

## 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：22791692

研究課題名（和文）活性酸素過剰発生モデルマウスを用いたドライアイ発症メカニズムの検証

研究課題名（英文）Search for the mechanism of dry eye disease using active oxygen excessive model mouse

研究代表者

内野 裕一（UCHINO YUICHI）

慶應義塾大学・医学部・特任助教（非常勤）

研究者番号：80365337

研究成果の概要（和文）：ドライアイ発症メカニズムを解明するため、活性酸素過剰発生マウス（*Tet-mev-1* マウス）を用いて、細胞内由来活性酸素とドライアイの関連性について検証した。*Tet-mev-1* マウスの涙腺における活性酸素量（ $O_2^-$ ）、酸化タンパク量はともに野生型（WT）に比較して有意に増大していた。酸化傷害部位が 8-OHdG により免疫染色され、HE 染色で単核球の浸潤などの炎症反応を、Azan 染色では線維化を確認した。また WT に比較して涙液分泌量は有意に減少し、点状表層角膜炎により眼表面スコアは有意に悪化していた。細胞内由来活性酸素は炎症惹起により涙腺機能低下をきたす可能性が示唆された（論文投稿中）。

研究成果の概要（英文）：*Tet-mev-1* mice revealed decreased tear production with the morphological changes. Tear quantity values in *Tet-mev-1* mice were lower compared to the wild type mice. The lacrimal gland of *Tet-mev-1* mice overproduced superoxide anion ( $O_2^-$ ) and oxidative protein compared to the wild type mice. Histopathological analyses showed the hallmarks of lacrimal gland inflammation by presence of intense mononuclear leukocytic infiltration and fibrosis around acinar cell staining by 8-OHdG antibody in the lacrimal gland of *Tet-mev-1* mice. These findings strongly suggest that oxidative stress can be a causative factor for the development of dry eye disease.

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：活性酸素、ドライアイ、酸化傷害、ミトコンドリア、涙腺、炎症、分泌減少

## 1. 研究開始当初の背景

近年日本国内のみならず世界中で VDT 作業、コンタクトレンズ使用や LASIK 施行後などによるドライアイ患者が増加の一途を辿っている。現在国内におけるドライ患者数は 2000 万人とも言われており、その症状としては眼乾燥感に留まらず、眼精疲労、肩こり、頭痛、さらには視力低下までも引き起こすことがある。これにより事務作業効率低下以外に日常生活にまで支障を来す場合も見

受けられる。しかし現在までヒアルロン酸含有の点眼薬、涙点閉鎖や眼瞼部温療法などのように ドライアイ治療への介入方法は未だに限定的である。

さらに疾患として増加が予想される ドライアイへの有効な治療方法を探るためにも、今までの着眼点に捉われない新しいドライアイ発症メカニズムの解明が急務である。細胞内酸化ストレスの大部分はミトコンドリア電子伝達系から発生する活性酸素 ( $O_2^-$ ) に

起因する。この活性酸素は、免疫応答機構や細胞増殖・分化などのホメオスタシス維持の役割を担うが、過剰量となった活性酸素はより強い毒性をもつ活性酸素種に代謝され、生活習慣病や癌、神経変性疾患などの発症原因になることが明らかとなっている。また眼科領域では、加齢性黄斑変性症等の加齢性網膜疾患および糖尿病性網膜症等の虚血性眼疾患の発症に細胞内酸化ストレスが関与していることが明らかになっている(Imamura Y *PNAS* 2006)。しかし、ドライアイ発症と酸化ストレスとの関係は、外部環境からの酸化ストレスによりドライアイが生じていることが判明しているのみで(Nakamura *IOVS* 2005)、**細胞内酸化ストレスとドライアイとの関係を明らかにする研究成果はない。**

