

200731044 8

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17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 坪田一男  
平成20(2008)年3月

# 目 次

## I. 総合研究報告書

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----17

III. 研究成果の刊行物・別刷-----19

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
（総合）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

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幹細胞を用いた再生医療を応用することが本研究の目的である。この目的のため、我々はマウスの涙腺・唾液腺組織から幹細胞を多数含んだ分画として知られるside population (SP) 細胞を採取し、その治療効果と機能の詳細について検討した。その結果、放射線照射により涙液・唾液分泌障害を誘導したマウスを用いた移入実験により、SP細胞を用いた細胞治療が奏効することが明らかとなった。しかしながら、当初、幹細胞を多数含む分画として採取されたSP細胞には、幹細胞の特徴の一つである腺組織再構築能を有していないことが明らかとなり、加えて、BrdU長期保持細胞 (LRC) の割合も極めて少なく必ずしも幹細胞を多数含む分画ではないことが明らかとなった。その一方で、発現遺伝子の網羅的解析により、SP細胞が分泌する因子の一つであるクラステリンに、活性酸素種を介した細胞障害を抑制する作用が明らかとなり、SP細胞の移入による治療効果が本因子を介している可能性が明らかとなった。現在、SP細胞の治療効果がクラステリンを介した作用であることを確認するためにshRNAを発現するレンチウイルスを作製し、クラステリン発現を消失したSP細胞が治療効果を有するか否かを検証している。また、クラステリンKOマウスから採取したSP細胞についても同様な検証を進めている。次に、クラステリンの機能をより詳細に検討するとともに、本因子の治療への応用の可能性を明らかにする目的で、バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて組み換えクラステリン蛋白を作製した。作製されたクラステリン蛋白は、wester blotting法によりジスルフィド結合を介した $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖よりなる2量体を形成する分泌型のクラステリンであることが確認された。また、本因子の存在下で過酸化水素刺激したNIH3T3細胞では、非存在下と比較して有意に細胞生存率の上昇が確認された。加えて、electron spin resonance (ESR) 法により、クラステリン蛋白にスーパーオキシドおよびヒドロキシルラジカルのスキャベンジ能が認められた。さらに、本蛋白の治療効果を検討するために、UV照射によるラットの角膜障害モデルを作製し、クラステリン蛋白の点眼による治療実験を行った結果、クラステ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。したがって、今後さらに詳細な検討が必要であるが、本研究によりクラステリン蛋白の投与が酸化ストレスを介した疾患の治療法となる可能性が示唆された。

分担研究者

後藤英樹 鶴見大学歯学部准教授

齋藤一郎 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・唾液腺の分泌機能を回復するために組織幹細胞をもちいた再生医療を応用することが本研究の目的である。この目的のため、マウス涙腺・唾液腺から幹細胞を多数含む分画として採取されたSP細胞および、その分泌蛋白であるクラステリンの機能の詳細を解析した。

B. 研究方法

1. 涙液・唾液分泌障害マウスを用いた治療実験

1) 涙液・唾液分泌障害マウスの作製

6週齢の雄性C57BL/6マウス眼窩外涙腺あるいは唾液腺組織に15Gyの放射線を照射し一週後にピロカルピン刺激による涙液あるいは唾液分泌量を測定した。

2) SP細胞の移入

放射線照射2週後にGreen Fluorescent Protein (GFP)を全身組織に恒常的に発現するGFPトランスジェニックマウスの涙腺あるいは唾液腺それぞれから採取したSP細胞( $5 \times 10^3$  cell $\sim 1 \times 10^4$  cell)を涙液・唾液分泌障害マウスの当該組織に移入した。

3) 涙液・唾液量の測定

経時的にピロカルピン刺激後の涙液・唾液量を測定した。

4) 移入したSP細胞の生着確認

蛍光顕微鏡を用いてSP細胞を移入した涙腺および唾液腺組織の摘出標本におけるGFP陽性細胞の存在を検討した。これまでの検討ではGFPの発する緑色蛍光を蛍光顕微鏡により直接観察していたが、さらに検出感度を上げる目的でTRITC標識マウス抗GFP抗体を用いてGFP陽性細胞を検出した。

2. SP細胞に特異的な発現遺伝子の機能解析  
cDNA microarrayを用いた結果よりSP細胞

特異的な発現遺伝子が複数同定された。本研究では、その一つであるクラステリンについて、さらに詳細な検討を行った。

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により全長cDNAを増幅した。

2) クラステリン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(理研の丹羽博士により供与)に挿入し大腸菌で大量培養した後plasmidを精製した(pCAGS-Clu)。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-Clu及び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による薬剤選択を2週間行い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抑制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) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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量を酸化ストレス感受性蛍光色素である100nMのCM-H<sub>2</sub>DCFDA染色後FACSにより解析した。CM-H<sub>2</sub>DCFDA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。

### 3. 幹細胞マーカーとしてのクラステリンの応用可能性を検討

クラステリンが当該腺組織における幹細胞のマーカー因子として応用が可能か否かを検討する目的で、これらの組織における幹細胞の同定を試みた。

#### 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 $\mu$ g/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 $\mu$ mの薄切切片を作製しFITC標識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

(1)で作製した薄切切片をもちいて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。

### 4. 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を作製し、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。

### 5. 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) 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shRNA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。

##### (2) 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(GF

P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STOC1u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。

#### 3) クラステリン遺伝子を欠失したSP細胞の移入実験

クラステ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、クラクラステ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。

