

変異をもつTACSTD2遺伝子を発現するプラスミドを作製し、不死化ヒト角膜上皮細胞に遺伝子導入してその細胞内局在が野生型TACSTD2タンパクと比べ明らかに変化していることを示した。

D. 考按

本研究によって膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化ヒト角膜および結膜上皮細胞の樹立に成功した。これらの細胞をウエスタンブロットで調べたところ、クローディン1および7の発現量に明らかな違いが認められ、また免疫染色ではそれらのタンパクの細胞内局在において野生型との間に明らかな違いを認めた。我々はこのクローディン1および7タンパクの細胞内局在の変化が分子病態を紐解くカギとなるものと考えており、ユビキチンやオートファジー、ライソゾーム、エンドソームとの関係を免疫染色で調べたが、有意な結果は得られなかった。しかしタンパクレベルの発現量において著しい低下が認められることから何らかの系によるタンパク分解の亢進は間違いなく存在するものと考えられ、次年度において再度詳細に検討する予定である。別の我々の研究においてクローディン1および7においてユビキチン化が起らないことがほぼ確定的となっていることから、分解の経路としてはオートファジーかライソゾーム経路にほぼ絞られることとなり、次年度の課題と考えている。

本疾患患者由来の不死化細胞は治療法の確立においても極めて重要な研究リソースとなるものと期待できる。村上らのソフトコンタクトレンズ

による本疾患の治療法の開発においても評価系として使用したいと考えている。

残念ながら当初考えていたプロテアソーム阻害剤による治療可能性はクローディン1および7がユビキチン化しないことがほぼ確定的となった現在では困難であるとの結論に至った。実際、プロテアソーム阻害剤を不死化細胞に対して処理してみたが、上皮バリア機能の改善は認められなかった。

E. 結論

膠様滴状角膜変性症患者由来の不死化ヒト角膜および結膜上皮細胞の樹立に成功した。これらの細胞は膠様滴状角膜変性症の病的性質を忠実に再現しており、病態の解明や治療法の開発等において極めて有用な研究リソースとなることが期待された。またコンタクトレンズをデバイスとして用いることで角膜上皮細胞の培養が可能であり、角膜への細胞移入も可能であることが明らかとなった。今後TACSTD2遺伝子導入をおこなった角膜上皮細胞をソフトコンタクトレンズ上で培養して患者角膜へ移入する方法の開発などを行うなどの応用が考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成22年度）

論文発表

巻末研究成果一覧表参照

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

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）
課題「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

平成 24 年度 総括研究報告書
「膠様滴状角膜変性症の標準治療レジメンの確立と新規療法の創出」

研究代表者 川崎 諭 京都府立医科大学眼科学教室 助教

【研究要旨】

膠様滴状角膜変性症は 10 歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し、責任遺伝子として 1999 年に辻川らによって TACSTD2 遺伝子が同定された。しかしながらその病態の詳細は未だ不明で、また希な疾患であるため臨床的にも様々な点において不明な状況が続いている。

一昨年度、角膜専門外来をもち本疾患について積極的に診断・治療を行っている本研究班の 4 施設（京都府立医科大学、大阪大学、順天堂大学、東京大学）において本疾患患者 45 例 90 眼について疫学背景、臨床像、治療成績についてデータを収集し、その成果として本疾患に対する標準的治療レジメンを作成した。また極めて重要な知見として、ソフトコンタクトレンズの装用が膠様滴状角膜変性症の角膜移植術後の再発抑制に極めて有効であるということが明らかとなった。また分子レベルでの膠様滴状角膜変性症の病態解明に取り組み、膠様滴状角膜変性症では TACSTD2 遺伝子の機能喪失型変異によりクロロディン 1 および 7 のタンパク分解を介してタイトジャンクションの形成不全が起こり上皮バリア機能の著明な低下を来すことが明らかにした。

昨年度は一昨年度の結果を踏まえ、さらなる病態解明、治療法の開発に取り組んだ。その成果として、膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜上皮および結膜上皮細胞の不死化細胞の樹立に成功した。またソフトコンタクトレンズを基質として角膜上皮細胞を培養することに成功し、効率的な遺伝子導入方法の確立のための一助となった。一方で *in vitro* におけるより *organotypic* な評価系確立のための基礎研究として培養角膜および口腔粘膜上皮シートにおける TACSTD2 タンパクの発現を確認した。臨床的には膠様滴状角膜変性症患者 3 例において新規の遺伝子変異を発見し、さらに前眼部 OCT が膠様滴状角膜変性症の術後再発の評価系として有用であることを見出した。

今年度は昨年度に樹立した膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜上皮および結膜上皮細胞の不死化細胞を用いて、レンチウイルスとプラスミドによる遺伝子治療の可能性について検討した。また角膜上皮、口腔粘膜上皮シートにおける TACSTD2 の発現を解析し、臨床の場で移植治療に用いている上皮シートの上皮バリア機能との関連を見た。また臨床的な観点では、膠様滴状角膜変性症患者の角膜移植術後の検査法の確立を行い、全国調査についても行った。

研究分担者

1. 村上 晶・順天堂大学 眼科学教室・教授
2. 天野史郎・東京大学 医学部附属病院 眼科学教室・教授
3. 稲富 勉・京都府立医科大学 医学(系)研究科(研究院) 眼科学教室・助教
4. 辻川元一・大阪大学 大阪大学・医学(系)研究科(研究院) 眼科学教室・助教

A. 研究目的

膠様滴状角膜炎は 10 歳代に角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じ、次第に角膜全面を覆うために著明な視力低下を来す疾患である。常染色体劣性遺伝を呈し発症頻度は稀であるが、日本人特有の疾患であることから大阪大学の辻川らによってその責任遺伝子として TACSTD2 遺伝子が同定された。しかしながら TACSTD2 遺伝子変異がいかんして本疾患の病態を引き起こすかについてはこれまで不明であった。本疾患は希な疾患であるためこれまでその疫学的情報については不明な点が少なくなかった。また本疾患は再発傾向が強く、他疾患にくらべてステロイド緑内障を合併しやすいことなどが知られていたが、その理由および予防策については明らかにされていなかった。さらに本疾患に対する外科的治療である表層角膜移植、角膜上皮移植、角膜表層切除についても、治療時期と治療法の最適な組み合わせについては明らかではなかった。

