

A. 研究目的

涙腺・唾液腺組織における幹細胞の局在とその表面マーカーを明らかにする目的で本研究では当該腺組織における幹細胞の同定を試みた。すなわち、これまで造血幹細胞、表皮幹細胞などをはじめとした種々の組織において幹細胞は slow cycling cell として知られ、BrdU を応用することにより同定することが可能と考えられている。すなわち生後3日齢のマウスに BrdU を3日間連続投与した後に10週後に BrdU を保持している細胞は BrdU が細胞分裂により希釈されることから slow cycling cell であり、これらの細胞は幹細胞としての性格を保持していると考えられる。我々は当該腺組織における幹細胞を同定すべく本法の応用を試みた。加えて幹細胞を多数含むと考えられている side population cell (SP 細胞) に特異的な因子として同定されたクラステリンが当該腺組織における幹細胞のマーカーとして応用可能か否かを検討した。

B. 研究方法

1. マウス涙腺・唾液腺組織における幹細胞の同定

これまで BrdU 長期保持細胞が slow cycling cell であり幹細胞の可能性が高いことが報告されてきたので当該腺組織においても slow cycling cell を同定し、これらの細胞におけるクラステリンの発現を検討した。すなわち、生後3日齢のマウスに3日間、1日2回 50 μ g BrdU を皮下注射し10週後に当該腺組織を摘出し O. C. T. compound に包埋した。さらに、クリオスタットを用いて4 μ m の薄切切

片を作製しマウスモノクローナル抗 BrdU 抗体(Roche)を用いて BrdU 陽性細胞を免疫組織化学的に検出した。

2. BrdU 陽性細胞におけるクラステリン発現の検出

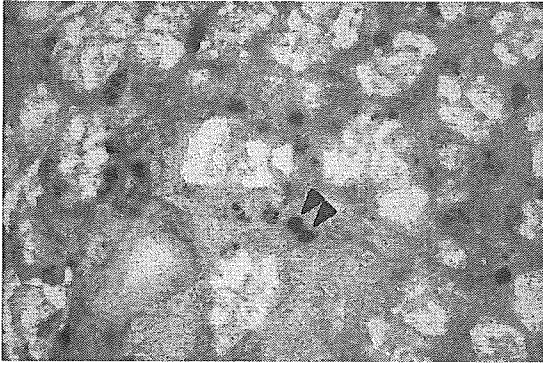
移入組織の薄切切片をもちいて FITC 標識マウスモノクローナル抗 BrdU 抗体(Roche)と PE 標識ヤギポリクローナル抗クラステリン抗体を用いた2重染色により検出した。

(倫理面への配慮)

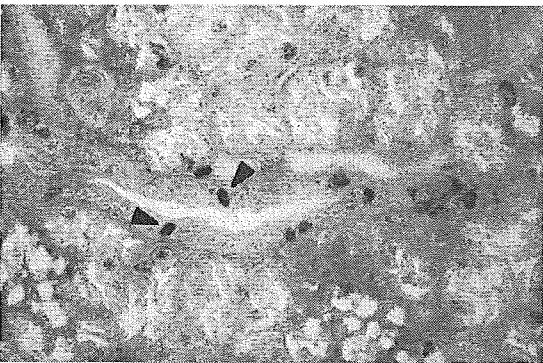
本研究では事前に実験手技、倫理面での対応などに関する承認を本学動物実験委員会から得ており、動物の飼育ならびに屠殺にあたっては動物への苦痛を極力避けるよう厳重に配慮した。

C. 研究結果

BrdU 陽性細胞すなわち slow cycling cell の分布は導管上皮が主体で一部、腺房細胞にも分布していた。一方、クラステリン陽性細胞の分布も同様であったが BrdU 陽性、クラステリン陽性の double positive cell は一部であった。



涙腺組織における BrdU 陽性細胞の局在 (LSAB 法、DAB 発色)



唾液腺組織における BrdU 陽性細胞の局在 (LSAB 法、DAB 発色)

