

200731044A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

難治性疾患による涙腺の障害に対する  
新規治療法の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 坪田 一男

平成20 (2008) 年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

難治性疾患による涙腺の障害 に対する新規治療法の開発	-----2
坪田一男	

## II. 分担研究報告

1. 組み換えクラステリン蛋白の機能解析	-----9
後藤英樹	

2. SP細胞の機能解析	-----13
斎藤一郎	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----18
---------------------	---------

IV. 研究成果の刊行物・別冊	-----19
-----------------	---------

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

難治性疾患による涙腺の障害に対する新規治療法の開発  
主任研究者 坪田一男 慶應義塾大学医学部眼科学教室教授

研究要旨

前年度までの検討で放射線照射により損傷を与えた涙腺・唾液腺局所に、当該腺組織から採取したSP細胞を移入した結果、分泌量の回復が認められたものの、再生結節の形成は認められなかった。したがって、これらの腺組織におけるSP細胞は幹細胞活性の1つである腺組織再構築能を有しては無く、幹細胞の濃縮された分画とは異なる可能性が示唆された。そこでSP細胞分画に含まれる幹細胞の割合を明らかにした。すなわち、幹細胞は生体内では静止期の細胞であり、BrdU長期保持細胞（LRC）として検出することが可能である。その結果、涙腺・唾液腺のSP細胞におけるLRCの割合は、それぞれ4.0%、4.7%であり、一方、non-SP細胞では、それぞれ6.9%、2.4%で両者に差が認められなかった。また、当該腺組織におけるBrdU陽性細胞とクラスτεリン陽性細胞の局在を検討した結果、それらの局在は異なることが明らかとなった。これらのことより、当該腺組織のSP細胞分画は必ずしも幹細胞の濃縮された分画とは考えられなかった。次いで、当該腺組織のSP細胞から分泌されたクラスτεリンが、残存腺組織の分泌能の回復に働いている可能性を、より直接的に証明するために1) SP細胞を移入した腺組織においてクラスτεリン遺伝子発現が上昇していること、2) クラスτεリン遺伝子を強発現したSP細胞では治療効果が増加すること3) クラスτεリン遺伝子の発現を抑制あるいは欠失したSP細胞では治療効果が抑制あるいは認められないことを示す必要があると考えられた。これらのことを検証する目的で、まず、SP細胞を移入した腺組織においてクラスτεリン遺伝子の発現を検討した。その結果、SP細胞を移入した涙腺・唾液腺においてクラスτεリン遺伝子発現が有意に上昇していることが確認された。次に、クラスτεリン遺伝子あるいはクラスτεリンの発現を抑制するshRNAを発現する組み換えアデノウイルスを作製した。組み換えアデノウイルスは唾液腺上皮細胞への感染効率は極めて高かったが細胞障害性が強く、SP細胞への遺伝子導入には適していないと考えられた。そこで、アデノウイルスを用いた導入法と比較して、比較的細胞障害性が低く持続的発現が期待できるレンチウイルスを用いた導入法を再検討し、新たにクラスτεリン遺伝子あるいはshRNAを発現する組み換えレンチウイルスを作製した。作製したウイルスを感染したSP細胞の治療効果について検討中である。さらに、クラスτεリンヘテロ欠損マウス（米国Jackson Laboratory）を購入し、現在ホモマウスを作出中であり、ホモマウスから採取したSP細胞における治療効果も検討する予定である。また、electron spin resonance（ESR）法により、バキュロウイルス-昆虫細胞系により作製した組み換えクラスτεリン蛋白にスーパーオキシドおよびヒドロキシラジカルのスカベンジ能が認められた。したがって、これまでの結果からクラスτεリンが細胞障害に対して防御的に働く可能性が明らかになったのでクラスτεリン蛋白を用いた *in vivo* 治療実験を行った。すなわち、UV照射によるラットの角膜障害モデルを作製し、点眼による治療実験を行った結果、クラスτεリン蛋白点眼群ではBSA点眼群と比較して角膜障害の抑制傾向が認められた。また、放射線照射により涙液・唾液分泌障害を誘導したマウスの当該腺組織局所にクラスτεリン蛋白を浸潤したアテロコラーゲンとコントロールとしてアテロコラーゲン単独で移入した。移入後、涙液・唾液量を測定した結果両群において分泌量に差が認められなかった。しかしながら、移入3週間後では徐放化されているクラスτεリン蛋白質が検出されなかったため、注入時期あるいは徐放化剤の再検討を行い、治療効果の有無を検証する必要があると考えられた。

分担研究者

後藤英樹 鶴見大学歯学部准教授

斎藤一郎 鶴見大学歯学部教授

A. 研究目的

難治性疾患であるスティーブンス・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障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。これまでの検討により、SP細胞を用いた細胞治療が涙液分泌障害の治療法として奏効する可能性が明らかとなり、加えて、SP細胞に高い発現を示すクラステリンが活性酸素種による細胞障害を抑制することが示された。本研究ではクラステリンの臨床応用の可能性について検討している。

B. 研究方法

1) 涙腺・唾液腺組織から採取したSP細胞における幹細胞活性の検討

(1) マウス涙腺・唾液腺組織におけるBrdU長期保持細胞 (LRC) の検出

生後3日齢のC57BL/6マウスの背部皮下に3日間連続で1日2回50 $\mu$ g/gのBrdUを投与した。投与10週後に当該腺組織を摘出後、摘出した組織からSP細胞およびnon-SP細胞を単離し、そのサイトスピン標本作製し、免疫組織学的にBrdU陽性細胞を検出した。

(2) マウス涙腺・唾液腺組織のLRCにおけるSP細胞特異的因子であるクラステリン発現の検討

生後3日齢のマウスに3日間、1日2回50 $\mu$ g/g BrdUを背部皮下注射し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 $\mu$ mの薄切切片を作製し、FITC標識抗BrdUマウスモノクローナル抗体(Roche)とPE標識抗クラステリンヤギポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法を施行した。

2) クラステリンを介したSP細胞の治療効果を検証

(1) SP細胞移入腺組織におけるクラステリン遺伝子発現の検討

マウス涙腺・唾液腺からSP細胞(1 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞)をそれぞれ採取し、放射線照射した当該腺組織に移入した。移入後、4週にマウスから涙腺・唾液腺を採取し、real-time-PCRによりクラステリン遺伝子の発現量を比較した。

(2) クラステリン発現を制御したSP細胞における治療効果の検討

① 遺伝子導入法の検討

(i) 組み換えアデノウイルスの使用

a. クラステリン発現アデノウイルスの作製  
Adenovirus Vector Kit(Takara)を用いてクラステリン発現組み換えアデノウイルス(Ad-Clu)を作製した。

b. クラステリン標的shRNAを発現した組み換えアデノウイルスの作製

Knockout RNAi SystemおよびAdeno-X Expression System 1(いずれもClontech)を用いてマウスクラステリンに特異的なshRNA発現アデノウイルス(Ad-shRNA-clu)とコントロールとしてスクランブルRNA発現アデノウイルス(Ad-shRNA-scr)を作製した。作製したアデノウイルスのクラステリン発現抑制を検討するため、クラステリンを恒常的に発現しているSTO細胞株(STOClu)に感染し、感染48時間後にクラステリン遺伝子発現をRT-PCRにより検討した。

c. 組み換えアデノウイルスの感染効率の検討  
理研から購入したLacZ遺伝子を発現する組み換えアデノウイルスを、ソーティング後のMP細胞(non-SP細胞)に浮遊状態で37 $^{\circ}$ C、1時間感染後、組織培養用dishに播種し、48時間後に $\beta$ -galactosidase染色により感染効率を検討した。

