

A. 研究目的

細胞外に分泌されたクラステリン蛋白が autocrineあるいはparacrine機構を介して細胞障害性を抑制する機能を有しているか否かを明らかにする目的で、バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて作製した組み換えクラステリン蛋白を用いて解析した。

B. 研究方法

(1) マウス線維芽細胞株であるNIH3T3細胞の培養上清に0.1, 1.0, および10 $\mu\text{g/ml}$ のクラステリン蛋白を添加した。

(2) クラステリン蛋白添加2時間後に0.1mMの過酸化水素を加えた。

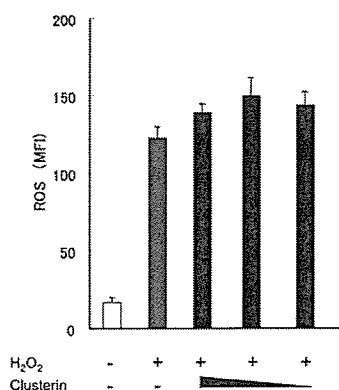
(3) さらに1時間後、活性酸素感受性蛍光色素であるCM-H₂DCFDA (1 $\mu\text{g/ml}$)により染色後、flow cytometryにより細胞内活性酸素種 (ROS) 量を測定した。

(4) 過酸化水素を加えた12時間後にトリパンブルー染色により生細胞数の割合を計測した。

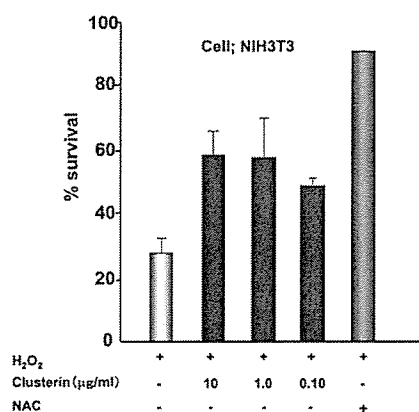
(倫理面への配慮)

C. 研究結果

クラステリン蛋白存在下で過酸化水素刺激した細胞と非存在下で刺激した細胞における細胞内ROS量を比較した結果、両者に差は認められなかった(下図)。



過酸化水素を加えた12時間後にトリパンブルー染色により生細胞数の割合を測定した結果、クラステリン未添加では、生細胞数が約30%であったのに対して、1および10 $\mu\text{g/ml}$ のクラステリンを添加した場合の生細胞数が約60%と有意に増加していた(下図)。(NAC; n-acetyl cysteineは radical scavengerとして知られ、コントロールとして使用された。)



D. 考察

これまでの研究から、放射線照射によりマウスに誘導した涙液・唾液分泌障害の回復がSP細胞から分泌されるクラステリンの有する作用である可能性が想定されている。したがって、本研究により培養上清中に加えたクラステリン蛋白が過酸化水素による細胞死を抑制したという結果は有用であり、加えて、このメカニズムが細胞内ROS産生の抑制効果によるものではないことは極めて興味深いと思われる。前年度の結果から細胞内のクラステリンは細胞内ROS量の産生を抑制することにより酸化ストレスによる細胞死を抑制する可能性が考えられていたが、細胞外から加えたクラステリンには異なるメカニズムを介した細胞死の抑制機能が存在する可能性が考えられるからである。クラステリン蛋白の細胞膜受容体としてはLRP2が報告されているが、その下流のシグナルについての解明は殆どなされていない。本実験でもクラステリンが細胞膜上の受容体に結合する可能性を検討する目的で、蛍光標識したクラステリン蛋白を用いて検討している。