D. 考察

涙腺・唾液腺幹細胞のマーカとしてクラステリンが候補因子として検討されたが、クラステリン陽性細胞が、これまでの報告で幹細胞とされていた slow cycling cell と必ずしも一致しなかったことより確定は不可能であった。しかしながら、最近になり乳腺において幹細胞の大部分は cycling cell であるという報告もなされ、今後 BrdU 長期保持細胞つまり slow cycling cell が幹細胞である可能性を明らかにする必要があると考えられる。すなわち、これらの細胞を単離しヌードマウスの腎被膜下組織に移入することにより多分化能を

検証する。このことにより当該腺組織における幹細胞の同定が可能となれば幹細胞の表面マーカが明らかとなり当該腺組織における幹細胞の純化に応用が可能となる。加えて、これらの検討によりクラステリンが幹細胞に特異的な因子である可能性についても検討を進める。

E. 結論

涙腺・唾液腺組織に幹細胞の可能性が示唆されている slow cycling cell の存在が確認された。今後これらの細胞の性状を詳細に検討することにより当該腺組織における幹細胞マーカの同定が可能となると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 後藤英樹. ドライアイ診断と治療の最近の進歩. 第 14 回日本シェーグレン症候群研究会, 2005.

(2) 後藤英樹. 重症マイボーム腺機能不全の治療—日本角膜学会シンポジウム難治性角膜疾患への挑戦. 第 59 回臨床眼科学会, 2005.

(3) 後藤英樹, 内田敦郎, 内野美樹, 村戸ドール, 小川葉子, 山本祐介, 小川由佳子, 深川和己, 坪田一男. ドライアイ患者における干渉デバイスを用いた非侵襲的メニスカス

高測定, 第30回角膜カンファレンス, 2006.

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

3) その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

涙腺・唾液腺 SP 細胞特異的発現因子の機能解析

分担研究者 齋藤一郎 鶴見大学歯学部教授

研究要旨

これまで我々は涙腺・唾液腺において多数の stem cell を含む分画として知られる side population cell (SP 細胞) に特異的に発現する複数の遺伝子を明らかにした。加えて特定された遺伝子の機能を解析する目的で、これらの遺伝子をマウス胎児線維芽細胞株 (STO 細胞) に導入し導入遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立した。その結果、クラステリンを恒常的に発現する STO 細胞 (STOclu) において mock STO と比較して酸化ストレスに対する抵抗性が上昇していた。すなわち、STOclu と mock STO に H_2O_2 刺激を加え刺激 24 時間後に生細胞数を計測するとともに細胞内で産生される活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 量を解析した。その結果 STOclu では mock STO と比較して H_2O_2 刺激による細胞死が抑制され、かつ細胞内の ROS 量も減少していた。また、クラステリンには細胞質型と分泌型の 2 種類存在することが知られており液性因子としてのクラステリンの機能を解析するために STOclu と mock STO の培養上清を STO 細胞に添加した後に H_2O_2 刺激による細胞内の ROS 量を測定した結果、STOclu の培養上清を添加した STO 細胞では細胞内 ROS 量の減少が認められた。したがって、これらの結果から、SP 細胞はクラステリンなどの細胞保護因子を分泌し移入した組織の機能回復に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

難治性疾患に対する根治療法の開発は極めて重要な課題と考えられる。その一つの試みとして、組織の再生を誘導することにより失われた機能を回復する再生医療の応用が想定される。この見地から、これまで臨床応用を目指した種々の試みが行われている。例えば糖尿病やパーキンソン病などの疾患モデル動物の治療に胚性幹細胞(ES細胞)や骨髄間葉系幹細胞などを用いた組織再生の応用が検討されている。これらの治療法は今まで根治療法がなかった疾患に対する新たな治療法となりうると考えられる。スティーブン・ジョンソン症候群やシェーグレン症候群もこれらの疾患の一つで、これらの患者にみられる重篤な涙液・唾液の分泌不全に対する治療法として組織幹細胞を用いた細胞治療の応用が考えられる。これまでの検討により多数の組織幹細胞を含む分画として知られる side population cell (SP細胞)を用いた細胞治療が放射線により誘導した涙液・唾液分泌障害を呈するモデルマウスの治療法として奏効することが明らかになった。しかしながら、移入した SP 細胞による組織再構築像は認められないことより SP 細胞により分泌された液性因子が障害された組織の機能回復に関与している可能性が示唆された。

