

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893262

研究課題名(和文) 転写因子発現による幹細胞からの機能的涙腺の誘導

研究課題名(英文) Induction of the lacrimal gland cells from stem cells by the regulation of transcriptional factors expression

研究代表者

平山 雅敏 (Masatoshi, Hirayama)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：90528473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：涙腺は眼表面に涙液を分泌し、眼表面を保護する。現状の涙腺機能不全に対する治療は、人工涙液による対症療法であり、重症癬痕性角結膜疾患において重度に障害された涙腺機能の再建のために、涙腺再生医療の実現が求められている。本研究では、幹細胞からの転写因子発現制御による涙腺上皮細胞の誘導を目指して、涙腺器官形成能を持つマウス涙腺原基上皮細胞の細胞特性を明らかとした。さらに、マウスにおいて成体涙腺や涙腺に類似した器官を用いて網羅的遺伝子解析を行うことにより、涙腺発生過程において涙腺原基上皮特異的に発現する遺伝子群を解析し、幹細胞からの涙腺上皮誘導に重要と考えられる転写因子群を同定した。

研究成果の概要(英文)：The lacrimal glands play an important role to maintain a healthy ocular surface by secreting tear fluids. The regeneration of the lacrimal glands are expected as an next generation therapeutic strategy for the therapy of severe dry eye diseases. In this study, we have clarified the cell characteristics including cytokeratin expression and gene expression profile of the mice lacrimal gland germ epithelium, which have an ability of organogenesis of the lacrimal glands. It have shown that the expression of our identified genes are crucial for the development and differentiation of the lacrimal glands.

研究分野：眼科学

キーワード：涙腺再生 分化誘導

### 1. 研究開始当初の背景

涙腺は眼表面に涙液を分泌し、眼表面を保護することで視機能を維持する。現状の涙腺機能不全に対する治療は、人工涙液による対症療法であり、失明の危機にある重症瘢痕性角結膜疾患において重度に障害された涙腺機能の再建のために、涙腺再生医療の実現が求められている。

現在の涙腺機能不全にたいする涙腺再生研究において、細胞移入療法による障害涙腺組織の部分的修復を目指して、涙腺組織幹細胞の探索が進められている。サイトカインを用いた涙腺障害モデルでは、障害後の部分的再生の可能性が示され、腺房周囲の筋上皮細胞の組織修復への関与が示されたものの、いまだ詳細は明らかとなっていない。一方、外胚葉性器官である歯や毛包の器官再生に向けて、器官原基を人為的に再生し、発生メカニズムを利用して再生させる戦略が進められている<sup>5</sup>。再生した歯胚、毛包といった器官原基を歯や毛髪喪失部位に移植することにより、完全な歯や毛包が萌出して機能することが実証された。さらに生体外で成熟させた再生歯・毛包を移植により即時機能させる治療技術の概念が明らかにされた。申請者により涙腺、唾液腺外分泌腺再生へと応用され、新しい外分泌再生のアプローチとして発展した

### 2. 研究の目的

涙腺は眼球近傍の外胚葉上皮から発生することがわかっているものの、涙腺特異的な発生過程分化マーカーは明らかではなく、従来の誘導方法では涙腺腺房細胞の誘導は困難である。また、涙腺は発生時における上皮間葉相互作用により涙腺原基が形成され、周囲組織と連携した立体的な腺構造へと分化するため、分化した涙腺腺房細胞を得たとしても、成熟細胞の移入療法により立体的な腺構造が再生するかは明らかではない。そこで、申請者はこれまで、マウスにおいて涙腺器官形成能をもつ涙腺原基由来の上皮細胞、間葉細胞を用いることにより、再生涙腺原基を作製でき、移植することで再生涙腺器官が機能できることを明らかにした。この研究は、涙腺再生医療の実現可能性をはじめ実証すると同時に、涙腺原基細胞のような器官形成能を持つ涙腺細胞を誘導できれば、幹細胞から涙腺器官を再生できる可能性を示した。ヒト人工多能性幹細胞作製技術にみられるように、細胞の分化・未分化状態は、その細胞に発現する特定の転写因子のセットにより規定される。

