

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¹⁾, 外園 千恵²⁾, 中村 隆宏¹⁾, 稲富 勉²⁾, 上田真由美¹⁾, 川崎 諭²⁾, 山田 潤³⁾
 横井 則彦²⁾, 上野 盛夫²⁾, 丸山 和一²⁾, 奥村 直毅²⁾, 伴 由利子²⁾, 西崎 暁子²⁾, 関山 英一²⁾
 永田 真帆²⁾, 中司 美奈²⁾, 東原 尚代²⁾, 鈴木 智²⁾, 佐野洋一郎²⁾, 山崎 健太²⁾, 谷岡 秀敏⁴⁾
 高橋 浩昭⁵⁾, 岡野 明⁶⁾, 羽室 淳爾²⁾, Andrew J. Quantock⁷⁾, Nigel J. Fullwood⁸⁾

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

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

⁷⁾School of Optometry and Vision Sciences, Cardiff University, ⁸⁾Department of Biological Sciences, Lancaster University

研究協力者

西田 幸二⁹⁾, 田代 啓¹⁰⁾, 中野 正和¹⁰⁾, 八木 知人¹⁰⁾, 不破 正博¹⁰⁾

鳥居 隆三¹¹⁾, 成宮 周¹²⁾, 松岡 俊行¹²⁾, 審良 静男¹³⁾

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

¹²⁾京都大学医学部神経細胞薬理学教室, ¹³⁾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-CSTD 2) 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 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 Kajii-cho, 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実現に取り組んだ。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実現

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、角膜上皮下と角膜実質への

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^{1)~3)}、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⁴⁾⁵⁾、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^{6)~8)}、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⁹⁾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¹⁰⁾やクラスタリン¹¹⁾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、

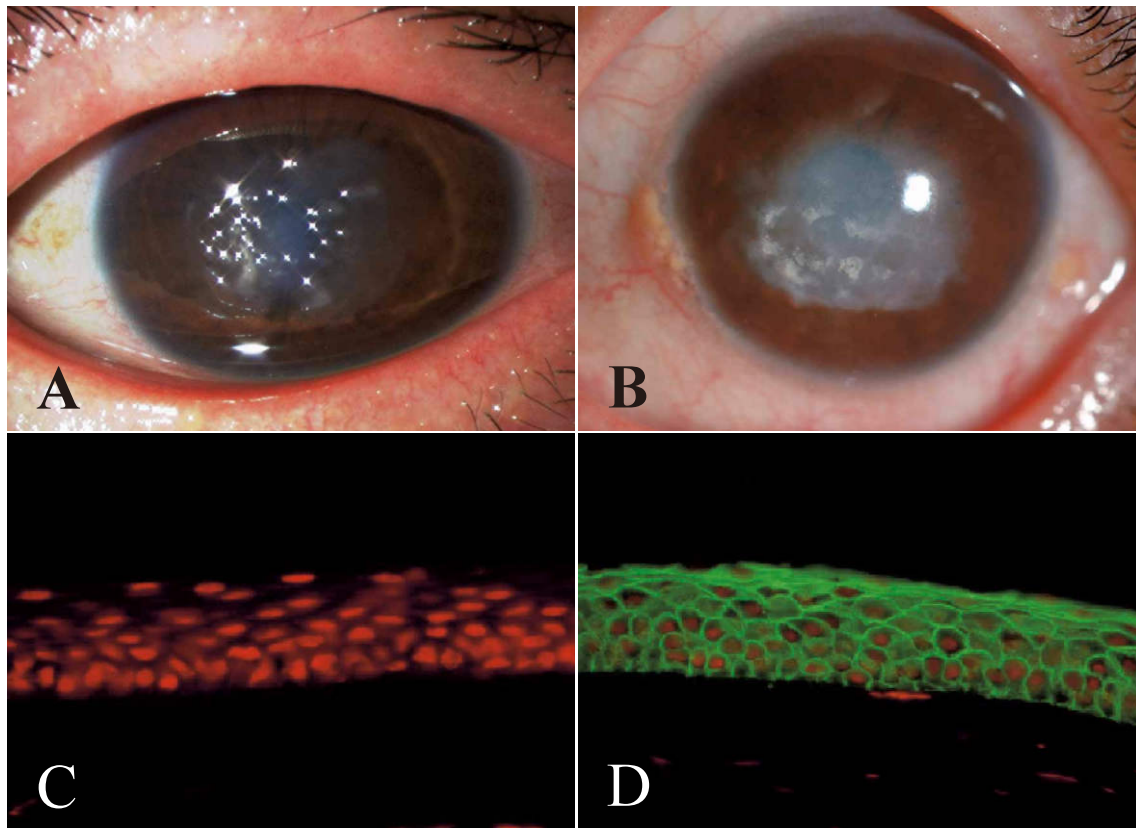


図 1 膠様滴状角膜ジストロフィ (GDLN) 角膜の臨床および免疫染色の所見.

GDLN 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 GDLN 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 GDLN 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¹²⁾¹³⁾. さらに, GDLN 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¹⁴⁾, 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, GDLN 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, GDLN 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, GDLN と正常角膜では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, GDLN 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 GDLN におけるものと同様に変化していた. 以上の結果より, GDLN においては TACSTD 2 遺伝子の loss of

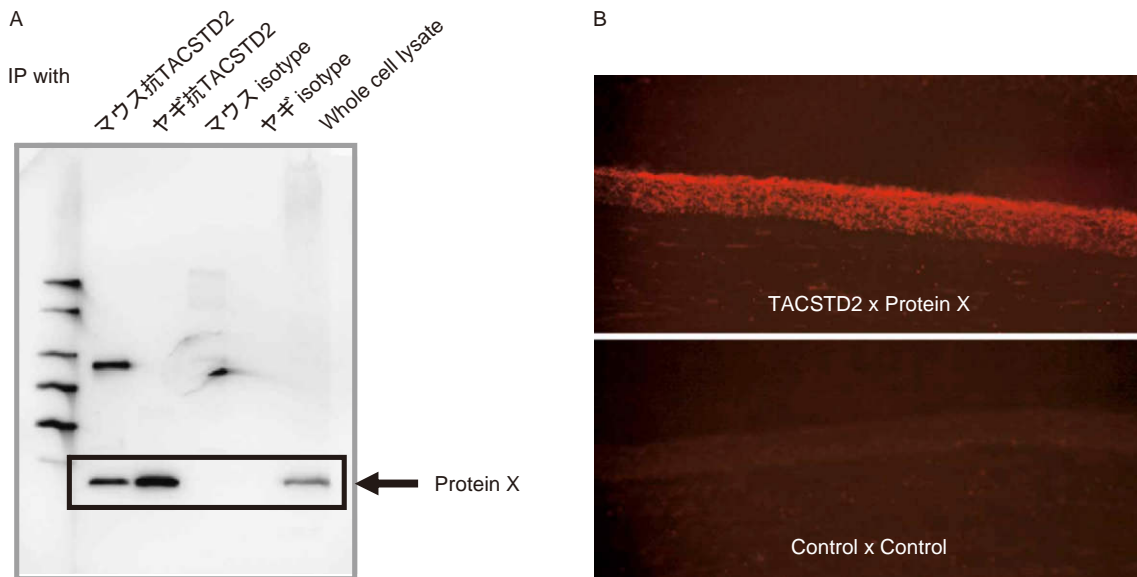


図 2 TACSTD2 蛋白質は Protein X と結合する。

A : Protein X は TACSTD2 抗体にて免疫沈降 (immunoprecipitation : IP) する。B : TACSTD2 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、TACSTD2 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、TACSTD2 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、癬痕、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。慢性癬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

慢性癬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¹⁵⁾、角膜上皮形成術 (keratoepithelioplasty)¹⁶⁾¹⁷⁾そして角膜輪部移植術 (limbal transplantation)¹⁸⁾¹⁹⁾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²⁰⁾。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^{21)~23)}、滅菌処理された凍結乾燥羊膜²⁴⁾、生体吸収性高分子のフィブリン²⁵⁾、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²⁶⁾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、心臓移植など同様に容易に拒絶されるからである²⁷⁾。

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を持ち、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²⁸⁾²⁹⁾。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^{30)~33)}。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³¹⁾³⁴⁾³⁵⁾。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³⁶⁾。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³⁰⁾。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²²⁾³⁷⁾、2002年から同種オート培養角膜上皮移植を開始した³⁸⁾。

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(2×3 mm、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³⁸⁾。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³⁷⁾、②慢性期の視機能回復目的²²⁾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³⁹⁾⁴⁰⁾。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³⁹⁾。

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^{41)~43)}。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

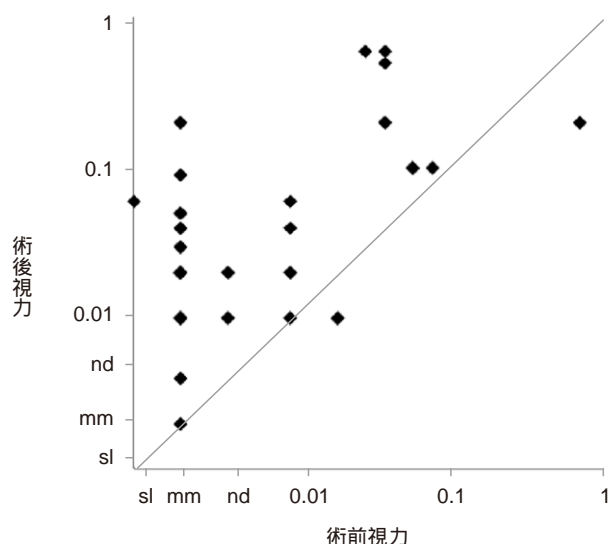


図 3 慢性期角膜再建を目的とした培養口腔粘膜上皮移植術を施行した症例の視力変化。

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性があると考え、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临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、眼表面は病的な瘢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)。

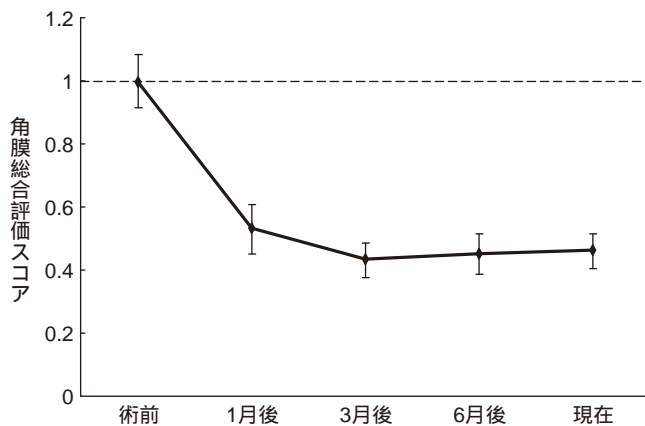


図 5 術後の臨床所見(角化、遷延性角膜上皮欠損、結膜侵入、角膜混濁)のスコア変化表。

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。前述の瞼球癒着、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⁴⁴⁾。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⁴⁵⁾⁴⁶⁾。

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

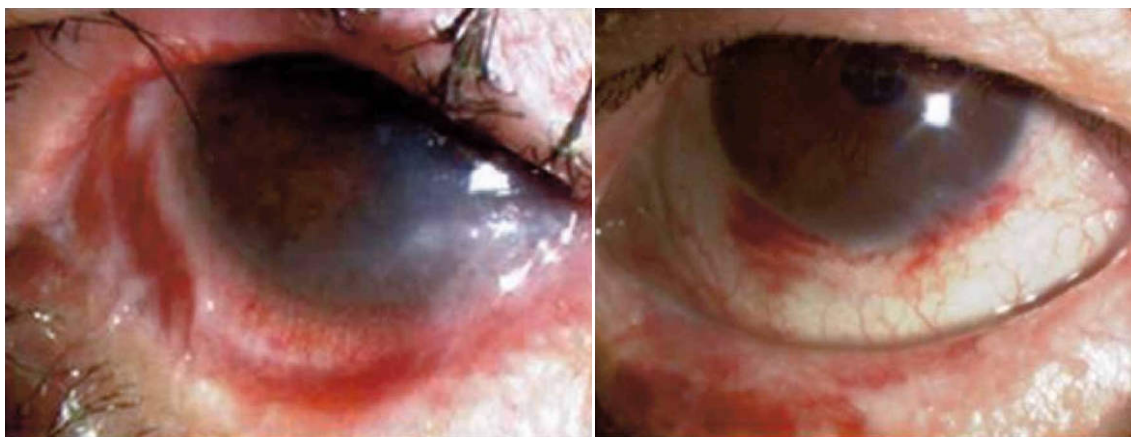


図 6 結膜嚢再建を目的とした培養口腔粘膜上皮移植の術前・術後の前眼部写真。
術前，下眼瞼の結膜嚢は短縮していた(左)．培養口腔粘膜上皮移植後，結膜嚢は深く再建されている(右)．

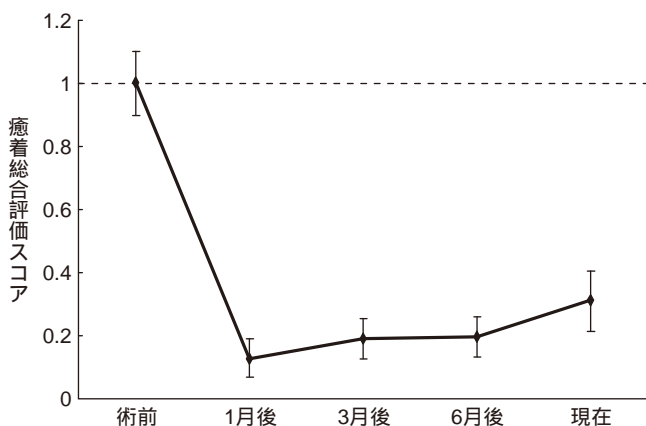


図 7 術後の臨床所見(瞼球癒着，上下の結膜嚢短縮癒着の程度)のスコア変化表。

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⁴⁷⁾．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， γ 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⁴⁸⁾．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^{49)~51)}．

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

性と安全性を示したため、ここで示したような再生医療の技術が臨床治験として検証される日は遠くないと考えている。

IV Stevens-Johnson 症候群の病態解明と新規治療法の開発

1. SJS, TEN, EM の鑑別診断

Stevens-Johnson 症候群 (Stevens-Johnson syndrome :

SJS) は、突然の高熱、咽頭痛に続いて全身の皮膚・粘膜にびらんと水疱を生ずる疾患であり、1922 年に小児 2 症例の報告がなされたのが最初である⁵²⁾。その後、中毒性表皮壊死融解症 (toxic epidermal necrolysis : TEN)、多型滲出性紅斑 (erythema multiforme : EM) が一連の皮膚粘膜症候群として認識されるようになった。これらの疾患について、欧州の皮膚科医を中心に大規模な臨床研究が行われ、SJS と TEN は重症度の異なる同一スペ

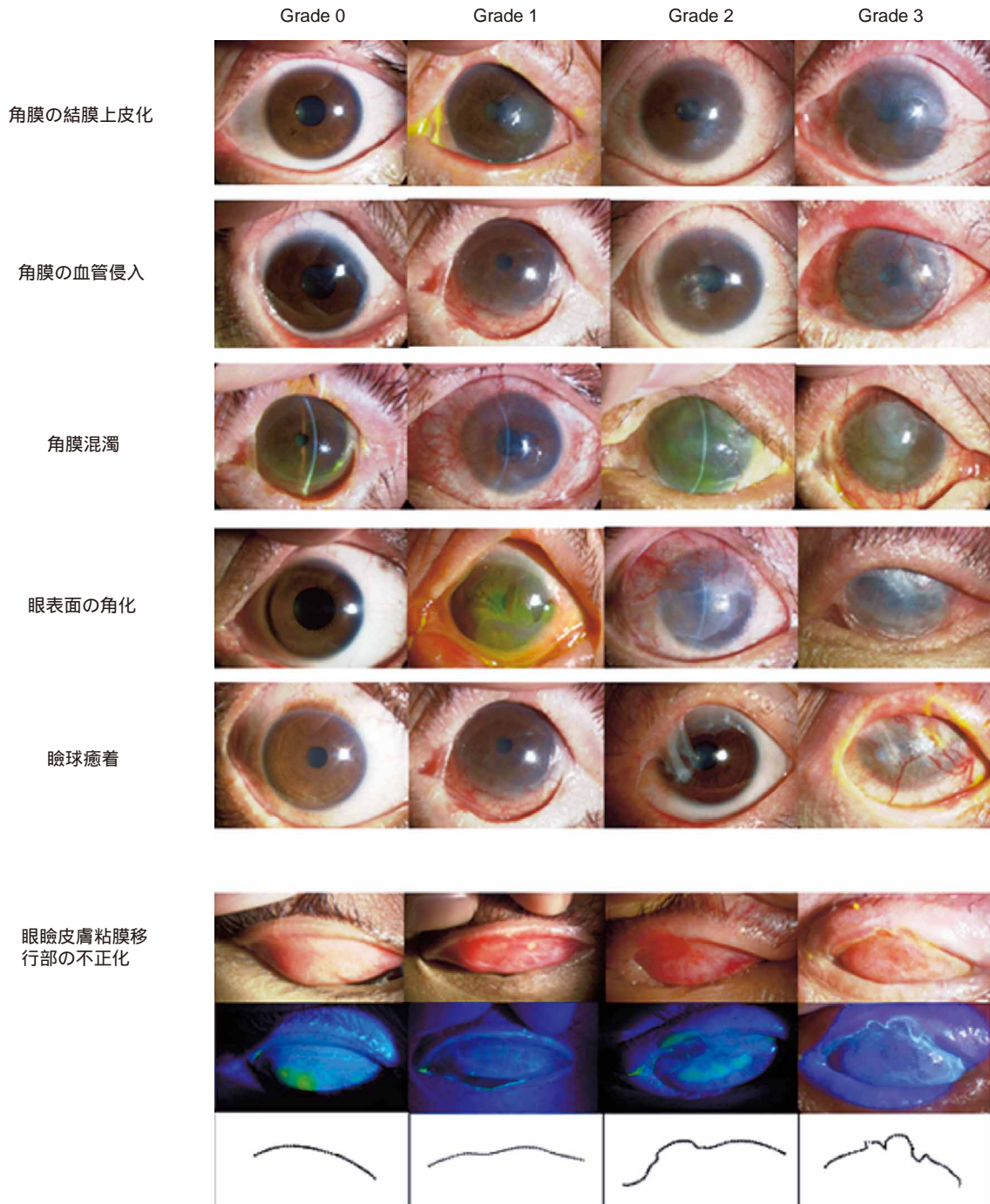


図 8 Stevens-Johnson 症候群 (SJS) 眼合併症のグレード分類。

角膜の結膜上皮化, 角膜の血管侵入, 角膜混濁, 眼表面の角化, 瞼球癒着, 眼瞼皮膚粘膜移行部の不正化, の 4 段階の分類。

(文献 63 より許可を得て転載)

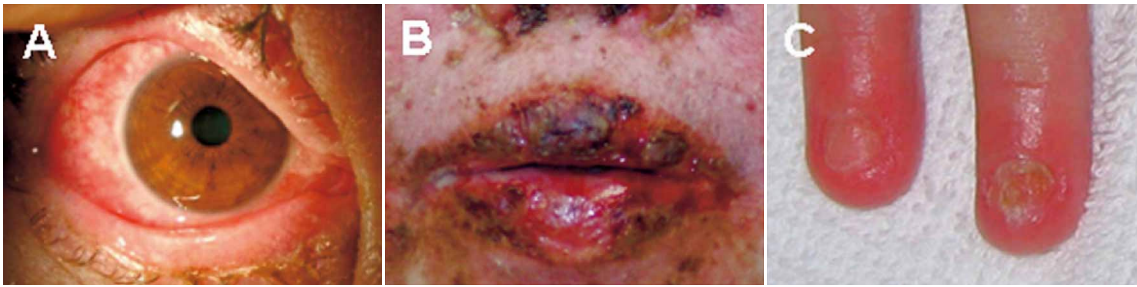


図 9 SJS 急性期の結膜炎, 口唇の発疹, 爪周囲炎.

眼合併症を伴う SJS 患者急性期には, 結膜炎(A)の他, 口唇の発疹(B), 爪周囲炎(C)が全例に認められる.
(文献 64 より許可を得て転載)

クトラムの疾患であり, EM は SJS/TEN とは病態が異なる疾患であることが明らかとなった⁵³⁾. 本邦でもこの概念の正当性を検証したのち, 厚生労働省難治性疾患克服研究事業研究班(「重症多形滲出性紅斑に関する調査研究」班長: 橋本公二)により SJS と TEN の診断基準が作成された⁵⁴⁾. 具体的には, 急性期の皮膚のびらん面積が全体表皮面積の 10% 未満を SJS, 10% 以上 30% 未満を overlap SJS/TEN, 30% 以上を TEN と診断することになっている.

SJS と TEN は発症率が人口 100 万人あたり 2~6 人/年とされる稀少かつ重症な疾患である. いずれも薬剤が誘因となって発症することが多いが, 病因・病態については未だ不明な点が多い. 急性期には眼表面の著しい炎症, 角膜上皮欠損, 結膜上皮欠損を生じるとともに, 角膜穿孔や角膜感染症など重篤な眼合併症を生じうる. 全身の炎症が沈静化しても, 瞼球癒着や角膜混濁などの瘢痕性変化が高頻度に生じ, 視力障害とドライアイが生涯にわたって持続する⁵⁵⁾. 視力障害はドライアイと密接に関係しており, 著しいドライアイのために長く開眼できないなど, 一般的な視力検査で比較的良好な視力であっても日常的な視覚には困難を来していることが多い⁵⁶⁾. 慢性期の眼表面には炎症が持続し, 人工涙液点眼, 睫毛抜去などの眼科治療を継続的に必要とする⁵⁵⁾⁵⁷⁾.

