

涙腺の発生メカニズムについて

伊藤正孝

防医大誌 (2024) 49 (1) : 12-20

要旨：涙腺は眼球表面を潤す涙液の容積の大半を分泌する外分泌腺で、その機能の障害は眼球表面の乾燥とそれに起因する炎症を引き起こし、重篤な場合には失明に至る。涙腺をはじめとする外分泌腺は「上皮間葉相互作用」のメカニズムによって発生する。この総説では、マウス涙腺の発生における上皮間葉相互作用に関わる因子のいくつかについて、それらの特に涙腺器官発生初期における働きについて紹介し、1990年代以降の涙腺発生研究の流れとその再生医療への応用に向けての研究動向について解説する。

索引用語： 涙腺 / 上皮間葉相互作用 / 線維芽細胞増殖因子 (FGF)10
/ マウス / iPS細胞 / 再生医療

緒言

ヒトでもネズミでも、角膜は涙液によって湿润していることで透明性が維持される。涙液は、眼球近傍に存在する複数の性状が異なる外分泌腺の分泌物の混合物である。そして、これらの外分泌腺の中でも、もっとも分泌物の量が多く、涙液の主体をなす水分を分泌する腺が涙腺である。よって、涙腺の機能が障害された場合には、眼球表面は乾燥し、しばしば角膜には炎症とそれに伴う疼痛が生じ、ひどくなればそれは透明性を維持できなくなり、視力が失われる。本稿では、このように眼球表面において重要な機能を果たしている涙液の中心的な産生臓器である涙腺について、その器官発生を中心に、筆者がこの二十数年間に関わってきたことと、それらのその後の発展についてレビューする。

ヒトとマウスの涙腺形態の差異

本稿で紹介する研究の多くはマウスを実験動物として用いているが、ヒトとマウスでは涙腺のロケーションと形態が大きく異なっているこ

とをまずは述べておく必要がある。

ヒトの涙腺の大部分は眼窩上縁外側の前頭骨に接して、つまり眼球と前頭骨に挟まれて存在している。ここで「大部分」と書いたのは、ヒトの涙腺は眼窩部と眼瞼部の2葉に分かれ、後者は大きさでは前者の約1/3程度であるが、文字通り眼瞼内に存在するためである。前頭骨の眼窩部涙腺に接する部分はわずかにくぼんでおり、そこは「涙腺窩」と名付けられている。まるで涙腺による圧迫で生じたかのようなわずかなくぼみがある。Grayの人体解剖学の教科書には「(涙腺は) 大きさも形もアーモンドと概ね同じくらい」との記載がある¹⁾。この涙腺から出る導管は長さ1~数mm程度のものが約10本あり、眼球結膜と眼瞼結膜が上で折れ返るあたり(解剖学的には「上結膜円蓋」という)に開口している。

これに対し、マウスでは涙腺の体積の大部分を占める眼窩外涙腺が眼窩の耳側に遠く離れて外耳道口直下付近に存在し、眼球表面へは長い1本の導管で結ばれている。眼窩内には同じ導

管に合流する，眼窩外涙腺と比較するとはるかに小さな眼窩内涙腺が存在している（図1）。

大きさやロケーション，導管の数などの点でヒトとマウスの涙腺は大きく異なっているが，成熟した涙腺の組織像を見るとどちらも複合管状胞状腺の構造を有する純漿液腺が複数の小葉を構成しており，終末部の腺胞細胞の基底側には筋上皮細胞が存在する。このように，ヒトとマウスの涙腺の組織構築はよく似ている（図2A, B）。

涙腺の初期発生における「上皮間葉相互作用」について

外分泌腺を含む上皮性器官の多くは，「上皮間葉相互作用」のメカニズムによって発生することが知られている。文字通り，上皮と間葉（間充織）の相互作用で器官発生がおこるとのことだが，その例を示す歴史的に有名な実験がいくつもあるので紹介する。一つ目の例は，ニワトリの羽毛と鱗の発生に関する実験である^{2, 3)}。胚期のニワトリ（鶏胚）の足の間葉と背中の上皮を組み合わせて，あるいは，背中の間葉と足