### 6. 組み換えクラステリン蛋白を用いた治療実験

#### 1) バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いたクラステリン組み換え蛋白作製

分泌蛋白としてのクラステリンの機能を解析する目的で、組み換えクラステリン蛋白を作製し、その機能を解析した。クラステリン蛋白の作製方法を以下に示す。

##### (1) 組み換えトランスファープラスミドの作製

①PCRによりHis-tagを付加したclusterin全長cDNAをpBAC1ベクター (*In vitro*gen) のマルチクローニングサイトに挿入し (pBAC1-Clusterin-HT)、大腸菌DH5 $\alpha$  にトランスフォームした。トランスフォームした大腸菌を大量培養後、プラスミドDNAをMaxi-

prepプラスミド精製キット (Quiagen) により抽出・精製した。

②精製したプラスミドの塩基配列を解析し、目的遺伝子と100%一致することを確認した。

##### (2) クラステリン発現組み換えバキュロウイルスの作製

①pBAC1-Clusterin-HTプラスミドを昆虫細胞であるSf9細胞にトランスフェクションしcytopathic effect (CPE)の出現によりウイルス産生を確認した。

②培養上清を回収し、さらにSf9細胞に感染することにより、ウイルスの大量増幅を行った。

##### (3) 組み換えバキュロウイルスの純化

①6穴プレートの各ウエルに $1 \times 10^6$ 個のSf9細胞を播種し、翌日、限界希釈したウイルスを感染した。感染1時間後、培地を吸引しlow-melting point agarose を重層した。

②6日後、出現したプラークを10クローン採取し、それぞれのクローンを別々にSf9細胞に感染させた。感染3日後、Western blotting 法により組み換えクラステリン蛋白の発現を検出した。すなわち、培養上清を回収し、細胞溶解液にて溶解後、96 $^{\circ}$ C 3分間加熱した。さらに10% SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)にて電気泳動後、PVDF膜に転写し、goat anti-clusterin 抗体およびrabbit anti-His 抗体を用いて組み換えクラステリン蛋白の発現を比較検討した。

③最も発現の高いウイルスクローンを同定し、同定したウイルスクローンをSf9細胞に感染させウイルスの増幅を行った。

##### (4) クラステリン発現組み換えバキュロウイルスを用いたクラステリン蛋白の大量合成

①クラステリン発現組み換えバキュロウイルスをSf9細胞に3MOIで感染後1L系にて蛋白の大量作製を行った。

②Western blotting 法によりクラステリン蛋白の発現を検討した。

③陽イオン交換クロマトグラフィーにより分離後、Ni-NTA (QIAGEN)を用いてクラステリン蛋白を単離・精製した。

④クマシーブルー染色およびWestern blotting 法により精製後の蛋白の純度を検討した。

### 7. *in vitro*における組み換えクラステリン蛋白の機能解析

1) 作製した組み換えクラステリン蛋白に酸化ストレスを介した細胞障害を抑制する機能が認められるか否かを検証する目的で以下の実験を行った。

(1) マウス線維芽細胞株であるNIH3T3細胞の培養上清に0.1, 1, および10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のクラステリン蛋白を添加した。

(2) クラステリン蛋白添加2時間後に0.1mMの過酸化水素を加えた。

(3) 過酸化水素を加えた12時間後にトリパンブルー染色により生細胞数の割合を計測した。

2) 作製した組み換えクラステ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テリン組み換え蛋白を作製し、作製したクラステ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。

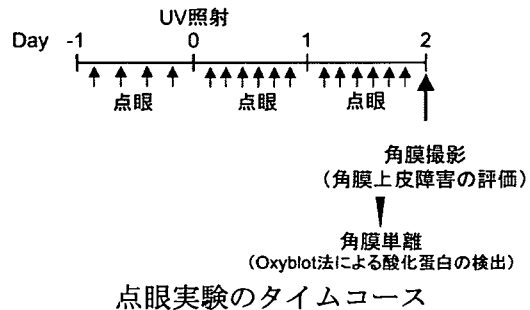
### 8. *in vivo*におけるクラステリン蛋白の機能解析

*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

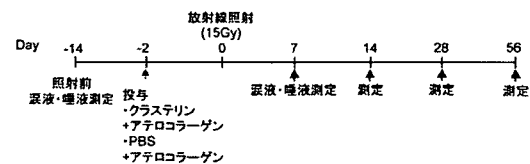
8週齢の雄性SDラットの両眼にUV-B, 125mJ/cm<sup>2</sup>の線量を照射し、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクラステリン蛋白およびコントロールとしてBSAを6回/日でそれぞれ点眼した。照射48時間後にフルオレセイン染色後、実態顕微鏡により角膜表面を観察した。損傷の程度はフルオレセイン染色の蛍光

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; 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 唾液腺; 9 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) 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)

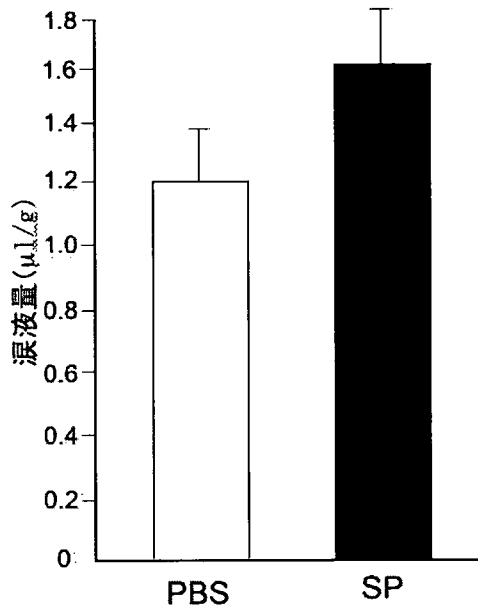
本研究では事前に実験手技、倫理面での対応などに関する承認を本学動物実験委員会から得ており、動物の飼育ならびに屠殺にあたっては動物への苦痛を極力避けるよう嚴重に配慮した。また、本実験は「バイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」に基づく文部科学省の法制化された規定に基づき実施された。また、組み換え実験に関しては、本学組み換え実験委員会の承認後施行された。