東海大学医学部分子生命科学石井直明教授らはミトコンドリア電子伝達系から活性酸素を過剰発生するモデル動物(SDHC E69 細胞株(Ishii T *Cancer Research* 2003)、*Tet-mev-1* コンディショナルトランスジェニックマウス(以下、*Tet-mev-1* マウス)(Ishii T *Mitochondrion* 2011)を作製した。このモデル動物を解析することで、**各組織における細胞内酸化ストレス産生から、細胞内ホメオスタシス維持機構の破綻および疾患発症に至るまでの分子メカニズムを明らかにすることが可能**になった。

## 2. 研究の目的

*Tet-mev-1* マウスを用いて、ドライアイ発症に関わる活性酸素と炎症性カスケードの関連性およびドライアイ発症メカニズムについて解明する。

## 3. 研究の方法

モデル動物として *Tet-mev-1* マウスと WT マウス (C57B6J) を使用した。特に *Tet-mev-1* マウスでは Tet-on system を利用して細胞内由来活性酸素を調整し、Doxycycline (以下 Dox) 投与 (以下 Dox(+)) もしくは Dox 未投与 (以下 Dox(-)) における、涙腺での表現型を比較検討した。

### (1) ミトコンドリア由来細胞内活性酸素(O<sub>2</sub>)の測定

O<sub>2</sub> と反応すると発光する MPEC 試薬を用いて吸光度計にてこれを数値化して評価することにより、細胞内活性酸素を測定することができる(Miyazawa M *J Radiat Res* 2009)。涙腺をホモジナイズした後にミトコンドリア画分を MS buffer を用いて遠心分離で採取し、タンパク定量して検体量を一定に揃えた上で各群のミトコンドリア画分の活性酸素(O<sub>2</sub>)を測定した。

### (2) 酸化タンパク量測定と 8-OHdG 免疫組織染色および HE 染色による組織学的評価

涙腺における酸化タンパク量を数値化して

評価するために、ELISA 法で評価が可能な OxyBlot™ (Millipore 社) という Protein Oxidation Detection Kit を用いて酸化タンパク量を評価した。涙腺組織内の酸化傷害の蓄積を観察するために、4%パラホルムアルデヒドで固定した涙腺組織検体を抗 8-OHdG 抗体で免疫組織染色を行い評価した。また炎症像を俯瞰的にとらえるため、HE 染色を施行した。

### (3) T 細胞や B 細胞などの免疫担当細胞の免疫組織染色と組織線維化評価のための Azan 染色

CD4、CD8、CD19 などの細胞表面マーカーを標的として免疫組織染色し、炎症像のある組織で免疫担当細胞の存在を調べた。凍結切片にて涙腺組織を用意し、すでに確立しているプロトコールで染色を行った(Ogawa Y *IOVS* 2003)。組織の線維化をみる Azan 染色はホルマリン固定したパラフィン切片が最も正確に評価できるため、他の組織染色とは別に検体を用意した。

### (4) 炎症性サイトカイン発現量の比較検討

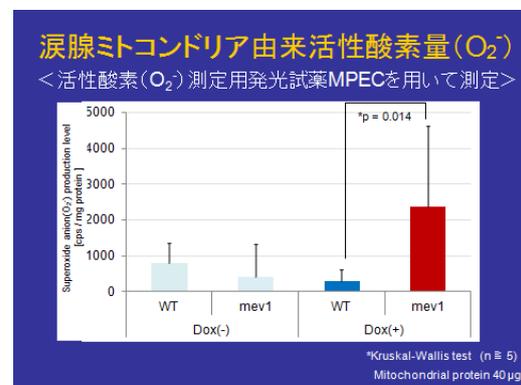
3 カ月齢のマウス涙腺を用いて、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10 の mRNA 発現量について、*Tet-mev-1* マウスと WT マウスを用いて Dox(+)) および Dox(-)) の条件下で比較検討した。

### (5) 涙液分泌量の測定および眼表面スコアリングの評価

無麻酔下にて microcapillary を用いて涙液を 1 回 3 分間、計 3 回に分けて回収し、capillary 内に回収された長さ(mm)の平均値を算出し、各マウスの体重(g)で補正した。またフルオレセインにて角膜表面を染色し、点状表層角膜炎についてスコアリング評価し、各マウス間で比較検討した。

