

博士論文

令和2年度

ドライアイ発症機序の解明

~~IP₃受容体を介した涙液分泌機構及びマイボーム腺の異常がもたらす代償機構~~

参天製薬株式会社

製品開発本部 製品研究統括部

薬理グループ

稲葉隆明

目次

要旨.....	4
1. IP ₃ R 欠損マウスを用いた涙液分泌メカニズムの解明.....	8
1-1. 序論	8
1-2. 材料および方法	11
1-2-1. 使用動物	11
1-2-2. イムノブロットイング	11
1-2-3. 涙液分泌量の測定.....	11
1-2-4. 病理組織学的検査および電子顕微鏡検査.....	12
1-2-5. 角膜フルオレセイン染色.....	12
1-2-6. 免疫組織化学的解析	12
1-2-7. 涙腺の腺房細胞面積の測定	12
1-2-8. 涙腺細胞内 Ca ²⁺ 濃度の測定	13
1-2-9. Real time RT-PCR	13
1-2-10. 免疫グロブリンおよび自己抗体の ELISA	13
1-2-11. 統計解析.....	14
1-3. 結果	15
1-3-1. 涙腺における IP ₃ R の発現および細胞内局在	15
1-3-2. ムスカリン作動性およびアドレナリン作動性涙液分泌における IP ₃ R の関与	16
1-3-3. 涙腺腺房細胞における ACh およびエピネフリン誘発 Ca ²⁺ 応答	18
1-3-4. Itpr2 ^{-/-} ;Itpr3 ^{-/-} マウスにおけるドライアイ様病態.....	20
1-3-5. Itpr2 ^{-/-} ;Itpr3 ^{-/-} マウスにおける涙腺の萎縮.....	21
1-3-6. Itpr2 ^{-/-} ;Itpr3 ^{-/-} マウス涙腺における炎症の亢進.....	22
1-3-7. Itpr2 ^{-/-} ;Itpr3 ^{-/-} マウス血中 IgG および IgA の量および自己抗体の増加.....	24
1-4. 考察	25
2. SCD-1 欠損によるマイボーム腺の異常がもたらす涙液量とムチンの代償的増加機構	28
2-1. 序論	28

2-2. 材料および方法	30
2-2-1. 使用動物	30
2-2-2. 涙液量の測定	30
2-2-3. 病理組織学的検査	30
2-2-4. 結膜の杯細胞数の測定	30
2-2-5. 免疫組織化学的解析	30
2-2-6. イムノブロッティング	31
2-2-7. Real time RT-PCR	31
2-2-8. 統計解析	31
2-3. 結果	32
2-3-1. 涙腺における SCD-1 の発現	32
2-3-2. SCD-1 欠損マウスにおける涙液量の増加	33
2-3-3. SCD-1 欠損マウスのマイボーム腺の病態	34
2-3-4. SCD-1 欠損マウス結膜における杯細胞の増加	35
2-3-5. SCD-1 欠損マウスにおける涙腺重量の増加	36
2-3-6. SCD-1 欠損マウス涙腺における脂肪代謝関連因子の変化	37
2-4. 考察	38
3. 総括	41
4. 謝辞	42
5. 参考文献	43
6. 補助資料	50

要旨

眼表面に存在する涙は油層、水層、ムチン層の3層構造からなり、油層はマイボーム腺から分泌される脂質成分により構成され、涙液の蒸発を防いでいる。ムチン層は結膜の杯細胞あるいは角膜上皮細胞から分泌され、水の維持に関わっている。水層は涙腺から分泌される涙液により、眼表面の濡れ性の維持に重要な役割を果たしている。涙液量が減少すると、眼の不快感や視覚障害をもたらすドライアイを引き起こすことが知られている。従って涙液分泌のメカニズムを解明することは、ドライアイの病態解明および新しい治療法の開発に極めて重要である。

第1章では小胞体に存在するカルシウムイオンチャンネルであるイノシトール 1,4,5-トリリン酸受容体 (IP₃R) の涙腺における発現を明らかにし、交感神経および副交感神経による涙液分泌における IP₃R の関与について検討した。これまでに2型 IP₃R および3型 IP₃R 2重欠損 (Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}) マウスの唾液腺および膵臓の腺房細胞において、小胞体から細胞内への Ca²⁺放出が欠如することにより重度の外分泌機能障害が引き起こされることが報告されている。本研究にて Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウスの涙腺腺房細胞において細胞内 Ca²⁺応答を検討した所、アセチルコリン (ACh) およびエピネフリン誘発性細胞内 Ca²⁺応答は生じなかった。また、Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウスでは、ピロカルピンおよびエピネフリン誘発性涙液分泌障害、ならびに角結膜の異常を伴う角膜上皮障害などが認められ、ドライアイ様病態を示すことが明らかとなった。さらに、Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウスの涙腺組織において、炎症性細胞の浸潤、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor alpha (TNF-α) および interleukin-6 (IL-6) の産生増加、ヒトシェーグレン症候群のマーカーである自己抗体の産生増加などが認められた。これらの異常はヒトシェーグレン症候群の病態に類似していた。これら結果から IP₃R は副交感神経、交感神経による涙液分泌に必須であり、Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウスは涙腺の Ca²⁺シグナル伝達の異常によって引き起こされるシェーグレン症候群に類似した症状を示す新しいドライアイモデルマウスであることが示唆された。

第2章ではマイボーム腺機能不全 (meibomian gland dysfunction ;MGD) の病態について検討した。MGD はマイボーム腺の慢性またはびまん性の異常であり、マイボーム腺導管の閉塞にともなうマイボーム腺分泌物の質的および量的変化が生じる疾患である。これら閉塞にともなう腺分泌物の変化は涙液機能の変化、眼の不快感、眼表面における重度の炎症、または上皮障害を引き起こすが、MGD に対する有効な治療法はほとんどない。これまでにマイボーム腺に異常をきたす動物モデルとして stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) 欠損マウスが報告されている。SCD-1 は細胞に取り込まれた飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸へ変換する酵素であり、SCD-1 欠損マウスでは、マイボーム腺からの脂質分泌に変化が認められている。そこで MGD の病態解明を目指し、SCD-1 欠損マウスの表現型解析を実施した。SCD-1 欠損マウスではマイボーム腺の萎縮、結膜杯細胞数の増加および MUC5AC mRNA の発現亢進を認め、涙腺では涙液量および涙腺重量の増加を認めた。この涙液増加には、脂質代謝に関わる遺伝子である fatty acid synthase (FASN)、uncoupling protein-1

(UCP-1)、low density lipoprotein receptor (LDLR) の減少及びトランスポーターである glucose transporter-4 (glut-4) の発現増加が関与していることが示唆された。これら結果から、マイボーム腺の異常に対する代償機構として、涙液量およびムチン産生が増加し、油層、水層、ムチン層が密接にかかわっていることが明らかとなった。SCD-1 欠損マウスの解析はヒトの MGD の病態解明、薬剤開発につながる可能性があり、臨床的意義は極めて高い。

今後、これら研究結果を利用した薬剤が少しでも早く臨床応用し、ドライアイ患者の治療選択肢の拡充に貢献したい。

略語一覧

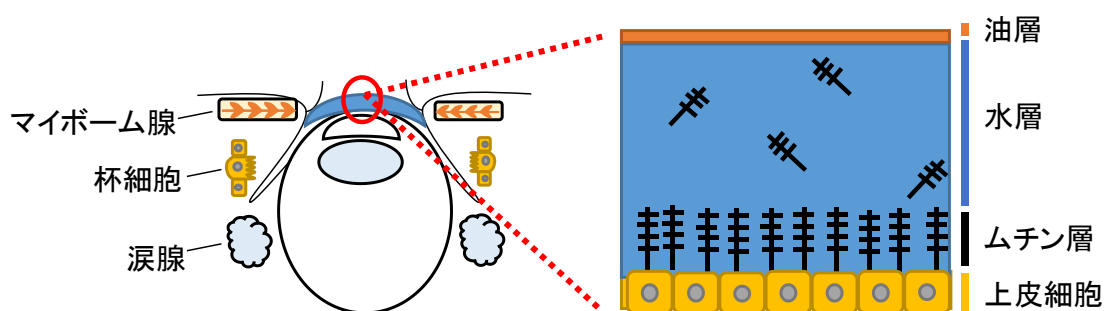
略語	用語
ARVO	association for research in vision and ophthalmology (アメリカ眼科学会)
ACh	Acetylcholine
BSA	bovine serum albumin
CPA	cyclopiazonic acid
DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Epi	Epinephrine
FASN	fatty acid synthase
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
glut-4	glucose transporter-4
H/E 染色	hematoxylin と eosin 染色
IL-6	interleukin-6
IP3	イノシトール 1,4,5-トリスリン酸
IP3R	イノシトール 1,4,5-トリスリン酸受容体
IP3R1	1 型イノシトール 1,4,5-トリスリン酸受容体
IP3R2	2 型イノシトール 1,4,5-トリスリン酸受容体
IP3R3	3 型イノシトール 1,4,5-トリスリン酸受容体
Itpr2 ^{-/-}	2 型イノシトール 1,4,5-トリスリン酸受容体欠損
Itpr2 ^{-/-} ;Itpr3 ^{-/-}	2 型および 3 型イノシトール 1,4,5-トリスリン酸受容体 2 重欠損
Itpr3 ^{-/-}	3 型イノシトール 1,4,5-トリスリン酸受容体欠損
LDLR	low density lipoprotein receptor
MGD	meibomian gland dysfunction
MUC5AC	mucin5AC
OCT	optimal cutting temperature
PAS	periodic acid schiff's
PVDF	polyvinylidene fluoride
SCD-1	stearoyl-CoA desaturase-1
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis
SS-A	Sjögren's syndrome-A
TBST	tris-buffered saline with tween
TFL	tear film lipid layer
TFOT	tear film oriented therapy
TNF- α	tumor necrosis factor alpha

略語	用語
t-SNARE	target- soluble NSF attachment protein receptor complex
UCP-1	uncoupling protein-1
VAMP2	vesicle-associated membrane protein-2
VDT	visual display terminal
v-SNARE	vesicle-soluble NSF attachment protein receptor complex

1. IP₃R 欠損マウスを用いた涙液分泌メカニズムの解明

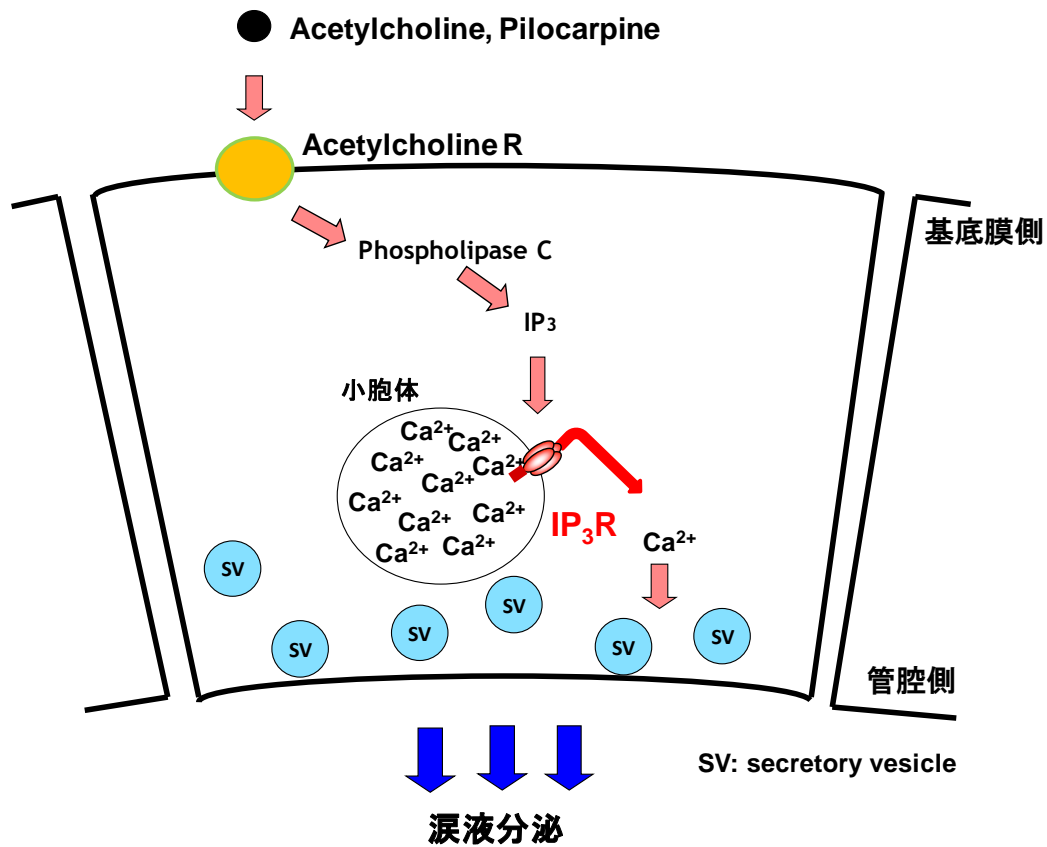
1-1. 序論

眼表面に存在する涙は油層、水層、ムチン層の3層構造からなる。油層はマイボーム腺から分泌される脂質成分により構成され、涙液の蒸発を防いでいる。ムチン層は結膜の杯細胞あるいは角膜上皮細胞から分泌され、水の維持に関わっている。水層は涙腺から分泌される。涙腺から分泌される涙液はタンパク質、電解質、および水を含む涙液の水性因子からなり、眼表面の濡れ性の維持に重要な役割を果たしている（模式図1） [1]。



模式図1. 目の構造と3層からなる涙

涙腺からの涙液分泌は、交感神経と副交感神経の2種類の神経によって支配されている [2, 3]。副交感神経から放出されたアセチルコリン (ACh) はムスカリン性アセチルコリン受容体を介してホスホリパーゼ C を活性化させることにより IP₃ を産生する。次いで IP₃ は涙腺腺房細胞の小胞体に発現する IP₃ R を介して細胞内に Ca²⁺ を放出する。細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が引き金となり、分泌顆粒が細胞膜と融合し、エキソサイトーシスにより涙液が分泌される（模式図2） [4]。また、交感神経から放出されたノルエピネフリンは、 α アドレナリン受容体および β アドレナリン受容体を介して、涙腺腺房細胞の小胞体から Ca²⁺ 放出を誘導する [5, 6]。涙腺には α アドレナリン受容体 (α 1A, α 1B, α 1D, α 2A, α 2B, α 2C) および β アドレナリン受容体 (β 1, β 2, β 3) のうち、 α 2C、 β 1および β 3を除くすべてのアドレナリン受容体の発現が報告されている [7]。



模式図 2. 涙液の分泌メカニズム

哺乳類では、異なる遺伝子に由来する 3 つの IP₃R サブタイプが確認されている [8]。IP₃R1 は主に脳組織で発現し、運動および学習システムの制御に重要な役割を果たす [9-13]。IP₃R1 ノックアウトマウスではてんかん様発作や小脳失調を示し、生後 20 日前後で死亡する [14]。他の 2 つのサブタイプ、IP₃R2 および IP₃R3 は、外分泌腺を含むさまざまな組織で発現している [15-17]。これまでに *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの唾液腺および膵臓の腺房細胞において小胞体から細胞内への Ca²⁺放出が欠如することにより、同欠損マウスでは重度の外分泌機能障害が引き起こされることが報告されている [17, 18]。

これまでに外分泌腺と IP₃R の関係は報告されているが、涙腺における各種 IP₃R の発現レベル、さらには涙液分泌に関与する IP₃R サブタイプに関する報告はない。本研究にて涙腺における各種 IP₃R の発現および役割を明らかにし、交感神経および副交感神経を介した涙液分泌促進経路における IP₃R の関与を検討した。本研究にて *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスではムスカリン作動性およびアドレナリン作動性涙液分泌が著しく障害されており、涙腺腺房細胞における ACh およびエピネフリン刺激による細胞内 Ca²⁺応答が消失していた。また、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスでは角結膜の異常に伴う角膜上皮障害が認められるなど、ドライアイ様病態を示すことも明らかにした。さらに、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}涙腺組織に炎症性細胞の浸潤を認め、事実、炎症性サイトカインである TNF-α および IL-6 の産生や、ヒトのシェーグレン症

候群のマーカーである Sjögren's syndrome-A (SS-A) に対する自己抗体の産生などが上昇することがわかった。これらの異常はヒトシェーグレン症候群の病態に類似していた。これら結果から、涙腺には 3 種の IP₃R サブタイプが発現しており、このうち、ムスカリン作動性経路およびアドレナリン作動性経路の両方を介した涙液分泌には IP₃R2 と IP₃R3 が必須であることが示唆された。さらに、*Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウスは涙腺の Ca²⁺シグナル伝達の異常によって引き起こされるシェーグレン症候群に類似した症状を示す新しいドライアイモデルマウスであることが示唆された。

ドライアイは様々な要因による涙液および角結膜上皮の慢性疾患であり、眼表面の乾燥により眼不快感や視機能異常を伴う疾患の総称である [19]。最近の報告から国内のドライアイ患者数は 2200 万人に上るともいわれている。ドライアイにはシェーグレン症候群による重症ドライアイと、コンタクトレンズの装着および visual display terminal (VDT) 作業時に生じる軽症ドライアイがあり、涙腺での炎症が進行すると重症化する傾向が認められ、時には失明にいたることが知られている。実際に米国ではドライアイ治療剤として免疫抑制剤であるシクロスポリン点眼液が承認されており、その有効性が報告されている。しかしながら、我が国の臨床現場では有効な根治療法はなく、人工涙液やヒアルロン酸製剤点眼液の点眼による涙液の補充もしくは涙点プラグ等による涙液流出の抑制といった対症療法が主流であり、治療満足度は十分ではない。近年、涙液分泌を促進させる薬剤であるジクアホソルナトリウム点眼液が登場したものの、ドライアイを根本から治療するものではない。本研究では涙液分泌メカニズムの一端を明らかにした。得られた情報はドライアイの病態解明および治療法開発において重要な基盤情報を提供する。

1-2. 材料および方法

1-2-1. 使用動物

Itp^{r2}^{-/-}マウス、Itp^{r3}^{-/-}マウスおよび Itp^{r2}^{-/-};Itp^{r3}^{-/-}マウスは二木ら（理化学研究所 脳科学総合研究センター 発生神経生物研究チーム）によって作製された。各種 IP₃R 遺伝子欠損マウスは従来の繁殖方法に従って系統を維持し、SPF 環境下で飼育した [17]。実験には 4-40 週齢のマウスを使用した。動物を用いた実験については理化学研究所および慶應義塾大学医学部の動物実験委員会より承認が得られており、動物の飼育および取扱いは ARVO の声明および各施設の動物実験ガイドライン諸規定に従った。動物福祉に配慮しつつ、科学的に適正な実験を行った。なお、安楽死の方法として頸椎脱臼を実施した。

