

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591957

研究課題名(和文) マウス涙腺を用いた機能的3次元培養腺房の作製とその細胞生物学的検討

研究課題名(英文) Construction of functional glandular structures using three-dimensional culture in mouse lacrimal gland

研究代表者

伊藤 正孝 (ITO MASATAKA)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：30534896

研究成果の概要(和文)：マトリゲルなど、複数のマトリックスを用いて3次元培養をしたが、導管構造を作り出すことが困難であったため、涙腺上皮細胞を air-lift 培養したところ数週間で角膜・結膜および皮膚様の構造物が生じた。次に、涙腺上皮細胞から分泌されている、上皮成長因子(EGF)と肝細胞成長因子(HGF)を、それぞれの阻害剤と組み合わせて投与したところ、EGF または HGF の一方を阻害した場合には、他方の増殖因子を投与しても増殖促進作用は弱く細胞死抑制効果も低下した。更に両者を阻害すると、全ての細胞が死滅した。以上の結果より、涙腺上皮細胞は培養環境で近縁の異なる組織に分化しうることを示唆され、分化・増殖には複数の因子が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mouse lacrimal gland epithelial cells were cultured in several three-dimensional conditions, but it was difficult to induce ductal structure. Then we cultured them in air-lift conditions. The epithelial cells differentiated to form epithelial tissues similar to cornea, conjunctiva and skin. We then analyzed the effects of EGF and HGF, these are paracrine factors secreted by lacrimal gland epithelial cells, in combination with their specific inhibitors and proved that EGF and HGF worked synergistically for cell proliferation and suppression of cell death in the development of lacrimal glands. These results of our experiments would provide clues for in vitro reorganization of functional glands from cultured cells for therapeutic purposes.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-------------|------|-------------|
| 2010年度 | 1,800,000 円 | 0 円 | 1,800,000 円 |
| 2011年度 | 800,000 円 | 0 円 | 800,000 円 |
| 2012年度 | 600,000 円 | 0 円 | 600,000 円 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 円 | 0 円 | 3,200,000 円 |

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：3次元培養、再生医学、涙腺、発生分化

1. 研究開始当初の背景

近年わが国では、労働者の VDT 作業の増加

やコンタクトレンズの普及などに伴い、ドライアイ患者は急速に増加している。ドライアイ

イは眼表面の乾燥により、眼の不快感、痛みなどの症状だけでなく視力障害も起こし、患者のQOLを低下させる疾患である。しかしながら、現在のところ、治療は対症療法が主で、根治的な再生医学的アプローチが求められている。

我々はこれまでにマウス生体から純粋な涙腺上皮細胞を取り出し培養することに成功している。そこで、本研究では、培養皿上で培養した涙腺上皮細胞を3次元培養に移して、実際に活動している機能的涙腺により類似した構造を培養環境中で作製することを目指し、培養涙腺上皮細胞から、分泌機能をもった機能的涙腺腺房を3次元培養下で作製することを試みた。本研究の成果は、外分泌腺機能の再建を目的とした再生医学領域の技術開発、特に、ES・iPS細胞等の幹細胞から腺上皮細胞が作製された際に、それを *in vivo* へ適用させる場合にも応用しうるものと考えられた。

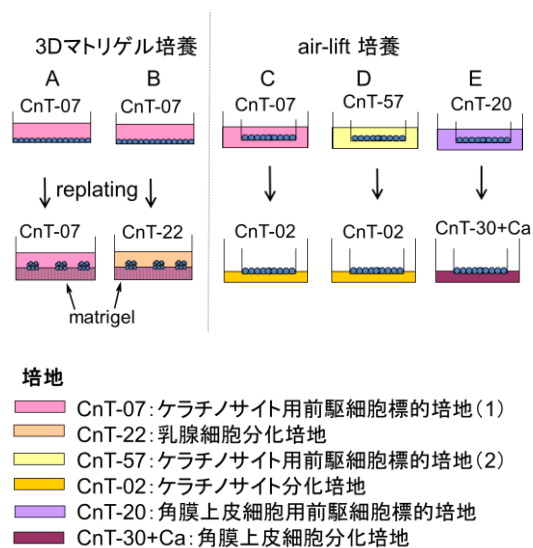
2. 研究の目的

マウス涙腺上皮細胞を3次元的に培養して、培養環境で機能的涙腺により類似した構造を作製するために、分化調節のための培養条件を検討した。さらに、涙腺発生にかかわる因子の検索の一環として上皮細胞成長因子(EGF)、肝細胞成長因子(HGF)の作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) 涙腺上皮細胞を培地や器材を変えて培養し、形成された組織の形態や発現蛋白を既知の組織と比較し分化能を検討した。

