

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592245

研究課題名（和文）

SOD1 ノックアウトマウスを用いたドライアイ発症における上皮間葉移行の検討

研究課題名（英文）

Role of Epithelial Mesenchymal Transition on the Pathogenesis of Dry Eye Disease in SOD1 Knock Out Mice

研究代表者

根岸 一乃 (NEGISHI KAZUNO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：10228281

研究成果の概要（和文）:

本研究においてスーパーオキシドジスムターゼ（Superoxide dismutase, SOD）1 欠損高週齢マウスでは同週齢の野生型に比べて涙液量の減少及び眼表面障害が起きていた。また免疫組織学的検討により涙腺の炎症、線維化、酸化ストレスマーカー発現の上昇を認めた。これらの変化のメカニズムとして上皮間葉移行(Epithelial Mesenchymal Transition)の関与を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要（英文）:

In the Cu,Zn-superoxide dismutase knock out mice (*Sod1*^{-/-} mice), decreased tear secretion and ocular surface abnormalities were observed. Moreover, prominent fibrosis, inflammation and increased oxidative stress marker staining were found in *Sod1*^{-/-} mice. The current study revealed that the epithelial-mesenchymal transition could be involved in the histological changes in *Sod1*^{-/-} mice.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 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：ドライアイ 老化 ストレス

1. 研究開始当初の背景

加齢はフリーラジカルによる組織障害が関係すると報告されている¹。そしてフリーラジカルを産生と除去する機構の不均衡が酸化ストレスを引き起こす。これは加齢に伴って起こる様々な病気で認められる細胞障害を生じ、老化過程の主要な因子と考えられている。よく知られた抗酸化ストレスのメカニズムとしてスーパーオキシドジスムターゼ（superoxide dismutase, SOD）という酵素がある。SOD はアイソザイムとして SOD1、

SOD2、SOD3 があり、この中で SOD1 が最も多くの組織に存在し、SOD 活性の約 90% を担うとされている²。

以前に我々のグループは SOD1 ノックアウトマウス（SOD1KO マウス）において網膜に障害が起き、それがヒトで認められる加齢性黄斑変性の特徴に類似していることを報告した³。加齢性黄斑変性症の発症率は米国で 40 歳以上の 1.47% と報告されている⁴が、ドライアイはそれよりも有病率が高く、3.98 から 9.8% と報告されている⁵。またド

ドライアイは視機能に影響を与える疾患であり、公衆衛生上も非常に重要な疾患であると認識されている。

2. 研究の目的

モデルマウスを使った実験やヒト対象のドライアイ研究によって、ドライアイでは、涙液分泌の低下、角結膜上皮障害、涙腺における炎症が起こることが明らかになっている⁶。また涙液分泌はヒトで年齢とともに減少することが報告されており、ドライアイの発症も年齢とともに高くなる。我々は、酸化ストレスの蓄積がドライアイ発症に関与するかどうかを検討するために、SOD1 ノックアウトマウス及び野生型マウスの涙液機能、眼表面障害、涙腺の病理組織学的検討を行った。

3. 研究の方法

<動物>

10週齢と50週齢でそれぞれ17匹の野生型マウス(C57BL/6)及びSOD1KOマウスを実験に用いた。SOD1KOマウスは東京老人総合研究所より提供を受けた。動物実験は全てAssociation for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)の動物実験ガイドラインに則り行った。

<涙液分泌量測定>

マウスの涙液分泌量測定にはフェノールレッド系(ゾーンクイック、昭和薬品株式会社)を用いて、60秒間無麻酔のマウスの外眼角部から測定を行い、体重により値を補正した。

<ピロカルピン刺激涙液分泌量測定>

マウスを麻酔後、0.06%のピロカルピンを3mg/kg腹腔内投与した。その後5µlのガラスキャピラリーチューブを用いて分泌された涙液を集め、涙がチューブに侵入した長さから涙液量を算出した。