1-2-2. イムノブロットティング

涙腺を lysis buffer (0.32 M sucrose、5 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM ethylene diamine tetraacetic acid、0.1 M phenyl methyl sulfonyl fluoride、10 mM leupeptin、10 mM pepstatin A、1 mM 2-mercaptoethanol) 中でホモジナイズした。ホモジネートを 4°C で 5 分間 1,000 × g で遠心分離し、涙腺抽出液を得た。試料 50 μg を sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8、20% glycerol、4.0% SDS、10% 2-mercaptoethanol、0.1% bromophenol blue) に溶解し、5% SDS-PAGE により分離後、PVDF 膜に転写した。5.0% skim milk および 0.05% Tween-20 含有リン酸緩衝液 (PBST) 中で 1 時間ブロッキングした。イムノブロットティングの一次抗体には抗マウス IP₃R1 モノクローナル抗体 (1:1,000; KM1112; BD Transduction)、抗マウス IP₃R2 モノクローナル抗体 (1:1,000; KM1083; BD Transduction)、抗マウス IP₃R3 モノクローナル抗体 (1:1,000; KM1082; BD Transduction)、抗マウス Pan-IP₃R モノクローナル抗体 (1:1,000) [20] もしくは抗マウス β アクチンモノクローナル抗体 (1:4,000; AC-15; Sigma) を用い、室温で 2 時間反応した。PBST で PVDF 膜を洗浄後、二次抗体 (HRP 標識ヤギ抗マウス抗体、GE Healthcare) を加え、室温で 1 時間反応した。PBST で PVDF 膜を洗浄後、ECL plus detection kit (GE Healthcare) を用いて抗原を検出した。シグナル強度は画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health) を用いて定量化し、β アクチンの発現レベルで補正した。

1-2-3. 涙液分泌量の測定

36 mg/kg ketamine (第一三共) と 16 mg/kg xylazine (Bayer) をマウスの腹腔内に注射することにより麻酔した。麻酔 1 分後に 3 mg/kg pilocarpine (参天) または 1 mg/kg のエピネフリンを腹腔内に注射することにより涙液分泌を誘導した。涙液量は 0.5 μL micro-capillary (Drummond) を用いて 5 分ごとの涙液を採取し、15 分間に分泌される涙液量を計算した。涙液量を測定後、マウスから涙腺を摘出し、涙腺重量の測定、涙腺重量あたりの涙液分泌量を算出した。

1-2-4. 病理組織学的検査および電子顕微鏡検査

摘出した涙腺と結膜を OCT compound (サクラファインテックジャパン) に包埋し、病理組織学的検査に用いた。涙腺または結膜の凍結切片を厚さ 5 μm で作製し、スライドガラスに張り付けた。試料を 10%ホルマリン中性緩衝液 (和光純薬) で固定し、涙腺は H/E、結膜は PAS で染色した。電子顕微鏡による観察のため、涙腺を 2.5%グルタルアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液で一晩固定し、1.0%オスミン酸含有 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) にて後固定した。試料をエタノールで脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。80 nm に超薄切した切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色し、透過型電子顕微鏡 (1200 EXII; JEOL) で観察した。

1-2-5. 角膜フルオレセイン染色

36 mg/kg ketamine と 16 mg/kg xylazine をマウスの腹腔内に注射することにより麻酔した。麻酔後に 0.05% フルオレセイン溶液 (東京歯科大) を 2 μL 点眼し、角膜を染色した。染色眼を 500 μL の PBS にて 3 回洗浄後、蛍光実体顕微鏡 (M165MC、LEICA) にて撮影した。撮影した写真を用い、角膜を 3 つの領域 (中央、上、下) に分け、各領域の角膜上皮障害の程度を 0-3 のスコアリングを実施し、各領域のスコアを合計した。(スコア 0 : 角膜損傷なし、スコア 1 : 軽度の角膜障害、スコア 2 : 中程度の角膜障害、スコア 3 : 重度の角膜障害)。

1-2-6. 免疫組織化学的解析

摘出した涙腺を OCT compound に包埋後、凍結切片を厚さ 5 μm で作製し、スライドガラスに張り付け、免疫組織学的検査に用いた。スライドガラスに張り付けた凍結切片を 10%ホルマリン中性緩衝液で固定し、1% 正常ヤギ血清含有 1.0% skim milk 溶液中で 1 時間ブロッキングした。PBST で洗浄後、一次抗体には抗マウス IP₃R3 抗体 (1:250; BD Transduction)、抗マウス CD45 抗体 (1:100; e-Bioscience)、抗マウス F4/80 抗体 (1:100; e-Bioscience)、抗マウス CD19 抗体 (1:100; e-Bioscience)、抗マウス CD8 抗体 (1:100; e-Bioscience) または抗マウス CD4 抗体 (1:100; e-Bioscience) を用い、室温で 2 時間反応した。PBST にて洗浄後、二次抗体には Alexa Fluor 488 標識あるいは HRP 標識ウサギ抗マウス抗体 (DAKO) を加え、室温で 1 時間反応した。Alexa Fluor 488 標識抗体で反応した場合は DAPI (Dojindo) で核染色をした。HRP 標識抗体で反応した場合は PBST で洗浄後、DAB で可視化し、hematoxylin で核染色した。

1-2-7. 涙腺の腺房細胞面積の測定

涙腺の腺房細胞面積を定量的に解析するため、涙腺の H/E 染色切片を用い、涙腺腺房細胞面積を鴨居らの方法により測定した [21]。

1-2-8. 涙腺細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

60 mg/kg nembutal (大日本住友製薬) をマウス腹腔内に注射することにより麻酔後、マウスを頸椎脱臼にて安楽殺した。涙腺を摘出し、4°Cの balanced salt saline ; BSS (115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2 mM Ca^{2+} , 1 mM Mg^{2+} , 20 mM Hepes, 10 mM glucose pH7.4) に浸し、2 mg/mL collagenase type 2 (Worthington) 含有 5% BSA 溶液中で 37°C、10 分間反応した。涙腺細胞を数回ピペッティングすることにより、均一に懸濁した。4°Cで 3 分間 100 × g で遠心分離し、BSS で涙腺細胞を洗浄した。涙腺細胞を 5 μM fura-2 AM (Dojindo) 含有 BSS にて 45 分間室温でインキュベートした。BSS による洗浄を 2 回実施し、500 μL の BSS に再懸濁し、4°Cで保存した。2 次元計測機能で Ca^{2+} の変化を明らかにするため、fura-2 処置した涙腺細胞懸濁液を Cell-Tak (BD Biosciences) でコートしたカバーガラスチャンバーに 75 μL 滴下し、カバーガラスチャンバー上に涙腺細胞を接着させた。カバーガラスチャンバーを倒立蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus) にセットし、室温で 2 mL/min の速度で BSS を灌流した。灌流液を BSS から 0.3 μM アセチルコリン溶液に交換し、10 秒間の刺激後、BSS に戻した。同様に 1 μM および 3 μM アセチルコリン溶液についても実施した。fura-2 の励起は 340 nm と 380 nm により 5 秒毎に行った。得られた蛍光 (510~550 nm; F340/F380) を対物レンズ (UPlanApo 20x/340, Olympus) および増感カメラを用いて画像化し、F340/F380 の擬似カラー画像を得た。ARGUS50/CA ソフトウェア (Hamamatsu Photonics) を用いて保存した [22]。なお、同視野で観察できる別々の細胞に ROI (region of interests) を 5 か所設定し、5 か所の平均を各マウスの測定値とした、さらに同様の測定を 3 回実施し、各種マウスの平均値とした。

1-2-9. Real time RT-PCR

マウス涙腺から TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。Superscript VILO Master Mix (Invitrogen) を用いて total RNA から cDNA を作製した。Fast Advanced Master Mix (applied biosystems) にプライマーを混合し StepOne-Plus Real Time PCR system (applied biosystems) にて real time RT-PCR を行った。プライマーは TNF- α 、IL-6 および GAPDH [TaqMan Gene Expression Assay (TNF- α : Mm00443258-m1, IL-6: Mm00446190-m1 および GAPDH: Mm99999915-g1)]を用いた。RNA の発現レベルは GAPDH mRNA 発現レベルで補正し、 $\Delta\Delta\text{CT}$ 方法で解析した。

1-2-10. 免疫グロブリンおよび自己抗体の ELISA

マウス血清中のマウス免疫グロブリンおよび自己抗体の量を ELISA にて定量した。SS-A 抗原に対する自己抗体の検出のために、マウス血清を 1:100 に希釈し、マウス抗 SS-A IgG ELISA キット (Alpha Diagnostics) を用いて SS-A の量を測定した。

1-2-11. 統計解析

データはすべて平均値±標準誤差で表した。統計学的有意性是对应のない Student の t 検定または Mann-Whitney の U 検定により算出した。多群間の比较については Tukey の多重比较検定を実施した。 p 値が 5%未満の場合を統計学的に有意とみなした。

1-3. 結果

1-3-1. 涙腺における IP₃R の発現および細胞内局在

涙腺における IP₃R サブタイプの発現量をそれぞれの抗体を用いてイムノブロッティング法にて検討した。野生型マウスの涙腺では 3 種類の IP₃R が何れも分子量 250 kDa のバンドとして検出され、すべての IP₃R が発現していることを明らかにした (図 1A)。なお、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{+/-} マウス涙腺では IP₃R2 および IP₃R3 の発現は認められなかったが、IP₃R1 については、野生型と同程度の発現が認められた。次にすべての IP₃R を認識する抗 Pan-IP₃R 抗体を用いて検出したところ、野生型マウスの涙腺ではバンドが検出されたが、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{+/-} マウス涙腺ではバンドが検出されなかったことから、涙腺では IP₃R のうち IP₃R2 と IP₃R3 が主に発現していることが明らかとなった (図 1A)。さらに *Itpr2*^{-/-} マウス涙腺抽出液あるいは *Itpr3*^{+/-} マウス涙腺抽出液を用いて抗 Pan-IP₃R 抗体で IP₃R の発現を検討したところ、*Itpr2*^{-/-} マウス涙腺抽出液からはバンドを検出したが、*Itpr3*^{+/-} マウスからは検出されなかった (図 1B)。以上の結果から、涙腺に全ての IP₃R が発現していること、また、3 つの IP₃R サブタイプのうち IP₃R3 が最も高発現していることが明らかとなった。また、抗 IP₃R3 抗体を用いた免疫組織化学的解析により、IP₃R3 の局在を検討した結果、IP₃R3 は涙腺腺房細胞のアピカル側の細胞膜付近に局在することが明らかとなった (図 1C)。一方、*Itpr3*^{+/-} マウス涙腺では IP₃R3 を検出できないことを確認した (図 1C)。

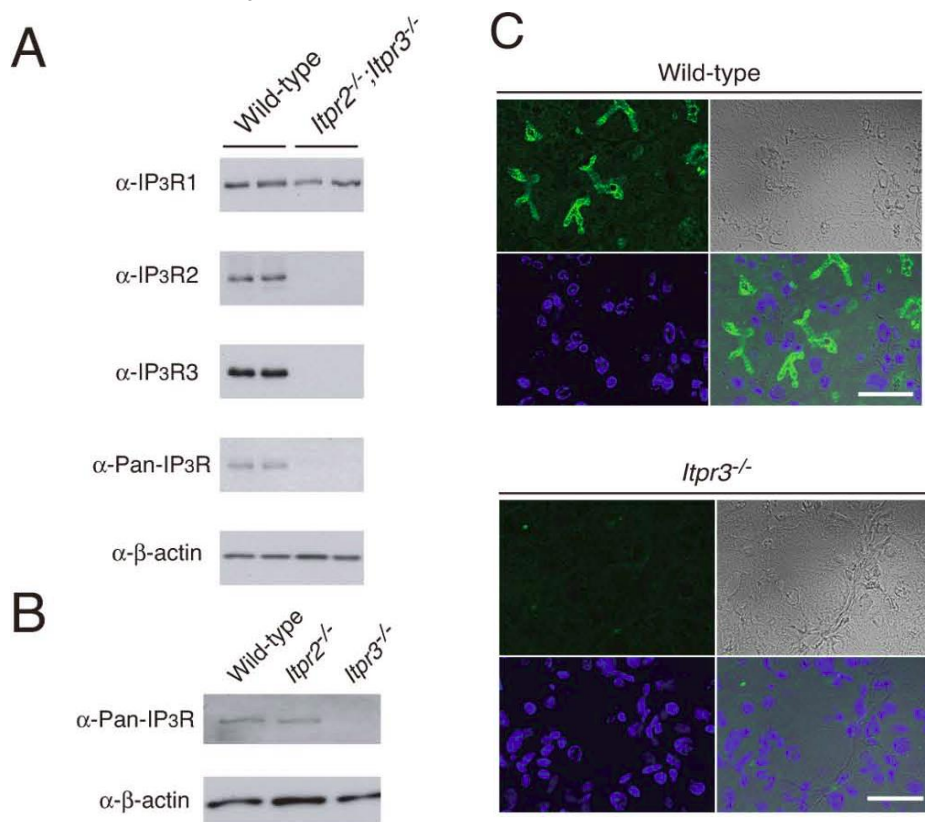


図 1. 涙腺における IP₃R の発現および細胞内局在

(A, B) 野生型マウス、*Itpr2*^{-/-}マウス、*Itpr3*^{-/-}マウスおよび *tpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスから摘出した涙腺を用い、各種抗 IP₃R 抗体によるイムノブロット解析を行った。電気泳動の全体像は 6.補助資料の項、資料 1 および資料 2. に示した。(C) 野生型マウス涙腺および *Itpr3*^{-/-}マウス涙腺における IP₃R3 の発現を免疫組織化学染色にて検討した。IP₃R3 (緑色)、DAPI (青色)、明視野像および重ね合わせ像をそれぞれ示した。Scale bar、30 μm。

1-3-2. ムスカリン作動性およびアドレナリン作動性涙液分泌における IP₃R の関与

涙腺における IP₃R の役割を解析するために、各種 IP₃R 欠損マウスにムスカリン受容体作動薬であるピロカルピンを腹腔内投与し、副交感神経経路を介した涙液分泌量をそれぞれ測定した (図 2A)。*Itpr2*^{-/-}マウスおよび *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスでは、野生型マウスと比較して涙液量が有意に減少した。しかしながら、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスでは、体重および涙腺重量が野生型マウスよりも少なかったため (図 2B, 2C)、涙腺重量に対する涙液量をそれぞれ算出し、涙腺あたりの分泌機能を各マウス間で比較した (図 2D)。その結果、*Itpr2*^{-/-}マウスの涙腺重量あたりの涙液分泌量は野生型マウスと同等であったのに対し、*Itpr3*^{-/-}マウスの涙液分泌量は野生型マウスよりも有意に増加した。また、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスでは、ピロカルピンによる涙液分泌はほとんど生じなかった (図 2D)。さらにピロカルピン刺激による涙液分泌の経時的変化を検討した。野生型マウス、*Itpr2*^{-/-}マウスおよび *Itpr3*^{-/-}マウスでは時間依存的に涙腺重量当たりの涙液分泌量が増加したが、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスでは涙液分泌が全く認められなかった (図 2E)。次に、交感神経経路を介した涙液分泌における IP₃R の関与を検討した。アドレナリン作動性薬であるエピネフリンをマウスに腹腔内投与したところ、図 2F に示すように、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの涙液分泌量は野生型マウスと比較して激減した。図 1 の結果から、涙腺には 3 種の IP₃R が発現するが、主たる機能的な IP₃R は IP₃R2 と IP₃R3 であり、ムスカリン作動性経路およびアドレナリン作動性経路の両方を介した涙液分泌に必須であることが示唆された。

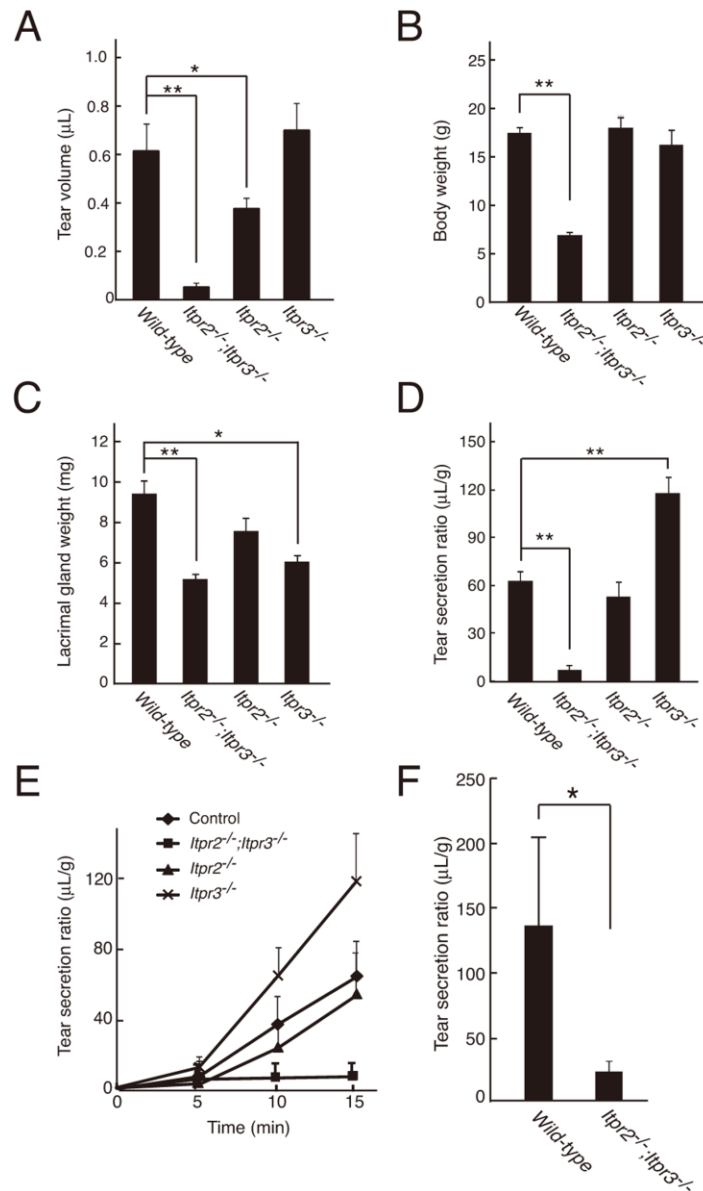


図 2. *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}* マウスにおけるムスカリン作動性経路およびアドレナリン作動性経路を介した重度の涙液分泌障害

(A) 6 週齢時の野生型マウス (n = 12)、*Itp2^{-/-}* マウス (n = 6)、*Itp3^{-/-}* マウス (n = 6) および *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}* マウス (n = 10) のピロカルピン刺激による涙液分泌量を測定した。(B) 6 週齢における野生型マウス、*Itp2^{-/-}* マウス、*Itp3^{-/-}* マウスおよび *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}* マウスの体重を測定した。(C) 6 週齢時の野生型マウス、*Itp2^{-/-}* マウス、*Itp3^{-/-}* マウスおよび *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}* マウスの涙腺重量を測定した。(D) ピロカルピン刺激による各涙腺の重量あたりの涙液分泌量を示した。(E) 野生型マウス (◆)、*Itp2^{-/-}* マウス (▲)、*Itp3^{-/-}* マウス (✕)、*Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}* マウス (■) におけるピロカルピン投与後の 5 分毎の涙液分泌量の経時的変化を測定した。(F) エピネフリン刺激による野生型マウスおよび *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}* マウスの涙腺重量あたりの涙液分泌量を測定した。すべてのデータは平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示す。(A) ~ (D) は Tukey の多重比較検定を、(E) は Mann-Whitney の U 検定をそれぞれ行った。**p* < 0.05; ***p* < 0.01。