以下の培地と培養条件で涙腺上皮細胞を培養した。



○3D マトリゲル培養：培養皿上で表皮ケラチノサイト用前駆細胞標的 (PCT)培地を用いて1週間培養後、マトリゲル上に植え継ぎ、同培地(A)、乳腺分化培地(B)で2-3週間培養。

○ air-lift 培養：インサート膜上に2種類の表皮ケラチノサイト用 PCT 培地(C, D)、あるいは角膜用 PCT 培地(E)中で1週間培養後、表皮ケラチノサイト分化培地(C, D)、または角膜上皮分化培地(E)で2-3週間 air-lift 培養。

①それぞれの培養条件で形成された組織、および生体から採取した皮膚、角結膜のパラフィン切片を作製し、HE染色、分化マーカーの免疫組織化学染色を行なった。

②培養下で形成された組織の透過電子顕微鏡観察を行なった。

(2) 涙腺上皮細胞の増殖に必要な成長因子を検討するため、線維芽細胞成長因子 (FGF) 10、EGF、HGFの作用を検討した。

①マウスの胎生後期の胎仔、および新生仔から採取した涙腺上皮細胞の培養液にEGF、HGF、FGF10とそれぞれの受容体チロシンキナーゼ(RTK)の阻害剤であるAG1478 (AG)、PHA665752 (PHA)、SU5402 (SU)を添加し、細胞生存度、DNA合成、細胞死を評価した。

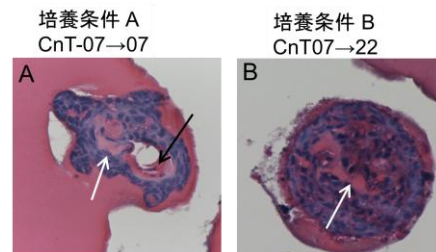
②胎生後期および新生仔マウスから涙腺を摘出し、RTK阻害剤を加えて器官培養後、細胞増殖マーカーKi67の免疫組織化学染色にて終末腺房中の増殖細胞の割合を求めた。

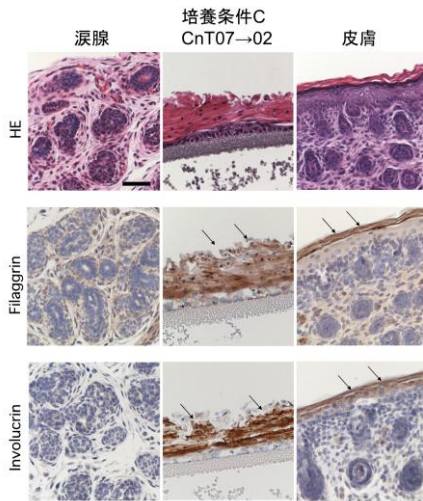
4. 研究成果

(1) 涙腺上皮細胞は培養条件によって、分泌腺様、皮膚様、角膜様、結膜様に分化した。

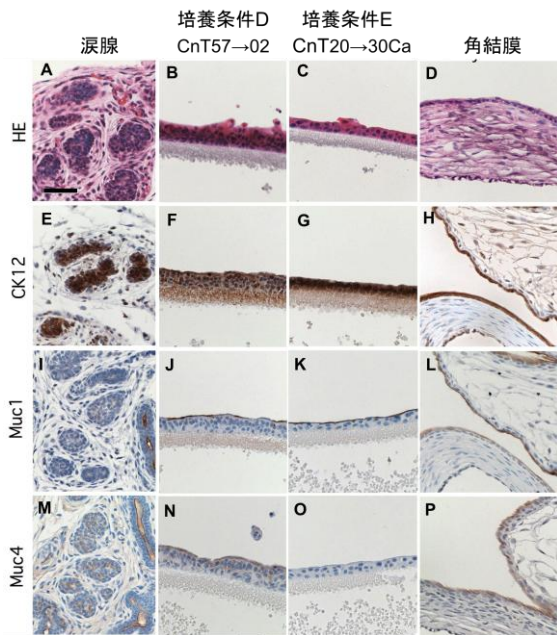
①マトリゲル上培養では、ともに内腔(下図A, B 白矢印)をもつ細胞塊が形成したが、培養液によっては腔内に角化細胞(下図A 黒矢印)があらわれた。

