

平成21年6月12日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592034

研究課題名（和文） 高次分岐形態形成の誘導による涙腺の機能的再生

研究課題名（英文） Regeneration of lacrimal gland by the induction of highly-ordered acinus branching

研究代表者

横井 則彦（YOKOI NORIHIKO）

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60191491

研究成果の概要：

これまで Stevens-Johns 症候群等の重症眼表面疾患においては涙液の量的・質的双方の異常がその病態形成に大きく関与するとは考えられていたものの、再生治療的な観点からは注目されていなかった。角膜上皮や口腔粘膜上皮細胞が平面状の上皮シート状態で治療に使用できる事に対し、涙腺組織は複雑な3次元構造をとるため培養そのものが極めて困難であるとされるためである。今回の我々のチャレンジはこの点についてのブレークスルーを得ることを目的としたものである。結果として、涙腺上皮細胞はコラーゲンゲル内である程度の3次元構造を取りうるということがわかった。実際に *in vivo* の涙腺組織のもつ複雑かつ機能的な組織構築を *in vitro* で再構成するには多くの機能性因子の同定が必要と考えられた。また我々は涙液の質的・量的異常の検出のためにいくつかの臨床機器およびそれに関連したソフトウェアの開発についても同時に行った。さらにそれらを用いて涙液油層の動的挙動の生理物理的な原理を解明するために流体力学モデル (Vogt モデル) を考案し、さらにクロスコリレーション法を応用することにより実際の臨床の場でリアルタイムに涙液油層伸展の解析を行なうことに成功した。さらにこの方法を用いて、ドライアイのスクリーニングや重症度評価が油層伸展初速度という非侵襲的なパラメーターによって評価できることを見出した。さらに油層伸展初速度を決定する因子について重回帰分析を行なったところ、眼表面の涙液貯留量をもっとも大きく関与することが明らかとなった。この新しい評価法は侵襲的、半定量的な従来の評価法に比べると大きな進歩であり、臨床のみならず動物実験の場でも今後の活用性が期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：涙腺、移植、再生医療、発生・分化、涙液、生理学

1. 研究開始当初の背景

眼表面は涙液層と上皮層からなり、両者の適切な相互作用は眼の光学性能に最も強く影響する角膜・空気界面を良好な状態に維持するために絶対不可欠である。涙液は単に乾燥を防ぐのみならず、各種の上皮成長因子やラクトフェリン、リゾチーム、IgAといった感染防御因子、や Vitamin A といった重要な生理活性物質を大量に含んでおり、涙液が著しく減少した場合には眼表面の恒常性を大きく損なうこととなる。例えば重症の眼表面疾患である Stevens-Johnson 症候群 (SJS)、眼類天疱瘡 (OCP) では、しばしば高度の涙液減少を伴い、上皮びらんや角化などの重篤な上皮障害が認められる。

我々はこれまでにこれらの表面疾患に対して、培養角膜上皮移植術や培養自己口腔粘膜移植術などの眼表面再建術の開発にその初期より力を注いできた。しかしながらたとえ手術が成功しても、高度に涙液が少ない患者の場合にはそれらの治療成績はおしなべて低い印象がある。これはおそらく涙液には既知、未知の様々な生理活性物質が含まれているため、たとえ手術によって健康な上皮細胞を移植しても涙液不足によって眼表面の恒常性が維持できず、結果として移植細胞が脱落ないし拒絶されてしまうためと推察される。人工の点眼剤では涙液と同等の機能を補うのは明らかに困難であり、それ故、涙液の量的・質的正常化は重症眼表面疾患の治療、特に眼表面再建術後において極めて大きな意味を持つものと考えられる。

近年の再生医療研究の盛り上がりのなかで、外分泌腺組織の再生研究についてもいくつかの成果が見られる。当該組織である涙腺については培養レベルで涙腺機能が維持され、またフィーダー細胞と細胞外マトリックスをうまく組み合わせることである程度 *in vivo* に類似した分岐形態形成を誘導できることが示されている。また基礎医学の分野では、最近 BMP7 が涙腺の分岐形態形成に極めて重要で、涙腺上皮細胞とその周りを満たす間葉系細胞の相互作用 (Epithelial-Mesenchymal interaction) が BMP7 の作用のもとで分岐の数を増すことが示された。類似組織である唾液腺でも ECM であるフィブロネクチンが分岐形成に重要な cleft の形成を誘導するこ

