

20030609

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15年度 総括研究報告書

主任研究者 坪田一男

平成16（2004）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 5

III. 研究成果の刊行物・別刷 7

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。本年度は眼球表面に対する乾燥の影響を角膜上皮細胞株およびドライアイモデルラットを用いて検討した。その結果、乾燥刺激により、角膜からの涙液中への IL-6 分泌が上昇することが示唆された。また TNF α の分泌量は変動しなかった。さらに細胞に乾燥抵抗性を与える因子を探索し、非常に有用な候補物質を見いだすことができた。昨年度までの結果と組み合わせることにより、人工涙液開発への応用に期待できる。

分担研究者 なし。

A. 研究目的

ドライアイ患者数は全国で約 800 万人と推定されており、年々増大の傾向にある。ドライアイ治療法の開発は生活障害改善や 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。ドライアイの発症機序は 2 ステップからなる。第 1 ステップは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。本研究では第 2 ステップに主眼を置いた。代表的な第 2 ステップ治療法として人工涙液の点眼があるが、十分な開発はされていない。

ドライアイにおける角結膜上皮の障害は、水分量低下による眼球表面の乾燥および涙液成分欠乏がおもな原因である。我々はこれまでに重度ドライアイ患者に対して患者自身の血清を希釈して人工涙液とする血清点眼治療法を用い、一部の患者において顕著な効果を得ている。血清希釈液が有効な人工涙液となりうることは、角結膜上皮維持に必要な成分が血清中にも存在するというこ

と示唆しており、血清由来成分を中心とした人工涙液の開発研究を試みることにした。

平成 15 年度は上記の成分不足の影響を検討すると共に、乾燥そのものの眼球表面に与える影響も検討した。乾燥が細胞に対して悪影響を与えることは言うまでもないが、これが具体的にどのような影響を与えるかを、細胞の viability や乾燥刺激によるサイトカインの分泌などを検討することにより定量化した。さらに細胞に乾燥抵抗性を与える因子の探索も行った。

B. 研究方法

培養細胞を用いた in vitro 系とドライアイモデルラットを用いた in vivo 系により、乾燥が眼球表面細胞に与える影響を検討することにした。

1. 角膜上皮細胞株を用いた実験
ヒト角膜上皮細胞株(CEPI)を用いて、乾燥の細胞に対する影響を検討した。

クリーンベンチ中で dish より培地を除くことにより細胞に乾燥刺激を与えた。実験時の環境条件は、温度 25 + 2 °C、相対湿度 30

+5%、風速 0.2m/秒であった。乾燥後、アラマブルーを添加した培地を dish に加え、1時間インキュベーションし、細胞の viability を測定した。乾燥刺激による CEPI からのサイトカイン分泌を調べるために、乾燥後培地を再添加し 15 分放置してサイトカイン(IL-6、TNF α など)を抽出後、培地を回収し、培地中のサイトカイン濃度を EIA 法にて測定した。

さらに、サイトカインの分泌が培地成分の除去のためではなく、乾燥の影響であることを示すために、乾燥させる代わりに、培地除去後リン酸緩衝液(PBS)を添加して培養し、サイトカイン量を測定した。

2. ドライアイモデルラットを用いた実験

Sprague-Dawleyラットの眼瞼上下それぞれに医療用アロンアルファを塗布して閉眼不能な状態にした後、温度 25°C、湿度約 50%、風速約 1m/s の乾燥条件下にて飼育してドライアイ状態にした。このドライアイモデルラットより角膜を回収し、サイトカイン遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により検討した。

3. 乾燥抵抗性物質の探索

培養細胞の乾燥による細胞死を確認する系を用いて、乾燥に抵抗できる因子をスクリーニングすることができた。

シュークロース(10mM)やトレハロース(10mM)アルブミン(1mg/ml)などの候補因子をあらかじめ培地と混合し、24 時間インキュベーションした。培地を取り除き一定時間ごと乾燥させた後、因子を含まない培地で培養し、乾燥させた細胞と viability の差異を比較検討した。

(倫理面への配慮)

本年度は培養細胞および動物を用いた実験のみを行ったため、ヒトを対象とした研究という意味での倫理面への配慮は行っていない。しかしながら動物実験に関しては、ラットに対してできる限り苦痛を与えないように配慮し、また最小限の個体数で実験を行った。

C. 研究結果

1. 角膜上皮細胞株を用いた実験

CEPI は乾燥開始 15-20 分後から死滅しはじめ、30 分後にはすべて死滅することがわかった。そこで、この 20 分間における培地中のサイトカイン分泌量を測定することにした。乾燥条件は同じで、乾燥後培地を dish に加えて 15 分放置後培地を回収し、培地中に抽出されたサイトカイン量を EIA 法により測定した。その結果、pro-inflammatory なサイトカインである TNF α と IL-6 の分泌が認められた。さらに IL-6 は乾燥時間に依存して、有意に分泌量が増大したが、これに対して TNF α の分泌量は変化しなかった。また、インターフェロン γ の分泌量も測定したが、これは検出できず細胞内における mRNA 発現も見いだせなかった。

また、乾燥させる代わりに PBS を加えて培養しても IL-6、TNF α 量は変動しなかった。

2. ドライアイモデルラットを用いた実験

ドライアイモデルラット角膜中の TNF α および IL-6 の発現を検討したところ、TNF α 発現量は変動しなかったが、IL-6 発現量は有意に増大することがわかった。ドライアイにおいて炎症反応が関与していることが報告されている。今回の結果から IL-6 が乾燥による細胞応答において何らかの役割を果たしていることが示唆された。