本研究の目的は SP 細胞特異的に発現する遺伝子の機能を解析することにより SP 細胞から分泌されることにより残存腺組織の細胞保護因子として機能する候補因子を明らかにすることにある。

B. 研究方法

1. クラステリン全長 cDNA の増幅

マウス顎下腺より採取した RNA を鋳型として RT-PCR によりクラステリン全長 cDNA を増幅した。

2. 遺伝子発現ベクターの構築

得られたクラステリン全長 cDNA を mammalian expression vector である pCAGS-puro (理研の丹羽博士より御供与) に挿入し大腸菌で大量培養した後 plasmid を精製した。また、導入遺伝子を挿入していない empty vector も作製した。

3. クラステリン遺伝子発現安定細胞株の樹立

精製した pCAGS-puro をリポフェクタミン 2000 (Invitrogen) によりマウスの胎児線維芽細胞株 (STO) に遺伝子導入し、さらに puromycin による薬剤選択 2 週間後、安定細胞株を採取した (STOclu)。

4. 樹立した STOclu 細胞を用いたクラステリン遺伝子の機能解析

造血幹細胞における自己複製能の維持には ATM を介した酸化ストレスの除去機構の存在が報告されている。したがって、SP 細胞特異的因子として同定されたクラステリンが酸化ストレスを抑制する可能性が考えられたので *in vitro* でその可能性を検証した。

(1) H₂O₂ 刺激後の生細胞数の計測

STOclu 細胞および mock STO 細胞を種々の濃度の H₂O₂ で刺激した 24 時間後に trypan blue 染色による生細胞数を計測した。

(2) H₂O₂ 刺激後の細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 量の測定

細胞内の ROS 量を蛍光色素である 100nM の CM-H₂DCFDA 染色後 FACS により解析した。CM-H₂DCFDA は蛍光色素の一つで ROS などによる酸化を受けると分子内のエステル結合が切断され異なる波長の蛍光を発する。この原

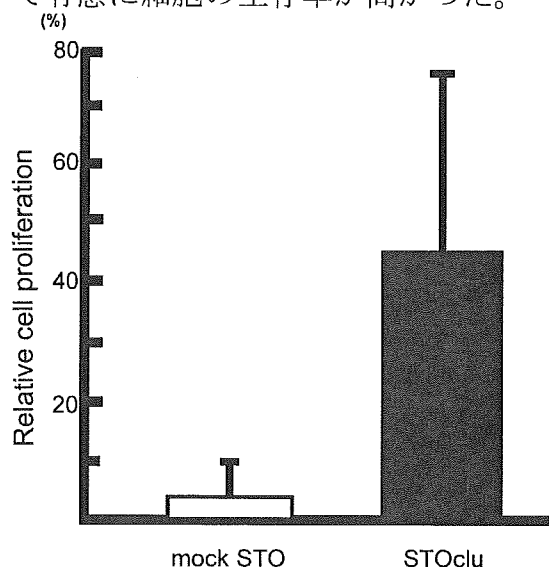
理を利用して細胞内の ROS 量を FACS により測定することが可能である。

(倫理面への配慮)

本研究では事前に実験手技、倫理面での対応などに関する承認を本学動物実験委員会から得ており、動物の飼育ならびに屠殺にあたっては動物への苦痛を極力避けるよう厳重に配慮した。

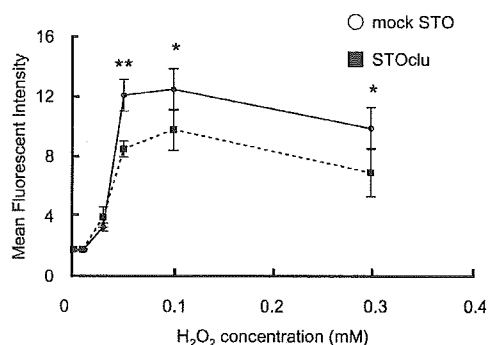
C. 研究結果

STOclu を用いた解析によりクラステリンが細胞障害抑制作用を有することが明らかとなった。すなわち、STOclu および mock STO を種々の濃度の H_2O_2 で刺激した 24 時間後に trypan blue 染色による生細胞数を計測した結果、STOclu では mock STO と比較して有意に細胞の生存率が高かった。



