

厚生労働科学研究費補助金  
感覚器障害研究事業

角膜内皮機能不全に対する  
新しい治療方法の開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山田 昌和

平成19年度 (2007) 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

角膜内皮機能不全に対する新しい治療方法の開発

### II. 分担研究報告書

1. 培養ヒト角膜内皮細胞の増殖機構における転写抑制因子  
Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF)の役割  
東城 博雅

2. ヒト角膜内皮細胞培養技術の確立  
東 範行

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 (感覚器障害研究事業)

総括研究報告書

## 角膜内皮機能不全に対する新しい治療方法の開発

主任研究者 山田昌和

国立病院機構東京医療センター (臨床研究センター) 部長

研究要旨： 角膜内皮機能不全に対する新しい治療法として、薬物療法と培養角膜内皮細胞移植による手術治療の開発を目的とした研究を行った。薬物療法に関しては、デキサメサゾンとインスリンが Na-K ATPase 活性を上昇させることが、酵素活性測定と Ussing chamber を用いた角膜内皮ポンプ機能測定の2つの方法で示された。デキサメサゾンとインスリンの Na-K ATPase 活性化の機序は異なると推定され、両者の相加作用が期待できる。角膜内皮の増殖制御については、正常角膜内皮細胞が体内で増殖しないことに PLZF 遺伝子の発現が関係していることを示した。今後、PLZF 遺伝子の発現制御によって、ヒト角膜内皮細胞を効率よく増殖させる方法について検討していく予定である。角膜内皮細胞の培養、増殖の技術が発展すれば、1人の提供者から採取した角膜内皮を増殖させて、複数の患者に移植することが可能になるものと期待される。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における役職名

東城 博雅	大阪大学大学院医学系研究科 生化学分子生物学 生命機能研究科細胞ネットワーク・生化学 准教授
東 範行	国立成育医療センター 眼科医長

角膜内皮は角膜の最後面に位置する一層の細胞層であり、ポンプ機能とバリア機能により角膜実質の含水率を制御し、角膜の透明性の維持に寄与している。角膜内皮細胞はヒトでは生後は再生能力がなく、その細胞数は加齢と共に低下し、コンタクトレンズの長期装用や眼手術などの侵襲によって低下することが知られている。細胞数の減少がある段階に達すると内皮機能不全となり、角膜浮腫から水疱性角膜症により失明状態に陥る。内皮機能不全の治療法は現状では角膜移植しかなく、角膜移植の適応となる最大の疾患であるが、本邦では提供眼不足のために、6000人の患者が数年間手術を待機している状態であり、角膜移植によらない本疾患の治療法の開発が急務と考えられている。

本研究では、主任研究者の山田は、角膜内皮機能不全の治療法として、従来ほとんど考慮されてこなかった薬物療法の開発を目的

### A. 研究目的

角膜内皮機能不全は角膜疾患のなかで最も失明に至る頻度が高く、角膜移植を待機する患者の過半数を占める疾患である。本研究は角膜内皮機能不全に対する新しい治療法として、薬物療法と培養角膜内皮細胞移植による手術治療の開発を行うことを目的としている。角膜内皮機能不全症例のうち、軽症例は薬物療法による機能維持を目指し、重症例は自己または同種の培養角膜内皮細胞移植による手術治療を目指す。

とした研究を行った。角膜内皮細胞のポンプ機能は主としてNa-K ATPaseにより発揮されるが、その詳細には不明の点が多い。本研究ではデキサメサゾン、インスリン及びprotein kinase C(PKC)による角膜内皮細胞のNa-K ATPase活性化について検討した。

また、分担研究者の東城と東は、内皮機能不全の重症例の治療のために、培養角膜内皮細胞移植の開発を目的とした研究を行った。ヒト角膜内皮細胞は生体内では増殖しないが、これには何らかの増殖抑制因子が関与していると推測されている。東城は、角膜内皮細胞の増殖抑制に関わる転写抑制因子の同定とそのメカニズムの解明を目指した研究を行い、転写抑制因子であるPromyelocytic leukemia zinc finger(PLZF)に焦点を当て、PLZFがヒト角膜内皮細胞の増殖抑制機構に関与しているかどうかについて検討した。また、眼組織中の角膜内皮系幹細胞を同定し、増殖させることが可能になれば、角膜内皮系幹細胞の利用が可能になる。東は、ヒト眼組織由来幹細胞の存在を明らかにし、その採取・分離・培養のための条件を検討した。

## B. 研究方法

角膜内皮細胞のポンプ機能の評価には、マウス由来の角膜内皮細胞(C3H)を継代培養したものを用いた。培養液中に種々の濃度のデキサメサゾン、インスリン、PKC活性薬のphorbol dibutyrate(PDBU)を添加し、6-48時間反応させた。

Na-K ATPaseの酵素活性測定は、培養液中にアデノシン3リン酸(ATP)を加えて、ATPaseにより生成される無機リン酸量をリンモリブデン反応による呈色反応を用いることで行い、Na-K ATPaseの特異的阻害剤であるウアバインを添加した場合と添加しない場合の差を求めてNa-K ATPase活性とした。Na-K ATPaseのポンプ機能の測

定は角膜内皮細胞シートをUssing chamberに組み込み、ポンプ機能により生じる角膜内皮細胞シートの表裏間のshort circuit currentを測定することで行った。