1-3-3. 涙腺腺房細胞における ACh およびエピネフリン誘発 Ca²⁺応答

涙腺細胞からの涙液分泌は小胞体からの Ca²⁺放出が引き金となって起こる。そこで、小胞体からの Ca²⁺放出における IP₃R の役割を明らかにするため、各 IP₃R 欠損マウスから単離した涙腺細胞において ACh およびエピネフリン誘発性 Ca²⁺応答反応を検討した。野生型マウス涙腺腺房細胞を ACh により刺激すると、濃度依存的に Ca²⁺応答が生じた (図 3A、3B)。Itpr2^{-/-}マウスの涙腺腺房細胞における ACh 誘発性 Ca²⁺応答のピーク振幅は野生型マウスの細胞の Ca²⁺応答のものと同程度であった (図 3A、3B)。Itpr3^{-/-}マウスでは、Ca²⁺応答のピーク振幅は減少したものの、反応の持続時間は野生型の反応と比較して長く、ACh (3 μM) によって生じた反応では有意に Ca²⁺応答が持続する傾向が認められた (3 μM ACh 誘発、野生型マウス ; 62.3 ± 5.3 秒、Itpr3^{-/-}マウス ; 129.4 ± 7.3 秒、*p* = 0.03)。一方、Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウス涙腺腺房細胞では ACh 誘発性 Ca²⁺応答は発生しなかった (図 3A、3B)。野生型マウス涙腺腺房細胞をエピネフリンにより刺激すると Ca²⁺応答が認められたが、Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウス涙腺腺房細胞では、エピネフリン誘発性 Ca²⁺応答は認められなかった (図 3C、3D)。さらに、Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウス涙腺腺房細胞のエピネフリン誘発 Ca²⁺応答の減少が小胞体 Ca²⁺の枯渇による可能性を排除するため、Ca²⁺ポンプ阻害剤である cyclopiazonic acid (CPA) を細胞に処置した。図 3C に示すように、CPA は小胞体からの Ca²⁺漏出を誘発したため、エピネフリン誘発 Ca²⁺応答の減少は小胞体 Ca²⁺の枯渇によるものではないことが示唆された。以上の結果からムスカリン作動性経路およびアドレナリン作動性経路における IP₃R2 と IP₃R3 は Ca²⁺応答シグナルに必須であることが示唆された。

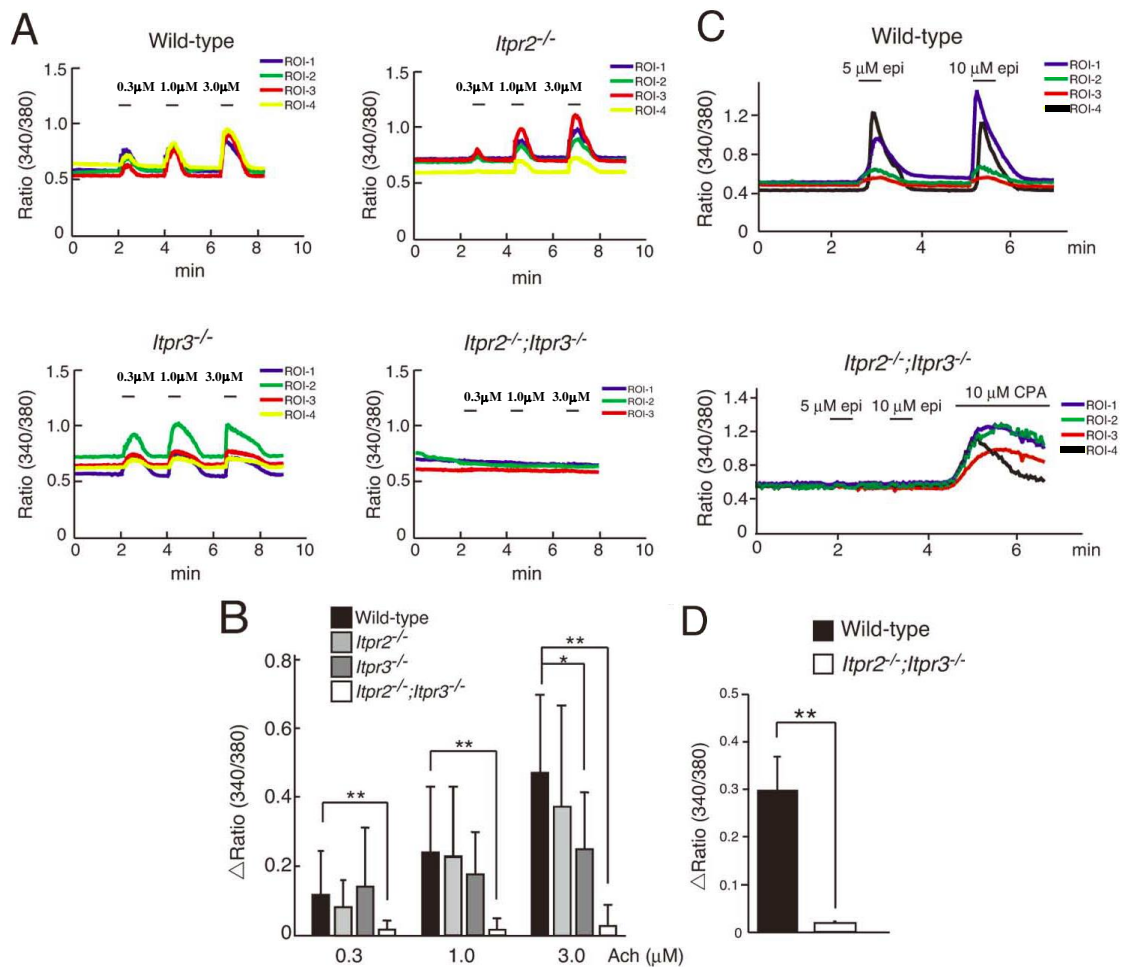


図 3. *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウス涙腺腺房細胞における ACh およびエピネフリン誘発 Ca²⁺応答

(A) 野生型マウス、*Itpr2*^{-/-}マウス、*Itpr3*^{-/-}マウス、および *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスから抽出した涙腺を用い、涙腺腺房細胞のアセチルコリン (ACh) の濃度依存的な Ca²⁺応答を測定した。ROI-1-4 は同視野の別々の涙腺腺房細胞における Ca²⁺応答を示した。(B) 涙腺腺房細胞を 0.3、1.0、3.0 μM ACh で連続的に刺激し、Ca²⁺応答のピーク振幅を定量化した。(C) 5、10 μM エピネフリン (Epi) 刺激に反応した Ca²⁺応答を測定した。*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウス涙腺腺房細胞を 10 μM CPA で処置し、小胞体内の Ca²⁺貯蔵を測定した。(D) 5 μM エピネフリンによる Ca²⁺ピーク振幅を定量化した。すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。(B) は Tukey の多重比較検定を、(D) は、Mann-Whitney の U 検定をそれぞれ行った。**p*<0.05; ** *p*<0.01。

1-3-4. *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスにおけるドライアイ様病態

涙液分泌が著しく障害されていた *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの眼表面を観察し、野生型マウスと比較した。*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの眼表面は野生型マウスに認められない多くの分泌物が観察された (図 4A)。野生型マウスおよび *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの結膜を病理組織学的に検討したところ、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの結膜上に大量のムチンが観察され、ドライアイ患者によくみられる杯細胞の減少が認められた (図 4B)。また、3 週齢の野生型マウスと *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの眼表面では角膜フルオレセインスコアに有意差が認められなかったが、6 週齢の *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスでは角膜の異常を示す角膜フルオレセイン染色スコアの増加を示し、角膜上皮のバリア機能の破綻が明らかとなった (図 4C、4D)。従って、角膜上皮障害は開眼直後の角膜表面の発達異常によるものではないと考えられる。*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスでは涙液量が不十分で多くの分泌物が眼表面に蓄積し、まばたきの回数が増加していた (図 4E)。

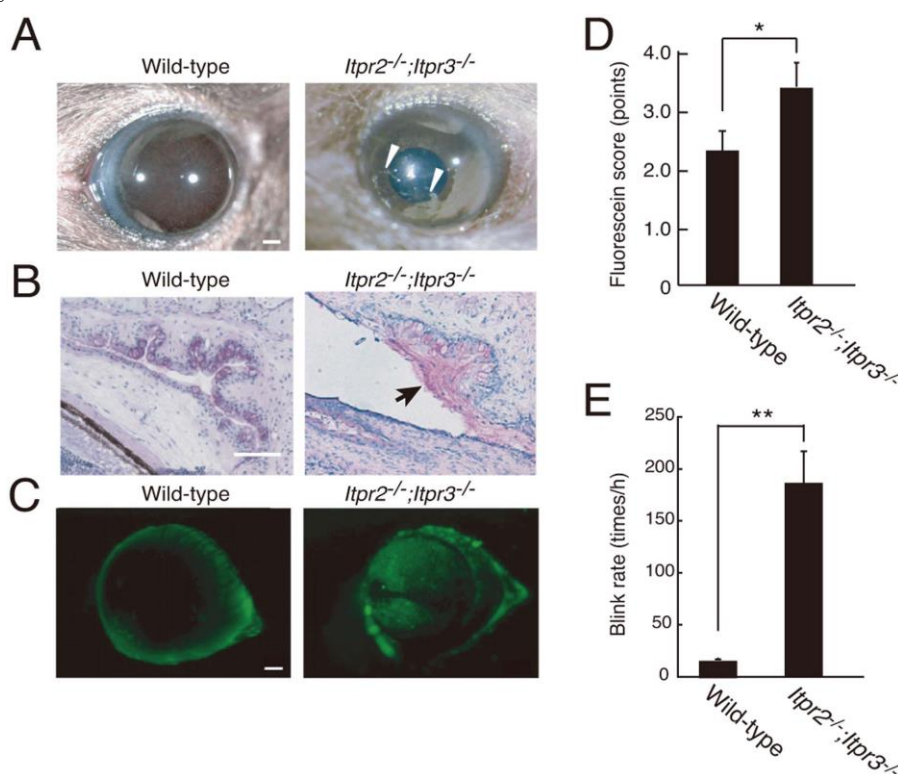


図 4. *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスにおける眼表面のドライアイ病態

(A) 野生型マウスおよび *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウス眼表面を撮影した。*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの眼表面に分泌物が認められた (白矢印)。Scale bar: 1 mm. (B) 野生型マウスおよび *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの結膜切片を PAS で染色した。*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウス結膜には多数のムチン複合体 (黒矢印) が認められた。Scale bar: 50 μ m. (C, D) 野生型マウスおよび *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウス眼表面の角膜フルオレセイン染色を行い、角膜フルオレセイン染色スコアを算出した。Scale bar: 1 mm. (E) 野生型マウスおよび *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの 1 時間あたりのまばたき回数を測定した。すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で示した。Student の *t* 検定、* p <0.05; ** p <0.01。

1-3-5. *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウスにおける涙腺の萎縮

野生型マウスおよび *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウス涙腺の組織学的解析を行った。8週齢の野生型マウスと *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウスの涙腺を比較したところ、*Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウス涙腺において、顕著なリンパ球浸潤を伴う涙腺腺房の萎縮を認めた (図 5A)。さらに電子顕微鏡による観察においても、野生型マウスおよび *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウス間で腺房細胞の違いを認めた。野生型マウスの涙腺腺房細胞の分泌顆粒は腺房のアピカル側に位置し、よく発達した小胞体構造が観察された (図 5B)。しかし、*Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウスの涙腺腺房細胞では細胞質内で小胞体が観察できないほど分泌顆粒が細胞質内に蓄積していた (図 5B)。さらに、野生型マウスおよび *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウスの腺房細胞の面積を比較したところ、*Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウスの涙腺腺房細胞は野生型マウス涙腺腺房細胞よりも約 40%小さく、萎縮していることが示唆された (図 5C)。

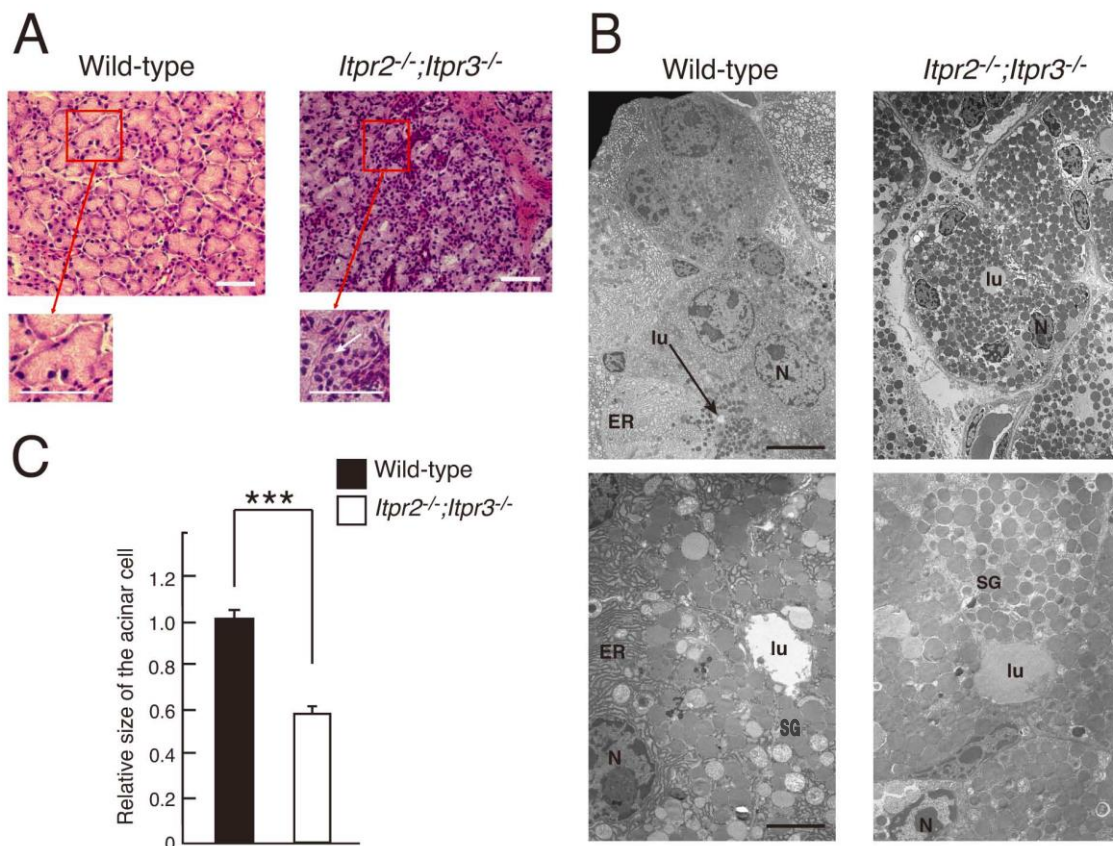


図 5. 涙腺の組織学的解析および電子顕微鏡による観察

(A) 野生型マウスおよび *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウスの涙腺組織切片を Hematoxylin/Eosin (H/E) で染色し、光学顕微鏡で観察した。白い矢印は炎症性細胞の浸潤を示した。Scale bar: 50 μ m。(B) 野生型マウスおよび *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウスの涙腺を電子顕微鏡で撮影した。Scale bar: 上図:5 μ m、下図:2 μ m。N:核、lu:内腔、ER;小胞体、SG:分泌顆粒。(C) 野生型マウス (n = 54) および *Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}*マウス (n = 59) 涙腺腺房細胞の HE 染色画像を用いて涙腺腺房細胞面積を測定し、相対的面積を算出した。数値は平均値 \pm 標準誤差を示した。Student の *t* 検定、*** $p < 0.001$ 。

1-3-6. $Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}$ マウス涙腺における炎症の亢進

野生型マウスおよび $Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}$ マウス涙腺への炎症性細胞の浸潤をさらに検討するため、いくつかのリンパ球マーカー（炎症性単核細胞; CD45、マクロファージ; F4/80、T細胞; CD4 および CD8、B細胞; CD19）を用いて炎症性細胞の浸潤を検出した。10週齢の $Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}$ マウス涙腺において、CD45陽性の炎症性単核細胞が涙腺に浸潤していることを見出した（図 6A、左図、白矢頭）。これらの CD45陽性細胞は涙腺腺房細胞周囲の間質腔に位置していた。10週齢のマウス涙腺ではマクロファージと活性化 T細胞の浸潤が主要な炎症細胞であったが（図 6A）、野生型マウスの涙腺では、欠損マウスで観察されたような炎症細胞の浸潤は認められなかった。さらに、40週齢の $Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}$ マウス涙腺では浸潤細胞の集団がその後変化し、マクロファージと活性化 T細胞が減少し、B細胞が多く検出された（図 6A、右図、黒矢印）。40週齢の野生型マウスの涙腺には、10週齢の $Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}$ マウスと同程度の炎症性細胞の浸潤が認められ、同欠損マウスの組織変化と類似していた。また、炎症性サイトカインのレベルを評価することにより涙腺の炎症状態を検討した。real time RT-PCR法にて炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6 の mRNA レベルを測定すると、野生型マウス涙腺と比較して $Itp2^{-/-};Itp3^{-/-}$ マウスの涙腺で有意に増加していることが明らかとなった（図 6B および C）。

