

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09431

研究課題名(和文)加齢涙腺の組織幹細胞賦活化による器官再生法に関する細胞生物学的研究

研究課題名(英文)Cell biological study on the stimulation of tissue stem cells of lacrimal glands of aged mammals.

研究代表者

伊藤 正孝(Ito, Masataka)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・再生発生学・准教授)

研究者番号：30534896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトとマウスの涙腺組織の検討から、加齢涙腺では、(1)リンパ球浸潤を中心とした炎症状態が生じていること、および(2)ハーダー腺化と呼ばれる組織構築の変化が生じていることを見出した。また、PPAR $\alpha$ の作動薬であるrosiglitazone(RSG)を用いて、マイボーム腺上皮細胞の培養実験を実施し、RSGがマイボーム腺上皮細胞の脂肪滴産生を増加させることを確認した。さらに、免疫チェックポイント受容体分子であるPD-1を欠損したマウスを解析し、加齢に伴って著しい涙腺炎とハーダー腺化が生じていることを発見した。しかしこのマウスにおいて機能的涙腺の再生の所見は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度な高齢化が進むわが国においてドライアイで悩む高齢者は多い。ドライアイ症状の有無は生活の質に直結することから、高齢者のドライアイ症状を改善することはわが国の福祉の向上に大いに資するものといえる。本研究は、これに対して再生医学の観点からのアプローチを試みた基礎研究である。

人体器官の多くでは障害が生じると再生機転が働いて障害部位は再生される。例えば皮膚ではその再生能力は終生維持されることが知られているが、皮膚と同様の発生学的な起源をもちながらも涙腺では皮膚ほどの旺盛な再生能は持たないことが本研究における幾つかの実験で明らかとなった。再生涙腺の臨床応用にはさらなる知見の蓄積が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have performed following studies. (1) Histopathological observations of lacrimal gland tissues from aged humans and mice. In aged lacrimal gland tissues, mild chronic inflammatory changes with lymphocytes infiltration in both humans and mice and tissue destruction/remodeling by so-called "Harderianization" in mice were observed. (2) Cell culture study using Meibomian gland epithelial cells with a PPAR $\alpha$  agonist rosiglitazone (RSG). Lipid synthesis was stimulated by RSG. (3) Analyses of phenotypes of lacrimal gland in PD-1 knockout mice. PD-1 is an immune checkpoint molecule and this mutant mouse shows various autoimmune-related phenotypes such as nephritis and arthritis. We showed that severe inflammatory changes and Harderianization in lacrimal gland in this mouse as they aged. However, tissue regeneration of functional lacrimal gland was not observed.

研究分野：再生発生学

キーワード：涙腺 組織幹細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う臓器機能の低下は人体のほとんどの臓器で生じる宿命的な変化であるが、その機能低下のメカニズムを解明する研究と、低下した機能を回復させる研究がそれぞれの臓器で進んでいる。加齢に伴う機能低下の様式は臓器によって様々であるが、通常は、臓器中の組織幹細胞の老化と減少によって再生能が低下している場合が多いと思われる。

涙腺においては、加齢がドライアイのリスク因子であることは広く知られているものの、加齢涙腺でどのような変化が生じているのか、そして、加齢による涙腺機能の低下に対してどのような抗加齢医療的アプローチが好ましいのか、こうした疑問を解明すべく進められている研究は現状ではなお多くはない。そこで、本研究では、実験動物および培養細胞を用いた実験系を使って、加齢涙腺の機能低下メカニズムの解析し、その機能の回復法に関して検討を行うことを目指したものである。

本研究は、抗加齢再生医療の基礎的研究といえるが、加齢にともなう涙液減少性ドライアイは高度な高齢化が急速に進むわが国においては高頻度にみられることから、高齢者の QOL と QOV の向上に資する研究として、重要な意義をもつものと考えられる。