<カルバコール刺激による涙腺の分泌総タンパク質の測定>

カルバコールはアセチルコリン受容体に作用して涙腺から涙液の分泌を促進する。摘出したマウスの涙腺を1~2mmの大きさに細切り、カルバコール刺激の前後でタンパク質を抽出し濃度を測定し、その差をカルバコール刺激による総タンパク質量とした。

<涙液採取方法>

0.1M PBS10µlをマイクロピペットで眼表面上に滴下し、その後外眼角部からガラスキャピラリーチューブを用いて涙液を採取した。

<サイトカインビーズアッセイ>

Mouse inflammation kit(ベクトン・ディッキンソン株式会社、BD社)を用いた。測定したサイトカインはインターロイキン6、インターロイキン10、インターロイキン12p70(IL-12p70)、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)、インターフェロン(IFN- γ)、Tumor necrosis factor(TNF)で

ある。蛍光の読み取りはFACSCaliburフローサイトメーター(BD社)を用いて、データの解析はCytometric bead Array software(BD社)を用いた。

<涙腺組織の採取、固定>

マウスを屠殺後、涙腺組織を周囲の脂肪組織や結合組織を外しながら採取し、すぐに4%パラホルムアルデヒドに浸漬しパラフィンブロックとした。凍結サンプルは未固定のまま、液体窒素を用いてOCTコンパウンドに封入した。

<凍結組織、蛍光抗体を用いたEpithelial mesenchymal transition(EMT)及び炎症細胞検出のための免疫染色>

凍結標本は厚み4~6µmに薄切した。標本を風乾後4%パラホルムアルデヒドで20分間固定した。その後1%bovine serum albumin及び2%ロバ血清にて20分間ブロッキングを行い、1次抗体を作用させた。1次抗体はウサギ抗-SMA抗体(0.01mg/ml, ab5694 Abcam社)、ラット抗-E cadherin抗体(0.01mg/ml, ab11512, Abcam社)、ウサギ抗I型コラーゲン(0.01mg/ml, ab292, Abcam社)、ラット抗CD4抗体(0.01mg/ml, 14-0041, eBioscience社)、ラット抗CD11b抗体(0.026mg/ml, ab8878, Abcam社) and ラット抗Gr-1抗体(0.01mg/ml, ab25377, Abcam社)を用いた。2次抗体はFITC標識抗ラットIgG抗体(0.0075mg/ml, Jackson Immunoresearch Laboratories社)、FITC標識抗ラットIgG抗体(0.0075mg/ml, Jackson Immunoresearch Laboratories社)を使用した。

<パラフィン包埋組織を用いた酸化ストレスマーカー及びCD45の免疫染色>

パラフィン固定組織は4µmの厚みで薄切した。免疫染色にはアビジン・ビオチンペルオキシダーゼ複合体法を用いた(Vector Laboratories社)。馬血清を用いてブロッキングを行い、その後1次抗体として抗8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)モノクローナル抗体(10µg/ml, 日本老化制御研究所)、抗4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)モノクローナル抗体(25µg/ml, 日本老化制御研究所)、抗CD45抗体(10µg/ml, BioLegend社)を用いた。1次抗体作用後に3%過酸化水素を5分作用させた。その後2次抗体としてビオチン標識抗マウスIgG抗体を使用した。