(ii) 組み換えレンチウイルスの使用

a. クラステリン遺伝子発現組み換えレンチウイルスの作製

クラステリンORF全長配列を挿入した組み換えウイルスゲノム発現プラスミド(GFP配列を有する)とパッケージングプラスミド(gag, poly, env, rev)を293T細胞に同時にトランスフェクションし、48時間後に培養上清を回収した。さらに、培養上清をCentriprep ultracel(YM-50)で濃縮し作製されたウイルスを回収した。

b. クラステリン標的shRNAを発現する組み

### 換えレンチウイルスの作製

shRNAの標的領域としてクラスτεリンORFの4カ所を選択し、選択した領域に対するshRNAを発現する組み換えウイルスゲノム発現プラスミド(GFP配列を有する)とscramble配列をそれぞれ発現するパッケージングプラスミド(gag, poly, env, rev)を293T細胞に同時にトランスフェクションし、48時間後に培養上清を回収した。さらに、培養上清をCentriprep ultracel(YM-50)で濃縮し作製されたウイルスを回収した。作製されたレンチウイルスをSTOC1uに感染し、感染48時間後にクラスτεリン発現をRT-PCRにより検討した。

### (3) クラスτεリン遺伝子を欠失したSP細胞の移入実験

クラスτεリン遺伝子を欠失したSP細胞の移入実験では治療効果が認められないことを示す目的で、クラクラスτεリンヘテロ欠損マウス(米国Jackson Laboratory)を購入し、現在ホモマウスを作出中である。今後ホモマウスから採取したSP細胞における治療効果を検討する予定である。

### 3) 組み換えクラスτεリン蛋白を用いた治療実験

#### (1) 作製した組み換えクラスτεリン蛋白のラジカルスカベンジ能の評価

バキュロウイルス昆虫細胞系を用いてクラスτεリン組み換え蛋白を作製し、作製したクラスτεリン蛋白にラジカルスカベンジ能が認められるか否かをelectron spin resonance (ESR) 法により検証した。

#### (2) *in vivo* におけるクラスτεリン蛋白の機能解析

*in vitro*における解析により、クラスτεリン蛋白が活性酸素種を介した細胞障害を抑制する機能を有することが明らかとなったので、*in vivo*におけるその治療効果を検証する目的で、ラット角膜障害モデルおよびマウスの放射線照射涙液・唾液分泌障害モデルを用いた治療実験を行った。

#### ① ラット角膜障害モデルを用いた治療実験

8週齢の雄性SDラットの両眼にUV-B, 125mJ/cm<sup>2</sup>の線量を照射し、100μg/mlのクラスτεリン蛋白およびコントロールとしてBSAを6回/日でそれぞれ点眼した。照射48時

間後にフルオレセイン染色後、実態顕微鏡により角膜表面を観察し損傷の程度を評価した。

#### ② マウスの放射線照射涙液・唾液分泌障害モデルを用いた治療実験

6週齢の雄性C57BL/6マウス眼窩外涙腺あるいは唾液腺にアテロコラーゲンとクラスτεリン蛋白の混合液を放射線照射前日に注入後(涙腺; 2μg/mouse唾液腺; 9μg/mouse) 15Gyの放射線を照射し当該腺組織に分泌障害を誘導した。

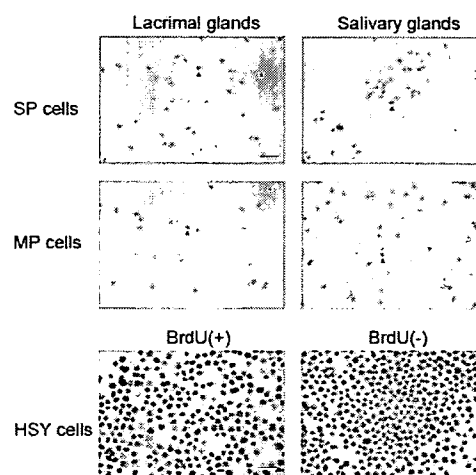
#### (倫理面への配慮)

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。また、本実験は「バイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」に基づく文部科学省の法制化された規定に基づき実施された。また、組み換え実験に関しては、本学組み換え実験委員会の承認後施行された。

### C. 研究結果

#### 1) 当該腺組織由来SP細胞における幹細胞活性の評価

当該腺組織から採取されたSP細胞およびnon-SP細胞のサイトスピン標本における免疫組織化学の結果(下図)では、

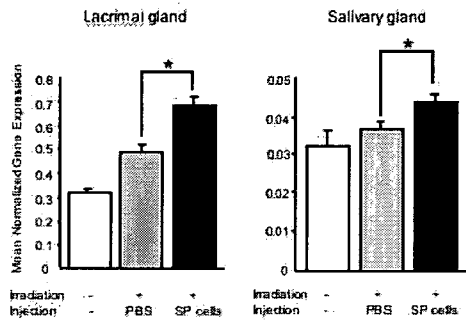


免疫組織化学によるSP細胞およびMP細胞におけるBrdU陽性細胞の検出

涙腺・唾液腺のSP細胞におけるLRCの割合は、それぞれ4.0%、4.7%であり、一方non-SP細胞では、それぞれ6.9%、2.4%で両者に差が認められなかった。加えて、BrdU投与マウスの当該腺組織においても、SP細胞特異的な発現因子であるクラステリン陽性かつBrdU陽性のdouble positive cellはごく少数であった。以上の結果から、SP細胞は必ずしも幹細胞の濃縮された分画とは考えられず、Bcrp1陽性でかつクラステリン陽性細胞を多数含む細胞集団と考えられた。

## 2) クラステリン発現を制御したSP細胞における治療効果の検討

(1) 射線照射した涙腺・唾液腺組織にSP細胞を移入し、3週後にクラステリン遺伝子発現量を比較検討したところ、移入腺組織において有意に、その発現量の増加が認められた(下図)。



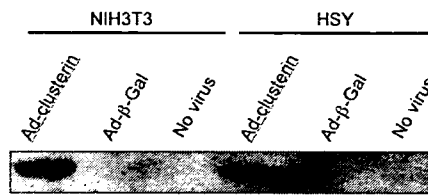
## SP細胞移入後のクラステリン遺伝子発現の検討

### (2) 遺伝子導入法の検討

#### (i) 組み換えアデノウイルスの使用

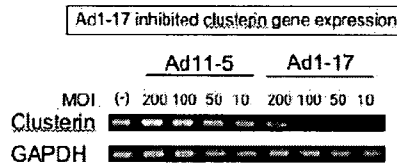
##### a. クラステリン発現アデノウイルスの作製

Adenovirus Vector Kit (Takara) を用いてクラステリン発現組み換えアデノウイルス (Ad-Clu) を作製した。作製したウイルスを50MOIでNIH3T3および唾液腺上皮細胞株であるHSY細胞に感染し抗クラステリン、ヤギポリクロナール抗体を用いてクラステリン蛋白発現を検討した結果、クラステリン蛋白の存在が確認された(下図)。



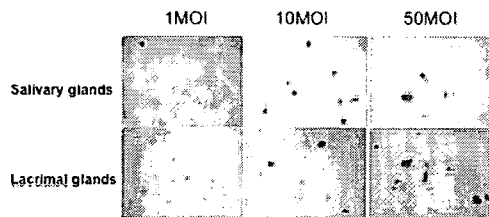
#### b. クラステリン標的shRNAを発現した組み換えアデノウイルスの作製

