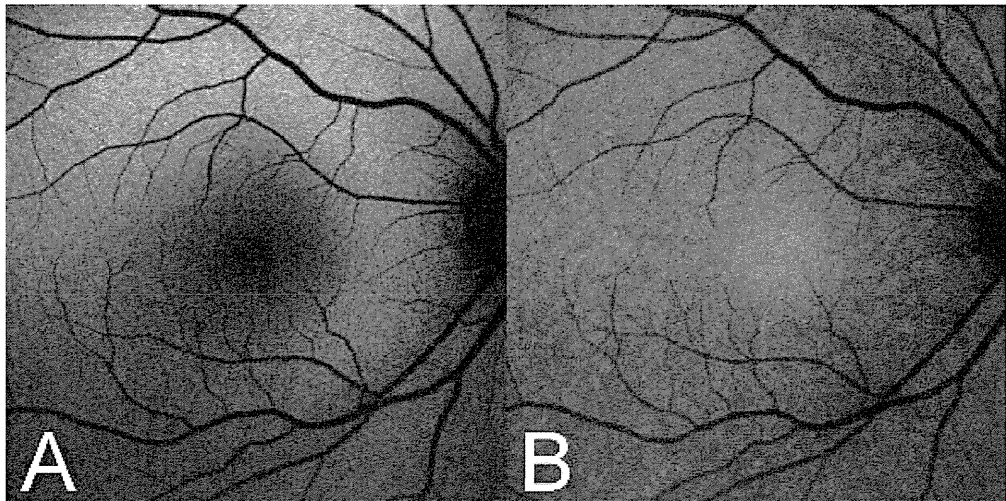
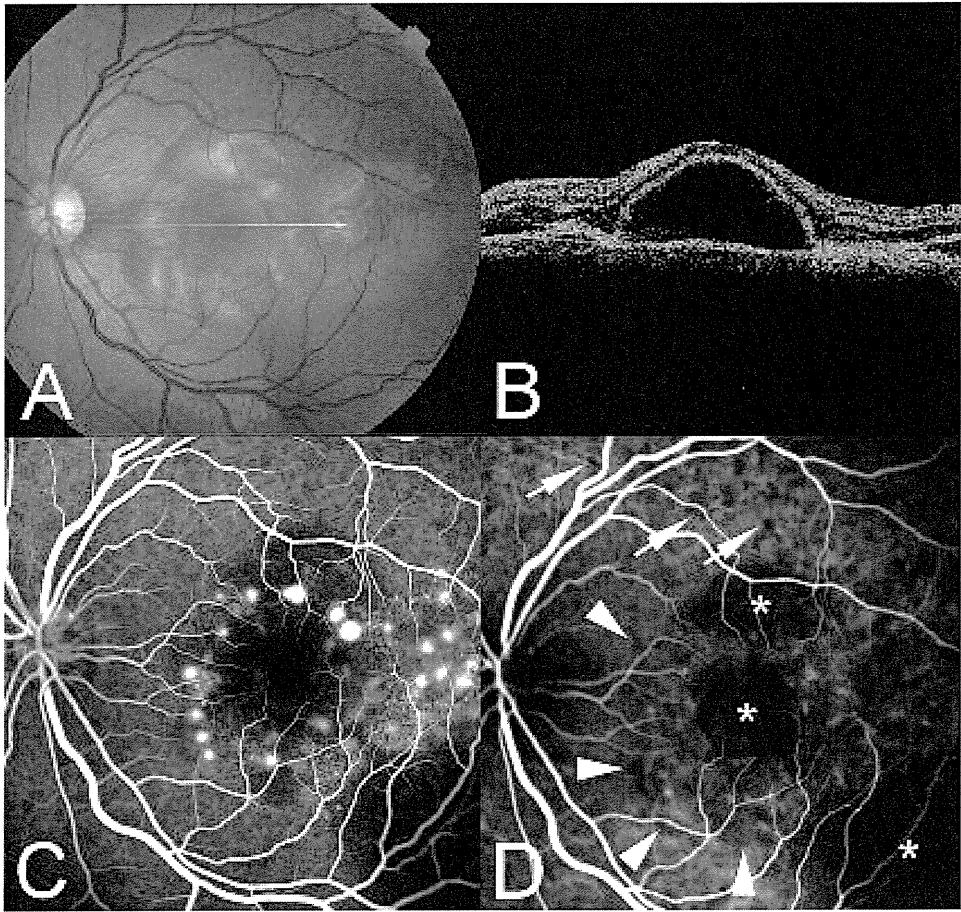
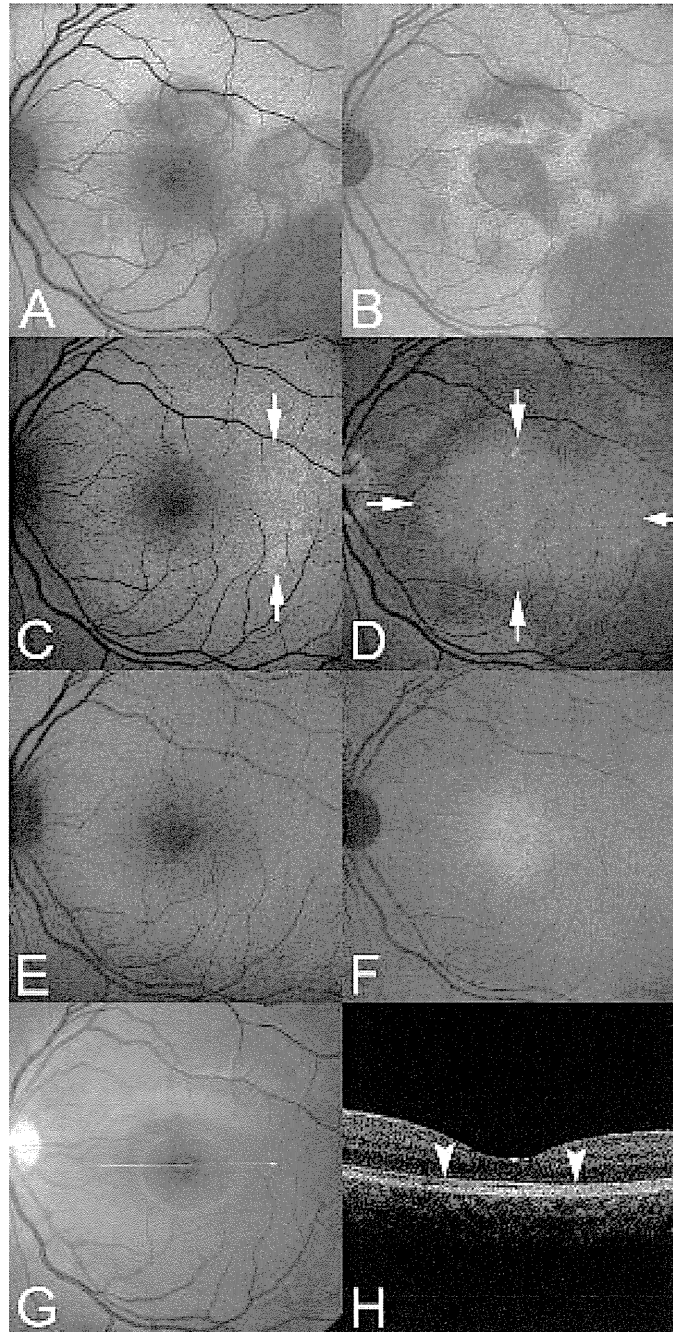
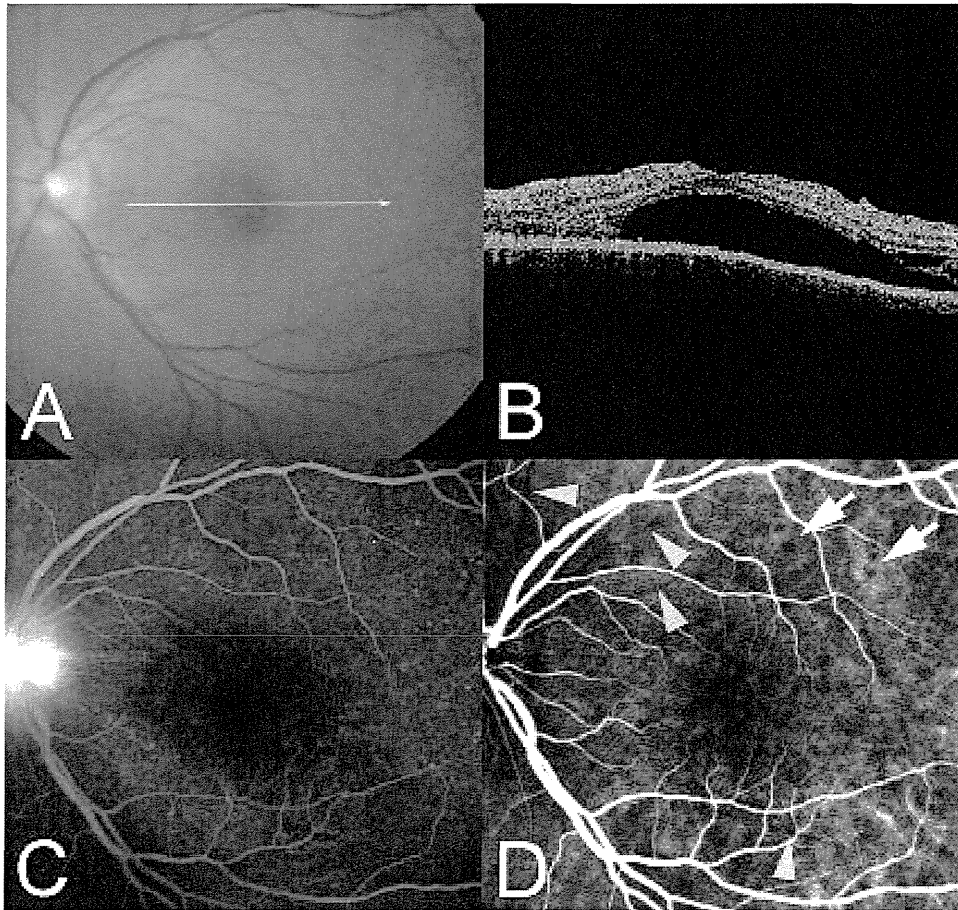