ケラチノサイト用の前駆細胞用培地(1)と分化用培地を用いた air-lift 培養では、細胞は重層扁平化、角化し、filaggrinおよびinvolucrinといった表皮(皮膚)マーカーを発現した。

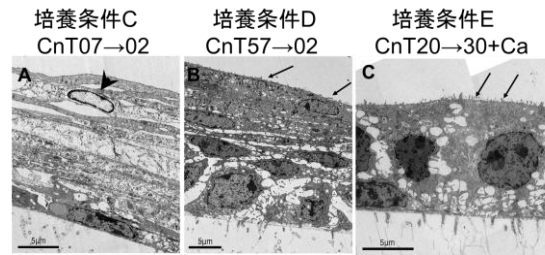




ケラチノサイト用の前駆細胞用培地(2)と分化培地、角膜上皮用の前駆細胞用培地と分化培地を用いた air-lift 培養では、ともに細胞は非角化重層上皮を形成したが、ムチン型の発現に差があった (下図 Muc4)。

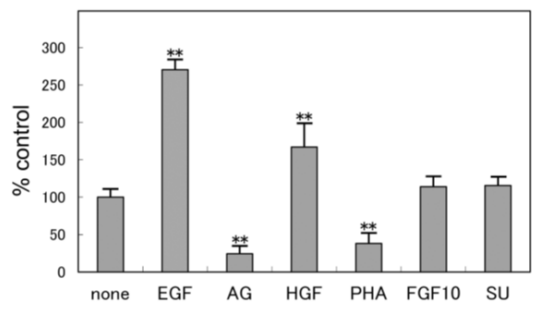


②透過電子顕微鏡像では、培養条件に応じた免疫組織化学染色の結果と一致して、皮膚様、角結膜様の形態が観察された。培養条件 C (07→02 lift) では、重層細胞の表層が変性 (A, 矢尻)。培養条件 D (57→02) と E (20→30+Ca) には microplacae が存在 (B, C 矢印)。

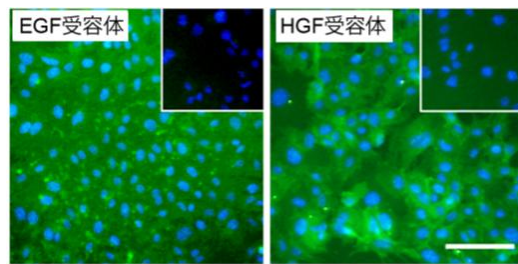


以上の結果より、涙腺上皮細胞は条件によっては涙腺以外の外胚葉由来組織に分化していることが明らかになった。機能的涙腺を再建するには異方向の分化を制御する必要がある。

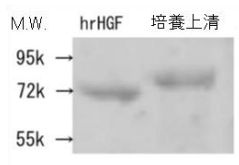
(2)①胎生後期マウス胎仔の涙腺上皮細胞では、新生仔由来のものと同様、培養下で EGF と HGF が細胞生存度を増加させたが FGF10 は効果がなかった。EGF と HGF の RTK 阻害剤添加により細胞生存度が低下したことから、EGF と HGF は自己分泌的に作用していることが推測された。



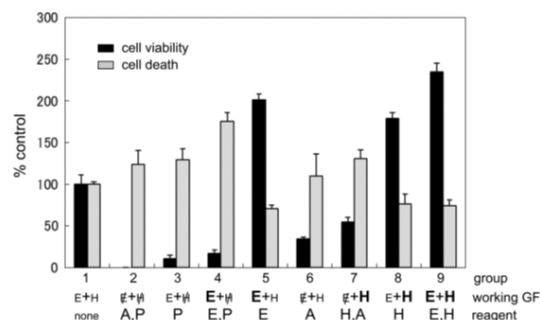
また免疫細胞化学的に検出した EGF と HGF の受容体の発現パターンも新生仔由来涙腺と同様であった。



