慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	薬理、光遺伝学的手法を絡めた「泣く」の生体イメージング解析
Sub Title	Establishment of intravital imaging of the lacrimal gland for elucidation of mechanism of lacrimation
Author	今田, 敏博(Imada, Toshihiro)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	涙腺細胞腫特異的にカルシウムセンサーを発現する遺伝子改変マウスと二光子顕微鏡を用い、生体で涙腺のカルシウム応答を可視化できる実験系を構築した。本実験系では、涙腺周囲に灌流チャンバーを設置することで、涙腺局所のみ刺激剤および阻害剤の暴露を可能とする。この実験系を用い、角膜知覚刺激時の涙液動態および涙腺筋上皮細胞、腺房細胞のカルシウム応答性を解析した。また、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法により、涙液分泌中枢、上唾液核にDREDDsを発現させ、CNOの腹腔投与による上唾液核興奮時の涙腺腺房細胞のカルシウム動態の可視化にも成功した。 We established an intravital imaging system enable to visualize and analyze the Ca2+ response in the lacrimal gland (LG) by combination of two-photon microscopy with transgenic mice expressing the genetically encoded Ca2+ indicator, yellow cameleon (YC) 3.6 or YC-Nano15. In this system, a perfusion chamber is fitted surrounding the LG to allow for exposure of stimulants and inhibitors only to the LG. We analyzed tear secretion and Ca2+ responses in the LG myoepithelial cells and acinar cells during the corneal sensory stimulation. We also succeeded in visualizing Ca2+ response in the LG acinar cells during pharmacogenetic excitation of superior salivatory nucleus which is important brain region controlling lacrimation.
Notes	研究種目：若手研究 (B) 研究期間：2017～2019 課題番号：17K16983 研究分野：分子生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K16983seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１６９８３

研究課題名（和文）薬理、光遺伝学的手法を絡めた「泣く」の生体イメージング解析

研究課題名（英文）Establishment of intravital imaging of the lacrimal gland for elucidation of mechanism of lacrimation

研究代表者
今田　敏博（IMADA, Toshihiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：８０７９０３６０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：涙腺細胞腫特異的にカルシウムセンサーを発現する遺伝子改変マウスと二光子顕微鏡を用い、生体で涙腺のカルシウム応答を可視化できる実験系を構築した。本実験系では、涙腺周囲に灌流チャンバーを設置することで、涙腺局所のみ刺激剤および阻害剤の暴露を可能とする。この実験系を用い、角膜知覚刺激時の涙液動態および涙腺筋上皮細胞、腺房細胞のカルシウム応答性を解析した。また、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法により、涙液分泌中枢、上唾液核にDREDDsを発現させ、CNOの腹腔投与による上唾液核興奮時の涙腺腺房細胞のカルシウム動態の可視化にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
従来の涙液分泌に関する研究では、涙腺機能に主眼が置かれ、脳との連動性に着目されずに解析されてきた。本研究では、二光子顕微鏡による深部生体イメージング、涙腺細胞腫特異的カルシウムプローブを発現する遺伝子改変マウス、薬理遺伝学による脳操作を組み合わせることで、脳ー涙腺活動の直接的な関わりを解析可能とする実験系を構築した。本研究を元に、脳ー涙腺活動の連動により生じる「泣く」メカニズムを解明することにより、根本治療法が存在しない眼表面疾患に対し、新しい、創薬・治療戦略の確立が可能となる。

研究成果の概要（英文）：We established an intravital imaging system enable to visualize and analyze the Ca2+ response in the lacrimal gland (LG) by combination of two-photon microscopy with transgenic mice expressing the genetically encoded Ca2+ indicator, yellow cameleon (YC) 3.6 or YC-Nano15. In this system, a perfusion chamber is fitted surrounding the LG to allow for exposure of stimulants and inhibitors only to the LG. We analyzed tear secretion and Ca2+ responses in the LG myoepithelial cells and acinar cells during the corneal sensory stimulation. We also succeeded in visualizing Ca2+ response in the LG acinar cells during pharmacogenetic excitation of superior salivatory nucleus which is important brain region controlling lacrimation.

