

20030826

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用

平成15年度 総括・分担研究報告書

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

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用----- 1

坪田一男

II. 分担研究報告

涙腺・唾液腺分化・増殖機構の解明に関する研究----- 8

斎藤一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 13

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 15

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用

主任研究者 坪田一男 東京歯科大学眼科教授

研究要旨

スティーブン・ジョンソン症候群やシェーグレン症候群などにより消失または著しく傷害された涙腺の分泌機能を回復するために再生医療を応用することが本研究の目的である。すなわち効率よく涙腺組織幹細胞の増殖・分化を誘導する因子を同定するとともに、同定された因子を用いて *in vitro* で涙腺組織幹細胞より分化誘導した涙腺の構成細胞を傷害された涙腺に移入することによりその機能の回復をはかる。本年度は FACS（自動細胞分離装置：フローサイトメーター）を用いて組織幹細胞として知られる side population cell（SP 細胞）を採取し non-SP 細胞（main population cell, MP 細胞）と発現遺伝子を比較することにより幹細胞特異的に発現の高い遺伝子を同定した。これらの遺伝子の機能を解析することにより涙腺組織幹細胞の増殖・分化を制御する因子を明らかにする。さらに、これらの疾患に起因する腺分泌機能不全は涙腺のみならず唾液腺にも認められるので、本研究では唾液腺についても同様な解析を行った。以下に本年度に得られた知見について記す。

- 1) FACS により単離された涙腺・唾液腺の SP 細胞はともに幹細胞での発現が報告されている breast cancer resistant protein 1（Bcrp1）の発現がみられ幹細胞にとんだ分画であることが確認された。
- 2) cDNA microarray を用いた解析により涙腺・唾液腺の SP 細胞特異的に発現している遺伝子群を明らかにした。
- 3) p53^{-/-}マウスの唾液腺組織より 3 種類の細胞株（MS1 細胞, MS2 細胞, MS3 細胞）を樹立した。
- 4) MS1 細胞および MS2 細胞を単独でヌードマウスの皮下に移植しても腫瘍形成は認められないがマトリゲルとともにヌードマウスに移植すると少なくとも移植後 3 ヶ月間は生着し、導管様構造と分泌細胞の存在を認めた。
- 5) MS1 細胞あるいは MS2 細胞をマトリジェルとともにヌードマウスの皮下に移植するモデルは *in vivo* における唾液腺の 3 次元的再構築を解析可能なモデルであるばかりか唾液腺の再生に関与する因子のスクリーニングにも有用なモデルと考えられた。涙腺細胞株についても同様なモデルの確立を行っている。

分担研究者 齋藤一郎 鶴見大学歯学部教授

A. 研究目的

現在、我が国でドライアイに罹患している患者数は 800 万人以上と推定されており、乾燥症状が重篤になると著しい QOL の低下を来すことが知られている。その原因は、シェーグレン症候群、スティーブン・ジョンソン症候群、頭頸部癌に対する放射線治療、種々の薬剤などによる涙腺の分泌低下があげられる。これらの対処法の現状は人工涙液の使用や残存する腺房細胞の分泌能を促進する薬剤の服用などが行われている。症状が重度な症例ではこれらの治療法が奏功せず失明に至る可能性があり、このことからより効果的な治療法として、失われた腺房細胞を体外から移入する再生医療の応用が考えられる。細胞移入による疾患の再生医療における基本的な概念は、高い増殖能を持つ幹細胞を生体外で増やし、分化を誘導した後に生体内に移入することにより、失われた組織の機能を回復することである。その際の幹細胞の供給源としては組織幹細胞 (tissue stem cell) あるいは胚性幹細胞 (ES 細胞) が現状では考えられており、現在様々な臓器で積極的に検討が進められている。

本研究では涙腺および発生学的にも組織学的にも類似した組織と考えられる唾液腺を対象にそれらの組織幹細胞の同定と *in vitro* で幹細胞の特異的増殖を誘導する因子の確定を行う。また、*p53*^{-/-} マウス涙腺・唾液腺組織より新たに樹立した腺上皮細胞株を用いて *in vivo* における腺組織を三次元的に再構築可能な実験モデルの確立を行い腺組織の再生に関与する因子を同定する。