作製したマウスクラステリンに特異的なshRNA発現アデノウイルス (Ad-1-17) とコントロールとして作製されたスクランブルRNA発現アデノウイルス (Ad-11-5) を、クラステリン遺伝子を強発現するSTOClu細胞に感染し、48時間後にクラステリン遺伝子発現をRT-PCRにより検討した(下図)。その結果、Ad-1-17でクラステリン遺伝子発現の抑制が確認された。



#### c. 組み換えアデノウイルスの感染効率の検討

理研から購入したLacZ遺伝子を発現する組み換えアデノウイルス (Ad-β-gal) を、マウス涙腺および唾液腺の上皮細胞に浮遊状態で37℃、1時間感染後、組織培養用dishに播種し、48時間後にβ-galactosidase染色により感染効率を検討した。



#### Ad-β-gal感染48時間後における涙腺・唾液腺MP細胞のβ-gal陽性像の検出

Positive ratio for β-galactosidase (%)			
MOI	1	10	50
Salivary glands	52.7 (%)	84.6	84.4
Lacrimal glands	40.9	73.8	78.4

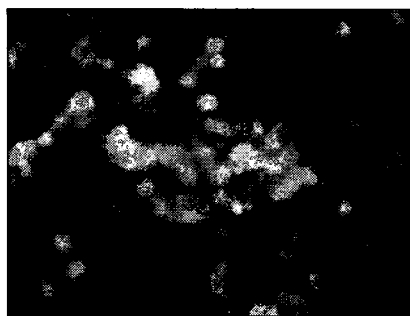
感染効率は10MOIでほぼプラトーと思われた。次に、FACSによるsortingで採取されたMP細胞に浮遊状態でAd11-5およびAd1-17 (10MOI)をそれぞれ感染し細胞生存率を検討した(下表)。

Cell viability of MP cells after infection of adenoviruses		
Adenovirus	Ad1-17	Ad11-5
Salivary glands	39(%)	39
Lacrimal glands	61	76

その結果、唾液腺MPにおいては細胞生存率が40%と低く、アデノウイルスによる強い細胞障害性が確認された。そこで、比較的細胞毒性が低く、長期発現可能な遺伝子導入法として組み換えレンチウイルスの使用を検討した。

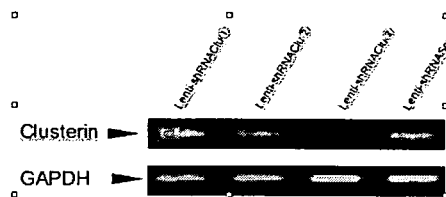
(ii) 組み換えレンチウイルスの使用  
クラステリン標的shRNAを発現する組み換えレンチウイルスの作製

作製されたレンチウイルス (Lenti shRNAClu①, ②, ③, ④, およびLenti shRNAsc r) をそれぞれSTOC1uに感染し、GFP陽性細胞率により感染効率をモニタリング(下図)



レンチウイルス感染後のSTOC1u細胞におけるGFPの検出

すると共に感染48時間後にクラステリン発現をRT-PCRにより検討した(下図)。

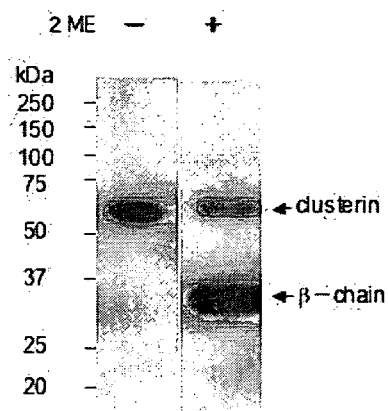


RT-PCRによるクラステリン発現抑制効果の確認

Real-time PCRの結果では、Lenti-shRNAClu③でコントロールに比べ発現量が1/10に低下することが確認された。

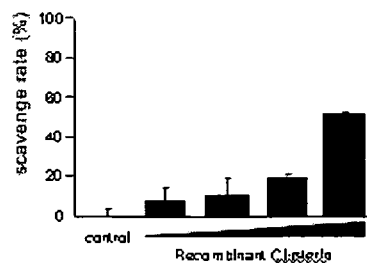
### 3) 組み換えクラステリン蛋白の機能解析

(1) バキュロウイルス-昆虫細胞系により作製したクラステリン蛋白はwestern blotting法により予想される分子量に相当するバンドの存在が確認され、加えて還元状態で泳動することにより分泌型のクラステリンが有する2量体を形成していることが確認された(下図)。

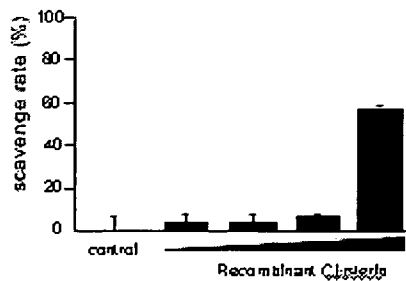


Anti-clusterin antibody

また、作製されたクラステリン蛋白にはラジカルスカベンジ能が認められた(下図)。



スーパーオキシド消去率



ヒドロキシラジカル消去率

#### 4) *in vivo*実験モデルを用いたクラステリン蛋白治療効果の評価

##### (1) ラットの角膜障害モデルを用いた治療実験

クラステリン蛋白投与群ではBSA投与群と比較して角膜障害の抑制傾向が認められた。今後、投与量などの詳細について検討することにより、治療効果の有無について検証する予定である。

##### (2) 放射線照射涙液・唾液分泌障害モデルを用いた治療実験

クラステリン+アテロコラーゲンの注入群とアテロコラーゲン単独注入群における涙液・唾液量を照射1, 2, 4週後に測定したが、両群において有意な差は認められなかった。移入3週後に両群のマウスそれぞれから、当該腺組織を摘出し、ウエスタンブロット法により徐放化されているクラステリン蛋白を検出した結果、両群におけるクラステリンタンパク量に差がみられなかった。したがって、注入時期あるいは徐放化剤の再検討を行い、治療効果の有無を検証する必要があると考えられた。

#### D. 考察

SP細胞は骨髄、骨格筋、乳腺、腎臓、肺など多数の臓器でその存在が報告されている。しかしながら、この中で幹細胞を多数含む分画として広く認められているのは骨髄と骨格筋のみで、他の臓器に関しては未だに議論の余地を残している。本研究においても当該腺組織におけるSP細胞は腺組織再構築能を有していないことより、幹細胞を多数含む分画とは異なる可能性が示唆されている。この可能性を検証する目的で、当該腺組織由来のSP細胞におけるBrdU長期保持細胞の割合を検証した結果、その割合は極めて低く5%程度であった。し

たがって、これらのことより涙腺・唾液腺におけるSP細胞は幹細胞を多数含む分画とは考えにくく、SP細胞の性格は採取された組織あるいは臓器により異なる可能性が考えられた。したがって、それぞれの臓器においてもその性格を詳細に調べる必要があると考えられる。また、SP細胞が分泌しているクラステリンが活性酸素種を介した細胞障害を抑制する可能性が示唆されたのは極めて興味深い。造血幹細胞における最近の報告でも、活性酸素種は幹細胞ニッチの破綻を誘導し幹細胞の枯渇をもたらすということが明らかにされた。したがって、当該腺組織におけるSP細胞が幹細胞の恒常性維持に働いている可能性も考えられ、クラステリンなどの因子を応用することにより幹細胞の機能不全を防ぐことが可能となるかもしれない。

