

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：2010～2011

課題番号：22791691

研究課題名（和文）メタボリックシンドロームマウスにおける涙液分泌低下の発症機序と制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of decreased tear secretion in mice with metabolic syndrome

研究代表者

川島 素子 (KAWASHIMA MOTOKO)

慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）

研究者番号：00327610

研究成果の概要（和文）：II型糖尿病モデルマウスに高脂肪食負荷をかけて作成したメタボリックシンドロームモデルにおいて、涙液量が有意に減少することを確認した。高脂肪食負荷群で涙腺組織における著明な炎症細胞の浸潤、および、炎症関連遺伝子の発現上昇を認めた。酸化ストレスマーカー（8OH-dG）染色では高脂肪食負荷群で強い染色を認めた。メタボリックシンドロームモデルマウスにおける涙腺機能低下の証明ができ、その機序として炎症細胞の浸潤および酸化ストレスが関与していることが示唆できる成果を得た。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that tear volume significantly decreased in metabolic syndrome model mice fed with a high fat diet. Inflammatory cell infiltration and inflammatory related gene expression level in the lacrimal glands were significantly increased in the high fat fed group. Immunohistochemistry of the lacrimal glands showed positive staining for 8-OHdG in the high fat group. Metabolic syndrome influences lacrimal gland function in mice, which might be caused by oxidative damage and the subsequent gland inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：細胞生物学、涙腺、ドライアイ、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

応募者は重症瘢痕性角結膜症に対する培養角膜上皮移植術の成績向上を目指して、平成 20 年度科学研究費補助金事業において、角膜上皮幹細胞をテーマに研究を行ってきた (Kawashima, et al. Mol. Vis, 2009)。また臨床面においては、培養角膜上皮移植術の組織学的解析および臨床経過の解析を行い、その臨床的成功には涙液分泌機能が維持さ

れていることが重要な因子であることを確認している (Kawashima, et. al., Archives of Ophthalmology, 2007)。これらの研究により、角膜上皮だけでなく、涙液分泌機能維持及び回復についての研究を進めることが重要であると考えたのが直接的な経緯である。そのために、まず、機能低下をきたす疾患での解析を行うべく、涙液分泌メカニズムを解明する対象としてメタボリックシンドロームにおけるドライアイの解析を考えた。

(1) 本研究の研究背景

我が国は世界一の平均寿命を誇り、急速に超高齢化社会に突入しつつある。さらに、近年のライフスタイルの欧米化により増加した高血圧・高脂血症・糖尿病などのいわゆる生活習慣病、メタボリックシンドロームが蔓延しつつある今日の日本は、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、そ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がる研究が求められている。また、現在わが国では、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視力障害も起こし、患者のQOLを低下させる疾患であり、加齢とともに涙液分泌能が低下することが知られている。(Maters, Cornea, 1996) また、2型糖尿病患者でのドライアイ有病率が高い (Harrison TR, 2001, Murat, Ophthalmolgy, 2001) ことより、高齢化およびメタボリックシンドロームの増加が、ドライアイ患者の増加の原因に関与していると推測される。

しかしながら、糖尿病網膜症や白内障など数多くある糖尿病眼合併症のうち、その重要性が認識されてきたのは最近である。2型糖尿病で涙液分泌が低下しているという報告 (Harrison TR, 2001, Murat, Ophthalmolgy, 2001) はあるものの、涙液の組成変化についての報告は依然として少なく、組織学的な変化についての検討はほとんどない。またこれら涙液減少のメカニズムについては詳細不明のままである。このため、われわれは、メタボリックシンドロームが生理機能の低下を促進することが他科領域で確認されていることに注目し、その現象を動物モデルで証明し、分子機構を解明することとした。ドライアイの病態を細胞の代謝機構の変化、エネルギー産生の変化により活性酸素の上昇、涙液分泌の低下がもたらされているのではないかと考えたからである。

(2) 国内外の関連する研究の中での本研究の位置づけ

メタボリックシンドロームとドライアイについての研究報告はほとんどない。涙腺の組織学的検討を行ったものは動物モデルを使用したものを含めて皆無である。ホメオスターシスの破綻と涙腺臓器障害の病態など代謝の面からドライアイ発症の分子メカニズムに関して検討している報告は皆無である。

2. 研究の目的

生活習慣病 (メタボリックシンドローム) を背景として進行するドライアイをマウスモデルを用いて証明し、その発症機序および涙液分泌機構の分子メカニズムを解明し、その制御機構を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) モデルマウス作成・飼育

雄のKK-Ayマウスを購入し、7週齢から標準食群と高脂肪食負荷群の2群にわけ飼育実験を開始し、14週目(21週齢)で解剖した。正常コントロールとして同週齢のB6マウスを用いた。

(2) ベースラインの評価

摂餌量、飲水量の計測、1週毎に体重測定を行い状態を経時的に確認した。投与14週目での体重、血液データを測定し、メタボリックシンドロームの状態を把握した。

(3) 涙液分泌量、角膜上皮障害の経時的評価

負荷開始4週ごとに、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、スコア化して評価した。涙液分泌量は綿糸法(30秒)を用いて測定した。