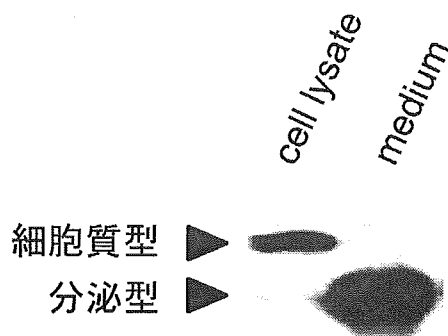
H_2O_2 刺激 24 時間後における細胞生存率

さらに、細胞内で産生される ROS 量を蛍光色素である 100nM の CM- H_2 DCFDA 染色後 FACS により解析した結果、STOclu では mock STO と比較して有意に ROS 量の減少が認められた。



H_2O_2 添加後 ROS 量の測定

次にクラステリンには細胞質型と分泌型の 2 種類存在することが知られており液性因子としてのクラステリンの機能を解析するために STOclu と mock STO の培養上清を STO 細胞に添加した後に H_2O_2 刺激による細胞内の ROS 量を測定した結果、STOclu の培養上清を添加した STO 細胞で細胞内 ROS 産生の抑制が認められた。



STOclu でみられる 2 種類のクラステリン

D. 考察

本研究では SP 細胞特異的に発現する遺伝子の一つが種々の疾患の原因として報告されている酸化ストレスによる細胞障害を抑制することは重要である。加えて、生体の恒常性維持に必要な幹細胞はミトコンドリア

で常時産生されている酸化ストレスに常に暴露されており、このようなストレスを抑制するためにクラスレリンなどの酸化ストレス抑制因子を有している可能性が考えられる。また、このような因子は創薬の標的分子としても興味深く今後さらに組織幹細胞の性格を解析することにより新たな機能を有する因子の発見につながる可能性が考えられた。

E. 結論

本研究において涙液・唾液分泌障害マウスを用いた治療実験の結果 SP細胞を用いた細胞治療が分泌能の回復に参与したことはヒト疾患においても細胞治療が奏効する可能性を示唆している。加えて、細胞治療の有効性は移入細胞による組織の再構築を介したもののみならず移入細胞の分泌する液性因子の機能による可能性が示されたことは意義がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Migishima, R.S., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H and Mizushima, N. :
Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, (in press).
- (2) Ishimaru, N., Arakaki, R., Omotehara, F., Yamada, K.,

Mishima, K., Saito, I., and Hayashi, Y. : A Novel Role of RbAp48 for Tissue-specific Apoptosis in the Exocrine Glands Depending on Estrogen Deficiency. *Mol. Cell. Biol.*, (in press)

2. 学会発表

美島健二, 坪田一男, 千葉 寛, 山田耕一, 井上裕子, 斎藤一郎 Side population 細胞特異的発現遺伝子の機能解析 第 5 回日本再生医療学会, 2006

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

3) その他

なし

別紙 4

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 |
|---|---|---------------------|-----------------------------|--------|------|
| Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Migishima, RS., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H and Mizushima, N. | Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. | Nature | in press | | |
| Ishimaru, N., Arakaki, R., Omotehara, F., Yamada, K., Mishima, K., Saito, I., and Hayashi, Y. | A Novel Role of RbAp48 for Tissue-specific Apoptosis in the Exocrine Glands Depending on Estrogen Deficiency. | Mol. Cell. Biol. | in press | | |
| Higuchi A, Shimmura S, Takeuchi, T, Suematsu, M, Tsubota, K. | Elucidation of apoptosis induced by serum deprivation in cultured conjunctival epithelial cells. | Br J Ophthalmol. | (Epub ahead of print) | | |
| Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K. | Laboratory findings in tear fluid analysis. | Clin Chim Acta. | (Epub ahead of print) | | |
| Onguchi T, Dogru M, Okada N, Kato NA, Tanaka M, Takano Y, Fukagawa K, Shimazaki J, Tsubota K, Fujishima H. | The impact of the onset time of atopic keratoconjunctivitis on the tear function and ocular surface findings. | Am J Ophthalmol. | 141(3) | 569-71 | 2006 |
| Kawaguchi N, Inoue M, Sugimura E, Shinoda K, Tsubota K. | Subjective visual sensation during vitrectomy under retrobulbar anesthesia. | Am J Ophthalmol. | 141(2) | 407-9 | 2006 |
| Kojima T, Dogru M, Ishida R, Goto E, Matsumoto Y, Tsubota K. | Clinical evaluation of the Smart Plug in the treatment of dry eyes. | Am J Ophthalmol. | 141(2) | 386-8 | 2006 |
| Shimmura S, Tsubota K. | Deep lamellar keratoplasty. | Am J Ophthalmol. | 141(2) | 352-3. | 2006 |