## C. 研究結果

デキサメサゾンの反応時間とNa-K ATPase酵素活性の関係を図1Aに示す。10<sup>-5</sup>Mのデキサメサゾンを投与後、6時間、24時間、48時間でのNa-K ATPase活性を測定した。デキサメサゾンは時間が経過するにつれて活性が増加し、48時間で最も活性が上昇した。デキサメサゾンの反応時間とUssing chamberを用いたNa-K ATPaseポンプ機能増加率の関係を図1Bに示す。酵素活性と同様にポンプ機能も時間が経過するにつれて活性が増加し、48時間で最も活性が高くなった。

デキサメサゾン濃度がNa-K ATPase酵素活性に及ぼす影響を図2Aに示す。10<sup>-9</sup>Mから10<sup>-5</sup>Mのデキサメサゾンを投与し48時間後のNa-K ATPase活性を測定した。Na-K ATPaseの活性がはっきり濃度依存的に増加するのがみられ、濃度が10<sup>-5</sup>Mのときにコントロールの約3.9倍に有意に増加していた。デキサメサゾンの濃度とポンプ機能増加率の関係を図2Bに示す。酵素活性と同様にポンプ機能も濃度依存的に増加するのがみられ、濃度が10<sup>-5</sup>Mのときにコントロールの10.6倍となった。

次にインスリンの反応時間とNa-K ATPase酵素活性の関係を図3Aに示す。10<sup>-5</sup>Mのインスリンを投与後、6時間、24時間、48時間でのNa-K ATPase活性を測定した。インスリン投与後6時間で最もNa-K ATPase活性が高くなり、時間が経過するにつれ活性が減少していった。インスリンの反応時間とポンプ機能増加率の関係を図3Bに示す。酵素活性と同様にポンプ機能もインスリン投与後6時間で最も

Na-K ATPase 活性が高くなり、時間が経過するにつれ活性が減少していった。

インスリン濃度が Na-K ATPase 活性に及ぼす影響を図 4A に示す。 $10^{-8}\text{M}$  から  $10^{-5}\text{M}$  のインスリンを投与し 6 時間後の Na-K ATPase 活性を測定した。Na-K ATPase 活性は、インスリン濃度が  $10^{-7}\text{M}$  において頂点に達しコントロールの約 2.6 倍の活性増加がみられた。インスリンの濃度とポンプ機能増加率の関係を図 4B に示した。酵素活性と同様にポンプ機能も、インスリン濃度が  $10^{-7}\text{M}$  において頂点となりコントロールの約 3.7 倍の増加がみられ、bell shape 型の用量反応曲線となった。

次に PDBU 濃度が Na-K ATPase 酵素活性に及ぼす影響を図 5 に示す。 $10^{-9}\text{M}$  から  $10^{-5}\text{M}$  の PDBU を投与し 30 分後の Na-K ATPase 活性を測定した。インスリンと同様、PDBU 濃度が  $10^{-7}\text{M}$  で頂点に達しコントロールの約 1.5 倍の増加がみられ、bell shape 型の用量反応曲線となった。

#### D. 考察

角膜内皮 Na-K ATPase の酵素活性測定においても、Ussing chamber を用いた short circuit current による角膜内皮ポンプ機能測定においてもデキサメサゾンとインスリンは Na-K ATPase 活性を上昇させることが示された。また、同時にデキサメサゾンとインスリンの Na-K ATPase への影響の仕方は異なることも示された。

デキサメサゾンは Na-K ATPase 活性の上昇に比較的長時間を要する一方で、インスリンは短時間で Na-K ATPase 活性を上昇させた。デキサメサゾンは、濃度依存的に Na-K ATPase 活性を上昇させ、一方、インスリン濃度と Na-K ATPase 活性の用量反応曲線は、インスリン濃度が  $10^{-7}\text{M}$  で頂点となる bell-shape 型を示した。デキサメサ

ゾンとインスリンの、Na-K ATPase 活性への影響の仕方が異なることから、デキサメサゾンとインスリンでは、異なる機序で Na-K ATPase 活性を上昇している可能性があると考えられた。

過去の腎臓尿細管や心筋など他の組織での報告によると、インスリンは PKC などの protein kinase 群を介して Na-K ATPase 活性へ影響を及ぼしていると考えられている。今回の結果でも、インスリン濃度と Na-K ATPase 活性の用量反応曲線は、PDBU 濃度と Na-K ATPase 活性の用量反応曲線と同様に  $10^{-7}\text{M}$  で頂点となる bell-shape 型を示した。PKC の下流では、protein phosphatase 群、特に protein phosphatase 1 および protein phosphatase 2A を介し Na-K ATPase の  $\alpha$ -subunit を脱リン酸化して Na-K ATPase の活性を上昇させる経路が指摘されている。一方で PKC の下流では cyclooxygenase や、cytochrome P<sub>450</sub> を介して Na-K ATPase 活性を抑制させる経路も指摘されている。

インスリンの作用は PKC を介していること、PKC の下流には Na-K ATPase 活性を亢進する系と抑制する系の双方があり、両者の相互作用によって bell shape 型の反応曲線を示すことが示唆された。従って、PKC の下流にある Na-K ATPase 活性を抑制する系を阻害すれば、インスリンの Na-K ATPase 活性亢進作用は更に増強できる可能性があると考えられた。これらの薬剤の組み合わせによって Na-K ATPase 活性の機序を解明し、活性を制御できれば、水疱性角膜症に対する薬物治療となる可能性があると考えられた。