### C. 研究結果

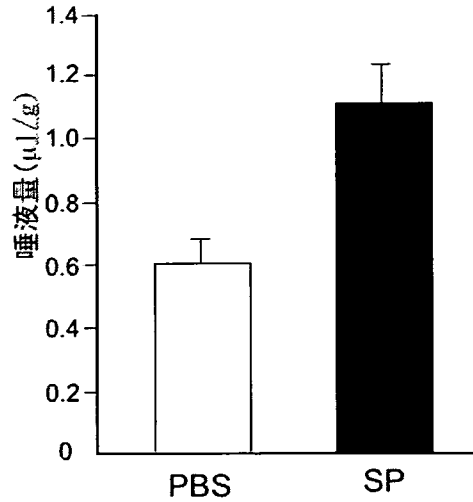
1. 涙液・唾液分泌障害マウスを用いた治療

## 実験

涙腺・唾液腺に放射線照射したマウスでは照射後一週目からピロカルピン刺激による涙液あるいは唾液分泌量に明らかな減少が認められた。放射線照射2週後に、これらの組織にGFPトランスジェニックマウスの涙腺あるいは唾液腺それぞれから採取したSP細胞( $5 \times 10^3$  cell $\sim 1 \times 10^4$  cell)を移入した結果、涙液・唾液量の回復が認められた(下図)。



SP細胞移入8週後の涙液量



SP細胞移入8週後の唾液量

次に、抗GFP抗体を用いて移植した組織におけるGFP陽性細胞の存在を詳細に検討した結果、GFP陽性細胞は散在性に存在するものの、移植した細胞による組織再構築は認められなかった。このことから、SP細胞を移入した組織において分泌量の回復が認められたのは、移入細胞自身の組織再構成による可能性は低く、移入細胞が分泌する液性因子を介した残存組織の賦活化に起因した可能性が考えられた。

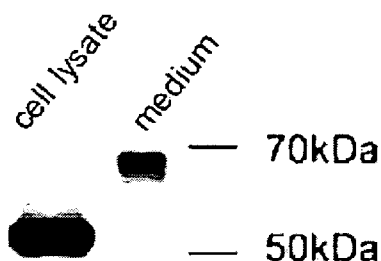
## 2. SP細胞に特異的な発現遺伝子の機能解析

SP細胞特異的な発現因子の一つであるクラステリンを恒常的に発現するSTO細胞を用いた解析によりクラステリンが活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)による細胞障害抑制作用を有することが明らかとなった。(以下クラステリンを恒常的に発現するSTO細胞をSTOclu、empty vectorを導入したSTO細胞をmock STOと略す。)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。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<sub>2</sub>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。

次にクラステリンには細胞質型と分泌型



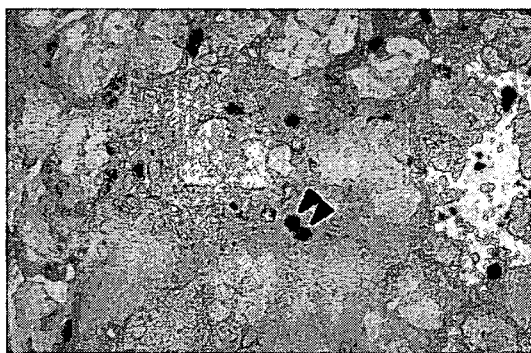
の2種類存在することが知られており液性因子としてのクラステリンの機能を解析するためにST0cluとmock ST0の培養上清をST0細胞に添加した後にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激による細胞内のROS量を測定した結果、ST0cluの培養上清を添加したST0細胞で細胞内ROSの産生が抑制された。



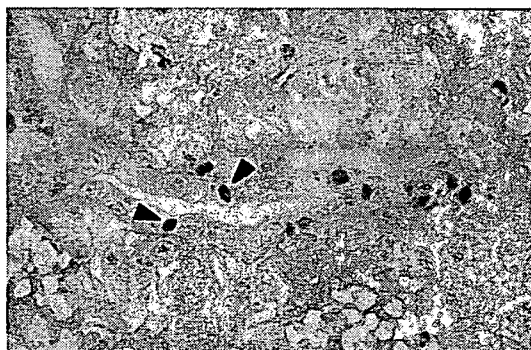
ST0cluでみられる2種類のクラステリン

### 3. 幹細胞マーカーとしてのクラステリンの応用可能性を検討

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(下図)。

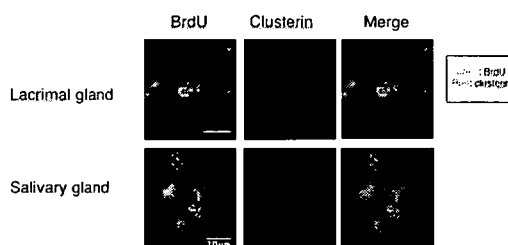


涙腺組織におけるBrdU陽性細胞の局在



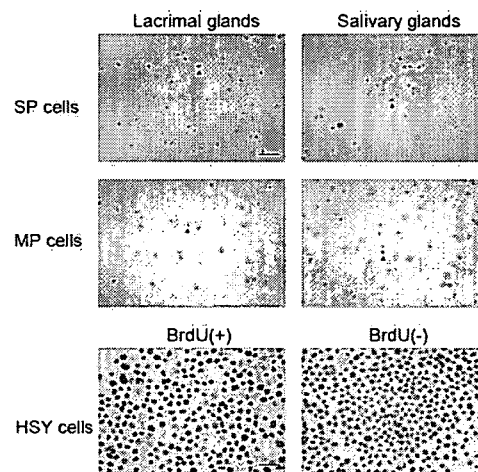
### 唾腺組織におけるBrdU陽性細胞の局在

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(LRC)、クラステリン陽性のdouble positive cellは一部であった(下図)。