| | | | | | |
|---|--|----------------------------|--------|----------|------|
| Noda-Tsuruya T, Asano-Kato N, Toda I, Tsubota K. | Autologous serum eye drops for dry eye after LASIK. | J Refract Surg. | 22(1) | 61-6. | 2006 |
| Izumi K, Kurosaka D, Iwata T, Oguchi Y, Tanaka Y, Mashima Y, Tsubota K. | Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in corneal fibroblasts during corneal wound healing. | Invest Ophthalmol Vis Sci. | 47(2) | 591-8. | 2006 |
| Shimazaki J, Konomi K, Shimmura S, Tsubota K. | Ocular surface reconstruction for thermal burns caused by fireworks. | Cornea. | 25(2) | 139-45 | 2006 |
| Asano-Kato N, Toda I, Sakai C, Hori-Komai Y, Takano Y, Dogru M, Tsubota K. | Pupil decentration and iris tilting detected by Orbscan: anatomic variations among healthy subjects and influence on outcomes of laser refractive surgeries. | J Cataract Refract Surg. | 31(10) | 1938-42. | 2005 |
| Hida RY, Nishiwaki-Dantas MC, Hida MM, Tsubota K. | [Quantitative tear study using the red phenol test in the Brazilian population] | Arq Bras Oftalmol. | 68(4) | 433-7. | 2005 |
| Asano-Kato N, Fukagawa K, Okada N, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H.. | Tryptase increases proliferative activity of human conjunctival fibroblasts through protease-activated receptor-2. | Invest Ophthalmol Vis Sci. | 46(12) | 4622-6 | 2005 |
| Okada N, Fukagawa K, Takano Y, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H. | The implications of the upregulation of ICAM-1/VCAM-1 expression of corneal fibroblasts on the pathogenesis of allergic keratopathy. | Invest Ophthalmol Vis Sci. | 46(12) | 4512-8 | 2005 |
| Dogru M, Asano-Kato N, Tanaka M, Igarashi A, Shimmura S, Shimazaki J, Okada N, Takano Y, Fukagawa K, Tsubota K, Fujishima H.. | Ocular surface and MUC5AC alterations in atopic patients with corneal shield ulcers. | Curr Eye Res. | 30(10) | 897-908 | 2005 |
| Shimmura S, Omoto M, Den S, Bissen-Miyajima H, Tsubota K, Shimazaki J. | Microkeratome-assisted phacoemulsification. | J Cataract Refract Surg. | 31(9) | 1699-701 | 2005 |