研究分野：分子生物学

キーワード：生体イメージング　二光子顕微鏡　涙液　涙腺　カルシウムシグナル　薬理遺伝学

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

涙液は、涙腺から眼表面に分泌され、角結膜の栄養補給、免疫制御等、多彩な生理機能を有している。ヒトが「泣く」状態を、「涙腺が崩壊する」、「目頭が熱くなる」、「涙腺が緩む」等、涙腺機能のダイナミックな変化として表現するが、その変化を科学的に実証するには至っていない。涙液分泌は情動および角膜からの痛覚刺激により惹起される、脳延髄の涙液分泌中枢(上唾液核)の興奮が、涙腺に投射する副交感神経を経て、涙腺に入力されることで生じる。「泣く」とは、生体において、脳―涙腺活動の連動により生じる現象であるが、現状、脳―涙腺活動の直接的な関わりに着目した研究例は存在しない。

涙液の異常はドライアイを始めとする、様々な眼表面疾患を引き起こし、視覚異常による Quality Of Life の低下を招く。涙液異常に対する治療には、現在でも涙液成分の補充する対症療法が使われている。そのため、「泣く」メカニズムを明らかにすることは、眼表面疾患の根本治療法を確立するうえでも重要であると考えられる。

我々は、マウスにて、薬理遺伝学[DREADDs (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs)]により、涙液分泌中枢である上唾液核を恣意的に操作する実験系の確立に取り組んでおり、ウイルスベクターによる遺伝子導入法により、上唾液核に人工改変型ムスカリンレセプター(hM3Dq)を発現させ、hM3Dq の特異的リガンドであるクロザピン N オキサイド(CNO)の腹腔投与による上唾液核の興奮に伴って、涙液量が増加することを確認している。また、涙腺を構成する筋上皮細胞、腺房細胞にそれぞれ特異的に蛍光タンパク質カルシウムプローブ Yellow Cameleon (YC)を発現する遺伝子改変マウス(筋上皮細胞特異的：YC3.60 マウス、腺房細胞特異的：YCNano15 マウス)を保有している（Yoshikawa S and Adachi T et al. Sci. Rep. 2016, Oshima Y and Nemoto T et al. Int. J. Mol. Sci. 2014)。これらのツールを組み合わせることにより、脳―涙腺活動の直接的な関わりを解析可能とする実験系を構築し、これまでブラックボックスであった「泣く」メカニズムを解明できるのではないかとの着想に至った。

２．研究の目的

本研究では、高等霊長類である、人類のみが有する「泣く」という生理現象のメカニズムの解明に向け、生体において、涙液分泌を支配する脳神経回路活動時の涙腺活動を可視化しうる実験系を確立し、脳神経回路―涙腺の連動性による「泣く」特有の変化を解析した。

３．研究の方法

(1) 動物

8-10 週齢の C57BL/6J マウス、YC3.60 マウス、YCNano15 マウスを動物：B6J マウス、YC3.60 マウス、YC Nano50 マウスを使用した。これらのマウスは麻酔下（1.2 g/kg ウレタン、腹腔投与)、保温パッド上にて、涙腺を露出させた後、涙腺周囲に灌流チャンバーを設置し、常時、灌流液を流した。

(2) 涙液分泌増加処置

① 涙腺薬剤刺激

涙液分泌刺激薬として、神経伝達物質アセチルコリン（ACh）を用いた。灌流チャンバーに 1 μM Ach を 10 分間流すことで涙腺に暴露した。涙腺アセチルコリン受容体拮抗薬として、アトロピン（1 μM）を使用し、また、涙腺構成細胞である、筋上皮細胞、腺房細胞の寄与を確認するため、筋上皮収縮抑制剤ブタンジオンモノオキシム(BDM, 10 mM)を使用した。

② 角膜知覚刺激

角膜知覚神経に発現する侵害受容器 TRPV1 のアゴニストであるカプサイシン（1 μM）を 1 μL 点眼した。カプサイシンによる涙液増加において、涙腺アセチルコリン受容体拮抗薬であるアトロピン、涙腺筋上皮細胞の寄与を確認するため、BDM を使用した。また、角膜刺激が中枢を介し、涙腺に入力する神経活動により涙液分泌が促されたことを確認するために、テトロドトキシン（TTX, 1 μM）を使用した。これらの阻害剤は、涙腺周囲の灌流チャンバーにて、点眼前より灌流することで、涙腺局所にのみ暴露した。

③ 涙液分泌中枢、上唾液核の恣意的操作

麻酔下のマウスを脳固定装置に固定し、上唾液核に AAV-CMV-hM3Dq-mCherry (600nl)をインジェクションした。インジェクション 2 週間後、腹腔に hM3Dq の特異的リガンドである CNO を 400μL(１mg/kg)の用量で腹腔投与し、上唾液核を活性化させた。