<血清中8-OHdG濃度測定>

血清中の8-OHdG濃度はELISAキット(日本老化制御研究所)を用いた。

<ヒト涙腺組織の酸化ストレスマーカー及び炎症細胞マーカーでの免疫染色>

ヒト涙腺組織は剖検におけるパラフィン組織標本を使用した。17歳から48歳までの若年群および76歳から87歳までの高齢者群からの各群6名の組織を自治医科大学小幡博

人先生より提供を受けた。免疫染色の方法は前述と同じ方法で行った。

<定量的 PCR による EMT マーカーの評価>
摘出した新鮮マウス涙腺は速やかに RNA later (Applied Biosystems 社) に保存した。その後組織は ISOGEN に浸漬し十分にホモジナイズした。RNA を抽出した後、DNase で処理し cDNA 合成をした。サイバークリーンを用いたリアルタイム PCR を StepOnePlus (Applied Biosystems 社) で行った。プライマーはマウス glyceraldehyde 3-phosphate (GAPDH) (sense 5' - TGA CGT GCC GCC TGG AGA AA - 3', antisense, 3' - AGT GTA GCC CAA GAT GCC CTT CAG - 5'), マウス Snail (sense 5' - TGG AAA GGC CTT CTC TAG GC - 3', antisense, 3' - CTT CAC ATC CGA GTG GGT TT - 5'), マウス E-cadherin (sense 5' - GGC TTC AGT TCC GAG GTC TA - 3', antisense, 3' - CGA AAA GAA GGC TGT CCT TG - 5'), マウス SMA (sense 5' - CTG ACA GAG GCA CCA CTG AA - 3', antisense, 3' - AGA GGC ATA GAG GGA CAG CA - 5') を用いた。

4. 研究成果

酸化ストレスマーカーの免疫染色において 4HNE の染色が 50 週齢 SOD1KO マウスで強く認められ、染色面積の定量化では 50 週 SOD1KO マウスでは 50 週齢野生型、10 週 KO マウスに比べて有意に染色面積が大きかった。血清中の 8-OHdG 濃度は 50 週 SOD1KO マウスでは 50 週野生型、10 週 SOD1KO マウスに比べて有意に高値を示した。(図 1)

涙腺組織の電子顕微鏡像では 10 週野生型、10 週 SOD1KO マウス、50 週野生型マウスではほとんど変化は認められなかったが、50 週 SOD1 ノックアウトマウスにおいて、涙腺腺房上皮細胞内のミトコンドリアに著大な形態異常を認めた。(図 2)

涙腺組織内の炎症細胞浸潤はどちらのマウスにおいても週齢とともに増加を認めた。特に 50 週齢 SOD1KO マウスにおいて CD45 陽性炎症細胞の浸潤が著明に認められた。炎症細胞密度は 50 週 SOD1KO マウスにおいて 10 週 SOD1KO マウス、10 週野生型マウスに比べて有意に高値を示した。炎症細胞を CD4、CD11b、Gr-1 抗体で染色し分類した。これによると CD4 陽性のヘルパー T 細胞が CD11b 陽性の単球や Gr-1 陽性の好中球に比べて優位であった。50 週 KO マウスの血清中 IL-6 濃度は 10 週齢 SOD1KO マウスに比べて高値を示した。50 週齢ノックアウトマウスの血清中 TNF 濃度及び涙液中 IL-6、TNF 濃度は 50 週齢野生型マウス、10 週 SOD1KO マウスに比して有意に高値を示した。(図 3)

50 週 SOD1KO マウス涙腺組織においては TUNEL 染色陽性細胞が著明に多く、同様にカ

スパーゼ 3 染色も同様な結果を得た。透過型電子顕微鏡では 50 週 SOD1KO マウス涙腺腺房上皮細胞の核の濃縮、断片化を認めた。細胞質内の空胞、核膜の喪失を認めた。(図 4) マロリー染色では、50 週 SOD1KO マウスにおける小葉間の著大な繊維化が示された。平均の腺房単位数は 50 週 SOD1 ノックアウトマウスにおいて、10 週 SOD1 ノックアウトマウス及び 50 週齢野生型に比べて有意に低値をしめした。(図 5)

I 型コラーゲンにて腺房上皮細胞の基底膜を評価したところ、50 週 SOD1 ノックアウトマウスでは基底膜の断裂が認められた。50 週 SOD1 ノックアウトマウスにおいて上皮系細胞のマーカーである E-カドヘリンの染色性が現弱し、間葉系細胞マーカーである SMA 陽性細胞が増加していた。リアルタイム PCR による mRNA の定量化を行ったところ、Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) の誘導因子である Snail の発現が 50 週齢 SOD1KO マウスでは 10 週齢 SOD1KO マウスおよび 50 週野生型マウスに比べて有意に高値であった。また E-カドヘリンは 50 週 SOD1 ノックアウトマウスで 50 週野生型マウスに比べて有意に低値を示し、逆に SMA は SOD1 ノックアウトマウスで野生型よりも高値をしめした。SMA/E-カドヘリン比は 50 週 SOD1 ノックアウトマウスで 50 週野生型マウス、10 週 SOD1KO マウスに比べて有意に高値を示した。(図 6)