### 4. 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

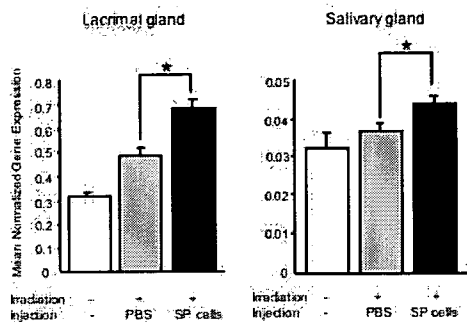
涙腺・唾腺のSP細胞におけるLRCの割合は、それぞれ4.0%、4.7%であり、一方non-SP細胞では、それぞれ6.9%、2.4%で両者に差が認められなかった。加えて、BrdU投与マウスの当該腺組織においても、SP細胞特異的な発現因子であるクラステリン陽性かつBrdU陽性のdouble positive cellはごく少数であった。以上の結果から、SP細胞は必ずしも幹細胞の濃縮された分画とは

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。

### 5. 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) SP細胞移入組織におけるクラステリン遺伝子発現の検討

放射線照射した涙腺・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)。

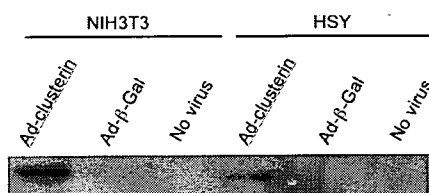


#### SP細胞移入後のクラステリン遺伝子発現の検討

#### 2) 遺伝子導入法の検討

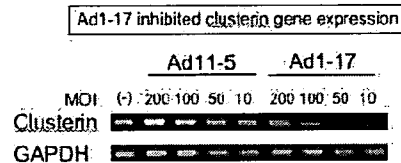
##### (1) 組み換えアデノウイルスの使用

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)。



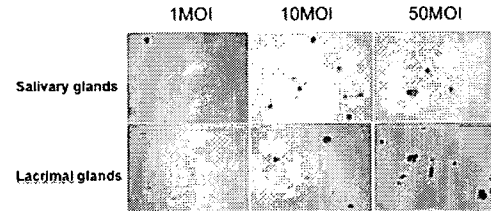
##### b. クラステリン標的shRNAを発現した組み換えアデノウイルスの作製

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shRNA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。



#### 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

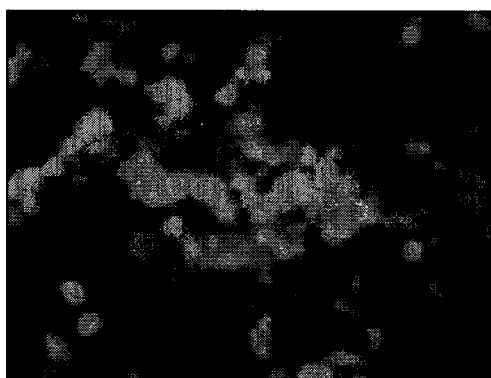
感染効率は10MOIではほぼプラトーと思われた。次に、FACSによるsortingで採取されたMP細胞に浮遊状態でAd11-5およびAd1-17 (10MOI) をそれぞれ感染し細胞生存率を検討した(下表)。

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。

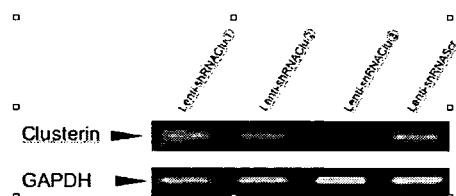
(2) 組み換えレンチウイルスの使用  
クラスτεリン標的shRNAを発現する組み換え  
レンチウイルスの作製

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STOClu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STOClu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τεリン発現をRT-PCRにより検討した (下図)。



RT-PCRによるクラスτεリン発現抑制効果の

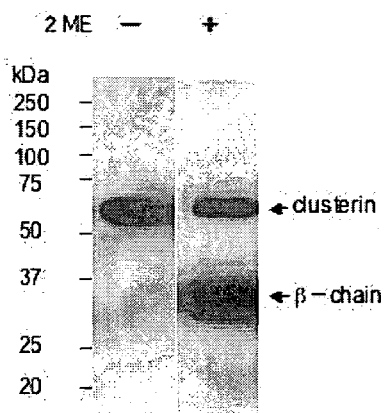
確認

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。

6. バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いた  
クラスτεリン組み換え蛋白作製

(1) プラーク法を用いて純化したクラスτεリン発現バキュロウイルスをSf9細胞にて増幅した。増幅したウイルスを用いて、浮遊培養状態にてSf9細胞に感染後、27℃にて振盪培養し、48、72、および96時間後の培養上清中に含まれるクラスτεリン蛋白をWestern blotting法により検出した。その結果、3MOIの力価で感染し、培養96時間の条件で良好な結果が得られた。

(2) 同様の条件により1L系の浮遊培養上清中に含まれるクラスτεリンを陽イオン交換クロマトグラフィーにて分離後Ni-NTA(QIAGEN)にて精製した。Western blotting法による結果から、比較的純度の高いクラスτεリン蛋白が得られたことが確認された。(下図)。