(3) 涙液量測定

マウスの外眼角に綿糸を挿入することにより行う。涙液分泌増加処置前、処置中、処置後に実施した。

(4) カルシウムイオン測定

蛍光タンパク質カルシウムプローブ YC3.60、YCNano15 を用いた。両プローブは、CFP と YFP の間にカルシウムカルモジュリンのカルシウム結合ドメインを持ち、カルシウム結合状態では分子内の CFP と YFP が隣接し、CFP から YFP へのエネルギー移動（Förster resonance energy transfer: FRET）が生じる。このエネルギー移動効率を計測することで細胞内カルシウム濃度の変化を検出した。FRET の計測は、二光子顕微鏡（オリンパス社、FV1200MPE)

(5) 生体涙腺イメージング法

麻酔下にて、涙腺周囲に灌流チャンバーを設置したマウスを観察台に固定し、涙腺の動きを最小限にとどめるようにして、涙腺生体イメージングをオリンパス製二光子顕微鏡を用いて行った。実験中はマウスの体温が低下しないよう、保温パッドで体温を維持した。励起波長 830nm で CFP と YFP の蛍光波長を測定し、YFP/CFP 蛍光強度の比を算出することにより FRET を検出した。

４．研究成果

(1) 涙腺への持続的な ACh 暴露下において、涙液量は一過性増加（ACh 暴露開始 0-5 分）の後、定常を維持する（ACh 暴露後 5-10 分）することが確認された（図 1）。アトロピン存在下では、涙腺 ACh 暴露による涙液量の増加は、抑制された。筋上皮収縮抑制剤 BDM 存在下では、阻害剤非存在下（Control）と比較し、ACh 刺激により生じる、一過性の涙液分泌増加が有意に抑制されていた。ACh 暴露後 5-10 分時に認められた維持的な涙液量増加は BDM 存在下では、阻害剤非存在下と比較し差は認められなかった。

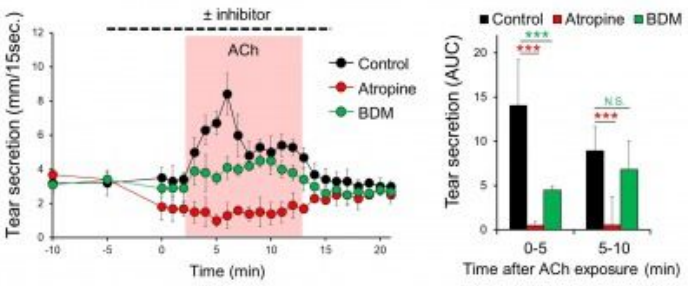

図 1．涙腺 ACh 暴露時の涙液量変動

涙腺において、筋上皮細胞特異的に蛍光カルシウムプローブを発現する YC3.60 マウス、腺房細胞特異的に蛍光カルシウムプローブを発現する YCNano15 マウスを用い、涙腺への持続的な ACh 暴露下における細胞内カルシウム濃度変動を確認するため、生体涙腺イメージングを行った（図 2）。

涙腺筋上皮細胞においては、ACh 暴露開始直後に FRET 比の一過性の上昇が認められた。その後、FRET 比は高値を維持していた。アトロピン存在下では、ACh 暴露による FRET 比の変動は観察されなかった。また、BDM 存在下においても、ACh 暴露による FRET 比の変動は認められなかった。

涙腺腺房細胞では、ACh の持続的暴露直後より FRET 比の上昇が認められ、FRET 比は、暴露時間中、高値を維持していたアトロピン存在下では、ACh 暴露による FRET 比の変動は認められなかった。BDM 存在下においては ACh 暴露開始直後より FRET 比の上昇が認められ、ACh 暴露時間中上昇し続けていた。刺激開始直後の FRET 比の上昇量には、BDM 存在下、非存在下において、統計学的な差は認められなかった。

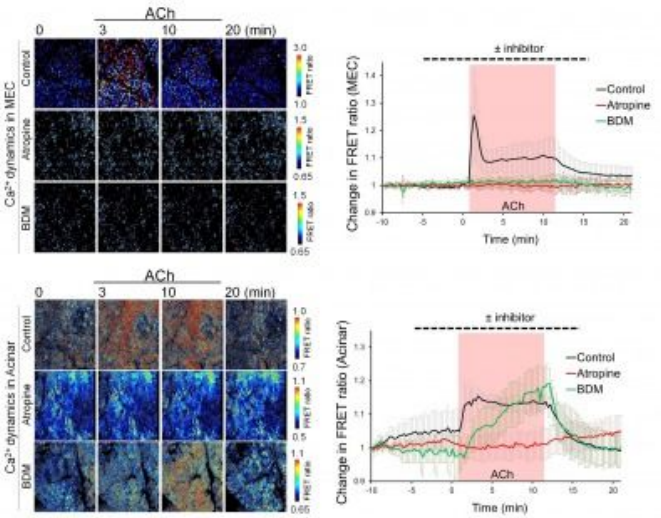

図 2．涙腺 ACh 暴露時の細胞内カルシウム濃度変動

2 種の YC マウスと、生体涙腺イメージング法により、涙腺には筋上皮細胞収縮による涙液排出機構と、腺房細胞による涙液産生機構の 2 種類の分泌様式があることが示唆された。