分担研究者の東城は、正常ヒト角膜内皮細胞が体内で増殖しないことに PLZF 遺伝子の発現が関係していることを示した。東城は、培養ヒト角膜内皮細胞の増殖機構

における PLZF の役割について検討し、以下の結果を得た。1) PLZF 遺伝子の発現制御には細胞間接着の形成が関与していることが示された。2) PLZF 遺伝子がヒト角膜内皮細胞の増殖抑制に関与していることが示された。3) PLZF によるヒト角膜内皮細胞の増殖抑制に TSC-22 が関与している可能性が示された。PLZF 遺伝子の発現制御によって、ヒト角膜内皮細胞を効率よく増殖させる方法について検討していく予定である。

また、分担研究者の東は、小児眼組織検体内には間葉系細胞と同様の培養条件で増殖する細胞が存在することを示した。今後これらの増殖する細胞群のプロファイリングを詳細に明らかにすることで、角膜内皮細胞培養の手法を確立していく予定である。

これらの研究により角膜内皮細胞の培養、増殖の技術が発展すれば、1人の提供者から採取した角膜内皮を増殖させて、複数の患者に移植することが可能になるものと期待される。また、角膜内皮機能不全の患者自身から角膜内皮細胞を採取し、シート状に培養して増殖させることが可能になれば、自己の細胞を用いた自家角膜内皮移植術が可能になり、拒絶反応の問題も解決される。自己移植、同種移植のいずれの場合にも、提供眼不足に苦慮する本邦の角膜移植医療の現状を根本から変えることができると考えられた。

#### E. 結論

角膜内皮機能不全に対する新しい治療法として、角膜内皮機能を活性化させる薬物療法、小児眼組織由来の角膜内皮幹細胞の同定と培養技術の確立、角膜内皮の増殖制御機構の解明による効率の良い角膜内皮細胞増殖法という3つの観点からの研究を行った。これらの研究を更に進め、臨

床応用に結びつけていくことで、提供眼不足に苦慮する本邦の角膜移植医療の現状を改善していくことを目標としたい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamada M, Ishikawa K, Mochizuki H, Kawai M. Corneal Penetration of Simultaneously Applied Topical Levofloxacin, Norfloxacin and Lomefloxacin in Human Eyes.

Acta Ophthalmol 2006;84:182-186.

Yamada M, Mochizuki H, Kawashima M, Hata S. Phospholipids and Their Degrading Enzyme in Tears of Soft Contact Lens Wearers. Cornea 2006;25:S68-S72.

Funayama T, Mashima Y, Kawashima M, Yamada M. Lattice Corneal Dystrophy Type III in Patients with a Homozygous L527R Mutation in the TGFBI Gene. Jpn J Ophthalmol 2006;50:62-64.

櫻井美晴, 望月弘嗣, 大野建治, 山田昌和. 白内障術前患者の角膜内皮細胞減少例とその要因. 臨眼 2006;60:73-77

櫻井美晴, 羽藤晋, 望月弘嗣, 山田昌和. フルオロキノロン剤が角膜上皮細胞および実質細胞に与える影響. あたらしい眼科 2006;23:1209-1212.

羽藤晋, 山田昌和. 日常診療に役立つ最新の薬物治療と副作用対策, 眼症状. 小児科 2006;47:691-699.

山田昌和. 眼感染症—古くて新しい問題—. Ophthalmology Update 2006;21:3-7.

秋山邦彦, 山田昌和. 白内障の診断. 白内障, 11-16, 金原出版, 2006

若倉雅登, 清澤源弘, 山田昌和, 石郷岡純 (編著). 解決, 目と視覚の不定愁訴, 不明愁訴. 金原出版, 2006

山田昌和, 羽藤晋. 角膜移植後の感染症. 眼感染症ケース別まるごとマスター. 前田直之, 黒坂大次郎編, 82-87, メジカルビュー社, 2006

後藤浩, 山田昌和, 吉川啓司, 飯野倫子 (編著). 眼科開業医のための疑問難問解決策. 診断と治療社, 2006

山田昌和. 前眼部疾患と両眼視. 両眼視. 大月洋編, 115-118, 金原出版, 2007

山田昌和. 移植か虹彩付きコンタクトレンズか? 美容的手術への対応. 眼科プラクティス 13, 角膜外科のエッセンス. 坪田一男編, 85-87, 文光堂, 2007

## 2. 学会発表

山田昌和. 前眼部疾患のVR-QOL 評価. シンポジウム, 第 110 回日本眼科学会総会, 大阪, 2006. 4

羽藤晋, 櫻井美晴, 望月弘嗣, 山田昌和. Phorbol dibutyrate と indomethacin による角膜内皮細胞 Na-K ATPase の活性化. 第 110 回日本眼科学会総会, 大阪, 2006. 4

佐々木香る, 子島良平, Qi Jia, 小幡博人, 山田昌和, 平野耕治, 木下茂, 刑部安弘,

宮田和典. 円錐角膜による続発性アミロイドーシスにおけるラクトフェリン遺伝子異常の有無. 第 110 回日本眼科学会総会, 大阪, 2006. 4

山田昌和. インストラクションコース, 解決, 不定愁訴, 不明愁訴. 目の痛み. 第 60 回日本臨床眼科学会, 京都, 2006. 10

山田昌和. シンポジウム, 小児の角膜感染症. 第 60 回日本臨床眼科学会, 京都, 2006. 10

佐々木香る, 小幡博人, 平野耕治, 山田昌和, 北川和子, 木下茂. 続発性アミロイドーシスの臨床像. 第 60 回日本臨床眼科学会, 京都, 2006. 10

勝田智子, 花園元, 山田昌和, 三宅養三, 感覚器ネットワーク白内障研究グループ. 白内障患者の QOL と健康イベントに関する多施設共同研究: ベースラインデータ. 第 60 回日本臨床眼科学会, 京都, 2006. 10