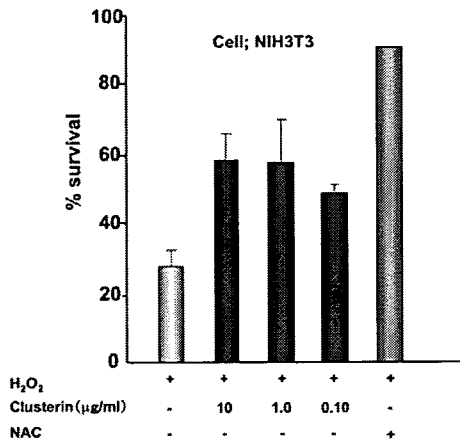
Anti-clusterin antibody

(2 ME; 2-Mercaptoethanol)

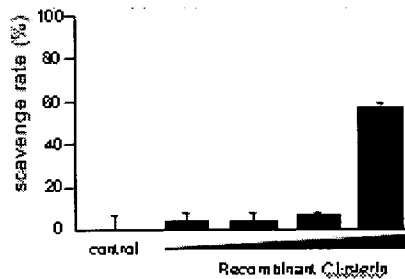
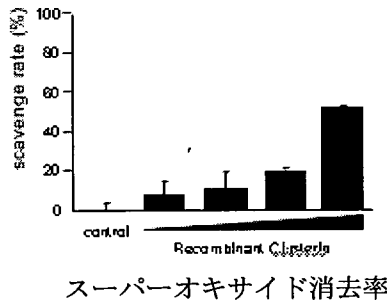
7. in vitro における組み換えクラスτεリン蛋白の機能解析

NIH3T3細胞の培養上清に0.1, 1および10 μg/ml のクラスτεリン蛋白を添加し、2

時間後に0.1mMの過酸化水素を加えた。過酸化水素を加えた12時間後にトリパンブルー染色により生細胞数の割合を測定した結果、クラステリン未添加では、生細胞数が約30%であったのに対して、1および10 $\mu$ g/mlのクラステリンを添加した場合の生細胞数が約60%と有意に増加していた（下図）。（NAC; n-acetyl cysteineは radical scavengerとして知られ、コントロールとして使用された。）



2) 組み換えクラステリン蛋白の機能解析  
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）。

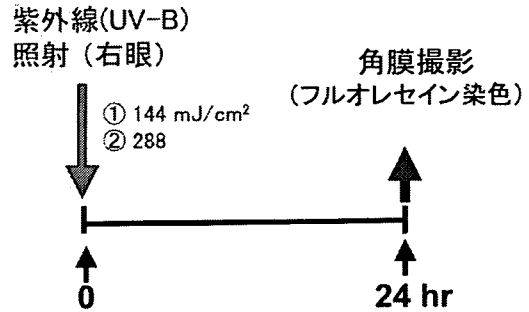


ヒドロキシラジカル消去率

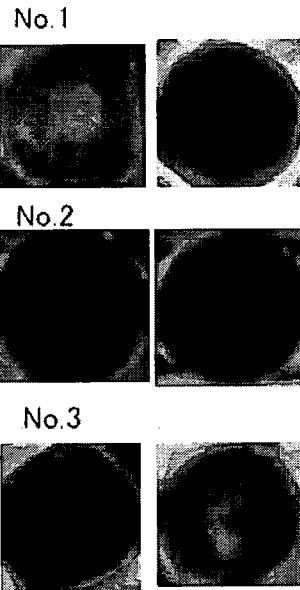
8. ラットの角膜障害モデルの作製

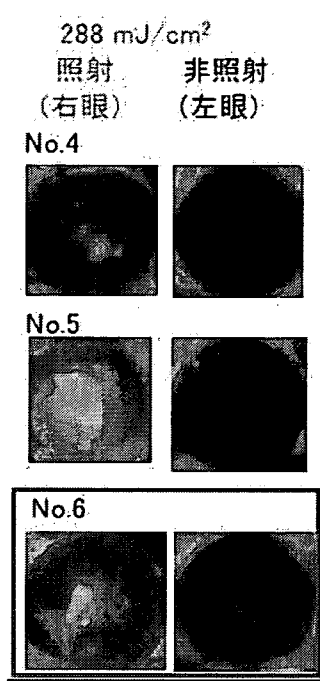
8週齢の雄性SDラットの右眼に144mJ/cm<sup>2</sup>あるいは288mJ/cm<sup>2</sup>の線量の紫外線をそれぞれ照射した。（下図）。

SDラット(8W, ♂) 6匹



144 mJ/cm<sup>2</sup>  
照射 (右眼) 非照射 (左眼)





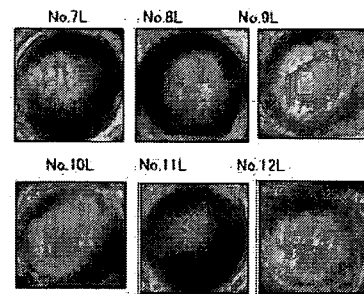
照射24時間後にフルオレセインにより角膜表面を染色し観察した(上図)。288mJ/cm<sup>2</sup>の線量の紫外線で明らかにフルオレセインの浸透像が確認された。さらに、これらの障害の蛍光強度をNIH imageにより測定することにより定量化した。

### 9. ラットの角膜障害モデルを用いた治療実験

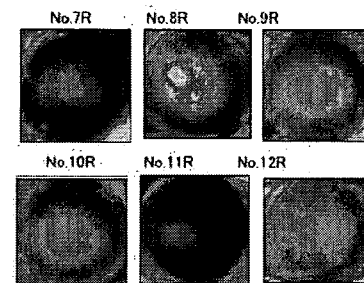
#### 1) ラットの角膜障害モデルを用いた治療実験

クラスτε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(下図)。また、oxyblot法によりカルボニル化蛋白を指標に、酸化蛋白量を定量化した結果、BSA投与群と比較してクラスτεリン蛋白点眼群において酸化修飾蛋白量が低下していた。したがって、クラスτε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。