SJS と TEN の眼所見はきわめて類似しており, 眼科では両者を併せて広義の Stevens-Johnson 症候群(SJS)と呼称している(以下, 両者をまとめて SJS と記載する). SJS の角膜混濁に対しては, 以前には全層角膜移植, 表層角膜移植が行われたが, 角膜潰瘍そして角膜穿孔を生じるなど, その予後は不良であった. 近年は輪部移植, 培養粘膜上皮移植などが行われるようになり, 我々が継続して行っている培養角膜上皮移植, 培養口腔粘膜上皮移植は急性期から持続する遷延性上皮欠損, 慢性期の視力障害のいずれにおいても一定の成果をあげている^{22)37)41)~46)58)59)}. 一方で SJS に対する上皮移植の長期予後は未だ不良との報告もあり⁶⁰⁾, いったん視覚障害に陥った患者が発症前の健康な視力を取り戻すことは未だ困難である. SJS を既に発症した患者に最良の治療を提

供するには臨床所見と病態の理解が不可欠であり, 病態が解明されれば良好な視力を温存できる治療, さらにには疾患の発症予防が可能になると考えられる.

2. 眼障害の解析

我々は, 慢性期 SJS 患者の視力に影響する因子を検討するため, 眼表面再建術を施行されていない慢性期患者 73 名〔男性 33 名, 女性 40 名, 年齢 10~83 歳(平均 48 歳)〕の病歴, 視力, 眼所見を多施設スタディとして解析した. 発症年齢は 2~69 歳(平均 28 歳), 罹患期間は 1~54 年(平均 19 年)であり, 解析した 138 眼の矯正視力は, 0.01 未満が 42 眼, 0.01 以上 0.1 未満が 32 眼, 0.1 以上 1.0 未満が 36 眼, 1.0 以上が 28 眼であり, 約半数の矯正視力が 0.1 未満ときわめて低視力であった. すなわち, 若年期に本症を発症して視力障害に陥り, その後眼科的療養ケアを長く必要とする患者の多いことが明らかとなった. これら 138 眼について眼合併症 13 項目を 4 段階にスコア化(図 8)して評価したところ, すべての項目が視力と相関し, なかでも角膜血管侵入, 角膜混濁, 結膜侵入が高い相関を示した. 興味深いことには, palisade of Vogt (POV) の完全消失^{61)~63)}, すなわち角膜上皮幹細胞の喪失が, 視力低下に大きく関係した⁶³⁾. POV の消失は本症の急性期に生じるため, 急性期に POV の消失を回避すること, すなわち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思われる.

さらに, 上述した研究とは異なる臨床研究で, 眼合併症を伴う SJS 患者 94 名から発症時の症状, 薬剤履歴, 発症時の診断, 急性期の眼科治療について病歴を聴取したところ, 80% が最初に感冒様症状を自覚し, 91% が 39℃ 以上の高熱を伴っていた. 興味深いことに約 3 分の 2 の症例で, 結膜充血が皮疹に先行して生じていた. また, 結膜炎の他, 口唇・口腔内の発疹, 爪周囲炎が全例にみられた⁶⁴⁾(図 9). 発症のごく初期に SJS を診断することは困難とされているが, 著しい高熱, 口唇・口腔内の発疹, 爪周囲炎を伴い, 結膜充血が先行あるいは同時に生じる皮疹は眼合併症を伴う SJS を示唆するといえる.

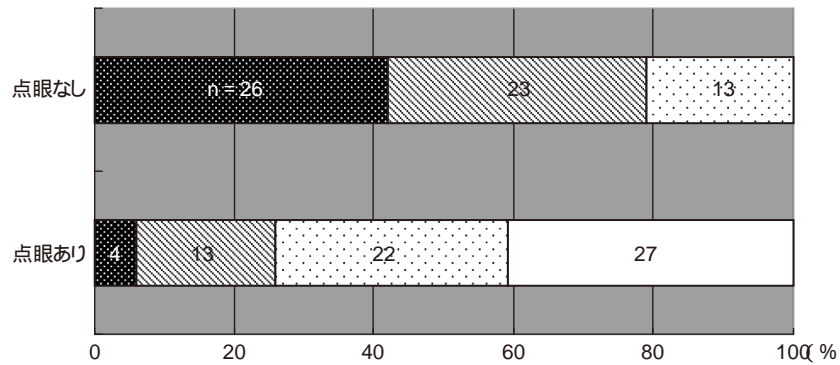


図 10 SJS 急性期の副腎皮質ステロイド薬眼局所投与の有効性.

発症 1 週以内に副腎皮質ステロイド薬の眼局所投与が行われた群の視力は、非投与群より有意に良好であった。視力は、■：0.01未満，▨：0.01以上0.1未満，▩：0.1以上1.0未満，□：1.0以上

(文献 64 より許可を得て転載)

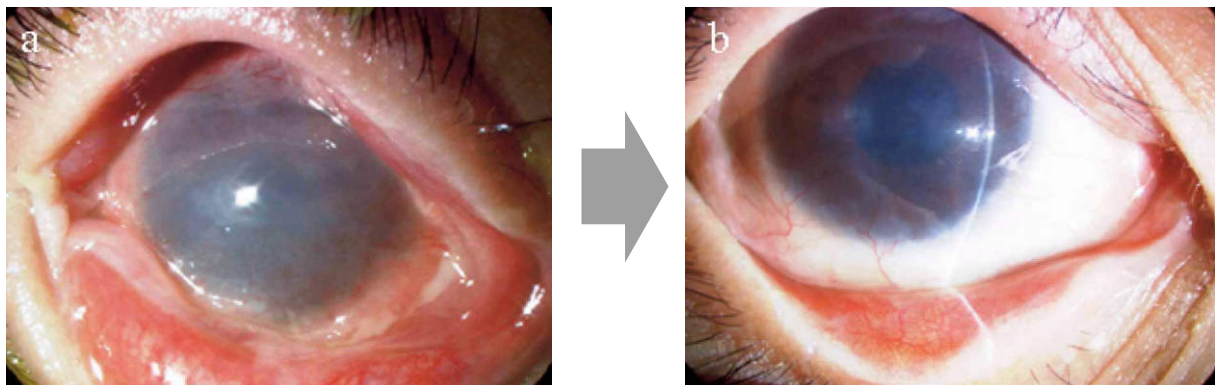


図 11 SJS 患者眼表面の眼表面炎症の増悪.

SJS の methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 保菌者で菌量が増えると、眼表面全体に炎症を生じて視力低下を来し(a)，MRSA の除菌により著しい炎症が沈静化する(b)。

(文献 58 より許可を得て転載)

3. 急性期の眼科的治療

急性期に角膜上皮幹細胞が完全消失すると、上皮欠損部は角膜上皮により修復されず、周囲から伸展する結膜組織で被覆され重篤な視力障害を来す、あるいは上皮修復遅延により遷延性上皮欠損を生じることになる。一方、角膜上皮欠損を生じて角膜上皮幹細胞が残存する場合には、上皮欠損は角膜上皮により修復され、最終的にはほぼ透明化する。したがって、SJS 急性期に眼局所を十分に消炎できれば、角膜上皮幹細胞の一部救済が可能となり、視力予後改善につながると推測される。そこで、我々は小規模ながらプロスペクティブ・スタディとして、2003 年 3 月から 2005 年 6 月までに京都府立医科大学附属病院で発症 4 日以内に SJS と診断できた 5 症例 (SJS 4 例、TEN 1 例) について、活動性のウイルス感染症とマイコプラズマ感染症のないことを確認したのちに、ステロイドパルス療法と眼局所ベタメタゾン投与を施行した。全例が両眼性の高度の眼表面炎症と角結膜上皮欠損を急性期に伴っていたが、10 眼すべてが発症 1 年後にも角膜上皮幹細胞の指標である POV を維持し、

視力 1.0 以上を保持した⁶⁵⁾。これは、SJS の急性期に生じていると想像されるサイトカイン・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。

また上述した SJS 患者 94 名を対象としたレトロスペクティブ・スタディでは、発症 1 週以内に副腎皮質ステロイド薬の眼局所投与が行われた群の視力は、非投与群より有意に良好であり⁶⁴⁾ (図 10)、急性期のステロイド眼局所投与が視力予後改善に有用であることが示唆された。

4. 自然免疫との関連

眼表面は常に外界と接しており、皮膚、口腔、腸内などと同様に常在細菌が棲息する。我々が、22~57 歳 (平均年齢 42 歳) までの健常人 40 人における結膜囊の細菌検出率を検討したところ、45% に表皮ブドウ球菌が、30% にアクネ菌が検出された⁶⁶⁾。一方、SJS 患者の眼表面は、化学外傷などの癩痕性角結膜上皮症患者の眼表面と比較して methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) または methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (MR-CNS) を有意に保菌しており⁵⁸⁾、こ

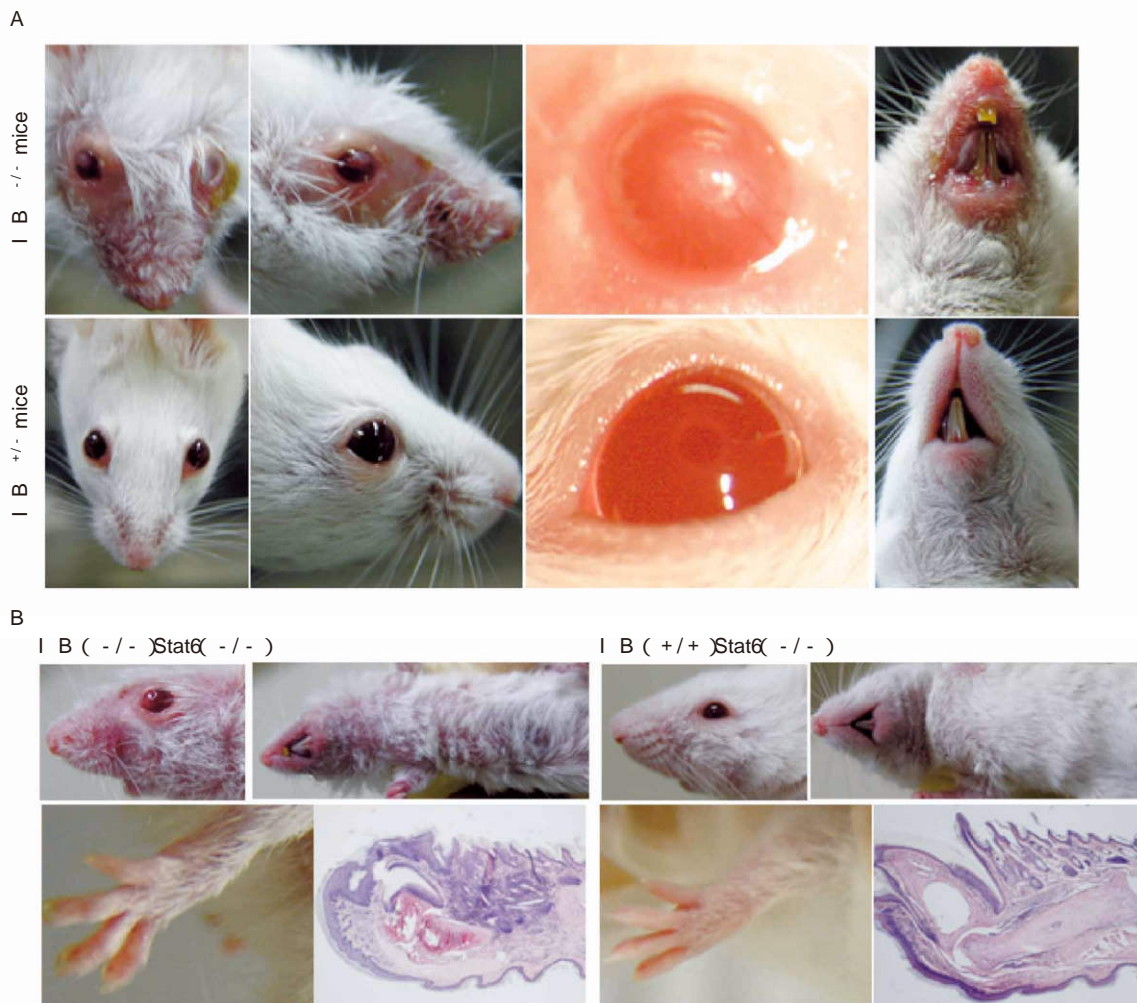


図 12 SJS 類似の眼表面炎症，口囲皮膚炎，爪周囲炎。

A : IκBζ 欠損マウスでは，SJS 類似の眼表面炎症ならびに口囲皮膚炎が認められる． B : Stat 6/IκBζ ダブル欠損マウスでは爪周囲炎も認められる．

(文献 71 より許可を得て転載)

れら耐性菌による角膜感染症もしばしば経験する⁶⁷⁾。

腸管では，腸内の常在細菌に関係する異常な炎症反応が，炎症性腸疾患の病態に関与していると考えられている．SJS 患者の眼表面でも，外科的治療の有無にかかわらず非特異的炎症が持続することがみられる．この非特異的炎症は低濃度副腎皮質ステロイド点眼薬の投与だけではコントロールが難しく，炎症制御が困難なために角膜上への結膜侵入を防止できないことがある．また，SJS の MRSA あるいは MR-CNS の保菌者で結膜囊における菌量が増加すると，眼表面全体に炎症に伴う細胞浸潤を生じて視力低下を来すが，この炎症は MRSA あるいは MR-CNS の除菌により沈静化し，視力も回復する⁵⁸⁾ (図 11)．眼表面からの MRSA 検出は，入院中の高齢者でも高頻度に認められるが，SJS 患者にみられるような著しい炎症を生じることはない．SJS の眼表面炎症には，未解明な機序とともに常在細菌が関与していることが示唆される．要約すると，眼合併症を伴う SJS では，

① 8 割が皮疹の出現する以前に感冒様症状を自覚し，② 眼表面が MRSA あるいは MR-CNS に易感染性であり，③ 常在細菌が存在する眼表面に炎症が持続するということになる．これらのことより，我々は，SJS の発症に自然免疫異常が関与する可能性があるとの仮説を立てている⁶⁸⁾⁶⁹⁾。

自然免疫は感染防御において重要なばかりではなく，種々の免疫疾患にも深く関与しており，例えば，自然免疫系の過剰活性化は，炎症性腸疾患の発症のトリガーとなる．眼表面においても，自然免疫応答の異常が眼表面炎症に関与しうるはずである．実際，toll like receptor (TLR) のシグナル因子であり nuclear factor (NF)-κB の regulator の一つである IκBζ の欠損マウスは，結膜杯細胞の消失を伴う眼表面炎症を自然発症する⁷⁰⁾．IκBζ は，単球のみならず眼表面上皮細胞にも発現しており，siRNA を用いて角膜上皮細胞の IκBζ の発現を抑制すると interleukin (IL)-6 ならびに IL-8 の産生が亢進する⁷¹⁾。

候補遺伝子アプローチ

自然免疫関連遺伝子：TLR3, I B

アレルギー関連遺伝子：IL4R, IL13

アポトーシス関連遺伝子：FasL

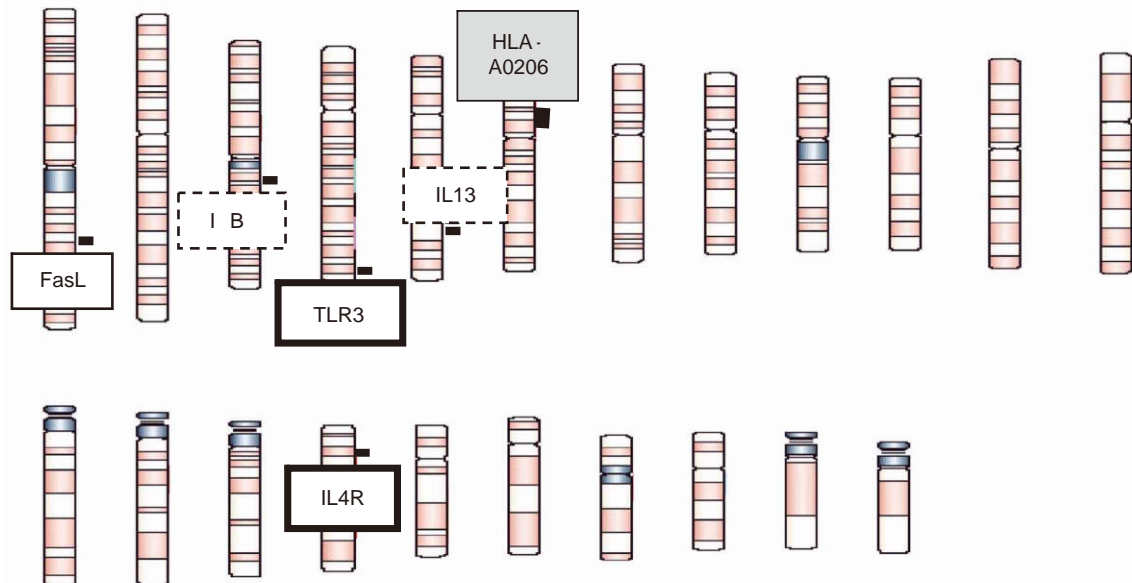


図 13 SJS 発症と有意に相関を示す複数の遺伝子多型.

SJS では、HLA-A0206, toll like receptor (TLR)3, interleukin-4 receptor (IL4R), FasL など複数の遺伝子多型との相関が認められた。

■: $p < 0.00005$, ■: $p < 0.0005$, □: $p < 0.005$, □: $p < 0.05$.

このことは、眼表面炎症の制御に眼表面上皮細胞に発現している $I\kappa B\zeta$ がかわっていることを示唆している。さらに、この $I\kappa B\zeta$ 欠損マウスを Balb/c 背景に純系化したところ、著しい眼表面炎症、口囲周囲の皮膚炎を生じ、気管支炎も認められた⁷¹⁾⁷²⁾。さらに、Stat6/ $I\kappa B\zeta$ ダブル欠損マウスでは、爪周囲炎も認められた⁷¹⁾ (図 12)。 $I\kappa B\zeta$ 欠損マウスにみられる皮膚・粘膜炎症は、自然免疫応答の異常により SJS 類似の炎症が眼表面に生じる可能性を示している。

5. 遺伝子多型解析による SJS 関連遺伝子の同定

SJS 発症の遺伝的素因として自然免疫応答異常が関与しているとの仮説のもとに、遺伝子発現解析ならびに遺伝子多型解析を行った。その結果、末梢血単球を用いた遺伝子発現解析において、lipopolysaccharide (LPS) 刺激に対する interleukin-4 receptor (IL4R) 遺伝子の発現レベルが異なった。すなわち、LPS 刺激 1 時間後の IL4R の発現が非刺激群と比較して、健常対照では上昇するのと対照的に、SJS 患者では減少した⁶⁹⁾。さらに、この IL4R について、Val50Ile, Ser478Pro, Gln551Arg の 3 つの遺伝子多型について解析を行ったところ、Gln551Arg について患者群と非発症群の間に有意な差異を認めた。大変興味深いことに、喘息などのアレルギー疾患では、健常人と比較して Arg 551 が有意に増加するのに対して、SJS では健常人と比較して Gln 551 が有意に増加していた⁷³⁾。また、IL4R のリガンドであ

る IL13 の遺伝子多型 Arg110Gln についても SJS との相関を認めた⁷⁴⁾。このことは、IL13—IL4R を介した反応の異常が、SJS 発症に関与している可能性を示している。さらに、SJS 患者の 8 割において急性期に感冒様症状がみられたことから、発症にはウイルス感染が大きく関与している可能性が考えられる。そこでウイルス由来二本鎖 RNA を認識し、眼表面上皮に強く発現している TLR3 に関して遺伝子多型を解析した。その結果、TLR3 の rs.3775290 と rs.3775296 が SJS 患者との相関を示した⁷¹⁾⁷⁵⁾。さらに、急性期 SJS で発現が上昇すると報告されている FasL についても 4 つの遺伝子多型を解析したところ、rs.3830150 と rs.2639614 に SJS と有意な相関を認めた⁷⁶⁾。

次に、human leukocyte antigen (HLA) 解析を行ったところ、HLA-A0206 が日本人 SJS 患者と強い相関を示した⁷⁷⁾⁷⁸⁾。抗原提示細胞に発現し獲得免疫に関係する HLA-class II ではなく、すべての細胞に存在しウイルスに対する免疫応答と関係する HLA-class I である A0206 と強い相関が認められたことは大変興味深い。皮膚科領域からは、重症薬疹と患者 HLA との相関が近年になり相次いで報告されている。抗てんかん薬であるカルバマゼピンによる全身の薬剤障害は、漢民族では HLA-B*1502 と強い相関を示す。また、抗痛風薬であるアロプリノールによる障害は、漢民族だけでなく欧米人、日本人においても、HLA-B*5801 と強い相関を示す

ことが報告されている⁷⁹⁾。大変興味深いことは、眼合併症を伴う SJS 患者は、これらの抗てんかん薬や抗痛風薬で発症することは少なく、約 8 割がウイルス感染を思わす感冒様症状に対する投薬後に発症していることである⁶⁴⁾。以上により、Stevens-Johnson 症候群の発症に遺伝子素因が関係し、自然免疫応答の異常がその発症に関係しているとの仮説は十分に批判に耐えられるものと思われる。

6. SJS 研究の今後の展開

SJS 発症を早期に診断し、全身に生じているサイトカイン・ストームを抑えること、例えば発症初期からステロイドパルス療法とベタメタゾン局所投与による眼科治療を行うことが、眼後遺症を防ぐために重要であると考えられる⁶⁴⁾⁶⁵⁾。ただし副腎皮質ステロイド薬の全身投与については国際的には賛否両論があり、未だ結論には至っていない。すなわち副腎皮質ステロイド薬投与が生命予後に悪影響を及ぼす、あるいは細菌やウイルス感染症を発症する可能性が懸念されている。発疹やびらんが拡大したあとに副腎皮質ステロイド薬を投与すると、二次感染により肺炎や敗血症などの重篤な合併症を招く可能性があるとしてされているが、副腎皮質ステロイド薬投与に関するこれまでの報告は発症から診断までの時期、眼科的重症度、副腎皮質ステロイド薬投与量などがさまざまであり、これらを一概に比べて論じることは困難である⁸⁰⁾⁸¹⁾。大規模なプロスペクティブ・スタディによる急性期所見の集積とともにステロイド早期治療の有効性を検証することが社会的にも必要であると痛切に感じている。

