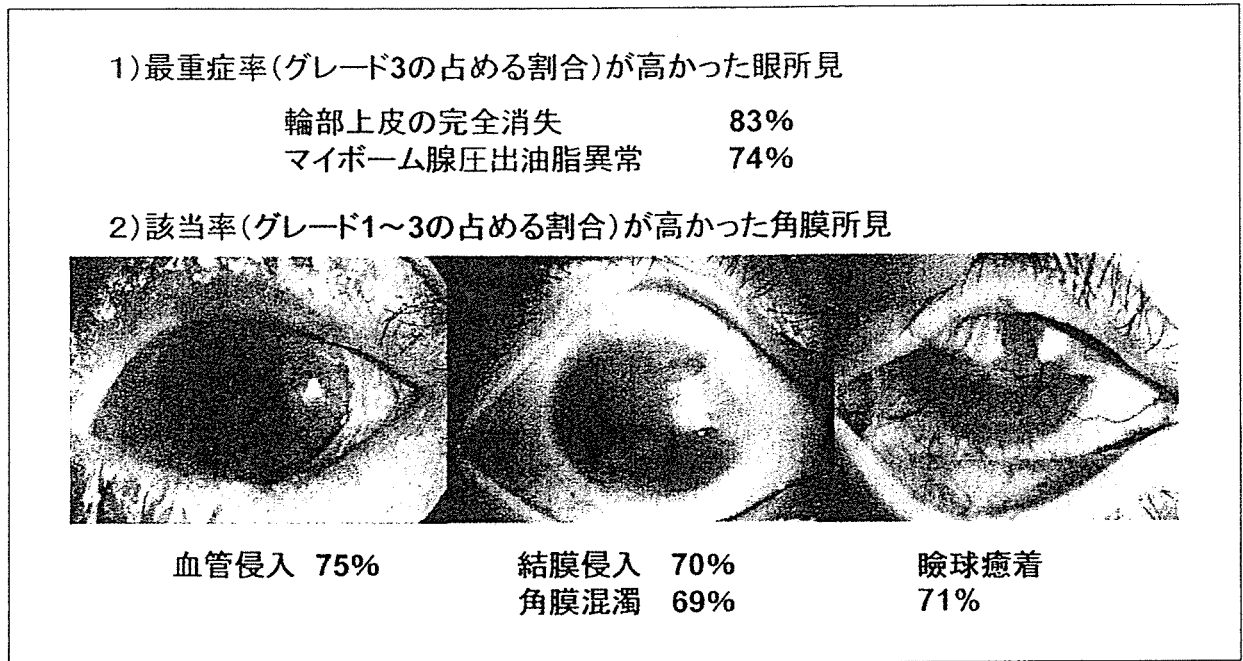


図45 種々の角膜疾患における涙液中 Interleukin-8 濃度