### 2. 研究の目的

上記の通り、本研究は加齢に伴う涙腺の機能低下のメカニズムを解析し、その機能の回復法に関して検討を行うことを目指したものであり、涙腺機能に関する抗加齢再生医学的な基礎的知見の蓄積に資することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3-1 ヒトとマウスの加齢涙腺の観察

ヒトとマウスの加齢涙腺において、どのような病理変化が生じているかを知るため、以下の方法で組織病理所見の検討を行った。

##### 3-1-1 マウス涙腺の組織学的観察

防衛医大動物実験施設にて維持・繁殖させた C57BL6 系オスマウスを用いた。(動物倫理委員会承認番号 14013) 2ヶ月齢、6ヶ月齢、1年齢および 1.5 年齢マウスの涙腺を解析に供した。4%パラフォルムアルデヒド液による灌流固定ののち、これらの腺を採取し、通法に従ってパラフィン切片を作成し、HE 染色をおこなった。

##### 3-1-2 ヒト涙腺の組織学的観察

防衛医大解剖実習に供された解剖献体より右または左の涙腺を採取し、パラフィン切片を作成し、HE 染色を実施した。

#### 3-2 培養ヒトマイボーム腺上皮細胞を用いた分化刺激実験

加齢に伴うドライアイの一因としてマイボーム腺の機能低下がある。マイボーム腺上皮細胞のような脂肪を産生する細胞では、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) の活性化が細胞分化や脂肪蓄積の誘導に関与していることが報告されていることから、PPAR $\gamma$  の作動薬である rosiglitazone (RSG) を用いて、培養マイボーム腺上皮細胞の増殖や脂肪産生等を調べる *in vitro* 実験を実施した。

##### 3-2-1 不死化ヒトマイボーム腺上皮細胞の培養

不死化ヒトマイボーム腺上皮細胞を 4 型コラーゲンをコートした培養皿中でウシ脳下垂体抽出物と上皮成長因子 (EGF) を添加した無血清角化細胞用培地 (KSFM, Gibco, Grand Island, USA) で増殖させ維持培養した。サブコンフルエントの培養細胞をトリプシン処理で解離し継代培養した。継代数 27-40 の培養細胞を実験に用いた。KSFM 中でサブコンフルエントにしたのち、10% ウシ胎仔血清と 50ng/mL EGF を添加した DMEM-F12 (Gibco) を分化誘導培地として、RSG (東京化成工業, 東京) を添加した。

##### 3-2-2 脂肪滴の染色

培養後のマイボーム腺上皮細胞の脂肪滴の染色はホルマリン固定ののち、BODIPY 493/503 (東京化成工業) を用いておこなった。

#### 3-3 PD-1 ノックアウト (KO) マウス涙腺の観察

PD-1 は免疫抑制性の補助刺激分子として T 細胞の過剰な活性化を抑制する機能があると考えられているが、これが欠損した場合には、腎炎や関節炎などの自己免疫性の炎症が生じることが知られていることから、そのノックアウトマウスにおいて涙腺炎症が生じていないか、そし

て再生機転が働いていないかを調べる目的で涙腺組織の病理所見を検討した。

### 3-3-1 PD-1KO マウス

PD-1KO マウスは京都大学本庶佑研究室より譲渡を受け、ホモ接合体を防衛医大動物実験施設にて維持・繁殖させた(動物倫理委員会承認番号 14013)。対照の野生型(WT)マウスとして C57BL/6 系マウスを用いた。

### 3-3-2 PD-1KO マウス涙腺の病理組織

3ヶ月齢、6ヶ月齢および1年齢の、PD-1KO マウスおよび WT マウスの涙腺を組織病理解析に供した。4%パラホルムアルデヒド液による灌流固定ののち涙腺を採取し、前述の方法でパラフィン切片を作成し、HE 染色をおこなった。