E. 結論

細胞外に存在するクラスτεリン蛋白は、ROSを介した細胞死を抑制することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Altinors DD, Akca S, Akova YA, Bilezikci B, Goto E, Dogru M, Tsubota K. Smoking associated with damage to the lipid layer of the ocular surface. **Am J Ophthalmol.** 141:1016-1021, 2006.
- (2) Dogru M, Ishida K, Matsumoto Y, Goto E, Ishioka M, Kojima T, Goto T, Saiki M, Tsubota K. Strip meniscometry: a new and simple method of tear meniscus evaluation. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 47:1895-901, 2006.
- (3) Goto E, Dogru M, Fukagawa K, Uchino M, Matsumoto Y, Saiki M, Tsubota K. Successful tear lipid layer treatment for refractory dry eye in office workers by low-dose lipid application on the full-length eyelid margin. **Am J Ophthalmol.** 142:264-270, 2006.
- (4) Kaido M, Dogru M, Goto E, Shimazaki J, Tsubota K. Fourier analysis of single running suture adjustment in penetrating and deep lamellar keratoplasty. **J Refract Surg.** 22:617-620, 2006
- (5) Kojima T, Dogru M, Ishida R, Goto E, Matsumoto Y, Tsubota K. Clinical evaluation of the Smart Plug in the treatment of dry eyes. **Am J Ophthalmol.** 141:386-388, 2006.
- (6) Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ishida R, Kojima T, Onguchi T, Yagi Y, Shimazaki J, Tsubota K. Efficacy of a new warm moist air device on tear functions of patients with sim plemeibomian gland dysfunction. **Cornea.** 25:644-650, 2006.
- (7) Suzuki S, Goto E, Dogru M, Asano-Kato N, Matsumoto Y, Hara Y, Fujishima H, Tsubota K. Tear film lipid layer alterations in allergic conjunctivitis. **Cornea.** 25:277-280, 2006.
- (8) Uchino M, Dogru M, Yagi Y, Goto E, Tomita M, Kon T, Saiki M, Matsumoto Y,

Uchino Y, Yokoi N, Kinoshita S, Tsubota K. The features of dry eye disease in a Japanese elderly population. **Optom Vis Sci.** 83:797-802, 2006.

(9) Uchino Y, Goto E, Takano Y, Dogru M, Shinozaki N, Shimmura S, Yagi Y, Tsubota K, Shimazaki J. Long-standing bullous keratopathy is associated with peripheral conjunctivalization and limbal deficiency. **Ophthalmology.** 113:1098-101, 2006.

2. 学会発表

- (1) Dogru M, Sasaki Y, Imamura Y, Okada N, Igarashi A, Goto E, Kawakita T, Sato E, Ward S, Saito I, Tsubota K. Implication of smoking on ocular surface and tear function. International Ocular Surface Society. Florida, 2006.
- (2) Ward S, Wang Y, Ogawa Y, Okada N, Igarashi A, Goto E, Kawakita T, Dogru M, Tsubota K. Ocular surface and tear functions graft versus host diseases. International Ocular Surface Society. Florida, 2006.
- (3) Goto E, Dogru M, Sato E, Takano Y, Matsuda S, Shinozaki E, Tsubota K. The intensity of corneal reflex from the eye increased after punctal plug insertion in dry eye patients with Sjogren syndrome. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual meeting, Florida, 2006.
- (4) Hara S, Kojima T, Shimazaki J, Ichikawa K, Goto E, Dogru M, Tsubota K. The evaluation of efficacy of surgery for conjunctivochalasis using "Tear Stability Analysis System (TSAS)". The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual meeting, Florida, 2006.
- (5) Kojima T, Shimazaki J, Ichikawa K, Goto E, Dogru M, Tsubota K. The evaluation of efficacy of surgery for conjunctivochalasis using "Tear Stability Analysis System (TSAS)". The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual meeting, Florida, 2006.
- (6) Ogawa Y, Yamazaki K, Dogru M, Goto E, Shimmura S, Fujishima H, Kuwana M, Okamoto S, Kawakami Y, Tsubota K. Pathogenic fibrosis and inflammation of conjunctival chronic graft-versus-host disease. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual meeting, Florida, 2006.