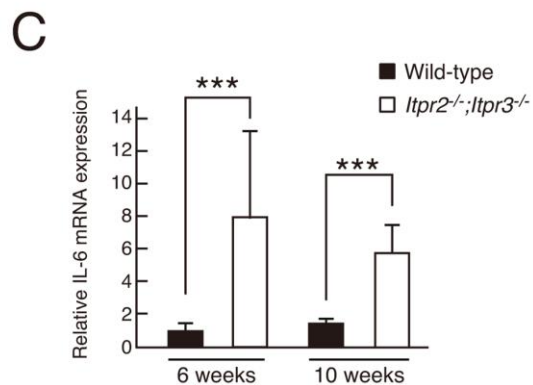
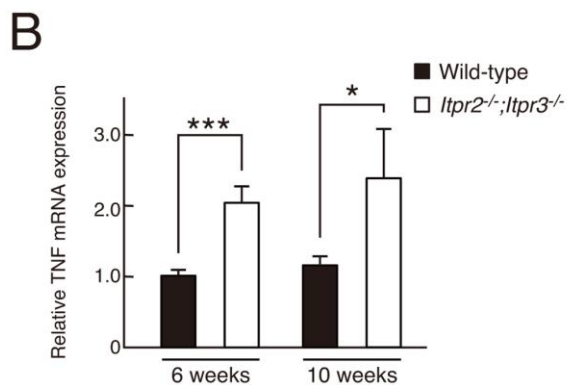
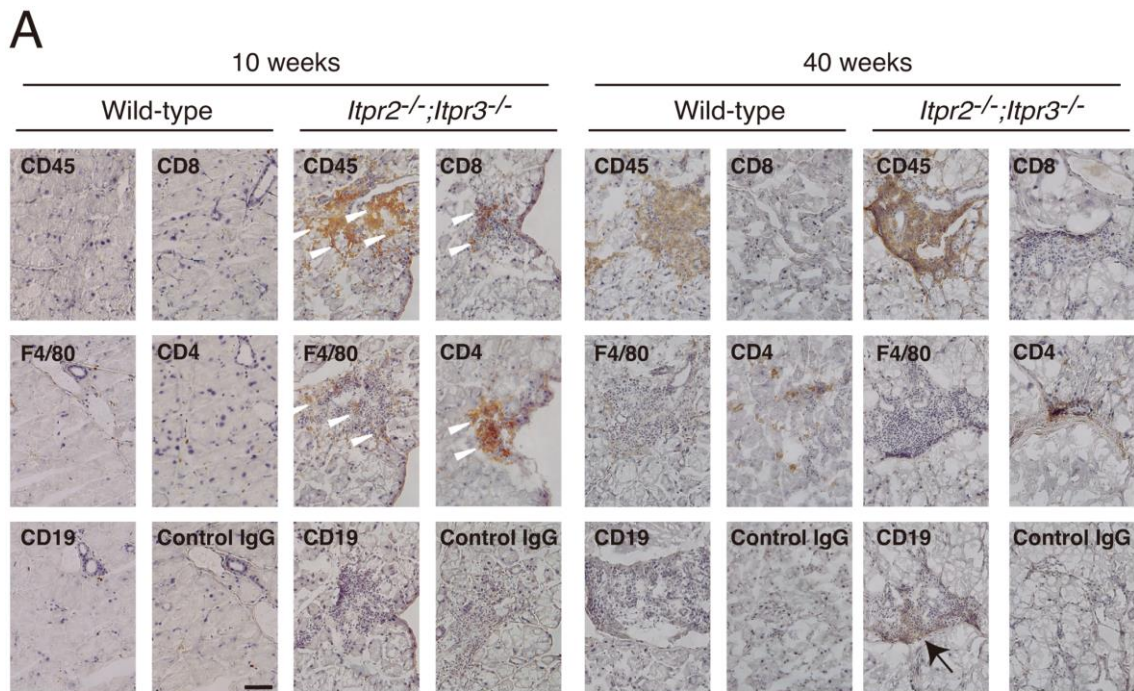


図 6. *Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウス涙腺における炎症の亢進

(A) 野生型マウスおよび *Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウスの涙腺組織切片を用いて CD45、F4/80、CD19、CD8 および CD4 を免疫組織化学的に染色した (白矢頭; 炎症性単核細胞、黒矢印; B 細胞)。(B) 6 週齢の野生型マウス (n=8) および *Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウス (n=8)、10 週齢の野生型マウス (n=16) および *Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウス (n=10) 涙腺より total RNA を抽出し、real time RT-PCR 法により TNF- α mRNA 発現量を定量した。

(C) 図 6B と同様に IL-6 mRNA 発現量を定量した。データはすべて平均値 \pm 標準誤差で示した。Mann-Whitney の U 検定、*** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$ 。

1-3-7. *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウス血中 IgG および IgA の量および自己抗体の増加

Itpr2^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの涙腺腺房細胞周辺には、リンパ球の浸潤が認められ、特に病変組織には顕著な活性化 CD4 陽性 T 細胞の集積が認められた。その後浸潤細胞の集団が B 細胞の集団に変化するなどシェーグレン症候群病態の変化に類似していた [23, 24]。そこで自己免疫反応の有無を明らかにするため、自己抗体の発現を検討した。

野生型マウスおよび *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスの血清中の IgG および IgA の量およびシェーグレン症候群患者で最も一般的に検出される自己抗体の 1 つである抗 SS-A 抗体の濃度を調べた。IgG なかでも IgG1 および IgG2a は野生型マウスより *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスにおいて有意に高く (図 7A)、SS-A に対する自己抗体の濃度は、炎症性細胞の浸潤が観察された 10 週齢以上のマウスで、野生型マウスと比較して、*Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスで有意に高いことがわかった (図 7B)。

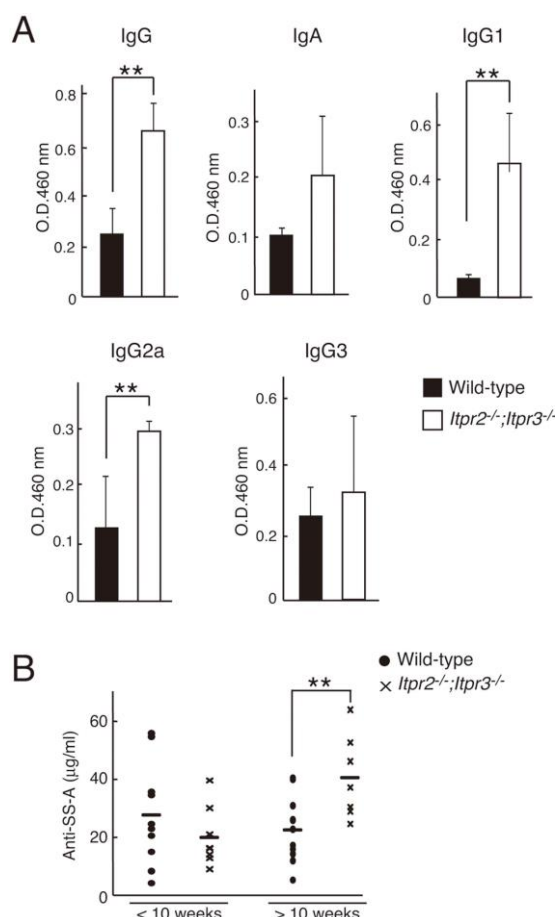


図 7. *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスにおける IgG および IgA の量および SS-A 抗原に対する自己抗体の上昇

(A) 8 週齢の野生型マウスおよび *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウスから血清試料を採取した。IgG, IgA, IgG1, IgG2a, IgG3 の血清中濃度を ELISA で測定した。(B) 野生型マウス (6 週齢, n = 10; 10~35 週齢, n = 11) および *Itpr2*^{-/-};*Itpr3*^{-/-}マウス (6 週齢, n = 8; 10~35 週齢, n = 7) の SS-A 抗原に対する自己抗体の血清中濃度を ELISA で測定した。データはすべて平均値±標準誤差で示した。Student の *t* 検定、***p*<0.01。

1-4. 考察

本研究では、涙液分泌における IP₃R サブタイプの役割を明らかにするために IP₃R2 および IP₃R3 サブタイプ欠損マウスを用いて解析を行った。その結果、ムスカリンおよびアドレナリン作動性涙液分泌において、IP₃R2 および IP₃R3 の両サブタイプが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、*Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウスでは涙液の分泌低下、まばたきの増加、角膜表面および結膜に重度の障害が認められ、ドライアイ様病態を示した。40 週齢の *Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウスでは、涙腺の萎縮とリンパ球浸潤による炎症が認められるとともに、ヒトシェーグレン症候群患者と同様、血清中に SS-A に対する自己抗体の産生が認められた [23,24]。これらの結果は、*Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウスがシェーグレン症候群様表現型を有する新規ドライアイモデルマウスとして利用できる可能性を示唆している。

涙液分泌は交感神経と副交感神経により支配されており、ムスカリン受容体およびアドレナリン受容体を介して涙液分泌が促進される。しかしながら、その分泌メカニズムについては不明な点も多い。本研究では、涙液分泌およびその引き金となる涙腺細胞の Ca²⁺応答における IP₃R の役割について検討を行った。*Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウスでは顕著なリンパ球浸潤を伴う涙腺腺房組織の萎縮が認められ、同欠損マウスにピロカルピンを処置しても涙液分泌はほとんど生じなかった。一方、IP₃R2 か IP₃R3 の遺伝子のどちらかを欠いたマウスの涙腺では形態学的異常は認められず、ピロカルピンを処置すると十分な量の涙液分泌が生じた。*Itpr3^{-/-}*マウスでは、涙腺あたりの涙液分泌量がむしろ亢進していることから、IP₃R2 が機能的に補っている可能性が考えられた。これらの結果は、副交感刺激における涙腺からの涙液分泌において IP₃R2 および IP₃R3 の両方が関与していることを示している。また、IP₃R2 あるいは IP₃R3 が欠損すると残存したサブタイプが代償的に働いて涙液分泌機能を補うことも示唆された。各 IP₃R サブタイプは IP₃ と異なった結合親和性を示すことが報告されており、IP₃ は特に IP₃R2 との結合が強いことが知られている [20]。涙腺における IP₃R2 の発現量は IP₃R3 の発現量より少ないが、IP₃ との親和性が高いため、反応の持続時間が長くなることが予想される。実際に、*Itpr3^{-/-}*マウスでは Ca²⁺応答の持続時間が野生型と比べて長くなる傾向が認められた。それ故、IP₃R2 のみでも涙液分泌に必要な Ca²⁺応答を引き起こすことができるのかもしれない。一方、IP₃R3 は IP₃ との親和性が IP₃R2 と比較して低い、受容体の発現量が多いため、十分な Ca²⁺応答を引き起こすことができると考えられる。

交感神経から放出されたノルエピネフリンは涙腺腺房細胞の Ca²⁺放出を誘発することがよく知られている [25]。この反応は主に α1 受容体を介していることが知られており、一部、β受容体の関与も示唆されている [5, 6]。しかし、副交感神経刺激による反応とは対照的に、αアドレナリン受容体刺激によって誘発される Ca²⁺放出において中心的な役割を担う Ca²⁺チャンネルは涙腺腺房細胞では明確には同定されていない。これまでのいくつかの研究では、ノルピネフリンによる涙腺の Ca²⁺放出にリアノジン受容体が関与していることが示唆されている [5]。*Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}*マウスの涙腺腺房細胞では、エピネフリンにより誘発さ

れる Ca^{2+} 応答および涙液分泌がほぼ消失したことから、涙腺のアドレナリン作動性経路において、 IP_3R を介した Ca^{2+} 放出が不可欠であることが明らかとなった。

$\text{Itpr}2^{-/-};\text{Itpr}3^{-/-}$ マウスでは、ドライアイ患者特有の臨床所見である涙液の減少、まばたき数の増加、角膜上皮の障害に加え、角結膜へのムチンなどの分泌物の蓄積、杯細胞の減少が認められた。さらに、 $\text{Itpr}2^{-/-};\text{Itpr}3^{-/-}$ マウスの涙腺ではリンパ球の浸潤、腺房細胞の萎縮と分泌顆粒の異常蓄積が認められた。眼表面の乾燥ストレスが涙腺への炎症性細胞の浸潤を引き起こすことが知られている [26]。 $\text{Itpr}2^{-/-};\text{Itpr}3^{-/-}$ マウスでは涙液分泌が著しく障害され、まばたきの回数が増加していた。これらに伴って、角膜には大きな摩擦が生じ、角膜障害が引き起こされたものと考えられる。涙腺細胞の長期にわたる機能不全によって引き起こされる角結膜障害は、抗原提示細胞の活性化を引き起こし [27]、涙腺周辺で共有される内因性エピトープに対する免疫寛容が破綻する可能性が示唆されており [28]、同欠損マウスにおける涙腺の炎症発現に関与している可能性がある。また、 IP_3R を介した Ca^{2+} シグナリングの阻害が炎症を誘発している可能性も除外できず、涙腺におけるリンパ球の浸潤メカニズムを明確に理解するためには、更なる研究が必要である。

$\text{Itpr}2^{-/-};\text{Itpr}3^{-/-}$ マウスでは眼表面を取り巻く涙腺ユニットに涙液分泌障害など異常な表現型が認められた。また、 $\text{Itpr}2^{-/-};\text{Itpr}3^{-/-}$ マウスの週齢が経過するに従って涙腺での炎症細胞集団が T 細胞集団から B 細胞集団の浸潤へと変化した。B 細胞の増加に伴って野生型マウスと比べて血清中の IgG および IgA および抗 SS-A 抗体量が高値を示した。先行研究 [17] で明らかにした $\text{Itpr}2^{-/-};\text{Itpr}3^{-/-}$ マウスの唾液減少とともに、涙腺へのリンパ球浸潤、角膜上皮障害、SS-A に対する自己抗体の産生など、 $\text{Itpr}2^{-/-};\text{Itpr}3^{-/-}$ マウスの多彩な症状が、American-European Consensus Group が提唱するシェーグレン症候群の診断基準を満たしている [29]。それ故、 IP_3R がヒトのシェーグレン症候群の病態に関与している可能性が考えられる。実際にシェーグレン症候群患者の血清中では、 IP_3R に対する自己抗体が増加しているという報告がなされている [30]。これまでにマウスシェーグレン症候群モデルとして Non Obese Diabetes マウスが報告されている [31]。シェーグレン症候群では涙液分泌応答と炎症との関連が疑われているが、この点を明らかにするうえで、Non Obese Diabetes マウスモデルでは糖尿病を発症する等の様々な問題点が指摘されている。それ故、 $\text{Itpr}2^{-/-};\text{Itpr}3^{-/-}$ マウスは、このような問題点を克服したシェーグレン症候群病態を示す初めてのドライアイモデルマウスとして活用できると考えられる。今後、同マウスをモデル動物として用いた研究により、シェーグレン症候群の病態進行メカニズムの解析や新たな治療法の開発が進むことが期待される。

本研究では、 $\text{IP}_3\text{R}2$ と $\text{IP}_3\text{R}3$ が涙腺からの涙液分泌と関連した眼の恒常性維持において中心的な役割を果たすことを実証した。ムスカリンおよびアドレナリン作動性涙液分泌の引き金となる涙腺腺房細胞における Ca^{2+} 放出には、 $\text{IP}_3\text{R}2$ と $\text{IP}_3\text{R}3$ の両方が必須であることを示した。 $\text{Itpr}2^{-/-};\text{Itpr}3^{-/-}$ マウスは涙腺の Ca^{2+} シグナル伝達の異常によって引き起こされるシェーグレン症候群に類似した症状を示す新しいドライアイモデルマウスであることが示

唆された。今後、同マウスを用いた研究により、涙腺の炎症によって生じるドライアイに対する治療薬の開発が進み、ドライアイ患者の治療選択肢の拡充に貢献したい。

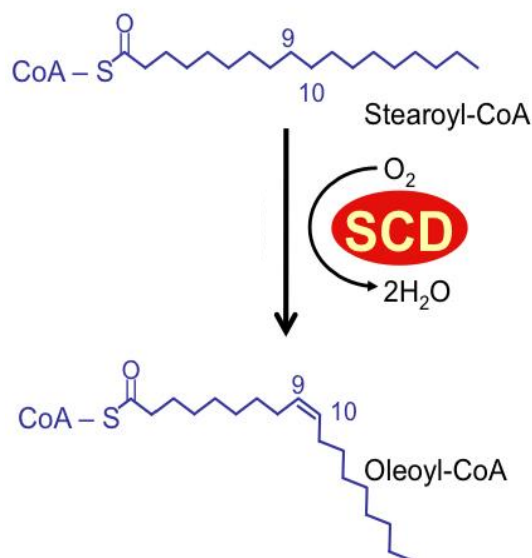
2. SCD-1 欠損によるマイボーム腺の異常をもたらす涙液量とムチン

の代償的增加機構

2-1. 序論

マイボーム腺は脂質を分泌し、涙液 3 層構造のうち油層の供給源として重要である。マイボーム腺分泌物は、コレステロールとワックスエステル、トリアシルグリセロール、遊離コレステロール、遊離脂肪酸、リン脂質を含む極性脂質あるいは非極性脂質の複雑な混合物であり、涙液の蒸発を防止することにより、涙液の層構造として安定に保つ役割を果たしている [32]。

マイボーム腺機能不全 (MGD) はマイボーム腺の慢性またはびまん性の異常であり、マイボーム腺導管の閉塞にともなうマイボーム腺分泌物の質的および量的変化が生じる疾患である [33-36]。さらに、これら閉塞にともなう腺分泌物の変化は涙液機能の変化、眼の不快感、眼表面における重度の炎症、または上皮障害を引き起こす [37]。これら病態は炎症あるいは常在菌の関与をともなう場合とともなわない場合があり、軽症例から重症例まで重症度が広範囲にわたる多様な臨床プロファイルを呈する。MGD の発症原因、病態には不明な点が多く残されており、現時点では MGD に対する有効な治療法はほとんどない。さらに、MGD の病態が解明されない理由の一つとして、ヒトの臨床所見を外挿する有用な動物モデルが存在しないことが考えられた。これまでにマイボーム腺に異常をきたす動物モデルとして *stearoyl-Coenzyme A desaturase* (SCD) -1 欠損マウスが報告されているが、眼における涙液の安定性についての解析はほとんどされていない [38]。



模式図 3. *stearoyl-Coenzyme A desaturase 1* の作用

近年、ライフスタイルの欧米化が進行し、過食や運動不足による高血圧、高脂血症および糖尿病などのいわゆるメタボリックシンドロームが増加していることが問題となっている。メタボリックシンドローム患者で MGD の発症率が高いという報告がある。また、生活習慣病による代謝異常がドライアイと密接に関係していることも示唆されている [39-41]。従って、MGD の病態において脂質代謝変化が重要な役割を果たしている可能性がある。SCD-1 は飽和脂肪酸であるステアリン酸 (18:0) およびパルミチン酸 (16:0) に二重結合を導入し、それぞれオレイン酸 (18:1) とパルミトレイン酸 (16:1) を産生する酵素である (模式図 3) [42-44]。SCD-1 は血液中の脂質であるトリグリセリド、遊離脂肪酸、コレステロールおよび遊離コレステロールの生成に変化をもたらし、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、脂質異常症誘発乾燥皮膚 (ドライスキン) およびマイボーム腺の萎縮など多くの病態に関わっていることが報告されている [38, 45-49]。SCD-1 欠損マウスでは LDL の分泌低下やコレステロールエステルとトリグリセリドの合成が低下し、肥満や糖尿病に抵抗性を示す [50]。また、2 型糖尿病患者では涙液の量またはその質の低下が報告されており [51]、動物レベルでも自然発症糖尿病モデルマウス (db/db マウス、レプチン受容体変異マウス) の涙液分泌量が低下していることが報告されている [52]。これら糖尿病マウスでは SCD-1 の発現量が増加し、fatty acid synthase (FASN)、uncoupling protein-1 (UCP-1) などの脂肪酸合成やエネルギー代謝に関わる遺伝子が増加している。さらに SCD-1 欠損マウスではコレステロールの合成に関わる low density lipoprotein receptor (LDLR) の減少が報告されており、涙液機能に SCD-1 が関与している可能性が考えられた [53-55]。そこで、本研究では、SCD-1 欠損マウスにおいて脂質代謝に関わる遺伝子の減少が涙腺機能に影響を及ぼすかを検討した。