(4) 涙腺および角結膜の組織学的解析

① 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、浸潤細胞の程度を観察した。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した。

② 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した。

(5) 涙腺遺伝子解析

炎症関連遺伝子発現変化や酸化ストレス関連遺伝子の発現変化を解析した。

(6) 酸化ストレスマーカー

8OHdG ELISA および 8OHdG 染色を行い比較検討した。

4. 研究成果

(1) メタボリックシンドロームマウス作成

II型糖尿病モデルマウス(雄のKK-A^yマウス)に高脂肪食負荷(60%FAT:ラード)をかけてメタボリックシンドロームモデルを作

成した。高脂肪食負荷群で有意な体重増加、血糖値上昇、耐糖能異常を確認した。

(2) 涙液分泌量

涙液量は高脂肪食負荷を行ったメタボリックシンドロームモデルマウス群で有意に減少することを再現性をもって確認した。

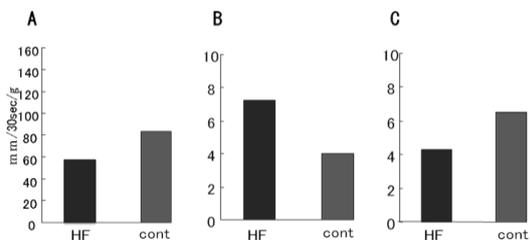


図 1A：涙液分泌量 高脂肪食負荷群 (HF) では標準食 (cont) に比して涙液分泌量が低下している。**B：角膜上皮障害(フルオスコア)** 高脂肪食負荷群では角膜上皮障害の程度が強い。**C：涙液層破壊時間** 高脂肪食群では涙液層破壊時間が短縮している。

(3) 涙腺組織学的所見および遺伝子解析

涙腺の組織学所見として、高脂肪食負荷群で著明な炎症細胞の浸潤が認められたのと同時に、涙腺の遺伝子解析では、TNF- α 、MCP-1などの炎症関連遺伝子の発現上昇を認めた。また、エネルギー代謝関連遺伝子および酸化酵素関連遺伝子の変動を認めた。酸化ストレスマーカー (8OH-dG) 染色では高脂肪食負荷群で強い染色を認めた。涙腺組織の電子顕微鏡観察も行い、高脂肪食負荷群での炎症細胞浸潤像や涙液分泌顆粒の分布変化、間質のコラーゲン線維の増加などを確認した。

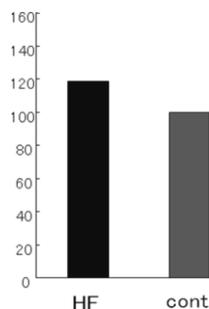


図 2：8-OHdG 量 高脂肪食負荷群 (HF) では標準食 (cont) に比して涙腺組織における 8-OHdG 量が亢進している。

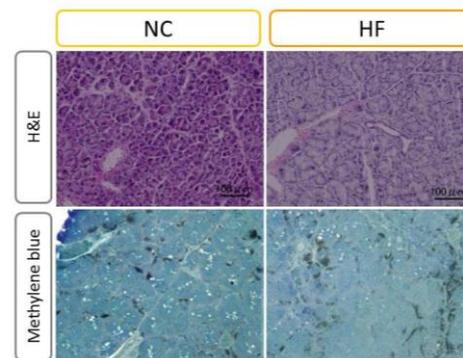


図 3：涙腺組織染色 高脂肪食負荷群 (HF) では標準食 (NC) に比して涙腺組織における炎症細胞の著明な浸潤が認められる。

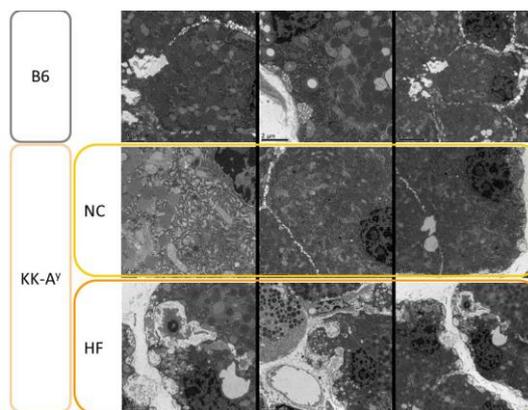


図 4：涙腺組織電顕所見 高脂肪食負荷群 (HF) では標準食 (NC) に比して涙腺組織における炎症細胞の著明な浸潤および間質線維の増加が認められる。

これらの研究結果により、メタボリックシンドロームモデルマウスによる涙腺機能低下の証明ができ、またその機序として炎症細胞の浸潤および酸化ストレスが関与し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0件)

[学会発表] (計1件)

- ①川島素子, 川北哲也, 稲葉隆明, 渡辺光博, 伊藤正孝, 榛村重人, 坪田一男. 高脂肪食負荷した糖尿病モデルマウスにおける涙腺機能の解析. 角膜カンファレンス 2011 第35回日本角膜学会総会/第27回日本角膜移植学会 東京 2011年2月17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]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 素子 (KAWASHIMA MOTOKO)

慶應義塾大学・医学部・講師 (非常勤)

研究者番号: 00327610