### 3-3-3 電子顕微鏡 (TEM) 観察

1年齢の PD-1KO マウスおよび WT マウスの涙腺を採取し、カルノフスキー液によって固定したのちエポン 812 樹脂にて包埋し、超薄切片を作成した。JEM1400 (日本電子) を用いて TEM 観察をおこなった。

### 3-3-4 免疫組織化学染色

上記パラフィン切片を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンののち 0.01 mM クエン酸バッファー (pH 6.0, 95°C) 中で抗原の賦活化をおこない、ブロッキングののち、1次抗体として抗 Ki67 抗体 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA; 希釈倍率 1:200) を 4°C で一晩反応させた。Ki67 は増殖細胞の指標である。2次抗体にはポリマー試薬 (ImmPRESS reagent; Vector) を用い、DAB で発色させた。ヘマトキシリンで核染色を実施した。

## 4. 研究成果

### 4-1 ヒトとマウスの加齢涙腺の組織像

採取できたヒト涙腺検体は 43 例で、その平均年齢は 83.7 歳であった。これらの涙腺では過半数の 58% で局所性またはびまん性の細胞浸潤を伴う炎症所見が見られた (図 1)。

加齢マウス涙腺では高い頻度でハーダー腺化が見られた。図 2 A, B のような涙腺のハーダー腺化が、3ヶ月齢マウスでは 1 例も見られなかったが、一方、6ヶ月齢では 4 例中 2 例で、1年齢では 8 例中 6 例で、1.5 年齢では 8 例中 7 例でハーダー腺化が観察された。

### 4-2 培養ヒトマイボーム腺上皮細胞を用いた分化刺激実験の結果

RSG の添加によりマイボーム腺上皮細胞の増殖は低下したものの、脂肪滴は増加することが確認され、分化促進の作用があることが示唆された (図 3)。このことは、加齢に伴うマイボーム腺の機能低下に対して、PPAR $\gamma$  経路の賦活化が治療戦略の一つとなり得ることを示唆している。

### 4-3 PD-1KO マウス涙腺

PD-1KO マウスにおいては、6ヶ月齢以上の個体において、涙腺で WT よりも顕著な炎症性細胞浸潤とハーダー腺化の像が観察された (図 4)。しかしながら、抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織化学染色において、陽性細胞は浸潤細胞でのみ見られ、導管および腺房上皮細胞で陽性細胞は見られなかった。このことから、PD-1KO マウスにおいては、涙腺炎症はあるものの、機能的涙腺の再生は生じていないものと思われた。

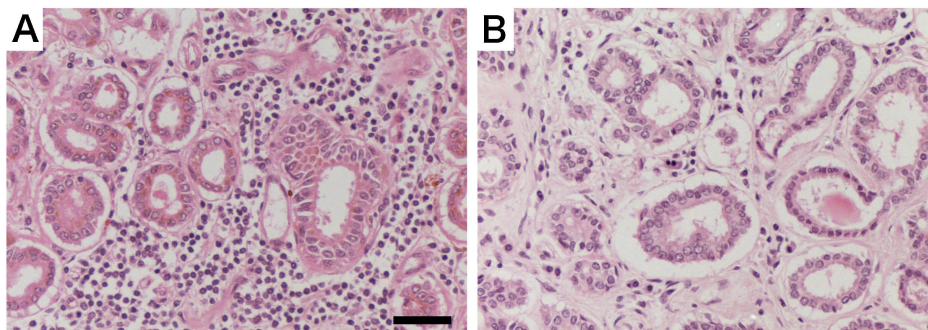


図 1 加齢ヒト涙腺の組織像。A は 74 歳女性、B は 99 歳女性のもの。高い頻度で間質の増生とリンパ球浸潤が見られた。Bar ; 50  $\mu$  m.