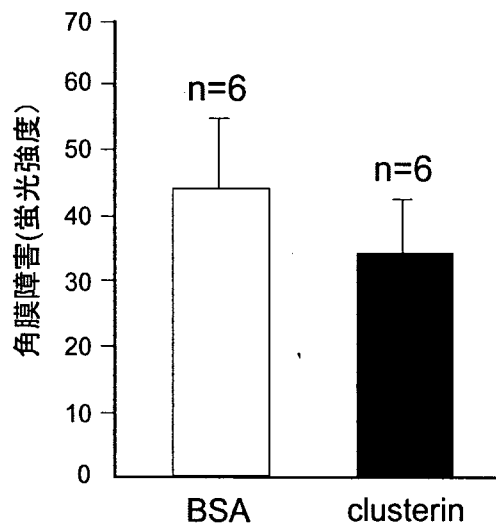
### BSA (100 μg/mL)点眼



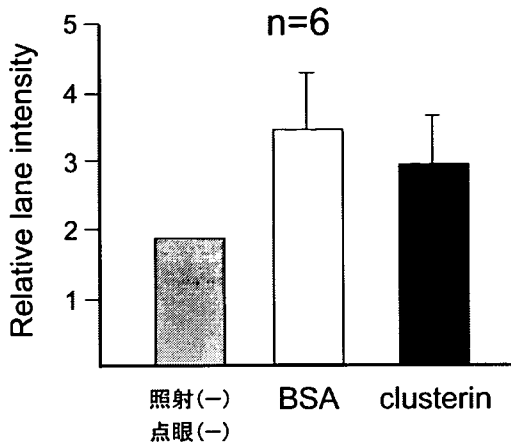
### 組換えclusterin(100 μg/mL)点眼



フルオレセイン染色により角膜障害の評価



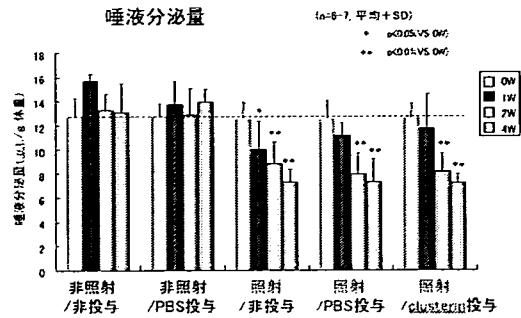
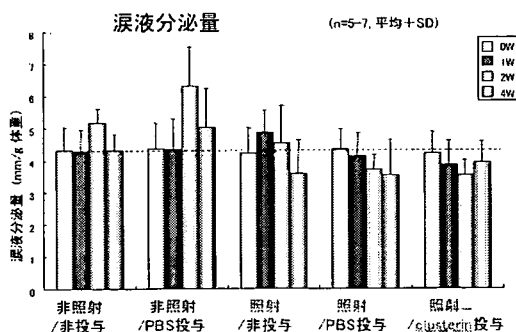
蛍光強度による角膜障害の評価



### Oxblot法による酸化修飾蛋白の定量

#### 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、ウェ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

根治療法の存在しない難治性疾患により失われた組織を再生するために幹細胞による再生医療の応用が検討されている。白血病患者における骨髄移植や熱傷患者における培養皮膚移植などは既に臨床応用され、糖尿病やパーキンソン病などでも疾患モデル動物を用いた実験で、胚性幹細胞 (embryonic stem: ES細胞) や骨髄間葉系幹細胞などを用いた組織再生による治療法の奏効が報告されており、それらの臨床応用が期待される。また、眼科領域でもスティーブンス・ジョンソン症候群や角膜化学傷・熱傷などの角膜障害に対して角膜幹細胞移植の応用を主任研究者が報告している。スティーブンス・ジョンソン症候群で認められる重篤な涙液分泌障害はシェーグレン症候群や頭頸部悪性腫瘍の放射線治療後にも認められるものの、その根治療法に関する報告は国内・国外において皆無であり効果的な治療法の開発が望まれる。

本研究結果において涙液・唾液分泌障害マウスの涙腺・唾液腺にSP細胞を移入することにより、その分泌機能の改善が認められたことはヒトの涙液・唾液分泌障害の治療法として細胞治療の応用可能性を示唆するものであり極めて有用と思われる。これまで細胞治療の目的は移入した細胞による失われた組織の再構築にあったが、本研究により移入細胞が分泌する細胞保護因子の存在が明らかとなり、残存する組織の機能回復に少なからず関与している可能性が示唆されたことは極めて興味深く治療適応の拡大につながると考えられる。