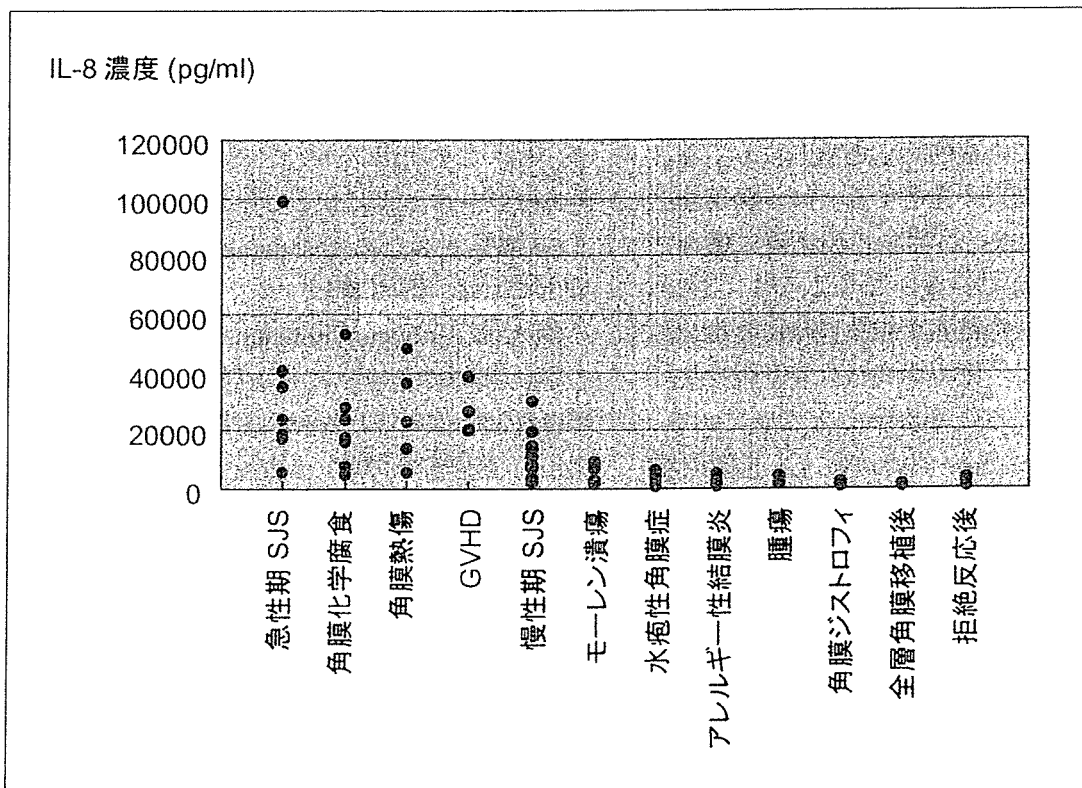
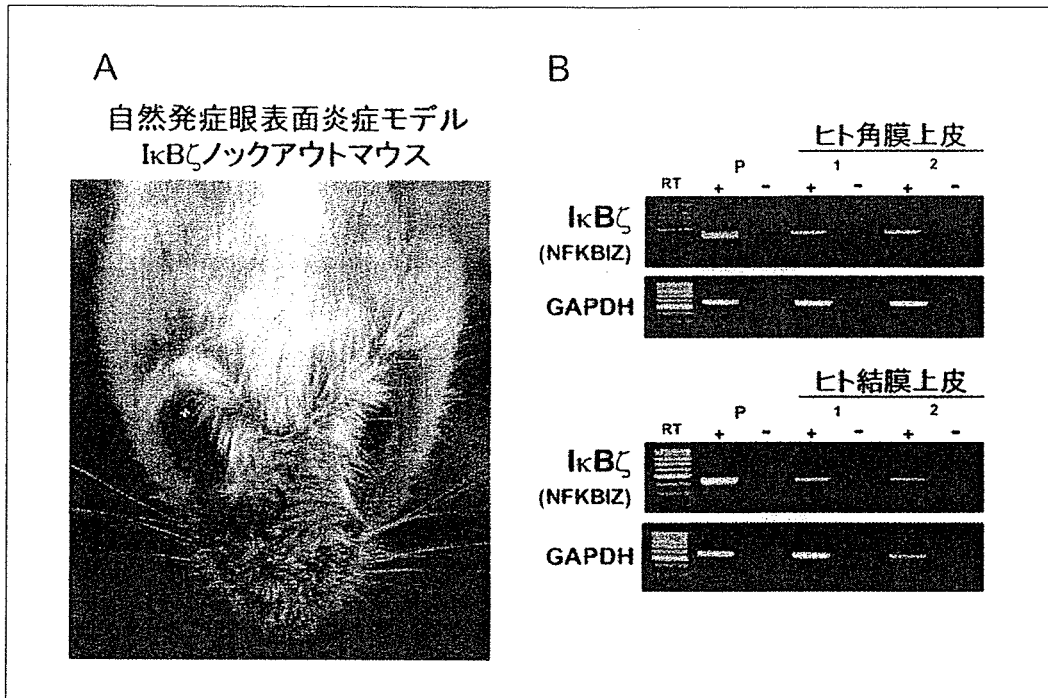