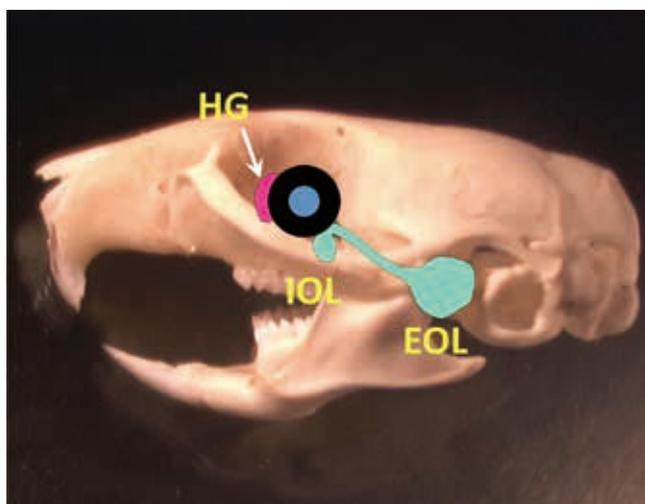


図1. マウスの涙腺の模式図

マウス成獣の骨格標本に眼球と涙腺を描き込んだ。マウス/ラットでは，涙腺は眼球耳側の眼窩内外に2葉存在している。涙腺の眼窩内の葉を眼窩内涙腺（IOL），眼窩外の葉を眼窩外涙腺（EOL）とよび，両者は1本の長い導管でつながっている。眼球鼻側の眼窩内にはハーダー腺（HG）という脂質とポルフィリンを分泌する腺が存在する。

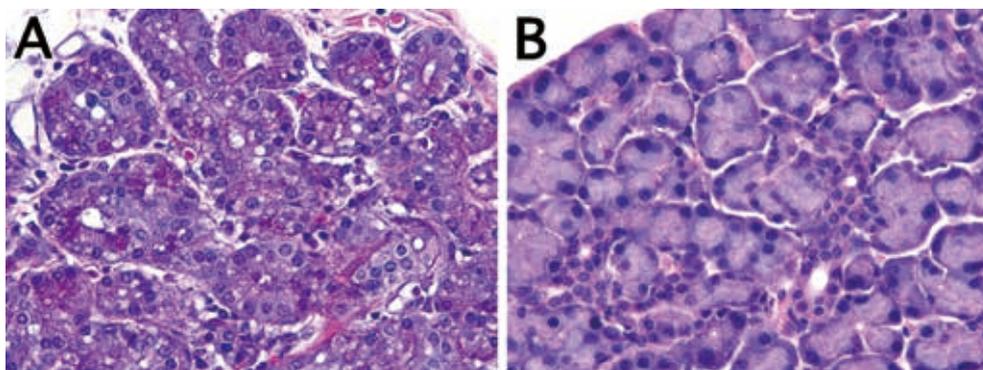


図2. ヒト (A) とマウス (B) の涙腺の組織像 (HE 染色)

A ヒト涙腺の組織像 (防衛医科大学校組織学実習標本より)

B 8週齢雄性マウス涙腺の組織像

どちらも純漿液腺であり，終末腺房の周囲に毛細血管などを認める。

の上皮を組み合わせて培養したところ、発生ステージによって感受性に違いはあるものの、前者では鱗が発生し、後者では、羽毛が発生した。また、もう一つの例は、消化管の上皮とその下の間葉とを交換して培養した実験⁴⁾である。これも鶏胚を用いた実験であるが、前胃と砂嚢の器官形成期における上皮と間葉を分離し、異なった組み合わせで培養したところ、砂嚢上皮と前胃の間葉とを培養した場合には、砂嚢上皮に胃腺が形成されペプシノゲンが発現した。これらの例から、上皮性器官の発生には上皮下の間葉からの誘導、つまり、誘導因子による上皮への働きかけが生じていることが示唆される。

筆者らが涙腺の発生について研究を始めた1990年代頃は、唾液腺⁵⁾や歯牙⁶⁾などの発生時における上皮間葉相互作用に関与する分子メカニズムが次々に発表される時期であった。なかでも筆者らが特に注目したものの一つが、1997年にBellusciらによって報告された、肺の器官発生における線維芽細胞増殖因子 (FGF) 10の作用に関する論文であった⁷⁾。肺は外分泌

腺ではないが、発芽、伸長、分枝形成といった発生過程は多くの外分泌腺とよく似ている。Bellusciらは、マウス肺の器官発生初期における発芽 (肺芽) の遠位側に隣接する間葉にはFGF10が発現しており、肺芽の器官培養系にFGF10を投与すると上皮の増殖と肥大が誘導されることを示した。その後、*Fgf10*のノックアウトマウスは二つのグループで開発され報告されているが^{8, 9)}、どちらも四肢の欠損と肺の欠損が主たる表現型として報告されている。