これらの同定された因子を ES 細胞あるいは患者本人より採取された涙

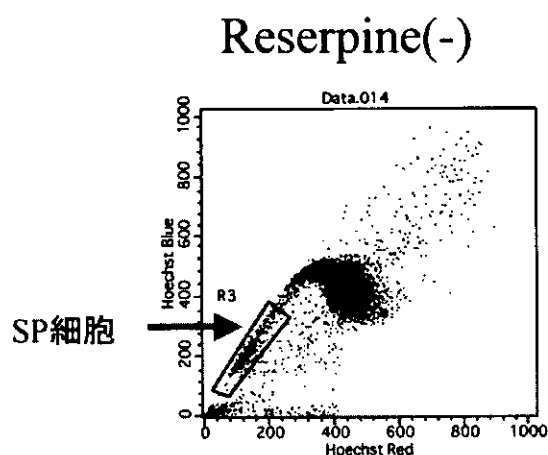
腺組織幹細胞に作用させることにより、病的に消失した涙腺組織の再生を行う。

B. 研究方法

1. 涙腺・唾液腺組織幹細胞における特異的発現遺伝子の同定

1) 涙腺・唾液腺組織幹細胞の同定

肝臓をはじめ多くの臓器で特異的マーカー分子を利用した幹細胞の単離が可能となったが、これまで涙腺特異的な幹細胞のマーカー分子に関する報告はなく、幹細胞の単離は困難と考えられていた。最近になり ES 細胞、造血幹細胞、組織幹細胞に共通して ATP binding cassette (ABC) transporter の発現が報告され、幹細胞マーカーとして利用が可能と考えられる。ABC transporter を有する細胞は色素排除能を有し Hoechst3342 で処理しても染色されない細胞群 (side population cells, SP 細胞) として検出されることが報告されている。この方法は、涙腺・唾液腺にも応用が可能であり、前年度に涙腺・唾液腺組織における SP 細胞の同定を行いそれらが培養可能なことは確認している (下図)。



2) 涙腺・唾液腺 SP 細胞に特異的な発現遺伝子の解析

FACS を用いて涙腺・唾液腺組織より得られた SP 細胞と non-SP 細胞 (main population cell, MP 細胞) から RNA を採取する。採取した RNA それぞれを T7 promoter-based method により増幅した後 NIA mouse 15K cDNA microarray (Version2) 上で競合的に hybridization を行うことにより発現量に差のある遺伝子を同定した。

3) cDNA microarray により同定された遺伝子の発現を検証

MP 細胞と比較して SP 細胞において高発現が認められた因子について RT-PCR によりそれらの発現を検証した。

2. p53-/- マウスから樹立した涙腺・唾液腺細胞株を用いた in vivo 腺組織再構築モデルの確立

1) p53-/- マウス涙腺・唾液腺より細胞株の樹立

2) 樹立した唾液腺細胞株における発現蛋白の解析

培養した細胞株から抽出した蛋白をアクリルアミドゲルで電気泳動後ウエスタンブロット法によりサイトケラチン 14 と α -smooth muscle actin (α -SMA) の発現を検討した。

3) 樹立した唾液腺細胞株における分化能の解析

樹立した細胞株をマトリジェル上で培養した後、形態学的な変化を検討した。また、マトリジェル上で培養した細胞より RNA を抽出し RT-PCR により分化マーカーの発現を解析した。

4) 樹立した唾液腺細胞株の in vivo における腺組織の再構築能の解析

樹立した細胞株を PBS あるいはマト

リゲルとともにヌードマウスの皮下に移植し 3 ヶ月後に摘出標本を組織学的に検索した。

(倫理面への配慮)

厚生労働省による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題に対応するための指針」に従い、研究計画書、同意文書を作成し、大学の倫理審査委員会で検討を始めている。具体的には、個人情報保護のため個人情報を外部に持ち出さず、資料を匿名化し、管理担当者を当大学に設置する。倫理委員会の審査に従った同意説明を行い、提供者の自由意志に基づくインフォームドコンセントを得る。資料の廃棄、遺伝子解析結果の開示については、提供者の意志を尊重する。

