

厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

「ドライアイ発症機序の解明および治療用人工涙液の開発研究」

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 坪田一男

平成14（2002）年4月

目次

I. 総括研究報告書	
「ドライアイ発症機序の解明および 治療用人工涙液の開発研究」 坪田一男	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 4
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 6

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
総括研究報告書

ドライアイ発症機序の解明および治療用人工涙液の開発研究

主任研究者 坪田一男 東京歯科大学眼科教授

研究要旨 本研究は希釈血清点眼治療法の知見を元にドライアイ治療用の汎用人工涙液の開発を行うものである。本年度は結膜上皮細胞をモデル系として用いて、血清除去および添加刺激による遺伝子発現プロファイルの変動、血清除去によって引き起こされる細胞死機構の検討およびこの細胞死抑制に有用な因子の探索を実施した。その結果、血清除去および添加刺激によって transcription factor など多数の遺伝子の発現が変動すること、EGF などの成長因子およびビタミン A が細胞死抑制に有効であることが示唆された。

分担研究者 なし。

A. 研究目的

ドライアイの発症機序は2つのステップに分けることができる。第1のステップは涙腺障害などによる涙液分泌量の低下である。第2のステップは涙液分泌量の低下による眼球表面の乾燥および障害である。本研究の目的は発症機序の第2ステップに主眼をおいた、ドライアイ治療法の探索および開発である。第2ステップの治療法には人工涙液の点眼、ドライアイ保護眼鏡の装用、涙点プラグ挿入術などがあるが、決定的な治療法は確立されていない。本研究は、既に治療効果が一部の症例で確認されている希釈血清点眼治療法の知見を元に、ドライアイ治療用の汎用人工涙液の開発を行うものである。

ドライアイ患者においてみられる涙液量低下による角結膜上皮障害は、患者自己血清希釈液の点眼により抑制される。このことは涙液中に存在する角結膜上皮の維持に必要な成分が血清中にも存在するか、あるいは同等の効果を有する成分が血清中に存在するというを示唆している。血清中には多くのタンパク質成分が存在するため、細胞に対する影響は非常に複雑である。

血清による眼球表面細胞への多様な影響を解析するために、結膜上皮細胞をモデル系として用い、培地中に血清を添加したときに生じる遺伝子発現の変動をマイクロアレイ法によって解

析することにした。また、このヒト結膜上皮細胞株は生存に血清の培地への添加が必要であり、培地中から血清を除去すると死滅する。この細胞死の機構を検討し、さらに細胞死を抑制し、細胞の正常状態の維持に参与している血清中因子の探索を行うことにした。

B. 研究方法

ヒト結膜上皮細胞株を 60-70%コンフルエントになるまで 10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む Medium199 で培養後、培地を 0.1%FBS を含む Medium199 に変更した。24 時間後、元の 10%FBS を含む Medium199 に再交換し、再交換後、0 時間、0.5 時間、6 時間および 24 時間後に細胞を回収した。回収した各細胞から mRNA を単離し、マイクロアレイ法にて血清除去および添加刺激による遺伝子発現プロファイルの変動を調べた。

ヒト結膜上皮細胞株を 60-70%コンフルエントになるまで 10%FBS を含む Medium199 で培養後、10%ヒト血清を含む Medium199、ヒト血清を含まない Medium199、あるいはヒト血清を含まない Medium199 に EGF など血清中因子を添加した培地に変更した。24 時間インキュベーション後細胞を回収し、可溶化後、各細胞の DNA 断片化、カスパーゼ活性などを測定した。

(倫理面への配慮)

当該年度の本研究は培養細胞株を用いた研究であり、倫理面の問題は特に生じていない。

C. 研究結果

0時間を基準として遺伝子発現の増減を経時的に観察したところ、血清添加刺激後、0.5時間、6時間および24時間後において時点特異的に発現増大ピークを示すもの、経時的に増大していくもの、全時点において常に高いもの、また経時的に低下していくものなど様々なプロファイルを示した。いずれかの時点において mRNA 発現が有意に増大した遺伝子は64、減少した遺伝子は40であり、中でも大きく変動したものは(3倍以上)、増大したものが18、減少したものが13であった。一般的に intercellular mediator、transcription factor およびリン酸化酵素などは0.5時間後に、細胞増殖、cytoskeleton、および molecular chaperone などは6時間後に増大ピークを示した。また発現が減少したものの大部分は6時間後にピークに達し、それ以上変動しないものが多かった。

血清除去による細胞死はDNAの断片化を伴い、さらにカスパーゼ3および8活性の上昇を伴い、各種カスパーゼ阻害剤の影響を受けることから、カスパーゼカスケードが関与するアポトーシスであることが示された。このDNAの断片化およびカスパーゼ活性の上昇を基準として、細胞死を抑制する血清中因子を探索することにした。これは血清をカラム分画などにより成分を分離して未知成分を探索する方法と、既知であり、可能性のあると思われる血清および涙液中因子を評価するという2つのアプローチを用いることにした。その結果、EGFなどの成長因子およびビタミンAが有効であることが示唆された。

D. 考察

血清中には多様の因子が含まれているため、その影響は多数の遺伝子与えられる。このため多くの遺伝子の発現変動を同時に見ることができ、マイクロアレイ法は適切な方法であるといえる。このマイクロアレイ法が一般的な手法化するに伴い、その結果の解析法が議論されてきている。今後は、類似の発現プロファイルを示すものが生理的に関連する遺伝子であると考え、クラスター解析を用いて本結果を解析し、血清中有効成分の探索に生かす予定である。

EGFおよびビタミンAは結膜上皮細胞の生存に有効であったため、人工涙液の成分としても有用である可能性が示唆された。今後は、他の成長因子やタンパク質成分の影響、および因子

の組み合わせ効果を検討する。さらに、カラムクロマトグラフィー法により、血清中の未知の有効成分を探索中である。

E. 結論

マイクロアレイ法により血清除去および添加刺激により、多数の遺伝子において発現が変動することが明らかになった。血清添加後30分という短時間で intercellular mediator、transcription factor およびリン酸化酵素などの発現が増大していた。

血清中因子ではEGFなどの成長因子およびビタミンAがアポトーシスの抑制に有効であることが示唆された。この知見はドライアイ治療法開発に有用な情報であると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsubota K, Fujita H, Tadano K, Takeuchi T, Murakami T, Saito I, Hayashi Y. Improvement of lacrimal function by topical application of CyA in murine models of Sjogren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 101-110.
- 2) Tsubota K, Hirai S, King LS, Agre P, Ishida N. Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjogren's syndrome. *Lancet* 2001; 357: 688-689.
- 3) Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 2001; 20: 807-810.
- 4) Toda I, Kuwana M, Tsubota K, Kawakami Y. Lack of evidence for an increased microchimerism in circulation of patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2001; 60: 248-253.
- 5) Toda I, Hori-Komai Y, Asano-Kato N, Tsubota K. Dry eye following laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol.* 2001; 132: 1-7.
- 6) Ogawa Y, Okamoto S, Kuwana M, Mori T, Watanabe R, Nakajima T, Yamada M, Mashima Y, Tsubota K, Oguchi Y. Successful treatment of dry eye in two patients with chronic graft-versus-host disease with systemic administration of FK506 and corticosteroids. *Cornea* 2001; 20: 430-4.
- 7) Asano-Kato N, Fukagawa K, Tsubota K, Urayama K, Takahashi S, Fujishima H. Quantitative evaluation of atopic blepharitis by

scoring of lid conditions and measuring the water content of the skin, and evaporation from the lid surface. *Cornea* 2001; 3: 255-259.

