

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659312

研究課題名（和文）

ドライアイ疾患における性差の分子メカニズム

研究課題名（英文）

Molecular mechanism of gender gap in dry eye disease

研究代表者

坪田 一男（TSUBOTA KAZUO）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40163878

研究成果の概要（和文）：

女性に高頻度で発症するシェーグレン症候群の疾患メカニズムの解明および新規治療法の確立を目指し、性ホルモンと分泌機能障害の分子メカニズムを明確にする事を目的としている。初年度は mAChR のサブタイプ(M1-M5)の違いと涙液分泌機能の変化を解析し、涙液分泌には M1 および M3 が重要であることを明らかにした。最終年度では性ホルモンが涙液分泌におよぼす影響を解析し、涙液分泌の変化が去勢処置により変動し、性ホルモンの可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Sjogren's syndrome is a systemic autoimmune disease in which immune cells attack and destroy the exocrine glands that produce tears and saliva (resulting dry eyes and mouth). The incidence of Sjogren's syndrome significantly increases in middle-aged or older women. The pathogenesis is unknown. The elucidation of the molecular mechanism and early establishment of new therapeutic approach are expected. Therefore, we examined the role of mAChRs in tear secretion by using various mAChR (M1-M5) genes knockout (mAChRKO) mice. We revealed that M1/M3 AchRs are key molecules for tear secretion. In addition, tear secretion were changed by sex hormone treatments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

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、シェーグレン症候群、ムスカリン性アセチルコリン受容体

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群は、自己免疫疾患の一つであり、主に涙腺（ドライアイ）や唾液腺（ドライマウス）などの外分泌腺が慢性炎症を

起こす。男女比は 1 : 14 であり中高年の女性に有意に発症する。しかしながら、この発症メカニズムは未だ不明であり、その分子メカニズムの解明・新規治療法の早急な確立が望

まれている。最近、細胞内情報伝達物質であるイノシトール 3 リン酸受容体欠損マウス (IP3R 欠損マウス)が、シェーグレン症候群の病態と酷似する症状を呈することを我々は次々と明らかにしている (Futatsugi, Science 2005)。その中でムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR)欠損マウスが唾液および涙液分泌に異常をきたすこともわかってきた。さらに、シェーグレン症候群の患者血清中に mAChR に対する自己抗体が高頻度で認められることも報告されている。これらの結果は、mAChR とシェーグレン症候群の間に何らかの密接な関係があることを示唆していると考えられ、mAChR 欠損マウスの分泌機能障害を詳細に解析することがシェーグレン症候群の発症機構解明に繋がる可能性があると考えられている。

2. 研究の目的

女性に高頻度で発症するシェーグレン症候群の疾患メカニズムの解明および新規治療法の確立を目指し、性ホルモンと分泌機能障害の分子メカニズムを明確にする。

3. 研究の方法

初年度は各種 mAChR 欠損マウスの涙液分泌障害の解析を行い、マウスモデルとしての妥当性を検証する。2 年目では性ホルモンによる涙液分泌障害の詳細な分子メカニズムを明らかにし、ドライアイの病態解明へ貢献する。

具体的にはドライアイ状態の検討するために涙液量の測定を行った。涙液量の変化を調べるために各種 KO マウスに対して mAChR アゴニストである pilocarpine で刺激を行い、涙液量を micro capillary tube を用いて測定した。また、病理組織学的な解析手法を用いて構造を観察した。

さらに、性ホルモンと分泌機能の関係を明らかにするために去勢処置 (雄マウスの精巣除去)し、性ホルモンの影響を減らしたマウスの涙液量を測定した。

4. 研究成果

mAChR のサブタイプ (M1-M5)の違いと分泌障害を明らかにする為、各サブタイプの欠損マウスの涙液分泌異常を解析した。その結果、ドライアイ様所見である涙液分泌障害は M1 と M3 が主であることを明らかにした (図 1)。加えて、M1/M3 欠損マウスの涙腺を病理組織学的に解析したところ腺房細胞に分泌顆粒の異常蓄積を認めた。しかし、腺房細胞の形態異常は認められなかった (図 2)。

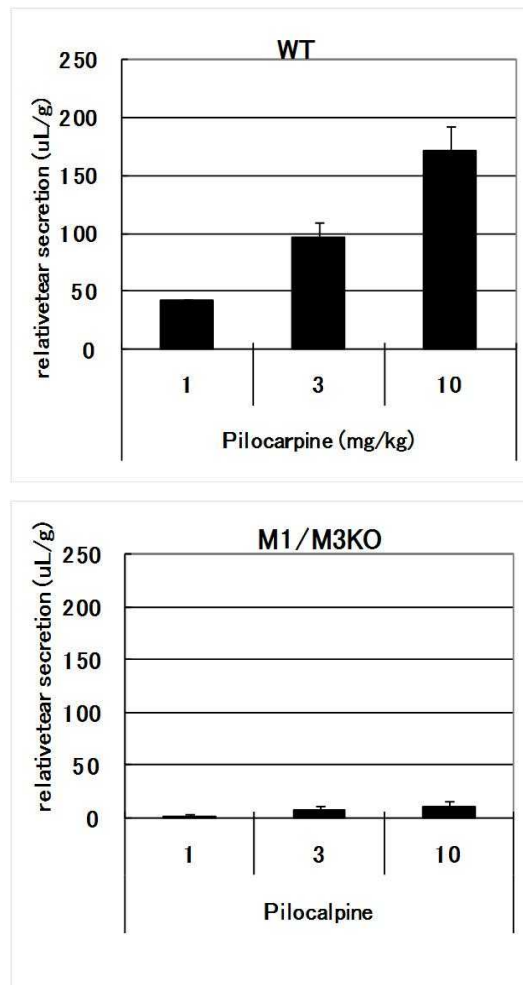
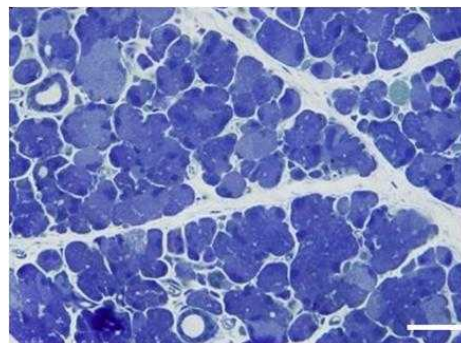