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知さ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ことも興味深い。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, Tab

unoki 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.
4. Nishiyama T, Mishima K, Ide F, Yamada K, Obara K, Sato A, Hitosugi N, Inoue H, Tsubota K, and Saito I. Functional analysis of established mouse vascular endothelial cell line. **J Vasc Res.** 44:138-148, 2007.
5. Nishiyama T, Nakamura T, Obara K, Inoue H, Mishima K, Matsumoto N, Matsui M, Manabe T, Mikoshiba K, Saito I. Upregulated PAR-2-mediated salivary secretion in mice deficient in muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **J Pharmacol Exp Ther.** 320: 516-24, 2007.
6. Dogru M, Matsumoto Y, Yamamoto Y, Goto E, Saiki M, Shimazaki J, Takebayashi T, Tsubota K. Lactoferrin in Sjögren's syndrome. **Ophthalmology.** 114:2366-2367, 2007.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. Ryo K, Yamada H, Nakagawa Y, Tai Y, Obara K, Inoue H, Mishima K, and Saito I. Possible involvement of oxidative stress in salivary gland of patients with Sjogren's syndrome. *Pathobiology* 73:252-60, 2006.
13. Obara K, Ide F, Mishima K, Inoue H, Yamada H, Hayashi Y, and Saito I. Biological and oncogenic properties of p53-deficient salivary gland epithelial cells with particular emphasis on stromal-epithelial interactions in tumorigenesis. *Pathobiology* 73: 261-70, 2006.
14. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Migishima RS, Yokoyama M, Mishima K, Saito I. Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441:885-889, 2006.
15. 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.* 26 :2924-2935, 2006.
16. Kaido M, Dogru M, Yamada M, Sotozono C, Kinoshita S, Shimazaki J, Tsubota K. Functional visual acuity in Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol*. 142:917-922, 2006.

## 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(A RVO), 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, 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.
7. 齋藤一郎, 『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, 9月
8. 齋藤一郎, 『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, 9月
9. 齋藤一郎, Overview of pathogenesis and management for Sjogren's syndrome, 第55回JADR, 2007, 11月
10. 齋藤一郎, 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, 12月
11. 大岡久司, 神田靖士, 鈴木裕子, 美島



- 健二, 齋藤一郎, 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, 12月
12. 齋藤一郎, Anti-Aging Medicine for Dentistry in Japan. 九州大学国際シンポジウム, 福岡, 2008, 1月
  13. 齋藤一郎, 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
  14. 大岡久司, 神田靖士, 鈴木裕子, 美島健二, 齋藤一郎, 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
  15. 外園千恵, 小泉範子, 上田真由美, 東原尚代, 稲富勉, 横井則彦, 山田昌和, 海道美奈子, 村戸ドール, 坪田一男, 木下茂. 慢性期Stevens-Johnson 症候群患者の視力と前眼部所見. 第30回角膜カンファランス・第22回日本角膜移植学会角膜移植学会, 東京, 2006, 2月.
  16. 吉本桂子, 小笠原未恵, 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, 阿部達, 竹内勤. シェーグレン症候群患者末梢T細胞におけるBAFF産生制御機構の検討. 第50回日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎, 2006, 4月.
  17. 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, 阿部達, 竹内勤. シェーグレン症候群患者末梢T細胞におけるBAFF産生制御機構の検討. 第11回シェーグレン症候群セミナー, 東京, 2006, 5月.
  18. 小川由佳子, 小川葉子, 村戸ドール, 榛村重人, 山本祐介, 後藤英樹, 山崎一人, 河上裕, 坪田一男. シェーグレン症候群と慢性移植片対宿主病によるドライアイの結膜微絨毛と杯細胞の比較検討. 第15回シェーグレン症候群研究会, 横浜, 2006, 9月.
  19. 山本和彦, 桜井俊晴, 中川洋一, 齋藤一郎, 坪田一男, 河上裕. シェーグレン症候群患者病巣涙腺・唾液腺移植SCIDマウス血清を用いたcDNA発現クローニング法で得られた自己抗原のELISA法を用いた診断応用への検討. 第15回シェーグレン症候群研究会, 横浜, 2006, 9月.
  20. 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, 阿部達, 竹内勤. シェーグレン症候群患者T細胞のBAFF産生機構のin vitro モデルの確立とその応用. 第15回シェーグレン症候群研究会, 横浜, 2006, 9月.
  21. 美島健二, 坪田一男, 千葉寛, 山田耕一, 井上裕子, 齋藤一郎. 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, 岡山, 2006
  22. 美島健二, 坪田一男, 山田耕一, 小原久実, 山田浩之, 渡辺雅尚, 井上裕子, 齋藤一郎. 外分泌腺機能維持における酸化ストレスの役割-Side population細胞における酸化ストレス抑制因子の同定- 第6回日本抗加齢医学会総会, 東京, 2006, 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

## 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> .	ITransplantation 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, Kondou S, Saka 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 Sjogren'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 established mouse vascular endothelial cell line	J Vasc Res	44	138-148	2007
Nishiyama T, Nakamura, T, Obara K, Inoue H, Mishima K, Matsumoto N, Matsui M, Manabe T, Mikoshiba K, <u>Saito I</u> .	Upregulated PAR-2-mediated salivary secretion in mice deficient in muscarinic acetylcholine receptor subtypes	J Pharmacol Exp Ther	320	516-524	2007
Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, <u>Kaido M</u> , Dogru M, Shimazaki J, <u>Tsubota K</u> , Yamada M, Kinoshita S.	New Grading System for the Evaluation of hronic Ocular Manifestations inPatients 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
Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Migishima RS, Yokoyama M, Mishima K, <u>Saito I</u> , Okano H, Mizushima N.	Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice	Nature	441	885-889	2006
Ishimaru N, Arakaki R, Omotehara F, Yamada K, Mishima K, <u>Saito I</u> , Hayashi Y.	A Novel Role of RbAp48 for Tissue-specific Apoptosis in the Exocrine Glands Depending on Estrogen Deficiency	Mol. Cell. Biol	26	2924-2935	2006