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

特許取得

なし

実用新案登録

なし

3) その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

組み換えクラステリン蛋白の作製

分担研究者 斎藤一郎 鶴見大学歯学部教授

研究要旨

当該研究では涙腺・唾液腺から採取したside population cell (SP細胞) に特異的に発現する因子の一つとしてクラステリンを同定し、このクラステリンを恒常的に発現する線維芽細胞株を用いて、その機能を解析してきた。その結果、本樹立細胞においては酸化ストレスに対する細胞死が抑制されることが明らかとなった。これまでの報告でも細胞質に存在するクラステリンが細胞障害抑制機能を有するとう報告はあるが、細胞外に存在する分泌型クラステリンの機能については不明な点が多い。これらの背景にもとづき、当該年度は分泌型のクラステリンの機能を解析する目的で、バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて組み換え分泌型クラステリン蛋白の作製を行った。すなわち、His-tagをC末に付加したクラステリン全長cDNAを発現するバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞であるSf9細胞に感染させクラステリン蛋白を発現させた。培養上清を採取し、陽イオン交換カラムおよびNi-NTAカラムによりクラステリン蛋白を精製した。精製したクラステリン蛋白をWestern blotting 法により解析した結果、糖鎖付加によると考えられる分子量の増加と、ジスルフィド結合によるヘテロダイマー形成が確認され、分泌型のクラステリンの構造を有していることが明らかとなった。

A. 研究目的

当該研究では、涙腺・唾液腺SP細胞の分泌するクラステリンに腺組織障害を抑制する機能が認められるか否かについて検討してきた。すなわち、本因子を恒常的に発現する樹立細胞株を用いた機能解析を行ってきた。しかしながら、本実験系では、細胞質内に存在するクラステリンの機能を解析している可能性が否定できず、より直接的に分泌型のクラステリンの機能を解析する目的でクラステリンの組み換え蛋白を作製した。

B. 研究方法

前年度はクラステリン蛋白を恒常的に発現するマウス線維芽細胞株を用いてクラステリンが細胞障害を抑制する機能を有していることが明らかとなった。当該年度は、分泌蛋白としてのクラステリンの機能を解析する目的で、組み換えクラステリン蛋白を作製し、その機能を解析した。クラステリン蛋白の作製方法を以下に示す。

(1) 組み換えトランスファープラスミドの作製

①PCRによりHis-tagを付加したclusterin 全長cDNAをpBAC1ベクター (*In vitro*) のマルチクローニングサイトに挿入し(pBAC1-Clusterin-HT)、大腸菌DH5 α にトランスフォームした。トランスフォームした大腸菌を大量培養後、プラスミドDNAをMaxi-prepプラスミド精製キット (Quiagen) により抽出・精製した。

②精製したプラスミドの塩基配列を解析し、目的遺伝子と100%一致することを確認した。

(2) クラステリン発現組み換えバキュロウイルスの作製

①pBAC1-Clusterin-HTプラスミドを昆虫細胞であるSf9細胞にトランスフェクションしcytopathic effect (CPE) の出現によりウイルス産生を確認した。

②培養上清を回収し、さらにSf9細胞に感

染することにより、ウイルスの大量増幅を行った。

(3) 組み換えバキュロウイルスの純化

①6穴プレートの各ウエルに 1×10^6 個のSf9細胞を播種し、翌日、限界希釈したウイルスを感染した。感染1時間後、培地を吸引しlow-melting point agarose を重層した。

②6日後、出現したプラークを10クローン採取し、それぞれのクローンを別々にSf9細胞に感染させた。感染3日後、Western blotting 法により組み換えクラステリン蛋白の発現を検出した。すなわち、培養上清を回収し、細胞溶解液にて溶解後、96°C 3分間加熱した。さらに10% SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) にて電気泳動後、PVDF膜に転写し、goat anti-clusterin 抗体およびrabbit anti-His 抗体を用いて組み換えクラステリン蛋白の発現を比較検討した。

③最も発現の高いウイルスクローンを同定し、同定したウイルスクローンをSf9細胞に感染させウイルスの増幅を行った。

(4) クラステリン発現組み換えバキュロウイルスを用いたクラステリン蛋白の大量合成

①クラステリン発現組み換えバキュロウイルスをSf9細胞に3MOIで感染後1L系にて蛋白の大量作製を行った。

②Western blotting 法によりクラステリン蛋白の発現を検討した。

③陽イオン交換クロマトグラフィーにより分離後、Ni-NTA (QIAGEN) を用いてクラステリン蛋白を単離・精製した。

④クマシーブルー染色およびWestern blotting 法により精製後の蛋白の純度を検討した。

(倫理面への配慮)