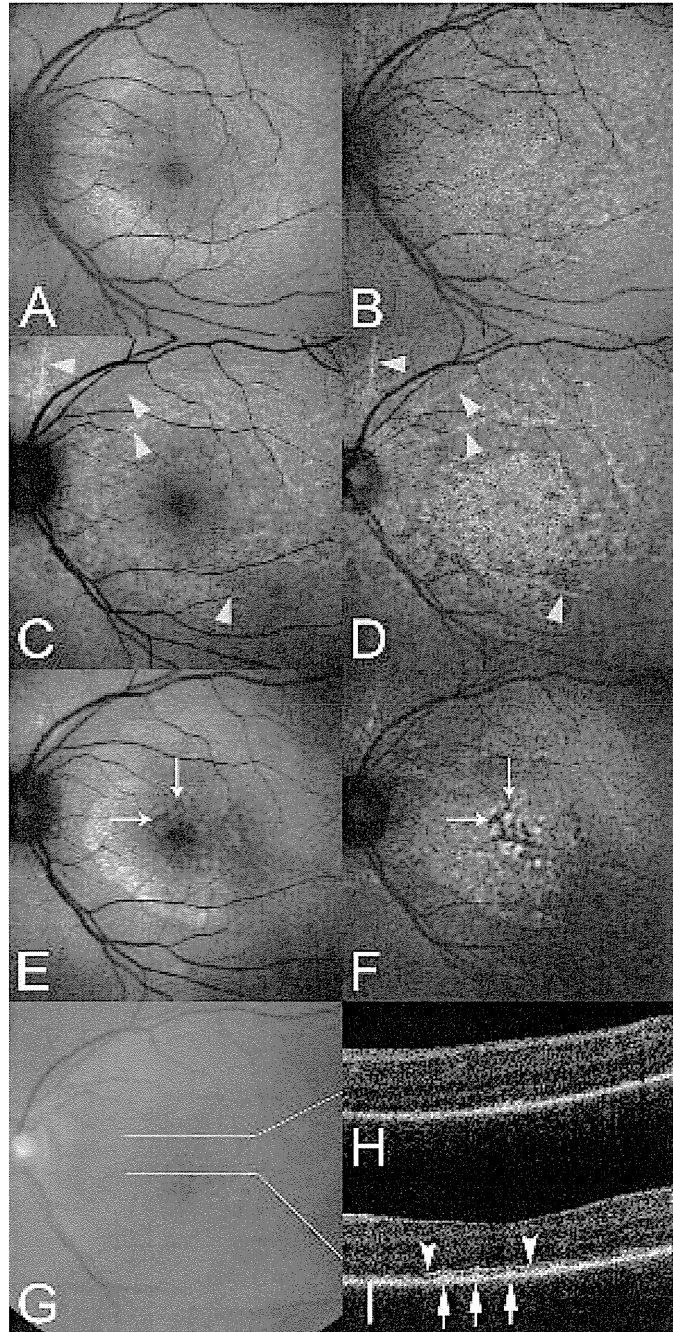
14. Keilhauer CN, Delori FC. Near-infrared autofluorescence imaging of the fundus: visualization of ocular melanin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3556-3564.
15. Parodi MB, Iacono P, Pedio M, et al. Autofluorescence in adult-onset foveomacular vitelliform dystrophy. *Retina* 2008;28:801-807.
16. Ayata A, Tatlipinar S, Kar T, Unal M, Ersanli D, Bilge AH. Near-infrared and short-wavelength autofluorescence imaging in central serous chorioretinopathy. *Br J Ophthalmol* 2009;93:79-82.
17. Bouchenaki N, Herbort CP. The contribution of indocyanine green angiography to the appraisal and management of Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Ophthalmology* 2001;108:54-64.
18. Kohno T, Miki T, Shiraki K, et al. Subtraction ICG angiography in Harada's disease. *Br J Ophthalmol* 1999;83:822-833.
19. Okada AA, Mizusawa T, Sakai J, Usui M. Videofunduscopy and videoangiography using the scanning laser ophthalmoscope in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1175-1181.
20. Oshima Y, Harino S, Hara Y, Tano Y. Indocyanine green angiographic findings in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Am J Ophthalmol* 1996;122:58-66.
21. Wu W, Wen F, Huang S, Luo G, Wu D. Choroidal folds in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Am J Ophthalmol* 2007;143:900-901.
22. Sheu SJ, Kou HK, Chen JF. Prognostic factors for Vogt-Koyanagi-Harada disease. *J Chin Med Assoc* 2003;66:148-154.
23. Chee SP, Jap A, Bacsal K. Prognostic factors of Vogt-Koyanagi-Harada disease in Singapore. *Am J Ophthalmol* 2009;147:154-161, e151.
24. Read RW, Rechodouni A, Butani N, et al. Complications and prognostic factors in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Am J Ophthalmol* 2001;131:599-606.
25. Al-Kharashi AS, Aldibhi H, Al-Fraykh H, Kangave D, Abu El-Asrar AM. Prognostic factors in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Int Ophthalmol* 2007;27:201-210.













## Contribution of IPS-1 to polyI:C-induced cytokine production in conjunctival epithelial cells

Mayumi Ueta<sup>a,b,\*</sup>, Taro Kawai<sup>c</sup>, Norihiko Yokoi<sup>a</sup>, Shizuo Akira<sup>c</sup>, Shigeru Kinoshita<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Research Center for Inflammation and Regenerative Medicine, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

<sup>c</sup> Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 November 2010

Available online 3 December 2010

#### Keywords:

RIG-I  
MDA5  
IPS-1  
Conjunctival epithelium  
TLR3  
PolyI:C

### ABSTRACT

We previously demonstrated that ocular surface epithelium expressed TLR3 and that its ligand, polyI:C, stimulation induced the secretion of inflammatory cytokines and type I IFN. It was recently reported that RIG-I and MDA5 also recognize viral dsRNA mimicking polyI:C. In this study, we investigated whether RIG-I and/or MDA5 contribute to polyI:C-inducible responses in conjunctival epithelium. The expression of RIG-I, MDA5, and TLR3 in human conjunctival epithelium was examined by RT-PCR and their up-regulation after polyI:C stimulation by quantitative RT-PCR and immunoblot analysis. Human conjunctival epithelial cells also expressed RIG-I, MDA5 and TLR3 mRNA and protein. The expression of RIG-I and MDA5, but not of TLR3, was markedly up-regulated upon polyI:C stimulation. We also examined the function of IPS-1 (an adaptor molecule common to RIG-I and/or MDA5) and TLR3 in conjunctival epithelium using IPS-1 KO and TLR3 KO mice. To analyze *in vivo* murine conjunctival epithelial cells, 10  $\mu$ l of a 100  $\mu$ g/ml polyI:C solution were delivered subconjunctivally and as eye drops, then conjunctival epithelial cells were subjected to gene expression analysis. We focused on 10 transcripts up-regulated in murine conjunctival epithelium upon polyI:C stimulation. *Cxcl10*, *Mx1*, *Ifi44*, *Ifi203*, *Iigp2* and *Rtp4* were dominantly regulated by IPS-1, *Ccl5* by TLR3, and *Rsad2*, *Mx2* and *Cmpk2* were regulated by TLR3 and IPS-1. Our results showed that conjunctival epithelial cells express RIG-I and MDA5, and IPS-1, an adaptor molecule common to RIG-I and MDA5, contributes to polyI:C-inducible cytokine production in conjunctival epithelial cells.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Innate immunity, the early host defense against microbes, is primarily studied in host immune-competent cells such as macrophages. The ability of cells to recognize pathogen-associated

molecular patterns (PAMPs) depends on the expression of a family of Toll-like receptors (TLRs), retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs), and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) [1]. Although TLRs detect PAMPs either on the cell surface or the lumen of intracellular vesicles such as endosomes or lysosomes, RLRs and NLRs are cytosolic detection systems for intracellular PAMPs. RLRs belong to the RNA helicase family that specifically detects RNA species derived from viruses in the cytoplasm; they coordinate anti-viral programs via the induction of type I interferon (IFN) [1].

Elsewhere we reported that human ocular surface epithelium expresses TLR3, which recognizes double-stranded (ds) RNA mimicking polyinosine–polycytidylic acid (polyI:C) (a synthetic dsRNA), and that polyI:C stimulation induces the secretion of inflammatory cytokines such as IL (interleukin)-6, IL-8, and type I IFN such as IFN- $\beta$  [2,3]. Moreover, our gene expression analysis of primary human conjunctival epithelial cells (PHCjECs) using oligonucleotide microarrays to examine the comprehensive effects of stimulation by polyI:C determined that transcripts including *XCL11*, *RIG-I*, *IL28A*, *CXCL10*, *CCL5*, *CCL4*, *MDA5*, *IL7R*, *TSLP*, *CCL20*, and *ICAM-1*, were up-regulated more than 10-fold by polyI:C stimulation.

**Abbreviations:** IFN, interferon; IPS-1, IFN- $\beta$  promoter stimulator-1; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; TLRs, Toll-like receptors; RIG-I, retinoic acid-inducible gene-I; RLRs, retinoic acid-inducible gene-I-like receptors; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain; NLRs, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors; polyI:C, polyinosinic:polycytidylic acid; PHCjECs, primary human conjunctival epithelial cells; CXCL, chemokine (C-X-C motif) ligand; CCL, chemokine (C-C motif) ligand; MDA5, melanoma-differentiation-associated gene 5; TSLP, thymic stromal lymphopoietin; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; Rsad2, radical S-adenosyl methionine domain containing 2; Cmpk2, cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial; Mx, myxovirus (influenza virus) resistance; Ifi44, interferon-induced protein 44; Ifi203, interferon-activated gene 203; Iigp2, interferon-inducible GTPase 2; Rtp4, receptor transporter protein.

\* Corresponding author at: Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajicho, Hirokoji, Kawaramachi, Kamigyoku, Kyoto 602-0841, Japan. Fax: +81 75 251 5663.

E-mail address: [muetakoto.kpu-m.ac.jp](mailto:muetakoto.kpu-m.ac.jp) (M. Ueta).



This finding suggests that polyI:C stimulation could not only induce anti-viral innate immune responses, but that it could also regulate allergic reactions in PHCjECs [4,5].

The cytoplasmic helicase proteins, RIG-I (retinoic-acid-inducible protein I; also known as Ddx58) and MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5; also known as Ifih1) have been reported to be implicated in the recognition of viral dsRNA. Our results show that new receptors that recognize dsRNA and polyI:C, RIG-I, and MDA5, are also expressed in PHCjECs [4,5].

Because, not only TLR3, but also RIG-I and MDA5 detect viral dsRNA, we examined the expression of RIG-I and MDA5 in human conjunctival epithelium, and investigated the function of IPS-1, an adaptor molecule common to RIG-I and/or MDA5, using IPS-1 KO mice to examine whether RIG-I and/or MDA5 contribute to polyI:C-inducible responses in conjunctival epithelium.

**2. Materials and methods**

**2.1. Human conjunctival epithelial cells and PHCjECs**

Our study was approved by the institutional review board of Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan; all experiments were conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients after they were given a detailed explanation of the purpose of the research and the experimental protocols.

For RT-PCR we obtained conjunctival epithelial cells from healthy volunteers by brush cytology using previously described methods [6]. For immunoblot analysis and quantitative RT-PCR, PHCjECs harvested from conjunctival tissue obtained at conjunctivochalasis surgery were cultured as described elsewhere [7]. Briefly, conjunctival tissues were washed and immersed for 1 h at 37 °C in 1.2 U ml<sup>-1</sup> purified dispase (Roche Diagnostic Ltd., Basel, Switzerland), and epithelial cells were detached, collected, and cultured in low-calcium defined keratinocyte-SFM medium containing defined growth-promoting additives (Invitrogen, Carlsbad, CA) including insulin, epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and 1% antibiotic-antimycotic solution. Using this method, cell colonies usually became visible within 3–4 days. After they reached 80% confluence in 7–10 days, the cultured PHCjECs were used in subsequent procedures.

**2.2. RT-PCR assay**

Total RNA was isolated from human conjunctival epithelial cells with TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer’s instructions. For RT-PCR we employed the SuperScript™ preamplification system (Invitrogen). Amplification was with DNA polymerase (Takara, Shiga, Japan) for 35 cycles at 94 °C for 1 min, 64 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min for human RIG-I, MDA5, and TLR3 (GeneAmp®; PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers were: (forward) 5'-CCTATGCAGCTCCGCTCGC-3' and (reverse) 5'-GCCACGGAACCAGCCTTCCT-3' for human RIG-I; (forward) 5'-GCAAGAGCATCCCCGAGCC-3' and (reverse) 5'-TCGTGGCCCC TCCAACACCA-3' for human MDA5; (forward) 5'-CGCCAACTTCA-CAAGTA-3' and (reverse) 5'-GGAAGCAAGCAAAGGAA-3' for human TLR3; and (forward) 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' and (reverse) 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3 for human GAPDH. The integrity of RNA was electrophoretically confirmed on ethidium bromide-stained 1.5% agarose gels.

**2.3. Immunoblot analysis of the protein expression of RIG-I, MDA5, and TLR3**

Protein expression in PHCjECs was examined by immunoblot analysis using a previously described method [8]. The cells were

incubated for various periods with 25 µg/ml polyI:C, washed twice, and then lysed by immersion in 0.2 ml ice-cold CellLytic M Cell Lysis reagent (Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, MO). SDS–PAGE was on a NuPAGE electrophoresis system (Invitrogen) according to the manufacturer’s instructions. Separated proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane using the iBlot Gel Transfer device (Invitrogen) according to the manufacturer’s instructions. The membrane was incubated in 5% skim milk with 0.1% Tween 20/TBS buffer for 1 h at room temperature for blocking. Immunoblot analysis was with rabbit anti-RIG-I or rabbit anti-MDA5 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) or rabbit anti-TLR3 antibodies (Abcam, Cambridge, MA) for first antibodies and with HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibodies (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) for secondary antibodies. Protein detection was with the ECL Plus Western blotting Detection System (GE Healthcare).

**2.4. Mice and reagents**

C57BL/6 and Balb/c mice were purchased from CLEA (Tokyo, Japan); C57BL/6 background *IPS-1*<sup>-/-</sup> mice [9] and Balb/c background *TLR3*<sup>-/-</sup> mice [10] were a gift from Professor Akira. Wild-type C57BL/6 and Balb/c mice were the respective controls. All mice were used at 8–12 weeks of age; they were maintained on a 12-h light/dark cycle under specific pathogen-free conditions. All experimental procedures were approved by the Committee on Animal Research of Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan and all studies were in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

PolyI:C was purchased from Invivogen (San Diego, CA). For the *in vivo* analysis of murine conjunctival epithelial cells we prepared a 100 µg/ml polyI:C solution in 50% VISCOAT® (Alcon Laboratories Ltd., Fort Worth, TX)/PBS to assure the *in vivo* stimulation by polyI:C of murine conjunctival epithelium. VISCOAT® is an ophthalmic viscosurgical product used in cataract surgery; it is a sterile, non-pyrogenic, viscoelastic solution of highly purified, non-inflammatory medium molecular-weight sodium chondroitin sulfate and sodium hyaluronate. PolyI:C solution (10 µl) was injected subconjunctivally and dropped into the eyes, respectively.