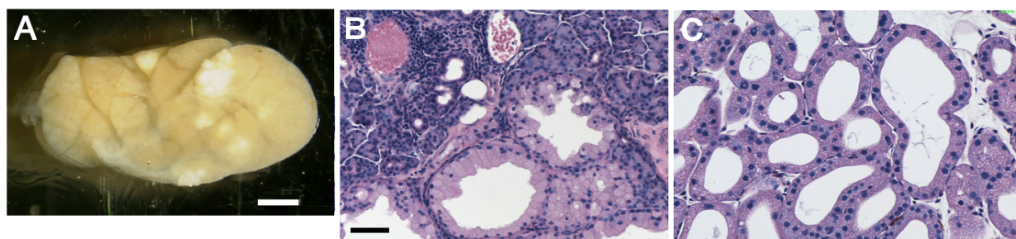


図2 加齢マウス涙腺 (1.5 年齢) のマクロ像 (A) と HE 染色組織像 (B) および対照としてのハーダー腺組織像 (C)。マクロ像では結節性の (A)、HE 染色においては、円柱上皮と大きな腺腔を伴うハーダー腺化涙腺が見られた (B)。 Bars ; 0.5mm in A, 50  $\mu$ m in B, C.

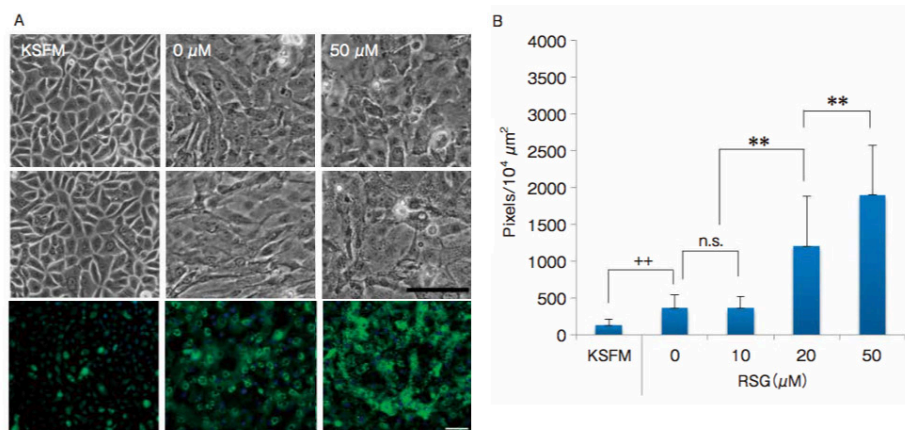


図3 RSG 添加培養したマイボーム腺上皮細胞の脂質蛍光像 (A) と蛍光面積の定量 (B) RSG の添加量に依存して脂質の産生が増加した。

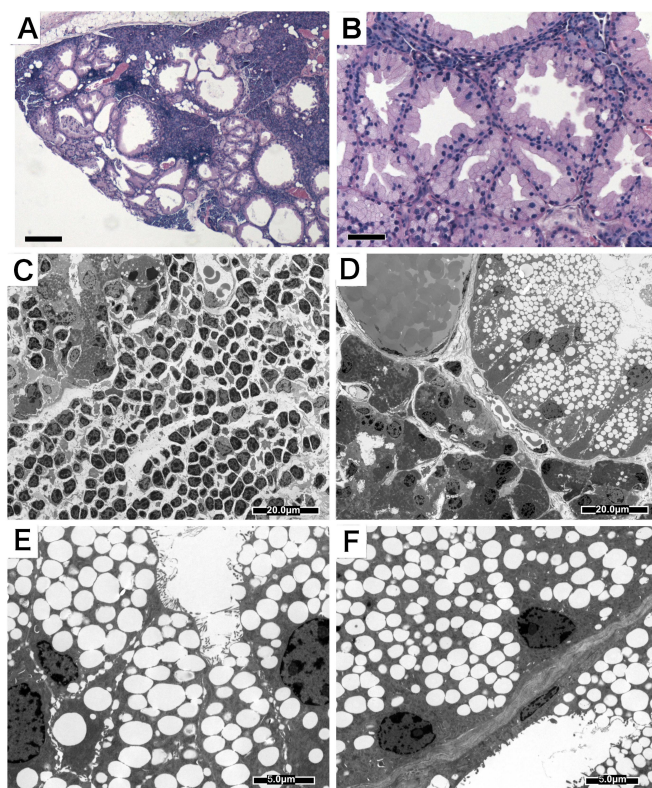


図4 1 年齢 PD-1KO マウス涙腺の光学顕微鏡像 (A, B) および TEM 像 (C-F)。光学顕微鏡像 (A, B) では極めて顕著なハーダー腺化とリンパ球浸潤が見られる。TEM で見られる浸潤細胞はほぼ全てがリンパ球である (C)。ハーダー腺化した部分の涙腺では、上皮は背の高い円柱状となり、細胞質中に脂肪滴が満たされている (D-F)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 唐沢容子、伊藤正孝、西尾佳明、竹内大	4. 巻 124
2. 論文標題 ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 の活性化による培養マイボーム腺細胞の分化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本眼科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jin Kai, Imada Toshihiro, Nakamura Shigeru, Izuta Yusuke, Oonishi Erina, Shibuya Michiko, Sakaguchi Hisayo, Tanabe Hirotaka, Ito Masataka, Katanosaka Kimiaki, Tsubota Kazuo	4. 巻 189
2. 論文標題 Corneal Sensory Experience via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Accelerates the Maturation of Neonatal Tearing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1699 ~ 1710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2019.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inada Makoto, Taguchi Manzo, Harimoto Kohzou, Karasawa Yoko, Takeuchi Masaru, Ito Masataka	4. 巻 178
2. 論文標題 Protective effects of dexamethasone on hypoxia-induced retinal edema in a mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 82 ~ 90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2018.09.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanewska A, Ito M, Karasawa Y, Inada M, Garreis F, Paulsen F, Takeuchi M.	4. 巻 231