このような背景のもと、一昨年度我々は本研究班の 4 施設を受診し膠

様滴状角膜炎と診断された 45 例 90 眼について臨床データを採取し、疫学的検討と術式毎の治療成績およびソフトコンタクトレンズ装用の有無による術後の再発の有無について検討し意義深い結果を得た。また本疾患の原因遺伝子である TACSTD2 遺伝子の機能喪失性変異がどのような機序で本疾患の病態のカギとも言える上皮バリア機能の低下を来すのかについて極めて意義深い結果を得た。

昨年度は疾患モデルとして、膠様滴状角膜炎患者由来の不死化角膜上皮細胞の樹立を行った。また全国調査のための準備を行うとともに、各大学の分担者においては、独自の視点で膠様滴状角膜炎の基礎的または臨床的研究を行った。

今年度は膠様滴状角膜炎に対する新しい治療法の確立を目的として、樹立した疾患モデル細胞を用いてレンチウイルスとプラスミドによる遺伝子治療の可能性について検討した。また臨床的観点から膠様滴状角膜炎に対する角膜移植後の新しい術後評価法の検討と、角膜および口腔粘膜上皮シートにおける TACSTD2 遺伝子の発現をヒトとウサギにおいて検討した。また全国調査を行い、膠様滴状角膜炎の疫学と治療成績について一昨年度の結果との比較を行った。

B. 研究方法

1. 昨年度に樹立に成功した膠様滴状角膜炎患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞を用いて遺伝子治療の

可能性についての検討を行った。(詳細は川崎の分担研究報告を参照)

2. コンタクトレンズ (P-CL) をデバイスとしたプラスミドによる遺伝子治療の可能性について検討した。(詳細は村上の分担研究報告を参照)
3. 膠様滴状角膜変性症患者に対する SCL 装用による再発抑制メカニズムについて検討した。(詳細は村上の分担研究報告を参照)
4. ヒトおよびウサギの角膜上皮、口腔粘膜上皮シートにおける TACSTD2 の発現を解析した。(詳細は辻川の分担研究報告を参照)
5. Swept source 型前眼部光干渉断層計に内蔵した自動角膜体積測定機能を用いて膠様滴状角膜変性症患者の角膜移植後の状態について検討した。(詳細は天野の分担研究報告を参照)
6. 膠様滴状角膜変性症患者の疫学および臨床成績について全国調査を行った。(詳細は稲富の分担研究報告を参照)

C. 研究結果

研究代表者の川崎は昨年度に膠様滴状角膜変性症のモデル細胞として膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および上皮細胞の不死化細胞の樹立に成功した。今年度はこの不死化細胞

を用いてレンチウイルスによる遺伝子治療の可能性について検討した。結果として、野生型 TACSTD2 遺伝子を膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および上皮細胞の不死化細胞に遺伝子導入すると、クローディン1および7の発現量の増加と細胞内局在の正常化が認められた。しかしながら上皮バリア機能についてはわずかな改善しか認められず、その原因として、導入遺伝子の発現量が細胞毎に大きくばらついていることが考えられた。FACSによるソーティングによってこの点は解決できる可能性がある。

研究分担者の村上は昨年度よりコンタクトレンズを用いて本疾患の原因遺伝子である TACSTD2 遺伝子をプラスミドの形で患者角膜に継続的に移入することを検討している。ソフトコンタクトレンズはリン酸基を側鎖に有するハイドロゲルからなり

(P-CL)、DNA と結合し、徐放効果を示す。研究代表者の川崎が樹立した膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および上皮細胞の不死化細胞に対し、野生型 TACSTD2 遺伝子を発現するプラスミドを P-CL に含侵させて遺伝子導入した。結果として研究代表者の川崎がレンチウイルスで確認したのと同様の結果、すなわちクローディン1および7タンパクの発現量の増加と細胞内局在の正常化を認めた。一般的には上皮細胞は線維芽細胞などの間葉系細胞よりも遺伝子導入効率が悪いために裸のプラスミドを与えただけでは高い遺伝子導入効率が得られないこと

が多い。ソフトコンタクトレンズが徐放の足場として働いたためにこのような高い遺伝子導入効率が得られたものと考えられる。

研究分担者の辻川は実際の角膜上皮再生治療に使われる角膜上皮ないし口腔粘膜上皮シートにおける TACSTD2 遺伝子の発現について、ヒトとウサギで検討した。結果として、角膜上皮ないし口腔粘膜上皮シートにおける TACSTD2 遺伝子の発現は *in vivo* における発現の 1/10 程度に減少していた。このことは臨床で使用する角膜上皮ないし口腔粘膜上皮シートの上皮バリア機能が弱いことと関係しているものと考えられた。

研究分担者の天野は全層角膜移植を行った膠様滴状角膜変性症に対し swept source 型前眼部光干渉断層計 SS-1000, CASIA (TOMEY 社) による検査を行い、角膜体積測定を行った。本装置は角膜混濁眼の撮像が可能であるという特性があり、膠様滴状角膜変性症のような角膜混濁眼でも角膜厚や角膜体積の測定を行うことができ、手術成績のさらなる詳細な検討が可能となるものと考えられる。

研究分担者の稲富は膠様滴状角膜変性症患者の疫学および臨床成績について全国調査を行った。一昨年度に行った研究班の4施設の結果とは大局的には同質であったと言えるが、手術成績などについては、研究班の4施設よりも不良な傾向がみられた。

D. 考按

本研究によって膠様滴状角膜変性症患者に対し遺伝子治療が効果的である可能性が示唆された。野生型 TACSTD2 遺伝子をレンチウイルスにて遺伝子導入するとクローディン1および7タンパクの発現量と細胞内局在が概ね正常化し、生化学的レベルでは遺伝子治療は効果的であると考えられた。しかしながら上皮バリア機能はわずかしか改善が得られず、治療レベルには程遠い結果となった。今後の課題としては、FACS による選択的ソーティングを用いることでこのことは解決できる可能性があると考えられた。