とが示されている。これらの成果をうまく組み合わせれば、複雑な涙腺組織構造を培養過程で形成させることも十分射程範囲内であると考えられる。

2. 研究の目的

Stevens-Johns 症候群等の重症眼表面疾患における涙液の質的、量的両面での正常化を図り、もって眼表面再建手術の成績を改善することにある。本研究ではその目標の一端として、動物実験レベルで涙腺の機能的再建法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラット結膜上皮細胞、涙腺上皮細胞、線維芽細胞の培養

ラットの主涙腺を切除して涙腺上皮細胞を単離する。

(2) 涙腺上皮細胞培養のための scaffold の作成

涙腺が本来持つ複雑な 3 次元構造を培養涙腺上皮細胞がとることができるようにあらかじめ複雑な内部構造をもつ ECM の足場を作成する。

(3) 涙腺上皮細胞の不死化細胞の作成

ラット涙腺上皮細胞に SV40 大型 T 抗原をプラスミドにて遺伝子導入し、G418 にて選択する。経代してコロニーを形成させ、増殖能の高いものをいくつかクローニングする。サザンブロットにてゲノムへの組み込みを確認し、増殖曲線を調べて不死化を確認する。

(4) GFP 融合分泌タンパクの作成

GFP が分泌されるように改変し不死化涙腺上皮細胞に遺伝子導入して培地にデザインした改変 GFP タンパクが分泌されるかどうかを調べる。

(5) 涙液の生理的動態の解明のための機器・ソフトウェアの開発

涙液油層の伸展はレオロジーの Voigt モデルで説明できることを発見し、これに基づく涙液伸展の動態解明ソフトを開発した。

4. 研究成果

ラット結膜上皮細胞、涙腺上皮細胞、線維芽細胞の培養

GFP ラットの涙腺を摘出し、細断したのちトリプシンで分散した。遠心したところ、上清に GFP 由来の強い蛍光が観察されたため、この方法では細胞障害が強いことがわかったが、十分な数の培養細胞が得られた。平面培養を行ったところ、涙腺上皮細胞は老化形質を示すことなく十分に幼弱な細胞形質を維持したまま培養可能であり、培養法としては問題ないものと考えられた。

涙腺上皮細胞培養のための scaffold の作成 in vivo の涙腺組織がもつ複雑な組織構築を培養にて形成させるべく 3 次元培養を行った。涙腺上皮細胞培養のための scaffold の作成 3 次元培養ではラット線維芽細胞をアテロコラーゲンゲルに包埋して培養し、そのなかで涙腺細胞を培養した。3 次元培養ではラット涙腺上皮細胞は自己誘導的に比較的複雑な構造を示した。