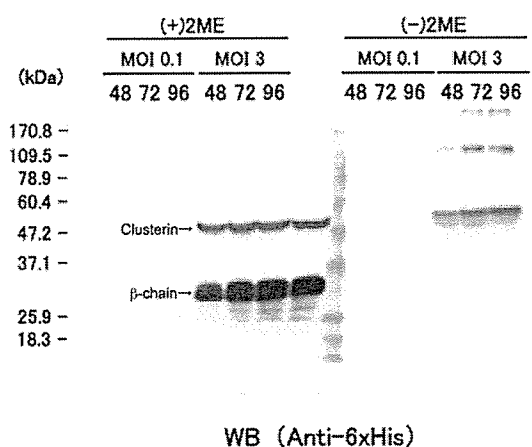
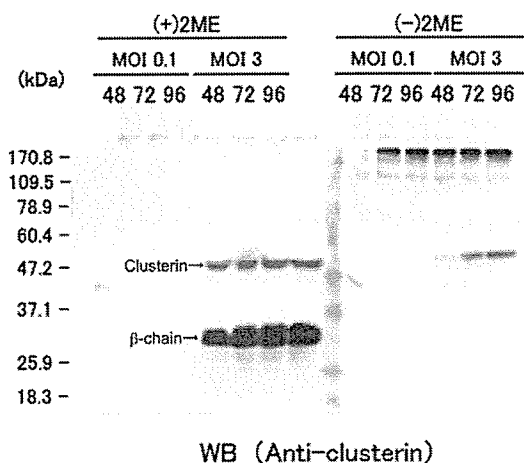
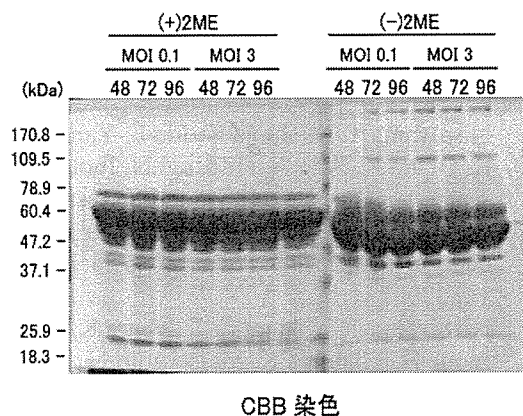
本実験は「バイオセーフティーに関する

るカルタヘナ議定書」に基づく文部科学省の法制化された規定に基づき実施された。

C. 研究結果

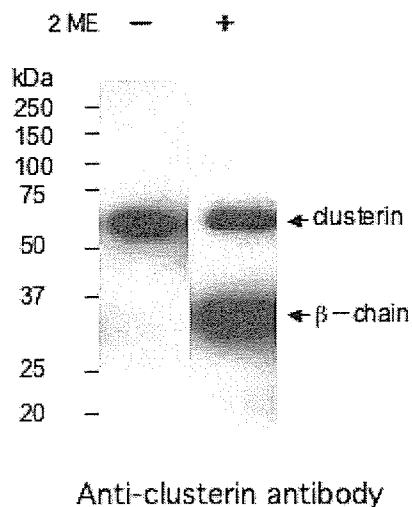
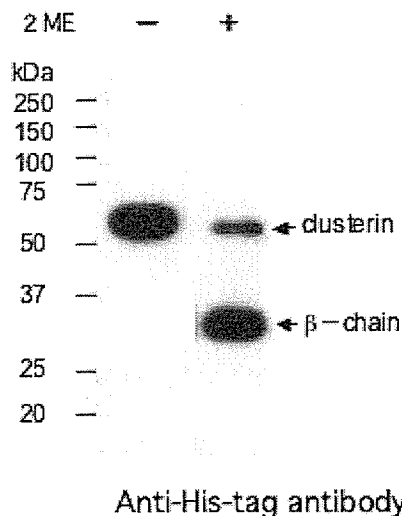
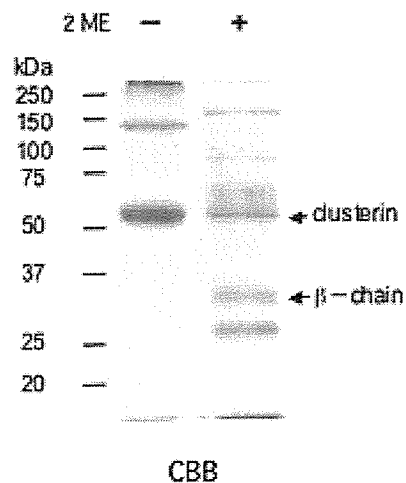
(1) プラーク法を用いて純化したクラステリン発現バキュロウイルス10クローンでは、全てSf9細胞感染後にクラステリン蛋白の産生が認められた。その中でも最も発現の良好なクローンを選択しSf9細胞に再度感染させ、ウイルスを増幅した。