本研究にて SCD-1 欠損マウスではマイボーム腺の萎縮、結膜杯細胞数の増加および MUC5AC mRNA の発現亢進を認め、涙腺では涙液分泌量および涙腺重量の増加を認めた。また、脂質代謝に関わる遺伝子である FASN、UCP-1 および LDLR が減少し、トランスポーターである glut-4 の発現増加が認められた。これらの変化は涙液量およびムチン産生の増加をもたらし、マイボーム腺の異常に対する代償機構としての役割を担っていると考えられる。また、涙液の安定性は、油層、水層、ムチン層が協調して維持されていることも明らかとなった。これらマイボーム腺から油の分泌が不足している MGD 患者では涙液量が増加しているなど、SCD-1 欠損マウスと多くの部分で類似した病態が認められたことから、SCD-1 欠損マウスの解析はヒトの MGD の病態解明、薬剤開発につながる可能性があり、臨床的意義は極めて高い。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 使用動物

野生型マウス (C57BL/6J) は日本クレアから購入し、遺伝的背景に C57BL/6J を有する SCD-1 欠損マウス (B6.129-Scd1tm1Ntam/J;000201) をジャクソン研究所 (Maine 州、USA) から購入した [38]。涙液量の経時的変化は 5~35 週齢のマウスを使用し、その他の試験は 10 週齢のマウスを使用した。実験動物を用いた実験については慶應義塾大学医学部動物実験委員会より承認され、動物の飼育および取扱いは ARVO の声明および慶應義塾大学動物実験ガイドラインの諸規定に従った。動物福祉に配慮しつつ、科学的に適正な実験を行った。なお、安楽死の方法として頸椎脱臼を実施した。

2-2-2. 涙液量の測定

フェノールレッド含有綿糸 (Zone-Quick, 昭和薬品化工) を用いて、綿糸試験により涙液分泌量を測定した。麻酔を行わずにマウスを拘束し、下眼瞼外側部に綿糸を 30 秒間置いた。左右の眼の両方について実施し、湿潤断片の長さを測定した。

2-2-3. 病理組織学的検査

摘出した涙腺、結膜、マイボーム腺を OCT compound (サクラファインテックジャパン) に包埋し、病理学的検査に用いた。包埋した涙腺または結膜の凍結切片を厚さ 5 μm で作製し、スライドガラスに張り付けた。スライドガラスに張り付けた凍結切片を 10%ホルマリン中性緩衝液 (和光純薬) で固定し、涙腺およびマイボーム腺は H/E、結膜は PAS で染色した。

2-2-4. 結膜の杯細胞数の測定

野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの結膜杯細胞数の定量には PAS 染色切片を用いた。以前に報告された手法を用いて 445 μm ×352 μm フレーム内に存在する杯細胞数を測定した [56]。各群の杯細胞密度 (杯細胞数/ μm^2) として平均化した。

2-2-5. 免疫組織化学的解析

野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスから摘出した涙腺を用いて SCD-1 の発現を免疫組織化学的に検出した。摘出した涙腺を OCT compound に包埋し、氷上で凍結した。スライドガラスに張り付けた凍結切片を 10%ホルマリン中性緩衝液で固定し、PBS で 10 分間洗浄後、0.5% Triton X-100 溶液中で 10 分間浸し、透過処理を行った。試料を 10% BSA 溶液中で 1 時間ブロッキングし、0.05% Tween-20 を含む TBS で 10 分間洗浄後、SCD-1 に対するマウスモノクローナル一次抗体 (1:1,000; Cell Signaling Technology) を用い 4°C で一晩反応した。TBST で洗浄後、切片を Alexa Fluor 555 標識ウサギ抗マウス抗体 (DAKO) を二次抗体として加え、室温で 1 時間反応した。TBST で洗浄後、DAP (Dojindo) で核染色

をした。蛍光顕微鏡 (BZ-H1M; Keyence) で試料の蛍光シグナルを観察した。

2-2-6. イムノブロットイング

涙腺を Pro-Prep 溶液 (iNtRON Biotechnology) 中で、ホモジナイザー (T-25; IKA) を用いてホモジナイズした。ホモジナイズした涙腺のタンパク質濃度は、BCA キット (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。1-2-2 項に記した方法に従って SDS-PAGE および PVDF 膜への転写を行った。PVDF 膜は Can Get Signal PVDF (東洋紡) にて 2 時間ブロッキングした。イムノブロットイングの一次抗体にはウサギ抗マウス SCD-1 抗体 (1:1000、Cell Signaling Technology)、ウサギ抗マウス glut-4 抗体 (1:1000、Cell Signaling Technology)、抗マウス β -アクチン抗体 (1:1,000、Sigma) を用い、4°Cで一晩反応を行った。TBST で PVDF 膜を洗浄後、二次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (GE Healthcare) あるいは HRP 標識ヤギ抗マウス抗体 (GE Healthcare) を加え、室温で 1 時間反応した。TBST で PVDF 膜洗浄後、ECL prime detection kit (GE Healthcare) を用いて検出した。シグナル強度は画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health) を用いて定量化し、 β アクチンの発現レベルで補正した。

2-2-7. Real time RT-PCR

マウス涙腺または結膜から TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。RevertraAce Master Mix (TOYOBO) を用いて total RNA から cDNA を作製した。cDNA の解析は 1-2-9 項に記した方法に従って real time RT-PCR を行った。プライマーは MUC5AC、FASN、LDLR、UCP-1 および β -アクチン [TaqMan Gene Expression Assay (MUC5AC: Mm01276718-m1, FASN: Mm00662319_m1, LDLR: Mm01177349-m1, UCP-1: Mm01244861-m1 and beta-actin: Mm00607939-s1)]を用いた。RNA の発現レベルは β -アクチン mRNA レベルで補正し、 $\Delta\Delta CT$ 方法で解析した。

2-2-8. 統計解析

1-2-11 項に記した方法に従って統計解析を実施した。

2-3. 結果

2-3-1. 涙腺における SCD-1 の発現

涙腺における SCD-1 の発現を免疫組織化学的染色とイムノブロッティングにより検討した。免疫組織化学的染色の結果から、SCD-1 は野生型マウスの涙腺腺房細胞の細胞質に存在したが、導管細胞には検出されなかった (図 8A)。また、野生型マウスの腺房細胞では、イムノブロッティングにより分子量 37 kDa のバンドとして SCD-1 が検出された (図 8B)。一方、SCD-1 欠損マウスの涙腺では何れの方法においても SCD-1 の発現は認められなかった。

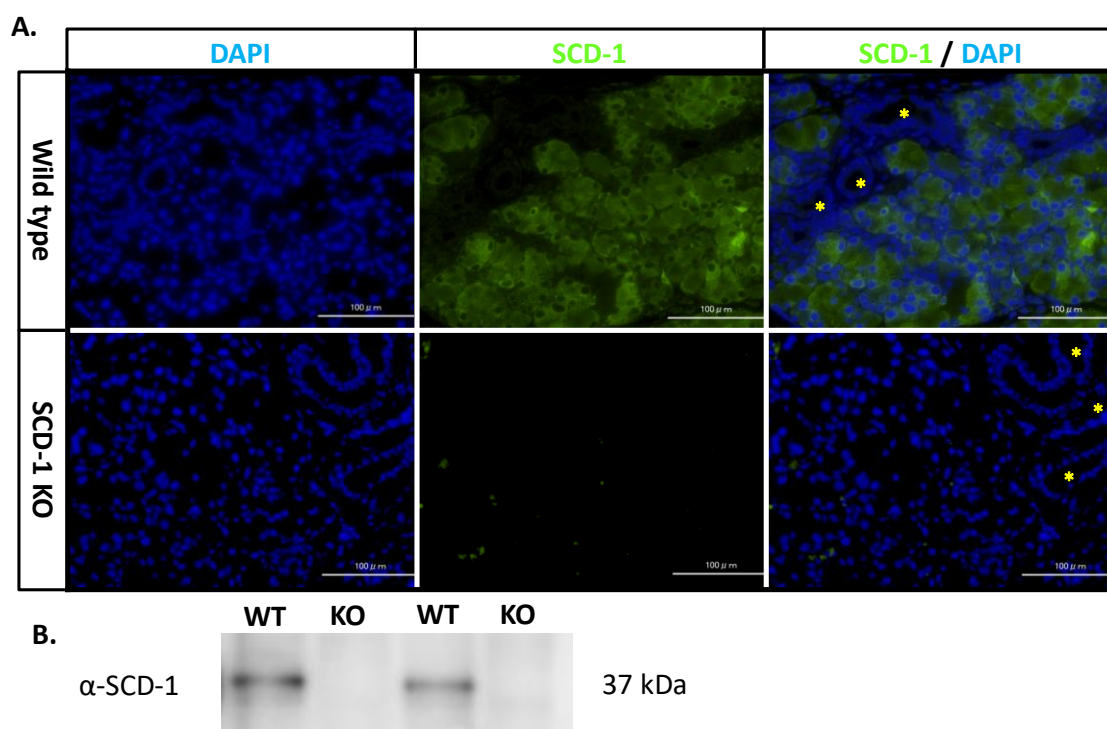


図 8. 涙腺における SCD-1 の発現

(A) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの涙腺における SCD-1 の免疫組織化学的染色を実施した。DAPI (青)、SCD-1 (緑)、および結合画像 (*;導管細胞、Scale bar: 100 μm) を示した。(B) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウス由来の涙腺抽出液を電気泳動後、イムノブロッティングを行い、抗マウス SCD-1 抗体を用いて SCD-1 を検出した。電気泳動の全体像は 6.補助資料の項、資料 3 に示した。

2-3-2. SCD-1 欠損マウスにおける涙液量の増加

野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの眼表面を観察した結果、野生型マウスと比較して SCD-1 欠損マウスではより多くの涙液で満たされていた (図 9A)。そこで、野生型および SCD-1 欠損マウスの涙液量を、綿糸法を用いて評価したところ、SCD-1 欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意な涙液量の分泌亢進が認められた (図 9B)。なお、涙液量の増加は、実験を行った 5~35 週齢のすべての週齢、および、雌雄どちらの SCD-1 欠損マウスでも同様に認められた (図 9B および 9C)。さらに、SCD-1 欠損マウスは、まばたきの回数が増加した (図 9D)。これら結果から脂質合成の障害による油層の欠損により眼表面に何らかの変化が生じたことが予想された。

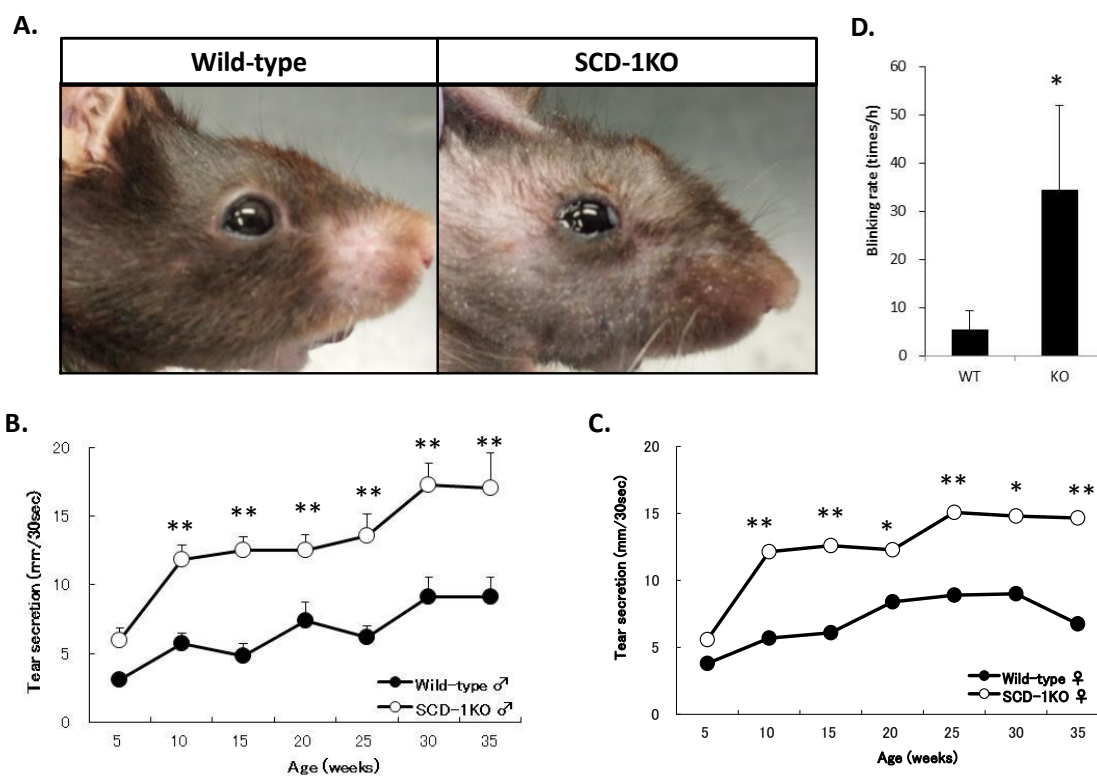


図 9. SCD-1 欠損マウスにおける涙液量の増加

(A) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの眼表面の画像を撮影した。(B, C) 5 週齢から 35 週齢の野生型マウス (n=8) および SCD-1 欠損マウス (n=8) において、週齢変化に伴う涙液量の変化を測定した。雄:B、雌:C。(D) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの 1 時間あたりのまばたきの回数を測定した。すべての実験は平均値±標準誤差で示した。Student の *t* 検定、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

2-3-3. SCD-1 欠損マウスのマイボーム腺の病態

野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスのマイボーム腺の組織学的解析を行った。野生型マウスと SCD-1 欠損マウスのマイボーム腺の H/E 染色像を比較したところ、SCD-1 欠損マウスのマイボーム腺において、顕著な萎縮を認めた (図 10)。

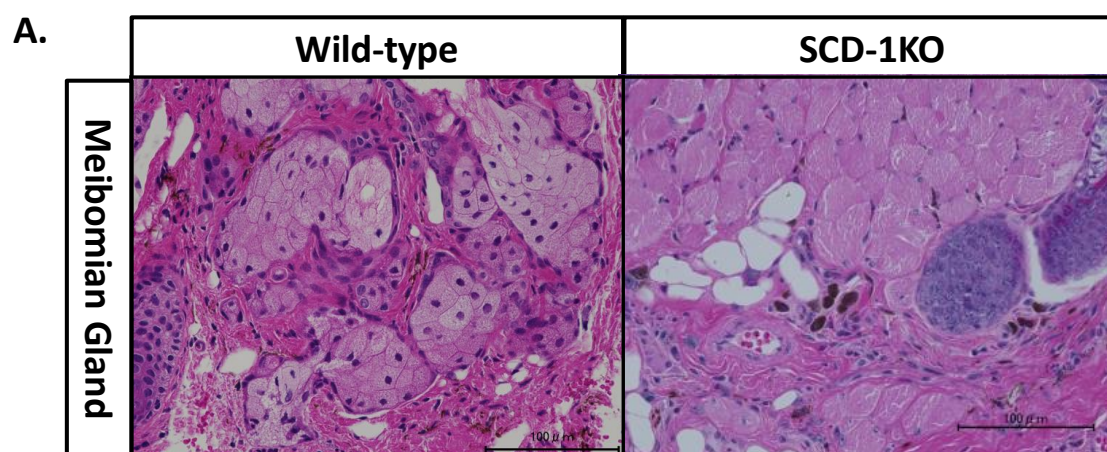


図 10. SCD-1 欠損マウスのマイボーム腺の病態

(A) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスのマイボーム腺の組織切片を H/E で染色し、光学顕微鏡下で観察した。Scale bar: 100 μm .

2-3-4. SCD-1 欠損マウス結膜における杯細胞の増加

野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの結膜切片を PAS 染色し (図 11A)、結膜の杯細胞数を計測した。その結果、SCD-1 欠損マウスの結膜における杯細胞数は野生型マウスの杯細胞数と比較して有意な増加が認められた (図 11B)。さらに、結膜杯細胞の産生する主要なムチンである MUC5AC の mRNA 発現レベルを real-time RT-PCR を用いて測定した。その結果、SCD-1 欠損マウスの結膜において、MUC5AC mRNA の発現量が野生型マウスの結膜における発現量と比較して有意に高いことが示され、杯細胞数が増加した結果と一致した (図 11C)。

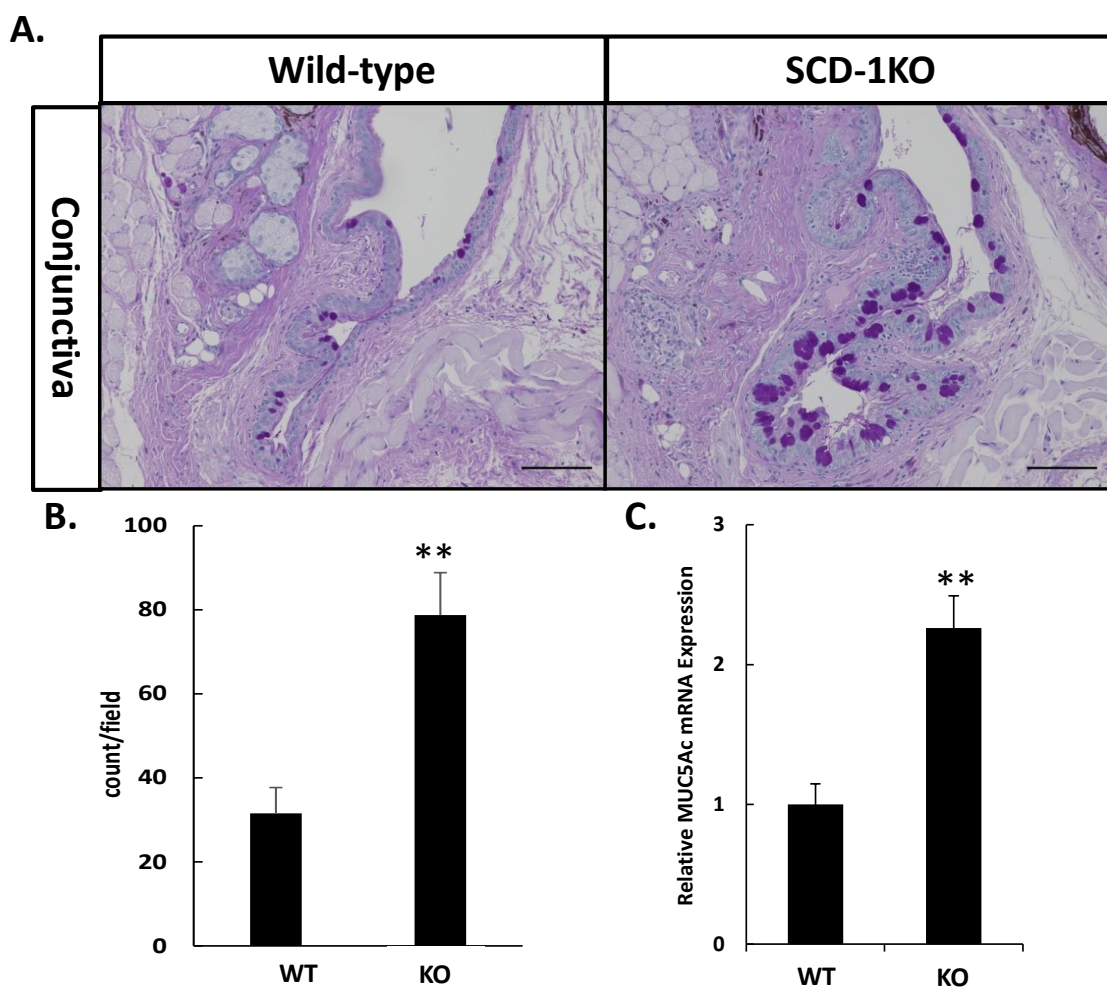


図 11. SCD-1 欠損マウスの結膜における杯細胞の増加

(A) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの結膜の組織切片を PAS で染色し、光学顕微鏡で観察した。Scale bar: 100 μ m. (B) 野生型マウス (n=8) および SCD-1 欠損マウス (n=10) の結膜杯細胞数を測定した。(C) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウス結膜における MUC5AC の mRNA レベルを real time PCR 解析した。すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で示した。Student の *t* 検定、** $p < 0.01$ 。