## 4. 研究成果

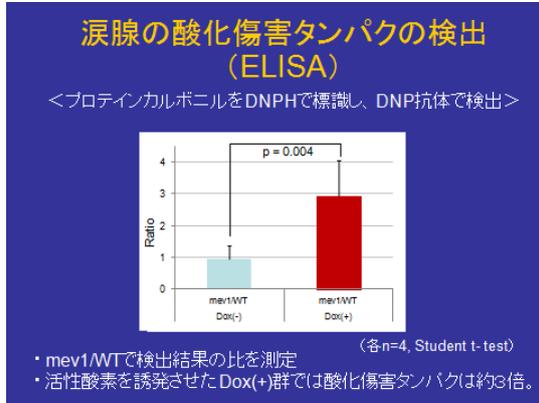
### (1) ミトコンドリア由来細胞内活性酸素(O<sub>2</sub>)の測定 (図 1)



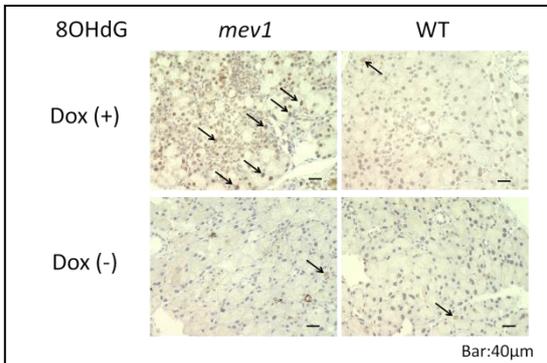
(図 1) 活性酸素を誘発させた *Tet-mev-1*/Dox(+)

マウス涙腺の活性酸素量 ( $O_2^-$ ) は、他のマウスと比較して有意に増加していた。

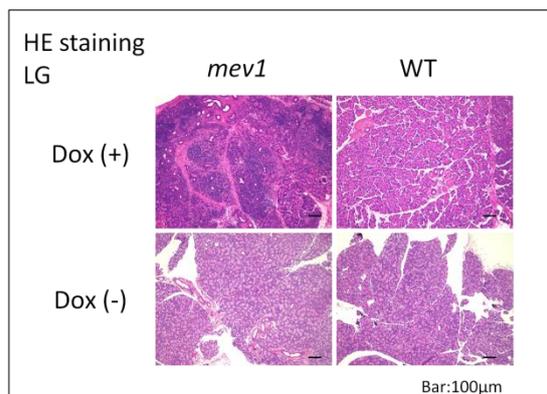
(2) 酸化タンパク量測定 (図 2) と 8-OHdG 免疫組織染色 (図 3) および HE 染色による組織学的評価 (図 4)