望月弘嗣, 羽藤晋, 山田昌和. ヒアルロン酸点眼による涙液動態の変化とヒアルロン酸自体の滞留性は異なる. 第 60 回日本臨床眼科学会, 京都, 2006. 10

山田昌和, 三宅養三, 感覚器ネットワークドライアイ研究グループ. QOL 評価に基づいたドライアイの治療法選択に関する多施設共同研究: ベースラインデータ. 第 60 回日本臨床眼科学会, 京都, 2006. 10

藤池佳子, 勝田智子, 山口洋子, 松丸麻紀, 村井徳子, 逸見睦子, 羽藤晋, 山田昌和. 成人斜視の手術成績と術後満足度調査. 第 60 回日本臨床眼科学会, 京都, 2006. 10



羽藤晋、望月弘嗣、山田昌和. Protein kinase C による角膜内皮細胞 Na-K ATPase 活性調節の機序. 第 60 回日本臨床眼科学会、京都、2006.10

山田昌和. よくみる角結膜腫瘍. 教育セミナー, 第 30 回日本眼科手術学会, 京都, 2007.1

山田昌和. 小児の角膜移植. シンポジウム, 第 30 回日本眼科手術学会, 京都, 2007.1

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

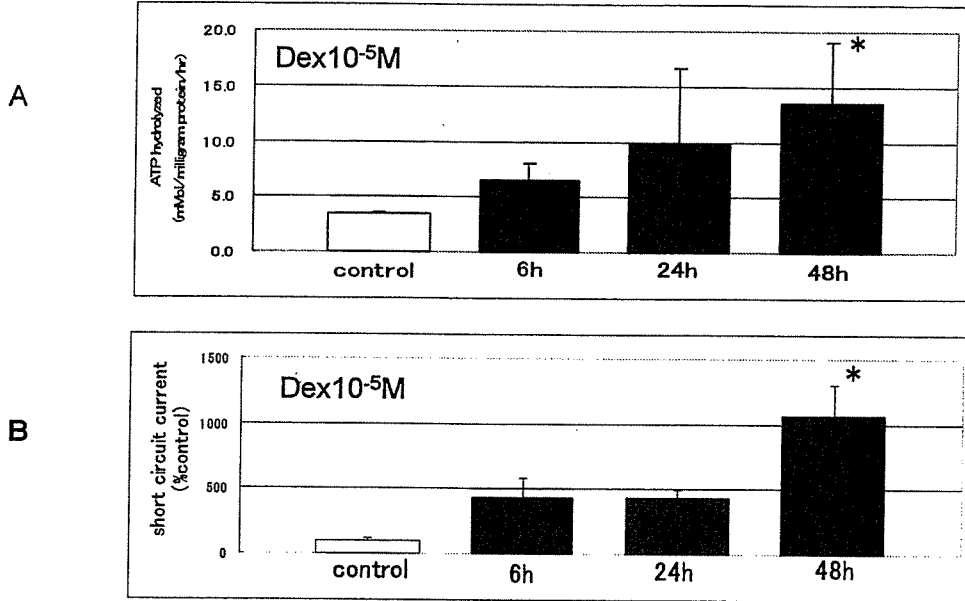
##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