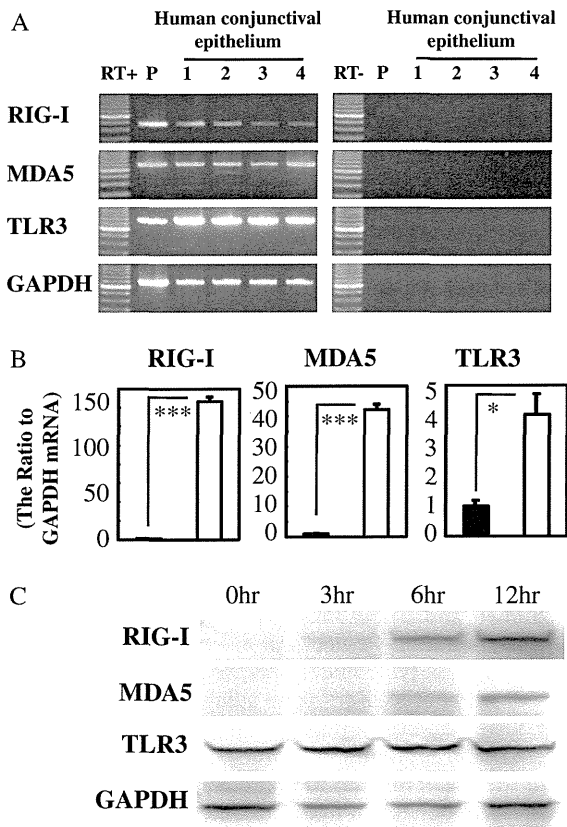
**2.5. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay**

Total RNA was isolated from murine conjunctival epithelium and PHCjECs using the RNeasy Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA)

**Table 1**  
The primers for quantitative RT-PCR assay of murine samples.

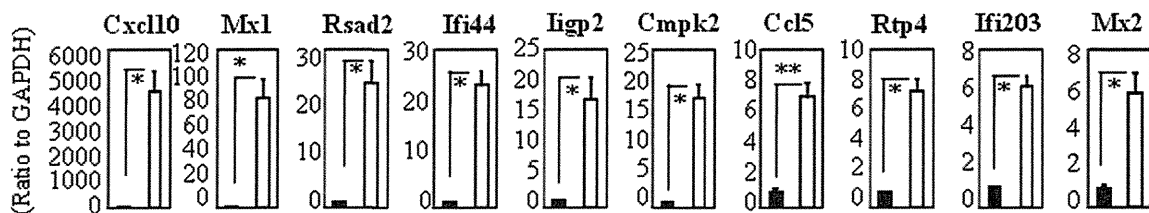
Gene	Primer for quantitative RT-PCR: forward and reverse
<i>Cxcl10</i>	5'-TGAATCCGGAATCTAAGACCATCAA-3' 5'-AGGACTAGCCATCCACTGGGTAAG-3'
<i>Mx1</i>	5'-CTGAGATGACCAGCACCTGAA-3' 5'-CTCCAGAAACCAGCTGCACCTAC-3'
<i>Rsad2</i>	5'-TGGGGATGCTGGTGCCCACT-3' 5'-ACCCCGGACCTGTGGCTGTT-3'
<i>Ifi44</i>	5'-TCGGTGCCAGCCTCGGTACA-3' 5'-TGCAGGCACTTTTCTTGCTGCCA-3'
<i>Iigp2</i>	5'-TTCCCAACAGGACCTGCC-3' 5'-AGCAACGGGGCAACCTGCTC-3'
<i>Cmpk2</i>	5'-CCTTGCACCAACCCGGACAC-3' 5'-ATGCGCAGTCCACCTGCACC-3'
<i>Ccl5</i>	5'-CACCACTCCCTGCTGCTT-3' 5'-ACACTTGGCGGTTCTTC-3'
<i>Rtp4</i>	5'-GGGATGGAGGAGCACCAGC-3' 5'-CGTGCTGGCCCTGCATT-3'
<i>Ifi203</i>	5'-TGTGAGAGAATTAAGGCACCAAGGAGA-3' 5'-ACTTTCAACACCATCACTTGTGGGA-3'
<i>Mx2</i>	5'-GTGCGGCCCTGCATTGACCT-3' 5'-GGCCACTCCAGACAGTCTTAGT-3'





**Fig. 1.** Up-regulation of RIG-I, MDA5, and TLR3 expression in human conjunctival epithelial cells stimulated with polyI:C. (A) We examined the expression of RIG-I, MDA5, and TLR3 in human conjunctival epithelial cells by RT-PCR assay. The positive control was mRNA isolated from human mononuclear cells. The expected length of PCR products for RIG-I (360 bp), MDA5 (601 bp), and TLR3 (689 bp) was obtained from the positive control and the human conjunctival epithelial cells. (B) We used quantitative RT-PCR assay to examine changes in the mRNA expression of the *RIG-I*, *MDA5*, and *TLR3* genes after the stimulation of PHCJECs with polyI:C. The quantification data were normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH. The Y axis shows the increase in specific mRNA over unstimulated samples. Data are representative of 3 separate experiments and show the mean  $\pm$  SEM from one experiment carried out in 3 wells per group. (C) Up-regulation by polyI:C stimulation of the protein expression of RIG-I and MDA5 in PHCJECs. Data are representative of 3 independent experiments.

according to the manufacturer’s instructions. For the RT reaction we used the SuperScript™ Pre-amplification kit (Invitrogen). Quantitative RT-PCR was on an ABI-prism 7700 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer’s instructions. The primers for the murine samples are shown in Table 1. The primers and probes for human RIG-I, MDA5, and TLR3 were purchased from Applied Biosystems. The results were analyzed with sequence detection software (Applied Biosystems). Quantification data were normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH.



**Fig. 2.** Transcripts up-regulated in murine polyI:C-stimulated conjunctival epithelium. In murine conjunctival epithelium, the expression of mRNA in 10 transcripts up-regulated by 6-h stimulation with polyI:C was 5-fold higher than in unstimulated samples. The quantification data were normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH. The Y axis shows the increase in specific mRNA over unstimulated samples. Data are representative of 3 separate experiments and show the mean  $\pm$  SEM from one experiment carried out in 3 mice per group (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.005).

**3. Results**

**3.1. RT-PCR assay of the expression of RIG-I, MDA5, and TLR3 in human conjunctival epithelial cells**

The expected length of the PCR products for RIG-I (360 bp), MDA5 (601 bp), and TLR3 (689 bp) was obtained from the positive controls (mRNA isolated from human mononuclear cells) and from conjunctival epithelial cells, suggesting that human conjunctival epithelial cells express RIG-I, MDA5, and TLR3 mRNA (Fig. 1A). To confirm the specificity for the detection of RIG-I, MDA5, and TLR3 mRNA we isolated and sequenced the PCR products. The obtained sequences were identical to the human RIG-I, MDA5, and TLR3 mRNA sequence.

**3.2. Up-regulation of the expression of RIG-I, MDA5 and TLR3 in polyI:C-stimulated human conjunctival epithelial cells**

The expression of mRNA in *RIG-I*, *MDA5*, and *TLR3* genes was up-regulated by polyI:C stimulation (Fig. 1B). Up-regulation was particularly pronounced in *RIG-I* and *MDA5*. Immunoblot analysis of polyI:C-stimulated PHCJECs to examine changes in the protein expression of RIG-I, MDA5, and TLR3 showed marked up-regulation in RIG-I and MDA5 but not TLR3 (Fig. 1C).

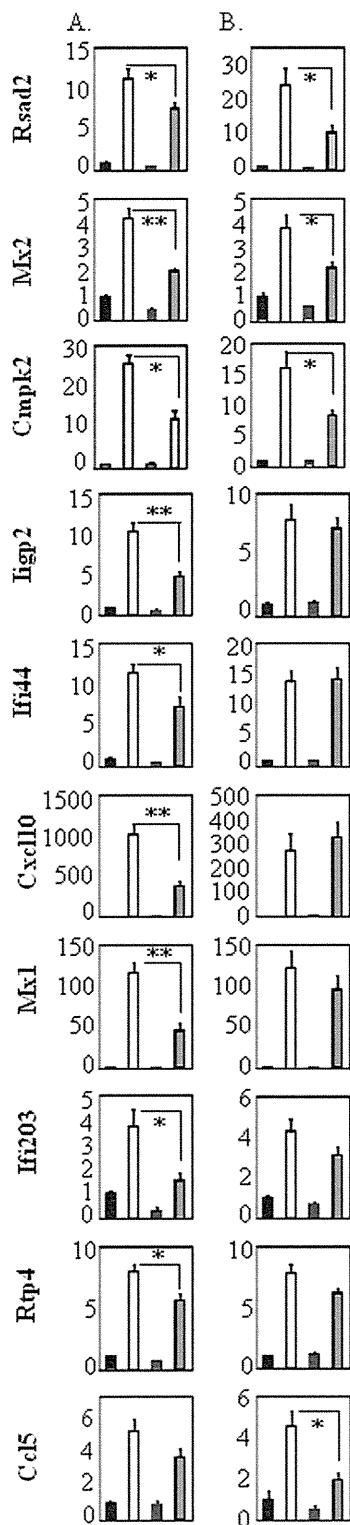
**3.3. Up-regulated transcripts in polyI:C-stimulated murine conjunctival epithelium**

For gene expression analysis of polyI:C-stimulated murine conjunctival epithelium, polyI:C was delivered by eye drops and subconjunctival injection.

We selected the top 15 genes of the ratio of polyI:C-administered sample signal: vehicle-administered sample signal (data not shown) and focused on the 10 genes whose expression was confirmed to be up-regulated more than 5-fold in polyI:C-stimulated samples compared to unstimulated samples using quantitative RT-PCR (Fig. 2). They were *Rsad2* (radical S-adenosyl methionine domain containing 2), *Cxcl10* (chemokine (C–X–C motif) ligand 10), *Cmpk2* (cytidine monophosphate (UMP–CMP) kinase 2, mitochondrial), *Mx1* (myxovirus (influenza virus) resistance 1), *Ifi44* (interferon-induced protein 44), *Mx2* (myxovirus (influenza virus) resistance 2), *Ifi203* (interferon-activated gene 203), *Iigp2* (interferon-inducible GTPase 2), *Rtp4* (receptor transporter protein 4), and *Ccl5* (chemokine (C–C motif) ligand 5).

**3.4. Change in the expression of transcripts in murine polyI:C-stimulated conjunctival epithelium**

Quantitative RT-PCR to compare the gene expression of the above 10 transcripts upon polyI:C stimulation showed that all but *Ccl5* were significantly down-regulated in the conjunctival epithelium of IPS-1 KO compared with wild-type mice (Fig. 3A).



**Fig. 3.** Comparison of changes in the expression of transcripts induced by the stimulation of conjunctival epithelium with polyI:C in wild-type (C57BL/6)- and IPS-1 KO mice and in wild-type (Balb/c)- and TLR3 KO mice. Expression of mRNA in 10 transcripts up-regulated by 6-h stimulation of conjunctival epithelium with polyI:C in wild-type (C57BL/6)- and IPS-1 KO mice (A), and in wild-type (Balb/c)- and TLR3 KO mice (B). The quantification data were normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH. The Y axis shows the increase in specific mRNA over unstimulated samples. Data are representative of 3 separate experiments and show the mean  $\pm$  SEM from one experiment carried out in 6 mice per group (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.005).

PolyI:C could be recognized not only by RIG-I and MDA5, whose common adaptor molecule is IPS-1, but also by TLR3 whose adaptor molecule is TRIF. To compare the gene expression of the above 10 polyI:C-induced transcripts in wild-(Balb/c) and TLR3 KO mice, we performed quantitative RT-PCR. We found that *Rsad2*, *Mx2*, *Cmpk2*, and *Ccl5*, but not *Cxcl10*, *Mx1*, *Ifi44*, *Ifi203*, *Iigp2*, and *Rtp4* were significantly down-regulated in the conjunctival epithelium of TLR3 KO compared to wild-type mice (Fig. 3B).

Our results suggest that *Cxcl10*, *Mx1*, *Ifi44*, *Ifi203*, *Iigp2*, and *Rtp4* were dominantly regulated by RIG-I or/and MDA5, that *Ccl5* were dominantly regulated by TLR3, and that *Rsad2*, *Mx2*, and *Cmpk2* were regulated by both TLR3 and RIG-I or/and MDA5.

