

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592650

研究課題名(和文) 涙腺細胞における評価系確立を目的とした、涙腺上皮細胞株の樹立

研究課題名(英文) Establishment of lacrimal gland epithelial cell line for the evaluation of lacrimal gland cells

研究代表者

川北 哲也 (KAWAKITA, TETSUYA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50408308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：7週齢CD1マウスより涙腺上細胞を培養し、細胞株として樹立した。この涙腺上皮細胞の培養技術を用いて、初代培養と樹立した細胞株から嚢胞様構造を効率よく形成させる条件を、培地、酵素処理時間、培養時間から検討し、最適条件を決定した。その条件において形成された嚢胞を用い、コヒーレント反ストークスラマン散乱顕微鏡(CARS顕微鏡)を用いて、嚢胞内外の水の移動の観察、解析を行なった。形成した嚢胞構造にサイズや構造のばらつきを認め、分泌機能のアッセイ系として有用かどうかの評価には追加研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We established lacrimal gland epithelial cell line spontaneously from 7-week old CD1 mice. Cyst-like cell aggregates were generated with modifying condition of cultivated time, culture medium, and enzyme treating time. using the defined conditions form established cell line and primary culture. Those cyst were used to observe and analyze the water movement by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering microscope. Although water movement could be observed, we need to generate cysts with the same size morphology for applying assay as the function of lacrimal glands. We need further study to solve this problems.

研究分野：細胞生物学

キーワード：涙腺 細胞株

### 1. 研究開始当初の背景

涙腺分泌機能の研究は、近年のドライアイの増加に伴い注目されてきている。唾液腺研究においては唾液腺上皮細胞株が存在し、様々な実験系に用いられているが、涙腺においては現在利用できる涙腺上皮細胞株が存在せず、生体外でも実験は困難であった。我々は世界ではじめてマウス涙腺上皮細胞株を樹立した。CARS 顕微鏡は この細胞、また初代細胞を用いて嚢胞を作成し、CARS 顕微鏡で薬剤添加前後のスフェア内外の水の動きを観察することによりドライアイの創薬のためのスクリーニング検査を開発することを着想した。

### 2. 研究の目的

ドライアイは、涙腺分泌機能低下に起因するものと起因しないものに大別することができる。シェーグレン症候群などは前者に分類され、主には涙腺の炎症、線維化によって涙液分泌機構が破綻していると考えられ、根本治療は涙腺を賦活化させ涙液分泌を促進させることである。しかしそういった治療薬候補のスクリーニングに対する有効なアッセイ系はまだ存在しない。生体外で様々な因子をスクリーニングするためのアッセイ系を開発することが必要と考え、前研究課題では涙腺上皮細胞の細胞株樹立を行なった。本研究では、その細胞株、あるいは初代細胞を用いて、嚢胞を効率よく形成させ Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡を用い水の移動をリアルタイム解析するアッセイ系を確立する事を目的とする。前研究では、いままでマウス角膜の細胞株を樹立してきた技術を用いて涙腺細胞株を樹立し、涙腺分泌ユニットの3次元構築が抵抗率ではあるが、できることまで明らかにした。本研究では、初代あるいはこの涙腺上皮細胞株から作成したスフェアを用いた涙液分泌機能のアッセイ系の確立をめざすものである。その観察には CARS 顕微鏡を用いる。本研究の意義として一番に挙げられるのは、ドライアイに対する創薬分野の生体外アッセイ系を確立する事により、様々な物質をスクリーニングできる点である。ドライアイの分類の中でも、シェーグレンタイプのドライアイは高齢者の女性に多く、今後急増する可能性がある。近年の点眼治療薬の進歩もあるが、すべての点眼薬は眼表面の涙液安定性をターゲットにしており、メインの涙液産生の場合である涙腺分泌機能の賦活化、改善をターゲットにはしていない。こういった創薬分野だけでなく、生体外での水の動きがリアルタイムで解析できるようになると、涙液分泌に関わる分子メカニズムの研究が飛躍的に発展する可能性がある。

また、本研究が独創的な点は、我々が樹立した自然不死化マウス涙腺由来上皮細胞株を用いることである。細胞株で嚢胞形成

が得られなかった場合、初代培養のマウス涙腺由来細胞を用いる予定である。予想される結果としては、涙マトリゲル上に培養すると Sphere 形成し、CARS 顕微鏡で水の移動を解析可能であると予想している。

### 3. 研究の方法

我々はすでに7週齢 CD1 マウスより涙腺上皮細胞の培養方法を確立しており、細胞株の樹立にも成功している。この涙腺上皮細胞の技術を用いて、まず初代培養、細胞株から嚢胞を効率よく形成させる条件を、培地、酵素処理時間、培養時間から検討し、最適条件を決定した。

その後、その条件において形成された嚢胞を用い、CARS 顕微鏡で嚢胞内外の水の移動の観察、解析を行なった。その後、涙腺分泌促進剤(ピロカルピン、P2Y2 アゴニスト)による刺激で水の移動に変化があるかどうかを観察し、分泌機能のアッセイ系として有用かどうかの評価を行なう。

- (1) 7週齢 CD1 マウス涙腺の初代培養上皮細胞から嚢胞形成を行なう
- (2) 7週齢 CD1 マウス由来涙腺上皮細胞株から嚢胞形成を行なう

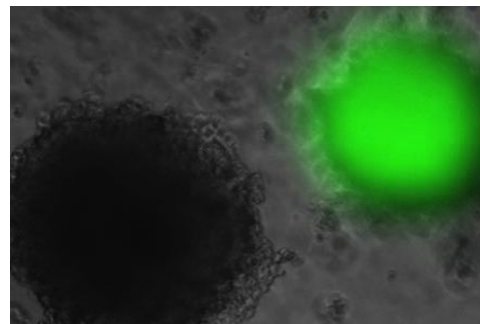
以上に関しては、これまでの細胞株樹立の成果に基づき、すでに培養、嚢胞形成の効率を改善するための条件検討の実験を初めており、最適酵素処理時間の決定を行なった。