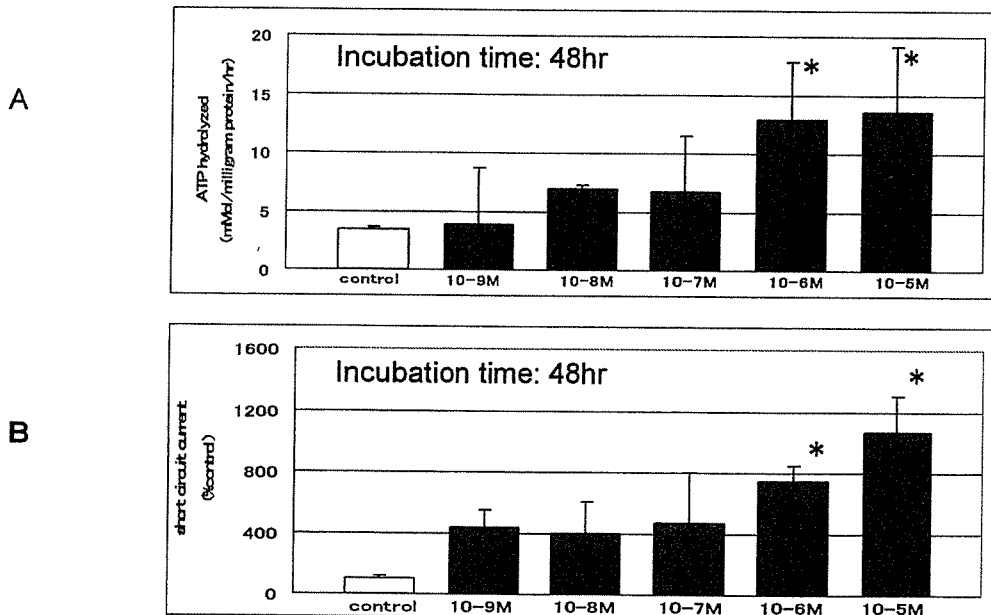
なし

図1: デキサメサゾンの反応時間と  
角膜内皮Na-K ATPase活性の関係



\* : P<0.01

図2: デキサメサゾンの濃度と  
角膜内皮Na-K ATPase活性の関係



\* : P<0.01

図3: インスリンの反応時間と  
角膜内皮Na-K ATPase活性の関係

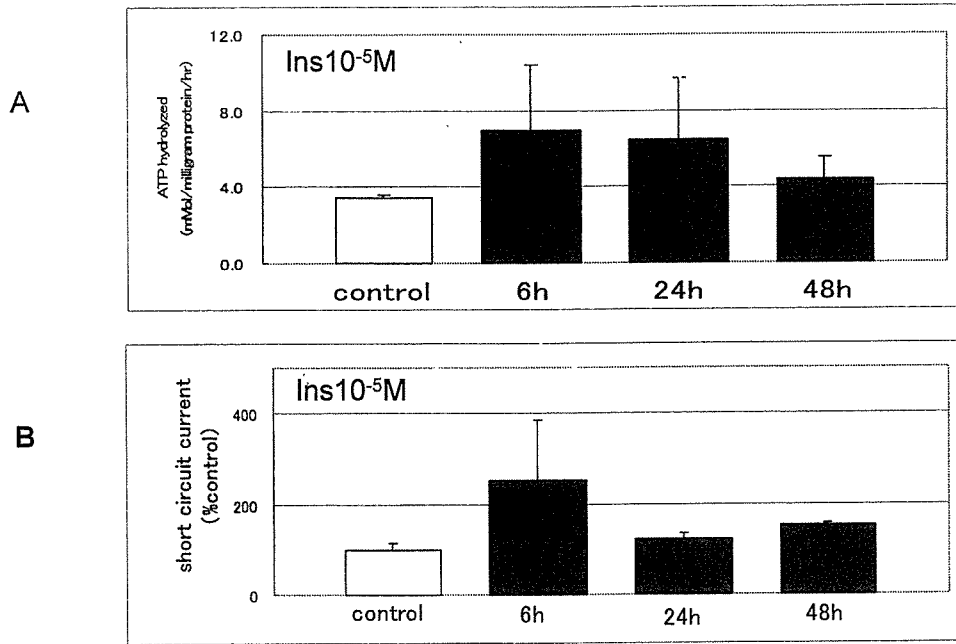
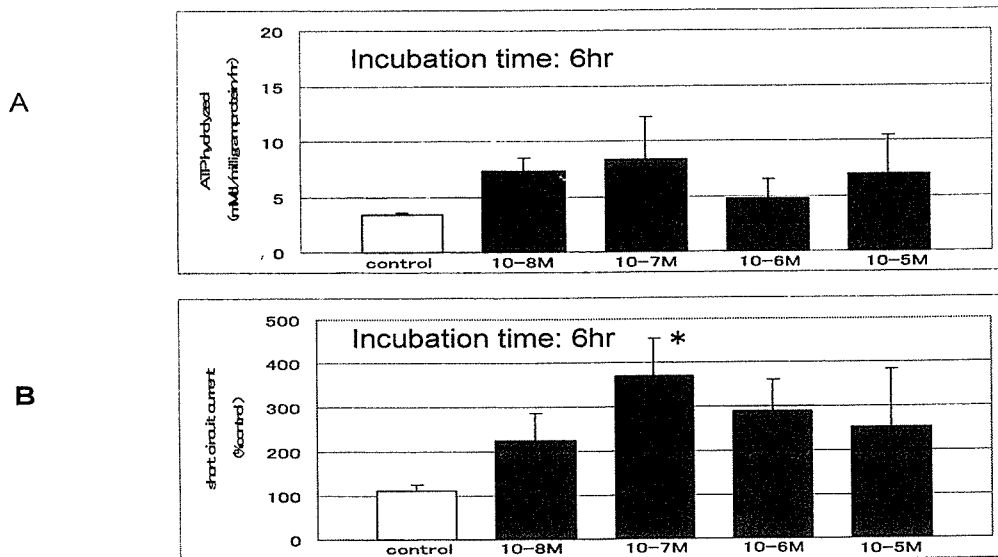
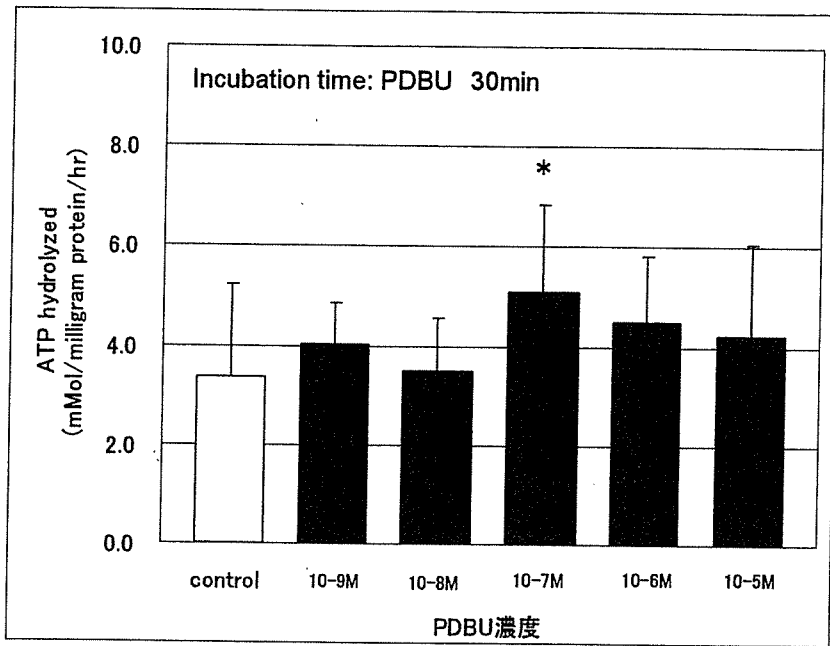