#### E. 結論

涙腺・唾液腺のSP細胞は幹細胞を多数含む分画とは異なると思われるが、その分泌蛋白であるクラステリンなどを介して当該腺組織恒常性維持に働いている可能性が考えられた。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mishima K, Inoue H, Obara K, Nishiyama T, Ide F, Yamada H, Watanabe M, Chiba K, Tsubota K, Saito I. Transplantation of side population cells restores the functions of damaged exocrine glands. *Nat. Cell Biol.* (in revision)
2. Nishiyama T, Mishima K, Obara K, Inoue H, Doi T, Kondo S, Saka M, Tabunoki Y, Hattori Y, Kodama T, Tsubota K, Saito I. Amelioration of lacrimal gland inflammation by oral administration of K-13182 in Sjogren's syndrome model mice. *Clin. Exp. Immunol.* 149:586-595, 2007.
3. Nishiyama T, Mishima K, Ide F, Yamada K, Obara K, Sato A, Hitosugi N, Inoue H, Tsubota K, Saito I. Functional analysis of an established mouse vascular endothelial cell line. *J. V*



- asc. Res. 44:138-148, 2007.
4. Dogru M, Matsumoto Y, Yamamoto Y, Goto E, Saiki M, Shimazaki J, Takabayashi T, Tsubota K. Lactoferrin in Sjögren's syndrome. **Ophthalmology**. 114:2366-2367, 2007.
  5. Goto E, Matsumoto Y, Kamoi M, Endo K, Ishida R, Dogru M, Kaido M, Kojima T, Tsubota K. Tear Evaporation Rates in Sjögren Syndrome and Non-Sjögren Dry Eye Patients. **Am J Ophthalmol**. 144:81-85, 2007.
  6. Ota Y, Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Uchino Y, Endo K, Tsubota K. Evaporative Dry Eye and Management of The Ocular Surface Disease in a Patient with Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Clefting (EEC) Syndrome. **Optom Vis Sci**, in press.
  7. Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, Kaido M, Dogru M, Shimazaki J, Tsubota K, Yamada M, Kinoshita S. New Grading System for the Evaluation of Chronic Ocular Manifestations in Patients with Stevens-Johnson Syndrome. **Ophthalmology**. 114:1294-1302, 2007.
  8. Tsuzaka K, Matsumoto Y, Sasaki Y, Abe T, Tsubota K, Takeuchi T. Down-regulation of Fas-ligand mRNA in Sjögren's syndrome patients with enlarged exocrine glands. **Autoimmunity**. 40:497-502, 2007.
  9. Uchida A, Uchino M, Goto E, Hosaka E, Kasuya Y, Fukagawa K, Dogru M, Ogawa Y, Tsubota K. Non-invasive interference tear meniscometry in dry eye patients with Sjögren syndrome. **Am J Ophthalmology**. 144:232-237, 2007.
- 2.学会発表
1. Tsubota K, Mishima M, Inoue H, Yamada H, Saito I. Clusterin is the Lacrimal Gland Side Population Secretory Glycoprotein and Can Restore Lacrimal Gland Function Through Suppressing Reactive Oxygen Species; A Potential New Therapy for Age - Related Dry Eye Disorders. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 2007, May.
  2. Tsubota K, Mishima K, Obara K, Yamada H, Inoue H, and Saito I, Reactive oxygen species can be controlled by the secretory glycoprotein, clusterin, from side population cells in the lacrimal gland: a new intervention for age-related dry eye disorders. International Aging Association (Greece) 2007, May.
  3. Mishima K, Inoue H, Obara K, Yamada H, Tsubota K, Saito I, Characterization and therapeutic potential of salivary side population cells. 13th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI), (Tokyo) 2007, July.
  4. Tsubota K, Mishima K, Obara K, Yamada H, Inoue H, Saito I. Reactive oxygen species can be controlled by the secretory glycoprotein, clusterin, from side population cells in the lacrimal gland: a new intervention for age-related dry eye disorders. International Conference on the Tear Film & Ocular Surface, Sicily, 2007, September.
  5. 吉本桂子, 高橋康恵, 瀬戸山由美子, 鈴木勝也, 津坂憲政, 小川葉子, 坪田一男, 安倍達, 竹内勤. シェーグレン症候群患者T細胞におけるBAFF産生制御機構の検討. 第51回日本リウマチ学会総会, 東京, 2007, 4月.
  6. 吉本桂子, 高橋康恵, 瀬戸山由美子, 鈴木勝也, 津坂憲政, 小川葉子, 坪田一男, 安倍達, 竹内勤. シェーグレン症候群患者T細胞からのBAFF産生におけるMMPの関与. 第12回シェーグレン症候群セミナー, 東京, 2007, 5月
- 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

組み換えクラステリン蛋白の機能解析

分担研究者 後藤英樹 鶴見大学歯学部准教授

研究要旨

前年度までにバキュロウイルス-昆虫細胞系で作製された組み換えクラステリン蛋白が活性酸素種により誘導される細胞障害を抑制する結果が確認されているので、当該年度は *in vivo* モデルを用いた治療実験を行った。すなわち、UV照射により角膜障害を誘導したマウスにクラステリン蛋白およびコントロールとしてBSAをそれぞれ6回/日投与し投与を開始した48時間後に眼球表面をフルオレセイン染色後、実態顕微鏡により損傷の程度を評価した。その結果、クラステリン投与群において角膜損傷の軽減傾向が認められた。また、放射線照射により涙液・唾液分泌障害を誘導したマウスの当該腺組織局所にクラステリン蛋白を含浸したアテロコラーゲンとコントロールとしてアテロコラーゲン単独で移入した。移入後、涙液・唾液量を測定した結果両群において分泌量に差が認められなかった。しかしながら、移入3週後では徐放化されているクラステリン蛋白質が検出されなかったため、注入時期あるいは徐放化剤の再検討を行い、治療効果の有無を検証する必要があると考えられた。

## A. 研究目的

クラステリン蛋白の臨床応用への可能性を検討する目的で、1)角膜障害マウス2)涙液・唾液分泌障害マウスを用いた治療実験を行った。

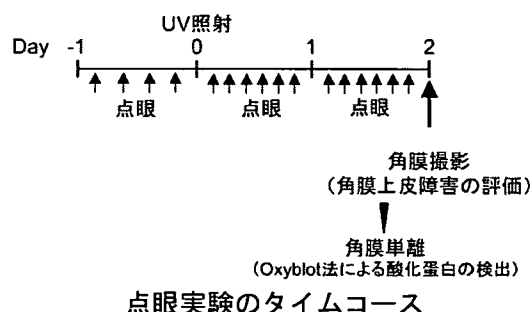
## B. 研究方法

*in vivo*におけるクラステリン蛋白の機能解析

*in vitro*における解析により、クラステリン蛋白が活性酸素種を介した細胞障害を抑制する機能を有することが明らかとなったので、*in vivo*におけるその治療効果を検証する目的で、ラット角膜障害モデルおよびマウスの放射線照射涙液・唾液分泌障害モデルを用いた治療実験を行った。

### 1) ラット角膜障害モデルを用いた治療実験

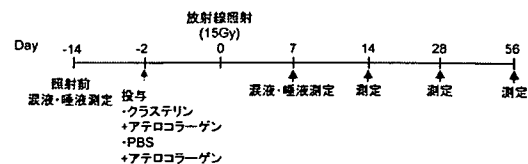
8週齢の雄性SDラットの両眼にUV-B、12.5mJ/cm<sup>2</sup>の線量を照射し、100μg/mlのクラステリン蛋白およびコントロールとしてBSAを6回/日でそれぞれ点眼した。照射48時間後にフルオレセイン染色後、実態顕微鏡により角膜表面を観察した。損傷の程度はフルオレセイン染色の蛍光強度をNIH imageにて定量化し客観的に比較検討した。これまでの研究により、クラステリン蛋白が酸化ストレスを抑制することが明らかとなっていたので、Oxyblot法を用いて蛋白の酸化の程度を評価した。結果はNIH imageを用いて定量化し客観的に評価された。