本疾患に対する遺伝子治療のもう一つのアプローチとして、プラスミドによる遺伝子治療の可能性を昨年度にも検討していた。今年度は昨年度に樹立した膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞を用いて、プラスミドによる遺伝子治療の効果を実際に検討した。昨年と同様、プラスミドを徐放させる目的でソフトコンタクトレンズをキャリアに用いている。結果として、レンチウイルスによる遺伝子治療で認められたように、野生型 TACSTD2 遺伝子を発現するプラスミドによる遺伝子治療によっても、クローディン1および7タンパクの発現量の増加と細胞内局在の正常化が得られた。しかしながら上皮バリア機能が改善するかどうかについては検討できていない。

レンチウイルスはゲノムにインテグレーションされるために、癌遺伝子の近位に挿入された場合は癌遺伝子の発現を強く亢進させることがあり、また癌抑制遺伝子の内部に挿入された場合は癌抑制遺伝子を破壊することがあり、癌発生に関わる可能性があると考えられている。そのため、より安全

であると考えられるプラスミドによる遺伝子治療は安全性の観点から望ましいオプションであると考えられる。通常、プラスミドを点眼しただけでは角膜上皮細胞への遺伝子導入はほとんど得られないものと考えられる。ソフトコンタクトレンズにプラスミドを静電的に結合させ徐放させることでレンチウイルスに匹敵するほどの遺伝子導入効率を得られたことは極めて画期的であると言える。

当初考えていたプロテアソーム阻害剤による治療可能性について、今年度も膠様滴状角膜変性症患者由来の角膜および結膜上皮細胞の不死化細胞を用いて検討を試みたが、プロテアソーム阻害剤の最低有効濃度でも細胞毒性によって細胞が死に絶えたために検討することができなかった。

全国調査については疫学的には一昨年度に行った研究班4施設における結果とほぼ同様であった。手術成績などについては、研究班4施設とは異なる治療手段を用いている場合が多く、再発率が高い傾向がみられた。

E. 結論

膠様滴状角膜変性症患者由来の不死

化ヒト角膜および結膜上皮細胞を用いて遺伝子治療の可能性について検討した。生化学的レベルでは遺伝子治療はレンチウイルスでもプラスミドによってもかなり効果的であると考えられた。しかしながら上皮バリア機能のレベルではわずかな改善にとどまり、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成24年度）

論文発表

巻末研究成果一覧表参照

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

[V]

診断基準

膠状滴状角膜ジストロフィ診断基準

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

課題「膠様滴状角膜変性症の標準的治療レジメンの確立と新規治療法の創出」に関する研究による成果物
京都府立医科大学、順天堂大学、大阪大学、東京大学 眼科学教室による合同研究（2012年度改訂版）

- 疾患名：膠状滴状角膜ジストロフィ、膠状滴状角膜変性症、Gelatinous Drop-Like Dystrophy
- 疾患概念：TACSTD2 遺伝子の機能喪失性変異によって角膜上皮下から実質にアミロイドが沈着する疾患。
- 診断基準
 1. 臨床所見
 - ① 両眼性 注1
 - ② 角膜実質沈着物 注2
 - i. 灰白色隆起上の角膜上皮下沈着物（Typical mulberry type）
 - ii. Band keratopathy 様の角膜上皮下カルシウム沈着（Band keratopathy type）
 - iii. 角膜実質混濁（Stromal opacity type）
 - iv. 角膜実質に黄色物質の沈着（Kumquat-like type）
 - ③ フルオレセインによる角膜上皮透過性の亢進
 2. 症状
 - ① 羞明
 - ② 異物感
 - ③ 流涙
 - ④ 視力低下
 3. 家族歴・遺伝子異常
 - ① 常染色体劣性遺伝を示す。（いとこ婚などの血族結婚が約半数に見られる。）
 - ② TACSTD2 遺伝子（かつてはM1S1 やTrop2 などとも呼ばれていた。）に異常を認める。

注1：片眼性あるいは左右で程度に著明な差のある症例がまれに存在する。

注2：括弧内は Ide らの報告（Ide T et al., Am J Ophthalmol. 2004, 1081-4）の臨床分類を示す。Typical mulberry type と Band keratopathy type が症例の大半を占める。

[VI]

治療指針

膠様滴状角膜ジストロフィ治療指針

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

課題「膠様滴状角膜変性症の標準的治療レジメンの確立と新規治療法の創出」に関する研究による成果物
京都府立医科大学、順天堂大学、大阪大学、東京大学 眼科学教室による合同研究（2012年度改正版）

1. 疾患

膠様滴状角膜ジストロフィ（膠様滴状角膜変性症、Gelatinous drop-like dystrophy）は常染色体劣性遺伝形式の遺伝性角膜ジストロフィで、10歳代に角膜上皮下にアミロイドが沈着し、著しい視力低下を来す疾患である。原因遺伝子は Tumor associated calcium transducer 2 (TACSTD2) で、この遺伝子の機能喪失型変異によってタイトジャンクションの形成不全が生じるため、涙液中のラクトフェリンが角膜内に侵入しアミロイドを形成すると考えられている。視力不良患者には視力改善の目的で角膜移植術が行われるが、高率に再発するため度重なる移植手術が余儀なくされる症例が少なくない。

2. 治療原則

現時点では膠様滴状角膜ジストロフィを完治させる治療法はない。そのため治療の目標は膠様滴状角膜ジストロフィの進行を遅らせる、視力が低下した場合には手術等の処置で改善させる、手術治療後の再発抑制を行う等によって失明を予防し患者の生涯にわたる QOL を維持することにある。以下に示すように疾患の進行程度に合わせて適切な術式を選択すべきであるが、基本的な考え方としては、できうる限り侵襲の少ない術式を選択し、合併症の多い全層角膜移植術をなるべく回避するような治療計画を立てることが肝要となる。またソフトコンタクトレンズの装用に角膜移植後の再発を有意に遅らせる効果があることが明らかとなっており、これを積極的に用いることが推奨される。