SJS 発症には、薬剤投与などの環境因子に加えて、複数の遺伝子多型が関与することが明らかとなった⁶⁹⁾(図 13)。我々は、現在さらに研究を進め、Affymetrix 社 500 K チップを用いた全遺伝子アプローチによる遺伝子多型解析(GWAS)を行っている。その結果、興味ある新たな疾患関連遺伝子群を同定した。今後は、これらの複数の疾患関連遺伝子と SJS 発症との関連について詳細な解析を行っていく予定である。

V 眼表面におけるアレルギー炎症制御

1. 眼表面上皮によるアレルギー炎症制御

1) アレルギー性結膜炎の概論

現在、アレルギー性角結膜炎の発症機序では、I 型アレルギー反応が主体であると考えられている。アレルギー性結膜炎の一般的な症状は、抗原曝露後数十分以内に即時相の反応として生じる結膜浮腫、充血、かゆみ、眼瞼浮腫、粘液性の眼脂である。これらは、肥満細胞の脱顆粒によって放出されたヒスタミンにより主として引き起こされる。一方、これに引き続いて 8~24 時間後に遅発相の炎症反応が生じる。これは、結膜局所部位への好酸球の浸潤を主体とする。春期カタルやアトピー性角

結膜炎などの組織障害を伴うアレルギー性角結膜炎は、I 型アレルギー遅発相がその病態の主体と考えられている。遅発相の好酸球浸潤は、肥満細胞によって誘導されると長年にわたって考えられてきた。しかし、最近では、好酸球浸潤に線維芽細胞や T 細胞が重要な役割を担うという報告がなされてきた。我々も、アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いた解析により、肥満細胞欠損マウスにおいても、アレルギー性結膜炎遅発相に結膜好酸球浸潤が生じることを証明した⁸²⁾(図 14)。このことは、アレルギー性結膜炎遅発相の結膜好酸球浸潤に肥満細胞以外の細胞が大きく関与していることを示唆するものである。

2) アレルギーへの上皮細胞のかかわり

アレルギー疾患は、原因抗原が体内に取り込まれ、そこで各種免疫細胞の活性化を起こすために生じる疾患である。このため、我々は、体外の抗原と免疫細胞を含む体内液体系をつなぐ窓口として、皮膚粘膜を被覆する上皮系がアレルギー疾患にかかわる可能性に着目した。一方、プロスタグランジン(PG) E₂の受容体の一つである EP3 は、アレルギー喘息を抑制することが報告されている。PG は、トロンボキサン(TX)とともに、プロスタノイドを構成し、さまざまな刺激に伴い、種々の細胞によって合成される生理活性物質である。プロスタノイドには、PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}、PGI₂、TXA₂の 5 種類があり、それぞれに対する特異的な受容体として、DP、EP(EP1, EP2, EP3, EP4)、FP、IP、TP が存在することが解明されている。

そこで、我々は、アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いて、眼表面炎症における EP3 の役割を解析した。EP3 欠損マウスにアレルギー性結膜炎を誘発したところ、抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が野生型マウスと比較して有意に増加した。また、抗原点眼 6 時間後の眼瞼エオタキシン mRNA 発現量も EP3 欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に増加した⁸³⁾(図 15)。続いて、EP3 を欠損させ代わりに β-gal 遺伝子をノックインしたマウスを用いて、眼における EP3 の局在を調べたところ、EP3 は眼表面上皮に限局して存在し、特に結膜上皮細胞に強く発現していた。また、免疫組織染色においても結膜上皮細胞における EP3 の強い発現が確認された⁸³⁾(図 16)。さらにアレルギー性結膜炎を誘発した野生型マウスに EP3 アゴニストを点眼投与すると、抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が有意に減少した。この EP3 アゴニストによる結膜好酸球浸潤抑制作用は、EP3 欠損マウスでは認められないことから、眼表面上皮に発現している EP3 を介した作用であることも確認された⁸³⁾(図 17)。これらのことから、眼表面上皮細胞に発現している EP3 が眼表面炎症を抑制していることは明白である。また、アレルギー性結膜炎を誘導すると EP3 のリガンドである PGE₂ならびにその合

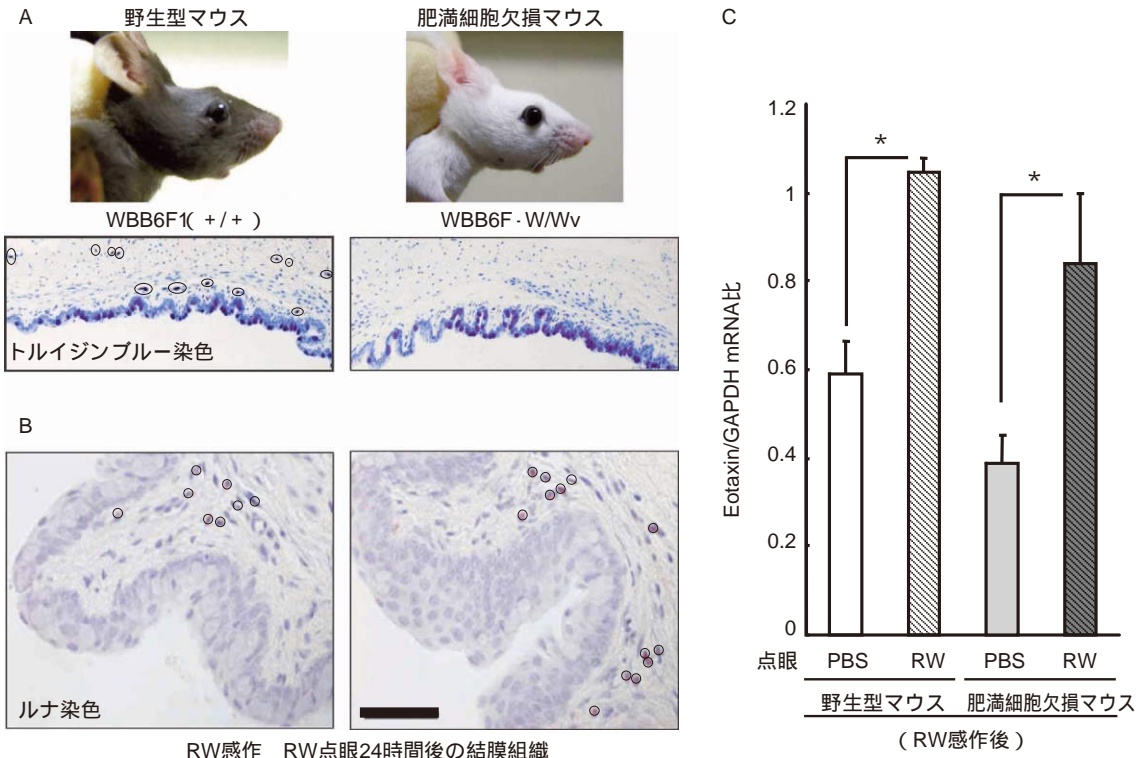


図 14 肥満細胞欠損マウスにおけるアレルギー性結膜炎遅発相の結膜好酸球浸潤。

A: 野生型マウスには結膜に多数の肥満細胞が確認できるが、肥満細胞欠損マウスには、肥満細胞は存在しない。○は肥満細胞。B: 肥満細胞欠損マウスでも、野生型マウスと同様に、ブタクサ花粉を用いてアレルギー性結膜炎の誘発により結膜好酸球浸潤を生じる。○は好酸球。スケールバーは 50 μm。C: マウス眼瞼の定量 polymerase chain reaction (PCR)。肥満細胞欠損マウスでも、野生型マウスと同様に抗原 (RW) 点眼によりエオタキシン (eotaxin) の発現が有意に上昇する。*: p<0.05。

(文献 82 より許可を得て転載)

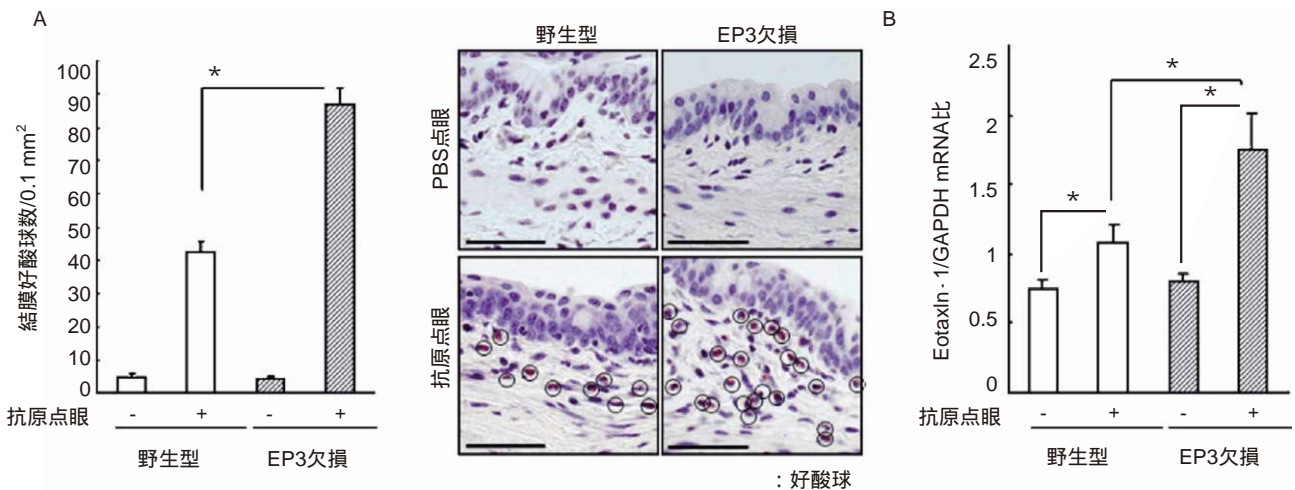


図 15 EP3 欠損マウスにおけるアレルギー性結膜炎遅発相の結膜好酸球浸潤。

A: 抗原感作マウスにおける抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球数/0.1 mm²。EP3 欠損マウスでは、抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が野生型マウスと比較して有意に増加していた。*: p<0.0005, n=19。スケールバーは 50 μm。B: 抗原感作マウスにおける抗原点眼 6 時間後の眼瞼中エオタキシン mRNA の発現。眼瞼エオタキシン mRNA 発現量も EP3 欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に増加した。*: p<0.05, n=7。

(文献 83 より許可を得て転載)

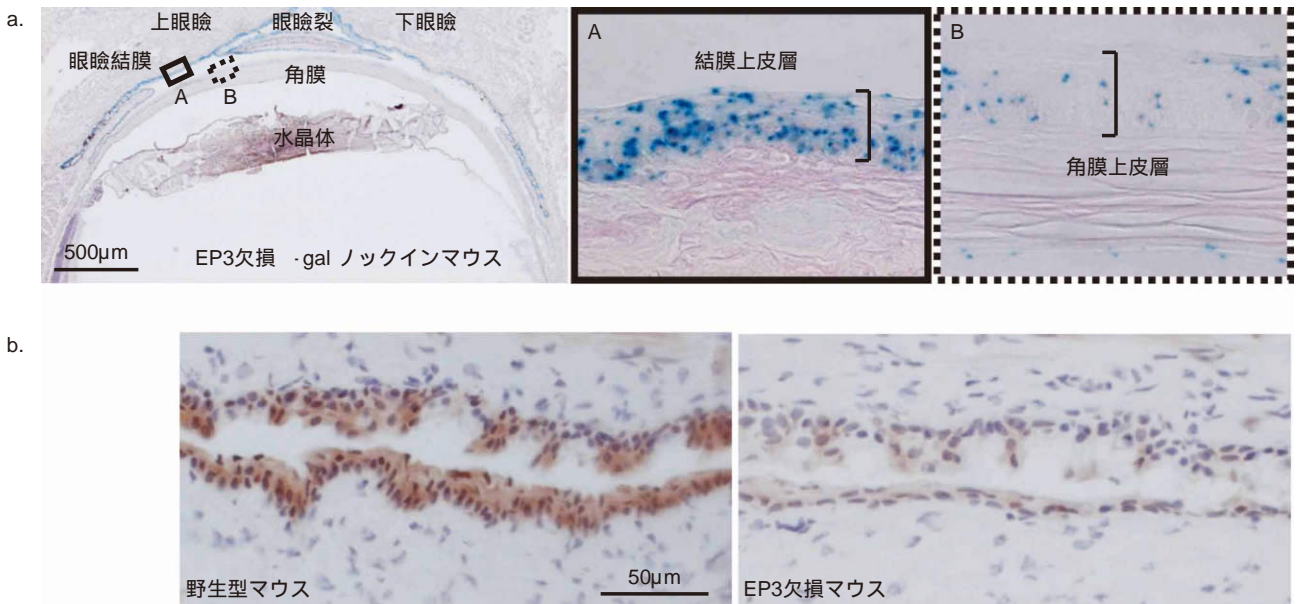


図 16 眼表面における EP3 の局在.

EP3 を欠損させ代わりに β -gal 遺伝子をノックインしたマウスを用いて、眼における EP3 の局在を調べたところ、眼表面上皮に局限して存在し、特に結膜上皮細胞に強く発現していた(a). また、免疫染色にても結膜上皮細胞における EP3 の強い発現が確認された(b).

(文献 83 より許可を得て転載, 改変)

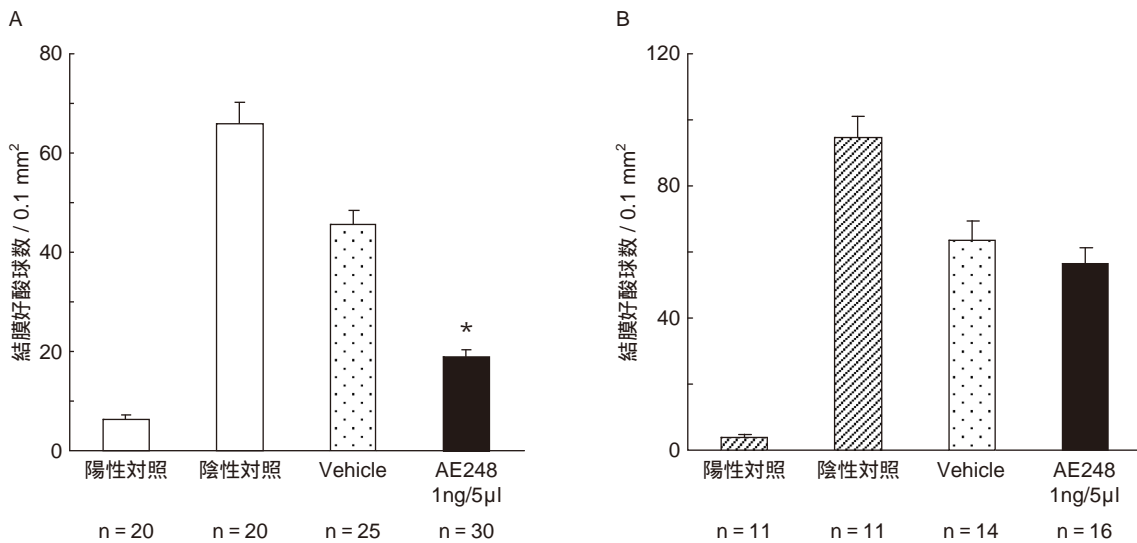


図 17 結膜好酸球浸潤に対する EP3 アゴニストの点眼効果.

A : アレルギー性結膜炎を誘発した野生型マウスに EP3 アゴニスト (AE 248) を点眼投与すると、抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が有意に減少した. * : $p < 0.0005$. B : この結膜好酸球浸潤抑制作用は、EP3 欠損マウスでは認められない.

(文献 83 より許可を得て転載, 改変)

成酵素の産生・発現が眼瞼中で上昇することから、EP3 を介したアレルギー炎症抑制作用が生理状態下でも作用していることが明らかとなっている⁸³⁾(図 18).

さらに我々は、ヒト結膜上皮細胞にも、この EP3 が発現していることを、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ならびに免疫染色で確認している(図 19). さらに、EP3 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を確認している. これらの知見は、ヒト眼表面炎症の制御に、結膜上皮細胞に発現している EP3 が大きく関与している可能性を示している.

眼表面上皮細胞に強く発現している toll like receptor (TLR)3 も、眼表面炎症制御に大きく関与している. アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いて、眼表面炎症に

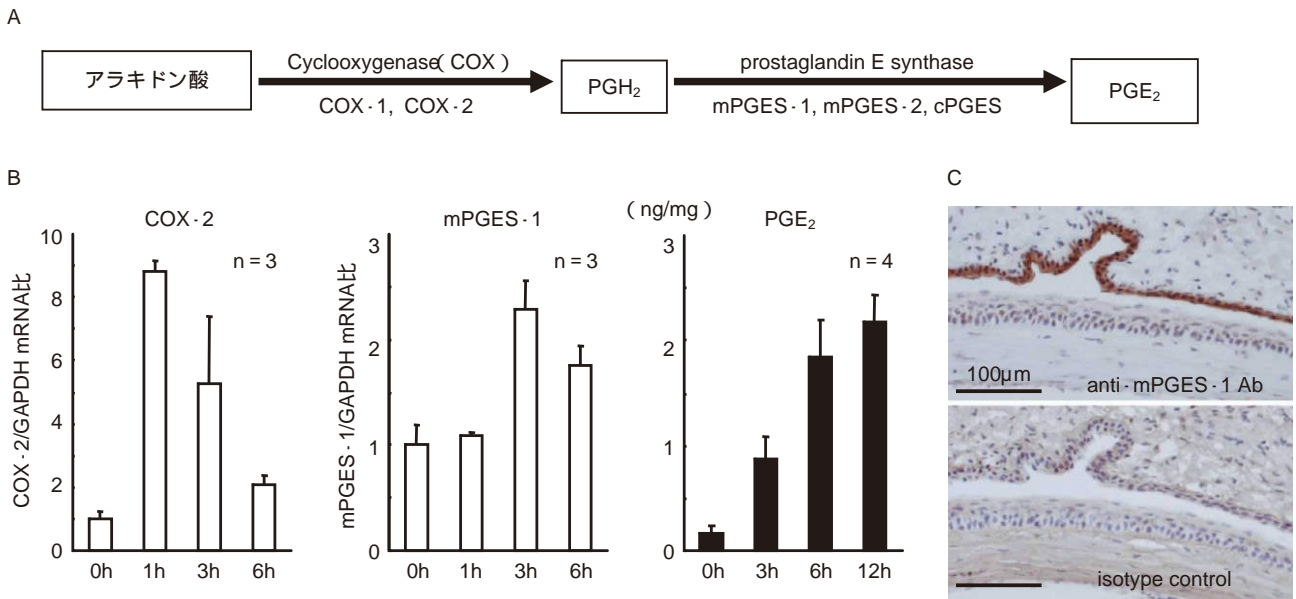


図 18 アレルギー性結膜炎におけるプロスタグランジン(PG)_{E2}ならびにその合成酵素の産生・発現。アレルギー性結膜炎を誘導すると EP3 のリガンドである PGE₂ならびにその合成酵素の産生・発現が眼瞼中で上昇する。
 A：プロスタグランジン E₂合成経路。 B：アレルギー性結膜炎における眼瞼中 COX-2, mPGES-1 mRNA 発現, ならびに PGE₂含有量の経時変化。 C：眼表面での mPGES-1 の局在。

(文献 83 より許可を得て転載, 改変)

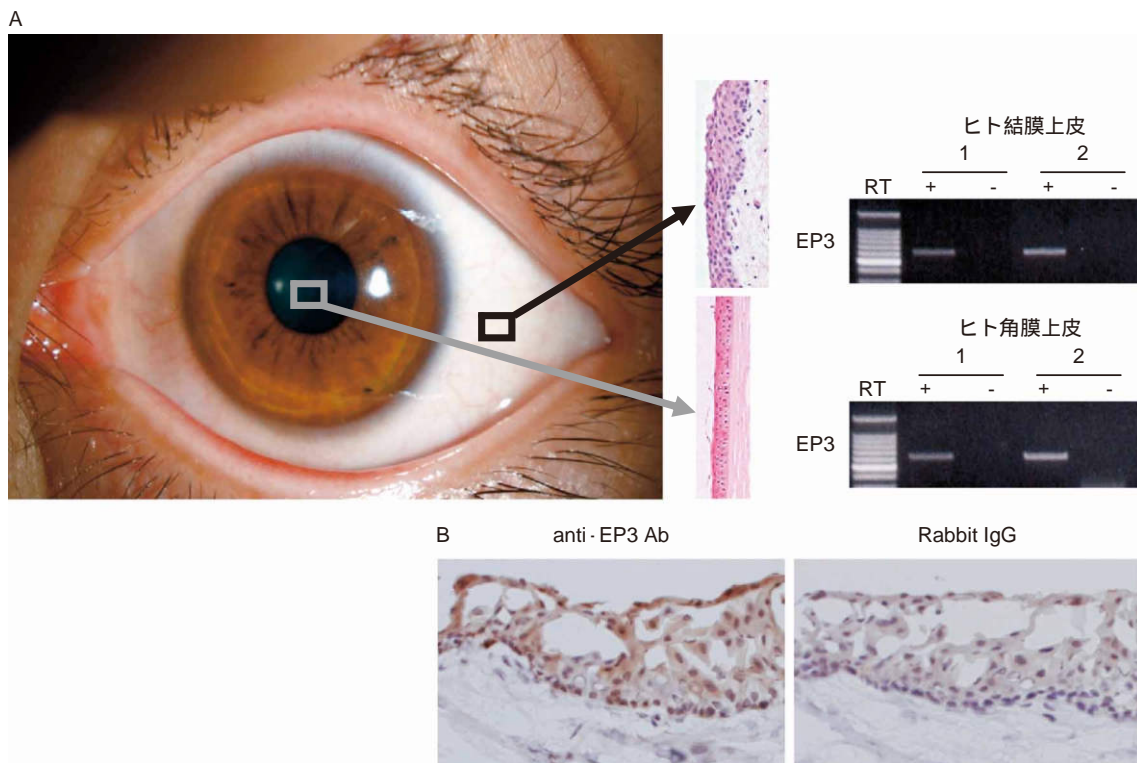


図 19 ヒト眼表面上皮細胞における EP3 の発現。

A：ヒト眼表面での EP3 mRNA の発現 (RT-PCR)。 B：ヒト結膜組織の免疫染色。 ヒト結膜上皮細胞, 角膜上皮細胞にも EP3 は発現している。

における TLR3 の役割を解析したところ, TLR3 欠損マウスでは, 抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が野生型マウスと比較して有意に減少した。一方, TLR3 過剰