### 2) マウスの放射線照射涙液・唾液分泌障害モデルを用いた治療実験

6週齢の雄性C57BL/6マウス眼窩外涙腺あるいは唾液腺にアテロコラーゲンとクラステリン蛋白の混合液を放射線照射前日に注入後（涙腺；2μg/mouse唾液腺；9μg/mou

se) 15Gyの放射線を照射し当該腺組織に分泌障害を誘導した。



## クラステリン蛋白移入実験のタイムコース

(倫理面への配慮)

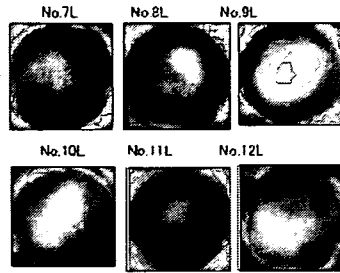
本研究では事前に実験手技、倫理面での対応などに関する承認を本学動物実験委員会から得ており、動物の飼育ならびに屠殺にあたっては動物への苦痛を極力避けるよう厳重に配慮した。また、本実験は「バイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」に基づく文部科学省の法制化された規定に基づき実施された。また、組み換え実験に関しては、本学組み換え実験委員会の承認後施行された。

## C. 研究結果

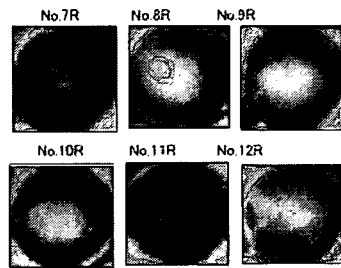
### 1) ラット角膜障害モデルを用いた治療実験

クラステリン蛋白点眼群ではBSA投与群と比較して角膜障害の抑制傾向が認められた(下図)。また、oxyblot法によりカルボニル化蛋白を指標に、酸化修飾蛋白を定量化した結果、BSA投与群と比較してクラステリン蛋白点眼群においてカルボニル化蛋白量が低下していた。したがって、クラステリン蛋白の点眼はUV照射により生じる活性酸素の作用および細胞障害を抑制する可能性が示唆された。今後、投与量などの詳細について検討することにより、治療効果の向上をはかりたい。

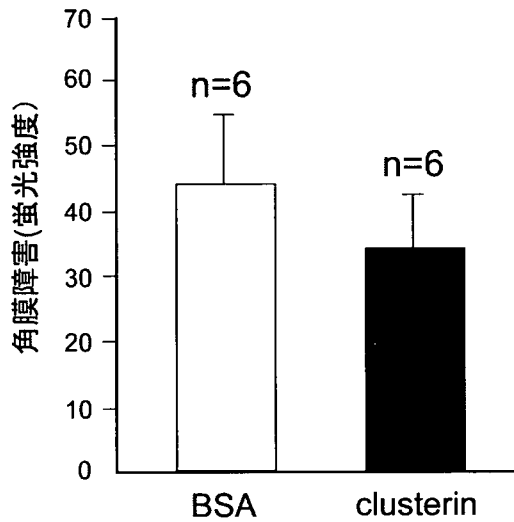
BSA (100 μg/mL)点眼



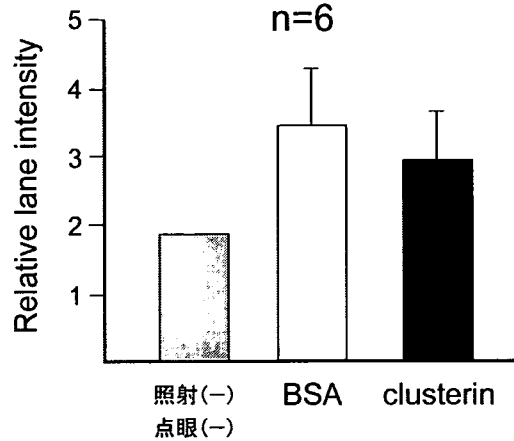
組換えclusterin(100 μg/mL)点眼



フルオレセイン染色により角膜障害の評価



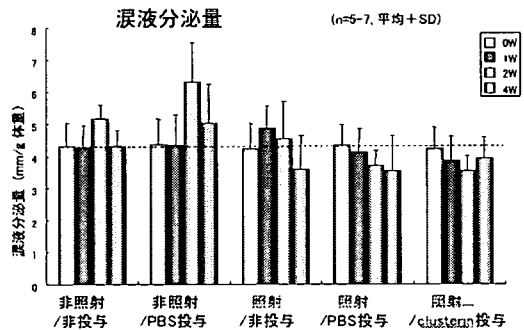
蛍光強度による角膜障害の評価

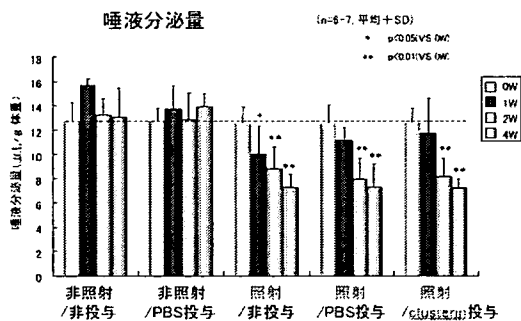


Oxblot法によるcarbonyl化蛋白の定量

2)放射線照射涙液・唾液分泌障害モデルを用いた治療実験

クラスτεリン+アテロコラーゲンの注入群とアテロコラーゲン単独注入群における涙液・唾液量を照射1, 2, 4週後に測定したが、両群において有意な差は認められなかった(下図)。移入3週後に両群のマウスそれぞれから、当該腺組織を摘出し、ウエスタンブロット法により徐放化されているクラスτεリン蛋白を検出した結果、両群におけるクラスτεリンタンパク量に差がみられなかった。したがって、注入時期あるいは徐放化剤の再検討を行い、治療効果の有無を検証する必要があると考えられた。





#### D. 考察

分泌型のクラスτεリン蛋白がAKTを活性化することにより、TNFを介した細胞死を抑制するという報告 (Ammar H. et al., J Biol Chem 2007) が最近なされ、クラスτεリンが細胞障害を抑制するメカニズムが徐々に明らかになりつつある。本実験でも角膜障害モデルにおいてクラスτεリンの治療効果が確認された。しかしながら、今後さらに投与方法の詳細を検討することにより、より治療効果を向上する必要がある、加えてそのメカニズムの詳細についても検討が必要と考えられる。一方、涙液・唾液分泌モデルにおいては、治療効果を確認することが出来なかったが、その原因として、蛋白の持続的な徐方化が困難であったことがあげられ、さらに徐方化剤の種類を換えることにより治療効果について検討していきたい。

#### E. 結論

UVによるマウスの角膜障害モデルではクラスτεリンの点眼がある程度奏効したことより、クラスτεリンの治療が明らかとなった。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Goto E, Matsumoto Y, Kamoi M, Endo K, Ishida R, Dogru M, Kaido M, Kojima T, Tsubota K. Tear Evaporation Rates in Sjögren Syndrome and non-Sjögren Dry Eye Patients. *Am J Ophthalmol.* 144:81-85, 2007.
- Uchida A, Uchino M, Goto E, Hosaka E, Kasuya Y, Fukagawa K, Dogru M, Ogawa Y, Tsubota K. Non-invasive interference tear meniscometry in dry eye patients with Sjögren syndrome. *Am J Ophthalmology.* 144:232-237. 2007.
- Ota Y, Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Uchino Y, Endo K, Tsubota K. Evaporative Dry Eye and Management of The Ocular Surface Disease in a Patient with Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Clefting (EEC) Syndrome. *Optom Vis Sci*, in press.