3. 治療指針

(ア) 手術治療

- ① 透過性亢進のみまたは視力低下がないか、ごく初期の膠様滴状角膜ジストロフィに対する治療現時点でその効果は明かとなっていないが、ソフトコンタクトレンズに疾患進行抑制効果がある可能性があり、これを用いることが推奨される。
- ② 軽症に対する治療 注1
軽症例には治療的表層角膜切除術 (Phototherapeutic keratectomy, PTK) を使用して角膜アミロイドを部分切除する方法が推奨される。
- ③ 中等症に対する治療 注2
治療的表層角膜切除術では取り除けない程アミロイド沈着が強い場合や、角膜実質混濁が強い場合は表層角膜移植術 (Lamellar keratoplasty, LKP) を行い、特に全層の角膜混濁を呈する症例には深層表層角膜移植術 (Deep anterior keratoplasty, DALK) を行う。
- ④ 重症 (全層角膜移植術の既往のある場合、DALK の手術中にデスメ膜穿孔を来した場合や重度の視力低下を呈する症例) に対する治療 注2、注3
全層角膜移植術 (Penetrating keratoplasty, PKP) の術後には緑内障を来しやすいことが知られており、そのため可能な限り中等症までの治療にとどめ、全層角膜移植術はなるべく回避することが望まれる。しかし既に全層角膜移植術の既往のある場合、DALK の手術中にデスメ膜穿孔を来した場合や角膜混濁程度が強く LKP または DALK による視機能改善が期待できない場合には全層角膜移植術が必要となる。

(イ) 手術後の再発予防に対する長期的治療

すべての手術後においてソフトコンタクトレンズの連続装用を強く推奨する。就眠中も連続使用させる方が再発予防効果が高いと考えられる。また感染予防と炎症抑制を目的として、抗生剤点眼と低濃度ステロイド点眼剤を併用することが望ましい。

注1：アミロイド沈着による突出が少ない場合は、照射径を小さくして沈着部位毎に切除するが、突出が多い場合には機械的搔爬とレーザー照射を併用する。術後は感染予防、炎症抑制のために抗生剤点眼剤と低濃度ステロイド剤を漸減しながら3ヶ月程度使用する。

注2：移植片由来の正常角膜上皮が再発抑制効果をもつため、可能な限り角膜上皮の状態が良好な新鮮ドナー角膜を用いる事が望ましい。また術後には抗炎症治療として経口ステロイド（リンデロン1-2mg/日程度）を2週間程度行うとともに感染予防、炎症抑制のために局所投与として抗生剤点眼剤とステロイド点眼剤を長期的に使用する。

注3：術後に緑内障を合併することが多いため眼圧の推移には十分注意し、眼圧上昇が見られる場合にはステロイド剤を中止して免疫抑制剤への変更を考慮する。

[VII]

研究成果の刊行に関する一覧表

平成 22 年度 論文一覽

1. Fukuoka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Matsuda A, Fukumoto A, Murakami A, et al. Lattice corneal dystrophy type IV (p.Leu527Arg) is caused by a founder mutation of the TGFBI gene in a single Japanese ancestor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;519:4523-30.
2. Kawasaki S, Yagi H, Yamasaki K, Matsuda A, Takeda K, Kinoshita S. A novel mutation of the TGFBI gene causing a lattice corneal dystrophy with deep stromal involvement. *Br J Ophthalmol.* 2011;951:150-1.
3. Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, Fukuoka H, Matsuda A, Tsujikawa M, et al. Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Am J Pathol.* 2010;1773:1344-55.
4. Ebihara N, Ohtomo K, Tokura T, Ushio H, Murakami A. Effect of Tacrolimus on Chemokine Production by Corneal Myofibroblasts via Toll-Like Receptors, Compared With Cyclosporine and Dexamethasone. *Cornea.* 2011;
5. Ohtomo K, Ebihara N, Matsuda A, Tokura T, Funaki T, Murakami A. Role of TGF-beta in tissue eosinophilia associated with vernal keratoconjunctivitis. *Exp Eye Res.* 2010;915:748-54.
6. Yamaguchi M, Ebihara N, Shima N, Kimoto M, Funaki T, Yokoo S, et al. Adhesion, migration, and proliferation of cultured human corneal endothelial cells by laminin-5. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;522:679-84.
7. Duncan TJ, Tanaka Y, Shi D, Kubota A, Quantock AJ, Nishida K. Flow-manipulated, crosslinked collagen gels for use as corneal equivalents. *Biomaterials.* 2010;3134:8996-9005.
8. Nishida K, Kamei M, Du ZJ, Xie P, Yamamoto T, Suzuki M, et al. Safety threshold of intravitreal activated protein-C. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010;
9. Oie Y, Hayashi R, Takagi R, Yamato M, Takayanagi H, Tano Y, et al. A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol.* 2010;949:1244-50.
10. Tsujikawa M, Maeda N, Tsujikawa K, Hori Y, Inoue T, Nishida K. Chromosomal sharing in atypical cases of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Jpn J Ophthalmol.* 2010;545:494-8.
11. Watanabe R, Nakazawa T, Yokokura S, Kubota A, Kubota H, Nishida K. Fluoroquinolone antibacterial eye drops: effects on normal human corneal epithelium, stroma, and endothelium. *Clin Ophthalmol.* 2010;41181-7.
12. Higashihara H, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. The blood-aqueous barrier breakdown in eyes with endothelial decompensation after argon laser iridotomy. *Br J Ophthalmol.* 2011;
13. Nakamura T, Sotozono C, Bentley AJ, Mano S, Inatomi T, Koizumi N, et al. Long-term phenotypic study after allogeneic cultivated corneal limbal epithelial transplantation for severe ocular surface diseases. *Ophthalmology.* 2010;11712:2247-2254 e1.
14. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2010;
15. Sasaki M, Sotozono C, Chihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, et al. [Characteristic appearance of early-stage Acanthamoeba keratitis]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 2010;11412:1030-5.

