

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09780

研究課題名(和文)三次元再生涙腺構造の誘導と新規バリデーション手法の開発

研究課題名(英文)A novel assessment for the lacrimal gland functional regeneration

研究代表者

平山 雅敏(Hirayama, Masatoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号：90528473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：涙腺は眼表面に涙液を分泌することで眼表面上皮の恒常性を維持する。本研究では、まずマウス涙液を用いて涙液中の細胞外小胞の解析を行った。その結果、涙液中にエクソソームをはじめとする細胞外小胞が存在し、角膜上皮細胞において恒常性にかかわる可能性が示唆された。また、涙腺上皮特異的遺伝子発現により、角膜上皮オルガノイドの形態変化や羊膜由来細胞における涙腺上皮マーカーの発現増加などが可能であることが明らかとなり、他系統細胞からの涙腺細胞誘導の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

涙液中には水分だけでなく、涙液タンパク、電解質、サイトサインなどの液性因子を含んでいる。涙腺機能の障害による涙液量の低下は、涙液水分、液性因子の不足を引き起こし、ドライアイなどの眼表面上皮障害の原因となる。本研究は、これまでなされていなかった涙腺機能と一部である液性因子分泌機能の新規評価手法を確立した。マウス涙液をモデルに、涙液中にエクソソームなどの細胞外小胞が含まれることを明らかとし、眼表面上皮の維持に貢献する可能性を示した。さらに、三次元角膜上皮オルガノイドや他系統由来細胞を用いて、多能性幹細胞以外からの涙腺再生の実現可能性について明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Lacrimal glands maintain the homeostasis of the ocular surface epithelium by secreting tear fluid onto the ocular surface. In this study, we first analyzed extracellular vesicles in tear fluid using mouse tears. As a result, it was suggested that extracellular vesicles such as exosomes are present in tears and are possible to be involved in homeostasis in corneal epithelial cells. In addition, it was revealed that morphological changes in 3 dimensional corneal epithelial organoids and increased expression of lacrimal epithelial markers in amnion-derived cells are possible by expression of genes specific to the lacrimal gland epithelium, suggesting the possibility of lacrimal gland cell induction from other cell lineages.

研究分野：眼科学

キーワード：涙腺 再生医学 ドライアイ 涙液 発生学

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

高齢社会、高度情報化社会の到来により、失明を克服し視機能を維持することは、国民の健康な生活においてますます重要となっている。涙腺は眼表面に涙液を分泌し、眼表面を保護することにより視機能に不可欠な役割を果たす。涙腺機能不全による涙液量減少（ドライアイ）は視機能異常を引き起こし、重度の場合、角膜輪部機能不全や角膜移植術後において失明に繋がる予後増悪因子として重要である。涙腺機能障害に対して、既存医療として涙液補充療法があるが、涙腺から分泌される液性因子などは含まれず、涙腺機能再生の手法の確立が求められている。涙腺組織再生の技術開発は、これまでも着実に進んでおり、人工多能性幹細胞からの涙腺細胞誘導のほか、新規技術による涙腺細胞誘導の技術開発が期待されている。また、涙腺機能として、涙腺から分泌される液性因子の分泌能を評価する手法の確立が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、重症ドライアイにおける失明の克服を目指して、涙腺の立体構造の再生可能性を検討すると同時に、エクソソームを軸とした新しい涙腺機能評価によるバリデーション手法の確立を目指す。現在、眼科臨床においてiPS由来角膜上皮細胞の臨床応用が進められ¹⁾、成果が報告されつつある。一方で、ドライアイを伴う重症眼表面疾患の眼表面の恒常性維持には涙腺機能が不可欠であり、効果的な眼表面再建は角膜・涙腺の機能再生を両輪として推進すべきと考えられる。涙腺を対象とした腺構造の分化誘導に関する報告はこれまでになく、国内で2000万人の患者数と推計されるドライアイの治療戦略に大きなインパクトをもたらす。さらに、涙液に含まれるエクソソームによるシグナル伝達系の解明を目指し、あたらしい涙腺機能評価系を確立することで涙腺再生の精度を向上させる。

本研究では涙腺の三次元再生の新規技術開発と涙腺機能の新規バリデーション手法の確立を目指して、外来性遺伝子発現による他系統の細胞から涙腺上皮細胞表現型の誘導が可能であるかを検討し、また、エクソソームなどの細胞外小胞によるシグナル伝達を軸とした新たな涙腺機能評価系を確立する。

3. 研究の方法

再生涙腺の眼表面保護効果は、水分の他に涙液リキッド中の生理活性物質などが関わることで予想され、機能評価に当たっては重視される。再生された涙液が涙腺から分泌される生理活性物質を含む証明として、本研究では涙液機能の新規の解析手法として涙腺から分泌される涙液中のエクソソーム解析を取り入れ、涙腺機能の確実なバリデーション手法確立のための基盤的知見としてその機能解析を行う。