2. 論文標題 Developmental change in the gene expression of transient receptor potential melastatin channel 3 (TRPM3) in murine lacrimal gland	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Anat.	6. 最初と最後の頁 151551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aanat.2020.151551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakurai Y, Usui Y, Hattori T, Takeuchi M, Takayama K, Karasawa Y, Nishio Y, Yamakawa N, Saitoh D, Goto H, Ito M.	4. 巻 191
2. 論文標題 Programmed Cell Death-1 Pathway Deficiency Enhances Autoimmunity Leading to Dacryoadenitis of Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 1077-1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2021.02.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田口 万蔵, 西尾 佳明, 稲田 真, 高山 圭, 播本 幸三, 唐沢 容子, 伊藤 正孝, 竹内 大
2. 発表標題 インターフェロンガンマ欠損Akita マウスに発症した糖尿病性網膜症
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内 大, 田口 万蔵, 西尾 佳明, 稲田 真, 高山 圭, 播本 幸三, 唐沢 容子, 伊藤 正孝
2. 発表標題 糖尿病網膜症を発症する IFN-g 欠損 Akita マウスの免疫メカニズム解析
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 唐沢容子, 伊藤正孝, 西尾佳明, 竹内大
2. 発表標題 ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 g 活性化による培養マイボーム腺細胞の分化
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井裕, 伊藤 正孝, 竹内 大
2. 発表標題 Programmed cell death-1 遺伝子欠損マウスに生じる涙腺炎の原因解析
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤正孝、平柳淑恵、今城純子
2. 発表標題 マウスにおけるハーダー腺とハーダー腺化涙腺の比較検討
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 唐沢 容子、伊藤 正孝、竹内 大
2. 発表標題 ベルオキシソーム増殖因子活性化受容体 活性化による培養マイボーム腺細胞の分化
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	竹内 大  (Takeuchi Masaru)  (40260939)	防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、 動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・眼科 学・教授  (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Friedrich-Alexander Universitat			