平成23年度 論文一覽

1. Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, Matsuda H, Murakami A. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;5212:8549-57.
2. Fukuda R, Usui T, Tomidokoro A, Mishima K, Matagi N, Miyai T, et al. Noninvasive observations of peripheral angle in eyes after penetrating keratoplasty using anterior segment fourier-domain optical coherence tomography. *Cornea.* 2012;313:259-63.
3. Hatou S, Shimmura S, Shimazaki J, Usui T, Amano S, Yokogawa H, et al. Mathematical projection model of visual loss due to fuchs corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;5211:7888-93.
4. Higashihara H, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. The blood-aqueous barrier breakdown in eyes with endothelial decompensation after argon laser iridotomy. *Br J Ophthalmol.* 2011;957:1032-4.
5. Hori K, Matsuda A, Ebihara N, Imai K, Mori K, Funaki T, et al. Involvement of plasminogen activator inhibitor-1 in the pathogenesis of atopic cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;534:1846-51.
6. Inomata T, Ebihara N, Funaki T, Matsuda A, Watanabe Y, Ning L, et al. Perlecan-deficient mutation impairs corneal epithelial structure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;533:1277-84.
7. Iwamoto S, Ebihara N, Hori K, Funaki T, Asada Y, Yokoi N, et al. Filaggrin mutations are not associated with chronic allergic keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol.* 2012;969:1272-3.
8. Kawasaki S, Kinoshita S. Clinical and basic aspects of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Dev Ophthalmol.* 2011;4897-115.
9. Kawasaki S, Yagi H, Yamasaki K, Matsuda A, Takeda K, Kinoshita S. A novel mutation of the TGFBI gene causing a lattice corneal dystrophy with deep stromal involvement. *Br J Ophthalmol.* 2011;951:150-1.
10. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2011;957:942-6.
11. Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, Fukuoka H, Matsuda A, Nishida K, et al. Two novel mutations of TACSTD2 found in three Japanese gelatinous drop-like corneal dystrophy families with their aberrant subcellular localization. *Mol Vis.* 2011;17965-70.
12. Sasamoto Y, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Effect of 1-year lutein supplementation on macular pigment optical density and visual function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;24912:1847-54.
13. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H, Du ZJ, Xie P, Matsumura N, et al. Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. *J Cell Sci.* 2012;125Pt 10:2407-15.
14. Takeda K, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Watanabe A, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using the combination of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation and eyelid surgery for severe ocular surface disease. *Am J Ophthalmol.* 2011;1522:195-201 e1.
15. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. Prostaglandin E receptor subtype EP3 expression in human conjunctival epithelium and its changes in various ocular surface disorders. *PLoS One.* 2011;69:e25209.
16. Wakabayashi T, Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Intravitreal bevacizumab for exudative branching vascular networks in polypoidal choroidal vasculopathy. *Br J Ophthalmol.* 2012;963:394-9.

平成24年度 論文一覽

1. Fukuda R, Usui T, Miyai T, Mori Y, Miyata K, Amano S. Corneal thickness and volume measurements by swept source anterior segment optical coherence tomography in normal subjects. *Curr Eye Res.* 2013;385:531-6.
2. Hieda O, Kawasaki S, Wakimasu K, Yamasaki K, Inatomi T, Kinoshita S. Clinical outcomes of phototherapeutic keratectomy in eyes with Thiel-Behnke corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol.* 2013;1551:66-72 e1.
3. Hino T, Sotozono C, Inatomi T, Fukuoka H, Nakamura T, Nagata M, et al. [Indications and surgical outcomes of amniotic membrane transplantation]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 2012;1164:374-8.
4. Iwamoto S, Asada Y, Ebihara N, Hori K, Okayama Y, Kashiwakura J, et al. Interaction between conjunctival epithelial cells and mast cells induces CCL2 expression and piecemeal degranulation in mast cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;544:2465-73.
5. Kawasaki S, Yamasaki K, Nakagawa H, Shinomiya K, Nakatsukasa M, Nakai Y, et al. A novel mutation (p.Glu1389AspfsX16) of the phosphoinositide kinase, FYVE finger containing gene found in a Japanese patient with fleck corneal dystrophy. *Mol Vis.* 2012;182954-60.
6. Kinoshita S, Kawasaki S, Kitazawa K, Shinomiya K. Establishment Of A Human Conjunctival Epithelial Cell Line Lacking The Functional TACSTD2 Gene. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2012;110166-177.
7. Shinomiya K, Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Yokoi N, Koizumi N, et al. Immunohistochemical analysis of inflammatory limbal conjunctiva adjacent to Mooren's ulcer. *Br J Ophthalmol.* 2013;973:362-6.
8. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Yokoi N, Ueta M, et al. Visual improvement after cultivated oral mucosal epithelial transplantation. *Ophthalmology.* 2013;1201:193-200.
9. Tsujikawa M. Gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Cornea.* 2012;31 Suppl 1S37-40.
10. Ueta M, Sotozono C, Yamada K, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. Expression of prostaglandin E receptor subtype EP4 in conjunctival epithelium of patients with ocular surface disorders: case-control study. *BMJ Open.* 2012;25:

[VIII]

代表的な研究成果の刊行物・別刷

Molecular Pathogenesis of Genetic and Inherited Diseases

Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 2 Is Required for the Proper Subcellular Localization of Claudin 1 and 7

Implications in the Pathogenesis of Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy

Mina Nakatsukasa,* Satoshi Kawasaki,*
Kenta Yamasaki,* Hideki Fukuoka,*
Akira Matsuda,† Motokazu Tsujikawa,‡
Hidetoshi Tanioka,* Maho Nagata-Takaoka,*
Junji Hamuro,* and Shigeru Kinoshita*

From the Department of Ophthalmology,* Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto; the Department of Ophthalmology,† Osaka University, Osaka; and the Department of Ophthalmology,‡ Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Gelatinous drop-like dystrophy (GDL) is a rare autosomal recessive form of corneal dystrophy characterized by subepithelial amyloid depositions on the cornea. Previous clinical and laboratory observations have strongly suggested that epithelial barrier function is significantly decreased in GDL. Despite the decade-old identification of the tumor-associated calcium signal transducer 2 (*TACSTD2*) gene as a causative gene for GDL, the mechanism by which the loss of function of this causative gene leads to the pathological consequence of this disease remains unknown. In this study, we investigated the functional relationship between the *TACSTD2* gene and epithelial barrier function. Through the use of immunoprecipitation and a proximity ligation assay, we obtained evidence that the *TACSTD2* protein directly binds to claudin 1 and 7 proteins. In addition, the loss of function of the *TACSTD2* gene leads to decreased expression and change in the subcellular localization of tight junction-related proteins, including claudin 1, 4, 7, and ZO1 and occludin, both in diseased cornea and cultured corneal epithelial cells. These results indicate that loss of function of the *TACSTD2* gene impairs epithelial barrier function through decreased expres-

sion and altered subcellular localization of tight junction-related proteins in GDL corneas. (*Am J Pathol* 2010, 177:1344–1355; DOI: 10.2353/ajpath.2010.100149)