EGF と HGF による細胞生存度の増加は DNA 合成の昂進とアポトーシスの低下によることをプロモデオキシウリジンの取り込みと TUNEL により確認した。また、通常 HGF は発生中の上皮に発現していないと考えられていたが、涙腺では上皮細胞が HGF を分泌していることを濃縮培養上清のウェスタンブロットにより確認した。

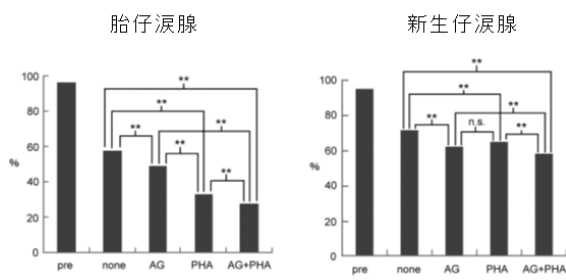


EGF と HGF、およびそれぞれの RTK 阻害剤を組み合わせて添加する実験では、EGF と HGF は、細胞生存度の増加と細胞死の抑制に対して相乗的に作用した。EGF と HGF の RTK をともに阻害すると全ての細胞が死滅した。片方の RTK 阻害剤添加により EGF あるいは HGF のうち一方の成長因子のみが作用している条件では、その成長因子をさらに添加すると細胞生存度の増加に伴って細胞死も増加した。RTK 阻害剤を添加せず、両方の因子が作用する条件では、成長因子の添加は単独の成長因子が作用しているときに比べて細胞生存度の大幅に増加させるとともに細胞死を低下させた。



添加試薬は頭文字で示す。Working GF では、小フォントは内在性、大フォントは内在性と添加成長因子が作用していることを表し、斜線付き文字は RTK 阻害剤添加によりその成長因子が作用していないことを示す。

②器官培養による成長因子の作用の解析では、RTK 阻害剤添加により終末腺房上皮中の増殖性細胞の比率が低下した。阻害剤は単独添加よりも両方の添加でより大きく低下した。また、胎仔由来涙腺は新生仔由来涙腺よりもより RTK 阻害剤の作用を強く受けた。全ての上皮細胞が死滅した細胞培養とは異なり、両方の RTK 阻害剤を添加した場合でも腺房の構造は保たれていた。



以上の結果より、胎生後期以降の涙腺の発生は EGF と HGF に依存していること、これらの因子は細胞の増殖と細胞死の抑制に相乗的に作用することが明らかになった。また、器官培養の実験から、これらの成長因子以外の他の因子が細胞の生存や形態の維持にかかわっていることが示唆された。

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 7 件)

(1) Takayama K, Sato T, Karasawa Y, Sato S, Ito M, Takeuchi M. Phototoxicity of indocyanine green and Brilliant Blue G under continuous fluorescent illumination on cultured human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有、53 巻 2012 年、7389-7394

DOI:10.1167/ iovs.12- 10754.

(2) Sugita S, Kawazoe Y, Imai A, Usui Y, Iwakura Y, Isoda K, Ito M, Mochizuki M. Mature Dendritic Cell Suppression by IL- 1 Receptor Antagonist on Retinal Pigment Epithelium Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有、54 巻 2013 年、3240-3249.

DOI:10.1167/ iovs.12- 11483.

(3) Kamoi M, Ogawa Y, Nakamura S, Dogru M, Nagai T, Obata H, Ito M, Kaido M, Kawakita T, Okada Y, Kawakami Y, Shimmura S, Tsubota K. Accumulation of secretory vesicles in the lacrimal gland epithelia is related to non-Sjogren's type dry eye in visual display terminal users. PLoS One. 査読有、7 巻 2012 年、e43688.

DOI: 10.1371/ journal.pone.0043688.

(4) Kobayashi S, Kawakita T, Kawashima M, Okada N, Mishima K, Saito I, Ito M, Shimmura S, Tsubota K. Characterization of cultivated murine lacrimal gland epithelial cells. *Mol Vis*. 査読有、18 巻 2012 年、1271-1277.