図46 眼表面と I $\kappa$ B- $\zeta$ 

A：自然発症の眼表面炎症モデル I $\kappa$ B- $\zeta$  のノックアウトマウス

B：ヒトの眼表面における I $\kappa$ B- $\zeta$  の発現

スでは、誘導した腸炎が悪化する<sup>35)</sup>。Myd88が欠損すると単球などの免疫担当細胞では各種菌体成分に対して炎症性反応を生じにくくなるにもかかわらず腸炎が悪化するのは、腸管などの粘膜面では TLRs が恒常性の維持に働いていることを示唆している。このように、TLRs を代表とする自然免疫系は感染防御に重要であるばかりではなく、種々の免疫性炎症性疾患にも深く関与していることがわかってきている。我々は、ocular surface においても、自然免疫応答異常が ocular surface 炎症に関与していると考えている。TLRs のシグナル因子であり、NF- $\kappa$ B の regulator の一つである I $\kappa$ B- $\zeta$  のノックアウトマウスでは、杯細胞の消失を伴う ocular surface 炎症を自然発症する<sup>32)</sup> (図46 A)。このことは、ocular surface の炎症制御に I $\kappa$ B- $\zeta$  が深く関わっていることを示唆するものであり、I $\kappa$ B- $\zeta$  を介した自然免疫応答の異常が炎症を惹起することを示している。また、このマウスを Balb/c 背景に純系化したところ、口囲周囲の皮膚炎も明らかとなった。この

皮膚炎は、表皮にアポトーシス細胞を伴い、アレルギー炎症とは異なる様相を示しており、我々は、このマウスが、Stevens-Johnson 症候群のモデルマウスになると考えている。さらに、この I $\kappa$ B- $\zeta$  は、ヒトの ocular surface でも発現している (図46 B)。

我々は、Stevens-Johnson 症候群に自然免疫応答の異常が関与する可能性について、現在、解析を進めている。患者末梢血単球をもちいた遺伝子発現解析では、自然免疫応答が誘導された状態において、I $\kappa$ B- $\zeta$  の発現が患者において有意に低下しているという結果を得ており、また、候補遺伝子アプローチによる遺伝子多型解析においても、自然免疫関連遺伝子において、健常人と Stevens-Johnson 症候群の間で、有意差を認めている。このように、自然免疫に着目することにより、今まで病因・病態の不明であった本疾患の病態が解明される可能性がある。

## V 結 び

難治性 ocular surface 疾患には外科的治療

は禁忌と考えられた時代があった。しかし、その多くが角膜上皮幹細胞疲弊症であることが分かり、角膜上皮幹細胞を適切に移植することができれば、臨床的には病態の寛解と視力改善を得られるようになってきた。この再生医学的な粘膜上皮幹細胞シート移植は、基礎的研究データの積み重ねから発した新しい治療概念の想起であり、新しい治療法として始動しつつある。我々の研究成果の臨床への本当の応用には、さまざまな安全性試験と客観的有用性の確認が必要であるが、一步一步着実に進んでおり、標準的な治療方法になることを期待する次第である。国際的にみても、我々の研究成果を地球規模で広く活用してもらうことにより、視力改善の希望を失った多くの患者を救うことができると考えている。一方、再生医学的な角膜再生アプローチの術後管理には、ocular surface の常在細菌叢と自然免疫に関する豊富な知識が必要とされており、我々の角膜再生医学もいよいよ第二段階に入ったと考えている。