筆者らが涙腺発生研究を始めるに至ったのはもう一つの大きなきっかけがあった。それは、当時筆者が留学していたニューヨーク大学Skirball研究所のR. Lang博士の研究室でPax6 (5.0)*lacZ*マウスと名付けられたトランスジェニックマウスが開発されたことである。Williamsら¹⁰⁾が開発したこのトランスジェニックマウスは、眼の初期発生におけるマスター制御遺伝子であるPax6の上流5.0kbに*lacZ*遺伝子を結合させたトランスジーン (図3A)を導入したものである。このマウスでは、眼組織の表皮外胚葉成分にLacZ遺伝子が発現するため、

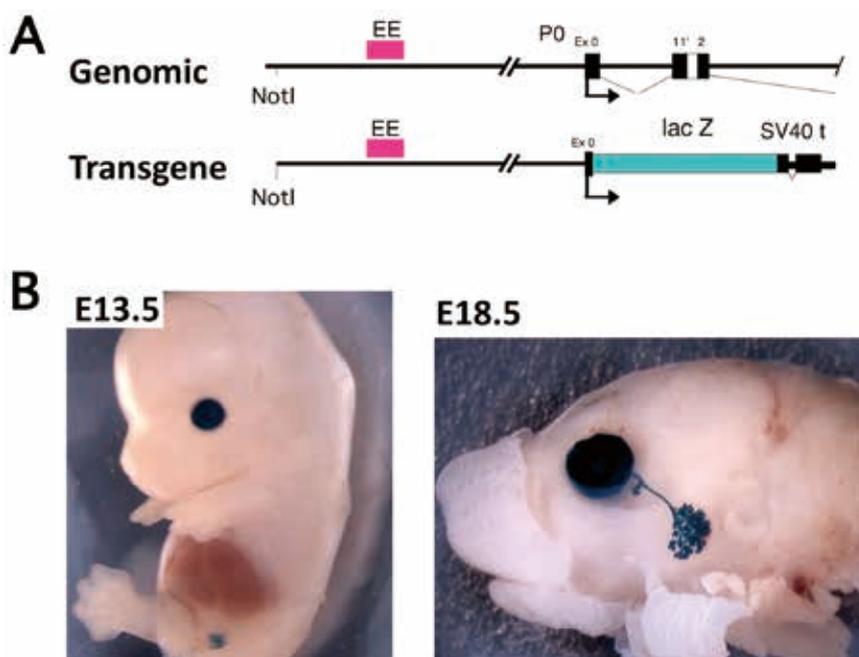


図3. Pax6(5.0)*lacZ*トランスジェニックマウスのトランスジーン (A) と表現型 (B) Pax6の上流5.0kbの中にはエンハンサーエレメント (EE) があり (A上), Pax6遺伝子の表皮外胚葉での発現を調節している。この5.0kb領域に*lacZ*遺伝子をつけた配列をトランスジーンとした (A下)。このマウスの全身または頭部にX-gal染色を施したところ、胎生13.5日胎仔 (B左) では角結膜と腺臓で、染色が見られた。胎生18.5日胎仔の頭部 (B右) では、角結膜に加え、涙腺の上皮で陽性となった。

これにX-gal染色を施すことにより角結膜と涙腺の上皮を青く染めることができ、涙腺発生を可視化するのにとっても都合の良いツールであった(図3B)。

筆者らは当初より、涙腺発生を誘導する因子が涙腺間葉から分泌されるFGFであるとの仮説をたてて実験を始めていたが、その仮説を支持するようなトランスジェニックマウスが2系統、ベイラー医科大学(テキサス州ヒューストン)のOverbeek博士らの研究室で開発されていた。これらはいずれも眼組織内にFGFを強制発現させたもので、異所性の腺組織が眼組織内に発生するものであった。これらのうち、Lovicuら(1999)¹¹⁾はヒトのFGF7遺伝子を水晶体で過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。その結果、角膜上皮の肥厚に加え、角膜内に外分泌腺様の構造物の発生が確認された。さらに同じ研究室のGovindarajanら¹²⁾は、ラットの*Fgf10*遺伝子を水晶体で過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、同様に角膜上皮の肥厚と、角膜内の腺様組織の発生を確認し、報告した。さらにGovindarajanらはこの論文の中でこのトランスジェニックマウスの表現型解析に加え、正常のマウスの涙腺発生期の涙腺間葉にFGF10が発現していることをin situハイブリダイゼーション法で示し、併せて、前述の*Fgf10*のノックアウトマウス⁹⁾で涙腺が欠損していることも報告している。