C. 研究結果

1. cDNA microarray による涙腺・唾液腺 SP 細胞の発現遺伝子解析

- 1) 涙腺 SP 細胞に高発現が認められる遺伝子のリストを示す (Table 1)
- 2) 唾液腺 SP 細胞に高発現が認められる遺伝子のリストを示す (Table 2)
- 3) RT-PCR による涙腺・唾液腺における遺伝子発現の検証

涙腺・唾液腺ともに SP 細胞に高い発現が認められる因子として Clusterin が認められ、RT-PCR によりその発現を確認した (図 1)。

A



B

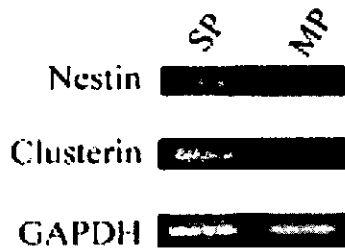


図 1 RT-PCR を用いた DNA microarray 解析により差の見られた遺伝子の発現解析

A : 涙腺

B : 唾液腺

2. p53^{-/-} マウスから樹立した唾液腺細胞株を用いた *in vivo* 腺組織再構築モデルの作成

1) p53^{-/-}マウスの唾液腺組織から明らかに敷石状構造を示す上皮様細胞株を2クローン (MS1 細胞および MS2 細胞) と紡錘形の線維芽細胞様の組織像を示す細胞株1クローン (MS3細胞) を樹立した。

2) ウェスタンブロットにより MS1 細胞はサイトケラチン 14 陽性、 α -smooth muscle actin 陽性で MS2 細胞はサイトケラチン 14 陽性、 α -smooth muscle actin 陰性であった。MS3 細胞にはいずれの発現も認められなかった。

3) マトリゲル上で一週間培養すると MS1 細胞および MS2 細胞では棍棒状の導管様構造の形成がみられ MS2 細胞では部分的に分泌細胞への分化を認めた。MS3 細胞では多数の紡錘形細胞の集合よりなる凝集体を形成するのみで導管様構造や分泌細胞の存在は認められなかった。

4) マトリゲル上で培養した細胞から RNA を抽出し、唾液腺の分化マーカー

である amylase の遺伝子発現を RT-PCR により検討したところ、MS2 細胞のみで amylase mRNA が検出された。従って、MS2 細胞は分泌細胞への分化能を持つ可能性が示唆された。5) MS1 細胞および MS2 細胞をマトリゲルとともにヌードマウスの皮下に移植すると移植後一か月より小腫瘍の形成が認められたが、それらの大きさに経時的な変化は認められなかった。一方、細胞を単独で移植しても明らかな腫瘍形成は認められなかった。摘出した腫瘍では MS1 細胞および MS2 細胞ともに残存するマトリゲルの中に明らかな腺腔を有する導管様構造の形成を認めさらに MS2 細胞では分泌細胞の存在を認めた。

6) MS3 細胞を単独あるいはマトリゲルとともにヌードマウスの皮下に移植した場合にはともに増大傾向を示す腫瘍形成を認め、この腫瘍は組織学的に線維肉腫の像を呈した。

D. 考察

本研究では涙腺・唾液腺の SP 細胞特異的に発現の高い遺伝子が同定され、これらの中には細胞増殖を制御する因子や細胞接着に関連する因子が含まれることより幹細胞の増殖あるいはニッチの形成などに関与している可能性が考えられる。さらに詳細にこれらの因子の機能を解析するために発現プラスミドを構築し ES 細胞に遺伝子導入することにより涙腺・唾液腺への分化誘導が可能か否か検討する。また、Clusterin などの分泌蛋白についてはリコンビナント蛋白を合成し、この蛋白をコートした培養皿上で SP 細胞を培養することや SP 細胞の培養上清中に添加することにより涙腺・唾液腺組織幹細胞の培養に必要な因子