(2) 増幅したウイルスをSf9細胞、浮遊培養 (1×10^9 cells, 1L培養) 状態にて0.1MOIあるいは3MOIの力価で感染させ、27°Cにて振盪培養し、48、72、および96時間後の培養上清中に含まれるクラステリン蛋白をWestern blotting法により検出した。その結果、タンパク量は経時的に増加傾向が認められ96時間後が最も多く産生されていた。また、96時間後におけるクラステリン蛋白の分解も認められなかった。加えて、2-mercaptoethanol (2 ME) の存在下 (還元状態) ではジスルフィド結合が解離しクラステリン蛋白β鎖の存在が検出された (下図)。



(3) Ni-NTA (QIAGEN) を用いてクラステリン蛋白を単離・精製した。

培養上清のSDS-PAGE電気泳動後のCBB染色像では組み換えクラステリン蛋白以外に多数のバンドが確認されたので、陽イオン交換クロマトグラフィーにて分離後Ni-NTA (QIAGEN) にて精製した。その結果、SDS-PAGE電気泳動CBB染色像では、分子量50kD付近にmain bandが確認され、Western blotting法によりbandがクラステリン蛋白であることが確認された (下図)。



従って、比較的純度の高いクラスτεリン蛋白が得られ、得られた蛋白は、*in vitro* および *in vivo* 実験に使用可能であると考えられた。今後、*in vivo* 実験に必要な蛋白量を得る目的で5L、SF9培養系を構築する予定である。

D. 考察

今回精製されたクラスτεリン蛋白は、Western blotting 法により予想されるアミノ酸配列よりも分子量が明らかに増加していることが確認され、糖鎖付加の可能性が示唆された。また、2 ME処理による還元状態において、その分子量の低下が認められたので、ジスルフィド構造を介したヘテロダイマー形成が確認された。

E. 結論

バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて作製された組み換えクラスτεリン蛋白は比較的純度高く、*in vivo* 実験にも使用が可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishiyama T, Mishima K, Ide F, Yamada K, Obara K, Sato A, Hitosugi N, Inoue H, Tsubota K, and Saito I. Functional analysis of established mouse vascular endothelial cell line. **J Vasc Res** 44:138-148, 2007
- (2) Nishiyama T, Nakamura T, Obara K, Inoue H, Mishima K, Matsumoto N, Matsui M, Manabe T, Mikoshiba K, and Saito I. Upregulated PAR-2-mediated salivary secretion in mice deficient in muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **J Pharmacol Exp Ther** 320: 516-24, 2007.
- (3) Ryo K, Yamada H, Nakagawa Y, Tai Y, Obara K, Inoue H, Mishima K, and Saito I. Possible involvement of oxidative stress in salivary gland of patients with Sjogren's syndrome. **Pathobiology** 73:

252-60, 2006

- (4) Obara K, Ide F, Mishima K, Inoue H, Yamada H, Hayashi Y, and Saito I. Biological and oncogenic properties of p53-deficient salivary gland epithelial cells with particular emphasis on stromal-epithelial interactions in tumorigenesis. **Pathobiology** 73: 261-70, 2006

