

## 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：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791713

研究課題名（和文） カロリー制限ラットにおける涙液分泌能維持機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of mechanism about maintaining secretory function in lacrimal gland in rat with caloric restriction

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

研究成果の概要（和文）：

我々は、カロリー制限を行うことにより加齢に伴う涙腺の涙液分泌機能低下を抑制できると仮説を立てた。そこで、加齢に伴い増加するドライアイにおいて、カロリー制限における涙液分泌能維持機構を、ラットモデルを用いて証明し、そのメカニズムを解明することを目的とした実験を計画した。オスの Fischer 344 ラットを 24 週齢からカロリー制限開始とし、コントロールは自由摂取とし、カロリー制限群はカロリー制限食（-35%）で飼育した。若齢群の比較対象として 8 週齢のラットを用いた。飼育期間は 6 ヶ月。カロリー制限群では自由摂取群と比較して、涙液分泌量が有意に保持され、線維化が少ないことを、明らかにした。また、摘出涙腺でのカルバコール刺激に対するタンパク分泌機能は、カロリー制限群でより高かった。涙腺組織片で、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG、HNE で染色したところ、カロリー制限群で自由摂取群と比べ低発現であった。（この実験で、加齢に伴う涙腺機能低下をカロリー制限によって抑制することができ、またその分子メカニズムに酸化ストレスが関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Since calorie restriction (CR) is considered to prevent functional decline of various organs due to aging, we hypothesized that CR could prevent age-related lacrimal dysfunction. Six month-old male Fischer 344 rats were randomly divided into ad libitum (AL) and CR (-35%) groups. After 6 months of CR, tear function was examined under conscious state. After euthanasia, lacrimal glands were subjected to histological examination, tear protein secretion stimulation test with Carbachol, and assessment of oxidative stress with 8-OHdG and HNE) antibodies. CR significantly improved tear volume and tended to increase tear protein secretion volume after stimulation with Carbachol compared to AL. The acinar unit density was significantly higher in the CR rats compared to AL rats. Lacrimal glands in the CR rats showed a lesser degree of interstitial fibrosis. CR reduced the concentration of 8-OHdG and the extent of staining with HNE in the lacrimal gland, compared to AL. Collectively, these results demonstrate that CR may attenuate oxidative stress related damage in the lacrimal gland with preservation of lacrimal gland functions.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：涙腺、ドライアイ、カロリー制御、涙液分泌、老化、動物

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は世界一の平均寿命を誇り、2015年には65歳以上の人口が全人口の25%を占めるという推計がなされている。その結果、中高齢者の健康維持とQOLの向上が現代社会における重要な政策課題となっており、加齢のメカニズムを系統的に理解して各種疾患の予防につなげる研究が求められている。

老化制御のエビデンスのあるものとして、実験的には、摂食カロリーを適度に制限（カロリー制限）すると、加齢に伴う生理的老化現象や老齢期に発症する様々な疾患の発症が抑制され、寿命は延長することが知られている。1935年 McCayらは、このカロリー制限による寿命延長作用をラットにおいて初めて報告した。それ以来、カロリー制限は、最も簡便で再現性の高い抗老化・寿命延長法として多くの研究グループで用いられている。またカロリー制限の効果は、酵母や線虫などの下等生物から哺乳類に至るまで様々な生物種で確認されてきた。ただし、カロリー制限の抗老化メカニズムとして、酸化ストレスや炎症の抑制、成長ホルモン/IGF-1/インシュリンシグナルやサーチュインなどの関与が報告されているものの、その詳細は未だ明らかになっていない。

特に『加齢』が感覚器に及ぼす影響は非常に大きく、加齢により涙液の安定性および分泌量が低下することが報告されており、加齢に伴い、眼科疾患（ドライアイ、加齢黄斑変性等）が増加しているのは臨床的には明らかである。涙液は主に涙腺で産生されるが、加齢によって組織学的に腺房の萎縮と導管周囲の線維化が生じることが報告されている。ドライアイは眼表面の乾燥により眼不快感、痛

みなどの症状だけでなく重度の場合、視力障害も起こし、患者のQOLを低下させる。現在わが国では高齢化の進行、VDT作業者の増加によりドライアイ患者は増加しており、全国で800万人のドライアイ患者が存在すると推測される。我々は、カロリー制限が加齢に伴う生理機能の低下を抑制することが他科領域で確認されていることに注目し、これら眼科領域における加齢性変化と涙液機能の低下をカロリー制限で抑制できるのではないかと考えた。まず観察系に優れる眼表面の涙液量、涙液安定性を対象に選んだ。

### 2. 研究の目的

加齢に伴い増加するドライアイにおいて、カロリー制限における涙液分泌能維持機構を、ラットモデルを用いて証明し、そのメカニズムを解明すること

#### (1) カロリー制限による涙腺機能保持の証明

まず、初年度に、カロリー制限による涙液分泌機能が保持できることを確証する。その後、組織学的変化を確認し、その分子メカニズムへの解明へと移る予定である。

#### (2) カロリー制限時の、涙腺組織における酸化ストレスマーカーの発現解析

#### (3) カロリー制限の key molecule である SIRT1 の関与の解析

### 3. 研究の方法

平成21年度

#### (1) カロリー制限ラット飼育

Fischer344 Rat のオスを24Wからカロリー制限開始とし、コントロールは自由摂取とし、カロリー制限群はカロリー制限食（総カロリーを30%落とし、ビタミンやミネラルの必要