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

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

SP細胞の機能解析

分担研究者 斎藤一郎 鶴見大学歯学部教授

**研究要旨**

これまでの検討により、SP細胞の移入が放射線照射による涙液・唾液分泌障害を抑制することが明らかとなり、そのメカニズムとして、SP細胞から分泌されるクラステリン蛋白の関与が想定された。このことをより直接的に証明するために1)クラステリン遺伝子を強発現したSP細胞では治療効果が向上すること2)クラステリン遺伝子の発現を抑制したSP細胞では治療効果が抑制あるいは認められないことを示す必要があると考えられた。これらのことを検証する目的で、クラステリン遺伝子あるいはクラステリンの発現を抑制するshRNAを発現する組み換えアデノウイルスを作製した。しかしながら、組み換えアデノウイルスは唾液腺上皮細胞への感染効率は極めて高かったが細胞障害性が強く、SP細胞への遺伝子導入には適していないと考えられた。そこで、アデノウイルスを用いた遺伝子導入法と比較して、比較的細胞障害性が低く持続的発現が期待できるレンチウイルスを用いた導入法を再検討し、新たにクラステリン遺伝子あるいはshRNAを発現する組み換えレンチウイルスを作製した。作製したウイルスを感染したSP細胞の治療効果について検討中である。

## A. 研究目的

これまでの検討により、SP細胞の移入が放射線照射による涙液・唾液分泌障害を抑制することが明らかとなり、そのメカニズムとして、SP細胞から分泌されるクラステリン蛋白の関与が想定された。このことをより直接的に証明するために当該年度は、クラステリン遺伝子あるいはクラステリンの発現を抑制するshRNAを発現する組み換えアデノウイルスおよび組み換えレンチウイルスを作製した。

## B. 研究方法

### 1)クラステリン発現を制御したSP細胞における治療効果の検討

#### 1)組み換えアデノウイルスの使用

##### (1)クラステリン発現アデノウイルスの作製

Adenovirus Vector Kit(Takara)を用いてクラステリン発現組み換えアデノウイルス(Ad-Clu)を作製した。

##### (2)クラステリン標的shRNAを発現した組み換えアデノウイルスの作製

Knockout RNAi SystemおよびAdeno-X Expression System 1(いずれもClontech)を用いてマウスクラステリンに特異的なshRNA発現アデノウイルス(Ad-shRNA-clu)とコントロールとしてスクランブルRNA発現アデノウイルス(Ad-shRNA-scr)を作製する。作製したアデノウイルスのクラステリン発現抑制を検討するため、クラステリンを恒常的に発現しているSTO細胞株(STOClu)に感染し、感染48時間後にクラステリン遺伝子発現をRT-PCRにより検討した。

##### (3)組み換えアデノウイルスの感染効率の検討

理研から購入したLacZ遺伝子を発現する組み換えアデノウイルスを、ソーティング後のMP細胞(non-SP細胞)に浮遊状態で37℃、1時間感染後、組織培養用dishに播種し、48時間後にβ-galactosidase染色により感染効率を検討した。

#### 2)組み換えレンチウイルスの使用

##### (1)クラステリン遺伝子発現組み換えレンチウイルスの作製

クラステリンORF全長配列を挿入した組み換えウイルスゲノム発現プラスミド(GFP配列を有する)とパッケージングプラスミ

ド(gag, poly, env, rev)を293T細胞に同時にトランスフェクションし、48時間後に培養上清を回収した。さらに、培養上清をCentriprep ultracel(YM-50)で濃縮し作製されたウイルスを回収した。

##### (2)クラステリン標的shRNAを発現する組み換えレンチウイルスの作製

shRNAの標的領域としてクラステリンORFの4カ所を選択し、選択した領域に対するshRNAを発現する組み換えウイルスゲノム発現プラスミド(GFP配列を有する)とscramble配列をそれぞれ発現するパッケージングプラスミド(gag, poly, env, rev)を293T細胞に同時にトランスフェクションし、48時間後に培養上清を回収した。さらに、培養上清をCentriprep ultracel(YM-50)で濃縮し作製されたウイルスを回収した。作製されたレンチウイルスをSTOCluに感染し、感染48時間後にクラステリン発現をRT-PCRにより検討した。

#### (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。また、本実験は「バイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」に基づく文部科学省の法制化された規定に基づき実施された。また、組み換え実験に関しては、本学組み換え実験委員会の承認後施行された。

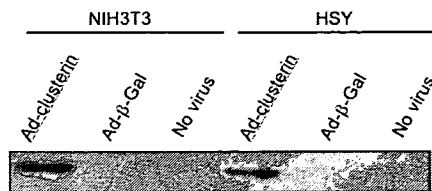
## C. 研究結果

### 遺伝子導入法の検討

#### 1)組み換えアデノウイルスの使用

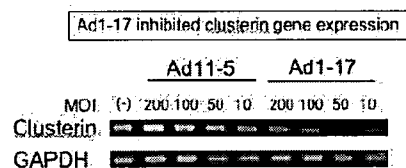
##### (1)クラステリン発現アデノウイルスの作製

Adenovirus Vector Kit(Takara)を用いてクラステリン発現組み換えアデノウイルス(Ad-Clu)を作製した。作製したウイルスを50MOIでNIH3T3および唾液腺上皮細胞株であるHSY細胞に感染し抗クラステリン、ヤギポリクロナール抗体を用いてクラステリン蛋白発現を検討した結果、クラステリン蛋白の存在が確認された(下図)。



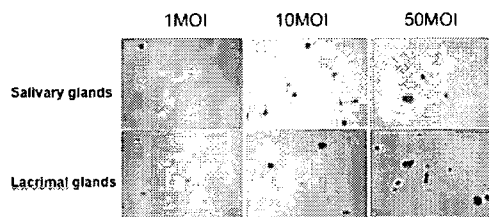
**(2) クラステリン標的shRNAを発現した組み換えアデノウイルスの作製**

作製したマウスクラステリンに特異的なshRNA発現アデノウイルス (Ad-1-17) とコントロールとして作製されたスクランブルRNA発現アデノウイルス (Ad-11-5) をSTOC1u細胞に感染し、48時間後にクラステリン遺伝子発現をRT-PCRにより検討した (下図)。その結果、Ad-1-17でクラステリン遺伝子発現の抑制が確認された。



**(3) 組み換えアデノウイルスの感染効率の検討**

理研から購入したLacZ遺伝子を発現する組み換えアデノウイルス (Ad-β-gal) を、マウス涙腺および唾液腺の上皮細胞に浮遊状態で37°C、1時間感染後、組織培養用dishに播種し、48時間後にβ-galactosidase染色により感染効率を検討した。



Ad-β-gal感染48時間後における涙腺・唾液腺MP細胞のβ-gal陽性像の検出

Positive ratio for β-galactosidase(%)