発現マウスでは, 有意に増加していた⁸⁴⁾(図 20)。我々は, 結膜上皮細胞に TLR3 が強く発現していること⁷¹⁾, さらに, 結膜上皮細胞を, TLR3 のリガンドである poly-

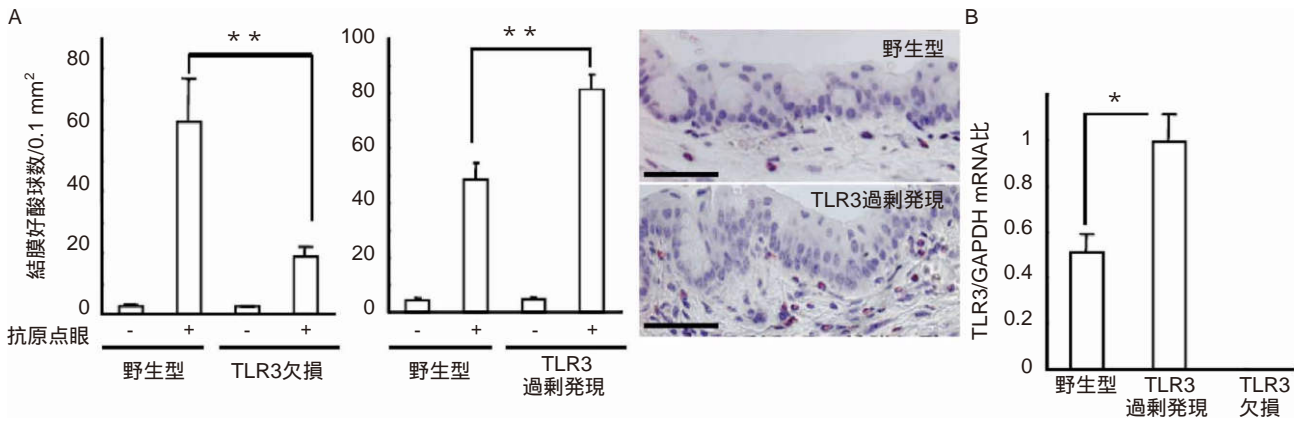


図 20 アレルギー性結膜炎遅発相の結膜好酸球浸潤における TLR 3 の役割。

A : 抗原感作マウスにおける抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球数/0.1 mm². ** : p<0.01. スケールバーは 50 μm. B : 抗原感作マウスにおける抗原点眼 6 時間後眼瞼中 TLR 3 mRNA の発現. * : p<0.05. TLR 3 欠損マウスでは、抗原点眼 24 時間後の結膜好酸球浸潤が野生型マウスと比較して有意に減少し、一方、TLR 3 過剰発現マウスでは、有意に増加した。

(文献 84 より許可を得て転載、改変)

IC で刺激すると thymic stromal lymphopoietin (TSLP) を発現・産生することも確認している。TSLP は、アレルギーやウイルスなどの刺激により、上皮細胞から産生され、樹状細胞に作用し Th 2 型細胞を誘導することにより間接的に好酸球遊走を誘導する。したがって、結膜上皮細胞に発現している TLR 3 は、TSLP の産生を介してアレルギー炎症を制御していると考えられる。

上記の結果から、アレルギー性炎症が、上皮細胞を介して制御されていることは明らかである。上皮細胞によるアレルギー炎症制御機構が解明されれば、現在の治療薬である肥満細胞や肥満細胞から放出されるヒスタミンを標的とした抗アレルギー薬に加えて、上皮細胞を標的とした新しい治療薬の開発へ進展する可能性があり、今後の発展が大きく期待される。

2. マクロファージの機能制御によるアレルギー炎症制御

近年、アレルギー疾患の増加が社会問題になっている。そこで、我々は、アレルギー体質の本質的な改善を目標としたアレルギー制御・予防方法の開発についても、免疫学的観点から取り組んできた。特に、アレルギー応答に対する免疫学的研究を行うにあたり、細胞内チオールレドックス理論に注目した。主な活性化 CD4⁺ T リンパ球には、IL-2 や interferon (IFN)-γ を産生する T-helper 1 型 (Th 1) と IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 など産生する T-helper 2 型 (Th 2) の存在が知られている。Th 1/Th 2 バランスは抗原提示細胞 (APC) であるマクロファージ (MΦ) や樹状細胞 (DC) の細胞内チオールレドックス状態により制御される⁸⁵⁾⁸⁶⁾。細胞内チオール基 (-SH 基) の大半は還元型グルタチオン (GSH) により担われ、微小環境の電位状態により、還元型 GSH と酸化型 GSSG との間に相互変換が起こる。細胞内 GSH

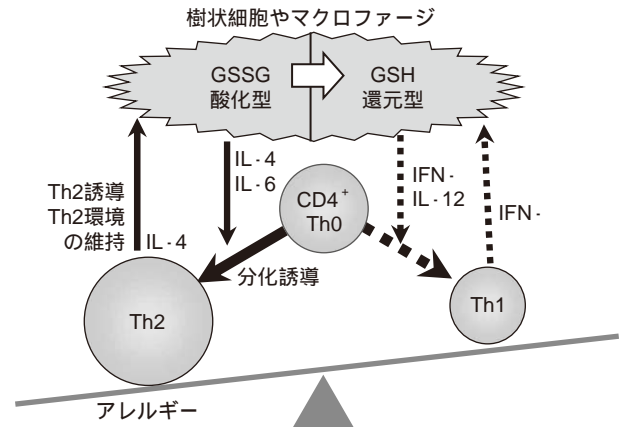


図 21 チオールレドックス偏倚によるアレルギー制御。細胞内還元型グルタチオン (GSH) 誘導により、T-helper 2 型 (Th 2) 免疫応答を制御可能である。GSSG : 酸化型グルタチオン, IFN : interferon.

含量の高いものが還元型 APC, 低いものが酸化型 APC と呼称され、それぞれ Th 1, Th 2 の誘導にかかわる。家ダニ抗原などのアレルギーは細胞内チオールレドックス状態を酸化型に傾斜させる (羽室ら, 未発表データ)。その結果、アレルギー曝露により Th 1/Th 2 バランスは Th 2 に傾斜する。しかしながら、APC は機能的可塑性を有しており、APC 内の GSSG を GSH に変換 (還元型誘導) することで、Th 2 増幅ループの遮断が可能である (図 21)。気道アレルギー応答においては、還元型を誘導する薬剤グルタミルシステインエチルエステル (GC-E) を用いることにより、卵白アルブミンで惹起されるマウス喘息モデルでの気道抵抗性の著明な軽減、好酸球浸潤の抑制が観察される。一方、酸化型を誘導する transforming growth factor (TGF)-β により、Smad 2/3 のリン酸化、connective tissue growth factor (CTGF) 発現、

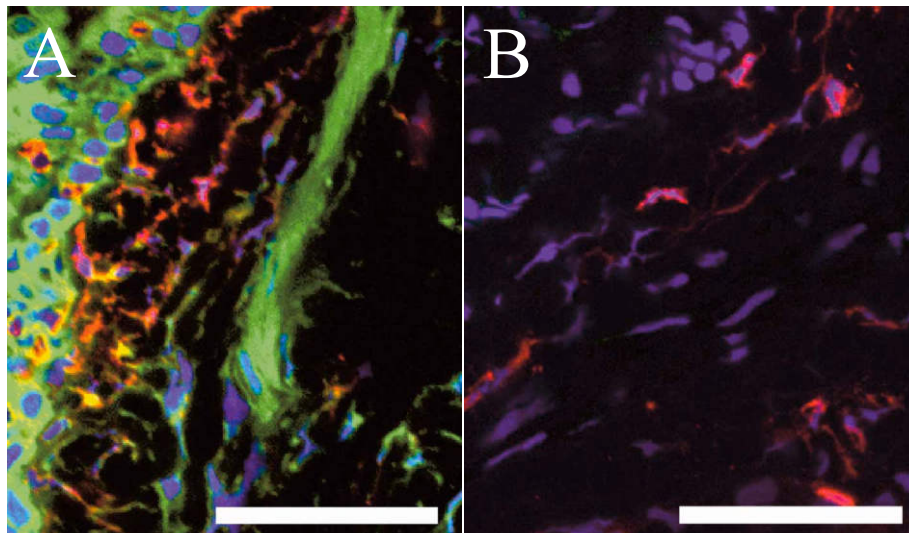


図 22 マウスアレルギー性結膜炎モデルにおける結膜での酸化型マクロファージ誘導。無処置マウス(A)と Ragweed を用いてアレルギー誘導したマウス(B)を準備し、採取した結膜を凍結包埋し、MCB(緑)、PI(青)、CD11b(赤)で染色した。スケールバーは 50 μm 。

上皮間葉転換や線維芽細胞からの I 型コラーゲン、フィブロネクチン、 α -smooth muscle actin (α -SMA) 産生の増大が観察され、細胞内チオールレドックス状態の制御が粘膜組織の肥厚抑制を含め広くアレルギー性症状の改善につながる可能性が判明している⁸⁷⁾⁸⁸⁾。

アレルギー性結膜炎の局所における酸化型 M Φ の誘導について、Ragweed を用いた実験的アレルギー性結膜炎マウスモデルを用いて検証した。採取した結膜を凍結包埋し、CD11b 表面抗原陽性のマクロファージにおけるチオールレドックス状態を評価した。その結果、無処置マウスの結膜と比較して、アレルギー性結膜炎で酸化型 M Φ が誘導されることや、周辺の細胞のグルタチオンも酸化型に偏倚していることが明らかとなった(図 22)。

APC の細胞内チオールレドックス状態を酸化型から還元型に偏倚させることは低分子薬剤以外に高分子性薬剤でも可能である。手術不能再発胃癌患者において延命効果が実証された世界発の自然免疫応答増強剤である β -1,3 グルカン「レンチナン」⁸⁹⁾ は還元型を、LPS は酸化型を誘導する。レンチナンは M Φ /DC の細胞表面受容体と結合して APC を酸化型から還元型に偏倚させる⁹⁰⁾。このレンチナンは、現在、静脈注射用製剤として使用されている。 β -グルカンは数百 μm の粒子径の巨大な凝集体を形成するため経口摂取では効能を示さない。そこで、腸管粘膜のパイエル板から体内に取込み可能な数 μm 程度以下の粒子径で安定化させた β -グルカン(ミセラピスト[®])を用いて APC を酸化型から還元型に偏倚させ、Th 2 偏移を抑制することで眼表面アレルギー疾患が制御可能か否かを臨床研究として行った。倫理委員会の承認と文書同意によるインフォームド・コンセントを行った後に二重盲検比較臨床試験を施行した。季節性ア

レルギー性結膜炎を有しているボランティア 60 例を無作為二重盲検法にて 2 群に分け、一方にミセラピスト[®] (味の素製、以下、微粒子化群)、他方に微粒子化されていないプラセボ β -グルカン液(以下、プラセボ群)を 1 日 1 回連続 2 か月摂取させた。ともに、 β -1,3 グルカンを 15 mg 含んでいるものを用いた。

自己評価での効果判定では、2 か月間の服用終了時点、および、服用終了 2 か月経過後において有意なアレルギー症状軽減効果が認められた。本臨床効果は末梢血 IgE 変化と相関しており、プラセボ群では効果がみられなかったのに対し、レンチナン微粒子化群では服用後 4 週と 8 週において、有意にアレルギー特異的 IgE/抗原非特異的 IgE の減少が認められた(図 23)。臨床効果との間に相関があるか否かを検討したところ、IgE 減少率と末梢血 CD 14 陽性単球へのレンチナン結合率に有意な相関がみられた(図 24)。以上により、レンチナンが単球に結合し、還元型を誘導し、Th 2 偏移を抑制することでアレルギー症状の制御が可能となったと推測している⁹¹⁾。一般的に、アレルギー疾患に対する治療には抗アレルギー薬や免疫抑制剤が用いられているが、抗アレルギー薬はアレルギー発症機序の末梢部分を抑制する対症療法に近い治療であり、また、免疫抑制剤もアレルギー体質を根本的に改善させる治療とはいいがたい。免疫疾患に対する治療は免疫抑制ではなく免疫制御が重要と考えており、中等症以下のアレルギーが罹患患者の大部分を占めている現状において、体質改善を意図した安全かつ安価な治療指針を開発することは妥当な方向性であろうと考えている。

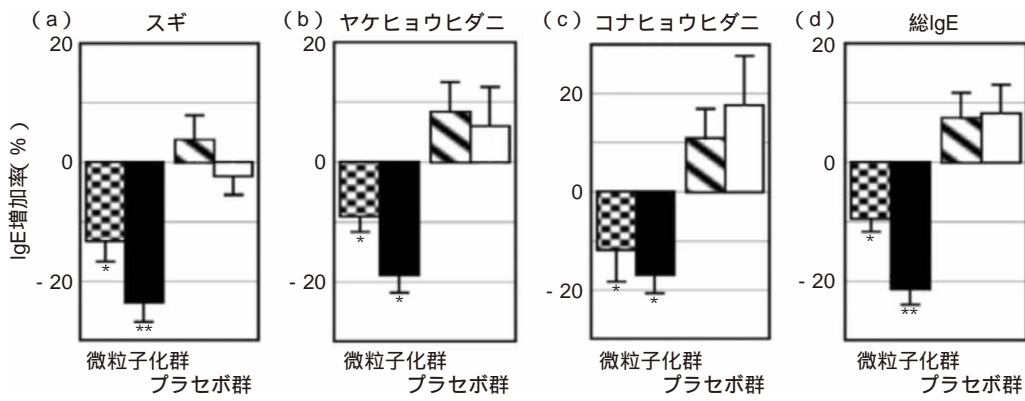


図 23 β -1,3 グルカン服用による非特異的, アレルゲン特異的 IgE 変化。
 微粒子化 β -1,3 グルカン, および, 非微粒子化プラセボ β -1,3 グルカンを 4 週間服用後(■, ▨)と 8 週間服用後(■, □)の末梢血を用いて評価. *: $p < 0.005$, **: $p < 0.0001$.

(文献 91 より許可を得て転載)

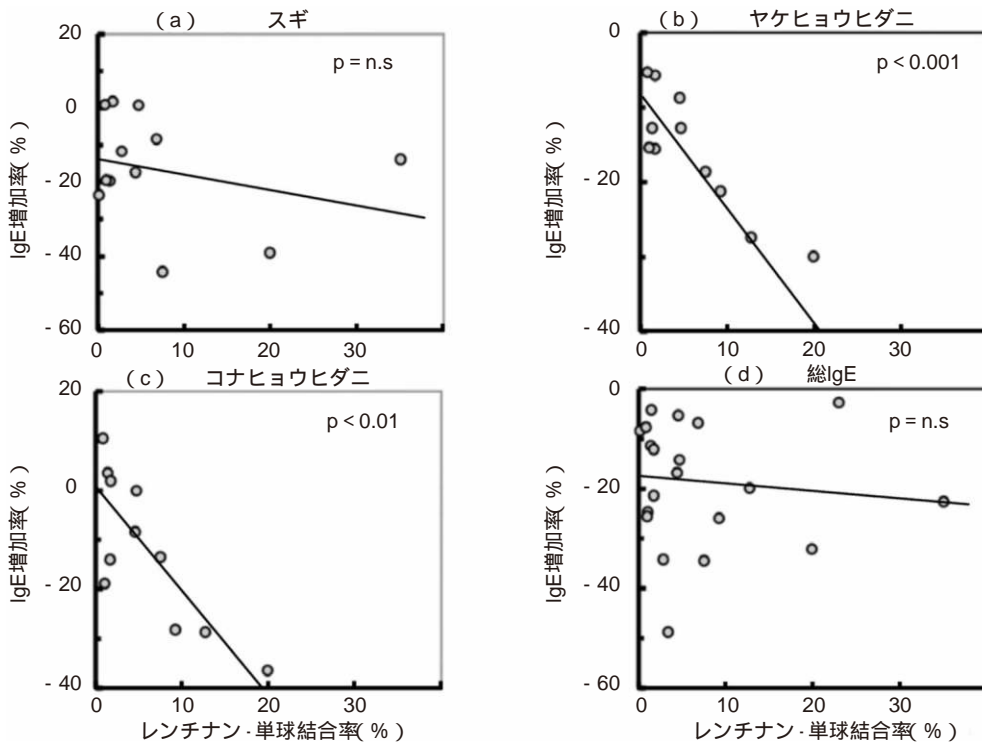


図 24 微粒子化 β -1,3 グルカン服用群における, レンチナン-単球結合率と抗アレルギー効果との相関。
 FACS(fluorescence activated cell sorting)を用いて血中 CD 14 陽性細胞とレンチナンとの結合率を解析。
 n. s : 有意差なし.

(文献 91 より許可を得て転載)

VI 眼表面上皮細胞の機能制御

1. 細胞内レドックス状態の重要性

一般に, マクロファージ(M Φ)など抗原提示細胞(APC)では, 細胞内の還元型グルタチオン(GSH)含量の高いものを還元型 APC, 低いものを酸化型 APC と呼称し, この細胞内レドックス状態は Th 1/Th 2 バランスを制御する(図 25). この概念を用いての Th 2 制御

によるアレルギー性結膜炎に対する治療の試みは前項で紹介した. 逆に, Th 1 制御による角膜移植拒絶反応の抑制についてもモデル動物で明確な効果を観察している^{27)92)~94)}. また, 細胞浸潤から組織破壊, そして血管障害による虚血の一連の応答によって生じる低酸素状態は酸化型 APC を誘導し, 慢性組織炎症と組織の線維化を誘導する(図 26). 免疫応答に伴う血管新生, リンパ管新生, そして炎症後の組織修復に伴う線維化の促進は抗

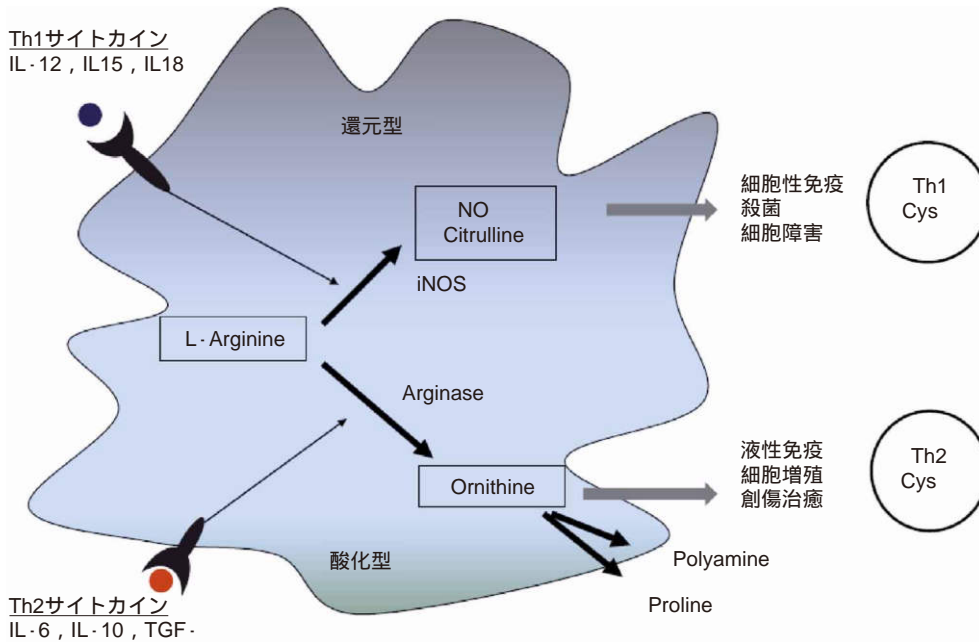


図 25 マクロファージ(MΦ)細胞内レドックス状態と Th 1/Th 2 バランスの制御。
細胞内グルタチオンのレドックス状態(GSH/GSSG 比)により、還元型マクロファージ(RMΦ)と酸化型マクロファージ(OMΦ)に大別することができる。前者は Th 1, 後者は Th 2 免疫応答を誘導する。Th 1 サイトカインは RMΦ を Th 2 サイトカインは OMΦ を誘導する。

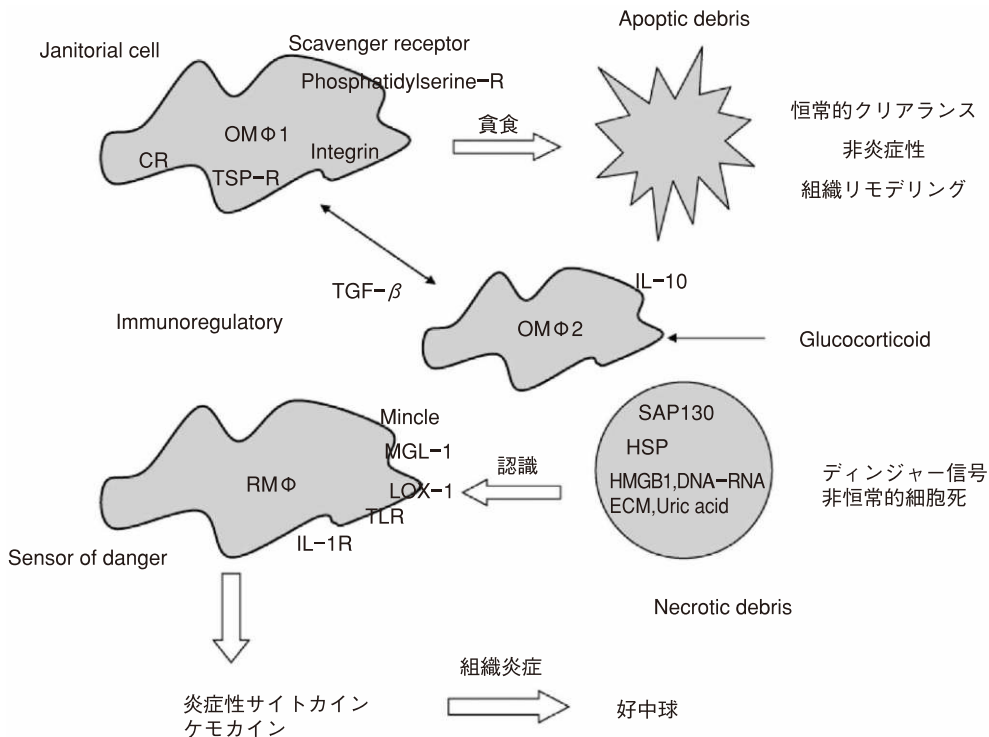


図 26 マクロファージ機能の多様性。

マクロファージの機能は可塑性をもつ。酸化型 MΦ 型 1(OMΦ1)は定常的な異物の貪食処理に働いた枯死した細胞の処理に働く。細胞表面にスカベンジャー受容体、補体受容体(CR), トロンボスポンジン受容体(TSP-R)などを発現する。IL-10 の発現が特徴的である。還元型 MΦ(RMΦ)はディンジャー信号 [SAP 130, heat shock protein(HSP), high-mobility group box(HMGB), advanced glycation end product(AGE)など] を感知して活性化され炎症性メディエーターを産生し組織炎症を惹起し、組織破壊に至る。細胞表面に toll like 受容体(TLR 3/9), IL-1 受容体(IL-1 R), macrophage-inducible C-type lectin(Mincle), macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1(MGL-1)などを発現する。IL-12 の発現が特徴的である。酸化型 MΦ 型 2(OMΦ2)は組織修復・再構築に働く。Transforming growth factor-β(TGF-β)の産生を介して機能すると予想されるが詳細は解明されていない。