(2) 角膜侵害受容器、作動薬であるカプサイシン点眼時の涙液量変動を測定した（図 3）。涙腺への阻害剤非暴露時において、涙液量は、カプサイシン点眼直後に点眼前の約 3 倍程度に増加した。点眼により増加した涙液量は、点眼 3 分後には点眼前とほぼ同程度の値に戻った。神経遮断薬 TTX を涙腺暴露下状態では、カプサイシン点眼による涙液量増加は認められず、阻害剤非暴露時と比較し、点眼後 3 分間の涙液量増加量は有意に低値だった。涙腺に対し、筋上皮収縮阻害剤 BDM 暴露下では、カプサイシン点眼により、涙液量の大きな変動はなく、点眼後 3 分間の涙液量増加量は、阻害剤非存在下と比較し、有意に低値だった。

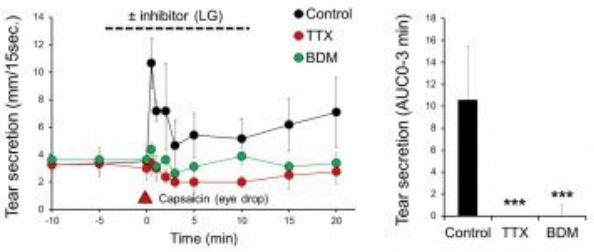

図 3．カプサイシン点眼時の涙液挙動

同条件下における、YC マウスを用いた生体涙腺カルシウムイメージングの結果を図 4 に示した。
涙腺筋上皮細胞における FRET 比はカプサイシン点眼直後に、一過性に上昇し、その後速やかに点眼前のレベルに戻った。神経遮断薬 TTX、および筋上皮収縮抑制剤 BDM を涙腺局所に暴露した状態では、カプサイシン点眼による涙腺筋上皮細胞の FRET 比の変動は認められなかった。

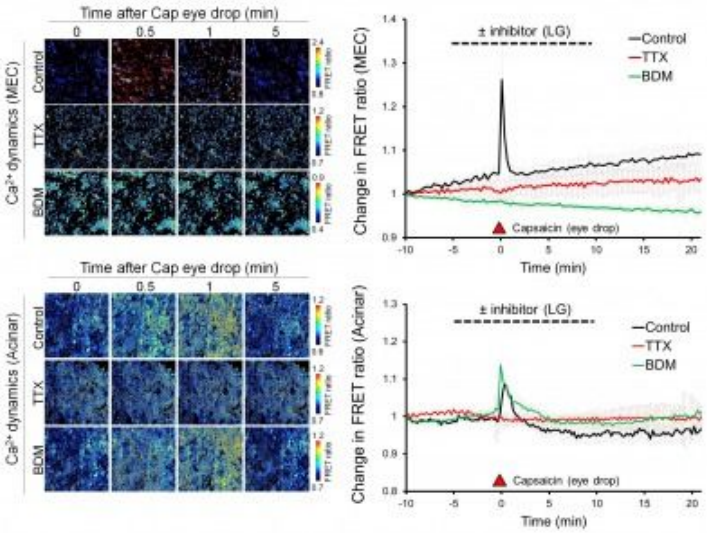

図 4．カプサイシン点眼時の涙腺細胞内カルシウム濃度変動

涙腺腺房細胞においても、カプサイシン点眼直後の一過性の FRET 比の増加が観察された。筋上皮細胞における応答性と比較し、カプサイシン点眼後の FRET 比の上昇-元のレベルに戻る時間が長い傾向にあった。TTX を涙腺に暴露している状態では、カプサイシン点眼による FRET 比の変動は認められなかった。一方、涙腺に BDM 暴露下では、カプサイシン点眼により、一過性の FRET 比上昇がみられ、その FRET 比上昇量は、阻害剤非存在下とほぼ同程度だった。
これらの結果より、角膜知覚神経刺激による涙液分泌には、筋上皮細胞のカルシウム濃度上昇による筋上皮収縮が引き起こす涙液排出機構が関与していることが示唆された。