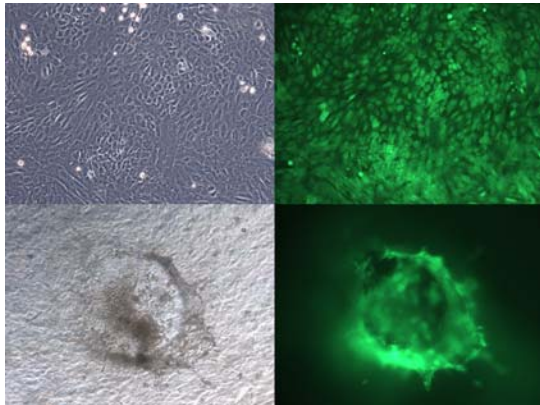


図1 左上：ラット涙腺上皮細胞、右上：同蛍光写真、左下：アテロコラーゲンゲル内でのラット涙腺上皮細胞。右下：同蛍光写真涙腺上皮細胞の不死化細胞の作成

上記で得られた培養涙腺上皮細胞に対し SV40 large T 抗原発現プラスミドを遺伝子導入し、不死化細胞を得ることを試みた。まずプラスミドの構築を行った。眼科領域で頻用される HCE-T 細胞は SV40 large T 抗原をアデノウイルスで遺伝子導入し、ゲノムにインテグレートされたクローンを選択することで樹立された細胞である。この細胞ゲノムには SV40 large T 抗原が挿入されており、また mRNA レベル、タンパクレベルで安定して発現していることを確認した。RT-PCR によって SV40 Large T 抗原のコーディング配列を増幅し、これを哺乳類細胞で発現するプラスミドに組み込んだ。これを遺伝子導入試薬によって涙腺上皮細胞に導入したが、恐らく遺伝子導入効率の問題のため不死化クローンの獲得には至らなかった。そこで我々は遺伝子導入効率の高いレンチウイルスで SV40 Large T 抗原を発現するプラスミドを構築した。途中シークエンス反応がどうしてもかからないという問題があり、時間を費やしたが最終的にレンチウイルスの作成に成功した。まだ感染実験には至っていないが、これを用いて不死化細胞の樹立を行う予定である。

GFP 融合分泌タンパクの作成

我々は通常細胞内タンパクとして転写される GFP を分泌型に改変することで移植涙腺機能の評価が可能となるのではないかと考え GFP 融合分泌タンパクの作成を試みた。GFP を分泌型に改変するためにはその N 末端側にシグナルペプチドを付与する必要がある。我々はイムノグロブリンのシグナルペプチ

ドに相当する塩基配列を PCR で増幅した。また GFP の N 末端から数残基のアミノ酸を除いた部分に相当する塩基配列を PCR で増幅した。これらを結合するため、GFP の 5 末端側のプライマーにはシグナルペプチドの 3 末端側の配列を付加した。両者を混合してアニールさせ、伸長反応を行ったのち PCR を行うことで両者が結合した配列を得た。これを哺乳類細胞で発現するプラスミドに組み込んだ。現在上記不死化細胞の樹立待ちである。涙液の生理的動態解明のための機器・ソフトウェアの開発

涙液油層は開眼直後に角膜上を上方へ伸展してゆくことが知られている。この挙動の源となる物理作用およびその運動特性についてはこれまで何の報告もなかった。我々は涙液の質を左右する因子として油層が最も重要であると考え、この伸展機序および運動特性の物理的解明を行った。試行錯誤の結果、油層の伸展はレオロジーの Voigt モデルが極



図2 涙液油層伸展の時間的推移

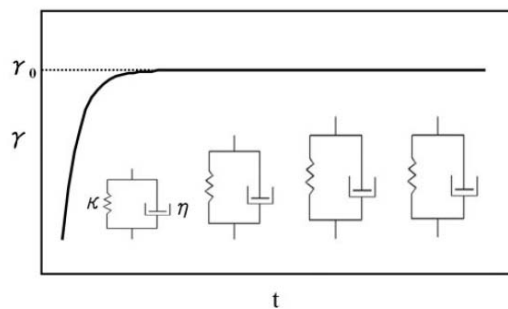


図3 レオロジーにおける Voigt モデル

めてよくあてはまり、 $H(t)-H(0)=\rho [1-\exp(-t/\lambda)]$ (ρ = 定数、 λ = 緩和時間) の式で表せることが明らかとなった。また油層の伸展初速度 $H'(0)$ とメニスコメトリー法で測定される涙液メニスカス曲率半径 (R) との間に有意な相関 ($r=0.573$) があることが明らかにされた。さらに臨床検査機器メーカーとの共同開発において cross-correlation 法を応用して涙液油層伸展初速度の自動計測法に成功した。この成