か否かを検討する。加えて、p53-/-腺組織より樹立した細胞株とマトリジェルをヌードマウスの皮下に移植することで *in vivo* で3次元的な腺組織の構築が再現可能となり、このモデルを応用することにより同定された因子の詳細な機能が解析可能となる。これらの検討により *in vitro* において涙腺・唾液腺組織幹細胞の大量培養が可能となれば本研究の最終的な目的である涙液・唾液の分泌障害を有する患者の治療へ応用することが可能である。すなわち、患者本人の涙腺・唾液腺より得られた幹細胞あるいはES細胞より *in vitro* で涙腺・唾液腺細胞を分化誘導し患者の涙腺・唾液腺組織に移入することにより分泌機能の回復をはかる。本研究は、再生医療により涙腺・唾液腺の機能障害を持つ患者の治療のみならず *in vitro* で作製された涙腺細胞は生理的条件に近い人工涙液の供給源として応用が可能である。

E. 結論

本研究により、涙腺・唾液腺の組織幹細胞の分化・増殖に関与している因子が明らかになれば、これらの因子を用いて *in vitro* で腺細胞の大量培養が可能となり、得られた腺細胞を分泌不全をもつ患者の涙腺・唾液腺に移入することにより、それらの分泌機能の回復が可能となる。

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, 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.

2) 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.* 2003; 87: 1279-1283.

3) Goto E, Endo K, Suzuki A, Fujikura Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Tear evaporation dynamics in normal subjects and subjects with obstructive meibomian gland dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 533-539.

4) 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.

5) Goto E, Dogru M, Kojima T, Tsubota K. Computer-synthesis of an interference color chart of human tear lipid layer by a colorimetric approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 4693-4697.

6) 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.

2. 学会発表

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. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting. 2003/5.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2002-313579

「プロラクチンを含む外分泌腺組織からの分泌促進剤およびプロラクチン遺伝子が導入されたトランスジェニック動物」

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

Table1. List of the differentially expressed genes between lacrimal SP cells and MP cells

Gene Name	CloneID
Mus musculus sulfated glycoprotein-2 isoform1 (Clusterin)	H3108A04
Mouse gene for beta-1-globin	H3118G01
M.musculus beta-globin complex	H3117D02
M.musculus DNA for alpha globin gene and flanking regions	H3114F05
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434N1427	H3054H03
M.musculus U7 snRNA gene	H3145B07
Mus musculus placental lactogen 2	H3046B04
Mus musculus neuroblastoma ras oncogene	H3079H06
Mus musculus topoisomerase (DNA) II alpha	H3139A05
Mus musculus SH3 domain-containing protein Lasp-1	H3078F12

Table2. List of the differentially expressed genes between salivary SP cells and MP cells

Gene Name	Clone ID
Mus musculus sulfated glycoprotein-2 isoform1 mRNA, complete cds	H3108A04
Mus musculus Cast (Cast) and peroxisomal membrane anchor protein (Pex14) genes, partial sequence	H3053F10
Mus musculus cyclin ania-6a gene, sequence	H3074C09
Homo sapiens cDNA FLJ20536 fis, clone KAT11223, highly similar to AL050225 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586M1523	H3017D05
Homo sapiens S164 gene, partial cds; PS1 and hypothetical protein genes, complete cds; and S171 gene, partial cds	H3077H02
Cycb1=cyclin B1 [mice, mRNA, 2387 nt]	H3027G03
Homo sapiens clone HH409 unknown mRNA	H3058G08
RIKEN cDNA 6330414G21 gene	H3159G07
Mus musculus nestin (Nes), mRNA	H3040E02
Homo sapiens cDNA FLJ12754 fis, clone NT2RP2001268, highly similar to Homo sapiens mRNA for KIAA0810 protein	H3102F06
Mus domesticus strain MilP mitochondrion genome, complete sequence	H3126C09
Homo sapiens cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kD (CSTF3), mRNA	H3044B06
Mus musculus G two S phase expressed protein 1 (Gtse1), mRNA	H3118F01