2.学会発表

- (1) 美島健二、坪田一男、山田耕一、小原久実、山田浩之、渡辺雅尚、井上裕子、斎藤一郎 外分泌腺機能維持における酸化ストレスの役割-Side population 細胞における酸化ストレス抑制因子の同定- 第6回日本抗加齢医学会総会（東京）2006, 5月
- (2) Mishima K, Inoue H, and Saito I. Identification and therapeutic potential of lacrimal and salivary gland side population cells. IXth International Symposium on Sjögren's Syndrome April 27-29, 2006, Washington, D.C.
- (3) Mishima K, Saito I, Identification and therapeutic potential of salivary gland side population cells. 3rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SALIVARY GLANDS IN HONOR OF NIELS STENSEN Okazaki, October 20-24, 2006

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

特許取得

なし

実用新案登録

なし

3) その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishiyama T, Mishima K, Ide F, Yamada K, Obara K, Sato A, Hitosugi N, Inoue H, <u>Tsubota K</u> , and <u>Saito I</u>	Functional analysis of established mouse vascular endothelial cell line.	J Vasc Res	44	138-148	2007
Nishiyama T, Nakamura T, Obara K, Inoue H, Mishima K, Matsumoto N, Matsui M, Manabe T, Mikoshiba K, and <u>Saito I</u>	Upregulated PAR-2-mediated salivary secretion in mice deficient in muscarinic acetylcholine receptor subtypes.	J Pharmacol Exp Ther	320	516-24	2007
Ryo K, Yamada H, Nakagawa Y, Tai Y, Obara K, Inoue H, Mishima K, and <u>Saito I</u> .	Possible involvement of oxidative stress in salivary gland of patients with Sjogren's syndrome.	Pathobiology	73	252-60	2006
Obara K, Ide F, Mishima K, Inoue H, Yamada H, Hayashi Y, and <u>Saito I</u> .	Biological and oncogenic properties of p53-deficient salivary gland epithelial cells with particular emphasis on stromal-epithelial interactions in tumorigenesis.	Pathobiology	73	261-70	2006
Higa K, Shimmura S, Kato N, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, <u>Tsubota K</u> .	Proliferation and Differentiation of Transplantable Rabbit Epithelial Sheets Engineered with or without an Amniotic Membrane Carrier.	Invest Ophthalmol Vis Sci	48.	597-604,	2007
Nishimura R, Negishi K, Saiki M, Arai H, Shimizu S, Toda I, <u>Tsubota K</u> .	No Forward Shifting of Posterior Corneal Surface in Eyes Undergoing LASIK.	Ophthalmology	Epub ahead of print		2007
Ogawa Y, Razaque MS, Kameyama K, Hasegawa G, Shimmura S, Kawai M, Okamoto S, Ikeda Y, <u>Tsubota K</u> , Kawakami Y, Kuwana M	Role of Heat Shock Protein 47, a Collagen-Binding Chaperone, in Lacrimal Gland Pathology in Patients with cGVHD.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	48:	1079-86	2007
Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Koto T, Shinoda H, Noda K, Ozawa Y, Inoue M, <u>Tsubota K</u> , Itoh H, Oike Y, Ishida S.	Role of nonproteolytically activated prorenin in pathologic, but not physiologic, retinal neovascularization.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	48	422-9	2007
Altinors DD, Akca S, Akova YA, Bilezikci B, <u>Goto E</u> , Dogru M, <u>Tsubota K</u> .	Smoking associated with damage to the lipid layer of the ocular surface.	Am J Ophthalmol	141	1016-1021	2006.
Dogru M, Okada N, Asano-Kato N, Igarashi A, Fukagawa K, Shimazaki J, <u>Tsubota K</u> , Fujishima H.	Alterations of the ocular surface epithelial mucins 1, 2, 4 and the tear functions in patients with atopic keratoconjunctivitis.	Clin Exp Allerg	36	1556-1565	2006
Dogru M, Ishida K, Matsumoto Y, <u>Goto E</u> , Ishioka M, Kojima T, Goto T, Saiki M, <u>Tsubota K</u> .	Strip meniscometry: a new and simple method of tear meniscus evaluation.	Invest Ophthalmol Vis Sci	47	1895-1901	2006