#### 4. Discussion

Our results demonstrate that conjunctival epithelial cells express TLR3, RIG-I and MDA5, and that not only TLR3 but also RIG-I and/or MDA5 contribute to polyI:C-inducible immune responses because *Rsad2*, *Mx2*, *Cmpk2*, *Cxcl10*, *Mx1*, *Ifi44*, *Ifi203*, *Iigp2*, and *Rtp4* were significantly down-regulated in conjunctival epithelial cells of IPS-1 knock-out compared to control mice. Moreover, *Rsad2*, *Mx2*, *Cmpk2*, and *Ccl5*, but not *Cxcl10*, *Mx1*, *Ifi44*, *Ifi203*, *Iigp2*, and *Rtp4* were also significantly down-regulated in the conjunctival epithelium of TLR3 KO compared to wild-type mice.

We posit that *Cxcl10*, *Mx1*, *Ifi44*, *Ifi203*, *Iigp2*, and *Rtp4* are dominantly regulated by IPS-1 (RIG-I or/and MDA5), *Ccl5* by TLR3, and that *Rsad2*, *Mx2*, and *Cmpk2* are regulated by both TLR3 and IPS-1 (RIG-I or/and MDA5). Our studies indicate that IPS-1 signaling plays an important role in eliciting innate immune responses in conjunctival epithelial cells.

Although the TLR family detects PAMPs either on the cell surface or in the lumen of intracellular vesicles such as endosomes or lysosomes, recent studies have shown the existence of a cytosolic detection system for intracellular PAMPs [1]. These cytosolic PRRs include RLRs and NLRs. RLRs, which include RIG-I and MDA5, belong to the RNA helicase family that specifically detects RNA species derived from viruses in the cytoplasm; they coordinate anti-viral programs via the induction of type I IFN [1].

According to Lai et al. [11] following injury, TLR3 is required for part of the normal inflammatory response in the skin epithelium; TLR3-deficient mice produced significantly less IL-6 and TNF- $\alpha$  at the wound edge than wild-type controls. Torres et al. [12] reported that TLR3/TRIF-dependent pathway activation was required for the development of the dsRNA-induced exacerbation of allergic reactions; they were reduced in TRIF (-/-) mice. They also found that *in vivo* and *in vitro* treatment with dsRNA amplified airway epithelial cytokine production. Our findings document that *Ccl5* were dominantly regulated by TLR3, and that *Rsad2*, *Mx2*, and *Cmpk2* were regulated by TLR3 and IPS-1 (RIG-I or/and MDA5); *Rsad2*, *Mx2*, *Cmpk2*, and *Ccl5* were significantly down-regulated in conjunctival epithelium of TLR3 KO compared with wild-type mice. These observations document that TLR3 contributes to the production of cytokine and to inflammation.

In intestinal epithelial cells, the production and expression of polyI:C-inducible type I IFN were dependent on the activation of RIG-I and IPS-1 [13]. We found that *Cxcl10*, *Mx1*, *Ifi44*, *Ifi203*, *Iigp2*, and *Rtp4* were dominantly regulated by IPS-1 (RIG-I or/and MDA5), and that *Rsad2*, *Mx2*, and *Cmpk2* were regulated by both TLR3 and IPS-1 (RIG-I or/and MDA5); *Rsad2*, *Cxcl10*, *Mx1*, *Ifi44*, *Mx2*, *Cmpk2*, *Ifi203*, *Iigp2*, and *Rtp4* were significantly down-regulated in conjunctival epithelium of IPS-1 KO compared to wild-type mice.

Moreover, polyI:C incorporated by dendritic cells is accessible to both TLR3 and MDA5; they activate respective signaling pathways for the robust induction of cytokines [14]. Similarly, in conjunctival

epithelial cells, polyI:C-inducible cytokine production requires signaling through both TLR3 and IPS-1 (RIG-I or/and MDA5).

*Rsad2* is an interferon-inducible protein that inhibits many DNA and RNA viruses [15]. *Mx2* is also an interferon-regulated gene that selectively inhibits hanta virus replication [16]. *Cmpk2*, a pyrimidine nucleoside monophosphate kinase, is thought to be involved in macrophage activation and inflammatory responses [17].

In our study, *Rsad2*, and *Mx2*, which exert anti-viral actions, and *Cmpk2* involving in inflammatory responses, were regulated by TLR3 and IPS-1 (RIG-I or/and MDA5).

*Ilgp2* plays a cell-autonomous role in IFN- $\gamma$ -mediated chlamydia inhibition [18] and *Ifi44* is associated with hepatitis C virus infection although its function is unknown [19]. *Cxcl10* is expressed primarily in response to a wide range of DNA and RNA viruses; it plays a role in the recruitment of leukocytes during inflammation [20]. Its expression is also increased in allergic diseases; it was elevated in the epidermis of patients with atopic dermatitis [21] and in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe asthma [22]. *Mx1* is an interferon-regulated gene that selectively interferes with the multiplication of influenza viruses [23]. *Ifi203*, a member of the *Ifi-200* gene family, is induced by type I and type II interferons; it has been reported as a regulator of cell proliferation and differentiation, and plays a role in apoptotic and inflammatory processes [24]. *Rtp4* is a member of the receptor transport protein (RTP) family; it participates in the export of odorant and taste receptors [25]. We document that these 6 transcripts (*Cxcl10*, *Mx1*, *Ifi44*, *Ifi203*, *Ilgp2*, and *Rtp4*) are dominantly regulated by IPS-1 (RIG-I or/and MDA5).

Like *Cxcl10*, *Ccl5* is up-regulated in the presence of viral infection [26]; it is also up-regulated in the skin lesions of chronic atopic dermatitis [27]. Our study shows that *Ccl5*, which play a role in inflammation and allergy, were dominantly regulated by TLR3. Elsewhere we reported that TLR3 regulated the late-phase reaction of experimental allergic conjunctivitis in a mouse model; eosinophilic conjunctival inflammation was reduced in TLR3 KO mice and exacerbated in TLR3 transgenic mice [10]. These findings suggest that TLR3 can induce anti-viral innate immune responses and that it exerts other functions such as the regulation of allergic reactions. Others [28] reported that in the absence of viral infection TLR3 amplified immune responses during acute inflammatory processes, a phenomenon that may involve TLR3 stimulation by endogenous RNA from necrotic cells. Innate immunity can respond to endogenous molecules released by host cells as a result of necrosis, pathogen infection, damage, injury, and certain pathological conditions that are directly or indirectly recognized by TLRs, NLRs, RLRs, and by yet to be identified sensors [1]. It is possible that endogenous RNA from tissues or cells may stimulate not only TLR3 but also RIG-I or/and MDA5.

In summary, our results showed that conjunctival epithelial cells express RIG-I and MDA5, and IPS-1, an adaptor molecule common to RIG-I and MDA5, contributes to polyI:C-inducible cytokine production in conjunctival epithelial cells.

## Acknowledgments

This work was supported in part by grants-in-aid for scientific research from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, the Kyoto Foundation for the Promotion of Medical Science, the National Institute of Biomedical Innovation of Japan, and the Intramural Research Fund of Kyoto Prefectural University of Medicine, and the Shimizu Foundation for Immunological Research Grant.

## References

- [1] T. Kawai, S. Akira, The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition, *Int. Immunol.* 21 (2009) 317–337.

- [2] M. Ueta, J. Hamuro, H. Kiyono, S. Kinoshita, Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (2005) 285–294.
- [3] M. Ueta, S. Kinoshita, Innate immunity of the ocular surface, *Brain Res. Bull.* 81 (2010) 219–228.
- [4] M. Ueta, S. Kinoshita, Ocular surface inflammation mediated by innate immunity, *Eye Contact Lens* 36 (2010) 269–281.
- [5] M. Ueta, K. Mizushima, N. Yokoi, Y. Naito, S. Kinoshita, Gene-expression analysis of polyI:C-stimulated primary human conjunctival epithelial cells, *Br. J. Ophthalmol.* (2010).
- [6] K. Kojima, M. Ueta, J. Hamuro, Y. Hozono, S. Kawasaki, N. Yokoi, et al., Human conjunctival epithelial cells express functional Toll-like receptor 5, *Br. J. Ophthalmol.* 92 (2008) 411–416.
- [7] M. Ueta, K. Mizushima, N. Yokoi, Y. Naito, S. Kinoshita, Expression of the interleukin-4 receptor alpha in human conjunctival epithelial cells, *Br. J. Ophthalmol.* 94 (2010) 1239–1243.
- [8] M. Ueta, K. Mizushima, N. Yokoi, Y. Naito, S. Kinoshita, Gene-expression analysis of polyI:C-stimulated primary human conjunctival epithelial cells, *Br. J. Ophthalmol.* (2010).
- [9] T. Kawai, K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, et al., IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and MDA5-mediated type I interferon induction, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 981–988.
- [10] M. Ueta, S. Uematsu, S. Akira, S. Kinoshita, Toll-like receptor 3 enhances late-phase reaction of experimental allergic conjunctivitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (2009) 1187–1189.
- [11] Y. Lai, A. Di Nardo, T. Nakatsui, A. Leichtle, Y. Yang, A.L. Cogen, et al., Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury, *Nat. Med.* 15 (2009) 1377–1382.
- [12] D. Torres, A. Dieudonne, B. Ryffel, E. Vilain, M. Si-Tahar, M. Pichavant, et al., Double-stranded RNA exacerbates pulmonary allergic reaction through TLR3: implication of airway epithelium and dendritic cells, *J. Immunol.* 185 (2010) 451–459.
- [13] Y. Hirata, A.H. Broquet, L. Menchen, M.F. Kagnoff, Activation of innate immune defense mechanisms by signaling through RIG-I/IPS-1 in intestinal epithelial cells, *J. Immunol.* 179 (2007) 5425–5432.
- [14] H. Kumar, S. Koyama, K.J. Ishii, T. Kawai, S. Akira, Cutting edge: cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses, *J. Immunol.* 180 (2008) 683–687.
- [15] G. Shaveta, J. Shi, V.T. Chow, J. Song, Structural characterization reveals that viperin is a radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391 (2010) 1390–1395.
- [16] H.K. Jin, K. Yoshimatsu, A. Takada, M. Ogino, A. Asano, J. Arikawa, et al., Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication, *Arch. Virol.* 146 (2001) 41–49.
- [17] Y. Xu, M. Johansson, A. Karlsson, Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 1563–1571.
- [18] I. Miyairi, V.R. Tatireddigari, O.S. Mahdi, L.A. Rose, R.J. Belland, L. Lu, et al., The p47 GTPases *Ilgp2* and *Irgb10* regulate innate immunity and inflammation to murine *Chlamydia psittaci* infection, *J. Immunol.* 179 (2007) 1814–1824.
- [19] L.C. Hallen, Y. Burki, M. Ebeling, C. Broger, F. Siegrist, K. Oroszlan-Szovik, et al., Antiproliferative activity of the human IFN- $\alpha$ -inducible protein IFI44, *J. Interferon Cytokine Res.* 27 (2007) 675–680.
- [20] J.M. Farber, Mig and IP-10: CXCL chemokines that target lymphocytes, *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997) 246–257.
- [21] S. Klunker, A. Trautmann, M. Akdis, J. Verhagen, P. Schmid-Grendelmeier, K. Blaser, et al., A second step of chemotaxis after transendothelial migration: keratinocytes undergoing apoptosis release IFN- $\gamma$ -inducible protein 10, monokine induced by IFN- $\gamma$ , and IFN- $\gamma$ -inducible alpha-chemoattractant for T cell chemotaxis toward epidermis in atopic dermatitis, *J. Immunol.* 171 (2003) 1078–1084.
- [22] S. Ying, B. O'Connor, J. Ratoff, Q. Meng, C. Fang, D. Cousins, et al., Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *J. Immunol.* 181 (2008) 2790–2798.
- [23] M.A. Horisberger, Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152 (1995) S67–S71.
- [24] M. Mondini, S. Costa, S. Sponza, F. Gugliesi, M. Gariglio, S. Landolfo, The interferon-inducible HIN-200 gene family in apoptosis and inflammation: implication for autoimmunity, *Autoimmunity* 43 (2010) 226–231.
- [25] H. Saito, M. Kubota, R.W. Roberts, Q. Chi, H. Matsunami, RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors, *Cell* 119 (2004) 679–691.
- [26] C. Prehaud, F. Megret, M. Lafage, M. Lafon, Virus infection switches TLR3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon, *J. Virol.* 79 (2005) 12893–12904.
- [27] E. Gros, C. Bussmann, T. Bieber, I. Forster, N. Novak, Expression of chemokines and chemokine receptors in lesional and nonlesional upper skin of patients with atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2009).
- [28] K.A. Cavassani, M. Ishii, H. Wen, M.A. Schaller, P.M. Lincoln, N.W. Lukacs, et al., TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 2609–2621.