涙腺・唾液腺分化・増殖機構の解明に関する研究

分担研究者 斎藤一郎 鶴見大学歯学部教授

研究要旨

前年度にプロラクチンおよびアンドロジェンが涙腺・唾液腺組織の再生を誘導する可能性が示唆されたので、さらにそれらの機能について詳細な解析を行うために p53^{-/-}マウスの涙腺・唾液腺より樹立した細胞株を用いた腺組織の3次元再構築モデルの作成を試みた。p53^{-/-}マウスの唾液腺組織より単一クローンとして3種類の細胞株を樹立した（MS1細胞, MS2細胞, MS3細胞）。in vitroで培養するとMS1細胞およびMS2細胞はいずれも上皮様の形態を示しMS3細胞は線維芽細胞様の形態を示した。ウエスタンブロットではMS1細胞がcytokeratin14陽性、 α -smooth muscle actin陽性、MS2細胞はcytokeratin14陽性、 α -smooth muscle actin陰性、MS3細胞はこれらのいずれの蛋白も陰性であった。これらの細胞株をマトリゲル上で培養するとMS1細胞およびMS2細胞では導管様構造の形成とさらにMS2細胞の一部には分泌細胞への分化が認められMS3細胞は紡錘形細胞の集合よりなる凝集体を形成した。さらに、これらの細胞が三次元的に腺組織を再構築する可能性を検討するために、これらの細胞を単独あるいはマトリゲルとともにヌードマウスの皮下に移植したところMS1細胞およびMS2細胞ではマトリゲルと移植した群にのみ移植後1ヶ月で小腫瘍の形成が認められたがその後大きさに変化は認められなかった。MS3細胞では移植後一ヶ月より腫瘍形成が認められ経時的に大きさの増大を認めた。移植後三ヶ月にそれぞれの腫瘍を採取し組織学的な検索を行った。MS1細胞およびMS2細胞では明らかな導管形成を認めさらにMS2細胞では一部に分泌細胞への分化が認められた。一方MS3細胞では紡錘形の異型細胞の錯綜構造が認められ線維肉腫を形成していた。以上の結果よりMS1細胞およびMS2細胞はマトリゲルとともにヌードマウスの皮下に移植することにより腺組織の3次元再構築モデルとしてプロラクチンやアンドロジェンをはじめとした腺組織の再生を誘導する可能性がある因子の詳細な機能解析に応用が可能と考えられた。

A. 研究目的

涙腺・唾液腺特異的にプロラクチン遺伝子を発現するトランスジェニックラットを解析した結果よりプロラクチンが腺組織の再生を誘導することが示され、さらに *in vitro* での解析によりアンドロジェンが唾液腺の分化を誘導する可能性が示唆された。これらの因子やこれまで明らかにされた涙腺・唾液腺の再生に関連した因子の機能を解析するために本研究では単一遺伝子の欠損で不死化が誘導可能で、比較的正常な機能・形態を備えた不死化涙腺細胞株を p53-/-マウスから樹立することに成功した。樹立した涙腺細胞株は腺組織の再生能を解析する上で有用なモデル細胞と考えられる。本研究では、涙腺・唾液腺の分化増殖機構の解明を行う目的でこれらの樹立された腺細胞株を用いた腺組織を三次元的に再構築する実験モデルを確立する。(本稿では、唾液腺細胞株を用いた *in vitro* における腺組織の再構築モデルについて記載するが、現在、涙腺細胞株についてもモデルの確立を行っている。)

B. 研究方法

1) p53-/-マウス涙腺・唾液腺より細胞株の樹立

p53-/-マウスより涙腺・唾液腺を採取し酵素処理により細胞を分散化した後、serum free keratinocyte mediumにて培養した。得られた唾液腺細胞から限界希釈法を用いて単一クローンを純化した。

2) 樹立した唾液腺細胞株における発現蛋白の解析

樹立した細胞株を培養し、細胞溶解液を加え溶出した蛋白をアクリルアミドゲルにて泳動後ウエスタンブロッ

ト法によりサイトケラチン 14 と α -smooth muscle actin (α -SMA) の発現を検討した。

3) 樹立した唾液腺細胞株における分化能の解析

樹立した細胞株をマトリゲル上で培養した後、形態学的な変化を検討した。また、マトリゲル上で培養した細胞よりRNAを抽出しRT-PCRにより分化マーカーである amylase mRNA の発現解析を行った。