## VI 引用文献

- 1) Nishida K, Adachi W, Shimizu-Matsumoto A, Kinoshita S, Mizuno K, Matsubara K, Okubo K: A gene expression profile of human corneal epithelium and the isolation of human keratin 12 cDNA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (9): 1800-1809, 1996.
- 2) Dota A, Nishida K, Adachi W, Nakamura T, Koizumi N, Kawamoto S, Okubo K, Kinoshita S: An expression profile of active genes in human conjunctival epithelium. *Exp Eye Res* 72 (3): 235-241, 2001.
- 3) Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock A J, Okubo, K: Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 20 (5): 639-673, 2001.
- 4) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S: Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108 (9): 1569-1574, 2001.
- 5) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S: Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 119 (2): 298-300, 2001.
- 6) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S: Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 88 (10): 1280-1284, 2004.
- 7) Kinoshita S, Koizumi N, Nakamura T, Yamada J, Sotozono C, Inatomi T: Concept and clinical application of cultivated epithelial transplantation. *The Ocular Surface* 2: 21-33, 2004.
- 8) Kinoshita S, Nakamura T: Development of cultivated mucosal epithelial sheet transplantation for ocular surface reconstruction. *Artif Organs* 28 (1): 22-27, 2004.
- 9) Ueno M, Matsumura M, Watanabe K, Nakamura T, Osakada F, Takahashi M, Kawasaki H, Kinoshita S, Sasai, Y: Neural conversion of ES cells by an inductive activity on human amniotic membrane matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (25): 9554-9559, 2006.
- 10) Kinoshita S, Friend J, Kiorpes T C, Thoft R A: Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 (5): 577-581, 1983.
- 11) Kinoshita S, Kiorpes T C, Friend J, Thoft R A: Limbal epithelium in ocular surface wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23 (1): 73-80, 1982.
- 12) Schermer A, Galvin S, Sun T T: Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103 (1): 49-62, 1986.
- 13) Cotsarelis G, Cheng S Z, Dong G, Sun T T, Lavker R M: Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 57 (2): 201-209, 1989.
- 14) Kim J C, Tseng S C: Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14 (5): 473-484, 1995.

- 15) Pellegrini G, Traverso C E, Franzi A T, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M: Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349 (9057): 990-993, 1997.
- 16) Koizumi N, Inatomi T, Quantock A J, Fullwood N J, Dota A, Kinoshita S: Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 19 (1): 65-71, 2000.
- 17) Koizumi N, Kinoshita S: Ocular surface reconstruction, amniotic membrane, and cultivated epithelial cells from the limbus. *Br J Ophthalmol* 87 (12): 1437-1439, 2003.
- 18) Koizumi N, Fullwood N J, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock A J: Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (9): 2506-2513, 2000.
- 19) Koizumi N, Cooper L J, Fullwood N J, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, Kinoshita S: An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (7): 2114-2121, 2002.
- 20) Koizumi N, Rigby H, Fullwood N J, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K, Kociok N, Jousseaume A M, Kinoshita S: Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*: 2006.
- 21) Ban Y, Cooper L J, Fullwood N J, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, Dota A, Mochida C, Kinoshita S: Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* 76 (6): 735-743, 2003.
- 22) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S: Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* 82 (4): 468-471, 2004.
- 23) Maruyama K, Yamada J, Sano Y, Kinoshita S: Th2-biased immune system promotion of allogeneic corneal epithelial cell survival after orthotopic limbal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (11): 4736-4741, 2003.
- 24) Ang L, Sotozono C, Koizumi N, Suzuki T, Inatomi T, Kinoshita S: A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol*. (in press)
- 25) Cooper L J, Fullwood N J, Koizumi N, Nakamura T, Kinoshita S: An investigation of removed cultivated epithelial transplants in patients after allocultivated corneal epithelial transplantation. *Cornea* 23 (3): 235-242, 2004.
- 26) Nakamura T, Endo K, Cooper L J, Fullwood N J, Tanifuji N, Tsuzuki M, Koizumi N, Inatomi T, Sano Y, Kinoshita S: The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (1): 106-116, 2003.
- 27) Nakamura T, Kinoshita S: Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 22 (7 Suppl): S75-80, 2003.
- 28) Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S: Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 141 (2): 267-275, 2006.
- 29) Nakamura T, Ang L P, Rigby H, Sekiyama E, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood N J, Kinoshita S: The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (3): 909-916, 2006.
- 30) Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S: Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. (in press)
- 31) Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M: Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (27): 9523-9528, 2005.