## 第 113 回 日本眼科学会総会 特別講演 I

## 角膜疾患の未来医療

木下 茂

京都府立医科大学医学部視覚機能再生外科学

## 共同研究者

小泉 範子<sup>1)</sup>, 外園 千恵<sup>2)</sup>, 中村 隆宏<sup>1)</sup>, 稲富 勉<sup>2)</sup>, 上田真由美<sup>1)</sup>, 川崎 諭<sup>2)</sup>, 山田 潤<sup>3)</sup>  
 横井 則彦<sup>2)</sup>, 上野 盛夫<sup>2)</sup>, 丸山 和一<sup>2)</sup>, 奥村 直毅<sup>2)</sup>, 伴 由利子<sup>2)</sup>, 西崎 暁子<sup>2)</sup>, 関山 英一<sup>2)</sup>  
 永田 真帆<sup>2)</sup>, 中司 美奈<sup>2)</sup>, 東原 尚代<sup>2)</sup>, 鈴木 智<sup>2)</sup>, 佐野洋一郎<sup>2)</sup>, 山崎 健太<sup>2)</sup>, 谷岡 秀敏<sup>4)</sup>  
 高橋 浩昭<sup>5)</sup>, 岡野 明<sup>6)</sup>, 羽室 淳爾<sup>2)</sup>, Andrew J. Quantock<sup>7)</sup>, Nigel J. Fullwood<sup>8)</sup>

<sup>1)</sup>同志社大学生命医科学部医工学科, <sup>2)</sup>京都府立医科大学医学部視覚機能再生外科学, <sup>3)</sup>国立長寿医療センター眼科

<sup>4)</sup>参天製薬株式会社中央研究所, <sup>5)</sup>千寿製薬株式会社中央研究所, <sup>6)</sup>味の素株式会社中央研究所

<sup>7)</sup>School of Optometry and Vision Sciences, Cardiff University, <sup>8)</sup>Department of Biological Sciences, Lancaster University

## 研究協力者

西田 幸二<sup>9)</sup>, 田代 啓<sup>10)</sup>, 中野 正和<sup>10)</sup>, 八木 知人<sup>10)</sup>, 不破 正博<sup>10)</sup>

鳥居 隆三<sup>11)</sup>, 成宮 周<sup>12)</sup>, 松岡 俊行<sup>12)</sup>, 審良 静男<sup>13)</sup>

<sup>9)</sup>東北大学医学部眼科学教室, <sup>10)</sup>京都府立医科大学ゲノム医学, <sup>11)</sup>滋賀医科大学動物生命科学センター

<sup>12)</sup>京都大学医学部神経細胞薬理学教室, <sup>13)</sup>大阪大学免疫学フロンティア研究センター

## 要 約

種々の角膜疾患に対する新規治療方法を開発するためには、臨床現場から得たヒントと自由な発想を基礎的研究成果と結びつけ、トランスレーショナルリサーチとして立ち上げることが大切である。そこで、我々のグループが角膜の未来医療を見据えて行っている 7 つの研究プロジェクトを概説する。

## 1. 膠様滴状角膜ジストロフィの病態解明

Tumor-associated calcium signal transducer 2 (TA-CST2) が原因遺伝子として同定されている本疾患では、loss of function 型の遺伝子変異によりタイトジャンクション関連蛋白質が機能障害を起こし、角膜上皮バリアー機能の高度な障害が生じ、その結果、涙液成分の角膜内への浸透が生じ、これがアミロイド沈着を促していると考えられた。

## 2. 培養粘膜上皮移植の開発と臨床応用

上皮細胞の *in vitro* から *in vivo* への橋渡しは、第 2 世代の眼表面再建術と位置づけることができる。1999 年から同種培養角膜上皮移植を、2002 年から自家培養角膜上皮移植と自家培養口腔粘膜上皮移植を開始した。このシート移植は難治性眼表面疾患のみならず結膜上皮幹細胞疲弊にも有効であった。

## 3. Stevens-Johnson 症候群 (SJS) の病態解明と新規治療法の開発

角膜上皮幹細胞の喪失が視力低下に相関することから、急性期のステロイドパルス療法で角膜上皮幹細胞の喪失を最小限にすることが良好な視力予後につながると考えられた。急性期に生じているサイトカイン・ストームの抑制が治療として必須であることを示唆している。本疾患では自然免疫応答の異常が発症に大きく関係していた。

## 4. アレルギー性眼表面疾患への新しい取り組み

上皮細胞に発現する EP 3 の眼表面炎症抑制作用をアレルギー性結膜炎モデルで明らかにした。EP 3 はヒト上皮細胞にも発現し、その遺伝子多型が関与する炎症性眼表面疾患が存在することから、アレルギー性炎症が上皮細胞を介して制御されている可能性がある。一方、上皮細胞に発現する toll like receptor 3 は眼表面炎症の増悪に関与していた。

## 5. 眼表面上皮細胞の機能制御

上皮細胞内のグルタチオン (GSH) 含量は細胞内レドックス状態を制御しており、例えば、ドライアイでは GSH 量の低下がみられ、涙点プラグで回復した。アミノ酸も細胞機能の制御に関与しているが、涙液のアミノ酸プロファイルは血漿とはまったく異なっていた。炎症

別刷請求先：602-0841 京都市上京区河原町通り広小路上る梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 木下 茂

(平成 21 年 12 月 12 日受付, 平成 22 年 1 月 14 日改訂受理) E-mail: shigeruk@koto.kpu-m.ac.jp

Reprint requests to: Shigeru Kinoshita, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajicho, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan

(Received December 12, 2009 and accepted in revised form January 14, 2010)

眼において発現が亢進したアミノ酸は酸化型のレドックス応答と考えられた。

#### 6. 水疱性角膜症への新しい治療方法の開発

培養角膜内皮細胞を用いた再生医学的治療法の開発に取り組んだ。サル培養角膜内皮シート移植は、4年を経過しても透明性を維持した。Rho キナーゼ阻害剤の添加によりヒト角膜内皮を良好な形態を維持したまま効率的に培養できた。Rho キナーゼ阻害剤を併用した前房内細胞注入療法や Rho キナーゼ阻害剤点眼の開発にも可能性がある。

#### 7. 新しい涙液検査法の開発

涙液油層の上方伸展は、開眼直後に生じた油層の表面張力の勾配に基づいて引き起こされ、レオロジーの

Voigt モデルに近似されることが明らかになった。このため、油層動態解析は、角膜上の涙液の量と質の情報を低侵襲、定量的に得ることのできる近未来のドライアイ検査法になると考えられた。(日眼会誌 114: 161-201, 2010)

キーワード：膠様滴状角膜ジストロフィ、培養粘膜上皮移植、Stevens-Johnson 症候群、一塩基遺伝子多型、プロスタノイド受容体、EP3、細胞内レドックス、グルタチオン、培養角膜内皮細胞、Rho キナーゼ阻害剤、涙液油層、レオロジー

## A Review

### Research and Development for Treating Devastating Corneal Diseases

Shigeru Kinoshita

*Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine*

#### Abstract

In order to develop new therapeutic modalities for corneal diseases, it is essential to combine cutting-edge translational research based upon liberal original ideas obtained from clinical experience with state-of-the-art basic science and technology. Here, I describe seven important research projects on which our group has been working.

1. Elucidation of the pathogenesis in gelatinous drop-like corneal dystrophy (GDL). Due to loss of function of the tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2), a responsible gene for this dystrophy, tight-junction-related proteins cease to function, resulting in severe corneal epithelial barrier impairment. As a result, various proteins contained in tear fluid continuously penetrate into the corneal stroma, promoting the development of massive amyloid deposits.
2. The development of cultivated mucosal epithelial transplantation: A landmark surgery, involving the transplantation of cultivated mucosal epithelial cells from *in vitro* to *in vivo*, now recognized as the next generation of ocular surface reconstruction. We began performing cultivated allo-corneal epithelial transplantations in 1999, and cultivated auto-corneal and auto-oral mucosal epithelial transplantations in 2002. These proved to be very effective in the reconstruction of both the corneal surface and the conjunctival fornix.
3. Elucidation of the pathogenesis of Stevens-

Johnson syndrome: Studies have shown that there is a close relationship between corneal epithelial stem cell loss and the associated degree of visual impairment. We discovered that a steroid pulse therapy at the acute phase aimed at minimizing stem cell loss is very effective in restoring visual acuity. This implies that inhibition of the cytokine storm is essential for the treatment of acute-phase Stevens-Johnson syndrome. The innate immunity abnormality seems to be heavily involved at the onset of this devastating disease.

4. Elucidation of the involvement of EP3 and toll like receptor 3 (TLR3) in inflammatory ocular surface reactions: We discovered that EP3, one of the prostanoid receptors expressed by ocular surface epithelium, has a dramatic inhibitory effect on ocular surface inflammation in a mouse model. Since EP3 is also expressed in human ocular surface epithelium, and since abnormality of its single nucleotide polymorphisms (SNPs) is involved in some ocular surface inflammatory diseases, we theorized that an allergic reaction may be negatively regulated by EP3 which is predominantly expressed by the ocular surface epithelium. Our findings show that this is similarly true for TLR3, which, conversely, up-regulates ocular surface inflammation.
5. Functional regulation of the ocular surface epithelium: Our findings show that intracellular

glutathione (GSH) content in the ocular surface epithelium regulates its intracellular redox state. For instance, the GSH content of the conjunctival epithelium decreases in dry eye diseases, yet recovers after the surgical insertion of a punctal plug. Since various amino acids are also heavily involved in the regulation of cellular functions, we investigated the profile of amino acids contained in tear fluids. Our results indicate that there is a marked difference in amino acid profiles between tear fluids and plasma. Furthermore, we found that several amino acids are up-regulated in inflamed eyes, probably due to an oxidative redox response.

6. The development of new therapeutic modalities for corneal edema: We are developing a new therapeutic modality of cultivated corneal endothelial transplantation using methods based on regenerative medicine. For instance, our findings show that cultivated corneal endothelial sheet transplantation in monkeys maintains corneal transparency for at least four years after transplantation. The supplementation of a Rho kinase (ROCK) inhibitor in the culture media produces an excellent result in culturing human corneal endothelium, maintaining a normal-looking endothelial cell morphology. The use of a ROCK inhibitor, both for cultivated endothelial

cell injection into the anterior chamber and for use as a topical application, may prove to be a potential tool for the treatment of corneal endothelial dysfunction.

7. The development of a new type of tear function test: The results of our investigations show that the time-dependent changes of tear film lipid layer (TFLL) spread are compatible with the Voigt model of viscoelasticity, and that the initial velocity of the TFLL spread after a blink decreases in proportion to the decrease in tear volume. Thus, a lipid-layer analysis will become an important tear analysis tool.