Gelatinous drop-like corneal dystrophy (GDL) has been reported as an uncommon, autosomal recessive disease, characterized by bilateral corneal amyloidosis.¹ To date, this disease is still quite rare in many countries, whereas it is relatively common in Japan, with a prevalence rate of 1 in 31,546 estimated from the frequency of parental consanguinity.^{2,3} During the first decade, GDL patients develop subepithelial nodular amyloid depositions that result in severe photophobia, lacrimation, and an ocular foreign body sensation.^{4,5} With age, the amyloid depositions typically enlarge, increase in number, coalesce with each other, and exhibit a mulberry-like appearance, thus leading to severe bilateral vision loss usually beginning within the third decade of their lives. The tumor-associated calcium signal transducer 2 (*TACSTD2*) has been identified as a causative gene for GDL.^{6,7}

We previously reported that the corneal epithelium of GDL has significantly increased permeability for fluorescence⁸ and horseradish peroxidase⁹ and that the apical side of the corneal epithelium of GDL exhibited

Supported by a grant-in-aid (21592238) from the Japanese Ministry of Education, Science, Culture, and Sports. This work was also supported by a research fund from the Kyoto Foundation for the Promotion of Medical Science.

Accepted for publication April 29, 2010.

Supplemental material for this article can be found on <http://ajp.amjpathol.org>.

Address reprint requests to Satoshi Kawasaki, M.D., Ph.D., Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Hirokoji-agaru, Kawaramachi-dori, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan. E-mail: bluenova@koto.kpu-m.ac.jp.

loosened cell-to-cell junctions and an increased number of scarred cells compared with that of normal cornea.⁸ Furthermore, we have recently shown that the most apical side of the lateral membrane of the superficial cells did not express claudin (CLDN)1, ZO1 (tight junction protein 1 (TJP1)), and occludin (OCLN) proteins in GDLN corneas.¹⁰ These findings strongly suggest that the epithelial barrier function may be compromised in GDLN corneas, thereby allowing the formation of amyloid depositions through permeation of tear lactoferrin^{11,12} or apolipoprotein.¹³ However, the exact molecular mechanisms by which the TACSTD2 protein affects the epithelial barrier function have yet to be elucidated.

In this study, we sought to shed a light on the presumed role of the TACSTD2 gene in the epithelial barrier function. We found that the TACSTD2 protein directly binds to CLDN1 and 7 proteins and that the functional loss of the TACSTD2 gene leads to decreased expression and altered subcellular localization of the TJ-related proteins. From these findings we conclude that the loss of function of the TACSTD2 gene impairs epithelial barrier function through the functional change of the TJ-related proteins in GDLN corneas.

Materials and Methods

Ethical Issues

All experimental procedures were approved by the Institutional Review Board for Human Studies at Kyoto Prefectural University of Medicine. Prior informed consent was obtained from all patients after a detailed explanation of the study protocols, and this study was performed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki for research involving human subjects.

Biohazard

For the production and the use of the lentivirus vector, we used a P2 level biohazard room after obtaining permission from the Institutional Review Board for Studies in Gene Recombination at Kyoto Prefectural University of Medicine.

Antibodies

All antibodies were raised against human antigens. Primary antibodies used in this study included anti-CLDN1 (mouse monoclonal (MM) IgG₂, clone 1C5-D9; Abnova, Taipei, Taiwan), CLDN4 (MM IgG₁, clone 3E2C1; Zymed Laboratories, San Francisco, CA), CLDN7 (MM IgG₂a, clone 5D10F3; Zymed Laboratories), TACSTD2 (MM IgG₂a, clone 77220 or goat polyclonal; R&D Systems, Minneapolis, MN), TJP1 (MM IgG₁, clone ZO1-1A12; Invitrogen, Carlsbad, CA), OCLN (goat polyclonal IgG, sc-8145; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), desmoplakin (MM IgG₂b, clone DP I/II 236.23.1; PROGEN, Heidelberg, Germany), desmocollin (MM IgG₁, clone 3G130; LifeSpan BioSciences, Seattle, WA), desmoglein (MM IgG₁, clone G129; American Research Products, Belmont, MA), and goldin-97 (MM IgG₁, clone CDF4;

Invitrogen Corp.). For isotype control, normal mouse IgG₁ (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), normal mouse IgG₂a (Ansell, Bayport, MN) normal mouse IgG₂b (DakoCytomation), or normal goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) were used.

Oligomers

All oligomers used in this study were synthesized by the Invitrogen (Table 1).

Tissue Preparation

Normal corneal tissues were obtained from Northwest Lions Eye Bank (Seattle, WA). GDLN corneas ($n = 4$, all bearing a p.118Q>X mutation) were obtained at the time of penetrating keratoplasty surgery. Normal tissues were obtained from skin, pharynx, esophagus, stomach, small intestine, colon, bladder, uterine cervix, and vagina during various kinds of surgery. These tissues were embedded in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek OCT; Sakura Fine Technical, Tokyo, Japan) and snap-frozen with liquid nitrogen and stored in a -80°C freezer.

Cell Culture

SV40 immortalized human corneal epithelial (HCE-T) cells¹⁴ were subcultured every 4 days and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 containing 200 U/ml penicillin and streptomycin, 10% fetal bovine serum (Mediatech, Herndon, VA), 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cholera toxin (List Biological Laboratories, Campbell, CA), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 10 ng/ml human epidermal growth factor (Invitrogen).¹⁵ HeLa cells and 293T cells were subcultured every 4 days and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum. The HCE-T cells were further subcloned by a limiting dilution method as reported previously.¹⁶

Laser Microdissection

Epithelial cells were microdissected from 10- μm -thick cryosections of GDLN or normal corneal tissues using a laser microdissection system (LMD3100; Leica, Wetzlar, Germany) to avoid any contamination by nonepithelial cells.