果によって臨床ならびに動物実験で涙液の質的・量的異常が高感度に評価可能となった。

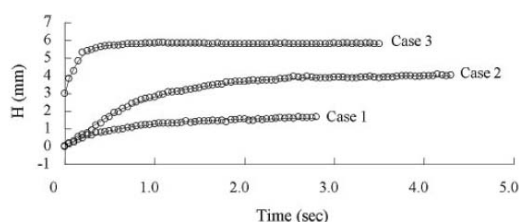


図4 患者より得た涙液油層伸展の動態データの Voigt モデルへの当てはまり。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- ① Yokoi N, Komuro A, Yamada H, Maruyama K, Kinoshita S. A newly-developed video-meibography system featuring a newly-designed probe. *Jpn J Ophthalmol* 51(1):53-56, 2007.
- ② Sotozono C, Ang LPK, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, Kaido M, Murato D, Shimazaki J, Tsubota K, Yamada M, Kinoshita S. A new grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 114(7), 1294-1302, 2007.
- ③ Bron AJ, Abelson MB, Ousler G, Pearce E, Tomlinson A, Yokoi N, Smith JA, Begley C, Caffery B, Nichols K, Schaumberg D, Schein O, Calonge M, Baudouin C, Goto E, Grus F, Paugh J. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: Report of the diagnostic methodology subcommittee of the international dry eye workshop (2007). *Ocul Surf* 5(2): 108-152, 2007.
- ④ Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. Surgery of the conjunctiva. *Dev Ophthalmol* 41:138-58, 2008.
- ⑤ Yokoi N, Yamada H, Mizukusa Y, Bron AJ, Tiffany JM, Kato T, Kinoshita S. Rheology of tear film lipid layer spread in normal and aqueous tear deficient dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(12): 5319-5324, 2008.
- ⑥ Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, Yokoi N, Gao P, Hamuro J, Hopkin JM, Kinoshita S. High-affinity IgE

receptor β chain expression in human mast cells. *J. Immunol. Methods* 336: 229-234, 2008.

- ⑦ Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, Yokoi N, Hamuro J, Walls AF, Ra C, Hopkin JM, Kinoshita S. Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor- β chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
- ⑧ Bron AJ, Yokoi N, Gaffney Eamonn, Tiffany JM. Predicted phenotypes of dry eye: Proposed consequences of its natural history. *Ocular Surface*, in press.
- ⑨ Gaffney Eamonn, Tiffany JM, Yokoi N, Bron AJ. A mass and solute balance model for tear volume and osmolarity in the normal and the dry eye prog. *Retina and Eye Res*, in press.
- ⑩ Tanioka H, Yokoi N, Komuro A, Shimamoto T, Kawasaki S, Matsuda A, Kinoshita S. Filament in filamentary keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.

[学会発表] (計22件)

学会招聘講演、教育講演 (国際学会)

- ① Yokoi N. Advanced conjunctival surgeries for the improvement of dry eye and dry-eye associated disorders. *World Ophthalmology Congress 2008*, Hong Kong, 2008. 7. 1.
 - ② Yokoi N. Clinical compatibility of multipurpose solutions with silicone hydrogel contact lenses. *World Ophthalmology Congress 2008*, Hong Kong, 2008. 7. 1.
 - ③ Yokoi N. A new surgery for punctal occlusion. *2008 Japan-Korea Joint Cornea Conference*, Seoul, 2008. 10. 3.
- 一般講演 (国際学会)
- ① Suzuki T, Yokoi N, Komuro A, Kinoshita S. The cyclic change of Meibomian gland physiology during the menstrual cycle. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Fort Lauderdale, USA, 2007. 5. 6.
 - ② Yokoi N, Yamada H, Maruyama K, Mizukusa Y, Bron AJ, Tiffany JM, Kinoshita S. Development of automated rheological analysis for tear film lipid layer spread using the cross-correlation method. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Fort Lauderdale, USA, 2007. 5. 6.
 - ③ Maruyama K, Yokoi N, Kinoshita S. New