The above are projects representing the way we believe new treatments for severe corneal diseases are heading.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 114: 161–201, 2010)

Key words: Gelatinous drop-like corneal dystrophy, Cultivated mucosal epithelial transplantation, Stevens-Johnson syndrome, Single nucleotide polymorphism, prostanoid receptor, EP 3, Intracellular redox state, glutathione, Cultivated corneal endothelium, Rho kinase inhibitor, Tear lipid layer, Rheology

## I 緒 言

角膜疾患の治療方法は、いくつかのパラダイムシフトを経て、現在の治療法に到達した。しかし、今なお難治な角膜疾患に対する新規治療方法を開発するためには、臨床現場から得たヒントと自由な発想を基礎的研究成果と結びつけ、トランスレーショナルリサーチとして立ち上げることが大切である。そこで、本総説では、我々のグループが角膜の未来医療を見据えて現在行っているいくつかの研究プロジェクトへの考え方と、その成果の一部を要約する。いくつかの研究プロジェクトとは、膠様滴状角膜ジストロフィの病態解明、培養粘膜上皮移植の開発と臨床応用、Stevens-Johnson 症候群の病態解明と新規治療法の開発、アレルギー性眼表面疾患への新しい取り組み、眼表面上皮細胞の機能制御、水疱性角膜症への新しい治療方法の開発、そして新しい涙液検査法の開発である。

## II 膠様滴状角膜ジストロフィの病態解明

膠様滴状角膜ジストロフィ (gelatinous drop-like corneal dystrophy: GDLD) は、角膜上皮と角膜実質への

アミロイド沈着を特徴とする、きわめて重症かつ稀少な角膜ジストロフィであり<sup>1)~3)</sup>、この疾患の新しい治療法を考案するためには病態の解明が必須である。この疾患は、常染色体劣性遺伝を示し、1998年に Tsujikawa らによって原因遺伝子が MIS1 と同定されたが<sup>4)5)</sup>、世界的にみて日本人に特徴的に発症するため founder effect が関与しているとも想像されている。原因遺伝子である tumor-associated calcium signal transducer 2 (以下 TACSTD 2, かつては MIS1 と呼称されていた) に関しては、いくつかの種類の癌細胞で発現が亢進すること<sup>6)~8)</sup>、TACSTD 2 抗体の刺激により細胞内カルシウム濃度が変化すること<sup>9)</sup>などが報告されているが、この遺伝子変異が GDLD の病態に結びつくプロセスについては未だ不明である。そこで、我々は長年にわたって、この病態解明について研究を進めてきた。

その結果、GDLD では、角膜実質のアミロイド沈着部位にラクトフェリン<sup>10)</sup>やクラスタリン<sup>11)</sup>などが沈着することから、我々は涙液成分の角膜実質への浸透が何らかのかたちでアミロイド沈着に関与しているとの仮説を立ててきた。このような涙液蛋白質の実質沈着には角膜上皮バリアー機能の持続的な障害が必須なはずであり、



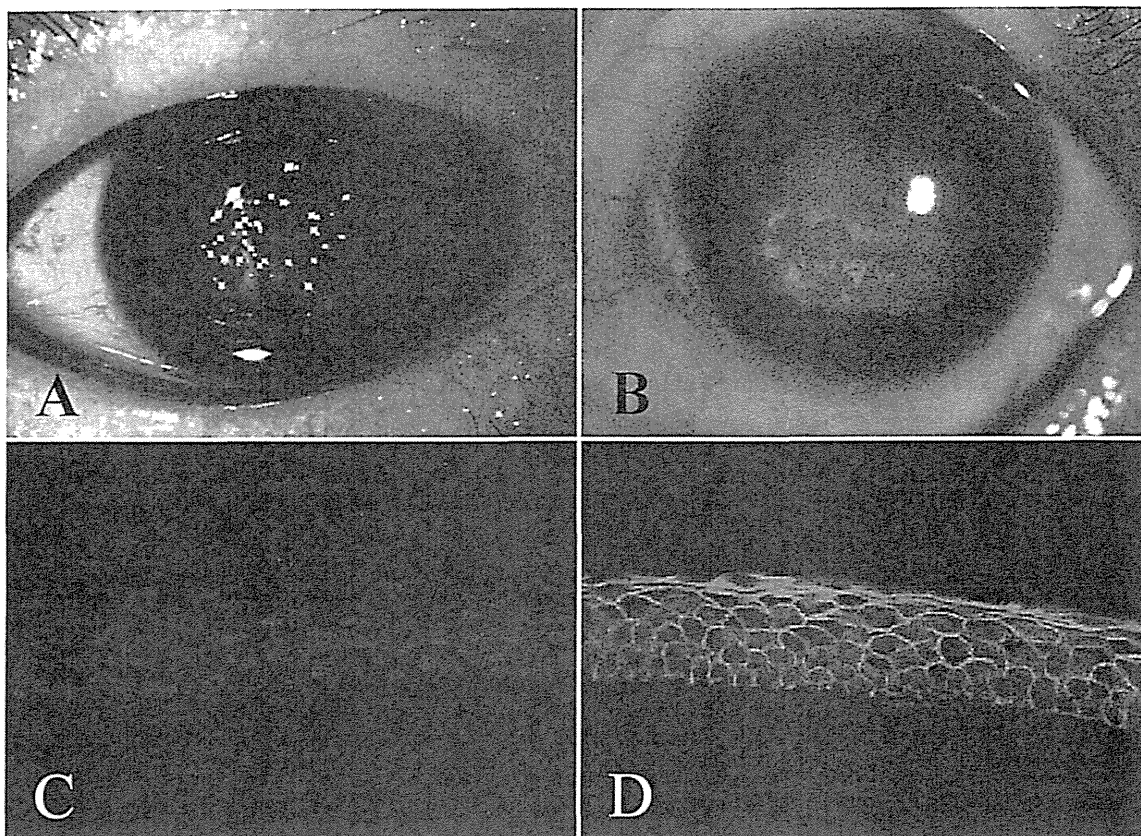


図 1 膠様滴状角膜ジストロフィ (GDLJ) 角膜の臨床および免疫染色の所見.

GDLJ 患者角膜所見 (A : Mulberry type, B : Band keratopathy type). Tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD 2) の発現 (緑色) は GDLJ 患者の角膜 (C) では認められないが, 正常角膜 (D) では全層の細胞膜に認められる. 赤色は核染色を示す.

我々は GDLJ におけるこの現象を電子顕微鏡的にも生理学的にも証明した<sup>12)13)</sup>. さらに, GDLJ の角膜上皮では, タイトジャンクション関連遺伝子である ZO-1 (zonula occludens 1) やオクルディンの発現が認められないことから<sup>14)</sup>, このバリアー機能の障害とタイトジャンクション機能低下との密接な関係を予想してきた. さらに, 我々の免疫組織化学的検討によると, TACSTD 2 蛋白質の発現は, GDLJ ではほぼ完全に消失していたが, 正常角膜上皮では全層の細胞の細胞膜に明瞭に認められた (図 1). 他の組織についても検討を行ったところ, TACSTD 2 は我々が検討したすべての重層扁平上皮で発現しており, その局在も角膜上皮細胞と同様であった.

次に我々は TACSTD 2 蛋白質と機能的に関連する蛋白質を同定することを試みた. 方法としては免疫沈降法と proximity ligation assay (以下 PLA) を用いた. 免疫沈降は二つの蛋白質の結合を, PLA は二つの蛋白質が近距離にあること (50 nm 以下とされている) を示す実験法である. 結果として, 我々が候補蛋白質としたもののなかで, 少なくとも 3 つの蛋白質 (X はその 1 つ) が免疫沈降実験や PLA で陽性シグナルを示した (図 2). これらの蛋白質は, 正常角膜上皮では全層の細胞に発現し

ているにもかかわらず, GDLJ 角膜では発現量が著しく減弱しており, また細胞内局在も変化していた. しかし, レーザーマイクロキャプチャーにより得た上皮細胞を検討してみると, 3 つの蛋白質の mRNA 発現は, GDLJ と正常角膜でほぼ同レベルであった. 次に我々は TACSTD 2 遺伝子をノックダウンするため shRNA 発現ベクターを構築した. shRNA とは short hairpin RNA のことで, 細胞内で発現させると RISC 複合体に取り込まれて small interfering RNA (siRNA) として機能しターゲット遺伝子の mRNA を分解する働きをもつ. ベクターとしては pLKO.1 というレンチウイルス発現系のものを用いた. ノックダウンする細胞としては, ヒト不死化角膜上皮細胞のなかで限界希釈法により高い上皮バリアー機能をもつものをクローニングして用いた. TACSTD 2 遺伝子をノックダウンするとヒト不死化角膜上皮細胞の上皮バリアー機能は著しく低下し, GDLJ において認められる角膜上皮バリアー機能の障害を反映しているものと考えられた. 次にノックダウンした細胞における上述の 3 つの蛋白質の発現を検討したところ, 発現量が減弱し, またその細胞内局在が GDLJ におけるものと同様に変化していた. 以上の結果より, GDLJ においては TACSTD 2 遺伝子の loss of



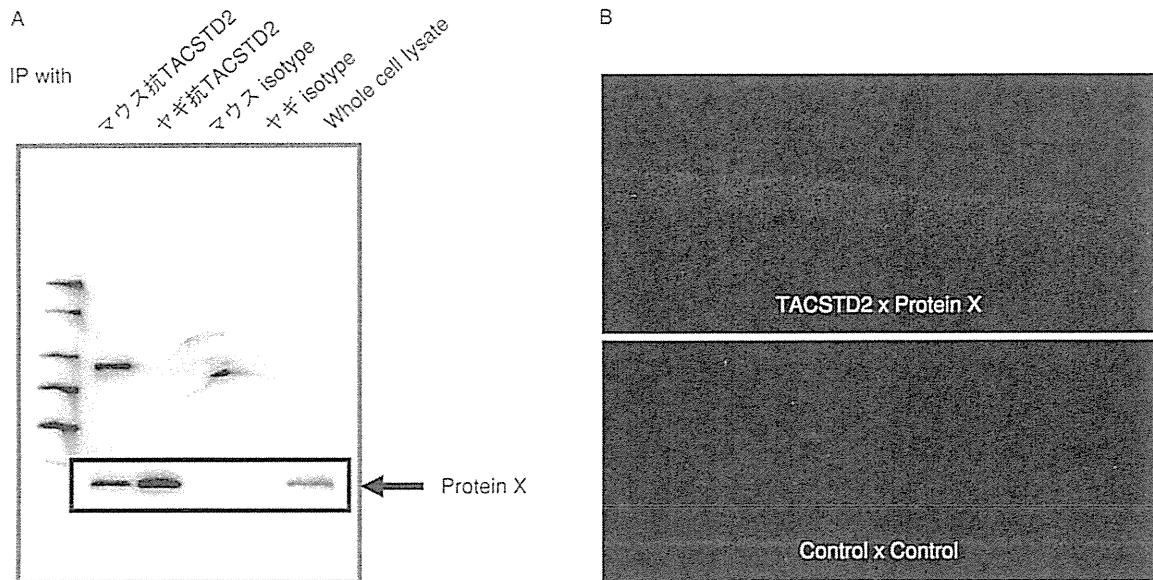


図 2 TACSTD 2 蛋白質は Protein X と結合する。

A : Protein X は TACSTD 2 抗体にて免疫沈降 (immunoprecipitation : IP) する。B : TACSTD 2 は Protein X と近距離に存在する。赤色が proximity ligation assay のシグナル。対照 (下写真) ではシグナルは検出されない。

function 型の遺伝子変異により、3つの蛋白質の発現量、細胞内局在の変化が生じ、この結果、上皮バリアー機能の障害が起こるのではないかと考えられた。今後は、TACSTD 2 遺伝子と3つの蛋白質の結合ドメインの同定、蛋白質発現量の低下、細胞内局在の変化に関する詳細について検討する予定である。

臨床的には、角膜上皮バリアー機能低下を代償させるような試み、例えばソフトコンタクトレンズの連続装着などが有効性を示しているが、最終的には、TACSTD 2 遺伝子の導入などにより、角膜上皮バリアー機能を正常化させる試みがなされるかもしれない。これには、遺伝子導入の倫理性、そして費用対効果における有用性が検討されるであろうが、角膜疾患として遺伝子治療が最も奏功する可能性のある疾患であることには違いない。

### III 培養粘膜上皮移植の開発

#### 1. 眼表面再建術の開発の歴史

Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡、熱化学外傷などの重症角結膜疾患では、角膜上皮幹細胞を含む角膜輪部領域が広範囲に障害されるため、正常な角膜上皮は供給不可能となる。その結果、周辺の結膜上皮が炎症、瘢痕、血管新生などを伴って眼表面を覆い、著しい視機能障害を来す。慢性瘢痕期には眼表面の非角化粘膜上皮は病的角化を来し、不可逆的となる。このように、角膜上皮幹細胞が機能不全を来す疾患は“難治性眼表面疾患”あるいは“角膜上皮幹細胞疲弊症”と呼ばれており、その病態・病理の解明、治療法の開発についてこれまでさまざまな基礎および臨床研究がなされてきた。従来これらの疾患に対する治療戦略としては、炎症を消退させて

慢性瘢痕期まで待ち外科的再建をするというのが世界的にコンセンサスを得られている考え方であった。

これまで、難治性眼表面疾患に対する外科的再建法としては、結膜移植術<sup>15)</sup>、角膜上皮形成術 (keratoepithelioplasty)<sup>16)17)</sup>そして角膜輪部移植術 (limbal transplantation)<sup>18)19)</sup>などが開発されてきた。概念的には、喪失した角膜上皮細胞を結膜上皮からの再生上皮で補充する手法が結膜移植術であり、幹細胞を含む角膜輪部や周辺部角膜からの再生上皮で再建する移植が角膜輪部移植術や角膜上皮形成術である。いずれの移植法も、*in vivo*における移植片からの再生上皮により眼表面の再建 (*in vivo* expansion 法) を目的とする手術法であり、第一世代の眼表面再建術といえる。

上述の移植法で、自家移植の行える片眼性疾患で健眼から移植片を採取可能な症例数には限りがあり、移植片の採取領域にも限界がある。両眼性の疾患ではドナー角膜を利用する同種移植を行うことになる。しかし我が国におけるドナー不足は深刻であり、再生医療学的見地から、必要とする移植組織が少量であれば理想的である。そこで難治性眼表面疾患に対する眼表面再建術として近年注目を集めているのが培養粘膜上皮移植術である。必要とする細胞を少量採取して生体外で培養粘膜上皮シートを作製したのち移植するというコンセプトは、これまでの角膜移植の長い歴史の中で細胞移植 (cellular surgery) の分野を確立したといえる。その先駆けとなったのは、1997年 Pellegrini らによる臨床報告である<sup>20)</sup>。彼女らは、自家培養角膜上皮シート移植による2例の成功例を報告し、これが角膜再生医療の幕開けとなった。当時、我々のグループも同様な研究を行っていたが、こ