こうした背景と先行研究から筆者らは、FGF10が涙腺の初期発生の際に上皮の発芽を誘導する因子であると考え、マウス胎仔の涙腺発芽の器官培養による実験系を作製し、異所性涙腺の発芽誘導実験とFGF受容体阻害剤の投与による発芽抑制実験を行い、報告している¹³⁾。この中で、異所性涙腺の発芽誘導実験にはFGFを吸着し徐放する働きのあるヘパリンビーズ(直径約0.1 mm)を用い、本来涙腺が発芽しない下結膜円蓋の下方にFGF10を吸着させたビーズを埋め込む実験を行った。すると、そのビーズに向かって異所性の発芽が生じた。このような異所性発芽はFGF7を吸着させたビーズの埋め込みでも同様の頻度で出現した。FGF7とFGF10は同じ受容体(FGFR2IIIb)に結合することが知られている¹⁴⁾。FGF受容体を阻害する

薬剤を用いた発芽抑制実験では、ほぼ全例で発芽が抑制された。さらにこの研究の中では、涙腺発生におけるPAX6の役割についても検討している。*Pax6*遺伝子は眼の発生におけるマスター制御遺伝子とされているが、その*Pax6*遺伝子に変異をもち小眼球を呈するSeyマウス¹⁵⁾のヘテロ接合体(*Sey+/-*)を用いて涙腺の発芽を観察したところ、野生型でFGF10を発現する涙腺間葉は*Sey+/-*でも同様に出現しているにも関わらず涙腺発芽は生じなかった。このことから、PAX6はマウス結膜上皮においてFGF10に対する感受性を獲得させる因子であることがわかった。

次に我々は涙腺の分枝形成に関わる因子の解析を行った。骨形成性タンパク質(bone morphogenic protein; BMP)は、肺^{16,17)}や前立腺¹⁸⁾などの上皮性の構造物の分枝形成に関与していることが知られていたことから、涙腺の分枝形成にもこれが関与しているものと考えた。中でもBMP7は眼球の表皮外胚葉成分の形成に関与していることが報告されていた^{19,20)}ことから、我々は2系統のBMP7に関するミュータントマウス^{20,21)}を取り寄せて解析を行った²²⁾。Dudleyらによる*Bmp7*ミュータントマウスはneo遺伝子を挿入して*Bmp7*遺伝子をノックアウトしたもので²⁰⁾、これに*Pax6(5.0)lacZ*マウスを掛け合わせることで、*Bmp7*ミュータントマウスの涙腺の枝分かれ構造が明瞭に観察できた。一方、Godinらによる*Bmp7*ミュータントマウス²¹⁾は*lacZ*遺伝子を挿入してノックアウトしたものであるため、そのヘテロ個体では涙腺を含む全身の器官に異常は見られなかったが、BMP7を発現する細胞でLacZが発現しているため、涙腺上皮近傍におけるBMP7の発現が可視化できた。これらのマウスの観察の結果、*Bmp7*ミュータントマウスでは、涙腺上皮の発芽に遅延はなく、導管伸長の長さにも異常はなかったものの、遠位部の分枝の数は野生型と比較して有意に減少していた。さらにBMPの阻害剤であるnogginまたはfollistatinを発芽後のマウス涙腺の器官培養系に投与すると、上皮の先端に生じる枝分かれの数はこれも有意に減少していた。

上皮間葉相互作用の一方の場である間葉組織

は一般には疎な結合組織であるので、細胞外基質が豊富である。ここでの細胞外基質はFGFの機能発現にも重要な役割を果たしている。FGFファミリーのタンパク質のほとんどの分子では、そのC末端側にヘパリン／ヘパラン硫酸に結合する部位が存在する。ヘパラン硫酸はグリコサミノグリカンの一つで、コアタンパクに結合してプロテオグリカンとして細胞膜や結合組織の細胞外基質中などに普遍的に存在している。FGFは分泌細胞から分泌されると、近傍の細胞外基質で、あるいはその分泌細胞自身の表面でヘパラン硫酸に結合し、遠方に拡散することなくパラクライン因子として働く。ならば、同じ受容体に結合するFGFでも、ヘパラン硫酸への結合性が異なれば、濃度勾配の形成も異なり、涙腺や唾液腺などの器官形成パターン（導管伸長の程度や分枝の数、終末腺房の形状など）に影響を与えると考えられる。そのようなモデルが肺発生で報告されていた^{23, 24)}。Makarenkovaら²⁵⁾は、FGF7とFGF10の器官形成における働きの違いはそれらのヘパラン硫酸への結合性の違いに基づく濃度勾配の違いによるものではないかと考えた。そこで、FGF10タンパク質分子のヘパリン結合部位の塩基配列のうちの一塩基に改変を加え、ヘパラン硫酸への結合性がFGF7とFGF10の間になったいくつかのミュータントFGF10分子を用いて、マウス涙腺発芽上皮の器官培養系への投与実験を行った。すると、誘導された涙腺上皮の分枝パターンやそこでの遺伝子発現はFGF10投与後のそれらよりもFGF7投与後のそれらに似ていた。