図 1. Pilocarpine 刺激による野生型マウス (WT: 上段) および M1/M3 欠損マウス (M1/M3KO: 下段) における涙液分泌量の測定。

6 週齢のマウスをケタミン・キシラジンにて麻酔し、ピロカルピン (1-10 mg/kg, body weight, i.p.) で処置後、15 分間の涙液分泌量を micro capillary tube を用いて採取した。涙液測定後に涙腺重量を測定し、涙腺重量当たりの涙液量を算出した。すべての値 (n=6) は平均値 \pm S.D.



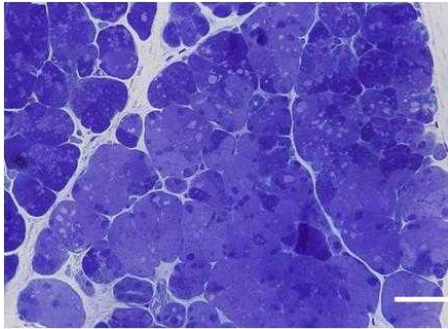


図 2. WT マウス涙腺 (上段)および M1/M3KO マウス涙腺 (下段)のメチレンブルー染色像

6 週齢における M1/M3KO マウス涙腺および野生型マウス涙腺を摘出し、2.5%グルタルアルデヒドにて固定後、メチレンブルー染色を実施した。Scale bar: 50 μ m.

さらに性ホルモンと分泌機能の関係を明らかにするために雄マウスの精巣を外科的に除去し、性ホルモンの影響を減らしたマウスの涙液量を測定した。その結果、去勢処置により涙液量が変化した。したがって本結果は性ホルモンの可能性を示唆する。

以上の結果より、性ホルモンと分泌障害の間に何らかの密接な関係があることを示唆していると考えられ、mAChR 欠損マウスを含め性ホルモンの変化による分泌機能障害を詳細に解析することがシェーグレン症候群の発症機構解明に繋がる可能性があると考えられている。

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 2 件)

1. Kawashima M, Kawakita T, Maida Y, Kamoi M, Ogawa Y, Shimmura S, Masutomi K, Tsubota K. Comparison of telomere length and association with progenitor cell markers in lacrimal gland between Sjögren syndrome and non-Sjögren syndrome dry eye patients. *Mol Vis*. 査読有 2011 Feb;13:97-1404
2. Sato EA, Matsumoto Y, Dogru M, Kaido M, Wakamatsu T, Ibrahim OM, Obata H, Tsubota K. Lacrimal gland in Sjögren's syndrome. *Ophthalmology*. 査読有 2010 May;117(5):1055-1055

[学会発表](計 4 件)

国際学会

1. Inaba T, Hisatsune C, Kawakita T, Sasaki Y, Ogawa Y, Mikoshiba K, and Tsubota K. Role of muscarinic acetylcholine receptors and Ca²⁺ signaling in tear secretion. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. Fort Lauderdale, FL, USA, 1-5 May 2011
2. Inaba T, Hisatsune C, Sasaki Y, Ogawa Y, Akiyama T, Ebisui E, Ogawa N, Matsui M, Takeuchi T, Mikoshiba K, Tsubota K. Chronically disturbed IP₃ Receptor mediated Ca²⁺ signaling in exocrine glands causes Sjögren's syndrome-like autoimmune disease. The 6th International Conference on the Tear Film & Ocular Surface Florence, Italy 22-25 Sep 2010
3. Tsubota K. Recovery of secretory function by clusterin derived from side population cells in exocrine glands. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. Fort Lauderdale, FL, USA, 2-6 May 2010

国内学会

4. 稲葉隆明、久恒智博、川北哲也、佐々木 恭正、小川葉子、御子柴克彦、坪田一男 ムスカリン性アセチルコリン受容体欠損マウスの涙液分泌 角膜カンファランス 2011 / 第 35 回日本角膜学会総会・第 27 回日本角膜移植学会 品川プリンスホテル, 東京 2011/2/17-19

[図書](計 1 件)

1. 坪田一男 理系のための研究生活ガイド テーマの選び方から留学の手続きまで 第 2 版 講談社 2010 272 ページ

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪田 一男 (TSUBOTA KAZUO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40163878

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし