

20020677

厚生労働科学研究費補助金
感覚器障害研究事業

「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14年度 総括研究報告書

主任研究者 坪田一男

平成15（2003）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
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表	----- 6
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 7~24

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。結膜上皮細胞株を用いた実験の結果、血清中因子のうち、アルブミン、成長因子、ビタミン A の有用性が示唆され、これらを組み合わせることによる効果増大が示唆された。またドライアイモデルラットに対するアルブミン点眼は、コントロール群に対して有意な改善がみいだされた。さらにシェーグレン症候群患者に対するアルブミン点眼においても、投与前に対して有意な改善がみいだされた。

分担研究者 なし。

A. 研究目的

ドライアイ患者数は現在全国で約 800 万人と推定されている。ドライアイ症状は患者に単に不快感を与えるだけでなく、かゆみや痛みなどによる集中力の低下にともない仕事などの作業効率の低下が生じる。また重度のドライアイ患者においては、眼球表面の損傷等により視力の著しい低下を伴うこともあるため、健全な社会生活を営む上で大きな生活障害となっている。ドライアイ治療法の開発は生活障害の改善や QOL の観点からも、今後の社会における重要な課題の一つであるといえる。

ドライアイ発症機序は2つのステップに分けられ、第1ステップは涙腺障害などによる涙液分泌量の低下であり、第2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、第2ステップにおけるドライアイ治療法の探索および開発である。第1ステップに対する治療法は各疾患に対して根本的な治療法となりうるが、疾患毎の要因が異なるために疾患毎の治療法が必要となる。これに

対して第2ステップに対する治療法は、根本的な治療法ではないが、重度から軽度ドライアイまで応用範囲の広い治療法である。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ことを示唆している。血清は涙液に比べて大量に入手可能であり、これまでに蓄積されている情報も多いために、涙液そのものを用いた人工涙液の開発よりも、時間的、経済的に有利である。

平成 13 年度は、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関与している血清中因子の探索を行うことにした。

平成 14 年度は 13 年度の結果を元に、成長因子やアルブミンなどいくつかの血清中有効成分の効果を *in vitro* でさらに検討することにした。さらにアルブミンに関しては、その有用性が示唆されてきたので、ドライアイモデル動物を用いた *in vivo* 実験および臨床研究も行うことにした。

B. 研究方法

1. 結膜上皮細胞株を用いた *in vitro* 実験

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、血清を含まない Medium199、あるいは血清の代わりにアルブミン、成長因子、ビタミンなど血清中因子を添加した Medium199 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、DNA 合成能などを測定した。

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%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、10%ヒト血清を含む Medium199 に交換したもの、あるいは血清の代わりに 5mg/ml ヒトアルブミンを添加した Medium199 に交換後、0.5 時間、3 時間、6 時間、12 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 RNA を抽出し、マイクロアレイ法にてアルブミン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。

2. ドライアイモデルラットを用いた *in vivo* 実験

Sprague-Dawley ラット (8 週齢、雄、n=10) の角膜上皮中央部を ϕ 2.2mm 円状刀を用いて円形に約 0.4mm² 掻爬後、乾燥条件下 (温度 23 \pm 2°C、相対湿度 28 \pm 2%、送風 (風速 2 ~ 4m/s)) にて飼育した。掻爬直後から点眼を行い、12 時間後前眼部に 1% フルオレセインナトリウム 1 μ L を点眼し、生理食塩水で洗浄後写真撮影を行い、画像解析ソフトを用いて上皮剥離

面積を算出した。点眼液は 1、5、10mg/ml アルブミン溶液、および対象薬としてリン酸緩衝液を用いた。

3. シェーグレン症候群患者に対するアルブミン点眼

シェーグレン症候群患者 9 名に対して 50mg/ml アルブミンの点眼を行った。点眼は 1 日 6 回、4 週間行った。フルオレセイン染色、ローズベンガル染色、BUT (tear break up time) の測定を点眼開始前、2 週間後、4 週間後にそれぞれ実施し、点眼効果を検討した。

(倫理面への配慮)

シェーグレン症候群患者に対してアルブミン点眼を行う臨床研究は、東京歯科大学倫理委員会において承認されたプロトコールに従い、同じく同委員会によって承認された患者説明書および同意書を用いて患者に対して文書による十分な説明を実施し文書による同意を得た後に実施した。

C. 研究結果

1. 結膜上皮細胞株を用いた *in vitro* 実験

血清の代わりにアルブミンを培地に添加すると、0.01mg/ml の濃度から、濃度依存的に血清なしの状態に比べてアポトーシスは抑制された。10mg/ml の濃度で血清なしに比べて有意にアポトーシスを抑制したが、血清そのものと同等の効果は示さなかった。またアルブミンは DNA 合成を促進した。EGF など各種成長因子のアポトーシス抑制効果を検討したところ EGF の他に TGF- β や IGF において効果が見いだされた。また EGF および IGF においては DNA 合成能の促進も見いだされた。しかしながら、これら成長因子の効果も血清と同等の効果は示さなかった。13 年度に有効性が示唆されたビタミン A との混合効果を検討したところ、アルブミン、EGF、ビタミン A 混合物において、各単体に比べて、アポトーシス抑制効果の上昇が見いだされた。しかしながらこの混合物においても血清と同等の効果は得られなかった。

アルブミン添加後の遺伝子発現プロファイルと血清添加後のプロファイル間の相関を検討した。アルブミン刺激による遺伝子発現プロファイルと血清刺激による発現プロファイルはアルブ

ミン添加後6時間までは相関を示したが、それ以降は相関を示さなかった(30分後:r=0.6、3時間後:r=0.427、6時間後:r=0.415)。次に、各種の生化学的、生理的反応に関連する遺伝子を選択し、相関を求めた。TCA回路(r=0.614~0.802)や酸化ストレス(r=0.574~0.867)に関連する遺伝子発現は常に高い相関を示したが、電子伝達系、アポトーシスあるいは細胞増殖に関連する遺伝子における相関は全時点において低い値を示した。

2. ドライアイモデルラットを用いた *in vivo* 実験

角膜上皮を搔爬したラットは通常であれば速やかに治癒するが、本研究の乾燥条件下では剥離面積は増大する。乾燥条件下においても血清点眼を実施すれば、速やかに治癒するがPBS点眼では治癒しないことがすでにわかっている。血清の代わりにアルブミンを用いて点眼すると、コントロール群(PBS点眼)に比べて剥離面積は減少した。特に5mg/ml投与群においては有意に($p < 0.01$)減少することが観察された。

3. シェーグレン症候群患者に対するアルブミン点眼

シェーグレン症候群患者に対してアルブミン点眼を行った結果、投与開始2週間後からフルオレセイン染色、ローズベンガル染色、BUTのすべてにおいて改善がみいだされた。投与開始4週間後においては、2週間後よりもさらに改善がみられ、投与前に対して有意に差異がみいだされた。

D. 考察

1. 結膜上皮細胞株を用いた *in vitro* 実験

血清因子中のアルブミン、成長因子、ビタミンAなどにおいてアポトーシスの抑制およびDNA合成の促進が見いだされた。このことはこれらの因子は結膜上皮細胞の正常維持に有効であることを示唆している。EGFなどの成長因子は細胞の生存と増殖に必須であり、ビタミンAは細胞を酸化ストレスから防御するために重要な役割を果たしていると考えられる。

アルブミンの作用機序は不明であるが、マイクロアレイ法による解析結果において酸化ストレスに対する遺伝子発現プロファイルの相関が高い値を示したこと、および血液中で抗酸化作用

を示すことが知られていることから、酸化ストレスに対する防御効果が考えられる。また栄養源としての作用、細胞膜の安定性を高める効果なども考えられる。アルブミン、EGF、ビタミンAを混合することによりアポトーシス抑制効果が増大することは、これらの因子の作用が互いに補いあっていることを示しているのかもしれない。

今後は、細胞増殖やアポトーシスに対する、他の成長因子やビタミン類の影響を検討すると共に、アルブミンとの組み合わせ効果をさらに検討していく。

2. ドライアイモデルラットを用いた *in vivo* 実験

乾燥条件にさらすことによるドライアイモデルラットは、遺伝的異常を含まず、眼球表面のみの異常を反映させることができ、軽度から重度までのドライアイモデルとして非常に有用である。今回このラットを用いることによりアルブミン点眼の有用性が *in vivo* においても示唆された。

今後は成長因子やビタミンおよびアルブミンとの組み合わせ効果について検討していく。

3. シェーグレン症候群患者に対するアルブミン点眼

予備的な小規模臨床研究において、アルブミン点眼がシェーグレン症候群患者におけるドライアイ治療に有用であることが示唆された。今後は、動物実験を繰り返しさらに安全性を確かめた上で、患者数を増やして精度の高いデータを出していきたい。さらに安全性を十分確かめた上で、アルブミンに他の血清中因子を組み合わせることで改良した点眼液の効能も検討していきたい。

アルブミンがドライアイに対して有効であることは2つの *in vivo* 研究から明らかであるが、その機構は推定の域を出ていない。今後は治療効果の機構を解明していきたい。

E. 結論

結膜上皮細胞株を用いた *in vitro* 実験の結果、血清中因子のうち、アルブミン、成長因子(EGF、IGF、TGF- β)、ビタミンAの有用性が示唆され、さらにこれらを組み合わせることにより効果の増大がみいだされた。

アルブミン添加後の遺伝子発現プロファイルと血清添加後のプロファイル間の相関を検討し

たところ、両者は6時間までは相関を示したが、それ以降は相関を示さなかった。また、TCA 回路や酸化ストレスに関連する遺伝子発現は常に高い相関を示したが、電子伝達系、アポトーシスあるいは細胞増殖に関連する遺伝子における相関は全時点において低い値を示した。