3. 乾燥抵抗性物質の探索

乾燥刺激 24 時間前に、さまざまな因子を培地中に添加し、インキュベーションした。処理後乾燥刺激を行った結果、シュークロース、マルトース、トレハロース、および糖 X において、未処理の場合と比べて viability の上昇がみいだされた。このことは添加した因子により乾燥に対して抵抗性が与えられたことを意味している。アルブミンを用いて同様の検討を行ったが効果は見いだせなかった。

D. 考察

眼球表面乾燥のモデルとして培養細胞を用いて細胞への乾燥の影響を検討した。その結果、乾燥により IL-6 が分泌されドライアイ

イにおける炎症反応と関連することが示唆された。

これまでに、シェーグレン症候群患者において結膜上皮における TNF α 産生上昇が見いだされ、ドライアイ症状の増悪化への関与が示唆されているが、IL-6 に関する知見は少ない。今回のように、涙液成分の供給低下を伴わない単純な乾燥による影響とシェーグレン症候群のような涙液成分の枯渇による影響では細胞の応答が異なる可能性が考えられる。さらにこれは涙液蒸散亢進型である軽度ドライアイと涙液分泌量低下型である重度ドライアイとは違いがあることを意味しているのかも知れない。

また、昨年度まで細胞の正常な維持に有効である因子を探索してきたが、今年度は乾燥そのものに対する抵抗性を与える生理的物質を探索し、これを見いだすことができた。この因子はドライアイの治療に有用であることが示唆される。昨年度までの結果とあわせて考慮することにより、より有効な治療法が開発されることが期待できる。現在、この糖 X の効果および臨床応用に関して特許申請中である。

E. 結論

乾燥刺激により、角膜上皮細胞株より IL-6 が分泌されることが明らかになり、さらに動物実験においても角膜における IL-6 発現が亢進されることが明らかにされた。

また、細胞に乾燥抵抗性を与える物質がいくつか見いだされ、中でも糖 X は強い抵抗性を与えることが見いだされた。昨年度までに見いだされた、アポトーシス抑制すなわち細胞正常維持に有効な物質と組み合わせることにより、より有用な人工涙液を作り出せることが期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto E, Yagi Y, Kaido M, Matsumoto Y, Konomi K, Tsubota K. Improved functional visual acuity after punctal occlusion in dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* 2003;135:704-705.
- 2) Ohashi Y, Ishida R, Kojima T, Goto E, Matsumoto Y, Watanabe K, Ishida N, Nakata K, Takeuchi T, Tsubota K. Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2003;136:291-299.
- 3) Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, Takeuchi T. Quantitative analysis of lacrimal gland function, apoptotic figures, Fas and Fas ligand expression of lacrimal glands in dry eye patients. *Exp Eye Res.* 2003;76:233-240.
- 4) 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.* 2003; 87: 1279-1283.
- 5) 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.* 2003; 44: 4682-4688.
- 6) Higuchi A, Takeuchi T, Suematsu M, Tsubota K. Elucidation of apoptosis induced by serum deprivation in cultured conjunctival epithelial cells. *Exp Eye Res* (submitted).

2. 学会発表

- 1) 樋口明弘、田上綾子、竹内勤、吉本桂子、坪田一男. 角膜上皮細胞株における炎症応答の検討. 第33回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、平成15年12月8日
- 2) 樋口 明弘、田上 綾子、木戸 啓司、戸村 淳嗣、中村 滋、坪田 一男. 培養細胞および動物実験による角膜上皮に対する乾燥刺激の影響の検討. 第28回角膜カンファランス、米子、平成16年2月19日

The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2003/5.

- 3) Tsubota K, Ohashi Y, Higuchi A, Inoue H, Doi T, Mataka C, Kodama T,

Hayashi Y, Saito I. A novel cell adhesion inhibitor K-7174, reduces lymphocyte infiltration and increases tear production in Sjögren's syndrome model mouse.

- 4) Higuchi A, Nishimura D, Fukata H, Komiyama M, Mori C, Aburatani H, Tsubota K. Effects of endocrine disrupters on corneal epithelial cell line.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

抗乾燥に働く有効因子の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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Goto E, Yagi Y, Kaido M, Matsumoto Y, Konomi K, Tsubota K	Improved functional visual acuity after punctal occlusion in dry eye patients	Am J Ophthalmol	135	704-705	2003
Ohashi Y, Ishida R, Kojima T, Goto E, Matsumoto Y, Watanabe K, Ishida N, Nakata K, Takeuchi T, Tsubota K	Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome	Am J Ophthalmol	136	291-299	2003
Tsubota K, Fujita H, Tsuwaka K, Takeuchi T	Quantitative analysis of lacrimal gland function, apoptotic figures, Fas and Fas ligand expression of lacrimal glands in dry eye patients	Exp Eye Res	76	233-240	2003
Shimmura S, Ueno R, Matsumoto Y, Goto E, Higuchi A, Shimazaki J, Tsubota K	Albumin as a tear supplement in the treatment of severe dry eye	Br J Ophthalmol	87	1279- 1283	2003
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	44	4682- 4688	2003

20030609

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。