(図 2) 活性酸素を誘発させた場合、涙腺にて約 3 倍の酸化傷害タンパクが検出された。

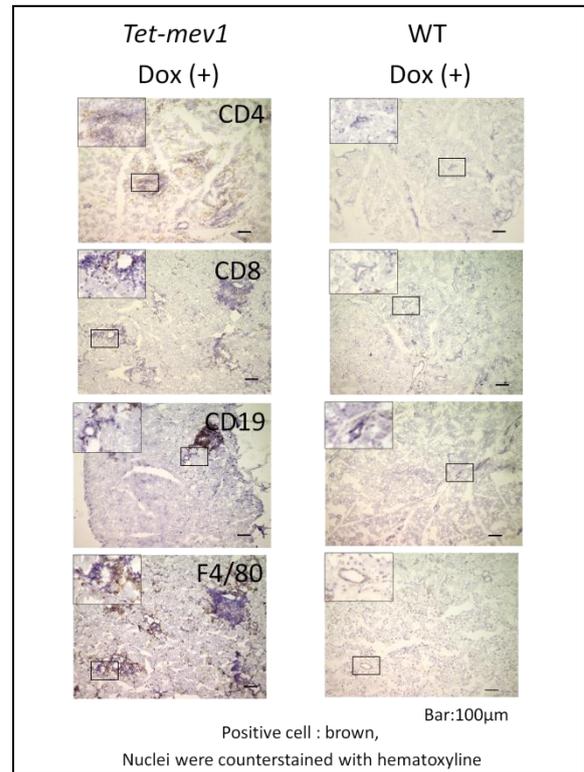


(図 3) 酸化傷害マーカーのひとつである 8OHdG の抗体を用いて免疫組織染色すると、活性酸素を誘発させたマウスで、強く染色され、涙腺にて組織的な酸化傷害が起きていることが確認された。

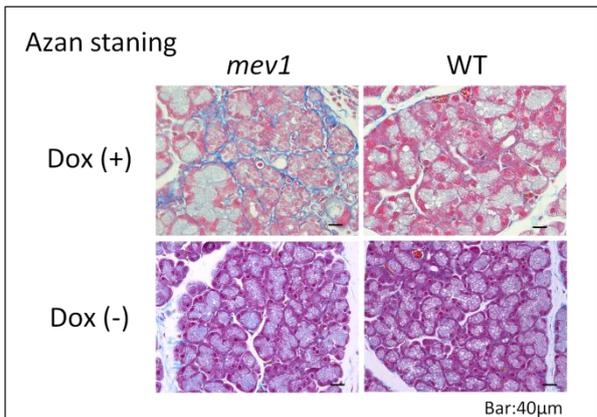


(図 4) 活性酸素を誘発させたマウス (*Tet-mev-1/Dox(+)*) では涙腺では強い炎症が生じていた。

(3) T 細胞や B 細胞などの免疫担当細胞の免疫組織染色 (図 5) と組織線維化評価のための Azan 染色 (図 6)

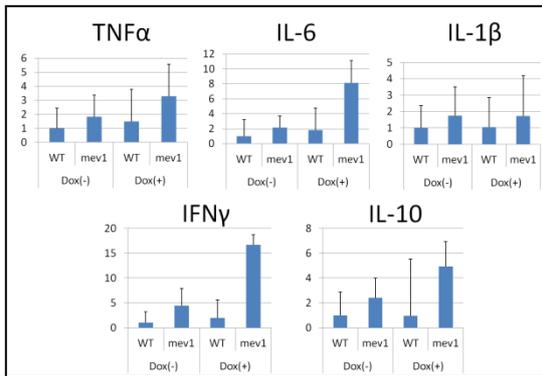


(図 5) 活性酸素誘発モデルでは CD4,CD8 などがマーカーとなる T 細胞に加え、CD19 をマーカーとする B 細胞や F4/80 をマーカーとするマクロファージなどが確認された。



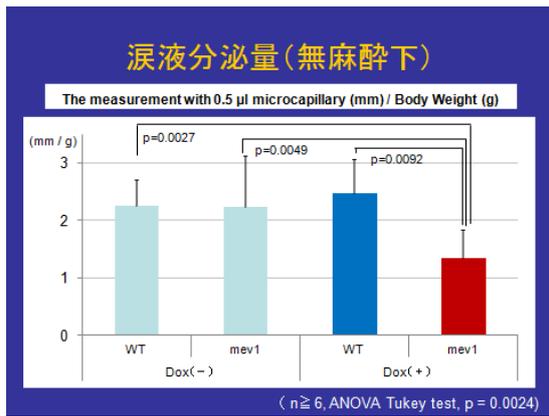
(図 6) Azan 染色にて線維化を確認したところ、活性酸素誘発モデルでは腺房細胞の周囲に線維化を認めた。

(4) 炎症性サイトカイン発現量の比較検討 (図 7)