本研究では、涙腺再生医療の実現へ向けて、まず、涙腺上皮細胞に特徴的な細胞特性を明らかにする。さらに、器官形成能を持つ涙腺原基上皮細胞の遺伝子発現パターンを明らかにし、幹細胞からの涙腺上皮誘導に必要な涙腺分化を決定する転写因子群を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、マウス涙腺原基上皮細胞、間葉細胞を用いたマイクロアレイによる遺伝子解析により、マウス涙腺の胎生期発生過程において増加するTF発現を時系列で解析し、すでに涙腺原基発生時に増加する Foxc2, Foxp2, Pax6, Six1 という転写因子群や、成熟時に発現するアクアポリン 5, アクアポリン 8, ラクトフェリンといった成熟マーカー群を見出している。また、涙腺原基、涙腺と同じく胎生期結膜より発生するハーダー腺原基、近傍にあり同一の発生起源をもつ眼輪結膜の上皮、間葉を分離し、各々を比較したマイクロアレイ解析を実施する。さらに、マイクロアレイ解析結果は、これまで研究協力者が行った各器官に発現する転写因子ネットワーク動態解析手法に基づいて、ソフトウェアにより他臓器・器官に発現する転写因子群と比較し、特異性を解析することにより、涙腺発生期の涙腺上皮・間葉における高発現、特異的な転写因子群を同定する。同時に、これまで不明であったマウス涙腺原基上皮細胞に特異的な細胞特性を明らかにするために、涙腺上皮細胞におけるサイトケラチンの発現解析を行い、涙腺原基上皮の分化、発現マーカーを明らかにする。

### 4. 研究成果

前述のマウス涙腺原基由来細胞を用いた涙腺再生の成果により、涙腺原基上皮細胞のような器官形成能を持つ涙腺細胞を誘導できれば、幹細胞から涙腺器官を再生できる可能性が示されたものの、これまで涙腺原基上皮細胞の細胞特性は不明であり、分化誘導は困難であるとされていた。そこで申請者は、マウス涙腺原基上皮細胞に特異的な細胞特性を明らかにするために、マウス胚性幹細胞、マウス涙腺原基間葉細胞や成体涙腺などの類似器官と比較したサイトケラチン発現の網羅的解析を行った。

まず、胎生 16.5 日のマウス涙腺原基をマイクロサージャリーにより摘出した。さらに、酵素処理を用いて、上皮組織と間葉組織に分離した (図 1)。

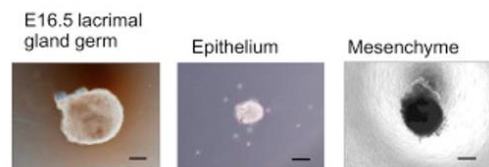


図1 摘出、分離されたマウス涙腺原基上皮細胞と間葉細胞

分離した上皮組織と、間葉組織について、mRNA 発現の解析を行ったところ、マウス涙腺原基において、サイトケラチン 5、サイトケラチン 8、サイトケラチン 14、サイトケラチン 15、差サイトケラチン 18 の発現はマウス

胚性幹細胞における発現と比べて増加していることがわかった (図2)。

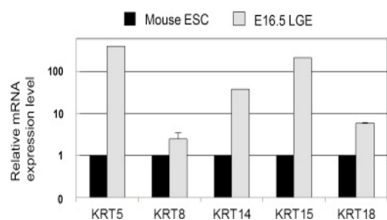


図2 摘出、分離されたマウス涙腺原基上皮細胞とマウス胚性幹細胞におけるサイトケラチン発現の比較

次に、これらのサイトケラチンの発現プロファイルの発生過程における継時的な変化を解析したところ、サイトケラチン 5、サイトケラチン 8、サイトケラチン 14、サイトケラチン 15、サイトケラチン 18 が確かに同じ発生時期の涙腺原基間葉細胞と比べて発現がぞうかしており、また、サイトケラチン 5 やサイトケラチン 14、サイトケラチン 18 の発現が成体涙腺においてさらにぞうかすることがわかった。一方、マウス涙腺発生過程において、サイトケラチン 15 は胎生期において発現が増加し、その発現は成体涙腺において明らかに減少することが明らかとなった (図3)。