MOI	1	10	50
Salivary glands	52.7(%)	84.6	84.4
Lacrimal glands	40.9	73.8	78.4

感染効率は10MOIでほぼプラトーと思われた。次に、FACSによるsortingで採取されたMP細胞に浮遊状態でAd11-5およびAd1-17 (10MOI)をそれぞれ感染し細胞生存率を検討した (下表)。

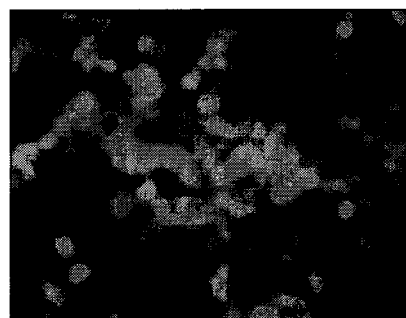
Cell viability of MP cells after infection of adenoviruses

Adenovirus	Ad1-17	Ad11-5
Salivary glands	39(%)	39
Lacrimal glands	61	76

その結果、唾液腺MPにおいては細胞生存率が40%と低く、アデノウイルスによる強い細胞障害性が確認された。そこで、比較的細胞毒性が低く、長期発現可能な遺伝子導入法として組み換えレンチウイルスの使用を検討した。

**2) 組み換えレンチウイルスの使用  
クラステリン標的shRNAを発現する組み換えレンチウイルスの作製**

作製されたレンチウイルス (Lenti shRNAClu①, ②, ③, ④, およびLenti shRNAScr) をそれぞれSTOC1uに感染し、GFP陽性細胞率により感染効率をモニタリング (下図)

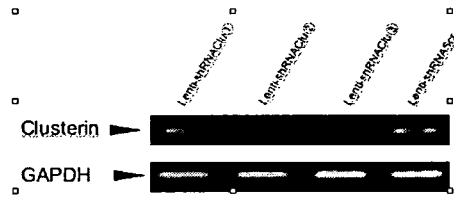


レンチウイルス感染後のSTOC1u細胞における



るGFPの検出

すると共に感染48時間後にクラステリン発現をRT-PCRにより検討した（下図）。



RT-PCRによるクラステリン発現抑制効果の確認

Real-time PCRの結果では、Lenti-shRNAC1u③でコントロールに比べ発現量が1/10に低下することが確認された。

#### D. 考察

組み換えアデノウイルスを用いた遺伝子導入法は、その感染効率の高さや非分裂期の細胞にも感染することからin vitroの実験を中心に極めてよく用いられる遺伝子導入法である。しかしながら、その欠点として細胞毒性が強い、遺伝子発現が一過性、in vivoにおいては免疫反応を惹起しやすく複数回の投与が困難などの点が報告されている。本研究においても、極めて高い遺伝子導入効率が得られたものの、強い細胞毒性が認められ、cell viabilityの低下により使用することが困難と考えられた。特に、本研究のようにヘキスト染色あるいはsorting作業によりある程度、障害の蓄積された細胞においては本導入法の利用が適していないと考えられた。一方、レンチウイルスによる遺伝子導入法は、アデノウイルスと比較すると導入効率は低いものの、細胞毒性は極めて低く、また、導入遺伝子が染色体に取り込まれることより長期発現が可能である点やin vivoの投与で炎症を殆ど誘発しない点から本研究においても本法の応用が考えられた。

#### E. 結論

本研究により、クラステリン遺伝子に対するshRNAを発現するレンチウイルスが本遺伝子の発現を効率よく抑制することが明ら

かになった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mishima K, Inoue H, Obara K, Nishiyama T, Ide F, Yamada H, Watanabe M, Chiba K, Tsubota K, Saito I. Transplantation of side population cells restores the functions of damaged exocrine glands. *Nat. Cell Biol.* (in revision)
2. Nishiyama T, Mishima K, Obara K, Inoue H, Doi T, Kondo S, Saka M, Tabunoki Y, Hattori Y, Kodama T, Tsubota K, Saito I. Amelioration of lacrimal gland inflammation by oral administration of K-13182 in Sjogren's syndrome model mice. *Clin. Exp. Immunol.* 149:586-595. 2007.
3. Nishiyama T, Mishima K, Ide F, Yamada K, Obara K, Sato A, Hitosugi N, Inoue H, Tsubota K, Saito I. Functional analysis of an established mouse vascular endothelial cell line. *J. Vasc. Res.* 44:138-148, 2007.

##### 2. 学会発表

1. Tsubota K, Mishima M, Inoue H, Yamada H, Saito I. Clusterin is the Lacrimal Gland Side Population Secretory Glycoprotein and Can Restore Lacrimal Gland Function Through Suppressing Reactive Oxygen Species; A Potential New Therapy for Age - Related Dry Eye Disorders. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 2007, May.
2. Tsubota K, Mishima K, Obara K, Yamada H, Inoue H, Saito I. Reactive oxygen species can be controlled by the secretory glycoprotein, clusterin, from side population cells in the lacrimal gland: a new intervention for age-related dry eye disorders. International Aging Association (Greece) 2007, May.
3. Mishima K, Inoue H, Obara K, Yamada H, Tsubota K, Saito I. Characterization and therapeutic potential of salivary side population cells. 13th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI), (Tokyo) 2007, July.
4. Tsubota K, Mishima K, Obara K, Ya

- |  |  |
|--|--|
| <p>mada H, Inoue H, <u>Saito I</u>. Reactive oxygen species can be controlled by the secretory glycoprotein, clusterin, from side population cells in the lacrimal gland: a new intervention for age-related dry eye disorders. International Conference on the Tear Film &amp; Ocular Surface, Sicily, 2007, September.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. <u>斎藤一郎</u>, 『アンチエイジング』口腔から実践する全身のアンチエイジング医学第5回日本再生歯科医学会学術大会, 東京, 2007年, 9月</li> <li>6. <u>斎藤一郎</u>, 『ドライマウス 基礎から臨床』ドライマウスの現状と展望, 第52回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2007年, 9月</li> <li>7. <u>斎藤一郎</u>, Overview of pathogenesis and management for Sjogren's syndrome, 第55回JADR, 2007年, 11月</li> <li>8. <u>斎藤一郎</u>, 唾液腺の障害と修復の病理-基礎から臨床へ-, 日本唾液腺学会, 東京, 2007年, 12月</li> <li>9. 大岡久司, 神田靖士, 鈴木裕子, 美島健二, <u>斎藤一郎</u>, 西山利正, 聴覚伝導路における組織幹細胞の同定, 第30回日本分子生物学会年会, 横浜, 2007年, 12月</li> <li>10. <u>斎藤一郎</u>, Anti-Aging Medicine for Dentistry in Japan. 九州大学国際シンポジウム, 福岡, 2008年, 1月</li> <li>11. <u>斎藤一郎</u>, 唾液分泌能修復の試み, 第7回日本再生医療学会, 名古屋, 2008, 3月</li> <li>12. 大岡久司, 神田靖士, 鈴木裕子, 美島健二, <u>斎藤一郎</u>, 西山利正, 聴覚伝導路における組織幹細胞の同定, 第7回日本再生医療学会, 名古屋, 2008, 3月</li> </ol> <p>H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）<br/>特許取得<br/>なし</p> | <p>実用新案登録<br/>なし<br/>3) その他<br/>なし</p> |
|--|--|