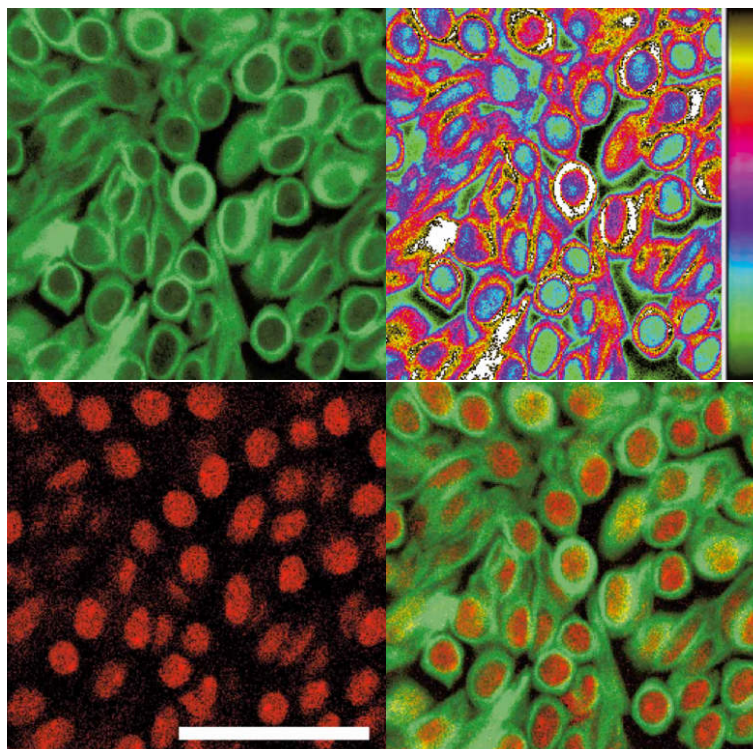


図 27 インプレッションサイトロジーの結膜サンプルにおけるチオールレドックス評価。MCB 染色による蛍光(左上), MCB 染色による蛍光をフルカラー表示(右上), PI 核染色(左下), MCB と PI との合成(右下)を示す。スケールバーは 50 μm 。

原提示細胞のチオールレドックス偏倚に規定されていることが判明している⁸⁸⁾。チオールレドックスは、自然免疫による炎症、組織線維化そして上皮間葉転換の制御にも密接に関与しているが、角膜の場においてこのような解析はなされていない。そこで、免疫担当細胞のみならず眼表面粘膜上皮細胞もあわせて細胞内レドックス状態を細胞内グルタチオン量から評価することはきわめて重要な課題であると考えられる。

2. 眼表面上皮のレドックス状態のイメージング

そこで、我々は角膜上皮細胞の健全性および酸化ストレス状態をグルタチオン(GSH)量の観点から評価し、臨床における治療方法の指針とすることを検討しはじめている。GSHは細胞が生存するのに欠かせないトリペプチドであり、自らが二量体の酸化型(GSSG)に変化することにより細胞内における酸化ストレス防御を行う。また、細胞内のGSH/GSSG比は炎症病期におけるサイトカイン・ケモカインの産生に影響を与えている。GSH量測定には生化学的手法が用いられるが、生体における局在を顕微鏡レベルで評価することは困難である。そこで我々はチオール基に特異的に結合して発色する MCB 試薬で染色し、共焦点顕微鏡で観察することにより、凍結包埋した組織標本や⁹²⁾、インプレッションサイトロジーで採取した細胞サンプルにおける GSH 量を相対的に評価することを可能とする方法を確立した。マウス角膜の検討では、縫合糸による物理的な角膜炎などにより

GSH 量が低下する一方、GSH 含有の多いマクロファージの浸潤が角膜実質にみられることなどが観察できている。また、インプレッションサイトロジーで採取したヒト結膜上皮を評価する技術が確立できたため、生体の結膜上皮細胞のレドックス状態の経時的な評価が可能となった。図に示すように、GSH は細胞質に多く存在し、蛍光強度を疑似カラー表示することも可能である(図 27)。健常人の結膜上皮においては、性差、部位などによる差異は認められなかった。

GSH 量の低下には以下のような種々の要因、すなわち ④ GSH 生合成の低下、⑤ 炎症などによる細胞機能障害、⑥ 活性酸素捕捉による GSH 消費、⑦ 酸化型マクロファージの誘導などの GSSG への変換、⑧ 薬剤による GSH 産生低下もしくは GSSG 誘導、⑨ 低酸素による GSH 低下、などが想定される。特に、GSH 生合成の低下には、加齢に伴う GCLC(グルタミルシステインリガーゼ触媒単位)の遺伝子発現低下が一つの原因となる。酸化ストレスを含む小胞体ストレスは多くの生活習慣病の原因の一つであり、老化の一因として重要視されている。実際、高齢者における結膜上皮 GSH 量には有意な低下がみられている。このような GSH 量の低下は、酸化ストレス防御能の低下を生じ、極端な低下では細胞死が誘導される。

細胞内 GSH は軽度の結膜炎であっても低下し、眼表面の脆弱性と防御機構の迅速性に感嘆させられる。ドラ

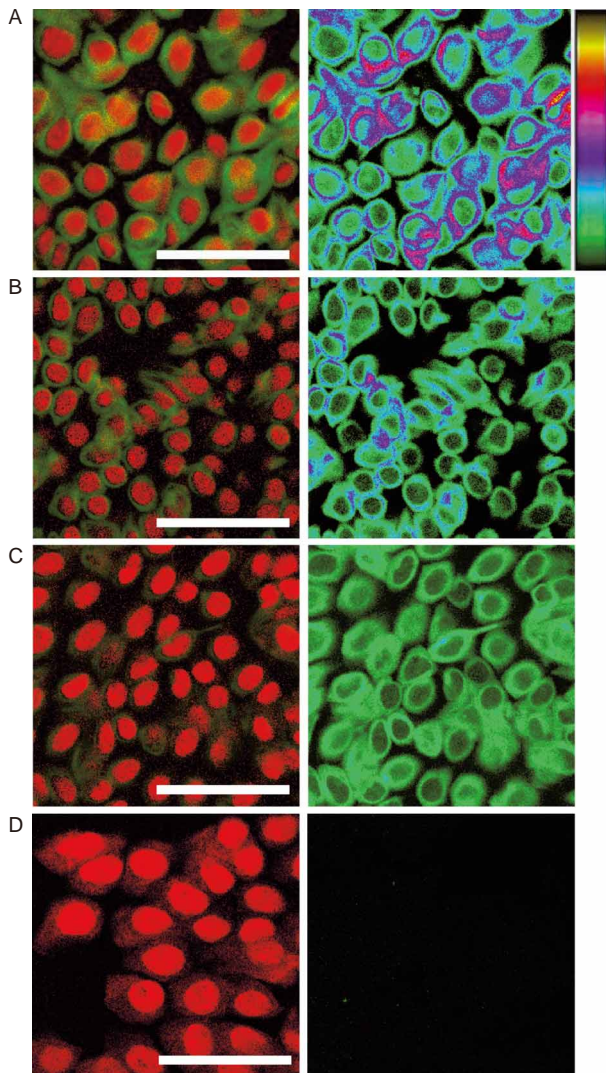


図 28 ドライアイにおける結膜上皮のグルタチオン低下。健常高齢者(A), 涙液層破壊時間(BUT)短縮型ドライアイ(B), 涙液減少型ドライアイ(C), Sjögren 症候群(D), それぞれの結膜サンプルについて評価した。MCB 染色と核染色との合成(左)と MCB 染色のフルカラー表示(右)を示す。スケールバーは 50 μm 。

ドライアイには眼表面の炎症と酸化ストレスの関与が示唆されているため、GSH の状態を検討したところ、涙液層破壊時間(BUT)短縮型では軽度の GSH 量低下、非 Sjögren 症候群における涙液分泌減少型ドライアイではさらなる GSH 量の低下が認められ、細胞機能が正常でないことを示唆した(図 28)。しかし、これらの疾患に涙点プラグを使用した後は、GSH 量は正常域に回復していた。一方、Sjögren 症候群の結膜上皮においては、GSH 量の低下はさらに著明であり、涙点プラグ治療では GSH 量の改善は認められなかった。結膜上皮深層を評価してみると、Sjögren 症候群以外では健常者と同等の GSH 量であるのに対し、Sjögren 症候群では結膜上皮深層に至るまで GSH 量の低下が認められた。すなわち、Sjögren 症候群では、涙液減少という結膜上皮

表面からの要因とともに、結膜上皮深層における炎症の存在が関与していることが示唆された。このように、細胞内 GSH 量という新たな客観的パラメータを臨床診断のパラメータに加えることで、斬新な細胞機能評価が行えるはずである。

3. 角膜上皮細胞のメタボローム：涙液中アミノ酸の視座

生体を構成する細胞・組織は、酸素、栄養(糖、アミノ酸)の適切な供給のもとでホメオスタシスを維持する。グルコースからグリコゲン、アミノ酸から蛋白質への同化作用とその逆反応としての異化作用のバランスで細胞・組織が維持される。図 29 に例示する筋肉細胞のように、細胞内のアミノ酸が不足し、細胞外からの取り込みに障害がある場合には、自己構成蛋白質を異化してアミノ酸とし、これを ATP の供給源として生命活動のエネルギー源とする。細胞内のレドックス状態が酸化型に傾斜するとアミノ酸とトランスポーター機能に障害が起こり、体液からアミノ酸を取り込む能力が低下する。これは、廃用性筋萎縮や老衰状態における筋萎縮や末期癌患者の急速な体重減少などの一因とされている。オートファジーやプロテアソームによる蛋白質処理機構と密接に関連する。

アミノ酸は従来、主として、蛋白質を構成する原料、あるいは、生体成分の前駆体といった栄養素として考えられてきた。しかしながら、細胞機能の制御に重要な役割を果たしていること、換言すれば、細胞が置かれている環境中のアミノ酸/アミノ酸代謝が、シグナル伝達物質/シグナル機能としての役割をもち、そのアミノ酸濃度のバランスを感知する機構が細胞に備わっていることが分子レベルで解明されつつある⁹⁵⁾⁹⁶⁾。体液中に含まれる種々のアミノ酸が、糖尿病、肝疾患、腎疾患の病態や、筋肉の老化、代謝に深く関与することが明らかにされている。眼科領域においても結膜上皮細胞内のグルタチオン量(細胞内レドックス状態)がその機能に大きな影響を与えることが最近になって報告され⁹⁷⁾、Harada らはグルタミン酸、システインの取り込み障害によるグリア細胞内グルタチオン量低下によるグリア細胞の枯死が正常眼圧緑内障の一因ではないかと報告している⁹⁸⁾。

最近、角膜上皮細胞にアミノ酸トランスポーターの存在することが報告されており⁹⁹⁾、涙液中に存在する種々のアミノ酸が上皮細胞の健常性の維持さらには上皮疾患の病態に関連すると推測される。涙液中の蛋白質構成成分や電解質バランスなどが血漿と異なっているように、涙液中のアミノ酸プロファイルも全身(血漿)とは異なり、そのことが病態に密接に関与するのではないかと仮説を我々は持っている。ただ、涙液は血液、体液とは異なり、1 回に採取できる量が微量なことから構成微量成分の解析が困難であり、これまでに涙液中のアミノ酸発現を詳細に検討した報告はなかった。しかし、近年、

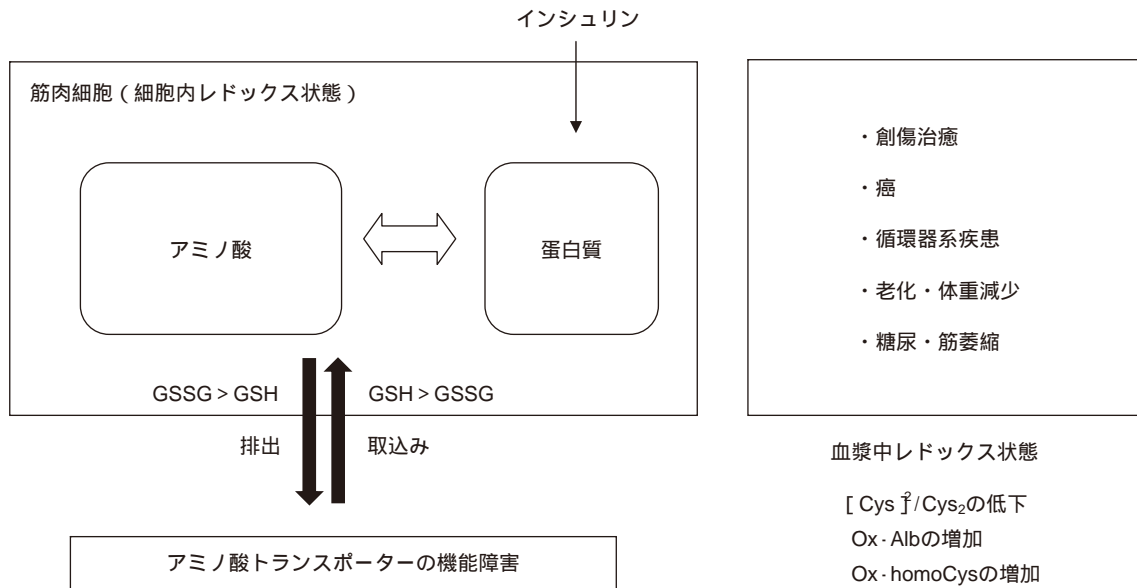


図 29 寿命シグナルとレドックス制御.

細胞外からのアミノ酸の取込みにかかわるアミノ酸トランスポーターの機能維持には細胞内チオールレドックス状態が重要であり、直接、間接に、老化や生活習慣病の発症とかかわると考えられる。

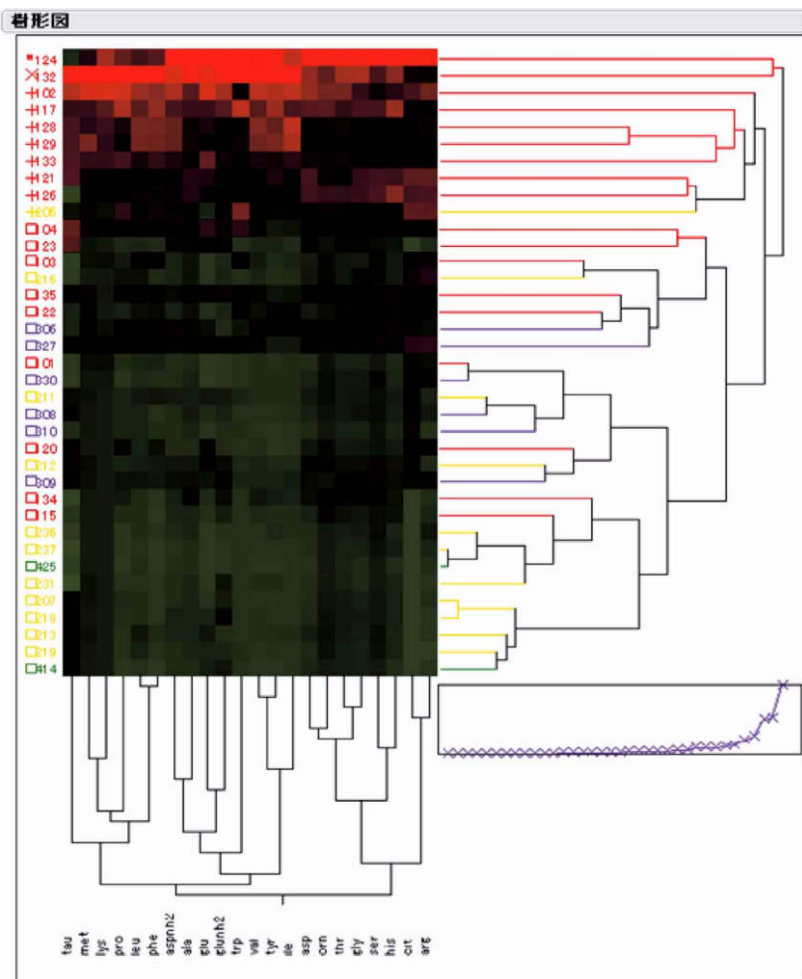


図 30 涙液中のアミノ酸に関するクラスター解析結果.

Stevens-Johnson 症候群、化学外傷、熱傷など炎症を伴う眼表面疾患と健常人涙液中の 23 種アミノ酸を検討した。Stevens-Johnson 症候群、化学外傷などの難治性炎症性疾患のグループがクラスターを形成している。

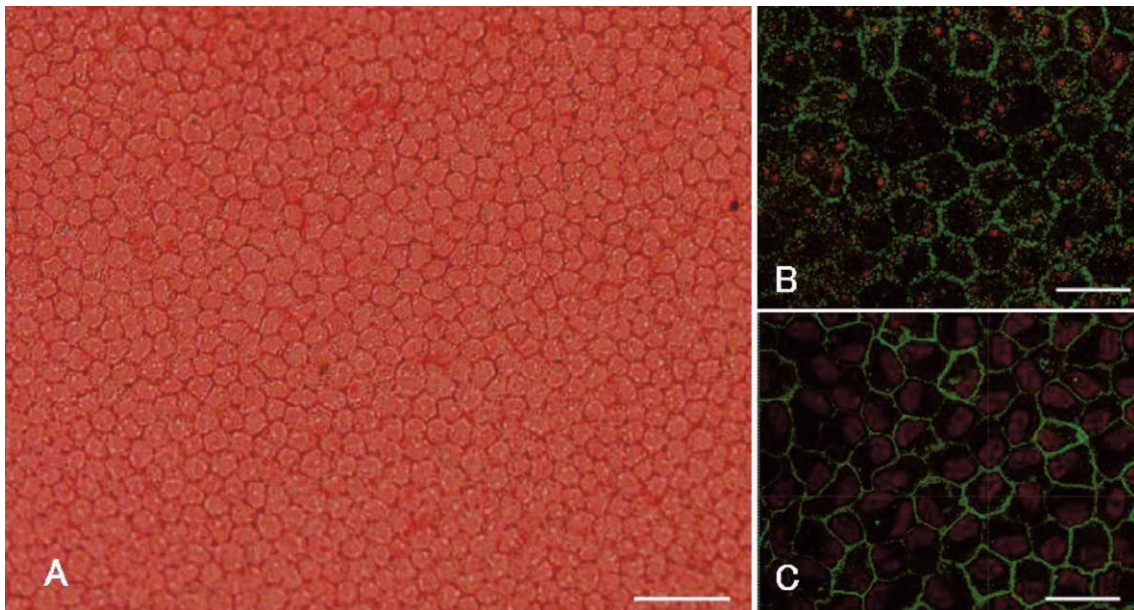


図 31 I 型コラーゲンシートを基質として作製したサル培養角膜内皮シート。

A：細胞密度は約 2,800 個/mm²で、角膜内皮細胞として良好な形態を維持していた(アリザリン染色写真)。免疫染色により、角膜内皮細胞の機能に関連する蛋白質である zonula occludens(ZO)-1(B)および Na⁺-K⁺ATPase(C)を発現していた(緑)。スケールバーは、50 μm(A), 30 μm(B, C)。

(文献 102 より許可を得て転載)

キャピラリー電気泳動/質量分析計などを用いる解析技術の発展により、微量検体での網羅的アミノ酸解析が可能となった。

我々は、体液中の微量アミノ酸の解析技術を確立した味の素社の研究者との共同研究により、眼表面疾患患者および年齢、性別を異にする正常ボランティアより採取した涙液、ドライアイ患者や眼精疲労モデルボランティアより採取した涙液を用いて 23 種のアミノ酸を網羅的に解析した。その結果、涙液中のアミノ酸プロファイルは血漿とはまったく異なるものであった。炎症眼において高度に発現が亢進していたアミノ酸は酸化型のレドックス応答と考えられ、眼局所の炎症を抑制する方向に涙液のアミノ酸プロファイルがシフトしていると推測された。Stevens-Johnson 症候群、化学外傷、熱傷など炎症を伴う眼表面疾患では、正常あるいは非炎症性疾患に比べて Tau, Arg, Orn, Glu, Gln, Gly, Ala, Ser の濃度が著しく増加していることが判明した。眼表面炎症疾患では Arg が arginase により Orn に代謝される酸化型レドックス応答が明瞭であった(論文投稿中)。図 30 にクラスター解析の結果を例示する。23 種アミノ酸の濃度によってクラスター解析したものであり、上位に Stevens-Johnson 症候群、化学外傷などの難治性、炎症性疾患が位置した。この中には炎症疾患であるものの、臨床所見上は炎症のない時期の症例も含まれたことは興味深い。涙液中に存在する種々のアミノ酸は血漿とは異なる濃度で存在し、炎症制御、創傷治癒、感染防御、血管新生、免疫応答に深く関与している可能性が高いと考え