- 32) Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M: Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 145 (4): 769–782, 1999.
- 33) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411 (6837): 599–603, 2001.
- 34) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411 (6837): 603–606, 2001.
- 35) Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R: Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118 (2): 229–241, 2004.
- 36) Sotozono C, Inagaki K, Fujita A, Koizumi N, Sano Y, Inatomi T, Kinoshita S: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections in the cornea. *Cornea* 21 (7 Suppl): S94–101, 2002.
- 37) King-Smith PE, Fink BA, Fogt N, Nichols KK, Hill RM, Wilson GS: The thickness of the human precorneal tear film: evidence from reflection spectra. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (11): 3348–3359, 2000.
- 38) Gipson IK: Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res* 78 (3): 379–388, 2004.
- 39) 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* 154 (2): 331–336, 1999.
- 40) Yokoi N, Bron A, Tiffany J, Brown N, Hsuan J, Fowler C: Reflective meniscometry: a non-invasive method to measure tear meniscus curvature. *Br J Ophthalmol* 83 (1): 92–97, 1999.
- 41) Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Kinoshita S: Reflective meniscometry: a new field of dry eye assessment. *Cornea* 19 (3 Suppl): S37–43, 2000.
- 42) Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Maruyama K, Komuro A, Kinoshita S: Relationship between tear volume and tear meniscus curvature. *Arch Ophthalmol* 122 (9): 1265–1269, 2004.
- 43) Yokoi N, Komuro A: Non-invasive methods of assessing the tear film. *Exp Eye Res* 78 (3): 399–407, 2004.
- 44) Maruyama K, Yokoi N, Takamata A, Kinoshita S: Effect of environmental conditions on tear dynamics in soft contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (8): 2563–2568, 2004.
- 45) Yokoi N, Maruyama K, Kinoshita S, Bron AJ, Tiffany JM: Dynamic changes in tear meniscus curvature at the rigid contact lens edge. *Cornea* 22 (3): 226–229, 2003.
- 46) Oguz H, Yokoi N, Kinoshita S: The height and radius of the tear meniscus and methods for examining these parameters. *Cornea* 19 (4): 497–500, 2000.
- 47) Yokoi N, Kinoshita S, Bron AJ, Tiffany JM, Sugita J, Inatomi T: Tear meniscus changes during cotton thread and Schirmer testing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (12): 3748–3753, 2000.
- 48) Ishibashi T, Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Komuro A, Kinoshita S: Retention of reversibly thermo-gelling timolol on the human ocular surface studied by video meniscometry. *Curr Eye Res* 27 (2): 117–122, 2003.
- 49) Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S: Comparison of the effects of topical levobunolol and timolol solution on the human ocular surface. *Cornea* 22 (8): 709–715, 2003.
- 50) Yokoi N, Takehisa Y, Kinoshita S: Correlation of tear lipid layer interference patterns with the diagnosis and severity of dry eye. *Am J Ophthalmol* 122 (6): 818–824, 1996.
- 51) Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S: Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and