Goto E, Dogru M, Fukagawa K, Uchino M, Matsumoto Y, Saiki M, Tsubota K.	Successful tear lipid layer treatment for refractory dry eye in office workersby low-dose lipid application on the full-length eyelid margin.	Am J Ophthalmol	142	264-270	2006
Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K.	Ocular surface epithelium epithelial cells upregulate HLA-G when expanded in vitro on amniotic membrane substrates.	Cornea	25	715-721 2006	2006
Higuchi A, Shimmura S, Takeuchi T, Suematsu M, Tsubota K.	Elucidation of apoptosis induced by serum deprivation in cultured conjunctival epithelial cells..	Br J Ophthalmol	90	760-764	2006
Hori-Komai Y, Toda I, Asano-Kato N, Ito M, Yamamoto T, Tsubota K.	Comparison of LASIK using the NIDEK EC-5000 optimized aspheric transition zone (OATz) and conventional ablation profile.	J Refract Surg	22	546-555	2006
Izumi K, Kurosaka D, Iwata T, Oguchi Y, Tanaka Y, Mashima Y, Tsubota K.	Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in corneal fibroblasts during corneal wound healing.	Invest Ophthalmol Vis Sci	47	591-598	2006
Kaido M, Dogru M, Goto E, Shimazaki J, Tsubota K.	Fourier analysis of single running suture adjustment in penetrating and deep lamellar keratoplasty.	J Refract Surg	22	617-620	2006
Kaido M, Dogru M, Yamada M, Sotozono C, Kinoshita S, Shimazaki J, Tsubota K.	Functional visual acuity in Stevens-Johnson syndrome.	Am J Ophthalmol	142	917-922	2006
Kato N, Fukagawa K, Dogru M, Fujishima H, Tsubota K.	Mechanisms of giant papillary formation in vernal keratoconjunctivitis.	Cornea	1	47-52	2006
Kawashima M, Kawakita T, Den S, Shimmura S, Tsubota K, Shimazaki J.	Comparison of deep lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty for lattice and macular corneal dystrophies.	Am J Ophthalmol	142	304-309	2006
Kojima T, Dogru M, Ishida R, Goto E, Matsumoto Y, Tsubota K.	Clinical evaluation of the Smart Plug in the treatment of dry eyes.	Am J Ophthalmol	141	386-388	2006
Maruyama-Hosoi F, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K.	Changes observed in keratolimbal allograft.	Cornea	25	377-382	2006
Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ishida R, Kojima T, Onguchi T, Yagi Y, Shimazaki J, Tsubota K.	Efficacy of a new warmmoist air device on tear functions of patients with simple meibomian gland dysfunction.	Cornea	25	644-650	2006
Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato N, Uchino Y, Kato M, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K.	Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium..	J Biomed Mater Res B Appl Biomater	76	56-63	2006
Noda-Tsuruya T, Asano-Kato N, Toda I, Tsubota K.	Autologous serum eye drops for dry eye after LASIK.	J Refract Surg	22	61-66	2006
Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K.	Laboratory findings in tear fluid analysis.	Clin Chim Acta	369	17-28	2006
Onguchi T, Dogru M, Okada N, Asano-Kato N, Tanaka M, Takano Y, Fukagawa K, Shimazaki J, Tsubota K, Fujishima H.	The impact of the onset time of atopic keratoconjunctivitis on the tear function and ocular surface findings.	Am J Ophthalmol	141	569-571	2006