られた。

眼疾患とアミノ酸発現プロファイルとの関係が詳細に明らかになれば、生体にとって安全なアミノ酸を補充することは容易であることから、眼疾患の新しい具体的治療に結びつく可能性がある。例えば、難治性の眼表面疾患の多くは重症ドライアイを伴っているが、治療のために用いられる人工涙液にはアミノ酸が配合されていない。このため人工涙液の点眼が、眼表面のホメオスタシスを大きく変動させている可能性がある。アミノ酸は、腸管粘膜上皮細胞において解明されている研究から概想すると、眼表面の感染防御や創傷治癒にも関与している可能性が高く、本研究は新規な治療用点眼薬、眼科用薬の開発につながり、新しい概念の眼科治療に結びつく可能性がある。また眼科において、全身疾患での血液検査、髄液検査に該当するように、涙液を用いたアミノ酸発現プロファイルの有用性が明らかになれば、客観的な病態把握が可能となり、眼疾患の病態あるいは疾患ステージを客観的に判断できる新しい診断技術の開発につながる可能性がある。

VII 角膜内皮障害の治療

1. 研究の背景

ヒトやサルなどの霊長類の角膜内皮細胞は、生体内における増殖能がきわめて乏しいことが知られており、種々の原因によって角膜内皮細胞が広範に障害されると水疱性角膜症による重篤な視力障害を来す。水疱性角膜症は、先進諸国における角膜移植の主要原因疾患であ

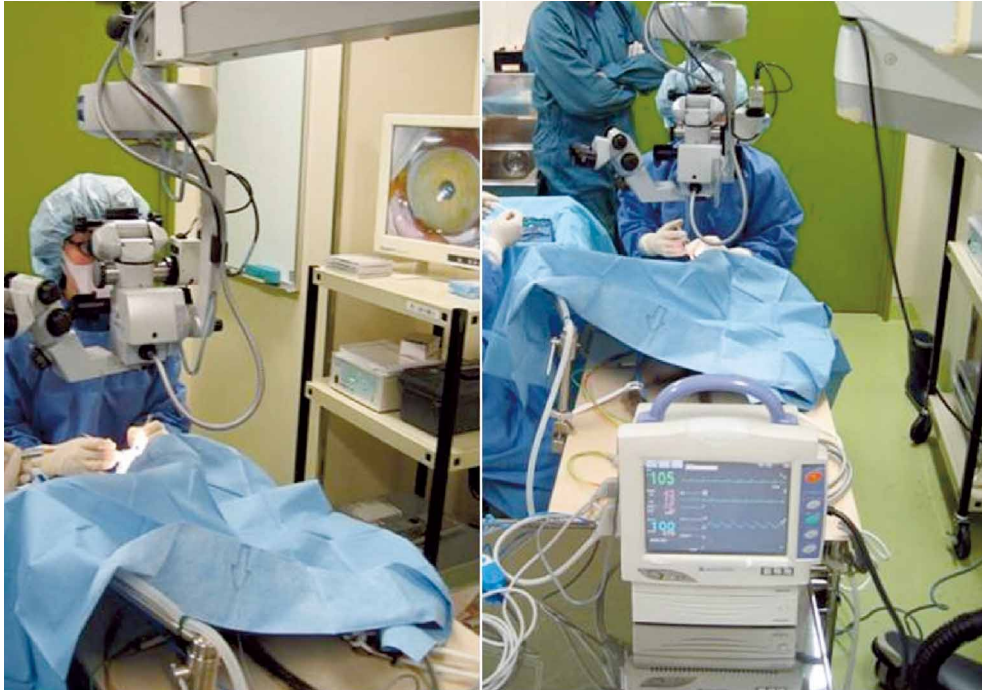


図 32 霊長類を用いた移植実験。

ヒトの角膜移植に準じる設備を用いてカニクイザルの移植実験を行っている(滋賀医科大学動物生命科学研究所にて)。

(文献 104 より許可を得て転載)

り²³⁾¹⁰⁰⁾、今後ますます増加することが予想されている。水疱性角膜症に対する治療法としては、Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) あるいは Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK) と呼称される角膜内皮移植術が、全層角膜移植に代わる水疱性角膜症の外科的治療法として急速に広まりつつある。DSAEK や DMEK には、角膜乱視が少なく早期に視力回復が得られるメリットがある一方で、周辺部の角膜内皮細胞も障害されている水疱性角膜症においては、移植後の角膜内皮細胞密度の低下が問題となることは全層角膜移植と同様である。このような背景のもとに、我々は水疱性角膜症に対する新規治療法の開発を目指して、生体外で培養した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できた¹⁰¹⁾。特に昨今では、ヒトへの臨床応用を目指した角膜内皮研究を行うためには、生体内における角膜内皮細胞の増殖能が乏しいサルを用いた移植実験が必要であると考え、サル水疱性角膜症モデルを用いた研究を行っている^{102)~104)}。

2. カニクイザル培養角膜内皮シートの作製と移植術

カニクイザルの角膜から角膜内皮細胞を採取し、コーティングを施した細胞培養用プレート上に播種して初代培養を行った。さらに 3, 4 継代培養した角膜内皮細胞を I 型コラーゲンシートに播種し、培養角膜内皮細胞シートを作製した。培養には、ウシ胎仔血清 (FBS)、bFGF (basic fibroblast growth factor) を加えた DMEM 培地を用いている。I 型コラーゲンシート上で培養した

カニクイザル角膜内皮細胞は、細胞密度約 2,800 個/mm²の六角形細胞を主とする多角形細胞からなり、角膜内皮細胞のバリアー機能およびポンプ機能に関連する蛋白質を発現していることを確認した¹⁰²⁾(図 31)。

全身麻酔下で、カニクイザルの角膜内皮細胞を可能な限り周辺部まで機械的搔爬により除去し、直径 6 mm の培養サル角膜内皮シートを角膜裏面に移植した(図 32)。培養角膜内皮シート移植眼では、翌日にはすべての個体で培養角膜内皮シートがホストの Descemet 膜に接着しており、角膜浮腫は軽度であった。2 週間には移植した培養角膜内皮シートが前房内に脱落したにもかかわらず、ホストの角膜は良好な透明性を回復した(図 33)。我々は DiI 標識シート移植眼の観察により、DiI 陽性のドナー角膜内皮細胞が、移植後眼の Descemet 膜上に生着していることを確認した¹⁰²⁾。本実験の結果から、間接的にはあるが、移植したドナーの角膜内皮細胞が移植後の眼内で増殖し、ホスト眼の Descemet 膜上に移動し生着した可能性が示唆された。一方、コラーゲンシートのみを移植、あるいは培養サル角膜内皮細胞の懸濁液の前房内注入を行った対照眼では、移植翌日から著明な角膜浮腫を認め、その後も角膜は透明性を回復することなく水疱性角膜症となった。このことは、過去に報告されているとおり、生体内におけるカニクイザル角膜内皮細胞の増殖能は限られており、周辺部に残存したホストの角膜内皮細胞のみからでは角膜の透明性を回復することができず、角膜内皮再生医療研究を行ううえでの有用

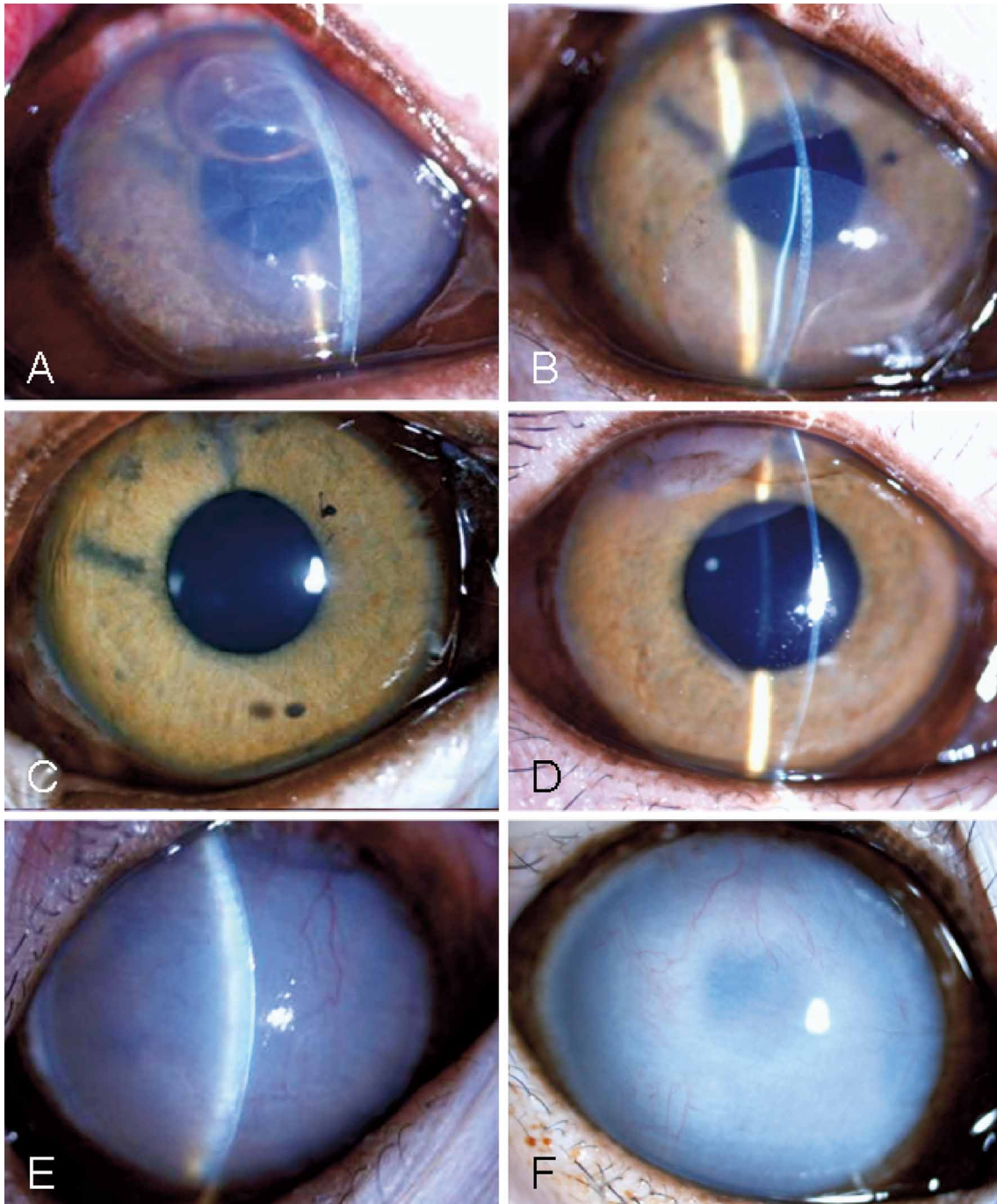


図 33 サル培養角膜内皮シート移植術.

A: 移植後の培養角膜内皮シートは角膜裏面に良好に接着し、角膜浮腫は軽度であった。B: 移植 14 日後には角膜は透明性を回復したが、培養角膜内皮シートは前房内に脱落した。C: 移植 6 か月後にも角膜は透明性を維持した(脱落したシートは摘出)。D: 培養内皮シート移植を行った別の個体でも同様の経過をたどり、6 か月まで角膜は透明性を維持した。E: コラーゲンシート移植のみを行った対照眼では、6 か月後には強い角膜浮腫と血管新生を認めた。F: 培養角膜内皮細胞の懸濁液を前房注入した対照眼でも、6 か月後には同様に強い角膜浮腫と血管新生を認めた。これらの対照眼では、いずれも手術後早期から不可逆性の角膜内皮機能不全となり、1 年以上にわたって回復することはなく、ヒトの水疱性角膜症と類似した経過となった。

(文献 102 より許可を得て転載)

な動物モデルとなることを示している。培養角膜内皮シート移植眼では、移植後 6 か月の角膜内皮スペキュラーで $1,992 \sim 2,475$ 個/mm² の正常角膜内皮細胞に類

似した多角形細胞が観察され、摘出した角膜組織の電子顕微鏡による観察でも、形態的に正常角膜に類似した多角形細胞が認められた。長期観察を行っている個体で

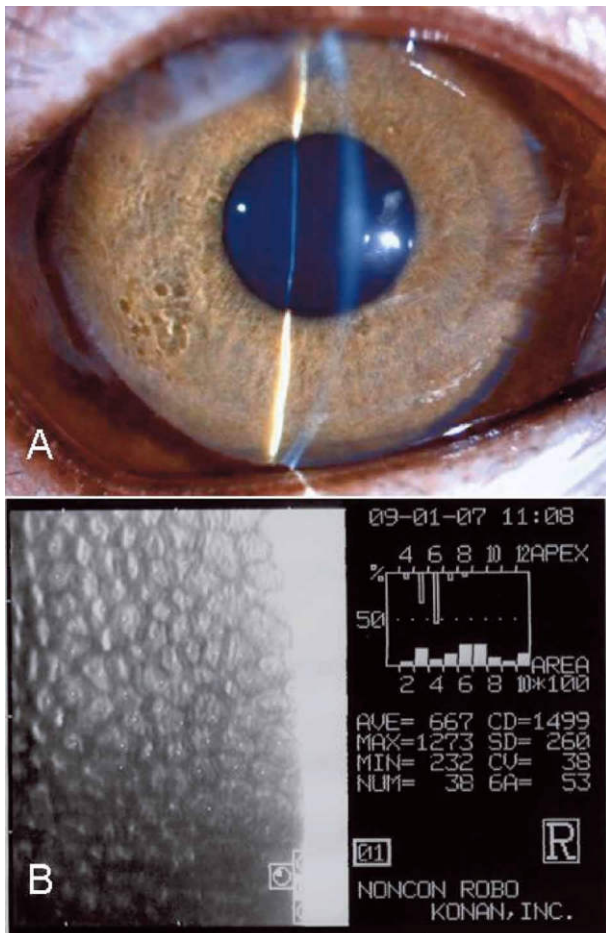


図 34 サル培養角膜内皮シート移植後 4 年の角膜所見。角膜は透明性を維持しており(A), 内皮スペキュラーでは密度約 1,500 個/mm²の角膜内皮細胞が観察された(B)。

(文献 104 より許可を得て転載)

は、移植後 4 年が経過した現在も透明角膜を維持しており、培養角膜内皮シート移植の長期の有用性を示唆している¹⁰²⁾(図 34)。

現在我々は、マイクロケラトームを用いて作製したヒト角膜実質グラフトを基質として、DSAEK に準じる手法でサル培養角膜内皮細胞シートを移植¹⁰²⁾する、培養 DSAEK の開発に着手しており、ウサギおよびカニクザルを用いた移植実験で角膜が透明性を回復する結果を得ている¹⁰⁵⁾。培養角膜内皮シート移植では、増殖能力が高く細胞機能の良いドナー角膜内皮細胞をマスター細胞として移植用内皮シートを作製できること、高密度に培養した角膜内皮シートを移植することができること、移植後の眼内においても一定の期間、増殖能をもち続ける角膜内皮シートを移植することができること、さらに HLA を適合させることができることなどのメリットがあると考えられ、今後も臨床応用を目指した研究を進めたいと考えている。

3. 選択的 Rho キナーゼ阻害剤を用いた霊長類角膜内皮細胞培養法の確立

サルを用いた研究で上記のような成果が得られている一方で、我々の方法ではヒト角膜内皮培養法の確立は容易ではなかった。ヒト角膜内皮細胞を *in vitro* で培養することが可能であることは過去に報告されているが、我々の培養条件では *in vitro* で培養したヒト角膜内皮細胞を継代培養すると、容易に線維芽細胞様の形態に変化してしまっ。そこで我々は、ヒト角膜内皮細胞を正常の形態を保持したまま、効率的に培養することを目指して、薬剤の併用や培養方法の改良を行っている。その一つは、ヒト胚性幹細胞の培養に対する有用性が報告されている選択的 Rho キナーゼ阻害剤の一種である Y-27632 である¹⁰⁶⁾。Rho キナーゼは低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的蛋白質として同定されたセリンスレオニンリン酸化酵素である¹⁰⁷⁾¹⁰⁸⁾。最近の研究では、Rho キナーゼをターゲットとした種々の薬剤の開発が行われており、心血管系疾患、神経疾患、癌、緑内障などさまざまな疾患に対して選択的 Rho キナーゼ阻害剤の有用性が報告されている。そこで、我々は Rho キナーゼ阻害剤による霊長類角膜内皮細胞への影響について検討した¹⁰⁹⁾。

カニクザルの角膜内皮細胞を Descemet 膜とともに剥離し、ディスパーゼを用いて回収後、培養を行った。培地は 10% FBS と 2 ng/ml bFGF を添加した DMEM 培地を対照として用いて、選択的 Rho キナーゼ阻害剤である Y-27632 を培地に加えた。Y-27632 添加群では、対照と比べて培養開始 24 時間後の接着細胞数が有意に増加し、均一な角膜内皮細胞からなる大きなサイズのコロニーが形成され、早期にコンフルエントに到達した。細胞形態も良好で、高密度で均一な六角形細胞からなる単層細胞層が得られた(図 35)。増殖細胞のマーカーである Ki 67 を用いたフローサイトメトリーによる解析では、継代後 24 時間、48 時間ともに Y-27632 添加群における Ki 67 の陽性率が有意に高く、Y-27632 は角膜内皮細胞の細胞増殖を促進することが示された(図 36)。Annexin V を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシスに対する影響の検討では、継代後 24 時間の解析で、対照群では 12.4±4.6(平均値±標準偏差)% の細胞が Annexin V 陽性のアポトーシス細胞であったのに対し、Y-27632 群では Annexin V 陽性細胞の割合は 2.0±1.6% と有意に減少しており、Y-27632 は角膜内皮細胞のアポトーシスを抑制することも示された(図 37)。

我々の検討において、選択的 Rho キナーゼ阻害剤である Y-27632 は、霊長類の角膜内皮細胞に対して細胞接着の促進、細胞増殖の促進、アポトーシスの抑制といった効果を有することが明らかになった。我々は、Y-27632 を培養系に用いることでヒト角膜内皮細胞を良好な形態を維持したまま効率的に培養することができるようになっており、ヒト培養角膜内皮細胞シート移植は

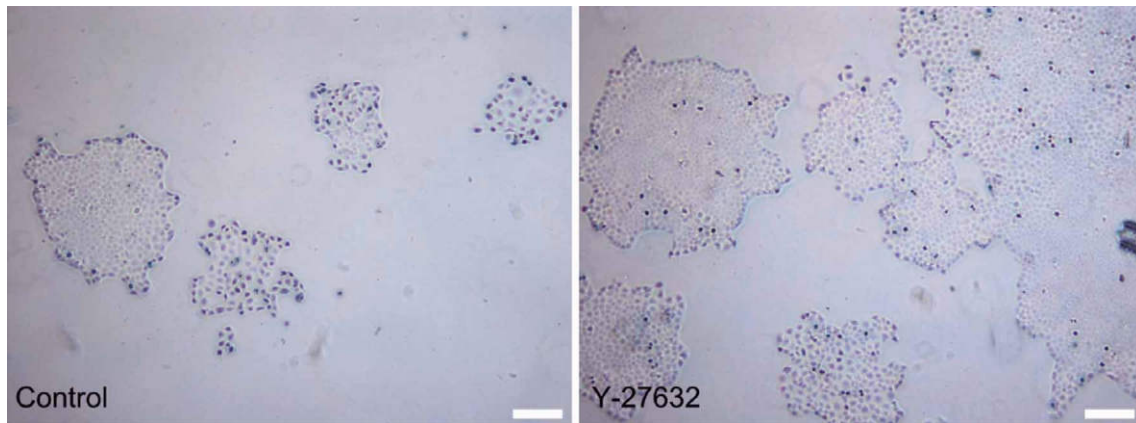


図 35 初代培養 3 日目の位相差顕微鏡写真.

Y-27632 の添加群 (右) において対照 (左) と比べ角膜内皮細胞のコロニーは大きく, 細胞形態に特記すべき異常を認めない. スケールバーは 250 μm .

(文献 109 より許可を得て転載)

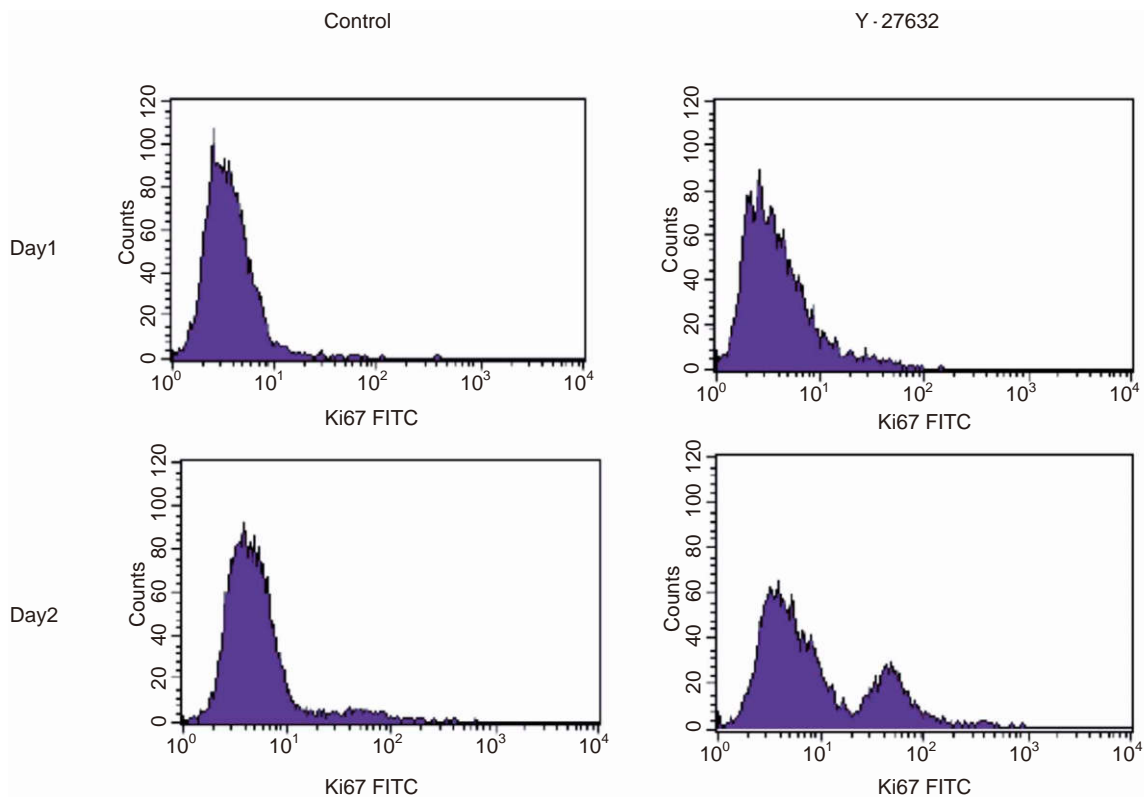


図 36 抗 Ki 67 抗体によるフローサイトメトリー.