4) 樹立した唾液腺細胞株の *in vivo* における三次元的腺組織の再構築能の解析

樹立した細胞株を単独あるいはマトリゲルとともにヌードマウスの皮下に移植し三ヶ月後に摘出標本を組織学的に検索した。

C. 研究結果

p53-/-マウスの涙腺・唾液腺より樹立した涙腺細胞株および唾液腺細胞株の三次元的に腺組織を再構築する可能性について検討した。本稿ではすでに三次元的に腺組織の構築が認められた唾液腺細胞株を用いたモデルの確立について記載する。

p53-/-マウスの唾液腺組織の培養により得られた細胞を限界希釈して得られたクローンの中から明らかに敷石状構造を示す上皮様細胞株を2クローン (MS1細胞およびMS2細胞) と紡錘形の線維芽細胞様の形体を示す細胞株1クローン (MS3細胞) を選びこれらの細胞の特徴を解析した (図1)。

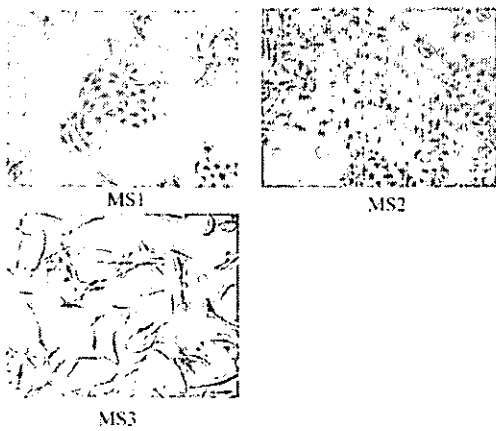


図1 p53^{-/-}マウスより樹立した唾液腺細胞株の組織像

これらの細胞株はウエスタンブロットにより MS1 細胞はサイトケラチン 14 陽性, α -smooth muscle actin 陽性、MS2 細胞はサイトケラチン 14 陽性, α -smooth muscle actin 陰性。MS3 細胞はいずれも陰性であった(図2)。

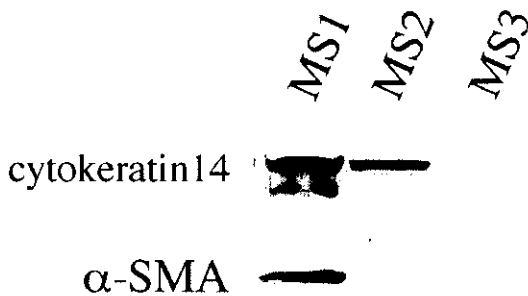


図2 p53^{-/-}マウス唾液腺より樹立した細胞株における発現蛋白の検討(ウエスタンブロット法)

加えて電子顕微鏡を用いて微細構造を解析したところ MS1 細胞および MS2 細胞では上皮様の構造が、一方 MS3 では間葉系由来を示唆する構造が認められた。

また、これまでヒト唾液腺細胞株(HSG)を用いた解析では唾液腺上皮細胞をマトリゲル上で培養することに

より腺房細胞様の分化を誘導することが可能であると報告されていたので、これらの細胞についてもマトリゲル上で培養し分泌細胞への分化能の有無について解析した。マトリゲル上で一週間培養すると MS1 細胞および MS2 細胞では棍棒状の導管様構造の形成がみられ MS2 細胞では部分的に分泌細胞への分化を認めた。MS3 では多数の紡錘形細胞の集合よりなる凝集体を形成するのみで導管様構造や分泌細胞の存在は認められなかった(図3)。