2-3-5. SCD-1 欠損マウスにおける涙腺重量の増加

SCD-1 欠損マウスにおける涙腺の病理組織学的変化を検討した。野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスにおける涙腺切片の H/E 染色では、顕著な形態学的な変化は認められなかった (図 12A)。しかし、SCD-1 欠損マウスの涙腺重量は野生型マウスと比較して有意に増加した (図 12B)。この涙腺重量の増加は、SCD-1 欠損マウスで観察された涙液分泌の亢進と一致している (図 9A-C)。

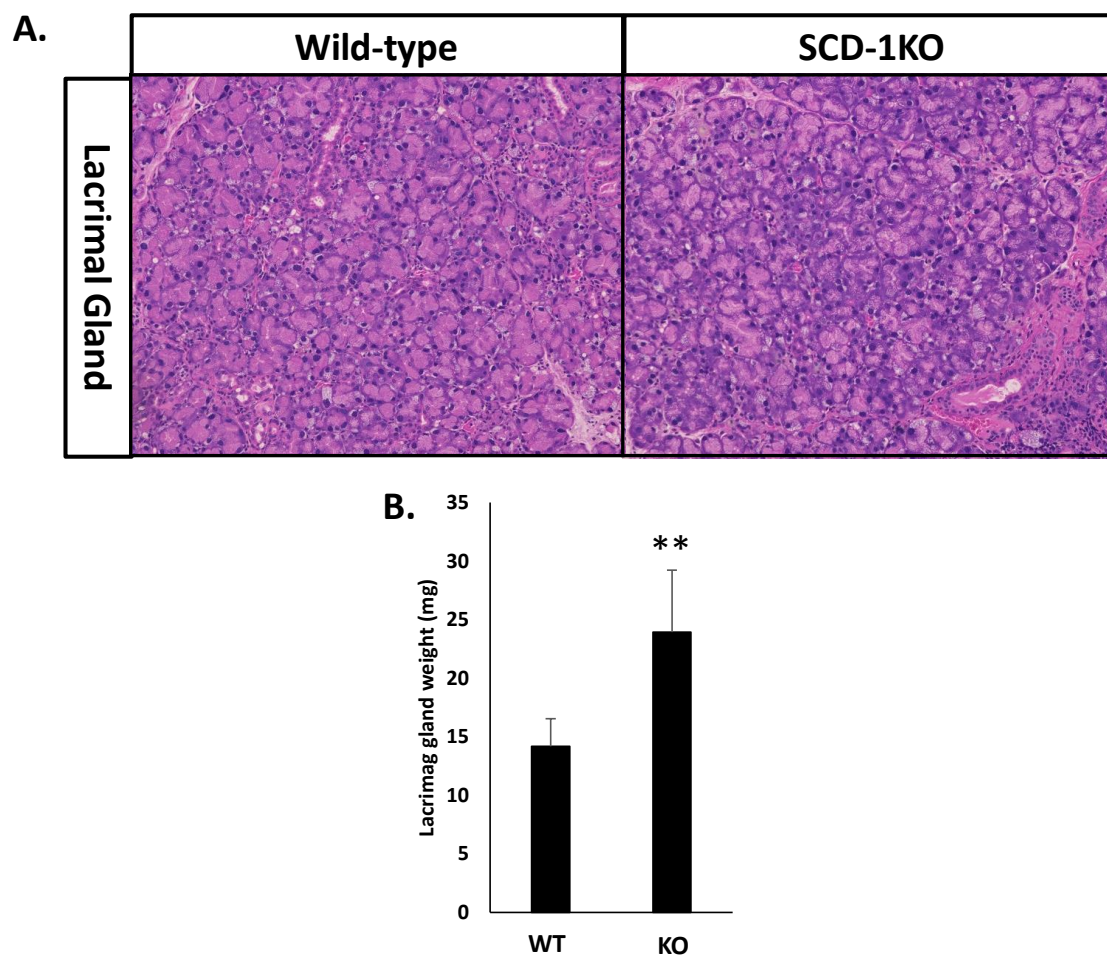


図 12. SCD-1 欠損マウスにおける涙腺重量の増加

(A) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの涙腺の組織切片を H/E で染色し、光学顕微鏡下で観察した。(B) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの平均涙腺重量を測定した。

2-3-6. SCD-1 欠損マウス涙腺における脂肪代謝関連因子の変化

SCD-1 欠損マウスにおける涙液量増加のメカニズムを解明するため、涙腺における脂肪代謝関連因子の関与を検討した。野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスの涙腺において、グルコースからパルミチン酸 (16:0) を合成する脂肪酸合成酵素である FASN、脂質代謝にともなうエネルギー産生の中心的役割を果たす LDLR および UCP-1 の発現レベルを real-time RT-PCR によって検討した。これら遺伝子の発現は、何れも野生型マウスと比較して SCD-1 欠損マウスにおいて有意に減少していた (図 13A)。さらに、イムノブロット解析を用いて、涙腺における *glut-4* の発現が野生型マウスよりも SCD-1 欠損マウスで有意に高いことが明らかとなった (図 13B および 13C)。この増加は、涙腺からの涙液分泌の増加に伴うグルコース消費の増加を反映している可能性が考えられた。

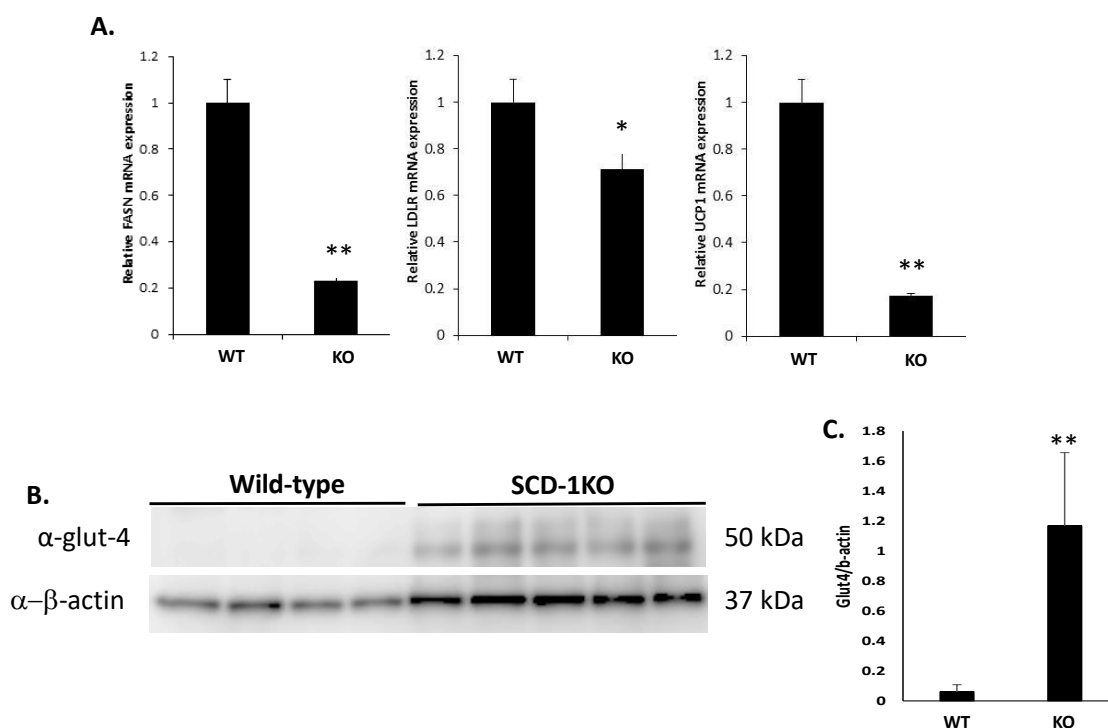


図 13. SCD-1 欠損マウス涙腺における脂肪代謝関連遺伝子の変化

(A) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウス涙腺より total RNA を抽出し、real time RT-PCR 法により、FASN、LDLR および UCP-1 mRNA 発現量を定量した。(B) 野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウス涙腺抽出液を電気泳動し、抗 *glut-4* 抗体および抗 β -アクチン抗体によるイムノブロット解析を行った。電気泳動の全体像は 6.補助資料の項、資料 4 に示した。(C) β アクチンの発現レベルに対する *glut-4* の相対的な発現レベルを算出した。すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で示している。Student の *t* 検定、** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ 。

2-4. 考察

マイボーム腺から分泌される脂質は涙液の蒸発を防止することで眼表面の安定性を維持している。本研究では、SCD-1 欠損マウスにおける涙腺ならびに結膜組織を解析することにより、油層の減少による [38] 涙液層ならびにムチン層におよぼす影響を検討した。

これまでに SCD-1 欠損マウスでは、マイボーム腺のワックスエステルが不足しているなど、脂質の分泌に変化が認められていることが報告されている [38]。本結果では SCD-1 欠損マウスでは、マイボーム腺の異常に対する代償機構として涙腺重量の増加、涙液分泌の亢進ならびに結膜杯細胞数の増加によるムチンの発現亢進が認められた。また、涙腺における FASN および UCP-1 など脂質代謝にかかわる遺伝子の減少と glut-4 の発現増加も認められたことから、脂質代謝の変化が眼表面の恒常性維持に影響を与えている可能性が示唆された。

以前の肥満または糖尿病マウスを用いた研究において、過剰な脂質レベルが涙液量を減少させることが示唆されている [51, 57]。SCD-1 欠損マウスは肥満に抵抗性であり、脂肪の蓄積をほとんど示さないことが報告されている [58, 59]。本研究において、SCD-1 は涙腺の腺房細胞の細胞質に存在し、SCD-1 欠損マウスは涙腺重量の増加、涙液分泌の亢進ならびに結膜杯細胞数の有意な増加を示した。これらの結果は、脂質代謝レベルの低下 [38] が涙液量を代償的に増加させる、もしくは涙液抑制因子の発現を低下させる可能性を示唆している [60]。実際にヒトでは涙液産生とメタボリックシンドロームとの間に何らかの関連があることが報告されている [61]。

SCD-1 の欠損は、涙腺における脂質代謝遺伝子の発現を減少させたのに対し、グルコーストランスポーターである glut-4 の発現については増加させた。この glut-4 の増加は、涙腺からの涙液分泌の増加および結膜杯細胞からのムチン産生増加に伴うグルコース消費の増加を反映している可能性が考えられた。また、glut-4 は、v-SNARE、VAMP-2、t-SNARE および syntaxin-4 などと共に、分泌小胞の構成タンパク質であることから [62, 63]、glut-4 の発現増加によりエンドサイトーシスが亢進し、細胞内に取り込まれた glut-4 が細胞膜にリサイクリングされる時に分泌小胞の形成が亢進している可能性も考えられる。涙腺の分泌小胞にはアミノ酸やグルコースなどの栄養素、ラクリチンや EGF などの成長因子、IgA やラクトフェリンなど抗菌・抗ウイルス因子など様々な因子が含まれている。ラクリチンや EGF は管腔側に放出されると、自身のエキソサイトーシスを自己促進的に調節することも知られている [64-66]。それ故、増加した分泌小胞から効率的に涙液が分泌されると予想される。このように脂質代謝関連遺伝子の発現変化が glut-4 の発現を増加させることにより、涙液分泌が亢進したと考えられる [67]。

涙液分泌は、角膜、結膜、涙腺、マイボーム腺および神経（交感神経、副交感神経および感覚神経）および脳からなる涙腺機能ユニットによって調節されており、この機能単位は視機能の維持に重要な役割を果たしている [68-70]。眼表面の涙液層は油層、水層、ムチン層の 3 層から構成されており、涙腺分泌の低下など涙液層のわずかな変化はドライアイ

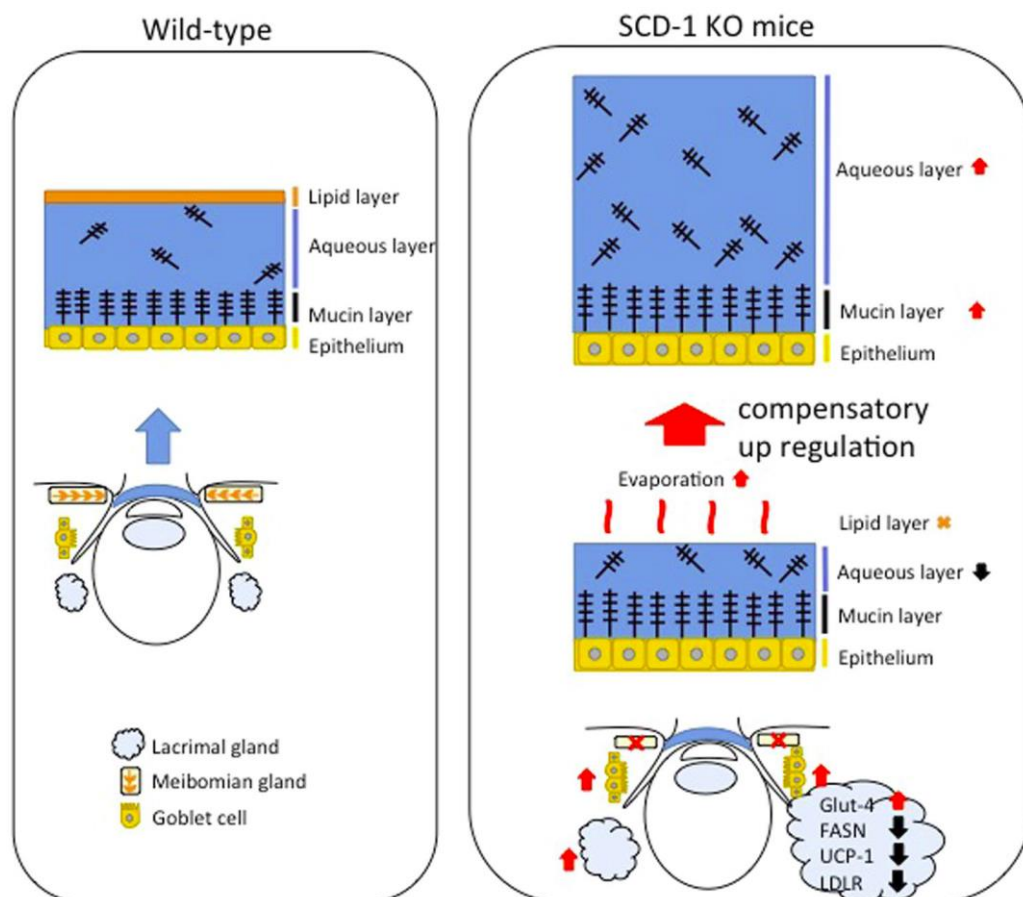
イにつながる [71]。SCD-1 欠損マウスでは、油層分泌を担うマイボーム腺が萎縮していたのに対し、涙液分泌および結膜杯細胞からのムチン産生が増加していた。これらの結果は、眼表面の3層のうち、いずれかの層に異常をきたせば、この異常を補うように他の層が変化するという可能性を示唆している。この考えは最近のドライアイ学会においても眼表面上の各層を標的とする層別治療 (TFOT) として提唱されている [72-74]。SCD-1 欠損マウスでは、マイボーム腺の萎縮に伴う油層の異常を補うため、ムチンの発現亢進と涙液量の増加が涙液層の機能を正常化するのに貢献していることが示唆された。

涙液脂質層 (TFLL) における飽和脂肪酸は温度による TFLL の流動性に変化を与える。飽和脂肪酸は不飽和脂肪酸より融点が高いため、涙液層における飽和脂肪酸の存在比が高くなると、眼表面における TFLL の均一な広がりや抑制されることが推察される [75-77]。SCD-1 欠損マウスにおいて増加が認められた MUC5AC は粘液性ポリマーとして TFLL の伸展剤として作用する可能性が示唆されている [78]。したがって、MUC5AC の増加は、不飽和脂肪酸の消失による涙液の伸展障害を部分的に補うことが予想される。ヒトでは、新生児の涙液には、成人と比較して脂質と MUC5AC が過剰に存在し、涙液の高い安定性に寄与していることが報告されている [79]。さらに、MUC5AC の増加は、涙液の粘度を増大させ、涙液層破壊時間 (瞬目後涙液が安定な時間) を伸ばすことが知られている [80]。また、MUC5AC は粘液層の構造機能も高め、その力学的安定性を高めることができる [81, 82]。涙液量の増大も MUC5AC と同様に、TFLL の伸展を促進することがよく知られている [77, 83]。このように、MUC5AC および涙液量の増加は、不飽和脂肪酸の低下による TFLL の潜在的な伸展障害を補うことを可能にしていると考えられる。

MGD 患者の中には、涙液成分および涙液量が正常値を示すにもかかわらず、涙液の不安定性のため、自覚症状としてドライアイ様症状を訴えることがしばしばある [84]。MGD 患者では、SCD-1 欠損マウスと同様に、涙液量が増加していることが報告されている [74]。それ故、MGD 患者でも、SCD-1 欠損マウスと同様に、油の分泌不足を代償するために、涙液量および結膜杯細胞が増加していると考えられる。マウスでは脂質分泌器官としてマイボーム腺だけではなく、ハーダー腺も存在し、ヒトとマウスでは解剖学的な違いがある。しかしながら、これまで述べてきたように、SCD-1 欠損マウスはヒト MGD 様の病態変化を示すことから [38]、SCD-1 欠損マウスはヒト MGD の病態モデルとして活用できる可能性がある。