## 別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト  
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
Dogru M, Matsumoto Y, Yamamoto Y, <u>Goto E</u> , Saiki M, Shimazaki J, Takebayashi T, <u>Tsubota K</u> .	Lactoferrin in Sjögren's syndrome.	Ophthalmology	114	2366-2367	2007
<u>Goto E</u> , Matsumoto Y, Kamoi M, Endo K, Ishida R, Dogru M, Kaido M, Kojima T, <u>Tsubota K</u> .	Tear Evaporation Rates in Sjögren Syndrome and non-Sjögren Dry Eye Patients.	Am J Ophthalmol	144	81-85	2007
Mishima K, Inoue H, Obara K, Nishiyama T, Ide F, Yamada H, Watanabe M, Chiba K, <u>Tsubota K</u> , <u>Saito I</u> .	Transplantation of side population cells restores the functions of damaged exocrine glands.	Nat. Cell Biol			in revision
Nishiyama T, Mishima K, Obara K, Inoue H, Doi T, Kondo S, Sakai M, Tabunoki Y, Hattori Y, Kodama T, <u>Tsubota K</u> , <u>Saito I</u> .	Amelioration of lacrimal gland inflammation by oral administration of K-13182 in Sjögren's syndrome model mice.	Clin. Exp. Immunol	149	586-595	2007
Nishiyama T, Mishima K, Ide F, Yamada K, Obara K, Sato A, Hitosugi N, Inoue H, <u>Tsubota K</u> , <u>Saito I</u> .	Functional analysis of an established mouse vascular endothelial cell line	J. Vasc. Res	44	138-148	2007
Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, Kaido M, Dogru M, Shimazaki J, <u>Tsubota K</u> , Yamada M, Kinoshita S.	New Grading System for the Evaluation of Chronic Ocular Manifestations in Patients with Stevens-Johnson Syndrome.	Ophthalmology	114	1294-1302	2007
Tsuzaka K, Matsumoto Y, Sasaki Y, Abe T, <u>Tsubota K</u> , Takeuchi T.	Down-regulation of Fas-ligand mRNA in Sjögren's syndrome patients with enlarged exocrine glands.	Autoimmunity	40	497-502	2007
Uchida, A, Uchino, M, <u>Goto, E</u> , Hosaka, E, Kasuya, Y, Fukagawa, K, Dogru, M, Ogawa, Y, <u>Tsubota, K</u> .	Non-invasive interference tear meniscometry in dry eye patients with Sjögren syndrome.	Am J Ophthalmol	144	232-237	2007

# Tear Evaporation Rates in Sjögren Syndrome and non-Sjögren Dry Eye Patients

EIKI GOTO, YUKIHIRO MATSUMOTO, MIZUKA KAMOI, KOJI ENDO, REIKO ISHIDA, MURAT DOGRU, MINAKO KAIDO, TAKASHI KOJIMA, AND KAZUO TSUBOTA

- **PURPOSE:** To reinvestigate tear evaporation rates in Sjögren syndrome (SS) and non-Sjögren (non-SS) dry eye patients with a recently reported ventilated chamber evaporimeter system.
- **DESIGN:** Prospective case-control study.
- **METHODS:** A ventilated chamber evaporimeter system was used to measure tear evaporation rates. A DR-1 camera (Kowa, Nagoya, Japan) was used for tear lipid layer interference image acquisition. The Yokoi severity grading system was used for DR-1 image evaluation. Twenty-four aqueous tear deficiency (ATD) eyes of 21 consecutive patients with SS were studied (SS ATD group). Twenty-one ATD eyes of 12 non-SS patients (non-SS ATD group) were examined as control subjects.
- **RESULTS:** Tear evaporation rates of the SS ATD group ( $5.9 \pm 3.5$  [ $10^{-7}$  g/cm<sup>2</sup> per second]) were significantly higher than those of the non-SS ATD group ( $2.9 \pm 1.8$  [ $10^{-7}$  g/cm<sup>2</sup> per second];  $P = .0009$ ). The severity grading of DR-1 tear interference images of the SS ATD group was significantly higher ( $P = .03$ ), along with significantly worse meibomian gland expressibility and vital staining scores, compared with those of the non-SS ATD group.
- **CONCLUSIONS:** Tear evaporation rates were higher in eyes of the SS ATD group compared with the non-SS ATD group. Tear evaporation assessed in conjunction with tear lipid layer findings and meibomian gland expressibility provides an increased understanding in the differential diagnosis of dry eye states. (Am J Ophthalmol 2007;144:81–85. © 2007 by Elsevier Inc. All rights reserved.)

**A**FTER THE NATIONAL EYE INSTITUTE REPORT BY Lemp, tear evaporimetry to describe evaporative water loss from the ocular surface has been considered as an important examination to differentiate the

Accepted for publication Mar 30, 2007.

From the Department of Ophthalmology, School of Dental Medicine, Tsurumi University, Yokohama, Japan (E.G.); the Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan (E.G., Y.M., M.K., R.I., M.D., M.K., T.K., K.T.); the Department of Ophthalmology, Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College, Ichikawa, Japan (Y.M., R.I., M.D., M.K., T.K., K.T.); the Analytical Research Center, KAO Corporation, Tochigi, Japan (K.E.); and the Department of Ophthalmology, Social Insurance Chukyo Hospital, Nagoya, Japan (T.K.).

Inquiries to Eiki Goto, Department of Ophthalmology, School of Dental Medicine, Tsurumi University, 2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama City, Kanagawa, Japan 230-8501; e-mail: goto-e@tsurumi-u.ac.jp

types of dry eye in addition to the basic Schirmer I test.<sup>1,2</sup> The ocular surface tear film consists of lipid, aqueous, and mucin layers. The tear film spreads across the ocular surface by blinking and drains mainly into the nasolacrimal duct, with the remainder evaporating into the air. The mucin layer is secreted by the goblet cells and the ocular surface epithelium, aqueous components are secreted from the lacrimal gland, and the lipid layer is formed by secreted meibomian lipids that act to suppress excessive tear evaporation by covering the aqueous tear layer.<sup>3,4</sup>

In dry eye, tear evaporation has been considered to be important because the ratio of tear evaporation in total tear flow is increased compared with that of normal subjects.<sup>5</sup> Previous tear evaporation reports in aqueous tear deficiency (ATD) dry eyes have revealed inconsistent results by several groups, sometimes higher<sup>6,7</sup> or sometimes lower<sup>8–10</sup> than the normal values.

We recently reinvestigated the tear evaporation rates in normal subjects and meibomian gland dysfunction (MGD) patients using the new ventilated chamber evaporimeter system.<sup>11</sup> As the meibomian gland lipid expressibility worsened, tear evaporation rates showed an increase under normal aqueous tear secretion. Thus, we thought that the comparison of tear evaporation rates of ATD dry eyes in patients with and without Sjögren syndrome (SS) were intriguing and warranted further investigation. Herein, we report tear evaporation rates of ATD dry eyes in patients with SS and ATD dry eyes in patients without SS using our new evaporimeter system which uses a ventilated chamber.<sup>11</sup> Tear interferometry to evaluate the precorneal tear lipid layer condition was performed simultaneously using the Yokoi semiquantitative grading system<sup>12,13</sup> and lipid layer thickness quantification system.<sup>14</sup> The significance of this method and findings are discussed.

## METHODS

- **SUBJECTS:** In the subspecialty clinic of Tokyo Dental College, Ichikawa General Hospital, 24 ATD eyes of 21 consecutive patients with SS were studied (SS ATD group: one male and 20 females; mean age,  $55.8 \pm 13.1$  years). Twenty-one ATD eyes of 12 non-SS patients (non-SS ATD group: three males and nine females; mean age,  $51.9 \pm 17.2$  years) were examined as control subjects. SS patients were diagnosed using the criteria of Fox and Saito.<sup>15</sup> The