ドライアイモデルラットを用いた実験において、アルブミン点眼群はコントロール群に比べて有意に症状の改善がみいだされた。

シェーグレン症候群患者に対するアルブミン点眼においても、有意な改善がみいだされた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsubota K, Miyake M, Matsumoto Y, Shintani M. Visual protective sheet can increase blink rate while playing hand-held video game. *Am J Ophthalmol.* 2002;133:704-705.
- 2) Goto E, Shimazaki J, Monden Y, Takano Y, Yagi Y, Shimmura S, Tsubota K. Low-concentration homogenized castor oil eye drops for noninflamed obstructive meibomian gland dysfunction. *Ophthalmology* 2002 ; 109: 2030-2035.
- 3) Goto E, Monden Y, Takano Y, Mori A, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of non-inflamed obstructive meibomian gland dysfunction by an infrared warm compression device. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86: 1403-1407.
- 4) Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, Aburatani H, Tsubota K. Serum-and Serum Deprivation-Induced Transcriptional Profiles of Cultured Conjunctival Epithelial Cells. Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3 Basic Science and Clinical Relevance Part A. 2002; 506: 673-676.
- 5) Shimmura S, Ueno R, Matsumoto H, Goto E, Higuchi A, Shimazaki J, Tsubota K. Albumin as a tear supplement in the treatment of severe dry eye. *Br J Ophthalmol* (in press) .
- 6) Higuchi A, Takeuchi T, Suematsu M, Tsubota K. Elucidation of apoptosis induced by serum deprivation in cultured conjunctival epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (submitted).
- 7) Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, Aburatani H, Tsubota K. The effects of serum deprivation

and serum stimulation on gene expression in cultured conjunctival epithelial cells. *Eye* (submitted).

- 8) Nakamura S, Matsunaga M, Saito Y, Nakashima H, Saito F, Higuchi A, Tsubota K. Effect of D-beta-hydroxybutyrate on ocular surface epithelial disorder in dry eye conditions through suppression of apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (submitted).

2. 学会発表

1) 樋口明弘、末松誠、油谷浩幸、坪田一男. 眼結膜細胞株におけるアポトーシスに対する血清成分の効果. 第 75 回日本生化学会大会、京都、平成 14 年 10 月 17 日

2) 樋口明弘、末松誠、油谷浩幸、坪田一男. 結膜上皮細胞株に対するアルブミン効果の検討. 第 27 回角膜カンファレンス、軽井沢、平成 15 年 2 月 20 日

The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2002/5.

- 3) Tsubota K, Yamada K, Saito I. Enhanced lacrimation and salivation by cyclic AMP through phosphorylation of CREB (ser 133) in prolactin transgenic rats.
- 4) Higuchi A, Suematsu M, Aburatani H, Tsubota K. Effects of components of serum on apoptosis in cultured conjunctival epithelial cells.

The 8th International Symposium on Sjogren's Syndrome, Kanazawa, Japan, 2002/5.

- 5) Higuchi A, Suematsu M, Aburatani H, Tsubota K. Effects of components of serum on apoptosis in cultured conjunctival epithelial cells.
- 6) Matsumoto Y, Goto E, Ishida R, Onguchi T, Tsubota K. Treatment of neurotrophic keratopathy by autologous serum application.
- 7) Ohashi Y, Ishida R, Watanabe K, Ishida N, Nakata K, King LS, Agre P, Takeuchi T, Tsubota K. Elevated aquaporin 5 protein in tear fluid of Sjogren's syndrome.
- 8) Shiraiishi K, Tsuzaka K, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T. Expression of apoptosis-related molecules in lacrimal and salivary glands of

patients with Sjogren's syndrome.

- 9) Toda I, Saito I, Yamada K, Hayashi Y, Tsubota K. Alternative cleavage of alpha-fodrin, organ-specific autoantigen in lacrimal gland in Sjogren's syndrome.
- 10) Tsuzaka K, Shiraishi K, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T. Mutation of Fas-L promotor region could lead to the down regulation of Fas-L in Sjogren's syndrome patients with severe swelling of the lacrimal and parotid glands.
- 11) Tsubota K. Abnormalities of water channel protein in Sjogren's syndrome lacrimal glands.
- 12) Tsubota K. New Treatment for Dry Eye in Sjogren's syndrome: Serum eye drops.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

1) 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申請中

2) アルブミン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申請中

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。

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, Miyake M, Matsumoto Y, Shintani M.	Visual protective sheet can increase blink rate while playing hand-held video game	Am J Ophthalmol	133	704-705	2002
Goto E, Shimazaki J, Monden Y, Takano Y, Yagi Y, Shimmura S, Tsubota K	Low-concentration homogenized castor oil eye drops for noninflamed obstructive meibomian gland dysfunction	Ophthalmology	109	2030-2035	2002
Goto E, Monden Y, Takano Y, Mori A, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K	Treatment of non-inflamed obstructive meibomian gland dysfunction by an infrared warm compression device	Br J Ophthalmol	86	1403-1407	2002
Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, Aburatani H, Tsubota K	Serum-and Serum Deprivation-Induced Transcriptional Profiles of Cultured Conjunctival Epithelial Cells	Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3 Basic Science and Clinical Relevance Part A	506	673-676	2002

20020677

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.6の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。