涙腺は角膜上皮と同様、未分化眼上皮細胞を発生基盤とする。これまでに研究者らのグループでは、ヒト角膜上皮細胞を用いた3次元角膜オルガノイド形成の技術開発を行い、それを生体に移植することで成熟した角膜上皮細胞が誘導可能であり、角膜オルガノイドが未分化眼上皮細胞を含むことを報告した(Higa et al. ARVO, 2019)。概説すると、ヒト角膜検体から角膜上皮幹細胞を分離し、本学にて確立した三次元培養環境で培養することでオルガノイド形成を誘導する。組織学的にこのオルガノイドには眼表面由来上皮系細胞と上皮幹細胞が含まれていることが確認された。本研究では、同様の手法を用いて3次元角膜上皮オルガノイドを作製する。角膜上皮細胞に涙腺特異的転写因子を導入し、3次元培養環境で眼上皮オルガノイドを形成させることで、三次元培養環境におけるオルガノイドの形態変化を解析する。また、他系統の細胞においても涙腺上皮特異的遺伝子発現による涙腺上皮マーカー発現の変化について解析し、涙腺再生における人工多能性幹細胞以外の細胞リソースの探索を目指す。涙腺・涙液におけるエクソソーム医学は、これまで報告がなく、本研究成果は将来的に再生医学を補完・代替する新規治療となる可能性がある。

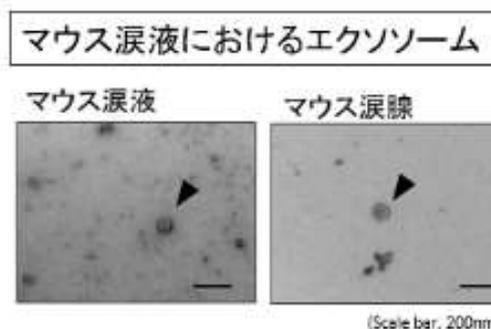
4. 研究成果

(1) マウス涙液中の細胞外小胞の分離と観察

まず、涙腺における液性因子のひとつである細胞外小胞の存在とその役割について解析をした。マウスより麻酔下において涙液を採取し、超遠心法にて細胞外小胞を分離し、電子顕微鏡下にて観察を行った(右図)。また、ウェスタンブロッティング法にて細胞外小胞マーカーの発現を確認した。

(2) マウス涙液細胞外小胞の角膜上皮細胞への取り込みの解析

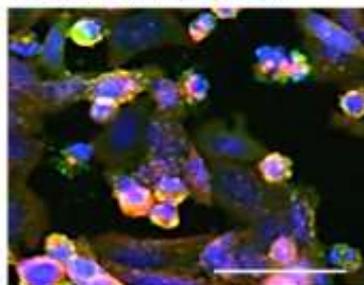
培養角膜上皮細胞に分離されたエクソソームを導入したところ、細胞に取り込まれる像



が観察可能であり、導入された細胞において、コントロール細胞と比較して細胞増殖機能がコントロール群と比較して有意に増加した（右図）。

涙液エクソソームの角膜上皮細胞への取り込み

Exosome / Phalloidin



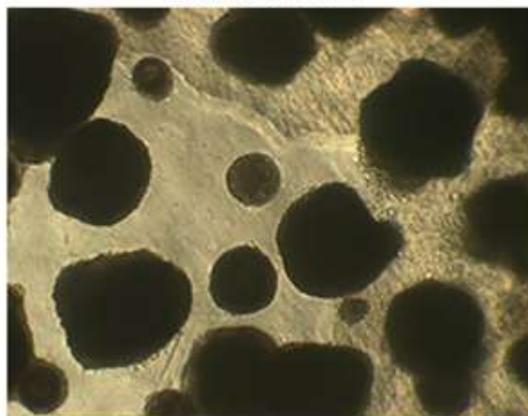
(3) マウス涙液細胞外小胞の角膜上皮細胞の恒常性への関与の詳細解析

さらに、導入細胞における遺伝子発現変化を解析するために、導入細胞とコントロール細胞のマイクロアレイ解析を施行した。遺伝子発現解析では、導入細胞において513遺伝子の発現増加を認めた。これらの発現増加遺伝子の機能解析を施行したところ、細胞周期や細胞骨格に関する遺伝子群が有意に増加していることが明らかとなった。このことから、涙液中の細胞外小胞が、*in vitro*での培養角膜上皮細胞において、生理的恒常性維持に関与する可能性が示唆された。

(4) 涙腺上皮特異的遺伝子発現3次元ヒト角膜上皮オルガノイドの作製と形態変化の解析

研究用角膜から得た角膜上皮細胞を、平面培養を経て3次元的に培養し、角膜上皮オルガノイドを作製した。平面培養の段階で涙腺上皮特異的遺伝子を外来性に発現させ、3次元角膜上皮オルガノイドを作製し、その形態変化について解析したところ、一部のオルガノイドでオルガノイドから突出する組織変化を示したものの、形態変化の頻度は一定でなく、さらなる条件検討の必要性が示唆された（下図）。

転写因子導入（-）



転写因子導入（+）



(5) 涙腺上皮特異的遺伝子発現羊膜由来間葉細胞における涙腺上皮マーカーの発現の解析

涙腺腺房に発現するマーカー蛋白として、水チャネルであるアクアポリン5や分泌蛋白であるラクトフェリンなどが知られている。平面培養において他系統の培養細胞に涙腺上皮特異的遺伝子を外来性に発現させ、涙腺上皮マーカーの発現についてqPCRを用いて解析した。羊膜由来の細胞を用いて解析したところ、アクアポリン5やラクトフェリンのmRNA発現の増加が認められ、胎生胚細胞や人工多能性幹細胞以外を細胞リソースとした涙腺分化誘導の可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Hayashi et al. Nature, 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平山雅敏、比嘉一成、島崎潤
2. 発表標題 角膜上皮細胞における涙液エクソソームの生理学的機能の解析
3. 学会等名 角膜カンファランス2021
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------