50 週 SOD1 ノックアウトマウスの透過型電子顕微鏡写真では腺房上皮細胞の微絨毛が間質側に発現しており、細胞極性の喪失が示唆された。また著明な間質におけるコラーゲン繊維も認めた。(図 7)

体重補正した涙液分泌量は SOD1KO マウスで 10 週 SOD1 ノックアウトマウス、50 週野生型マウスに比べて有意に低値を示した。ピロカルピン刺激では 50 週 SOD1KO マウスでの涙液分泌量は 50 週野生型に比べて有意に低値を示した。カルバコール刺激による涙腺からの総タンパク質分泌量も 50 週 SOD1KO マウス涙腺からの分泌量は同週齢の野生型マウスに比べて低値であった。電子顕微鏡で分泌顆粒を測定したところ、50 週 SOD1KO マウスでは 10 週 SOD1KO マウス及び 50 週野生型マウスに比べて高値であった。眼表面障害の視標であるフルオレセイン染色スコアは 50 週 SOD1KO マウスでは 10 週 SOD1 ノックアウトマウス及び 50 週野生型マウスに比べて高値であった。(図 8)

图 1

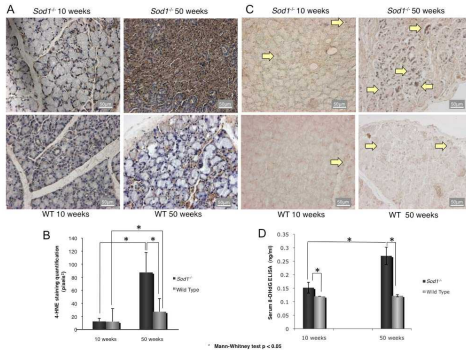


图 2

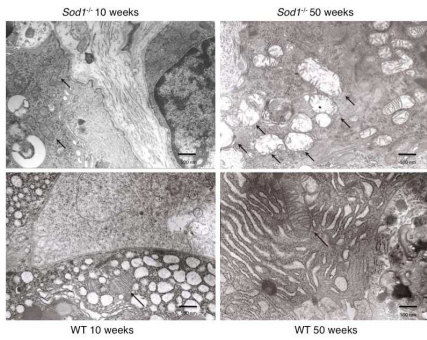


图 3

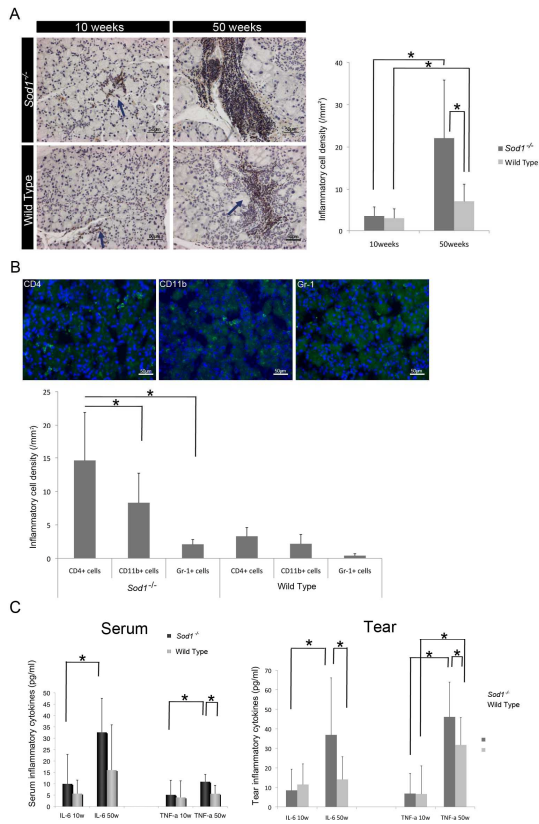


图 4

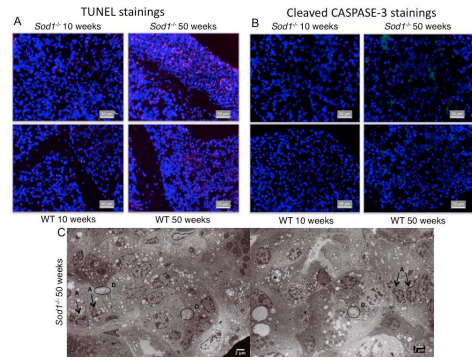


图 5

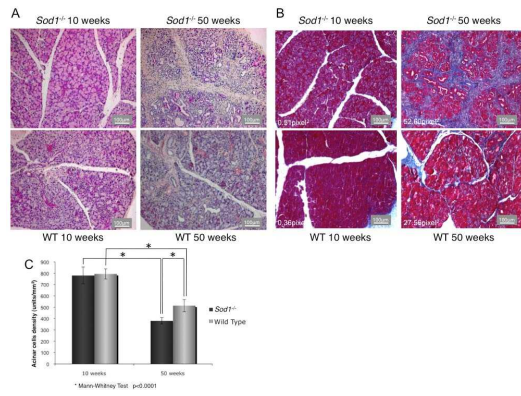


图 6

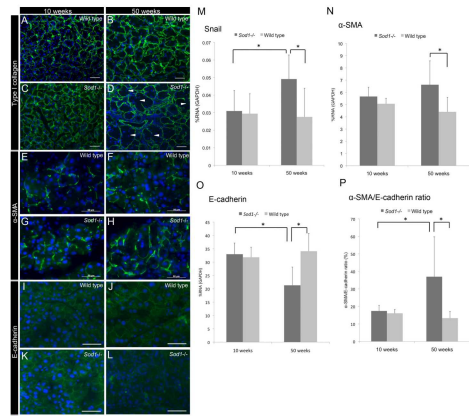