Kaido M, Dogru M, Yamada M, Sotozono C, Kinoshita S, Shimazaki J, <u>Tsubota K.</u>	Functional visual acuity in Stevens-Johnson syndrome.	Am J Ophthalmol.	142	917-922	2006
Obara K, Ide F, Mishima K, Inoue H, Yamada H, Hayashi Y, <u>Saito I.</u>	Biological and oncogenic properties of p53-deficient salivary gland epithelial cells with particular emphasis on stromal-epithelial interactions in tumorigenesis	Pathobiology	73	261-270	2006
Ryo K, Yamada H, Nakagawa Y, Tai Y, Obara K, Inoue H, Mishima K, <u>Saito I.</u>	Possible involvement of oxidative stress in salivary gland of patients with Sjogren's syndrome	Pathobiology	73	252-260	2006

## Lactoferrin in Sjögren's Syndrome



Dear Editor:

Lactoferrin is a glycoprotein present in human milk and is secreted into tears by the lacrimal gland. It has several functions, including antiinflammatory effects and promotion of cell growth and DNA synthesis, and antiangiogenic and antitumoral properties.<sup>1,2</sup> Tear lactoferrin level has been reported to be an indicator of lacrimal secretory function.<sup>3</sup> Previous studies also reported that tear lactoferrin level correlated with the severity of conjunctivo-corneal epithelial lesions in patients with primary, secondary, and non-Sjögren's syndrome dry eyes.<sup>3</sup>

We studied the alterations of the tear functions and the ocular surface disorder in 20 eyes of 10 Sjögren's syndrome patients (4 male, 6 female; mean age, 60.5 years) with dry eyes by performing corneal sensitivity measurements, tear film lipid layer interferometry, a Schirmer test, tear film breakup time (BUT) measurements, ocular surface vital staining, and conjunctival impression cytology with 1 month of peroral enteric lactoferrin treatment and with its cessation in a crossover-design prospective trial. Fourteen eyes of 7 Sjögren's syndrome patients (3 male, 4 female; mean age, 62) who did not consent to a lactoferrin trial served as the control group undergoing the same examinations as the LF treatment group throughout the study period. None of the patients had another ocular or systemic disorder or history of ocular surgery or used contact lenses. Patients without symptomatic and objective improvement despite use of non-preserved artificial tears, autologous serum eyedrops, and upper and lower punctal occlusion for 8 weeks who did not wish to use topical cyclosporine or steroid eyedrops were included in this study. Informed consents and ethical board reviews were obtained. Patients received 270 mg/day of oral enteric lactoferrin capsules (NRL Pharma, Kawasaki, Japan) for 1 month. Examinations were performed before commencement, at 1 month, and 4 weeks after cessation of lactoferrin treatment.

The mean corneal sensitivity, BUT value, central tear film lipid layer thickness, vital staining scores, squamous metaplasia grades, and goblet cell densities were significantly worse before lactoferrin treatment, improving significantly and concomitantly with dry eye symptomatology after 1 month of treatment. These parameters worsened again 1 month after cessation of treatment. Differences were statistically significant. Schirmer test scores did not show any changes. The mean frequency of artificial tear instillations in a day decreased significantly 1 month after treatment, with a significant increase within 4 weeks after cessation of treatment. There were no significant changes in the control group, which did not receive oral lactoferrin (Figs 1–8 [available at <http://aaojournal.org>]). All patients reported transient loosening

of stools for 3 to 7 days with treatment. No other complications were observed.

Lactoferrin receptors exist in human nervous tissues and are upregulated with neural damage.<sup>2</sup> Bovine lactoferrin administration has also been reported to stimulate nerve growth factor secretion and aid neural healing in mice, which might explain the improvements in corneal sensitivity.<sup>2</sup> Biomicroscopy revealed resolution of conjunctival inflammation with lactoferrin ingestion and reversal of the findings after cessation of lactoferrin. HLA-DR; interleukins 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 6, and 8; transforming growth factor  $\beta$ 1; and tumor necrosis factor  $\alpha$  were reported to be upregulated in the conjunctiva of Sjögren's syndrome patients.<sup>4</sup> Lactoferrin can directly inhibit the production of several cytokines, including tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$ , via receptor-mediated signaling pathways.<sup>1,2</sup> Lactoferrin can suppress inflammation by downregulating tumor necrosis factor  $\alpha$  and upregulating interleukin 10 in rat adjuvant-induced arthritis.<sup>1,2</sup> Lactoferrin can also nonselectively inhibit T-cell proliferation in human inflammatory skin disease.<sup>2</sup> A topical lactoferrin drop was found to suppress the loss of corneal epithelial integrity in a rabbit dry eye model.<sup>5</sup> We attribute the tear function and ocular surface improvements in our study to suppression of inflammatory mediators by lactoferrin. Our findings of conjunctival inflammatory resolution with lactoferrin should be substantiated with data from flow cytometry or tear enzyme-linked immunosorbent assay studies investigating the expression of inflammatory cytokines.

In summary, oral lactoferrin seemed to be an efficient treatment modality in improving tear stability and ocular surface epithelium in dry eye patients with Sjögren's syndrome. We did not detect any safety concerns regarding oral lactoferrin use in our study. We hope that the results of this trial stimulate further randomized double-blind studies involving more subjects and investigating the changes of symptoms and conjunctivocorneal epithelial integrity as primary end points. Such a future study with a minimum of 90% power to reflect statistically significant similar vital staining scores observed in the current study should have an estimated sample size of at least 22 subjects in both the active drug group and the vehicle/placebo group.<sup>6</sup>

MURAT DOGRU, MD  
YUKIHIRO MATSUMOTO, MD  
YUSUKE YAMAMOTO, MD  
EIKI GOTO, MD  
MEGUMI SAIKI, CO  
JUN SHIMAZAKI, MD  
TORU TAKEBAYASHI, MD  
KAZUO TSUBOTA, MD  
*Tokyo, Japan*