| | | | | | |
|---|--|-------------------------------------|---------|---------|------|
| Noda K, Ishida S, Shinoda H, Koto T, Aoki T, Tsubota K, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E. | Hypoxia induces the expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in retinal glial cells. | Invest Ophthalmol Vis Sci. | 46(10) | 3817-24 | 2005 |
| Dogru M, Stern ME, Smith JA, Foulks GN, Lemp MA, Tsubota K. | Changing trends in the definition and diagnosis of dry eyes. | Am J Ophthalmol. | 140(3) | 507-8. | 2005 |
| Hida RY, Ohashi Y, Takano Y, Dogru M, Goto E, Fujishima H, Saito I, Saito K, Fukase Y, Tsubota K. | Elevated levels of human alpha -defensin in tears of patients with allergic conjunctival disease complicated by corneal lesions: detection by SELDI ProteinChip system and quantification. | Curr Eye Res. | 30(9) | 723-30 | 2005 |
| Inoue M, Shinoda K, Ishida S, Uchida A, Kurosaka D, Katsura H, Tsubota K. | Intraocular lens implantation after atopic cataract surgery decreases incidence of postoperative retinal detachment. | Ophthalmology. | 112(10) | 1719-24 | 2005 |
| Dogru M, Tsubota K. | Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. | Am J Ophthalmol. | 140(2) | 305-6 | 2005 |
| Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Shimazaki J, Tsubota K. | Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. | Exp Eye Res. | 81(2) | 218-23 | 2005 |
| Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato N, Uchino Y, Kato M, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. | Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. | J Biomed Mater Res B Appl Biomater. | 76(1) | 56-63. | 2006 |
| Nagai N, Oike Y, Noda K, Urano T, Kubota Y, Ozawa Y, Shinoda H, Koto T, Shinoda K, Inoue M, Tsubota K, Yamashiro K, Suda T, Ishida S. | Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking the angiotensin II type 1 receptor. | Invest Ophthalmol Vis Sci. | 46(8) | 2925-31 | 2005 |
| Dogru M, Tsubota K. | Current concepts in ocular surface reconstruction. | Semin Ophthalmol. | 20(2) | 75-93 | 2005 |

| | | | | | |
|--|--|-----------------------------------|---------|----------|------|
| Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Fujishima H, Tsubota K. | Successful topical application of a new antifungal agent, micafungin, in the treatment of refractory fungal corneal ulcers: report of three cases and literature review. | Cornea. | 24(6) | 748-53 | 2005 |
| Shiraishi K, Tszaka K, Yoshimoto K, Kumazawa C, Nozaki K, Abe T, Tsubota K, Takeuchi T. | Critical role of the fifth domain of E-cadherin for heterophilic adhesion with alpha E beta 7, but not for homophilic adhesion. | J Immunol. | 175(2) | 1014-21 | 2005 |
| Asano-Kato N, Toda I, Hori-Komai Y, Sakai C, Fukumoto T, Arai H, Dogru M, Takano Y, Tsubota K. | Experience with the Artisan phakic intraocular lens in Asian eyes. | J Cataract Refract Surg. | 31(5) | 910-5 | 2005 |
| Dogru M, Honda R, Omoto M, Toda I, Fujishima H, Arai H, Matsuyama M, Nishijima S, Hida Y, Yagi Y, Tsubota K. | Early visual results with the ICU accommodating intraocular lens. | J Cataract Refract Surg. | (5) | 895-902 | 2005 |
| Miyake-Kashima M, Dogru M, Nojima T, Murase M, Matsumoto Y, Tsubota K. | The effect of antireflection film use on blink rate and asthenopic symptoms during visual display terminal work. | Cornea. | 24(5) | 567-70 | 2005 |
| Kamoi M, Mashima Y, Kawashima M, Tsubota K. | Electrolysis for corneal opacities in a young patient with superficial variant of granular corneal dystrophy (Reis-Bucklers corneal dystrophy). | Am J Ophthalmol. | 139(6) | 1139-40. | 2005 |
| Okuda A, Inoue M, Shinoda K, Tsubota K. | Massive bilateral vitreoretinal hemorrhage in patient with chronic refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. | Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. | 243(11) | 1190-3 | 2005 |
| Takahashi Y, Igaki M, Suzuki A, Takahashi G, Dogru M, Tsubota K. | The effect of periocular warming on accommodation. | Ophthalmology. | 112(6) | 1113-8 | 2005 |

| | | | | | |
|--|---|----------------------------|-------|--------|------|
| Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. | Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. | Invest Ophthalmol Vis Sci. | 46(5) | 1653-8 | 2005 |
| Matsumoto Y, Dogru M, Tsubota K. | Ocular surface findings in Hallopeau-Siemens subtype of dystrophic epidermolysis bullosa: report of a case and literature review. | Cornea. | 24(4) | 474-9. | 2005 |
| Asano-Kato N, Fukagawa K, Okada N, Kawakita T, Takano Y, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H. | TGF-beta1, IL-1beta, and Th2 cytokines stimulate vascular endothelial growth factor production from conjunctival fibroblasts. | Exp Eye Res. | 80(4) | 555-60 | 2005 |