その嚢胞形成における培養過程を細かく実体顕微鏡で形態を観察しながら、適宜嚢胞のヘマトキシリン-エオジン染色による細胞形態観察も行い、より均一性の高い球型に近い 50-100 μm 程度の直径の嚢胞を形成させる条件を培地、培養時間から検討した。

最適な培養条件を決定し、その条件で培養、形成した嚢胞の凍結切片で、AQP5、AQP8(分泌機能性因子)、ラクトフェリン(涙腺分泌物マーカー)で分泌機能を有するか確認した。

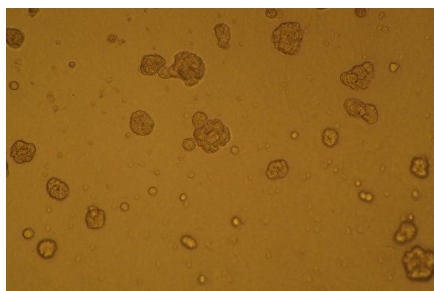
### 4. 研究成果

- (1) 7週齢 CD1 マウス涙腺培養上皮細胞株の表現型の解析  
7週齢 CD1 マウス涙腺培養上皮細胞株から

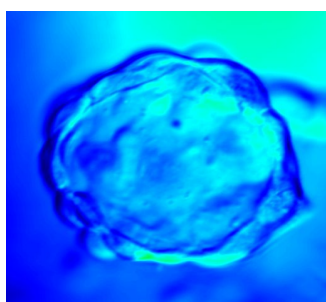


きた嚢胞が単一細胞からであることを確かめるために GFP マウスと野生タイプマウスの涙腺上皮細胞をコラゲナーゼタイプ 1 で 3 時間の酵素処理を行い、単一細胞化した後に 1 : 1 で混合し、マトリゲル上にて培養した。その結果グリーンの嚢胞とグリーンでない嚢胞に分かれており、細胞が混合されている嚢胞は観察されなかった。このことから、嚢胞は単一の細胞から形成されている可能性が示唆された。(文献 1 参照)

## ( 2 ) 効率的に嚢胞を作成する条件の検討



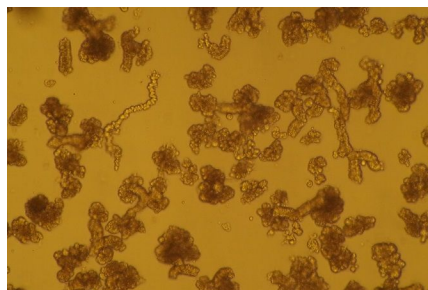
( 1 ) で形成された嚢胞は、他の器質 (ゼラチン) 上ではきれいな嚢胞を形成しなかった。また、マトリゲル上で 5-7 日以上培養すると、細胞質内に大きな嚢胞をもつ細胞が 5-10 % の頻度で出現した。そこで、器質はマトリゲル、培養時間を 5 日間とし、嚢胞を CARS 顕微鏡にて水の動きの観察を試みた。しかし、中空構造が適度に形成されている嚢胞が存在せず下図のように水の動きの測定には至らなかった。その条件で培養、形成した嚢胞の凍結切片では、AQP5、AQP8 (分泌機能性因子)、ラクトフェリン (涙腺分泌物マーカー) の発現は認めなかった。



## ( 3 ) 涙腺由来細胞による嚢胞以外のの涙腺分泌能アッセイ系の確立

至適条件において形成された嚢胞を用い、CARS 顕微鏡で嚢胞内外の水の移動の観察、解析を行なったが、今回作成した嚢胞では水の動きの観察には至らなかった。そのため、涙腺分泌促進剤 (ピロカルピン、P2Y2 アゴニスト) による刺激で水の移動に変化があるかどうか、分泌機能のアッセイ系の確立はできなかった。そのため、マウス涙腺のコラゲナーゼ処理を 1 時間に短縮すると導管構造物が

観察される。1 日経つとその構造は崩れてしまうので、コラゲナーゼ処理し、同日の導管構造物を用いて水の動きを観察できないかどうかも現在検討中である。(次図)



## 参考文献

1. Kobayashi S, Kawakita T, et.al. Characterization of cultivated murine lacrimal gland epithelial cells. Mol Vis. 2012;18:1271-7.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)  
なし

〔学会発表〕(計 2 件)

Tetsuya Kawakita, Characterization of murine lacrimal gland epithelial cell line. The Association of Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, 2012/5/8, Fort Lauderdale, Florida, USA.

川北哲也、マウス涙腺上皮細胞株の樹立と表現型の解析、角膜カンファランス、2012/2/24、ホテルニューオータニ (東京都・千代田区)

〔図書〕(計 2 件)

川北哲也 再生医療叢書 4 上皮・感覚器 涙腺 臨床における機能的涙腺再生 2013 年 P18-25 朝倉書店

川北哲也 再生医療用語ハンドブック、2015 年、P189、メディカルトリビューン 出版

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川北哲也 (KAWAKITA, Tetsuya)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：50408308

### (2) 研究協力者

柳員 (RYU, In)  
慶應義塾大学・医学部・大学院生

池浦一裕 (IKEURA, Kazuhiro)  
慶應義塾大学・医学部・大学院生

相馬義郎 (SOMA, Yoshio)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：60268183