Shimazaki J, Konomi K, Shimamura S, <u>Tsubota K.</u>	Ocular surface reconstruction for thermal burns caused by fireworks.	Cornea	25	139-145	2006
Shimamura S, Miyashita H, Higa K, Yoshida S, Shimazaki J, <u>Tsubota K.</u>	Proteomic analysis of soluble factors secreted by limbal fibroblasts.	Mol Vis	12	478-484	2006
Shimamura S, Miyashita H, Uchino Y, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, Tanaka J, <u>Tsubota K.</u>	Microkeratome assisted deep lamellar keratoprosthesis.	Br J Ophthalmol	90	826-829	2006
Suzuki S, Goto E, Dogru M, Asano-Kato N, Matsumoto Y, Hara Y, Fujishima H, <u>Tsubota K.</u>	Tear film lipid layer alterations in allergic conjunctivitis.	Cornea	25	277-280	2006
Tanaka M, Dogru M, Takano Y, Miyake-Kashima M, Asano-Kato N, Fukagawa K, <u>Tsubota K.</u> , Fujishima H.	Quantitative evaluation of the early changes in ocular surface inflammation following MMC-aided papillary resection in severe allergic patients with corneal complications.	Cornea	25	281-285	2006
Toda I, Kato-Asano N, Hori-Komai Y, <u>Tsubota K.</u>	Dry eye after LASIK enhancement by flap lifting.	J Refract Surg	22	358-362	2006
Tomita M, Shimamura S, <u>Tsubota K.</u> , Shimazaki J.	Dacryoadenitis associated with acanthamoeba keratitis.	Arch Ophthalmol	124	1239-42	2006
Tsuji K, Yamamoto T, Hori-Komai Y, Toda I, <u>Tsubota K.</u>	Traumatic epithelial flap detachment after laser subepithelial keratomileusis.	J Refract Surg	22	305-307	2006
Uchino M, Dogru M, Yagi Y, Goto E, Tomita M, Kon T, Saiki M, Matsumoto Y, Uchino Y, Yokoi N, Kinoshita S, <u>Tsubota K.</u>	The features of dry eye disease in a Japanese elderly population.	Optom Vis Sci	83	797-802	2006
Uchino M, Ogawa Y, Kawai M, Shimada H, Kameyama K, Okamoto S, Dogru M, <u>Tsubota K.</u>	Ocular complications in a child with acute graft-versus-host disease following cord blood stem cell transplantation: therapeutic challenges.	Acta Ophthalmol Scand	84	545-548	2006
Uchino Y, Goto E, Takano Y, Dogru M, Shinozaki N, Shimamura S, Yagi Y, <u>Tsubota K.</u> , Shimazaki J.	Long-standing bullous keratopathy is associated with peripheral conjunctivalization and limbal deficiency.	Ophthalmology	113	1098-101	2006
Uchino Y, Shimamura S, Miyashita H, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, Tanaka J, <u>Tsubota K.</u>	Amniotic membrane immobilized poly(vinyl alcohol) hybrid polymer as an artificial cornea scaffold that supports a stratified and differentiated corneal epithelium.	J Biomed Mater Res B Appl Biomater	Epub ahead of print		2006
Yoshida S, Shimamura S, Kawakita T, Miyashita H, Den S, Shimazaki J, <u>Tsubota K.</u>	Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces.	Invest Ophthalmol Vis Sci	47	4780-6	2006
Yoshida S, Shimamura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, <u>Tsubota K.</u>	Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea.	Stem Cells	24	2714-2722	2006

Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, Shimizu T, Mizushima Y, Shirasawa T, <u>Tsubota K.</u>	Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration.	Proc Natl Acad Sci U S A	103	11282-11287	2006
Inagaki Y, Mashima Y, Fuse N, Funayama T, Ohtake Y, Yasuda N, Murakami A, Hotta Y, Fukuchi T, <u>Tsubota K.</u>	Polymorphism of beta-adrenergic receptors and susceptibility to open-angle glaucoma.	Mol Vis	12	673-680	2006
Kawaguchi N, Inoue M, Sugisaka E, Shinoda K, <u>Tsubota K.</u>	Subjective visual sensation during vitrectomy under retrobulbar anesthesia.	Am J Ophthalmol	141	407-409	2006
Kurihara T, Ozawa Y, Shinoda K, Nagai N, Inoue M, Oike Y, <u>Tsubota K.</u> , Ishida S, Okano H.	Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) blocker, telmisartan via modulating AT1R and AT2R signaling in retinal inflammation.	Invest Ophthalmol Vis Sci	47	5545-5552	2006
Nagai N, Oike Y, Izumi-Nagai K, Urano T, Kubota Y, Noda K, Ozawa Y, Inoue M, <u>Tsubota K.</u> , Suda T, Ishida S.	Angiotensin II type 1 receptor-mediated inflammation is required for choroidal neovascularization.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	26	2252-2259	2006
Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Yamashiro K, Koto T, Shinoda H, Noda K, Ozawa Y, Inoue M, <u>Tsubota K.</u> , Suzuki F, Oike Y, Ishida S.	Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by inhibiting nonproteolytic activation of prorenin.	Invest Ophthalmol Vis Sci	47	2686-2892	2006