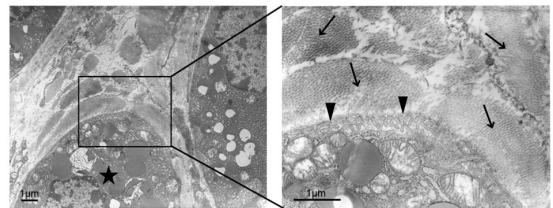
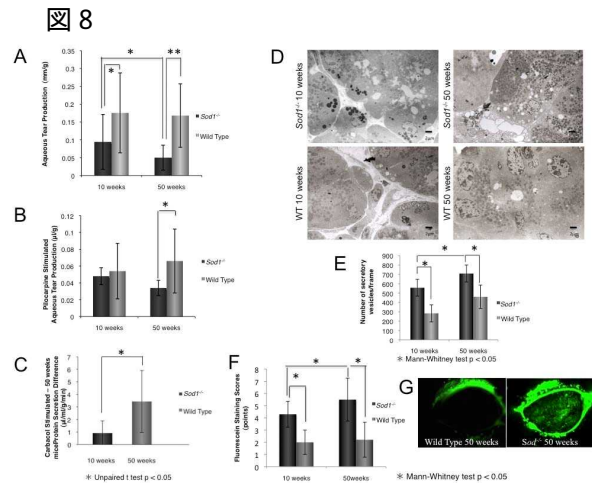


图 7





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1件)

Kojima T, Wakamatsu TH, Dogru M, Ogawa Y, Igarashi A, Ibrahim OM, Inaba T, Shimizu T, Noda S, Obata H, Nakamura S, Wakamatsu A, Shirasawa T, Shimazaki J, Negishi K, Tsubota K. Age Related Dysfunction of the Lacrimal Gland and Oxidative Stress: Evidence from the Cu,Zn-Superoxide Dismutase-1 (Sod1) Knockout Mice. Am J Pathol. 2012 May;180(5):1879-96. 査読あり

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

根岸 一乃 (NEGISHI KAZUNO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 10228281

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

村戸 ドール (MURAT DOGRU)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号: 60385284