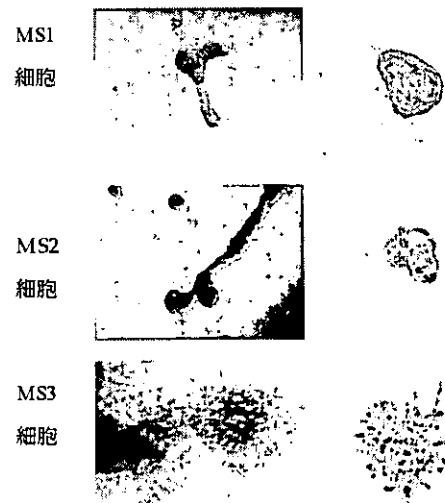


図3 p53^{-/-}マウス唾液腺より樹立された細胞株をマトリゲル上で一週間培養、
左：位相差顕微鏡像、
右：薄切標本のヘマトキシリン・エオジン染色像

次に、これらの細胞が分泌細胞への分化能を有するか否かを検証するためにマトリゲル上で培養した細胞から RNA を抽出し、唾液腺の分化マーカーである amylase の遺伝子発現を RT-PCR により検討したところ、MS1 細胞、MS3 細胞では amylase mRNA

が検出されず MS2 細胞では検出された。従って、MS2 細胞は腺房細胞様の分泌細胞に分化する可能性が示唆された (図4)。

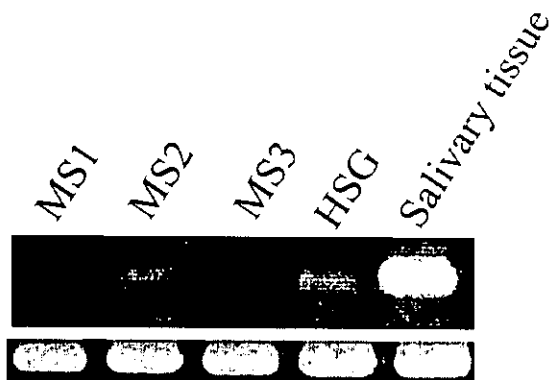


図4 RT-PCR による amylase mRNA の検出
上段: amylase
下段: β -actin

次に、これらの細胞株が *in vivo* において三次元的に唾液腺組織を再構築可能か否かを *in vitro* で検証した。MS1 細胞, MS2 細胞, および MS3 細胞 (2×10^6 個) を PBS ($100 \mu\text{l}$) あるいはマトリゲル ($100 \mu\text{l}$) とともにヌードマウスの皮下組織に移植し腫瘍形成能を有するか否かを検討した。MS1 細胞および MS3 細胞では移植時より小腫瘍の形成が認められたが、それらの大きさは経時的に殆ど変化せず、3ヶ月後に摘出瘤の組織学的検索を行った。摘出標本では残存するマトリゲルの中に明らかな腺腔を有する導管様構造の形成や胞体内に分泌物を有する分泌細胞の存在を認めた (図5 A, B)。一方、MS3 細胞をヌードマウスの皮下組織にマトリゲルとともに移入した群では移植時より認められた小腫瘍は2ヶ月後より明らかな径の増大傾向を示し明らかな腫瘍を形成した (図6 A)。この腫瘍の摘出標本