RNA Extraction and cDNA Synthesis

RNA was extracted from the cultured cells and the microdissected epithelial cells using a commercial column-based extraction kit (RNeasy Mini or RNeasy Micro kit; Qiagen, Hilden, Germany). The RNAs were reverse transcribed in a buffer containing 10 U/ μl recombinant reverse transcriptase (Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ of a random primer.

Table 1. List of the Oligomers Used in This Study

Primer	Target	Purpose	Direction	Sequence
TACSTD2_qPCR_F	TACSTD2	qPCR	Forward	5'-CCTGAACGCAGTTTGGATGTC-3'
TACSTD2_qPCR_R			Reverse	5'-GTAAGGGCAAGCTGAAGAATAAATAGA-3'
CLDN1_qPCR_F	CLDN1	qPCR	Forward	5'-CAGTCAATGCCAGGTACGAATTT-3'
CLDN1_qPCR_R			Reverse	5'-AAAGTAGGCACCTCCCAGAA-3'
CLDN4_qPCR_F	CLDN4	qPCR	Forward	5'-GCTGGCTTGCGCATCAG-3'
CLDN4_qPCR_R			Reverse	5'-ACGACTTAACGTTFCGAGAGT-3'
CLDN7_qPCR_F	CLDN7	qPCR	Forward	5'-ACAAAGTGAAGAAGGCCCGTATAG-3'
CLDN7_qPCR_R			Reverse	5'-GCTACCAAGGCGCAAGAC-3'
TACSTD2_exp_F	TACSTD2	Expression	Forward	5'-TTCTCCGCCCCACCATGGCTC-3'
TACSTD2_exp_R			Reverse	5'-GTAGGTACCCGGCGGGCAG-3'
CLDN1_exp_F	CLDN1	Expression	Forward	5'-CGAGTCATGGCCAAACnCGGGGGCTG-3'
CLDN1_exp_R			Reverse	5'-CTTTTGCCTCTGTGTACACAGTAG-3'
CLDN4_exp_F	CLDN4	Expression	Forward	5'-CTGAACAATGGCCCTCCATGGGGCTA-3'
CLDN4_exp_R			Reverse	5'-GAGGAACAGAGTGGAGCCGTGGCAC-3'
CLDN7_exp_F	CLDN7	Expression	Forward	5'-GGCGGAAATGGCCAATTCGGGCCCTG-3'
CLDN7_exp_R			Reverse	5'-GCCTGTCAGGCTGGGGCAAGGAGAT-3'
TACSTD2_shRNA_1_F	TACSTD2	shRNA	Forward	5'-CCGGCGTGGACAACGATGGCCTCTACTC GAGTAGAGGCCATCGTTGTCCACGTTTTTG-3'
TACSTD2_shRNA_1_R			Reverse	5'-AATTCAAAAACGTGGACAACGATGGCCTCT ACTCGAGTAGAGGCCATCGTTGTCCACG-3'
TACSTD2_shRNA_3_F	TACSTD2	shRNA	Forward	5'-CCGGCTACTTCGAGAGGGACATCAAC TCGAGTTGATGTCCCTCTCGAAGTAGTTTTTG-3'
TACSTD2_shRNA_3_R			Reverse	5'-AATTCAAAACTACTTCGAGAGGGACAT CAACTCGAGTTGATGTCCCTCTCGAAGTAG-3'
CLDN1_shRNA_1_F	CLDN1	shRNA	Forward	5'-CCGGGCAAAGTCTTTGACTCCTTGCCCTCG AGGCAAGGAGTCAAAGACTTTGCTTTTTG-3'
CLDN1_shRNA_1_R			Reverse	5'-AATTCAAAAAGCAAAGTCTTTGACTCCTT GCCTCGAGGCAAGGAGTCAAAGACTTTGC-3'
CLDN1_shRNA_4_F	CLDN1	shRNA	Forward	5'-CCGGGCCACAAGACCTAGCCTAATTTCTCGA GAATTAGGCTAGGCTTTGTGGCTTTTTG-3'
CLDN1_shRNA_4_R			Reverse	5'-AATTCAAAAAGCCACAAGACCTAGCCTAAT CTCGAGAATTAGGCTAGGCTTTGTGGC-3'
CLDN1_shRNA_6_F	CLDN1	shRNA	Forward	5'-CCGGGCATCGTTATTAAGCCCTTATCTC GAGATAAGGGCTTAATAACGATGCTTTTTG-3'
CLDN1_shRNA_6_R			Reverse	5'-AATTCAAAAAGCATCGTTATTAAGCCCTTATC TCGAGATAAGGGCTTAATAACGATGC-3'
CLDN4_shRNA_1_F	CLDN4	shRNA	Forward	5'-CCGGGCAACATTTGCACCTCGCAGACTC GAGTCTGCGAGGTGACAATGTTGCTTTTTG-3'
CLDN4_shRNA_1_R			Reverse	5'-AATTCAAAAAGCAACATTTGCACCTCGCAGA CTCGAGTCTGCGAGGTGACAATGTTGC-3'
CLDN4_shRNA_3_F	CLDN4	shRNA	Forward	5'-CCGGCCACAACATCATCCAAGACTTCTCGA GAAGTCTTGGATGATGTTGTGGTTTTTG-3'
CLDN4_shRNA_3_R			Reverse	5'-AATTCAAAAACCAACATCATCCAAGAC TTCTCGAGAAGTCTTGGATGATGTTGTGG-3'
CLDN4_shRNA_4_F	CLDN4	shRNA	Forward	5'-CCGGCCAAGTATTCTGCTGCCCGCTCTC GAGAGCGGCAGCAGAATACTTGGTTTTTG-3'
CLDN4_shRNA_4_R			Reverse	5'-AATTCAAAAACCAAGTATTCTGCTGCC GCTCTCGAGAGCGGCAGCAGAATACTTGG-3'
CLDN7_shRNA_1_F	CLDN7	shRNA	Forward	5'-CCGGGAGTCTCTATGCGGGTGACAATC GAGTTGTACCCGCATAGGAGCTCTTTTTG-3'
CLDN7_shRNA_1_R			Reverse	5'-AATGAGTCTCTATGCGGGTGACAATC AGTTGTACCCGCATAGGAGCTCTTTTTG-3'
CLDN7_shRNA_3_F	CLDN7	shRNA	Forward	5'-CCGGCCATCAGATTGTACAGACTTCTCG AGAAGTCTGTGACAATCTGATGGTTTTTG-3'
CLDN7_shRNA_3_R			Reverse	5'-AATTCAAAAACCATCAGATTGTACAGAC TTCTCGAGAAGTCTGTGACAATCTGATGG-3'
CLDN7_shRNA_4_F	CLDN7	shRNA	Forward	5'-CCGGCCCTTTGATCCCTACCAACATCTCG AGATGTTGGTAGGGATCAAAGGGTTTTTG-3'
CLDN7_shRNA_4_R			Reverse	5'-AATTCAAAAACCCCTTTGATCCCTACCAACA TCTCGAGATGTTGGTAGGGATCAAAGGG-3'
pLKO_seq_F	pLKO.1	Sequencing	Forward	5'-TTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTT-3'
pLKO_seq_R			Reverse	5'-ACTATTCTTTCCCTGCACTGT-3'
CMV_seq_F	pLenti6.3	Sequencing	Forward	5'-CGAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
V5_seq_R			Reverse	5'-ACCGAGGAGAGGTTAGGGAT-3'
TACSTD2_seq_3_F	TACSTD2	Sequencing	Forward	5'-CCTGCAGACCATCCAGACG-3'
TACSTD2_seq_3_R			Reverse	5'-CAGGAAGCGTGACTCACTTG-3'

Quantitative PCR

Quantitative PCR (qPCR) was performed using a real-time PCR machine (ABI Prism 7000 Sequence Detection System; Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's guidelines. Briefly, cDNAs were amplified using 10 pmol of primer pairs designed for each purpose in a 20- μ l reaction buffer containing a 2 \times reaction mix (Power SYBR Green PCR Master Mix; Applied Biosystems). The thermal cycle was 40 cycles of denaturation-annealing/elongation steps at 95°C and 60°C, respectively. The relative expression of each gene in each sample was calculated by the formula $2^{(Ct_{GAPDH} - Ct_{gene})}$, where the Ct_{GAPDH} is the cycle over the threshold for the GAPDH gene and the Ct_{gene} is the cycle over the threshold for each of the specific genes.

Sequencing Analysis

Sequencing analysis was performed using a commercial kit (BigDye 3.1; Applied Biosystems). Briefly, the PCR product or plasmid DNA was bidirectionally sequenced in a 20- μ l reaction buffer containing a 2 \times sequencing mixture and a primer designed for each purpose. After ethanol precipitation, the sequence products were electrophoresed on an automated capillary sequencer (Gene analyzer 3130xl; Applied Biosystems).

Short Hairpin RNA Vector Construction

For the construction of the lentivirus plasmid vector that expresses short hairpin RNA (shRNA), we used a commercial lentiviral vector (pLKO.1; Sigma-Aldrich). Briefly, pairs of oligomers designed for shRNA expression were annealed and ligated into the *AgeI/EcoRI*-digested lentivirus plasmid vector.

Expression Vector Construction

For the construction of the lentivirus plasmid vector that expresses a gene of interest, we used a commercial lentiviral vector (pLenti6.3_V5-TOPO; Invitrogen). Briefly, cDNAs were amplified with a primer pair encompassing an entire coding sequence of a specific gene, gel-purified, and ligated into the lentivirus plasmid vector.

Transformation, Propagation, and Plasmid Extraction

The recombinant plasmid vector for either shRNA or protein expression was transformed into competent *Escherichia coli* cells (Competent high JM109; Toyobo, Osaka, Japan), plated on an Luria-Bertani-agar plate, propagated overnight, screened by colony-direct PCR, and then sequenced. The clone that was confirmed to have a non-mutated insert was largely propagated in a liquid Luria-Bertani medium and its harboring plasmid DNA was extracted using a commercial, transfection-grade,

column-based extraction kit (NucleoBond; Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Lentivirus Production and Infection

The 293T cells were seeded on a gelatin-coated T25 plastic flask at a density of 40,000 cells/cm². The lentivirus plasmid DNA (1750 ng) was transfected to the 293T cells along with an equal amount of packaging plasmid mixture (MISSION Lentiviral Packaging Mix; Sigma-Aldrich), which contains pMISSIONgagpol and pMISSIONsvg, respectively encoding gag/pol and env virus proteins using 12 μ l of a commercial transfection reagent (Fugene HD; Roche Diagnostics). Two days after the transfection, the culture supernatant containing the infection-competent virus particle was harvested. The supernatant was applied onto the HCE-T cells or the HeLa cells in the presence of 10 to 20 μ g/ml polybrene.

Immunostaining Analysis

Tissue sections placed on glass slides or cells grown on a commercial culture-glass slide (Nunc Lab-Tek Chamber Slide System; Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) were fixed with Zamboni fixative or 95% ice-cold ethanol, blocked with 1% skim milk, and then incubated overnight with a primary antibody at 4°C. After being washed with 0.01 M PBS, the samples were incubated with a secondary antibody (Alexa Fluor 488-labeled anti-mouse or anti-goat IgG; Invitrogen) at room temperature for 1 hour. After being washed again with 0.01 M PBS, the sections or the cells were counterstained with propidium iodide, mounted, covered with coverslips, and observed and photographed by use of a fluorescence microscope (AX70 TRF; Olympus, Tokyo, Japan) or a confocal laser scanning microscope (TCS-SP2; Leica). For all experiments, we performed control experiments using isotype-negative controls corresponding to each of the primary antibodies.

Measurement of Transepithelial Resistance

HCE-T cells were cultured in a 12-well Transwell (12-mm Transwell with a 0.4- μ m Pore Polyester Membrane Insert; Corning, Corning, NY). Resistance between upper and lower chambers of the Transwell was measured with the use of a volt-ohm meter (EVOM; World Precision Instruments, Sarasota, FL), and transepithelial resistance (TER) was calculated by multiplying the measured resistance (ohm) by the growth area of the Transwell filter (1.12 cm²). The background resistance due to the filter alone was subtracted from each of the obtained data.

Immunoelectron Microscopy

The postembedding labeling method was used to analyze the ultramicroscopic distribution of the TACSTD2 protein. Human corneal tissues were fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for 1 hour. After being