細胞増殖のマーカーである Ki 67 の陽性率は継代後 24 時間 ($p < 0.05$), 48 時間 ($p < 0.01$) とともに Y-27632 群において有意に高かった.

(文献 109 より許可を得て転載)

現実味を帯びてきていると考えている.

4. 水疱性角膜症に対する新規治療法の開発の試み

我々は, 水疱性角膜症を, 可能であれば, 低侵襲な薬物治療により治療する方法を確立したいと考えており, ある種の薬物の前房内注入や点眼投与などによる治療法の開発を試みている. ギャップジャンクションを構成する蛋白質の一つであるコネキシン 43 は, 細胞結合に関

与するのみならず, さまざまな組織の創傷治療においても重要な役割を果たしていることが知られているが, 2008 年に我々のグループの中野らは, コネキシン 43 の siRNA を前房内に注入することによってラット角膜内皮細胞の創傷治療を促進させることができることを報告した¹¹⁰⁾. コネキシン 43 siRNA の前房内投与は, 角膜内皮細胞の増殖能が低いサル角膜内皮障害モデルにおい

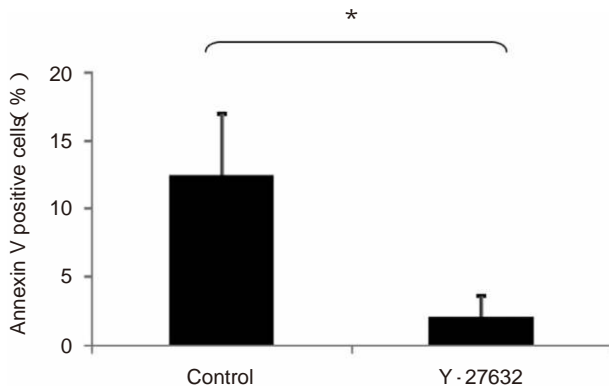


図 37 Annexin V を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシス解析。

継代後 24 時間で対照群では 12.4 ± 4.6 (平均値 \pm 標準偏差) % の細胞が Annexin V 陽性のアポトーシス細胞であったのに対し、Y-27632 群では 2.0 ± 1.6 % と有意に抑制されていた。* : $p < 0.01$ 。

(文献 109 より許可を得て転載)

でも同様の効果を示し、角膜内皮細胞の増殖促進、創傷治癒促進効果が認められている¹¹¹⁾。現在、我々は、角膜内皮障害の治療に有用な新しい前房内ドラッグデリバリーシステムの開発や、先に示した選択的 Rho キナーゼ阻害剤などの細胞接着を亢進する作用をもつ薬剤を併用した、前房内細胞注入治療の開発にも着手しており、今後これらの薬物を用いた水疱性角膜症の治療が可能になると信じている。さらに、前述の選択的 Rho キナーゼ阻害剤は、*in vitro* および *in vivo* の角膜内皮障害モデルにおいて、霊長類の角膜内皮細胞を増殖させる効果があることを確認しており¹¹²⁾、まもなく京都府立医科大学倫理委員会の承認を得て臨床研究を開始する予定である。将来的には、角膜内皮障害を移植のみならず薬物によっても治療できる日が来ることを目標に研究を進めている。

Ⅷ 涙液検査の近未来

1. 涙液量測定法の開発

ドライアイは、最近の考え方によれば、涙液と上皮の慢性疾患とされ、その上流にはさまざまなリスクファクターが存在し、眼不快感のみならず視機能異常を来すとされている¹¹³⁾。ドライアイの診断には、症状、涙液異常、上皮の異常の検査が必須であり、我が国では一定の診断基準が既に設けられている¹¹⁴⁾。

ドライアイの原因となる涙液異常には、量的異常と質的異常があるが、いずれも涙液の安定性の低下、ひいては眼表面の上皮障害を来す原因となる。したがって、ドライアイの的確な診断のためには、涙液の量と質の異常を正確に評価できる検査法が必要である。しかし、現行の涙液検査では、量の検査としてシルマーテスト、質の検査としてフルオレセイン BUT の測定が行われ¹¹⁴⁾、い

ずれも眼表面に対して少なからず侵襲を与える。さらに、シルマーテストは、眼表面のその場の涙液量を反映する検査法とはいいがたい。そこで、非侵襲的な涙液の評価方法として角膜形状解析や波面収差解析を応用した評価法¹¹⁵⁾¹¹⁶⁾や optical coherence tomography (OCT) を利用した涙液メニスカスの計測法¹¹⁷⁾などが開発されているが、正規のドライアイ検査に位置づけられるものとはなっていない。このようななかで、我々は、非侵襲かつ定量的な新しい涙液検査法の開発に取り組んできた。

まず、我々は、涙液の量的検査として、Oxford 大学との共同研究により、ビデオメニスコメトリー法を完成させた¹¹⁸⁾¹¹⁹⁾。本法は、涙液メニスカスの凹面形状に着目して、下方の涙液メニスカス中央に水平格子縞を投影し、その鏡面反射像を得る方法であり、凹面鏡の光学式に基づいて、涙液メニスカスの曲率半径 (R) を非侵襲かつ非接触的に得ることができる (図 38 上段)。我々は R が、眼表面全体の涙液量と一次相関を示すことを示した¹¹⁸⁾、そのため、本法は、涙液量の検査としてドライアイに応用できるだけでなく、点眼液の薬物動態や副作用の解析にも利用できる応用範囲の広い方法と考えられる^{120)–122)}。

2. 涙液油層にかかわる検査法の開発

一方、我々は、涙液油層に着目し、油層情報から、涙液の量的・質的異常を定量的に評価しうる方法の開発に取り組んできた。涙液油層はマイボーム腺から分泌される油脂により構成され、液層の水分蒸発を防ぐとともにその安定性を保持する働きをもつ。また、厚さ約 100 nm 程度の薄膜として振舞うため、光の反射による干渉像を得ることができる。我々は、涙液油層の干渉像を観察するための専用装置として DR-1[®] (興和社製) を共同開発したが、本装置により、①開眼後の油層の伸展挙動¹¹⁵⁾、②伸展後の油層像¹²³⁾ (図 38 中段)、そして③開眼維持による涙液破綻像¹²⁴⁾ の 3 つの情報を得ることができる。そこで、我々は、伸展後の油層像に着目して定性的な Grade 分類を作成し、健常眼とドライアイで Grade 分布が異なること、ドライアイの重症度と Grade との間に有意な相関があることを報告した¹²³⁾。次に、開眼維持による涙液破綻までの時間 (non-invasive break-up time) を涙液の安定性の指標として、防腐剤が涙液に与える影響¹²⁴⁾ や外部環境がソフトコンタクトレンズ表面の涙液に与える影響¹²⁵⁾ の評価に応用した。

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¹²⁶⁾、液層の厚みに依存した“粘弾性挙動”を取り、その伸展速度は $V = (h/\mu) \cdot dT/dx$ (V = 油層の上方伸展速度、 h = 液層の厚み、 μ = 液層の粘度) で記述されるという¹²⁷⁾。一方、角膜上の涙液層の厚み (H) と涙液メニスカス曲率半径 (R) の間には、 $H = 2.12 \cdot R(\mu'U/\rho)^{2/3}$ (H = 角膜上の涙液層の厚み、 R = 涙液メニスカス曲率半径、 μ' = 涙液の粘度、

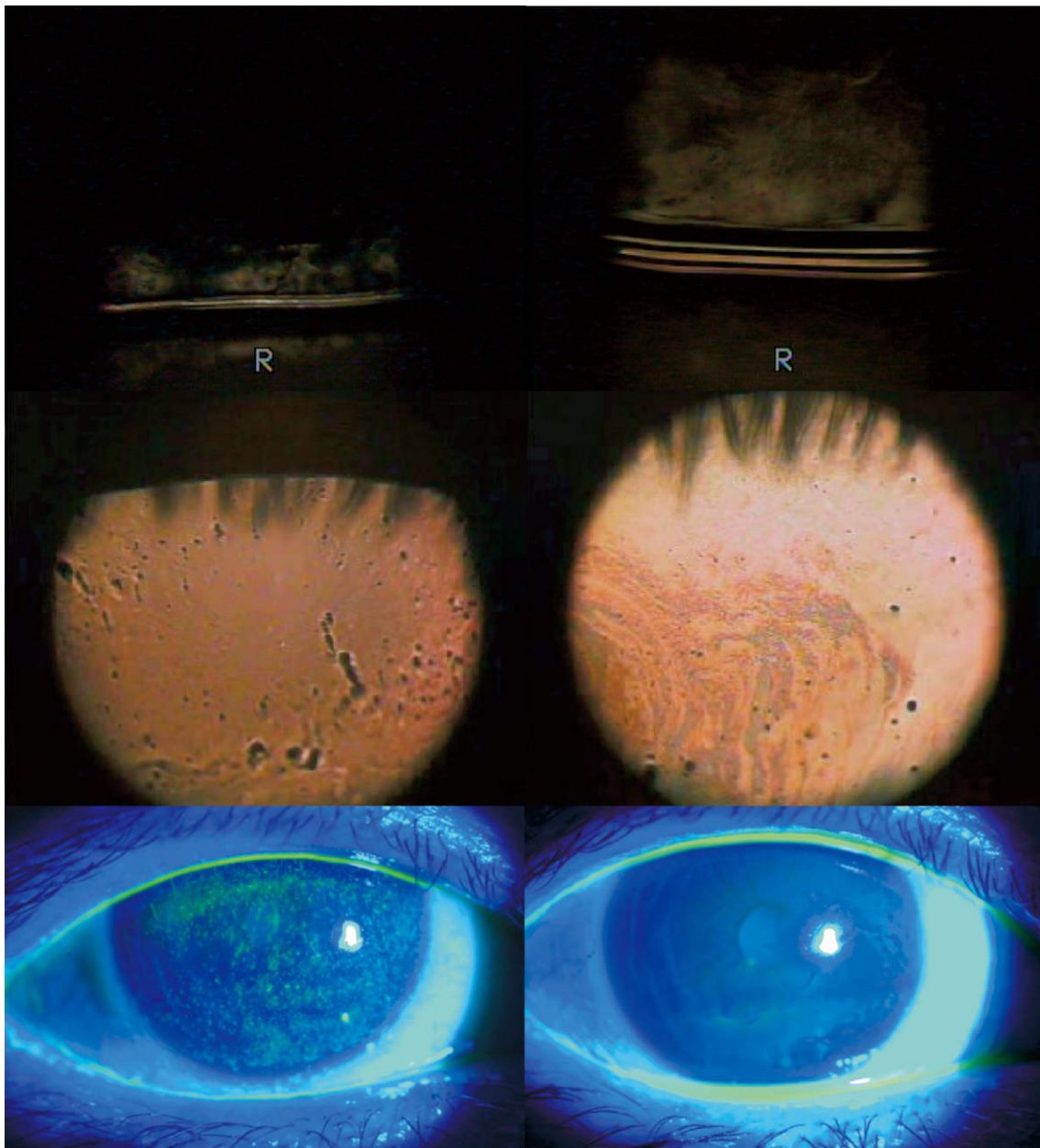


図 38 上・下の涙点プラグ挿入前(左列)・後(右列)におけるメニスコメトリーにおけるイメージ(上段), 涙液油層像(中段), および, フルオレセイン染色像(下段).
涙点プラグを上・下涙点に挿入することにより, 涙液貯留量は増加し[左上段: 涙液メニスカス曲率半径 (R)=0.11 mm, 右上段: R=0.22 mm], プラグ挿入前にみられなかった(左中段)涙液油層像がみられるようになり(右中段), 高度の角膜上皮障害(左下段)が消失している(右下段)ことが分かる.

U = 開眼速度, ρ = メニスカス涙液の表面張力)の関係がある¹²⁸⁾ため, $H \approx h$ の関係から $V = 2.12 \cdot R(\mu U / \rho)^{2/3} \cdot (dT/dx) / \mu$ の関係が得られる. そしてこのことは, 油層伸展の解析により, R , ひいては, 角膜上の涙液厚の情報が得られる可能性を示している. 我々は, 涙液油層が粘弾性挙動を取るとする仮説¹²⁷⁾に基づいて, 粘弾性挙動を取り扱う分野であるレオロジーのモデルの1つ〔Voigtモデル(図39上段)〕を涙液油層の解析に応用した. その結果, 油層の上方伸展距離 $H(t)$ は, きわめて良好に Voigtモデルで近似されることが明らかになった

〔 $H(t) = \rho(1 - e^{-t/\lambda})$; $H(t)$: 伸展油層距離(mm), ρ : 定数, t : 時間(秒), λ : 緩和時間(秒)] (図39中段). そして, 油層の伸展初速度 $H'(0)$ と R の間に有意な相関があることが示された¹²⁹⁾(図40). このことは, 涙液油層伸展に関する基礎理論¹²⁷⁾の証明になるとともに, 涙液油層の伸展挙動の Voigtモデルによる解析によって, 角膜上の涙液の厚み情報が得られうる可能性を示したことになる.

ドライアイにおいては, 一般に涙液と上皮の相互作用に悪循環が生じ, その悪循環の上流にさまざまなリスク

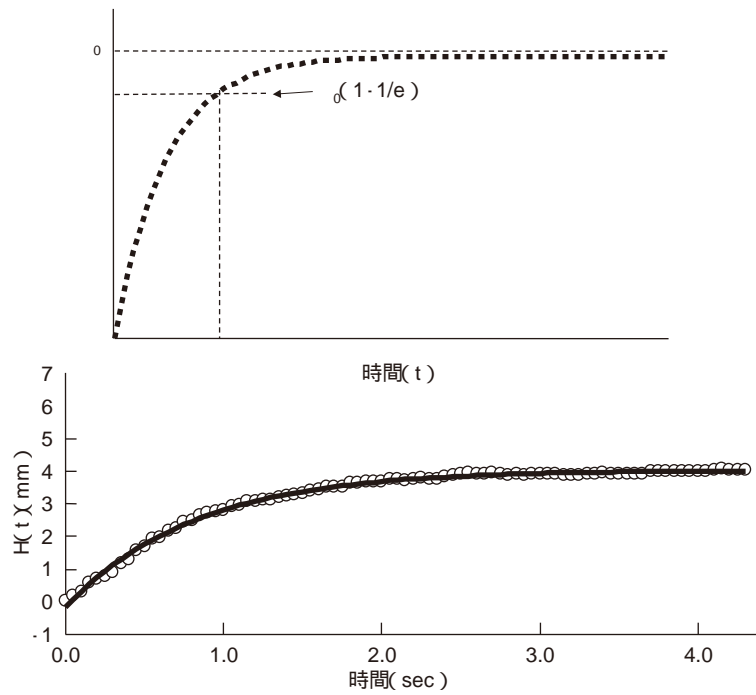


図 39 レオロジーの Voigt モデル(上段)と代表症例における開瞼後の涙液油層の上方伸展距離の経時変化(下段).
 下段グラフの実線は, Voigt モデルで描かれるグラフ. 上段において, $\gamma = \gamma_0[1 - e^{-(t/\lambda)}]$ [γ : バネの伸び, γ_0 : $t = \infty$ のときの γ , λ : 遅延時間 $= \gamma_0(1 - 1/e)$]. 下段において, 涙液油層の上方伸展距離は, Voigt モデルとよく一致することが分かる. 本症例の油層の伸展初速度は $H'(0) = 5.04 \text{ mm/sec}$ となった.

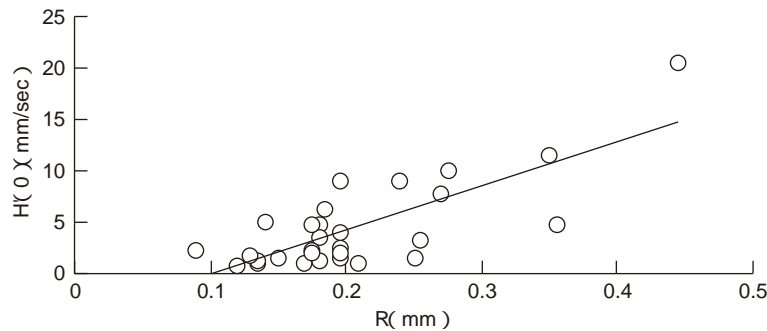


図 40 涙液メニスカス曲率半径(R)と涙液油層の上方伸展初速度 [$H'(0)$] の相関.
 両者の間には, 有意な相関がみられた [$r = 0.573 (p = 0.003)$].
 (文献 129 より許可を得て転載)

ファクターが存在する¹¹³⁾. なかでも涙液減少は最も大きなリスクファクターであり, 日常臨床において, 涙液減少のスクリーニング, すなわち, 涙液の量的検査は, ドライアイ診断に不可欠といっても過言ではない. その究極の検査は, 角膜上の涙液の液層の厚みを計測できる方法であるが, 現在までのところ, ドライアイに応用できるまでには至っていない¹²⁶⁾. 油層動態解析は, 角膜上の涙液の量と質の情報を低侵襲(白色光を当てのみ), 定量的(ともに数値として得られる)に得ることのできる, 近未来の検査法と考えられ, 涙液の量と質の異常によるドライアイを一つの検査法で鑑別できるポテンシャルをもつと考えられる. 今後のこの領域の研究の進

歩が新しいドライアイ検査法の確立につながると考えている.

IX おわりに

角膜疾患の未来医療に向けた我々の研究を 7 項目に分けて概説したため, その内容は一見羅列した研究紹介のように感じられたかもしれない. しかしながら, これは, 難治な眼表面疾患そして角膜内皮疾患の治療を長年にわたって行ってきた, 多方面からの研究開発アプローチが必須であることを身に沁みて感じてきたためである. ご理解いただきたい. さらに, 眼表面の自然免疫, 細胞内レドックス状態とアミノ酸代謝, Stevens-Johnson

症候群の遺伝子多型とサイトカイン・ストームなどといった新しい視点については、一部の新規データ(未公表)を示していないため、我々の統合的な考え方が十分にご理解いただけなかったかもしれない。いずれ別の機会に、生物学、免疫学、微生物学を踏まえた我々の統合的な概念を示す予定である。

本稿を終えるにあたり、第113回日本眼科学会総会における特別講演の機会を賜りました日本眼科学会特別講演選考委員ならびに日本眼科学会評議員の皆様、第113回日本眼科学会総会会長の澤 充先生、本講演の座長の労をお取りいただきました西田輝夫先生に感謝申し上げます。

恩師の大阪大学名誉教授眞鍋禮三先生、故大阪大学教授田野保雄先生には長年にわたるご厚情に、そして京都府立医科大学眼科学教室の全教職員ならびに明交会諸氏には温かいご支援に深甚なる謝意を表します。また、共同研究者の一人ではありますが、貴重なご助言とご指導を賜りました羽室淳爾先生に御礼を申し上げます。最後に、第11代大阪大学総長であった山村雄一先生から私が学位授与時にいただいた言葉を若手研究者に伝え、筆を置きたいと思えます。

夢みて行い、考えて折る。人生には必要なものが3つある。それは夢とロマンと反省だ。

文 献

- 1) 中泉行徳：稀有ナル角膜變状ニ就テ附右病理組織標本供覧。日眼会誌 18 : 949—950, 1914.
- 2) Mondino BJ, Rabb MF, Sugar J, Sundar Raj CV, Brown SI : Primary familial amyloidosis of the cornea. *Am J Ophthalmol* 92 : 732—736, 1981.
- 3) Weber FL, Babel J : Gelatinous drop-like dystrophy. A form of primary corneal amyloidosis. *Arch Ophthalmol* 98 : 144—148, 1980.
- 4) Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Nishida K, Shimomura Y, Tano Y, et al : Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat Genet* 21 : 420—423, 1999.
- 5) Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Okada M, Yamamoto S, Maeda N, et al : Homozygosity mapping of a gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy to chromosome 1p. *Am J Hum Genet* 63 : 1073—1077, 1998.
- 6) Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, et al : High expression of TROP 2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 99 : 1290—1295, 2008.
- 7) Fong D, Spizzo G, Gostner JM, Gastl G, Moser P, Krammel C, et al : TROP 2 : a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Mod Pathol* 21 : 186—191, 2008.
- 8) Muhlmann G, Spizzo G, Gostner J, Zitt M, Maier H, Moser P, et al : TROP 2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 62 : 152—158, 2009.
- 9) Ripani E, Sacchetti A, Corda D, Alberti S : Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. *Int J Cancer* 76 : 671—676, 1998.
- 10) Klintworth GK, Valnickova Z, Kielar RA, Baratz KH, Campbell RJ, Enghild JJ : Familial subepithelial corneal amyloidosis—a lactoferrin-related amyloidosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2756—2763, 1997.
- 11) Nishida K, Quantock AJ, Dota A, Choi-Miura NH, Kinoshita S : Apolipoproteins J and E colocalise with amyloid in gelatinous drop-like and lattice type I corneal dystrophies. *Br J Ophthalmol* 83 : 1178—1182, 1999.
- 12) Kinoshita S, Nishida K, Dota A, Inatomi T, Koizumi N, Elliott A, et al : Epithelial barrier function and ultrastructure of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Cornea* 19 : 551—555, 2000.
- 13) Quantock AJ, Nishida K, Kinoshita S : Histopathology of recurrent gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Cornea* 17 : 215—221, 1998.
- 14) Takaoka M, Nakamura T, Ban Y, Kinoshita S : Phenotypic investigation of cell junction-related proteins in gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1095—1101, 2007.
- 15) Thoft RA : Conjunctival transplantation. *Arch Ophthalmol* 95 : 1425—1427, 1977.
- 16) Thoft RA : Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* 97 : 1—6, 1984.
- 17) Kinoshita S, Ohashi Y, Ohji M, Manabe R : Long-term results of keratoepithelioplasty in Mooren's ulcer. *Ophthalmology* 98 : 438—445, 1991.
- 18) Kenyon KR, Tseng SC : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96 : 709—722 ; discussion 722—703, 1989.
- 19) Tsai RJ, Tseng SC : Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 13 : 389—400, 1994.
- 20) Pellegrini G, Traverso CE, Franz AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349 : 990—993, 1997.
- 21) Tsai RJ, Li LM, Chen JK : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 343 : 86—93, 2000.
- 22) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108 : 1569—1574, 2001.
- 23) Shimazaki J, Amano S, Uno T, Maeda N, Yokoi N : National survey on bullous keratopathy in Japan. *Cornea* 26 : 274—278, 2007.
- 24) Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, et al : Sterilized, freeze-dried amniotic membrane : a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol*