図4: インスリンの濃度と  
角膜内皮Na-K ATPase活性の関係



\* : P<0.01

図5: PDBU濃度がNa-K ATPase 活性に及ぼす影響



\* P<0.05

PDBU: phorbol dibutyrate

## II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

培養ヒト角膜内皮細胞の増殖機構における転写抑制因子  
Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF) の役割

分担研究者 東城博雅

大阪大学大学院医学系研究科生化学分子生物学

生命機能研究科細胞ネットワーク・生化学 助教授

研究要旨

本研究は、角膜内皮細胞の増殖抑制に関わる転写抑制因子の同定とそのメカニズムの解明を目的とするものであり、転写抑制因子である Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) に焦点を当て、PLZF の角膜内皮細胞の増殖抑制機構への関与とそのメカニズムについて検討した。その結果、PLZF 遺伝子の発現制御には細胞間接着の形成が関与していること、PLZF 遺伝子が角膜内皮細胞の増殖抑制に関与していること、そのメカニズムに transforming growth factor beta-stimulated clone 22 が関与している可能性が示された。正常ヒト角膜内皮細胞が体内で増殖しないことに PLZF 遺伝子の発現が関係していることが示された。PLZF 遺伝子の発現制御によって、角膜内皮細胞を効率よく増殖させることができれば、自己の残存内皮細胞を分裂増殖させることで理想的な角膜内皮障害の治療法となる可能性があるものと考えられた。

A. 研究目的

角膜内皮細胞は角膜の透明性を維持するために重要な役割を果たしている。ヒト角膜内皮細胞は生後生体内ではほとんど分裂増殖しないため、内眼手術や眼内の炎症、感染など種々のストレスにより内皮細胞の極端な減少から代償不全を招き、水疱性角膜症を発症するケースが増加している。水疱性角膜症に対する治療としては現在のところ全層角膜移植しかないが、慢

性的なドナー不足に加え、移植後拒絶反応や術後角膜乱視、日和見感染の発生等、問題点は山積している。理想的な角膜内皮障害の治療法は、自己の残存内皮細胞を何らかの形で刺激し分裂増殖させることであるが、これを可能とする第一段階として、角膜内皮細胞の増殖抑制機構を種々の角度から詳細に解明していくことが必要である。

本研究は、角膜内皮細胞の増殖抑制に関わる転写抑制因子の同定とそのメカニズ

ムの解明を目的とするものであり、転写抑制因子である Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) に焦点を当て、PLZF がヒト角膜内皮細胞の増殖抑制機構に関与しているのかどうかについて検討した。

## B. 研究方法

実験には、輸入角膜より得られたヒト角膜内皮細胞を培養し、5 継代目の内皮細胞を使用した。BTB/POZ-zinc finger protein family に属する 6 つの転写因子の発現パターンを RT-PCR にて検討した。増殖過程における PLZF 遺伝子の発現動態、さらには 3.2mM EDTA 処理による一時的細胞間接着解除における PLZF 遺伝子の発現動態を real-time PCR にて検討した。アデノウイルスベクターによる PLZF の遺伝子導入を行い、PLZF の増殖抑制効果をリアルタイム細胞計測システムを用いて検討した。Micro-array 法にて PLZF の標的遺伝子を検討した。

## C. 研究結果

1) ヒト角膜内皮細胞における BTB/POZ-zinc finger protein family に属する 6 つの転写因子の発現パターンおよび増殖過程における PLZF 遺伝子の発現動態：

RT-PCR において、培養ヒト角膜内皮細胞では PLZF だけが異なる遺伝子発現パターンを示した。また、Real-time PCR において、PLZF mRNA の発現はサブコンフルエ

ントでは認められず、コンフルエントの状態では認められた。正常ヒト角膜内皮細胞では常に PLZF mRNA の発現が認められた。(Fig 1)

2) 3.2mM EDTA 処理による一時的細胞間接着解除における PLZF 遺伝子の発現動態：

Real-time PCR において、培養ヒト角膜内皮細胞における PLZF 遺伝子の発現量は、細胞間接着の解除により約 1/20 に減少し、その後の細胞間接着の再形成に伴い通常のレベルまで回復した。(Fig 2)

3) アデノウイルスベクターによる PLZF の遺伝子導入および PLZF の培養ヒト角膜内皮細胞に対する増殖抑制効果：

Ad-GFP を用いたアデノウイルスベクターの導入効率は、MOI 100 で 24%であった。

MOI 100 の条件下で PLZF を過剰発現させた培養ヒト角膜内皮細胞では、control に比べて 24 時間後で 30.3%、48 時間後で 26.5% の細胞増殖抑制効果を認めた ( $P < 0.001$ )。(Fig 3)

4) Micro-array 法による PLZF の標的遺伝子の検討

MOI 100 の条件下で PLZF を過剰発現させた培養ヒト角膜内皮細胞では、control に比べて、transforming growth factor beta-stimulated clone 22 (TSC-22) の発現が 2.32 倍に増加した。(Fig 4)

#### D. 考察

本研究において我々は、培養ヒト角膜内皮細胞の増殖機構における PLZF の役割について検討した。本研究において 1) PLZF 遺伝子の発現制御には細胞間接着の形成が関与していることが示された。

2) PLZF 遺伝子がヒト角膜内皮細胞の増殖抑制に関与していることが示された。

3) PLZF によるヒト角膜内皮細胞の増殖抑制に TSC-22 が関与している可能性が示された。

#### E. 結論

正常ヒト角膜内皮細胞が体内で増殖しないことに PLZF 遺伝子の発現が関係していることが示された。PLZF 遺伝子の発現制御によって、ヒト角膜内皮細胞を効率よく増殖させることができれば、自己の残存内皮細胞を分裂増殖させることで理想的な角膜内皮障害の治療法となる可能性があるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nagatsuka, Y., Tojo, H., and Hirabayashi, Y. Analysis and determination of novel glycolipids in vertebrate brains by HPLC/mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 417, 155-167 (2006).