の時点では、一步先を越されたかたちとなった。この発表以降、培養角膜上皮移植に関する基礎および臨床研究が世界的に精力的に行われることとなり、これまで、その培養基質には、生体由来材料の羊膜<sup>21)~23)</sup>、滅菌処理された凍結乾燥羊膜<sup>24)</sup>、生体吸収性高分子のフィブリン<sup>25)</sup>、また基質を用いない培養方法として温度応答性培養皿を用いた手法<sup>26)</sup>などが報告されている。このような *in vitro* から *in vivo* への橋渡しは、第二世代の眼表面再建術と位置づけることができる。これら第一世代ならびに第二世代上皮移植の概念は原則として自家移植であるが、上述したように、両眼性疾患や急性期疾患には同種移植も行われる。この場合には、全身ならびに局所に対するしっかりとした免疫抑制治療が必須となる。何故なら、同種角膜上皮移植は通常の角膜移植とは異なり免疫寛容を享受せず、心臓移植などと同様に容易に拒絶されるからである<sup>27)</sup>。

## 2. 培養角膜上皮シート移植術の研究開発

### 1) 研究開発の経緯

我々は、家兎を用いたさまざまな動物実験から、*in vitro* から *in vivo* への移植に耐えうる培養角膜上皮シートの作製条件を詳細に検討した。なぜなら、生体に近い角膜上皮細胞層を作製するためには、瞬目による機械的摩擦に耐えうるだけの基質との接着性もち、また基底細胞層で一定の増殖能を保った重層化した培養細胞層を作る必要があるからである。また、移植時にハンドリングの容易な培養上皮シートの作製が必須である。これまで、I型およびIV型コラーゲンシートや角膜実質を基質とした培養角膜上皮シートの作製が試みられたが、眼表面に生着する培養上皮シートの作製は困難であった<sup>28)29)</sup>。検討の結果、羊膜は有用な基質となりえること、基質としての羊膜はEDTAにより羊膜上皮細胞を除去して用いること、培養にはマイトマイシンC処理した3T3細胞との共培養を行うこと、培養期間後半に培養上皮シートを空気に曝露する(*air-lifting*)ことにより最表層細胞のタイトジャンクション機能を増強させること、が我々の施設で培養角膜上皮シートを作製する条件として最適であることが分かった<sup>30)~33)</sup>。作製した培養角膜上皮幹細胞シートの性状を確認するために、*in vivo* のヒト角膜上皮細胞に特異的に発現している細胞骨格蛋白質であるケラチン3およびケラチン12の発現を免疫染色で確認した<sup>31)34)35)</sup>。また、電子顕微鏡による細胞の微細構造ならびに細胞間接着の形成を検討した。その結果、羊膜の上で培養したヒト角膜上皮細胞は、表層では4~5層に重層化してケラチン3およびケラチン12を発現しており、*in vivo* 角膜上皮細胞と同様の分化を示すことが明らかとなった。また角膜上皮細胞間にはデスモゾームを、基底部分の上皮細胞と羊膜基質の間にはヘミデスモゾームを形成しており、さらに、最表層細胞はタイトジャンクションを形成してバリアー機能を獲得している

ことが確認された<sup>36)</sup>。作製した羊膜上培養角膜上皮シートを同じ家兎に自家移植した結果、眼表面に生着し、術後透明性を維持することを確認した<sup>30)</sup>。これらの実験動物レベルでの基礎データをもとに、京都府立医科大学倫理委員会の承認のもと、1999年から難治性眼表面疾患に対する同種アロ培養角膜上皮移植を<sup>22)37)</sup>、2002年から同種オート培養角膜上皮移植を開始した<sup>38)</sup>。

### 2) 自家移植の臨床成績

片眼性の難治性眼表面疾患に対しては、健眼から少量(2×3mm、角膜輪部)の角膜上皮幹細胞が含まれる角膜輪部組織を採取し羊膜上で培養した。2002年7月~2007年1月の期間で自家培養角膜上皮移植術を施行し、術後2年以上観察した6例6眼(化学外傷3眼、特発性角結膜上皮症3眼)を対象とし臨床成績を解析した。全症例で重層化した自家培養角膜上皮シートの作製に成功、そして移植後早期(2日~1週間)に培養上皮が角膜表面に生着していることを生体染色法により確認した。術後最終観察時の視力においては6眼中5眼で2段階以上の視力の改善を認め、悪化した症例はなかった<sup>39)</sup>。7年を超える最長観察例では周辺部角膜にわずかに侵入する結膜上皮とは明瞭に区別される培養角膜上皮由来上皮の長期生着が観察できた。術後遷延性角膜上皮欠損、眼圧上昇、瞼球癒着などの合併症は認めなかった。以上のことより、再生医学的手法を用いた自家培養角膜上皮幹細胞シート移植は、安全で有効な外科的再建法であると考えられた。

### 3) 同種移植の臨床成績

アロ培養角膜上皮幹細胞シート移植の実施にあたっては、従来の外科的治療法では再建できない両眼性の難治性眼表面疾患、すなわちStevens-Johnson症候群、重症熱・化学腐食、眼類天疱瘡を対象とした。手術適応は、①急性期あるいは慢性期の急性増悪で生じた遷延性上皮欠損の上皮修復目的と<sup>37)</sup>、②慢性期の視機能回復目的<sup>22)</sup>とした。全症例において、十分なインフォームド・コンセントのもとに文書同意を取得し、京都府立医科大学倫理委員会の承認に基づいて羊膜処理、培養上皮シート作製を行い、移植手術を施行した。1999年1月から2006年6月までにアロ培養角膜上皮幹細胞シート移植を行った症例は36例39眼であり、急性期の上皮修復目的で手術を施行した症例が12例15眼、慢性期の視機能回復目的で手術を行ったものが24例24眼であった。全例で移植48時間後に移植した培養上皮が角膜表面にはほぼ完全に生着していることを生体染色法により確認した。急性期症例の全例が術後に速やかな眼表面の上皮化を得て、長期においても眼表面は安定していた。また視機能回復を目的とした症例の術前視力は半数以上が0.01未満であったが、術後1年に79%において視力改善を得た。

これらの結果を踏まえて、2004年2月~2006年7月

に愛媛大学、東京歯科大学の協力を得て、各大学倫理委員会の承認のもとに国内多施設スタディを展開した。京都府立医科大学で 10 例、愛媛大学と東京歯科大学において 8 例、合計 18 例 18 眼に対してアロ培養角膜上皮シート移植を行った。上皮シートの移送に起因する合併症を生じず、術後経過に施設による差異を認めなかった。18 例中 14 例で視力改善を得ており、今後は厚生労働省承認の臨床試験により臨床評価を行う段階にあると考えられる。

### 3. 培養口腔粘膜上皮シート移植術の研究開発

#### 1) アロからオートへ：培養口腔粘膜上皮シート移植のコンセプト

重症の難治性眼表面疾患に対しては培養角膜上皮幹細胞シート移植などの外科的治療法が考案され良好な成績を収めてきた。しかしながら難治性眼表面疾患の大部分は両眼性であり、これらの治療法の多くは同種(アロ)の上皮移植となるため、術後の拒絶反応と感染症を克服することが必須であった。そこで我々は、角膜上皮の代用となりえる粘膜上皮を探索した。細胞生物学的特徴および組織採取の容易性などを考慮し、角膜型ケラチンをその細胞骨格蛋白質にもつ口腔粘膜上皮に着目し、羊膜を基質に用いた培養口腔粘膜上皮シートの作製を検討した。

#### 2) 培養口腔粘膜上皮シート作製法の検討

まず家兎の培養口腔粘膜上皮シートを作製し、作製した口腔粘膜上皮シートを眼表面に自家移植し、その有用性について検討した<sup>39)40)</sup>。羊膜を口腔粘膜上皮培養の基質として使用した。羊膜上で培養した口腔粘膜上皮細胞は、羊膜基質上で敷石状に増殖し、1 週間でコンフルエントになり、約 2 週間で角膜上皮に類似した 5~6 層に重層化した上皮層を形成した。培養口腔粘膜上皮シートの組織学的特徴としては、非角化型の粘膜上皮としての性質を保持しながら、細胞骨格の側面からは角膜の性質を一部保持する上皮シートであることが分かった。培養口腔粘膜上皮シートの *in vivo* での機能を評価する目的で、家兎眼表面の障害モデルを作製し自家移植を行った。移植 10 日後においても、移植された粘膜上皮シートは眼表面に生着していた。今回我々が作製した培養口腔粘膜上皮シートは、重層化した非角化粘膜上皮であり、角膜上皮類似の細胞生物学的性状を示し、無血管というきわめて特殊な環境においても生着した<sup>39)</sup>。

#### 3) 臨床成績のレトロスペクティブ解析

2002 年から自家培養口腔粘膜上皮シートを用いて角膜表面を再建し光学的な機能回復を目的として臨床応用を開始し、短期・中期の臨床成績に関して報告してきた<sup>41)~43)</sup>。しかしながら、今後この成果を広く社会へ還元するためには、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成 18 年厚生労働省告示第 425 号)に基づいて、安全性を担保したより進歩した次世代の再生医療技

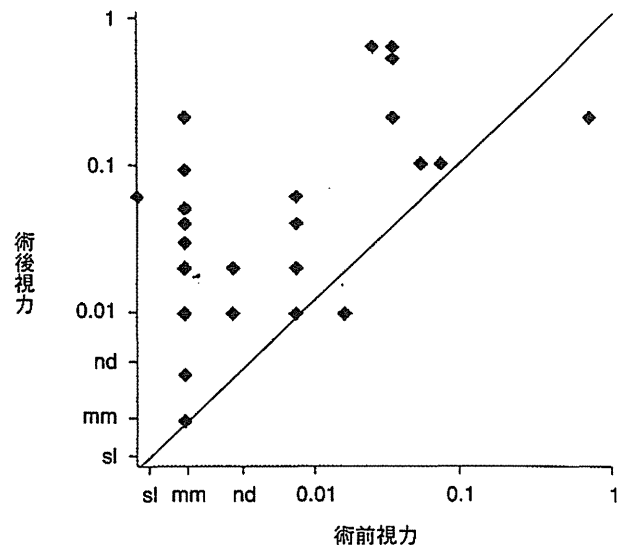


図 3 慢性期角膜再建を目的とした培養口腔粘膜上皮移植術を施行した症例の視力変化。

術後観察期間中の最高矯正視力に関しては、2 段階以上の視力改善が 71%、1 段階以上の視力改善が 82%、不変が 14%、悪化は 3% に認められた。

sl：光覚弁，mm：手動弁，nd：指数弁。

術を用いた臨床研究を行うことが必須である。そこで、我々は次世代の角膜再生医療の技術開発を行うには、これまで施行されてきた培養口腔粘膜上皮移植術の臨床評価をまず集積し、その課題や問題点を明らかにする必要があると考え、大規模レトロスペクティブ解析を行った。

まず、慢性期角膜再建を目的とした 45 症例 52 眼の臨床評価を行った。主たる疾患の内訳は Stevens-Johnson 症候群 22 眼、熱・化学腐食 7 眼、眼類天疱瘡およびその類縁疾患は 12 眼、その他が 11 眼であった。術後観察期間中の最高矯正視力に関しては、2 段階以上の視力改善が 71%、1 段階以上の視力改善が 82%、不変が 14%、悪化は 3% に認められ、視力はきわめて安定していた(図 3)。重症眼表面疾患であることを考慮すると、培養口腔粘膜上皮シート自体の光学特性が代用角膜上皮として臨床上十分な機能を果たしていると考えられた(図 4)。術後の臨床所見(角化、遷延性角膜上皮欠損、結膜侵入、角膜混濁)を既報のグレード分類によりスコア化して臨床評価し、術後の角膜総合評価のスコアの変化を検討した(値が低いほど正常に近い)。その結果、術前を 1 とした場合、術後 6 か月、最終観察時でも 0.5 前後であり、角結膜全体の健全性は著明に改善していると考えられた(図 5)。

難治性眼表面疾患では角膜上皮幹細胞のみならず結膜上皮幹細胞が疲弊する場合も多く、結膜嚢の短縮から癒痕形成により瞼球癒着、偽翼状片へと進行し、視機能障害に至る。これらの治療としては、僚眼からの結膜移植や羊膜移植などによる外科的再建が試みられてきたが、