DOI:なし

(5) Kawashima M, Kawakita T, Inaba T, Okada N, Ito M, Shimmura S, Watanabe M, Shinmura K, Tsubota K. Dietary lactoferrin alleviates age-related lacrimal gland dysfunction in mice. *PLoS One*. 査読有、7 巻 2012 年 e33148.

DOI:10.1371/journal.pone.0033148.

(6) Takayama K, Usui Y, Ito M, Goto H, Takeuchi M. A case of sebaceous adenoma of the eyelid showing excessively rapid growth. *Clin Ophthalmol*. 査読有、7 巻 2013 年、667-670、

DOI: 10.2147/OPTH.S42135.

(7) 伊藤正孝、涙腺の形態と機能、*Frontiers in Dry Eye*、査読無、7 巻、2012 年、34-43、
DOI:なし

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) Ito M. Regeneration of Mouse Lacrimal Gland after Severe Ischemia. 第 20 回 International Society for Eye Research. 2012 年 7 月、ベルリン(招待講演).

(2) Ito M, Karasawa Y, Harimoto K, Shinomiya N, Imaki J, Takeuchi M. Growth Factor-dependent Proliferation of Cultured Lacrimal Gland Epithelial

Cells Derived from Embryonic and Newborn Mice. ARVO2012 Annual Meeting. 2012 年 5 月、Fort Lauderdale, USA.

(3) Sato T, Karasawa Y, Kato N, Ito M, Takeuchi M. Oxidative Stress Caused By Continuous Fluorescent Lamp Illumination and/ or Indocyanine Green On Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells. ARVO2012 Annual Meeting. 2012 年 05 月、Fort Lauderdale, USA.

(4) 櫻井裕、伊藤正孝、服部貴明、臼井嘉彦、後藤浩、本庶佑、竹内大、PD- 1 ノックアウトマウスに自然発症する涙腺顎下腺炎の加齢に伴う病態変化、第 12 回 日本抗加齢医学会、2012 年 6 月、横浜.

(5) 伊藤正孝、唐沢容子、播本幸三、竹内大、今城純子、坪田一男、斎藤一郎、加齢マウスマイボーム腺の形態計測の試み、第 12 回日本抗加齢医学会、2012 年 6 月、横浜.

(6) 伊藤正孝、眼炎症疾患のメカニズム最前線 炎症は涙腺再生を促進するか? 第 116 回日本眼科学会総会、2012 年 4 月、東京(招待講演).

(7) 唐沢容子、伊藤正孝、播本幸三、竹内大、四ノ宮成祥、発生期マウス涙腺由来培養上皮細胞における増殖の成長因子依存性について、第 116 回日本眼科学会総会、2012 年 04 月、東京.

(8) 唐沢容子、伊藤正孝、小林靖直、四ノ

宮成祥、竹内大、器官培養を用いた胎生後期マウス涙腺器官形成の成長因子依存性の検討、第 117 回日本眼科学会総会、2013 年 4 月、東京.

(8) 伊藤正孝、石川聖、若栗隆志、播本幸三、唐沢容子、川北哲也、坪田一男、今城純子、竹内大、マウスマイボーム腺開口部焼灼による機能不全モデル作成の試み、第 117 回日本眼科学会総会、2013 年 04 月、東京.

(10) 櫻井裕、伊藤正孝、唐沢容子、服部貴明、臼井嘉彦、後藤浩、本庶佑、竹内大、PD-1 ノックアウトマウスに自然発症する涙腺炎のケモカイン発現解析、第 117 回日本眼科学会総会、2013 年 04 月、東京.

(11) Sakurai Y, Ito M, Karasawa Y, Usui Y, Hattori T, Goto H, Takeuchi M.
Analysis of chemokines involved in the pathogenesis of dacryoadenitis in mice deficient for programmed cell death-1. ARVO2013 Annual Meeting, 2013 年 5 月、Seattle, USA.

〔図書〕(計 1 件)

(1) 伊藤正孝：再生医療叢書 4 上皮・感覚器。(日本再生医療学会編) 朝倉書店、東京、2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 正孝 (ITO MASATAKA)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：30534896

(2) 研究分担者

今城 純子 (IMAKI JUNKO)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号：20223323

唐澤 容子 (KARASAWA YOKO)