結論として、SCD-1 欠損マウスではマイボーム腺の萎縮による油の不足により、涙液層の安定性が低下していることが示唆された。また、同欠損マウスでは、結膜杯細胞数の増加および MUC5AC mRNA の発現亢進、涙腺における涙液分泌量および涙腺重量の増加が認められた。このような変化は油不足による涙液層の不安定性を代償する役割を果たしていることが示唆された。これらの結果は、油層、水層、ムチン層が協調して涙液層の安定性を維持していることも示唆している。さらに、脂質代謝遺伝子の減少が涙腺機能の亢進に関与していることが考えられた。マイボーム腺から油の分泌が不足している MGD 患者

では涙液量が増加しているなど、SCD-1 欠損マウスの病態と多くの類似した点が認められたことから、SCD-1 欠損マウスはヒト MGD の病態モデルとして活用できる可能性がある。SCD-1 欠損マウスの更なる病態解析はヒト MGD の病態解明、薬剤開発につながる可能性があることから、その臨床的意義は極めて高いと考えられる（模式図 4）。



模式図 4. マイボーム腺の異常に対する涙腺および結膜の代償機構のイメージ図

野生型マウスの涙液層は、涙液の安定性を維持する 3 層（油層、水層、ムチン層）からなる。SCD-1 欠損マウスはマイボーム腺機能不全のため、油層が減少し、蒸発により水層が薄くなる。SCD-1 欠損マウスは油層が不足する代償機構として涙腺重量の増大、涙液量の増加およびムチン分泌が増加していた。SCD-1 欠損マウスにおける増加した涙液を提供する涙腺では FASN、LDLR および UCP-1 などの脂質代謝遺伝子の発現が低下していた。

3. 総括

ドライアイは様々な要因による涙腺および角結膜上皮の慢性疾患であり、眼の不快感や視機能異常を伴う疾患である。シェーグレン症候群によるドライアイは難治性であり、炎症状態がその重症度に関係すると言われている。その他にも様々な要因によってドライアイを発症するが、涙腺の炎症とドライアイ発症の分子メカニズムに関して詳細に検討している報告は殆どない。また、実際の臨床現場においても根治療法はなく、人工涙液の補充、涙点プラグ等の対症療法が主流となっているが、その治療効果は不十分である。涙液分泌の詳細な分子メカニズムを解明することは涙液の産生を促進させる新規治療法または薬剤開発に結び付く可能性がある。そこで、本研究ではドライアイ治療薬の選択肢を増やすべく、第1章では IP₃R 欠損マウスを用いた涙液の分泌メカニズムを検討し、第2章では SCD-1 の欠損によるマイボーム腺の異常がもたらす涙液量とムチンの代償的増加機構について検討した。今回明らかにした結果は以下の通りである。

第1章では、IP₃R がムスカリン作動性経路およびアドレナリン作動性経路の両シグナル伝達経路を介した涙液分泌に必須であることを明らかにした。さらに Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウスでは角膜上皮障害や結膜における杯細胞の減少が認められ、ドライアイ様病態を示した。さらに涙腺では分泌顆粒の異常蓄積、リンパ球の浸潤が認められ、炎症性サイトカインの産生が亢進していた。Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウスではヒトシェーグレン症候群患者で臨床的に観察される血清中の SS-A に対する自己抗体の産生が認められたことから、Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウスは、シェーグレン症候群に類似した新しいドライアイモデルマウスとして活用できる可能性が考えられた。

第2章では、SCD-1 欠損にともなうマイボーム腺の異常が、結膜および涙腺へ及ぼす影響を明らかにした。SCD-1 の欠損は、マイボーム腺の萎縮、油の分泌不足による涙液層の異常を引き起こした。SCD-1 欠損マウスの結膜では結膜杯細胞数の増加および MUC5AC mRNA の発現亢進を認め、涙腺では涙液量および涙腺重量の増加が認められた。この涙液量の増加メカニズムの1つとして、涙腺における脂質代謝に関わる遺伝子の減少が関与していることを明らかにした。これら涙液量およびムチン産生の増加は、マイボーム腺からの油の分泌不足に対する代償機構としての役割を担っていることが示唆された。さらに、涙液層の安定には油層、水層、ムチン層が密接に関わっていることを明らかにした。

本研究において得られた結果は、涙液の分泌メカニズムの解明に加え、涙腺の炎症や MGD に伴って生じるドライアイの病態解明ならびに治療法の開発に貢献するものである。今後、これら研究結果を利用した薬剤が少しでも早く臨床応用され、ドライアイ患者の治療の選択肢の拡充に貢献していきたい。

4. 謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始かわらぬ深厚なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都産業大学 生命科学部 先端生命科学科の板野直樹教授、中田博教授、齋藤敏之教授ならびに棚橋靖行准教授に深謝の意を表します。本研究第1章の遂行を終始にわたり御指導、御鞭撻くださいました理化学研究所 脳科学総合研究センター 発生神経生物研究チーム 御子柴克彦博士（現 上海科技大学 免疫化学研究所）、久恒智博博士（現 東京都医学総合研究所 脳発達/神経再生研究分野）に深謝の意を表します。本研究の遂行を終始にわたり御指導、御鞭撻くださいました慶應義塾大学 医学部 眼科学教室 坪田一男教授に深謝の意を表します。

さらに、本研究に携わる機会を与えてくださいました参天製薬株式会社の中村雅胤博士、松本雄博士ならびに加藤雅智博士に感謝の意を表します。また、本研究に種々の有益なる御助言を賜りました竹内勤博士、小川葉子博士、佐々木恭正博士、戎井悦子氏、小川直子氏、玉木修作氏、田中康久氏、伊東知高氏に厚く御礼申し上げます。

終わりに、本研究を陰から常に支えてくれた妻時子と息子陽来に心から感謝します。

5. 参考文献

1. Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K. Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clin Chim Acta*. 2006 ;369 (1):17-28.
2. Dartt DA. Signal transduction and control of lacrimal gland protein secretion: a review. *Curr Eye Res*. 1989 8: 619–636.
3. Dartt DA. Regulation of tear secretion. *Adv Exp Med Biol*. 1994 350: 1–9.
4. Dartt DA. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2009 28: 155–177.
5. Gromada J, Jorgensen TD, Dissing S. The release of intracellular Ca^{2+} in lacrimal acinar cells by alpha-, beta-adrenergic and muscarinic cholinergic stimulation: the roles of inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose. *Pflugers Arch*. 1995 429: 751–761.
6. Hodges RR, Dicker DM, Rose PE, Dartt DA. Alpha 1-adrenergic and cholinergic agonists use separate signal transduction pathways in lacrimal gland. *Am J Physiol*. 1992 262: G1087–1096.
7. Ikeda-Kurosawa C, Higashio H, Nakano M, Okubo M, Satoh Y, Kurosaka D, Saino T. Alpha 1-Adrenoceptors relate Ca^{2+} modulation and protein secretions in rat lacrimal gland. *Biomed Res*. 2015;36 (6):357-69.
8. Furuichi T, Kohda K, Miyawaki A, Mikoshiba K. Intracellular channels. *Current opinion in neurobiology*. 1994 4, 294-303.
9. Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, Takano H, Minowa O, Kuno J, Sakakibara S, Yamada M, Yoneshima H, Miyawaki A, Fukuuchi Y, Furuichi T, Okano H, Mikoshiba K, Noda T. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature* 1996 379, 168-171.
10. Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo M. M, Kato K. Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 2000 408, 584-588.
11. Inoue T, Kato K, Kohda K, Mikoshiba K. Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci*. 1998 18, 5366-5373.
12. Hisatsune C, Kuroda Y, Akagi T, Torashima T, Hirai H, Hashikawa T, Inoue T, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in granule cells, not in Purkinje cells, regulates the dendritic morphology of Purkinje cells through brain-derived neurotrophic factor production. *J Neurosci*. 2006 26, 10916-10924.
13. Cai W, Hisatsune C, Nakamura K, Nakamura T, Inoue T, Mikoshiba K. Activity-dependent expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 2004 279, 23691-23698.
14. Blondel O, Takeda J, Janssen H, Seino S, Bell GI. Sequence and functional characterization of

- a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP₃R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J Biol Chem.* 1993 268, 11356-11363.
15. Fujino I, Yamada N, Miyawaki A, Hasegawa M, Furuichi T, Mikoshiba K. Differential expression of type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNAs in various mouse tissues: in situ hybridization study. *Cell and tissue research* 1995 280, 201-210.
 16. Sudhof TC, Newton CL, Archer BT, Ushkaryov YA, Mignery GA. Structure of a novel InsP₃ receptor. *The EMBO journal* 1991 10, 3199-3206.
 17. Futatsugi A, Nakamura T, Yamada MK, Ebisui E, Nakamura K, Uchida K, Kitaguchi T, Takahashi-Iwanaga H, Noda T, Aruga J, Mikoshiba K. IP₃ receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretions underlying energy metabolism. *Science* 2005 309: 2232–2234.
 18. Fukuda N, Shirasu M, Sato K, Ebisui E, Touhara K, Mikoshiba K. Decreased olfactory mucus secretion and nasal abnormality in mice lacking type 2 and type 3 IP₃ receptors. *Eur J Neurosci.* 2008 27: 2665–2675.
 19. Dogru, M. & Tsubota, K. New insights into the diagnosis and treatment of dry eye. *The ocular surface.* 2004 2, 59-75.
 20. Iwai M, Tateishi Y, Hattori M, Mizutani A, Nakamura T, Futatsugi A, Inoue T, Furuichi T, Michikawa T, Mikoshiba K. Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. *J Biol Chem.* 2005 280: 10305–10317.
 21. Kamoi M, Ogawa Y, Nakamura S, Dogru M, Nagai T, Obata H, Ito M, Kaido M, Kawakita T, Okada Y, Kawakami Y, Shimmura S, Tsubota K. Accumulation of secretory vesicles in the lacrimal gland epithelia is related to non-sjögren's type dry eye in visual display terminal users. *PLoS One* 2012 e43688.
 22. Hattori M, Suzuki AZ, Higo T, Miyauchi H, Michikawa T, Nakamura T, Inoue T, Mikoshiba K. Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem.* 2004 279: 11967–11975.
 23. Fox RI. Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 1995 7: 409–416.
 24. Fox RI, Maruyama T. Pathogenesis and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 1997 9: 393–399.
 25. Dartt DA, Rose PE, Dicker DM, Ronco LV, Hodges RR. Alpha 1-adrenergic agonist-stimulated protein secretion in rat exorbital lacrimal gland acini. *Exp Eye Res.* 1994 58: 423–429.
 26. Niederkorn JY, Stern ME, Pflugfelder SC, De Paiva CS, Corrales RM, Gao J, Siemasko K. Desiccating stress induces T cell-mediated Sjögren's syndrome-like lacrimal keratoconjunctivitis. *J Immunol.* 2006 176: 3950–3957.
 27. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002 296: 301–305.

28. Matsumoto I, Tsubota K, Satake Y, Kita Y, Matsumura R, Murata H, Namekawa T, Nishioka K, Iwamoto I, Saitoh Y, Sumida T. Common T cell receptor clonotype in lacrimal glands and labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest.* 1996 ;97 (8):1969-1977.
29. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox TC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH, European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002 61: 554–558.
30. Miyachi K, Iwai M, Asada K, Saito I, Hankins R, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are autoantibody target antigens in patients with Sjögren's syndrome and other systemic rheumatic diseases. *Mod Rheumatol.* 2007;17 (2):137-143.
31. Dao AH, Spindle JD, Harp BA, Jacob A, Chuang AZ, Yee RW. Association of dyslipidemia in moderate to severe meibomian gland dysfunction. *Am J Ophthalmol.* 2010;150 (3):371-375
32. Bu J, Wu Y, Cai X, Jiang N, Jeyalatha MV, Yu J, He X, He H, Guo Y, Zhang M, Quantock AJ, Liu Z, Li W. Hyperlipidemia induces meibomian gland dysfunction. *Ocul Surf.* 2019 17 (4):777-786.
33. Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, Lemp MA, Sullivan DA. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Executive Summary. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 2011 52:1922-1929.
34. Tomlinson A, Bron AJ, Korb DR, Amano S, Paugh JR, Pearce EI, Yee R, Yokoi N, Arita R, Dogru M. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Diagnosis Subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 2011 52:2006-2049.
35. Green-Church KB, Butovich I, Willcox M, Borchman D, Paulsen F, Barabino S, Glasgow BJ. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Tear Film Lipids and Lipid–Protein Interactions in Health and Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 2011 52:1979-1993.
36. Nelson JD, Shimazaki J, Benitez-del-Castillo JM, Craig JP, McCulley JP, Den S, Foulks GN. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Definition and Classification Subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 2011 52:1930-1937.
37. Rao K, Farley WJ, Pflugfelder SC. Association between high tear epidermal growth factor levels and corneal subepithelial fibrosis in dry eye conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 2010 51:844-849.
38. Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM. Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J Nutr,* 2001 131 (9):2260-2268.

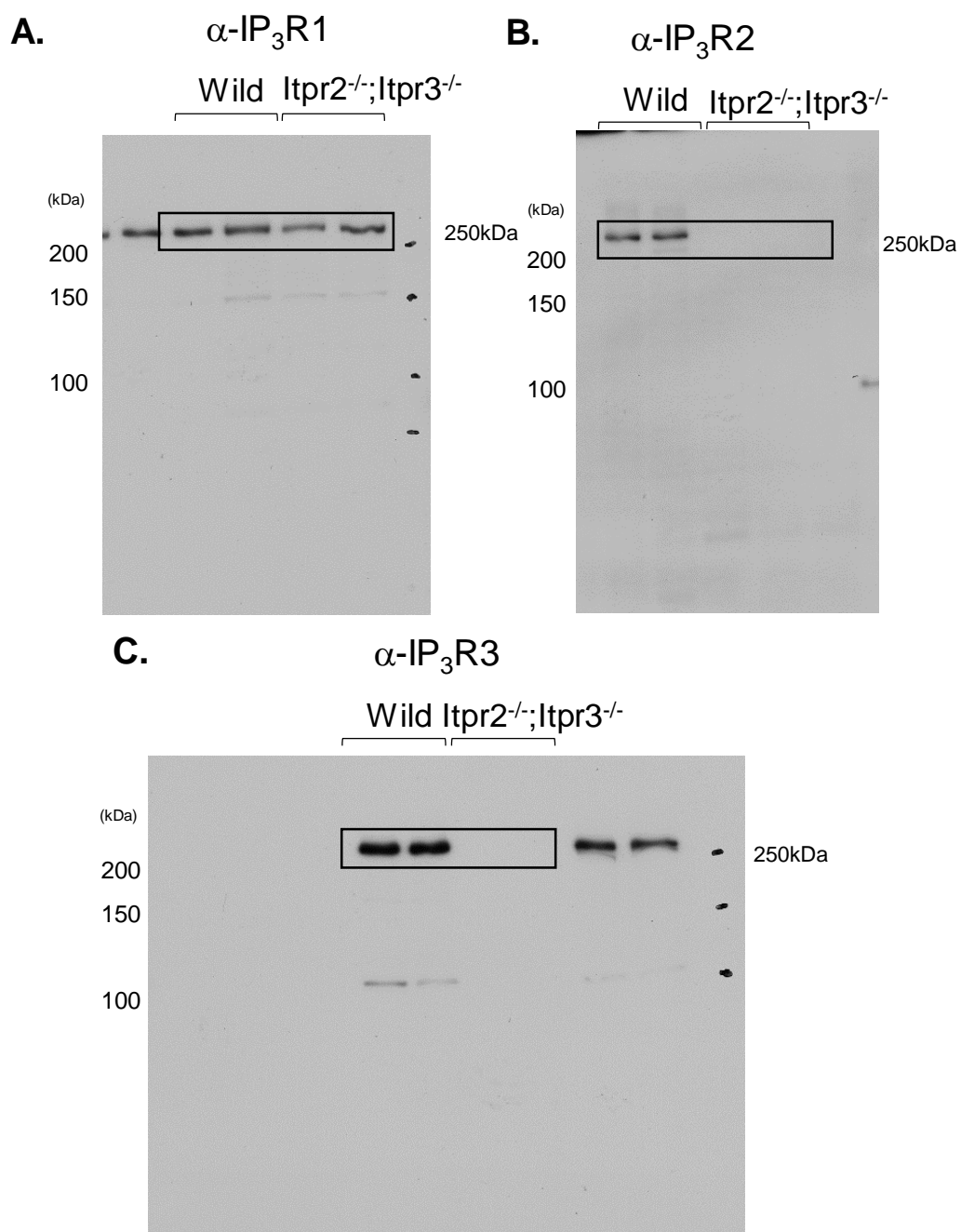
39. Nguyen KH, Brayer J, Cha S, Diggs S, Yasunari U, Hilal G, Peck A B, Humphreys-Beher M G. Evidence for antimuscarinic acetylcholine receptor antibody-mediated secretory dysfunction in nod mice. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 2297-2306
40. Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, Lemp MA, Sullivan DA. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011 52, 1922-1929.
41. Pinna A, Blasetti F, Zinellu A, Carru C, Solinas G. Meibomian gland dysfunction and hypercholesterolemia. *Ophthalmology*. 2013 120 (12):2385-2389.
42. Flowers MT, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 2008 19 (3):248-256.
43. Attie AD, Flowers MT, Flowers JB, Groen AK, Kuipers F, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase deficiency, hypercholesterolemia, cholestasis, and diabetes. *Nutr Rev*. 2007 65 (6 Pt 2) :S35-S38.
44. Dobrzyn A, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase as a new drug target for obesity treatment. *Obes Rev*. 2005 6 (2):169-174.
45. Attie AD, Krauss RM, Gray-Keller MP, Brownlie, Miyazaki M, Kastelein JJ, Lusis AJ, Stalenhoef AF, Stoehr JP, Hayden MR, Ntambi JM. Relationship between stearoyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*. 2002 43 (11):1899-1907.
46. Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee SH, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency reduces ceramide synthesis by downregulating serine palmitoyltransferase and increasing beta-oxidation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005 288 (3) :E599-E607.
47. Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004 101 (17):6409-6414.
48. Sampath H, Flowers MT, Liu X, Paton CM, Sullivan R, Chu K, Zhao M, Ntambi JM. Skin-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase-1 alters skin lipid composition and protects mice from high fat diet-induced obesity. *J Biol Chem*, 2009 284 (30):19961-19973.
49. Meingassner JG, Aschauer H, Winiski AP, Dales N, Yowe D, Winther MD, Zhang Z, Stütz A, Billich A. Pharmacological inhibition of stearoyl CoA desaturase in the skin induces atrophy of the sebaceous glands. *J Invest Dermatol*, 2013 133 (8):2091-2094.
50. Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science*. 2002 ;297 (5579):240-243.
51. Manaviat MR, Rashidi M, Afkhami-Ardekani M, Shoja MR. Prevalence of dry eye syndrome