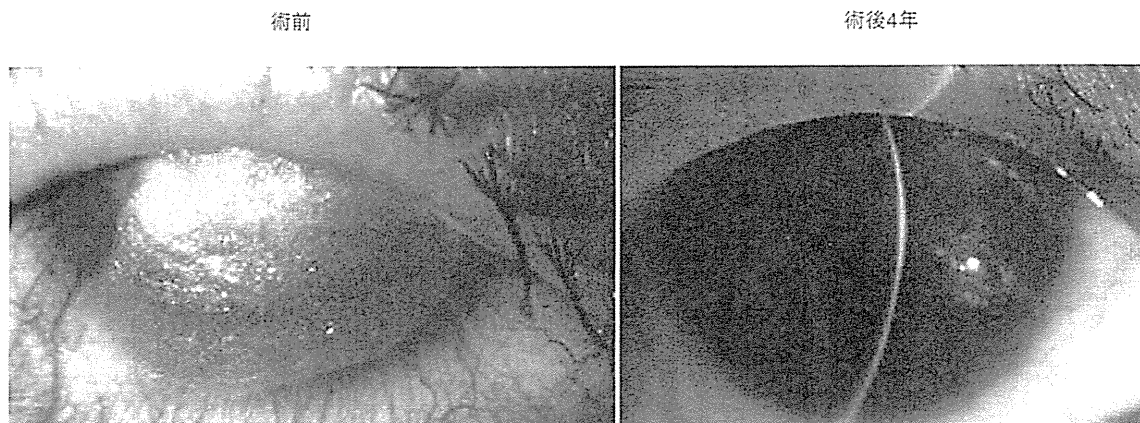


図4 角膜再建を目的とした培養口腔粘膜上皮移植の術前・術後4年の前眼部写真。

術前、眼表面は病的な癍痕性の結膜組織で被覆され著しい視力障害を来している(左)。培養口腔粘膜上皮移植後4年、眼表面は再建されている(右)。

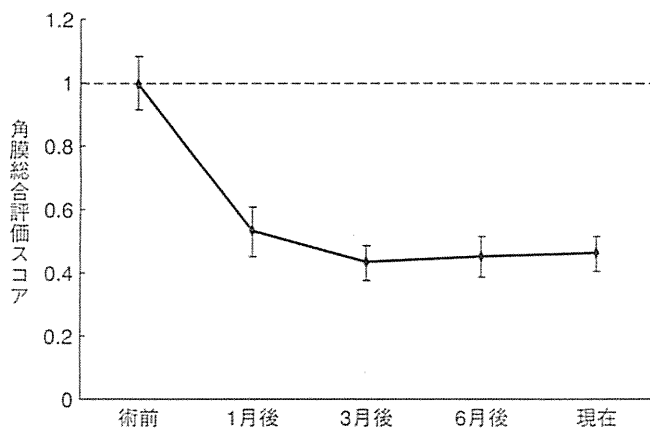


図5 術後の臨床所見(角化、遷延性角膜上皮欠損、結膜侵入、角膜混濁)のスコア変化表。

既報のグレード分類により臨床所見をスコア化して評価し、術後の角膜総合評価のスコアの変化を検討した(値が低いほど正常に近い)。術前を1とした場合、術後6か月、最終観察時でも0.5前後と改善していた。

両眼性疾患や慢性炎症を伴う疾患では十分な治療効果を得られていない。我々は結膜上皮の代用として培養口腔粘膜上皮シートを難治性眼表面疾患26眼に移植し、結膜嚢形成における有効性を検討した。前述の驗球癒着、上下の結膜嚢短縮癒着の程度をグレード分類に従ってスコア化し、術後の継時的変化を検討した(値が低いほど正常に近い)。その結果、術前のスコアを1とした場合、術後6か月、最終観察時で0.3前後となり、全体としては、培養口腔粘膜上皮シート移植による結膜嚢再建の有効性が十分に示された(図6、図7)。結論として、培養口腔粘膜上皮シート移植は、眼表面へ結膜上皮幹細胞を供給することにより、結膜上皮幹細胞疲弊に対しても有効と考えられた。

#### 4. 臨床試験へ向けた安全性の担保

##### 1) 培養方法の改良

再生医療の技術を用いた一連の臨床試験において、

我々はその医療技術が安全性、倫理的課題を克服できているか否かに注意を払う必要がある。特に、培養粘膜上皮シートの作製過程で使用するウシ胎仔血清やマウス由来のフィーダー細胞は異種移植の範疇に入るため、さらなる次世代の再生医療の技術開発ならびに臨床応用の実現化が急務である。そこで我々はまず、従来使用されてきたウシ胎仔血清の代替として、ヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮移植システムの開発を手がけた<sup>44)</sup>。培養液の改変も含む種々の培養操作過程の最適化により、自己血清を用いた培養上皮シートの作製システムを確立した。それらのデータをもとに患者の自己血清を用いた培養上皮移植術を開発し、その臨床成績を報告した<sup>45)46)</sup>。自己血清で作製した培養上皮シートの細胞生物学的考察を、免疫染色法、電子顕微鏡を用いて解析した。次に眼表面再建を目的として培養粘膜上皮シートを移植し、その眼表面における生着性を検討した。その結果、自己血清を用いて作製した培養粘膜上皮シートは、独自の分化型ケラチン、基底膜関連蛋白質の染色性を示し、正常角膜上皮と同等の細胞接着装置などの構築を示した。術後早期(2~7日)における培養上皮の眼表面での生着を全例(100%)で確認した。2段階以上の視力改善が認められた症例は、培養角膜上皮移植7例(88%)、培養口腔粘膜上皮移植6例(86%)であった。この結果より、自己血清を用いた培養粘膜上皮移植術は、従来のウシ胎仔血清を用いた移植法と同等の細胞生物学的特徴、臨床的有用性を示し、より安全で倫理面に配慮した移植法であることが分かった。さらに、近年では従来使用してきたマウス3T3細胞や血清を用いない、完全な無血清・無フィーダーによる培養方法も確立されつつあり、再生医療における培養技術は目覚ましい進歩を遂げていると考えられる。

我々は、培養粘膜上皮シートに用いる基質の安全性にも配慮した。特に我々が使用してきた羊膜は生体由来の材料であり、従来から清潔操作下で処理されてはきたが、その物理学的特性上、完全な滅菌操作が不可能で

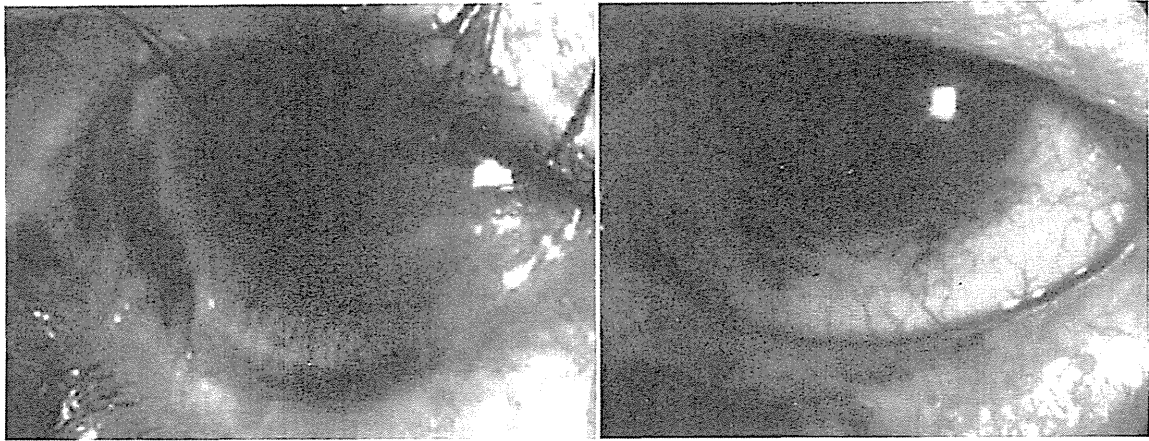


図 6 結膜嚢再建を目的とした培養口腔粘膜上皮移植の術前・術後の前眼部写真。術前、下眼瞼の結膜嚢は短縮していた(左)。培養口腔粘膜上皮移植後、結膜嚢は深く再建されている(右)。

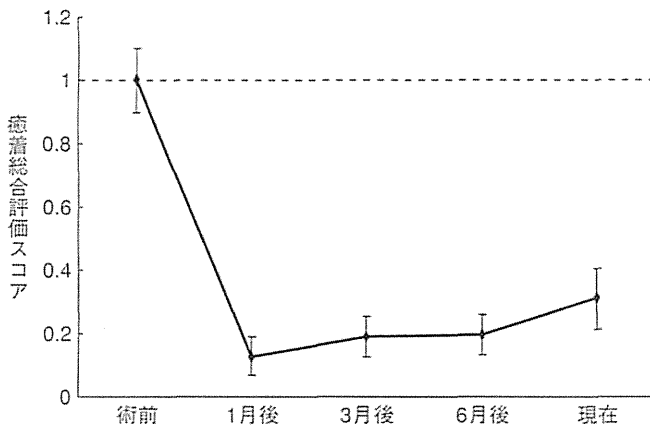


図 7 術後の臨床所見(睑球癒着, 上下の結膜嚢短縮癒着の程度)のスコア変化表。

既報のグレード分類により臨床所見をスコア化して評価し、術後の癒着総合評価のスコアの変化を検討した(値が低いほど正常に近い)。術前を1とした場合、術後6か月、最終観察時でも0.3前後と改善していた。

あった。そこで、より安全面と倫理面に配慮した生体医療材料の開発を念頭に、滅菌、常温保存可能なトレハロース処理ヒト凍結乾燥羊膜を開発し、眼表面再建の基質としての適合性を検証した<sup>47)</sup>。感染症(B, C型肝炎, HIV, 梅毒)陰性の妊婦から予定帝王切開時に無菌的に羊膜を採取し、羊膜上皮を除去後、トレハロース溶液に約2時間浸漬、真空凍結乾燥させ、 $\gamma$ 線滅菌を施行した。作製したトレハロース処理凍結乾燥羊膜の物理学的特性を力学的検査で、細胞生物学的特性を種々の細胞外マトリックスに対する免疫染色で検討した。その結果、作製したトレハロース処理凍結乾燥羊膜は、溶液中では羊膜と同等のきわめて高い柔軟性を示し、縫合も可能であった。一点支持力、耐破断張力試験などの力学的検査では、従来の羊膜と比較して統計学的に有意差はなく、力学的特性は劣っていないかった。また、種々のコラーゲン、ラミニンなどに対する免疫染色性も従来型の羊膜と

同等に認められた。以上のように、我々が開発したトレハロース処理ヒト凍結乾燥羊膜は、従来の保存羊膜と同等の物理学的、細胞生物学的特性を保持し、眼表面での生体適合性も認められたことから、安全な基質として広く臨床応用できると考えられた<sup>48)</sup>。その他、上皮幹細胞にかかわる基礎研究を地道に行っており、例えばインテグリン $\beta$ 1, p 75, Hes 1などの発現と上皮幹細胞との関係を詳細に検討している<sup>49)~51)</sup>。

2) ハード面での安全性の担保

平成 18 年に厚生労働省から「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が発令され、組織幹細胞を用いた臨床研究に関しては、薬剤の臨床治験と同等レベルの臨床研究が必要とされ、大学倫理委員会とともに厚生労働省の審査が必要となった。そこで我々の施設で 1999 年以降継続して施行してきた培養上皮幹細胞移植術に関しても、ガイドラインに従った方法へグレードアップすることが望ましく、培養上皮移植術に関するハードおよびソフト面を再構築した。京都府立医科大学内に、培養室内はクラス 10,000 レベル(EU GMP class B)、安全キャビネット内はクラス 100 レベル(EU GMP class A)の GMP 準拠の細胞培養用施設を整備した。本施設を用いて上皮シートを作製し、完成した上皮シートの形態を比較・検討した。難治性眼表面疾患 16 例に対して、自家培養上皮移植を施行した。培養上皮シートの作製は、本研究施設において SOP(standard operating procedure) 手順書を含めた、GMP 準拠の厳しい品質管理体制のもとで行った。移植後全例で 48 時間における完全な上皮生着を認めた。術後の合併症としては経過観察中に自家培養口腔粘膜上皮移植例で部分的な上皮欠損、表層血管侵入が認められたが、適切な術後管理により軽快・消失した。自家培養角膜上皮移植例では術後合併症は認められなかった。このように、厚生労働省の目指す安全基準を視野に入れた GMP 準拠細胞培養施設で作製された培養上皮シートは、従来法で作製したシートと同様の有用