- interferometric-based in vitro technique applicable to the assessment of wettability of contact lenses. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, USA, 2007. 5.10.
- ④ Maruyama K, Yokoi N, Kinoshita S. A new interference-based in vitro technique for the wettability assessment of soft contact lenses. British Contact Lens Association, Manchester, England, 2007. 6.3.
- ⑤ Sakai R, Maruyama K, Yokoi N, Kinoshita S. Evaluation of wettability in MPS by interference-based in vitro technique. British Contact Lens Association, Manchester, England, 2007. 6.3.
- ⑥ Tanioka H, Yokoi N, Komuro A, Shimamoto T, Kawasaki S, Matsuda A, Kinoshita S. Immunohistochemical investigation of the filament in filamentary keratitis. 5th international Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance, Taormina, Sicily, Italy, 2007.9.6.
- ⑦ Sonomura Y, Yokoi N, Komuro A, Nishii M, Inagaki K, Chihara H, Kinoshita S. The improved surgical technique for conjunctivochalasis. 5th international Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance, Taormina, Sicily, Italy, 2007.9.7.
- ⑧ Komuro A, Yokoi N, Maruyama K, Kinoshita S. Long-term results of superior conjunctivochalasis operation for treating superior limbic keratoconjunctivitis. 5th international Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance, Taormina, Sicily, Italy, 2007.9.7.
- ⑨ Yokoi N, Chihara H, Nishii M, Komuro A, Shimamoto T, Kinoshita S. A new surgical punctal occlusion using fibrous tissue under the lacrimal caruncle. 5th international Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance, Taormina, Sicily, Italy, 2007. 9.7.
- ⑩ Ward S, Dogru M, Wakamatsu T, Ebrahim O, Kaido M, Matsumoto Y, Yokoi N, Ueda M, Tsuyama A, Tsubota K. Imprementation of a new questionnaire into the recently revised Japanese dry eye diagnostic criteria. 5th international Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film, Ocular Surface and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance, Taormina, Sicily, Italy, 2007.9.7.
- ⑪ Suzuki T, Yokoi N, Komuro A, Kinoshita S. Sex differences in meibomian gland physiology. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, USA, 2008.4.27.
- ⑫ Hori K, Hamuro J, Sotozono C, Kawasaki S, Yokoi N, Ueda H, Tabata Y, Kinoshita S. A newly developed biodegradable punctal plug with controlled bFGF release for permanent lacrimal punctal occlusion. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, USA, 2008.4.27.
- ⑬ Komuro A, Yokoi N, Maruyama K, Kinoshita S. Retension of long-acting carmellose alginic ophthalmic solution on the human ocular surface. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, USA, 2008.4.28.
- ⑭ Tanioka H, Yokoi N, Shimamoto T, Komuro A, Kawasaki S, Matsuda M, Kinoshita S. Composition of the corneal filament in filamentary keratitis on immunohistochemical examination. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, USA, 2008.4.28.
- ⑮ Shimamoto T, Yokoi N, Maruyama K, Komuro A, Nishii M, Kinoshita S. Applicability of a new tear stability analysis system for the screening of dry eye. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, USA, 2008.5.1.
- ⑯ Yokoi N, Komuro A, Nishii M. A new surgery for punctal occlusion using fibrous tissue from under the caruncle. American Academy of Ophthalmology 2008 Joint Meeting with the European Society of Ophthalmology, Atlanta, USA, 2008.11.9.

シンポジウム (国内)

- ① 横井則彦. 涙液油層の動態解析. シンポジウム 2 前眼部画像診断装置の現況.

第31回角膜カンファレンス・第23回日本角膜移植学会，宮崎，2007.2.11.

② 横井則彦. ドライアイにおける涙液油層の動態変化. シンポジウム7 新世界ドライアイ診断基準とドライアイ診断における考え方はこう変わった. 第111回日本眼科学会総会，大阪，2007.4.20.

一般講演（国内）

① 横井則彦、山田英明、木下 茂、横井則彦、加藤孝久、水草 豊. 関法による涙液油層伸展動態の自動解析法の開発とその臨床応用. 第31回角膜カンファレンス・第23回日本角膜移植学会，宮崎，2007.2.9.

〔図書〕（計6件）

① 横井則彦. 涙液検査. 今日の眼疾患治療指針 第2版, 667-669, 2007.

② 横井則彦. メニスコメトリ、インターフェロメトリ. 今日の眼疾患治療指針 第2版, 669-670, 2007.

③ 横井則彦. マイボメトリ、マイボグラフィ. 今日の眼疾患治療指針 第2版,

④ 横井則彦. ドライアイ. 眼科プラクティス18 前眼部アトラスIII. 角膜 7. 角膜上皮・表面, 207-213, 2007.

⑤ 横井則彦. 年齢とともにドライアイがひどくなると聞きました. 何か気をつけられることはありますか? 患者さんから浴びせられる眼科疾患100の質問, 64-65, 2008.

⑥ 横井則彦. ドライアイで防腐剤抜き目の薬を使うようにいわれました. どこで手に入るのでしょうか? 患者さんから浴びせられる眼科疾患100の質問, 66-67, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 則彦 (YOKOI NORIHIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60191491

(2) 研究分担者

川崎 諭 (KAWASAKI SATOSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：60347458

松田 彰 (MATSUDA AKIRA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教（研究申請時、現順天堂大学・医学部・医学研究科・准教授

研究者番号：00312348

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

福岡 秀紀 (FUKUOKA HIDEKI)

京都府立医科大学・医学研究科・大学院生

研究者番号：なし

谷岡 秀敏 (TANIOKA HIDETOSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・研究生

研究者番号：なし