2. Tokuoka, K., Nakajima, Y., Hirotsu, K., Miyahara, I., Nishina, Y., Shiga, K., Tamaoki, H., Setoyama, C., Tojo, H., and Miura, R. Three-Dimensional Structure of Rat-Liver Acyl-CoA Oxidase in Complex with Fatty Acid: Insights into Substrate-Recognition and Reactivity toward Molecular Oxygen. *J. Biochem.* 139, 789-795 (2006)

3. 東城 博雅 リピドミクス 質量分析学 9章 大阪大学出版会 印刷中

4. Shiraishi A, Joko T, Higashiyama S, Ohashi Y. Role of promyelocytic leukemia zinc finger protein in proliferation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea* (in press)

5. Joko T, Nanba D, Shiba F, Miyata K, Shiraishi A, Ohashi Y, Higashiyama S. Effects of Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein on the Proliferation of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Mol Vis* (in press)

6. Yamamoto Y, Uno T, Shisida K, Xue L, Shiraishi A, Zheng X, Ohashi Y. Demonstration of aqueous streaming through a laser iridotomy window against the corneal endothelium. *Arch Ophthalmol.* 124: 387-393, 2006.

7. Mizoue S, Iwai M, Ide A, Suzuki J, Horiuchi M, Ohashi Y. Role of Angiotensin II receptor subtypes in conjunctival wound healing. *Curr Eye Res* 31: 129-136, 2006.



8. Yamaguchi M, Kutsuna M, Uno T, Zheng X, Kodama T, Ohashi Y. Marx line: fluorescein staining line on the inner lid as indicator of meibomian gland function. *Am J Ophthalmol*, 141: 669-675, 2006.
9. Natioka J, Ohashi Y. Changes in Lumen Width of Nasolacrimal drainage system after adrenergic and cholinergic stimulation. *Am J Ophthalmol*, 141: 689-698, 2006.
10. 岡奈央子、鈴木崇、中野有香、山西茂喜、宇野敏彦、大橋裕一. 強い硝子体混濁を認めた Human T-Cell Lymphotropic Virus Typel 関連ぶどう膜炎の1例. *眼紀* 57: 691-694, 2006.
11. Fukaya Y, Kurita A, Tsuruga H, Naito A, Nakaya S, Sato M, Kamata Y, Hirata H, Kambara Y, Kurasaka N, Wada T, Toyoda Y, Shirasawa E, Ohashi Y. Antibiotic effects of WP-0405, a thermo-setting ofloxacin gel, on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbits. *J Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 22: 258-266, 2006.
12. Ochi R, Suzuki T, Kimura Y, Kikuchi M, Miyamoto H, Uno T, Ohashi Y. A case of *Nocardia asteroides* keratitis. *Folia Ophthalmol Jpn*, 60: 379-382, 2006.
13. Zhang W, Suzuki T, Shiraishi A, Shimamura I, Inoue Y, Ohashi Y. Dendritic keratitis caused by an acyclovir-resistant herpes simplex virus with frame-shift mutation. *Cornea*, 26: 105-106, 2007.

## 2. 学会発表

1. Tojo, H. Comprehensive lipid profiling by normal-phase HPLC/ion-trap mass spectrometry. 9<sup>th</sup> international conference of hyphenated chromatography and chromatographic analyzers 2006年2月9日
2. Mass spectrometry-based analyses of lipids and proteins from membrane microdomains 日本質量分析学会ランチョンセミナー 2006年5月9日
3. 長塚 靖子、堀端 康博、山崎 泰広、木下 雅美、篠田 陽子、伊藤 伸也、鍋谷 卓司、東城 博雅、平林 義雄 ホスファチジルグルコシドは飽和脂肪酸のみからなる単一分子種として発達期のラット中枢神経系に存在する 第48回日本脂質生化学会 2006年6月9日
4. 東城 博雅、長塚 靖子、浅野 千幸、平林 義雄 HPLC/イオントラップ質量分析法によるホスファチジルグルコシドの分析 第48回日本脂質生化学会 2006年6月9日
5. 東城 博雅 コメンテータ 病理組織材料を用いたプロテオミクス研究の課題 日本臨床プロテオミクス学会 2006年7月18日
6. Tojo, H. Comprehensive Lipid Profiling by Normal-phase HPLC/ion-trap Mass Spectrometry 17<sup>th</sup> International mass spectrometry conference 2006年8月28日
7. Tojo, H. Lipid Profiling encompassing neutral lipids and phospholipids by Normal-phase HPLC/Ion-trap Mass Spectrometry.