栄養素は保持したもの:commercial use) とする。期間は6Mとし、52Wでサクリファイズする。1W毎に体重測定を行い状態を経時的に確認する。

平成22年度 - 平成23年度

(1) 涙腺の解析

52Wでサクリファイズし涙腺を摘出する。比較対照として、52W自由摂取群及び8W齢のラットの涙腺を同数摘出する。摘出した涙腺は重量を測定し、以下の解析用に分別、直ちに測定または、実験まで解析目的に合わせて固定保存する。

a. 組織学的検討：マロリー染色、ヘマトキシリン・エオジン染色で、組織の構造変化、線維化の変化を観察する。酸化ストレスマーカーの発現を8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 4-hydroxy-2-nonenalの免疫染色を行い比較検討する。

b. 涙腺組織ATP測定および涙液蛋白分泌能測定：測定方法はすでに当研究室でラットで行っており、確立されている方法を用いる。

c. 電子顕微鏡観察：ミトコンドリアの形態、涙液分泌顆粒の分布、間質のコラーゲン線維の状態を観察する。

(2) 涙液分泌量、角膜上皮障害の経時的評価  
角膜表面状態の測定は角膜上皮障害の程度をフルオレセイン染色を用い、スコア化して評価する。また涙液安定性は、涙液層破壊時間の測定することにより評価する。涙液分泌量は綿糸法を用いて測定する。

4. 研究成果

(1) カロリー制限ラット飼育

Fischer344 Ratのオスを24Wからカロリー制限開始し(CR)、自由摂取群(AL)、8週齢群(Y)と涙液分泌量比較した。(図1；期間は6M, 涙液量単位；mm p<0.05)

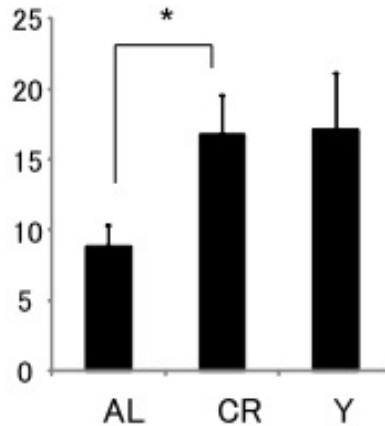


図1

(2) 涙腺の解析

a. 組織学的検討：マロリー染色で導管周囲の線維化がALに比較し、CRでは少ない傾向にあった。酸化ストレスマーカーの発現は免疫染色でCRで低発現であり、涙腺中の定量でも、ALと比較し有意に低値であった。

b. カルバコール刺激による涙液蛋白分泌能測定では、CRではALよりも高値を示した。

c. 電子顕微鏡観察：ミトコンドリアの形態はクリステの配列がCRのほうで整っている傾向にあり、涙液分泌顆粒はCRのほうでサイズの均一性、腺管周囲に多い分布が観察された。(図2)

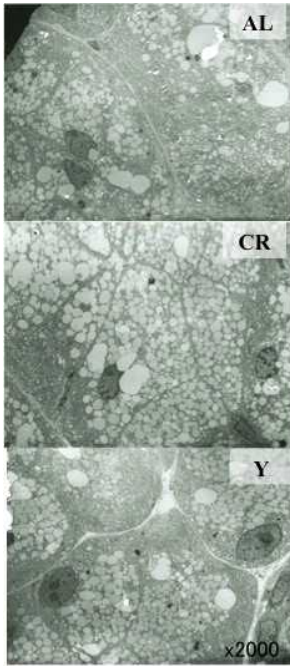
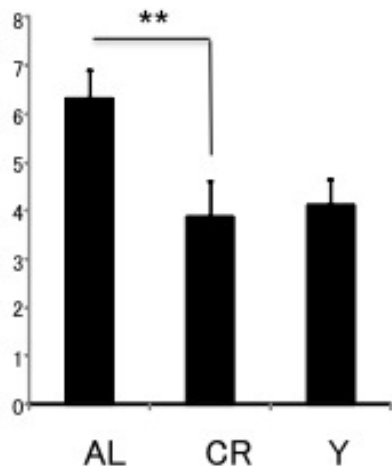


図 2

### (3)角膜上皮障害

角膜上皮障害の程度をフルオレセイン染色を用いて測定した。CRでは、ALと比較し有意に低値であった。(p<0.01)



### 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)

Kawashima M, Kawakita T, Okada N, Ogawa Y, Murat D, Nakamura S, Nakashima H, Shimmura S, Shimmura K, Tsubota K. Calorie restriction: A new therapeutic intervention for age-related dry eye

disease in rats Biochem Biophys Res Commun. 397; 724-728 2010, 査読有

〔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

川北 哲也 (KAWAKITA TETSUYA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 50408308