- Vis Sci 45 : 93—99, 2004.
- 25) **Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, et al** : Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 72 : 1478—1485, 2001.
 - 26) **Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al** : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77 : 379—385, 2004.
 - 27) **Maruyama K, Yamada J, Sano Y, Kinoshita S** : Th 2-biased immune system promotion of allogeneic corneal epithelial cell survival after orthotopic limbal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4736—4741, 2003.
 - 28) **Friend J, Kinoshita S, Thoft RA, Eliason JA** : Corneal epithelial cell cultures on stromal carriers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23 : 41—49, 1982.
 - 29) **Ohji M, SundarRaj N, Hassell JR, Thoft RA** : Basement membrane synthesis by human corneal epithelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 479—485, 1994.
 - 30) **Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S** : Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 19 : 65—71, 2000.
 - 31) **Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, et al** : An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2114—2121, 2002.
 - 32) **Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S** : Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 20 : 173—177, 2000.
 - 33) **Koizumi N, Kinoshita S** : Ocular surface reconstruction, amniotic membrane, and cultivated epithelial cells from the limbus. *Br J Ophthalmol* 87 : 1437—1439, 2003.
 - 34) **Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K, et al** : Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245 : 123—134, 2007.
 - 35) **Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ** : Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2506—2513, 2000.
 - 36) **Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, et al** : Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* 76 : 735—743, 2003.
 - 37) **Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S** : Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 119 : 298—300, 2001.
 - 38) **Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S** : Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* 82 : 468—471, 2004.
 - 39) **Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, et al** : The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 106—116, 2003.
 - 40) **Nakamura T, Kinoshita S** : Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 22 : S 75—80, 2003.
 - 41) **Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S** : Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 88 : 1280—1284, 2004.
 - 42) **Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S** : Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 141 : 267—275, 2006.
 - 43) **Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S** : Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 142 : 757—764, 2006.
 - 44) **Nakamura T, Ang LP, Rigby H, Sekiyama E, Inatomi T, Sotozono C, et al** : The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 909—916, 2006.
 - 45) **Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Yokoi N, et al** : Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 113 : 1765—1772, 2006.
 - 46) **Ang LP, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, et al** : Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplants for severe ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 124 : 1543—1551, 2006.
 - 47) **Nakamura T, Sekiyama E, Takaoka M, Bentley AJ, Yokoi N, Fullwood NJ, et al** : The use of trehalose-treated freeze-dried amniotic membrane

- for ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 29 : 3729—3737, 2008.
- 48) Nakamura T, Inatomi T, Sekiyama E, Ang LP, Yokoi N, Kinoshita S : Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand* 84 : 401—405, 2006.
 - 49) Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S : Porcine corneal epithelial cells consist of high- and low-integrin β 1-expressing populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 3951—3954, 2004.
 - 50) Nakamura T, Endo K, Kinoshita S : Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p 75 and the role of neurotrophin/p 75 signaling. *Stem Cells* 25 : 628—638, 2007.
 - 51) Nakamura T, Ohtsuka T, Sekiyama E, Cooper LJ, Kokubu H, Fullwood NJ, et al : Hes 1 regulates corneal development and the function of corneal epithelial stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26 : 1265—1274, 2008.
 - 52) Stevens AM, Johnson FC : A new eruptive fever associated with Stomatitis and ophthalmia. *Am J Dis Child* 24 : 526—533, 1922.
 - 53) Auquier-Dunant A, Mockenhaupt M, Naldi L, Correia O, Schroder W, Roujeau JC : Correlations between clinical patterns and causes of erythema multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis : results of an international prospective study. *Arch Dermatol* 138 : 1019—1024, 2002.
 - 54) 外園千恵 : Stevens-Johnson 症候群と眼障害. *あたらしい眼科* 25 : 465—469, 2008.
 - 55) 外園千恵 : SJS と TEN の眼合併症. *最新皮膚科学体系 2008-2009*. 中山書店, 東京, 182—188, 2008.
 - 56) Kaido M, Dogru M, Yamada M, Sotozono C, Kinoshita S, Shimazaki J, et al : Functional visual acuity in Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 142 : 917—922, 2006.
 - 57) Kawasaki S, Nishida K, Sotozono C, Quantock AJ, Kinoshita S : Conjunctival inflammation in the chronic phase of Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* 84 : 1191—1193, 2000.
 - 58) 木下 茂, 外園千恵, 稲富 勉, 中村隆宏, 小泉 範子, 川崎 諭, 他 : 再生医学による重症角膜疾患の新規治療法開発への戦略的研究(ベルツ章受賞論文). *最新医学* 62 : 132—180, 2007.
 - 59) Ang LP, Sotozono C, Koizumi N, Suzuki T, Inatomi T, Kinoshita S : A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 143 : 178—180, 2007.
 - 60) Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Grueterich M, Espana EM, et al : Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 109 : 1159—1166, 2002.
 - 61) 木下 茂, 切通 彰, 大路正人, 大橋裕一, 眞鍋 禮三 : Palisades of Vogt の消失する角膜疾患. *臨眼* 40 : 363—366, 1986.
 - 62) Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, et al : Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 20 : 639—673, 2001.
 - 63) Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, et al : New grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 114 : 1294—1302, 2007.
 - 64) Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, Shirakata Y, Ikezawa Z, et al : Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology* 116 : 685—690, 2009.
 - 65) Araki Y, Sotozono C, Inatomi T, Ueta M, Yokoi N, Ueda E, et al : Successful treatment of Stevens-Johnson syndrome with steroid pulse therapy at disease onset. *Am J Ophthalmol* 147 : 1004—1011, 2009.
 - 66) Ueta M, Iida T, Sakamoto M, Sotozono C, Takahashi J, Kojima K, et al : Polyclonality of *Staphylococcus epidermidis* residing on the healthy ocular surface. *J Med Microbiol* 56 : 77—82, 2007.
 - 67) Sotozono C, Inagaki K, Fujita A, Koizumi N, Sano Y, Inatomi T, et al : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections in the cornea. *Cornea* 21 : S 94—101, 2002.
 - 68) Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Tashiro K, Hamuro J, et al : Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in Japanese patients with Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* 91 : 962—965, 2007.
 - 69) Ueta M : Innate immunity of the ocular surface and ocular surface inflammatory disorders. *Cornea* 27 : S 31—40, 2008.
 - 70) Ueta M, Hamuro J, Yamamoto M, Kaseda K, Akira S, Kinoshita S : Spontaneous ocular surface inflammation and goblet cell disappearance in $I\kappa B\zeta$ gene-disrupted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 579—588, 2005.
 - 71) Ueta M, Kinoshita S : Innate immunity of the ocular surface. *Brain Research Bulletin* 81 : 219—228, 2010.
 - 72) Ueta M, Hamuro J, Ueda E, Katoh N, Yamamoto M, Takeda K, et al : Stat 6-independent tissue inflammation occurs selectively on the ocular surface and perioral skin of $I\kappa B\zeta^{-/-}$ mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 3387—3394, 2008.
 - 73) Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Hamuro J, Kinoshita S : Association of IL4R polymorphisms with Stevens-Johnson syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 120 : 1457—1459, 2007.
 - 74) Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Hamuro J, Kinoshita S : Association of combined IL-13/IL-4R signaling pathway gene polymorphism

- with Stevens-Johnson syndrome accompanied by ocular surface complications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 1809—1813, 2008.
- 75) **Ueta M, Hamuro J, Kiyono H, Kinoshita S** : Triggering of TLR 3 by polyI : C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 331 : 285—294, 2005.
- 76) **Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kojima K, Hamuro J, Kinoshita S** : Association of Fas Ligand gene polymorphism with Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* 92 : 989—991, 2008.
- 77) **Ueta M, Sotozono C, Tokunaga K, Yabe T, Kinoshita S** : Strong association between HLA-A* 0206 and Stevens-Johnson syndrome in the Japanese. *Am J Ophthalmol* 143 : 367—368, 2007.
- 78) **Ueta M, Tokunaga K, Sotozono C, Inatomi T, Yabe T, Matsushita M, et al** : HLA class I and II gene polymorphisms in Stevens-Johnson syndrome with ocular complications in Japanese. *Mol Vis* 14 : 550—555, 2008.
- 79) **Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, et al** : HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Pharmacogenomics* 9 : 1617—1622, 2008.
- 80) **Sotozono C, Ueta M, Kinoshita S** : Systemic and local management at the onset of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Am J Ophthalmol* 149 : 354, 2010.
- 81) **Sotozono C, Ueta M, Kinoshita S** : The severity and management of ocular complications of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Arch Dermatol* 145 : 1336—1337, 2009.
- 82) **Ueta M, Nakamura T, Tanaka S, Kojima K, Kinoshita S** : Development of eosinophilic conjunctival inflammation at late-phase reaction in mast cell-deficient mice. *J Allergy Clin Immunol* 120 : 476—478, 2007.
- 83) **Ueta M, Matsuoka T, Narumiya S, Kinoshita S** : Prostaglandin E receptor subtype EP 3 in conjunctival epithelium regulates late-phase reaction of experimental allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 123 : 466—471, 2009.
- 84) **Ueta M, Uematsu S, Akira S, Kinoshita S** : Toll-like receptor 3 enhances late-phase reaction of experimental allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 123 : 1187—1189, 2009.
- 85) **Murata Y, Shimamura T, Hamuro J** : The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 14 : 201—212, 2002.
- 86) **Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, Endou K, Hamuro J, Murata Y, et al** : c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages : role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol* 171 : 628—635, 2003.
- 87) **Koike Y, Hisada T, Utsugi M, Ishizuka T, Shimizu Y, Ono A, et al** : Glutathione redox regulates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37 : 322—329, 2007.
- 88) **Ono A, Utsugi M, Masubuchi K, Ishizuka T, Kawata T, Shimizu Y, et al** : Glutathione redox regulates TGF- β -induced fibrogenic effects through Smad 3 activation. *FEBS Lett* 583 : 357—362, 2009.
- 89) **Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka F** : Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. *Nature* 222 : 687—688, 1969.
- 90) **Murata Y, Shimamura T, Tagami T, Takatsuki F, Hamuro J** : The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. *Int Immunopharmacol* 2 : 673—689, 2002.
- 91) **Yamada J, Hamuro J, Hatanaka H, Hamabata K, Kinoshita S** : Alleviation of seasonal allergic symptoms with superfine β -1, 3-glucan : a randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 119 : 1119—1126, 2007.
- 92) **Yamada J, Hamuro J, Terai K, Kinoshita S** : Major histocompatibility complex semi-matching improves murine corneal allograft survival under oxidative macrophage dominance. *Transplantation* 84 : 899—907, 2007.
- 93) **Yamada J, Maruyama K, Sano Y, Kinoshita S, Murata Y, Hamuro J** : Promotion of corneal allograft survival by the induction of oxidative macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 448—454, 2004.
- 94) **Yamada J, Yoshida M, Taylor AW, Streilein JW** : Mice with Th2-biased immune systems accept orthotopic corneal allografts placed in “high risk” eyes. *J Immunol* 162 : 5247—5255, 1999.
- 95) **Broer S** : Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev* 88 : 249—286, 2008.
- 96) **Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al** : Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136 : 521—534, 2009.
- 97) **Gukasyan HJ, Kim KJ, Lee VH, Kannan R** : Glutathione and its transporters in ocular surface defense. *Ocul Surf* 5 : 269—279, 2007.
- 98) **Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HM, Okumura A, Namekata K, et al** : The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest* 117 :

- 1763—1770, 2007.
- 99) **Katragadda S, Talluri RS, Pal D, Mitra AK** : Identification and characterization of a Na⁺-dependent neutral amino acid transporter, ASCT 1, in rabbit corneal epithelial cell culture and rabbit cornea. *Curr Eye Res* 30 : 989—1002, 2005.
 - 100) **Darlington JK, Adrean SD, Schwab IR** : Trends of penetrating keratoplasty in the United States from 1980 to 2004. *Ophthalmology* 113 : 2171—2175, 2006.
 - 101) **Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Cannon CJ, Rigby H, Fullwood NJ**, et al : Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 800—806, 2004.
 - 102) **Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Okahara N, Tsuchiya H, Torii R**, et al : Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 4519—4526, 2007.
 - 103) **Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Tsuchiya H, Torii R, Cooper LJ**, et al : Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate : possible future clinical application in corneal endothelial regenerative medicine. *Cornea* 27 : S 48—55, 2008.
 - 104) 小泉 範子 : 霊長類を用いた角膜内皮再生医療の開発. *日眼会誌* 113 : 1050—1059, 2009.
 - 105) **Koizumi N, Okumura N, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, Okahara N**, et al : Cultivated monkey corneal endothelial cell transplantation using a corneal lamellar graft. ARVO, Fort Lauderdale, 2009.
 - 106) **Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T**, et al : A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25 : 681—686, 2007.
 - 107) **Hall A** : Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279 : 509—514, 1998.
 - 108) **Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S** : ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 392 : 189—193, 1996.
 - 109) **Okumura N, Ueno M, Koizumi N, Sakamoto Y, Hirata K, Hamuro J**, et al : A ROCK inhibitor enhances survival of primate corneal endothelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 3680—3687 : 2009.
 - 110) **Nakano Y, Oyamada M, Dai P, Nakagami T, Kinoshita S, Takamatsu T** : Connexin 43 knock-down accelerates wound healing but inhibits mesenchymal transition after corneal endothelial injury *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 93—104, 2008.
 - 111) **Koizumi N, Nakano Y, Sakamoto Y, Okumura N, Dai P, Tsuchiya H**, et al : Corneal endothelial cell proliferation is enhanced by a single injection of connexin 43 siRNA in a primate endothelial injury. ARVO, Fort Lauderdale, 2008.
 - 112) **Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K**, et al : A ROCK inhibitor enhances corneal endothelial wound healing in both an *in vitro* and *in vivo* model. ARVO, Fort Lauderdale, 2009.
 - 113) **No authors listed** : The definition and classification of dry eye disease : report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop Ocul Surf 5 : 75—92, 2007.
 - 114) 島崎 潤 (ドライアイ研究会) : 2006 年度ドライアイ診断基準. *あたらしい眼科* 24 : 181—184, 2007.
 - 115) **Goto E, Tseng SC** : Kinetic analysis of tear interference images in aqueous tear deficiency dry eye before and after punctal occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 1897—1905, 2003.
 - 116) **Koh S, Maeda N, Hirohara Y, Mihashi T, Bessho K, Hori Y**, et al : Serial measurements of higher-order aberrations after blinking in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 133—138, 2008.
 - 117) **Shen M, Li J, Wang J, Ma H, Cai C, Tao A**, et al : Upper and lower tear menisci in the diagnosis of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 2722—2726, 2009.
 - 118) **Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Maruyama K, Komuro A, Kinoshita S** : Relationship between tear volume and tear meniscus curvature. *Arch Ophthalmol* 122 : 1265—1269, 2004.
 - 119) **Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Kinoshita S** : Reflective meniscometry : a new field of dry eye assessment. *Cornea* 19 : S 37—43, 2000.
 - 120) **Yokoi N, Komuro A** : Non-invasive methods of assessing the tear film. *Exp Eye Res* 78 : 399—407, 2004.
 - 121) **Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S** : Comparison of the effects of topical levobunolol and timolol solution on the human ocular surface. *Cornea* 22 : 709—715, 2003.
 - 122) **Ishibashi T, Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Komuro A, Kinoshita S** : Retention of reversibly thermo-gelling timolol on the human ocular surface studied by video meniscometry. *Curr Eye Res* 27 : 117—122, 2003.
 - 123) **Yokoi N, Takehisa Y, Kinoshita S** : Correlation of tear lipid layer interference patterns with the diagnosis and severity of dry eye. *Am J Ophthalmol* 122 : 818—824, 1996.
 - 124) **Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S** : Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and without benzalkonium chloride. *J Glaucoma* 12 : 486—490, 2003.
 - 125) **Maruyama K, Yokoi N, Takamata A, Kinoshita S** : Effect of environmental conditions on tear dynamics in soft contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2563—2568, 2004.

- 126) **King-Smith PE, Fink BA, Hill RM, Koelling KW, Tiffany JM** : The thickness of the tear film. *Curr Eye Res* 29 : 357—368, 2004.
- 127) **Berger RE, Corrsin S** : A surface tension gradient mechanism for driving the pre-corneal tear film after a blink. *J Biomech* 7 : 225—238, 1974.
- 128) **Creech JL, Do LT, Fatt I, Radke CJ** : *In vivo* tear-film thickness determination and implications for tear-film stability. *Curr Eye Res* 17 : 1058—1066, 1998.
- 129) **Yokoi N, Yamada H, Mizukusa Y, Bron AJ, Tiffany JM, Kato T**, et al : Rheology of tear film lipid layer spread in normal and aqueous tear-deficient dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 5319—5324, 2008.
-

Comment : 三宅 謙作

木下 茂教授とそのグループが、永年取り組んできた難治性角膜疾患を中心にした7つのプロジェクトを、未来展望を含め報告している。内容に共通するものは、臨床現場から得たヒントや自由な発想を基礎研究と結びつけるトランスレーショナルリサーチである。

膠様滴状角膜ジストロフィ(以下 GDL)では、角膜実質のアミロイド沈着部位にラクトフェリンなど涙液成分が沈着するという臨床上の観察から、角膜上皮バリアー機能の障害が起こっていると考えた。GDL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 zonula occludens-1(ZO-1)やオクルディンの発現が認められないことを証明し、原因遺伝子の loss of function 型の遺伝子変異により上皮バリアー機能の障害が起こるとした。このように著者らは、本疾患の成立に本質的に上皮バリアー機能障害が存在することを証明しつつある。

粘膜上皮移植の開発に関しては、著者は、留学中の上司である Thoft 教授とともに開発した Keratoepithelioplasty にはじまる角膜上皮の *in vivo* expansion など第一世代の眼表面再建術から出発した。その後、結膜上皮幹細胞疲弊や難治性眼表面疾患の治療を目的とし、第二世代の眼表面再建術の開発をめざした。*In vitro* から *in vivo* への橋渡しとして、同種培養角膜上皮移植、自家培養角膜上皮移植、自家培養口腔粘膜上皮移植へと歩を進める。この経過は臨床の詳細な観察と培養基質を中心にした基礎的な研究に裏打ちされた理論と経験が確実に背景にある著者らのグループが最も情熱を傾けた一連の研究であり、安全性、ハード面などにも目配りのきいた完成度の高い術式へと進歩している。

Stevens-Johnson 症候群(以下 SJS)の病態解明に関して、特に眼表面における methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)あるいは methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (MR-CNS)に易感染性であることから SJS の発症には自然免疫異常があるとの仮説を提示した。遺伝子多型解析により SJS 関連遺伝子を同定し、自然免疫応答の異常が本症候群の発症に関与することを強く示唆した。本症候群の急性期にみられるサイトカイン・ストームと、遺伝子多型解析による SJS 関連遺伝子の同定の結果から、著者らは本症候群のさらなる新概念を想定し近未来にこれを発表する予定としており、大変楽しみである。

アレルギー性表面疾患への新しい試みとして、いずれも上皮細胞に発現するプロスタグランジン(PG)E₂の受容体の一つである EP3 および toll like receptor に着目した。前者はアレルギーを抑制的に、後者は増強的に働いており、この制御が大切である。またマクロファージの機能制御によるアレルギー炎症の抑制についても検討を行っている。これら2点の着眼は、アレルギー炎症性疾患に対する治療は単なる免疫抑制ではなく免疫制御が基本になるというコンセプトで行われており、新しい見方として今後が期待される。

眼表面上皮細胞の機能制御に関して、眼表面のグルタチオン量は軽度の結膜炎でも低下し、表面の脆弱性と防御機構の迅速性には感嘆させられるという臨床的な観察から、グルタチオン量すなわち眼表面のレドックス状態あるいは酸化ストレス状態を指標として、上皮細胞の機能を評価できることを示唆した。

角膜内皮障害の治療に関しては、現在急速に普及しつつある Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK)、Descemet's membrane endothelial keratoplasty (DMEK)などの欠点を補うべく生体外で培養した角膜内皮細胞を用いた再生医学的治療法の開発を報告している。サルを利用した多くの実験結果をもとに、培養内皮シート移植と選択的 Rho キナーゼ阻害剤併用で、有望な方法が開発される可能性を示した。さらに夢の話として、水疱性角膜症の残余の内皮細胞の増殖と創傷治癒の促進を促すコネキシン 43 阻害剤や Rho キナーゼ阻害剤などを前房内に長期継続投与する方法の可能性についても言及している。

ドライアイという障害の解析に最も重要な問題は、非侵襲的で定量的な涙液検査法の開発であり、究極の検査は角膜上の涙液の液層の厚みを測定することであって、この目的のために著者らは油層動態解析法を導入し、涙液の定量法に結びつくと考えている。

本論文の中心的概念は SJS に代表される難治性眼表面疾患の成因を明らかにし、治療法を確立したいという強い思いである。この思いは7つ並べられたテーマに共通しており、ばらばらに組み立てられた仕事ではない。それら一つ一つは臨床家としての鋭い観察眼を基本にしているが、生物

学，免疫学，微生物学さらに分子遺伝学などにわたる幅広い理解を縦横に駆使してはじめて完成されていくのである。柔軟で創意的な発想と知識を有する木下教授および，この強力な指導者のアイデアを実行に移してきたグループの人々に改めて敬意を表したい。論文は先人の重要業績は引用しつつ，本グループによる多数の一流誌から出版された業績を基本に組み立てられている。論じられた概念が今後どのような発展を遂げるか，大きな期待をもたせる。