Application to Disease Analysis. 47<sup>th</sup>  
International conference of lipid  
bioscience 2006年9月6日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

US Patent: Published 20060022131  
(Issued patent 7186974、2007年3月6  
日)

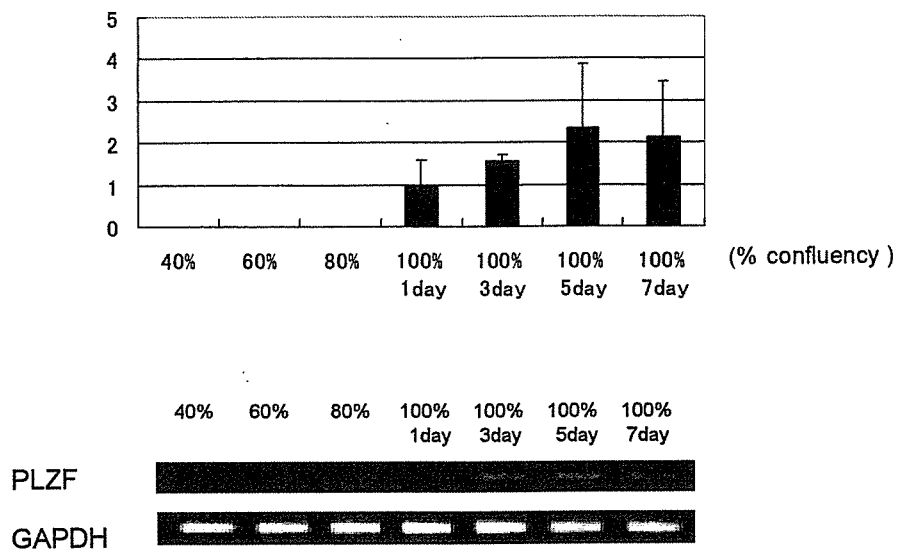
Tojo, H., Electrospray emitter coated  
with material of low surface energy.

##### 2. 実用新案登録

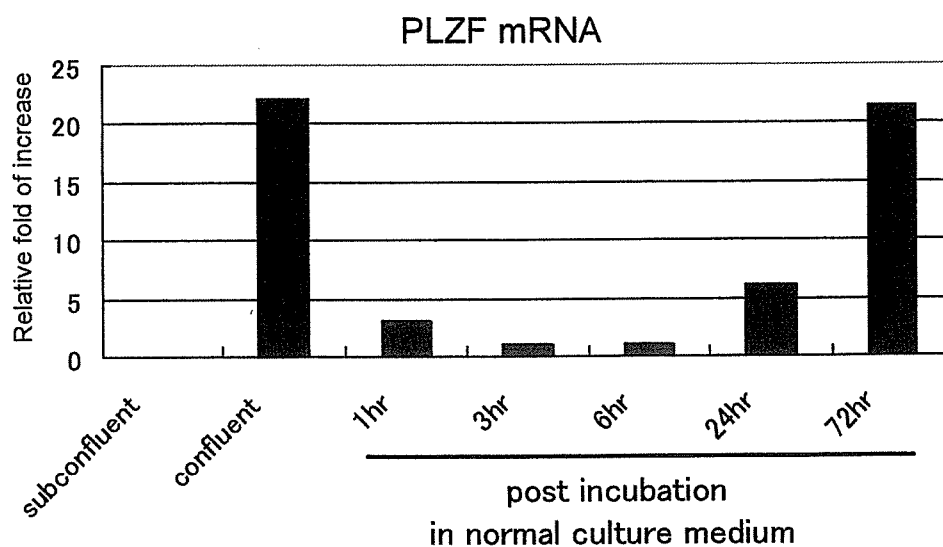
なし

##### 3. その他

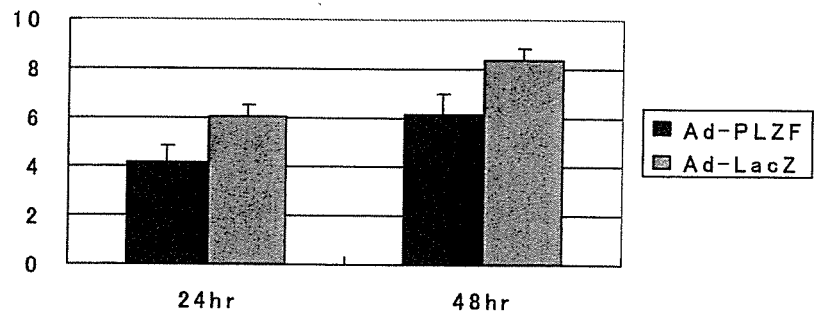
なし



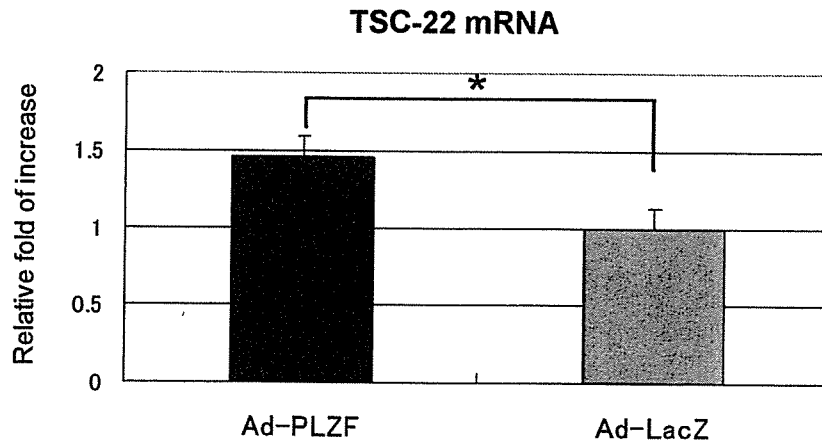
**Figure1.**



**Figure 2.**



**Figure 3.**



**Figure 4.**