- without benzalkonium chloride. *J Glaucoma* 12 (6): 486-490, 2003.
- 52) Ichijima H, Yokoi N, Nishizawa A, Kinoshita S: Fluorophotometric assessment of rabbit corneal epithelial barrier function after rigid contact lens wear. *Cornea* 18 (1): 87-91, 1999.
- 53) Niiya A, Yokoi N, Matsumoto Y, Komuro A, Ishibashi T, Tomii S, He J, Kinoshita S: Effect of beta-blocker eyedrops on corneal epithelial barrier function. *Ophthalmologica* 214 (5): 332-336, 2000.
- 54) Taniguchi T, Yamamoto T, Mochizuki K, Haque MS, Kitazawa Y, Yokoi N, Komuro A, Kinoshita S: Epithelial barrier function of the filtering bleb conjunctiva and the cornea after trabeculectomy with mitomycin C. *J Glaucoma* 5 (4): 233-236, 1996.
- 55) Tanihara H, Yokoi N, Komuro A, Honda Y, Kinoshita S: Prolonged impairment of peripheral corneal epithelium barrier function after successful trabeculectomy. *Am J Ophthalmol* 123 (4): 487-493, 1997.
- 56) Yokoi K, Yokoi N, Kinoshita S: Impairment of ocular surface epithelium barrier function in patients with atopic dermatitis. *Br J Ophthalmol* 82 (7): 797-800, 1998.
- 57) Yokoi N, Kinoshita S: Clinical evaluation of corneal epithelial barrier function with the slit-lamp fluorophotometer. *Cornea* 14 (5): 485-489, 1995.
- 58) Yokoi N, Komuro A, Nishida K, Kinoshita S: Effectiveness of hyaluronan on corneal epithelial barrier function in dry eye. *Br J Ophthalmol* 81 (7): 533-536, 1997.
- 59) Yokoi N, Niiya A, Komuro A, Yokogaki S, Naka H, Awata T, Honma Y, Yamada J, Tei M, Kinoshita S: Effects of aldose reductase inhibitor CT-112 on the corneal epithelial barrier of galactose-fed rats. *Curr Eye Res* 16 (6): 595-599, 1997.
- 60) Yokoi N, Mossa F, Tiffany JM, Bron AJ: Assessment of meibomian gland function in dry eye using meibometry. *Arch Ophthalmol* 117 (6): 723-729, 1999.
- 61) Yokoi N, Komuro A, Maruyama K, Kinoshita S: New instruments for dry eye diagnosis. *Semin Ophthalmol* 20 (2): 63-70, 2005.
- 62) Mathers WD, Daley T, Verdick R: Video imaging of the meibomian gland. *Arch Ophthalmol* 112 (4): 448-449, 1994.
- 63) Ang LP, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S: Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplants for severe ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 124: 1543-1551, 2006.
- 64) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S: Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 113: 1765-1772, 2006.
- 65) Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Nakamura T, Shimizu Y, Kinoshita S: Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (1): 93-99, 2004.
- 66) Nakamura T, Inatomi T, Sekiyama E, Ang LP, Yokoi N, Kinoshita S: Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand* 84 (3): 401-405, 2006.
- 67) Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, Kinoshita S: Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (3): 800-806, 2004.
- 68) Suemori H, Yasuchika K, Hasegawa K, Fujioka T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N: Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (3): 926-932, 2006.
- 69) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28 (1): 31-40, 2000.
- 70) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi

- M, Yoshikawa K, Nishikawa S, Nakatsuji N: Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (3): 1580–1585, 2002.
- 71) Brederlau A, Correia A S, Anisimov S V, Elmi M, Paul G, Roybon L, Morizane A, Bergquist F, Riebe I, Nannmark U, Carta M, Hanse E, Takahashi J, Sasai Y, Funa K, Brundin P, Eriksson P S, Li J Y: Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of *in vitro* differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells* 24 (6): 1433–1440, 2006.
- 72) Buytaert-Hoefen K A, Alvarez E, Freed C R: Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF. *Stem Cells* 22 (5): 669–674, 2004.
- 73) Ooto S, Haruta M, Honda Y, Kawasaki H, Sasai Y, Takahashi M: Induction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (6): 2689–2693, 2003.
- 74) Nishida K, Kawasaki S, Adachi W, Kinoshita S: Apolipoprotein J expression in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (11): 2285–2292, 1996.
- 75) Munier F L, Korvatska E, Djemai A, Le Paslier D, Zografos L, Pescia G, Schorderet D F: Keratoepithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nat Genet* 15 (3): 247–251, 1997.
- 76) Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M: p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (6): 3156–3161, 2001.
- 77) Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y: Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett* 565 (1–3): 6–10, 2004.
- 78) Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming M D, Dotsch V, Andrews N C, Caput D, McKeon F: p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2 (3): 305–316, 1998.
- 79) Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson R T, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F: p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398 (6729): 714–718, 1999.
- 80) Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Connon C J, Kinoshita S: Expression and tissue distribution of p63 isoforms in human ocular surface epithelia. *Exp Eye Res* 82 (2): 293–299, 2006.
- 81) Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Yokoi N, Komuro A, Kinoshita S: Clusters of corneal epithelial cells reside ectopically in human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (4): 1359–1367, 2006.
- 82) Tanioka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Ang L P, Koizumi N, Nakamura T, Yokoi N, Komuro A, Inatomi T, Kinoshita S: Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 3820–3827, 2006.
- 83) Sekiyama E, Nakamura T, Kawasaki S, Sogabe H, Kinoshita S: Different expression of angiogenesis-related factors between human cultivated corneal and oral epithelial sheets. *Exp Eye Res* 83: 741–746, 2006.
- 84) Sekiyama E, Nakamura T, Cooper L J, Kawasaki S, Hamuro J, Fullwood N J, Kinoshita S: Unique distribution of thrombospondin-1 in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (4): 1352–1358, 2006.
- 85) Ueta M, Nochi T, Jang M H, Park E J, Igarashi O, Hino A, Kawasaki S, Shikina T, Hiroi T, Kinoshita S, Kiyono H: Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J Immunol* 173 (5): 3337–3347, 2004.
- 86) Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335–376, 2003.

- 87) Hozono Y, Ueta M, Hamuro J, et al: Human corneal epithelial cells respond to ocular-pathogenic, but not to nonpathogenic-flagellin. *Biochem Biophys Res Commun* 347 (1): 238-247, 2006.
- 88) Ueta M, Hamuro J, Kiyono H, Kinoshita S: Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 331 (1): 285-294, 2005.
- 89) Kawasaki S, Nishida K, Sotozono C, Quantock A J, Kinoshita S: Conjunctival inflammation in the chronic phase of Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* 84 (10): 1191-1193, 2000.
- 90) Nakamura T, Nishida K, Dota A, Matsuki M, Yamanishi K, Kinoshita S: Elevated expression of transglutaminase 1 and keratinization-related proteins in conjunctiva in severe ocular surface disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (3): 549-556, 2001.
- 91) Sotozono C, Ang L P K, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, Kaido M, Dogru M, Shimazaki J, Tsubota K, Yamada M, Kinoshita S: A new grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology*. (in press)
- 92) Ueta M, Hamuro J, Yamamoto M, Kaseda K, Akira S, Kinoshita S: Spontaneous ocular surface inflammation and goblet cell disappearance in I kappa B zeta gene-disrupted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 (2): 579-588, 2005.

---

Strategic Research and Development of Novel Therapeutic Modalities  
for Ocular Surface Diseases by Regenerative Medicine

Shigeru Kinoshita<sup>1</sup>, Chie Sotozono<sup>1</sup>, Tsutomu Inatomi<sup>1</sup>,  
Takahiro Nakamura<sup>2</sup>, Noriko Koizumi<sup>2</sup>, Satoshi Kawasaki<sup>1</sup>,  
Mayumi Ueta<sup>1</sup>, Norihiko Yokoi<sup>1</sup>, Morio Ueno<sup>1,3</sup>, Yoshiki Sasai<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

<sup>2</sup> Research Center for Regenerative Medicine, Doshisha University

<sup>3</sup> Organogenesis and Neurogenesis Group, RIKEN Center for Developmental Biology