- 8) Hori-Komai Y, Toda I, Tsubota K. Laser in situ keratomileusis: association with increased width of palpebral fissure. *Am J Ophthalmol.* 2001; 131: 254-255.
- 9) Inoue H, Tsubota K, Ono M, Kizu Y, Mizuno F, Takada K, Yamada K, Yanagi K, Hayashi Y, Saito I. Possible involvement of EBV-mediated alpha-fodrin cleavage for organ-specific autoantigen in Sjogren's syndrome. *J Immunol.* 2001; 166: 5801-5809.
- 10) Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* 2002; 133: 181-186.
- 11) Tsubota K, Miyake M, Matsumoto Y, Shintani M. Visual protective sheet can increase blink rate while playing hand-held video game. *Am J Ophthalmol.* in press.
- 12) Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, Aburatani H, Tsubota K. Effects of serum stimulation on gene expression in a conjunctival epithelial cell line. 投稿準備中
- 13) Higuchi A, Takeuchi T, Suematsu M, Tsubota K. Elucidation of apoptosis induced by serum deprivation in cultured conjunctival epithelial cells. 投稿準備中

2. 学会発表

【国内】

1) 樋口 明弘、榛村 重人、末松 誠、平嶋正樹、前田浩明、野崎 周英、坪田 一男. 眼結膜上皮細胞におけるアポトーシスの検討. 第74回日本生化学会大会、京都、平成13年10月28日

【海外】

- 1) Tsubota K, Hirai S, King L, Agre P, Ishida N. Defective cellular trafficking of aquaporin-5 water channel protein in Sjögren's syndrome lacrimal glands. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2001/5.
- 2) Higuchi A, Shimmura S, Suematsu M, Ishimura Y, Tsubota K. Elucidation of apoptosis induced by serum deprivation in cultured conjunctival epithelial cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2001/5.

H. 知的所有権の取得状況

血清成分によるアポトーシス抑制およびドライアイ治療薬への応用で特許取得準備中。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsubota K, Fujita H, Tadano K, Takeuchi T, Murakami T, Saito I, Hayashi Y	Improvement of lacrimal function by topical application of CyA in murine models of Sjogren's syndrome	Invest Ophthalmol Vis Sci	42	101-110	2001
Tsubota K, Hirai S, King LS, Agre P, Ishida N	Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjogren's syndrome	Lancet	357	688-689	2001
Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K	Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum	Cornea	20	807-810	2001
Toda I, Kuwana M, Tsubota K, Kawakami Y	Lack of evidence for an increased microchimerism in circulation of patients with Sjogren's syndrome	Ann Rheum Dis	60	248-253	2001
Toda I, Hori-Komai Y, Asano-Kato N, Tsubota K	Dry eye following laser in situ keratomileusis	Am J Ophthalmol	132	1-7	2001
Ogawa Y, Okamoto S, Kuwana M, Mori T, Watanabe R, Nakajima T, Yamada M, Mashima Y, Tsubota K, Oguchi Y	Successful treatment of dry eye in two patients with chronic graft-versus-host disease with systemic administration of FK506 and corticosteroids	Cornea	20	430-434	2001
Asano-Kato N, Fukagawa K, Tsubota K, Urayama K, Takahashi S, Fujishima H	Quantitative evaluation of atopic blepharitis by scoring of lid conditions and measuring the water content of the skin, and evaporation from the lid surface	Cornea	3	255-259	2001
Hori-Komai Y, Toda I, Tsubota K	Laser in situ keratomileusis: association with increased width of palpebral fissure	Am J Ophthalmol	131	254-255	2001

Inoue H, Tsubota K, Ono M, Kizu Y, Mizuno F, Takada K, Yamada K, Yanagi K, Hayashi Y, Saito I	Possible involvement of EBV-mediated alpha-fodrin cleavage for organ-specific autoantigen in Sjogren's syndrome	J Immunol	166	5801-5809	2001
Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K.	Impaired functional visual acuity of dry eye patients	Am J Ophthalmol	133	181-186	2002

20010783

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。