では大小不同で異型の強い核を有する紡錘形細胞の錯綜が認められ、線維肉腫の像を呈した (図6)。

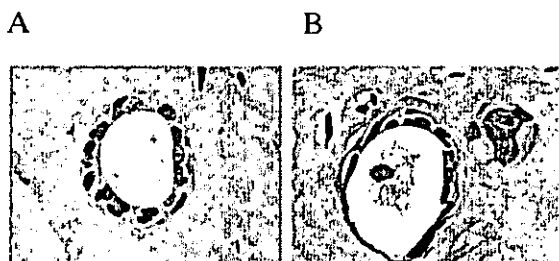


図5 MS1 細胞移植後ヌードマウスに形成された小腫瘍の組織学的検索
A, B: 移植後3ヶ月の摘出標本におけるヘマトキシリン・エオジン染色像

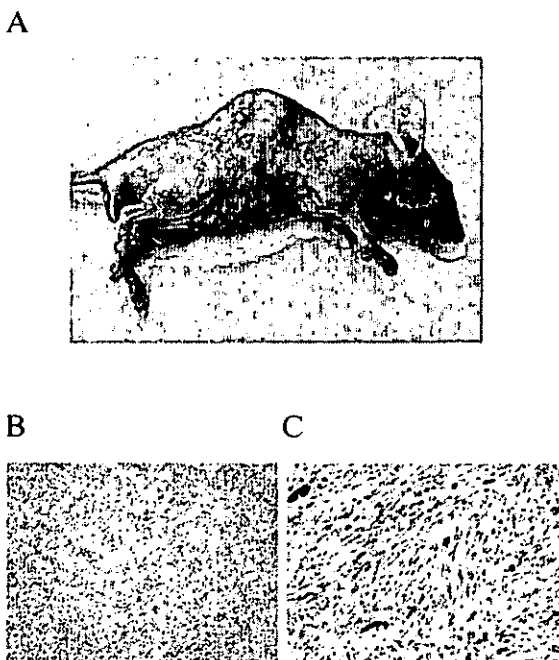


図6 MS3 細胞移植3ヶ月後にヌードマウスに形成された腫瘍の肉眼像および組織像
A: 移植後3ヶ月の肉眼像
B: 摘出標本におけるヘマトキシリン・エオジン染色像

D. 考察

p53-/-マウスから樹立した細胞株はヌードマウスに移植しても癌化し

ないことや、正常機能を有するなどの利点が報告されているが、我々が p53-/-マウスの唾液腺より樹立した MS1 細胞も同様な性格を保持していると考えられる。すなわち MS1 細胞をマトリゲル上で培養すると導管様構造を呈し一部で分泌細胞への分化が認められ、さらに、この細胞を単独でヌードマウスの皮下に移植しても生着しないことより正常の唾液腺細胞に類似した機能を持つと考えられる。加えて、MS1 細胞をマトリゲルとともにヌードマウスに移植することで明らかな腫瘍形成なしにマトリゲル内で長期生着が可能なのは、この細胞とマトリゲルの応用が in vivo で唾液腺組織の 3 次元的再構築の解析にも有用なモデルとなり得ると考えられる。また、マトリゲルはラミニン、4 型コラーゲンなどの細胞外基質と EGF, bFGF, NGF, PDGF などの種々の増殖因子より構成され細胞の足場のみならず増殖因子の徐放体としての役割を呈していることが知られ、マトリゲルに機能を解析したい新規因子を加え、さらに MS1 細胞とともにヌードマウスに移植することにより新規因子における機能解析が in vivo で可能となる。このことは、本モデルがシェーグレン症候群、スチーブン・ジョンソン症候群や口腔癌の放射線照射後に認められる消失した唾液腺組織の治療薬に対するスクリーニングに有用であることを意味している。今後、p53-/-マウスの涙腺より樹立された細胞株に対して同様な解析を行うことにより新たな in vivo モデルの開発を行う予定である。

E. 結論

p53-/-マウスの唾液腺より樹立された MS1 細胞とマトリゲルをヌードマ

ウスの皮下に移植する in vivo モデルは唾液腺の 3 次元的再構築の解析のみならず、唾液腺の再生を誘導する新規因子のスクリーニングにも有用である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nagata Y., Inoue H., Yamada K., Higashiyama H., Kizu Y., Takeda I., Mizuno F., Mishima K., Hayashi Y., Saito I. Activation of Epstein-Barr virus by saliva from Sjogren's syndrome patients. *Immunol.*, in press.

2. 学会発表

美島健二・斎藤一郎. 涙腺・唾液腺再生の試み. 第 8 回シェーグレン症候群市川セミナー. 2003/4.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2002-313579

「プロラクチンを含む外分泌腺組織からの分泌促進剤およびプロラクチン遺伝子が導入されたトランスジェニック動物」

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, 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	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
Goto E , Endo K, Suzuki A, Fujikura Y, Matsumoto Y, Tsubota K	Tear evaporation dynamics in normal subjects and subjects with obstructive meibomian gland dysfunction	Invest Ophthalmol Vis Sci	44	533-539	2003
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
Goto E, Dogru M, Kojima T, Tsubota K	Computer-synthesis of an interference color chart of human tear lipid layer by a colorimetric approach	Invest Ophthalmol Vis Sci	44	4693 - 4697	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

20030826

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。