(3) 涙液分泌中枢である上唾液核を恣意的に操作するため、ウイルスベクターによる遺伝子導入法により、上唾液核に人工改変型ムスカリン受容体 hM3Dq を発現させ、hM3Dq の特異的リガンドである CNO を腹腔投与することで、上唾液核を興奮させた（図 5）。涙液量は、CNO 腹腔投与直後より、増加し始め、測定時間内、上昇し続けた。
YCNano15 マウス、上唾液核に hM3Dq を発現させた個体を用いた、生体涙腺カルシウムイメージングでは、CNO 投与後、腺房細胞における FRET 比の上昇が確認され、CNO 投与、約 5 分後まで上昇し続けた。その後観察時間内、FRET 比は高値を維持していた。

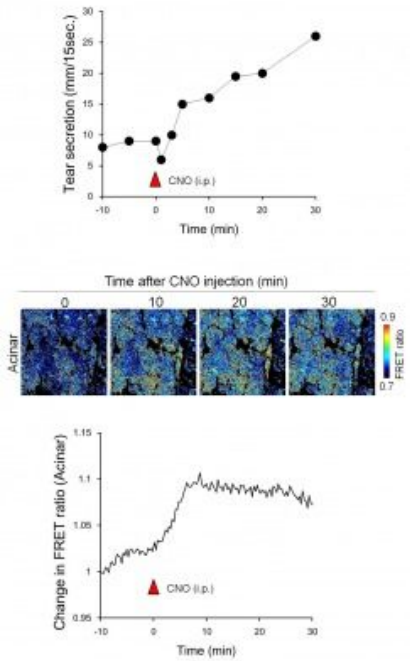

図 5.涙液分泌中枢興奮時の涙液量変動、および腺房細胞カルシウム濃度変動

本研究において、涙腺細胞腫特異的に蛍光カルシウムプローブを発現する遺伝子改変マウス、二光子顕微鏡による生体イメージングシステムを組み合わせることにより、涙腺の生体イメージング法を確立できた。涙腺への薬剤持続刺激下による実験により、涙腺には筋上皮細胞収縮による涙液排出機構、腺房細胞による涙液産生機構が存在している可能性が示唆された。角膜知覚神経刺激、および涙液分泌中枢である上唾液核の恣意的操作法による、脳神経回路-涙腺活動の連動性を解析した結果、角膜知覚神経刺激による涙液分泌には涙腺筋上皮細胞、上唾液核の恣意的操作による涙液分泌には涙腺腺房細胞が寄与していると推察された。
これまで、涙液分泌に関する研究では、涙腺機能に主眼が置かれ、脳との連動性に着目されずに解析されていた。「泣く」メカニズム解明のためには、本研究で得られた、脳神経回路-涙腺活動の連動性を可視化し、解析可能とする実験系を用い、詳細な検討が引き続き必要である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Kai Jin, Toshihiro Imada, Shigeru Nakamura, Yusuke Izuta, Erina Oonishi, Michiko Shibuya, Hisayo Sakaguchi, Takahiro Adachi & Kazuo Tsubota	４．巻 8
２．論文標題 Intravital Two-photon Imaging of Ca2+ signaling in Secretory Organs of Yellow Cameleon Transgenic Mice	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34347-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kai Jin, Toshihiro Imada, Ryuji Hisamura, Masataka Ito, Haruki Toriumi, Kenji F Tanaka, Shigeru Nakamura & Kazuo Tsubota	４．巻 190
２．論文標題 Identification of Lacrimal Gland Postganglionic Innervation and Its Regulation of Tear Secretion.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 The American Journal of Pathology	６．最初と最後の頁 1068-1079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.01.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kai Jin, Toshihiro Imada, Shigeru Nakamura, Yusuke Izuta, Erina Oonishi, Michiko Shibuya, Hisayo Sakaguchi, Hirotaka Tnanabe, Masataka Ito, Kimiaki Katanosaka & Kazuo Tsubota	４．巻 189
２．論文標題 Corneal Sensory Experience via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Accelerates the Maturation of Neonatal Tearing.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 The American Journal of Pathology	６．最初と最後の頁 1699-1710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2019.05.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Toshihiro Imada, Kai Jin, Yusuke Izuta, Shigeru Nakamura, Takahiro Adachi, Kazuo Tsubota
２．発表標題 In vivo dynamics of Ca2+-dependent myoepithelial contraction in lacrimal gland
３．学会等名 The Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017 (ARVO2017)（国際学会）
４．発表年 2017年

１．発表者名 Kai Jin, Toshihiro Imada, Yusuke Izuta, Shigeru Nakamura, Kazuo Tsubota
２．発表標題 Lacrimal Gland Squeezing by Contraction of Myoepithelial Cell Affects Tear Secretion
３．学会等名 The Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017 (ARVO2017)（国際学会）
４．発表年 2017年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考