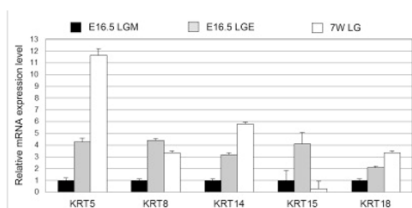


図3 マウス涙腺原基上皮細胞、マウス涙腺原基間葉細胞、マウス成体涙腺におけるサイトケラチン発現の変化

さらに、これまで過去の文献において、涙腺の発生過程において発現が報告されている遺伝子の発現の変化を解析した。すると、涙腺の上皮に発現するとされる Pax6 遺伝子は涙腺原基上皮、成体涙腺においても発現がほぼ同等に認められた。涙腺発生時に上皮に認めるとされる Runx1 は涙腺原基上皮で発現し、成体涙腺において減少していた。涙腺発生時のみに認められる上皮間葉相互作用による涙腺の分枝形成に重要であるとされる Fgf10 や Barx2 遺伝子は、涙腺原基上皮において増加しており、成体涙腺においては減少していた。また、涙腺の腺房細胞の成熟に伴って認められると考えられる、アクアポリン 5 やラクトフェリンといった分泌にかかわる遺伝子は、涙腺原基上皮における発現と比べ、成体涙腺において大きく増加していた。このことから、サイトケラチン 15 の発現プロファイル変化は、涙腺発生時のみに認められる上

皮間葉相互作用による涙腺の分枝形成に重要であるとされる Fgf10 や Barx2 遺伝子の発現プロファイル変化を類似しており、サイトケラチン 15 の発現は、涙腺発生過程におけるマウス涙腺原基上皮細胞に特異的に増加する可能性が示唆された (図4)。

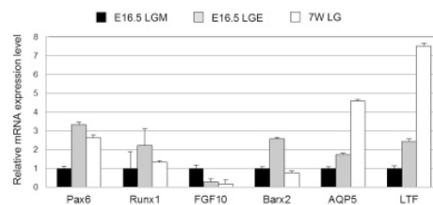


図4 マウス涙腺原基上皮細胞、マウス涙腺原基間葉細胞、マウス成体涙腺における涙腺発生マーカー発現の変化

本研究成果は、これまで不明であった涙腺細胞の誘導における分化マーカーのエビデンス確立に貢献した。

さらに、我々がこれまでに確立したマウス涙腺原基における上皮組織、間葉組織を分離する技術により、マウス涙腺原基上皮、マウス涙腺原基間葉、マウスハーダー腺原基上皮、マウスハーダー腺原基間葉、成体涙腺、生体ハーダー腺を用いて、マウス涙腺原基上皮細胞に特異的に発現する遺伝子群を同定した。これらの成果により、これまで明らかではなかった涙腺発生における転写因子を含む遺伝子群を明らかとした。

本研究成果は、今後、幹細胞からの涙腺上皮誘導において基盤的な知見となることが考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

1. Hirayama M, Liu Y, Kawakita T, Shimmura S, Tsubota K. Cytokeratin expression in mouse lacrimal gland germ epithelium. *Experimental Eye Research* 2015, 146:54-59 (査読有)

[学会発表] (計3件)

1. Hirayama M, Kawakita T, Shimmura S, Minoru Ko MS, Tsubota K. Induction of Lacrimal Gland Epithelial Cell Phenotype from Human ES Cells by Defined Factors. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. Denver, CO, USA, May3-7, 2015

2. 平山雅敏, 川北哲也, 榛村重人, 洪実, 坪田一男. 転写因子調節によるヒト涙腺上皮細胞表現型の直接誘導. 第119回日本眼科学会総会 ロイトン札幌 (北海道札幌市) 2015年4月16-19日

3. 平山雅敏, 川北哲也, 榛村重人, 坪田一男. マウス涙腺原基におけるサイトケラチン発現の解析. 第14回日本再生医療学会総会

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市） 2015  
年3月19-21日

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平山 雅敏 (HIRAYAMA, Masatoshi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：90528473