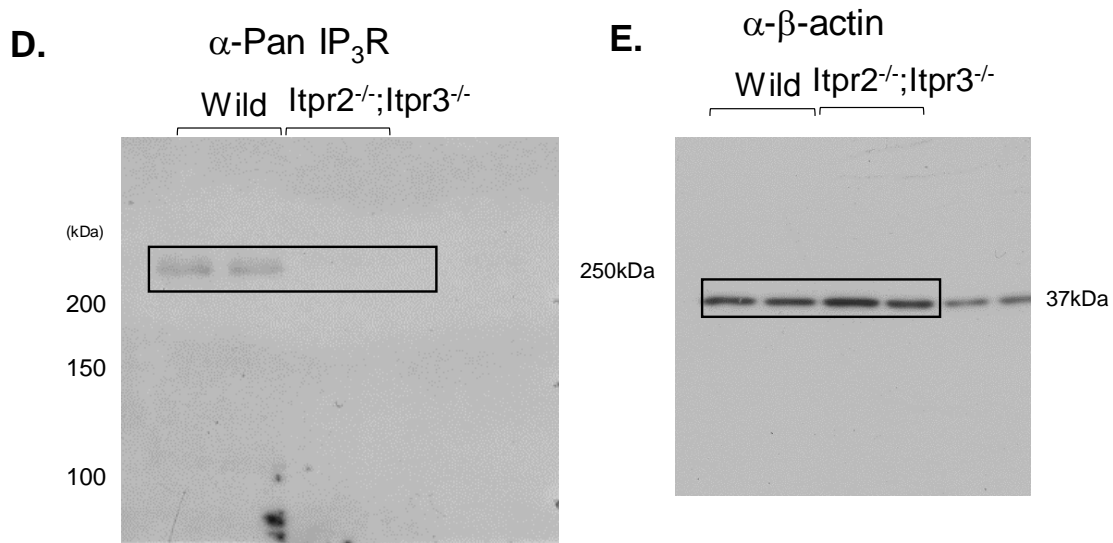
- and diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients. *BMC Ophthalmol.* 2008 8:10.
52. Sano K, Kawashima M, Ito A, Inaba T, Morimoto K, Watanabe M, Tsubota K. Aerobic exercise increases tear secretion in type 2 diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014 55 (7):4287-4294.
 53. Motoko K, Matsuzaka T, Matsumori R, Saito R, Kaga N, Taka H, Ikehata K, Okada N, Kikuchi T, Ohno H, Han S, Takeuchi Y, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Yahagi N, Arakawa Y, Fujimura T, Nakagawa Y, Yamada N, Shimano H. Absence of Elovl6 attenuates steatohepatitis but promotes gallstone formation in a lithogenic diet-fed Ldlr^{-/-} mouse model. *Sci Rep.* 2015; 5:17604.
 54. Flowers JB, Rabaglia ME, Schueler KL, Flowers MT, Lan H, Keller MP, Ntambi JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 improves insulin sensitivity in lean mice but worsens diabetes in leptin-deficient obese mice. *Diabetes* 2007 56 (5): 1228-1239.
 55. Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem.* 2000 29;275 (39):30132-30138.
 56. Kojima T, Dogru M, Ibrahim OM, Nagata T, Higa K, Shimizu T, Shirasawa T, Satake Y, Shimazaki S, Shimazaki J, Tsubota K. The effects of 3% diquafosol sodium application on the tear functions and ocular surface of the Cu,Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1)-knockout mice. *Mol Vis.* 2014 (20):929-938.
 57. Robinson CP, Yamachika S, Bounous DI, Brayer J, Jonsson R, Holmdahl R, Peck AB, Humphreys-Beher MG. A novel NOD-derived murine model of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1998 41 (1):150-156.
 58. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzioriski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002 99 (17):11482-11486.
 59. Miyazaki M, Sampath H, Liu X, Flowers MT, Chu K, Dobrzyn A, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency attenuates obesity and insulin resistance in leptin-resistant obese mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 380 (4):818-822.
 60. Sampath H, Miyazaki M, Dobrzyn A, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem*, 2007 282 (4):2483-2493.
 61. Kawashima M, Uchino M, Yokoi N, Dogru M, Uchino Y, Komuro A, Sonomura Y, Kato H, Kinoshita S, Tsubota K. Decreased tear volume in patients with metabolic syndrome: the Osaka study. *Br J Ophthalmol.* 2014 98 (3):418-420.
 62. Bryant NJ, Gould GW. SNARE proteins underpin insulin-regulated GLUT4 traffic. *Traffic.* 2011;12 (6):657-664.
 63. Wang C, Shi H, Guo K, Ng CP, Li J, Gan BQ, Liew HC, Leinonen J, Rajaniemi H, Zhou ZH,

- Zeng Q, Hong W. VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system. *Mol Biol Cell*. 2007 18 (3):1056-1063.
64. Sanghi S, Kumar R, Lumsden A, Dickinson D, Klepeis V, Trinkaus-Randall V, Frierson HF Jr., Laurie GW. cDNA and genomic cloning of lacritin, a novel secretion enhancing factor from the human lacrimal gland. *J Mol Biol*. 2001 310: 127–139.
 65. Samudre S, Lattanzio FA, Lossen V, Hosseini A, Sheppard JD, McKown RL, Laurie GW, Williams PB. Lacritin, a novel human tear glycoprotein, promotes sustained basal tearing and is well tolerated. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 ;52 (9):6265-70.
 66. van Setten GB, Viinikka L, Tervo T, Pesonen K, Tarkkanen A, Perheentupa J. Epidermal growth factor is a constant component of normal human tear fluid. *Graefes Arch Clin Exp ophthalmol*. 1989 27 (2): 184–187.
 67. de Souza GA, Godoy LM, Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol*. 2006 7: R72,
 68. Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998 17 (6):584-589.
 69. Mathers WD. Why the eye becomes dry: a cornea and lacrimal gland feedback model. *CLAO J*. 2000 26 (3):159-165.
 70. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res*, 2004 78 (3):409-416.
 71. Inaba T, Hisatsune C, Sasaki Y, Ogawa Y, Ebisui E, Ogawa N, Matsui M, Takeuchi T, Mikoshiba K, Tsubota K. Mice lacking Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors exhibit dry eye. *PLoS ONE*. 2014 9 (6) e99205.
 72. Yokoi N, Georgiev GA. Tear-film-oriented diagnosis and therapy for dry eye. *Future Medicine*. 2013 96-108.
 73. Tsubota K, Yokoi N, Shimazaki J, Watanabe H, Dogru M, Yamada M, Kinoshita S, Kim HM, Tchah HW, Hyon JY, Yoon KC, Seo KY, Sun X, Chen W, Liang L, Li M, Liu Z; Asia Dry Eye Society. New perspectives on dry eye definition and diagnosis: A consensus report by the asia dry eye society. *Ocul Surf*. 2017 15 (1):65-76.
 74. Arita R, Morishige N, Koh S, Shirakawa R, Kawashima M, Sakimoto T, Suzuki T, Tsubota K. Increased tear fluid production as a compensatory response to meibomian gland loss. A multicenter cross-sectional study. *Ophthalmology*. 2015 122 (5):925-933.
 75. Mudgil P, Borchman D, Yappert MC, Duran D, Cox GW, Smith RJ, Bhola R, Dennis GR, Whitehall JS. Lipid order, saturation and surface property relationships: a study of human meibum saturation. *Exp Eye Res*. 2013 116:79-85
 76. Sledge S, Henry C, Borchman D, Yappert MC, Bhola R, Ramasubramanian A, Blackburn R,

- Austin J, Massey K, Sayied S, Williams A, Georgiev G, Schikler KN. Human meibum age, lipid-lipid interactions and lipid saturation in meibum from infants. *Int J Mol Sci.* 2017 28;(9), E1862.
77. Yokoi N, Yamada H, Mizukusa Y, Bron AJ, Tiffany JM, Kato T, Kinoshita S. Rheology of tear film lipid layer spread in normal and aqueous tear-deficient dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 49 (12):5319-5324.
 78. Georgiev G, Yokoi N, Ivanova S, Dimitrov T, Andreev K, Krastevd R, Lalcheva Z. Surface chemistry study of the interactions of hyaluronic acid and benzalkonium chloride with meibomian and corneal cell lipids. *Soft Matter.* 2013 10841–10856.
 79. Mantelli F, Tiberi E, Micera A, Lambiase A, Visintini F, Bonini S. MUC5AC overexpression in tear film of neonates. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007 245 (9):1377-81.
 80. Berger RE, Corrsin S. A surface tension gradient mechanism for driving the pre-corneal tear film after a blink. *J Biomech.* 1974 225-238.
 81. Creech JL, Do LT, Fatt I, Radke CJ. In vivo tear-film thickness determination and implications for tear-film stability. *Curr Eye Res.* 1998 (11):1058-1066.
 82. Yokoi N, Bron AJ, Georgiev GA. The precorneal tear film as a fluid shell: the effect of blinking and saccades on tear film distribution and dynamics. *Ocul Surf.* 2014 (4):252-266.
 83. Fatt I. Observations of tear film break up on model eyes. *CLAO J.* 1997 (4):267-281.
 84. Shimazaki J, Sakata M, Tsubota K. Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. *Arch Ophthalmol.* 1995 113 (10):1266-1270.

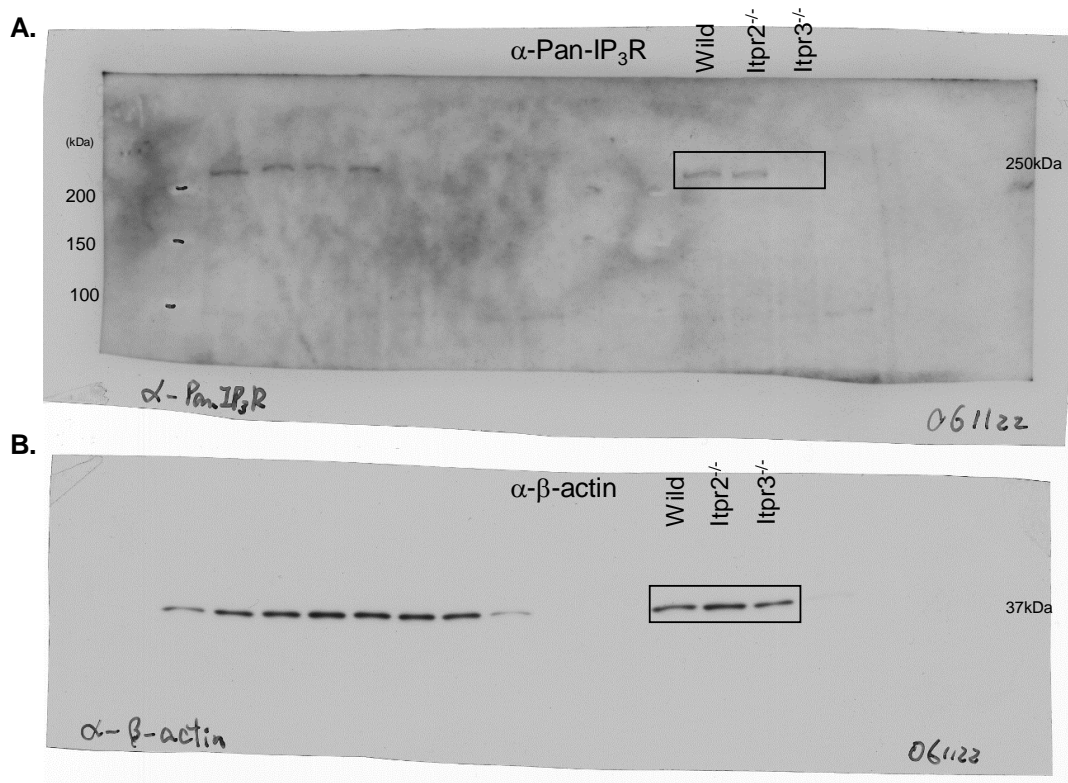
6. 補助資料





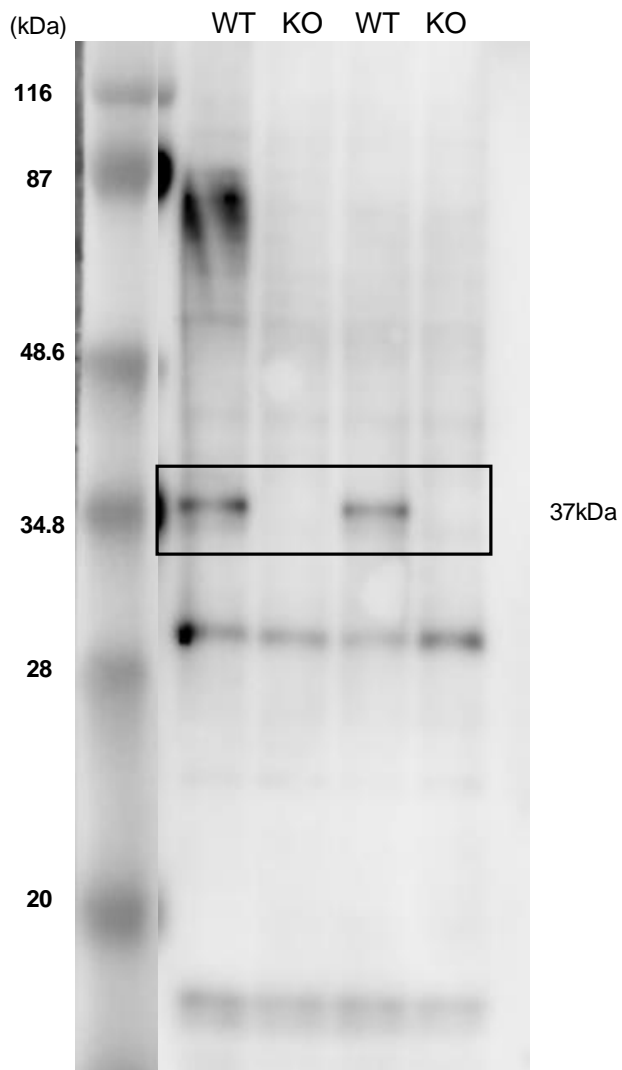
資料 1. イムノブロッティング解析で使した電気泳動像

野生型マウスおよび Itpr2^{-/-};Itpr3^{-/-}マウスから摘出した涙腺を用い、(A) 抗 IP₃R1 抗体によるイムノブロッティング解析を行った。(B) 抗 IP₃R2 抗体によるイムノブロッティング解析を行った。(C) 抗 IP₃R3 抗体によるイムノブロッティング解析を行った。(D) 抗 Pan-IP₃R 抗体によるイムノブロッティング解析を行った。(E) 抗 β -アクチン抗体によるイムノブロッティング解析を行った。



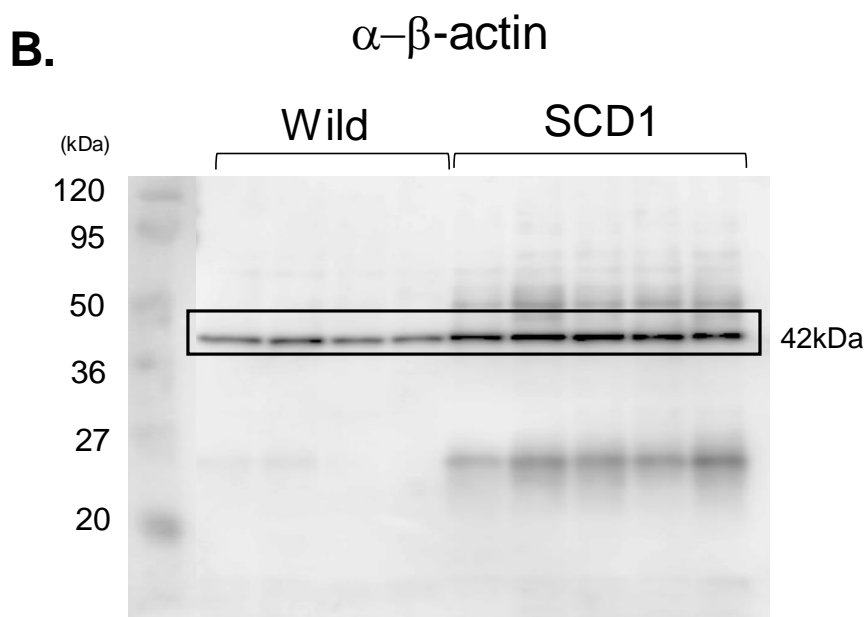
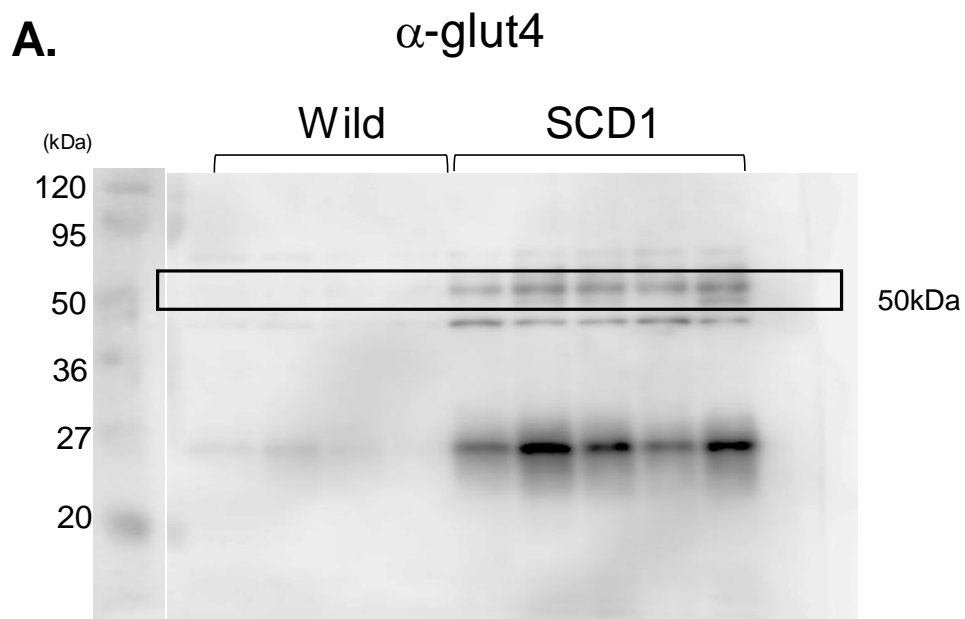
資料 2. イムノブロッティング解析で使した電気泳動像

野生型マウス Itpr2^{+/+}マウスおよび Itpr3^{+/+}マウスから抽出した涙腺を用い、(A) 抗 Pan-IP₃R 抗体によるイムノブロッティング解析を行った。(B) 抗 β -アクチン抗体によるイムノブロッティング解析を行った。



資料 3. イムノブロットィング解析で使した電気泳動像

野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスから抽出した涙腺を用い、(A) 抗 SCD-1 抗体によるイムノブロットィング解析を行った。



資料 4. イムノブロッティング解析で使した電気泳動像

野生型マウスおよび SCD-1 欠損マウスから抽出した涙腺を用い、(A) 抗 glut-4 抗体によるイムノブロッティング解析を行った。(B) 抗 β -アクチン抗体によるイムノブロッティング解析を行った。