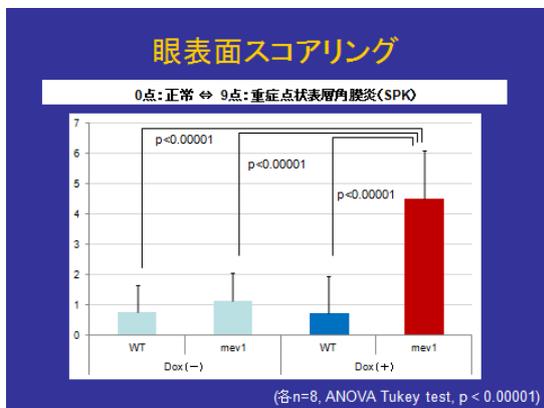


(図 7) 涙腺における炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10) の mRNA 発現量について検討したところ、TNF- $\alpha$  や IL-6、IFN- $\gamma$  などの発現が、活性酸素誘発モデルマウスの涙腺において上昇していることが確認された。

(5) 涙液分泌量の測定 (図 8) および眼表面スコアリングの評価 (図 9)



(図 8) 涙液分泌量を計測したところ、活性酸素誘発モデルマウス (*Tet-mev-1/Dox(+)* マウス) で有意に減少していた。



(図 9) 各マウスの眼表面をフルオレセイン染色し、点状表層角膜炎についてスコアリン

グしたところ、活性酸素誘発モデルマウスでは有意にスコアが上昇し、眼表面に点状表層角膜炎が出現していることが確認された。

本研究の総括および結論

以上より、活性酸素誘発モデルマウスでは涙腺において活性酸素量が増加しており、酸化タンパク量の増加、免疫組織染色から酸化傷害などが認められた。また涙腺全体に炎症所見が確認され、多彩な免疫担当細胞が浸潤しており、炎症性サイトカイン発現の上昇も認められた。涙液分泌量の低下および眼表面における点状表層角膜炎の出現は臨床的ドライアイと近似しており、細胞内由来活性酸素と臨床的ドライアイは関連性があ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 5 件)

- ① Kyoto Cornea Club, 京都, 2011/12/3-4  
 “New model mouse of dry eye disease : Oxidative Stress Affect Functional Decline In Lacrimal Gland”  
Yuichi Uchino.
- ② 第 16 回シェーグレン症候群セミナー, 東京, 2011/6/4.  
 「ミトコンドリアとドライアイ」  
内野裕二、川北哲也、宮沢正樹、尾内宏美、安田佳代、石井恭正、小川葉子、榛村重人、石井直明、坪田一男
- ③ Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, 2011/5/1-5.  
 “The role of intracellular oxidative stress in the mechanism of the dry eye disease”  
Yuichi Uchino, Tetsuya Kawakita, Masaki Miyazawa, Takamasa Ishii, Hiromi Onouchi, Kayo Yasuda, Yoko Ogawa, Shigetou Shimmura, Naoaki Ishii, Kazuo Tsubota.
- ④ 第 35 回角膜カンファレンス, 品川, 2011/2/17-19.  
 「*Tet-mev-1* マウスを用いた細胞内酸化ストレスによるドライアイ発症メカニズムの解析」  
内野裕二、川北哲也、宮沢正樹、尾内宏美、安田佳代、石井恭正、小川葉子、榛村重人、石井直明、坪田一男

⑤ The 6th International Conference on the Tear Film & Ocular Surface, Florence, Italy, 22-25 September 2010.

“A New Mouse Model of Dry Eye Disease (*Tet-mev-1* Mice): Oxidative Stress Affect Functional Decline in Lacrimal Gland”

Yuichi Uchino, Tetsuya Kawakita, Masaki Miyazawa, Takamasa Ishii, Hiromi Onouchi, Kayo Yasuda, Shigeto Shimmura, Naoaki Ishii, Kazuo Tsubota

[その他]  
特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内野 裕一 (UCHINO YUICHI)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教 (非常勤)  
研究者番号 : 80365337