涙腺の形成不全を伴う先天性疾患

ヒトにおいても、FGF10経路の異常で涙腺が欠損する疾患が知られている。先天性涙腺唾液腺欠損 (aplasia of lacrimal and salivary glands; ALSG)^{26, 27)} と涙腺-耳-歯-指症候群 (lacrimo-auriculo-dento-digital syndrome; LADD症候群)^{28, 29)} であるが、どちらもFGF10またはその受容体であるFGFR2をコードする遺伝子のハプロ不全が原因の常染色体優性遺伝の先天性疾患である。いずれも稀な疾患であるが、涙腺を含む複数の器官に形成不全が見られる。

ワーデンブルグ症候群 (waardenburg syndrome;

WS) と眼瞼裂狭小・眼瞼下垂・逆内眼角贅皮症候群 (Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome; BPES) でも涙腺、唾液腺の低形成が生じることが報告されている。WSは、種々の程度の難聴と色素細胞などの神経堤由来組織の軽微な異常を特徴とする疾患である³⁰⁾。Elmaleh-Bergèsらの報告では、画像診断を実施したWS患者の約8割で涙腺と唾液腺の低形成が見られている³¹⁾。WSは、PAX3, SOX10, MITFなどの遺伝子の変異が原因として知られている。BPESは*Foxl2*遺伝子の変異を原因としている³²⁾。*Foxl2*は一般には卵巣の発達と機能発現に関与する転写因子であるので、女性のBPES患者では眼瞼異常に卵巣機能不全を伴う例が多く、眼瞼異常のみを呈するII型に対して、I型に分類されている³³⁾。Duarteらの報告によると、BPES患者21例中15例で涙腺は欠損または低形成であり、16例中13例で*Foxl2*遺伝子の変異が見つかっている³⁴⁾。WSとBPESの原因遺伝子の涙腺・唾液腺発生への直接の関与は報告されていないため、これら疾患における涙腺・唾液腺の欠損・低形成はこれらの遺伝子の変異の2次的な影響によるものと考えられる。

涙腺上皮細胞の単離と培養

2000年頃までの研究で、涙腺発生にはFGF10をはじめとする複数の因子が関与していることが明らかになってきたが、我々はさらに複数の因子が関与していると考えていた。そして、涙腺発生における上皮間葉相互作用に関わる因子をさらに深く調べてゆくためには、上皮と間葉を分けて、それぞれの成長因子感受性や発現遺伝子などを解析する必要があると考えた。増殖因子やその阻害剤等を投与する実験をするときには、上皮と間葉の双方を含んだ器官培養系だと、投与したものがどちらに作用しているのかわかりにくい上、それぞれの側でどのようなタンパク質や遺伝子が発現しているのかを調べるのにも上皮と間葉を分離することが必須になる。そこで、当時、防衛医科大学校の研究科学生であった上田らは、新生仔マウスの涙腺組織を酵素消化によってバラバラにしたのち、シャーレへの接着性の違いや培地による選択性などを利用して、涙腺上皮細胞と間葉細胞をそ

それぞれ分離、純化し、それぞれ高純度の細胞集団として培養する方法を確立した³⁵⁾。そして、FGF10とその受容体に加え、唾液腺発生において関与が知られていたEGF^{5, 36, 37)}とHGF^{38, 39)}についてその発現と作用を解析することとした。

純化されたマウス胎仔涙腺の上皮細胞と間葉細胞を用いて、qPCR法で発現している*Fgf10*とその受容体である*Fgfr 2IIIb*を定量したところ、*Fgf10*は間葉で上皮の1000倍程度、*Fgfr 2IIIb*は上皮で間葉の10000倍程度、強く発現していることがわかった。*Fgf10*と*Fgfr 2 IIIb*ほど顕著ではないが、*Hgf*とその受容体である*c-Met*についても、間葉で増殖因子が、上皮でその受容体が発現していた。*Egf*については上皮と間葉の双方でリガンドも受容体も発現していた。これらの増殖因子を培養涙腺上皮細胞に投与すると、EGFとHGFでは細胞増殖活性は上がり、細胞死は減少した。しかし一方で、FGF10ではその受容体が発現しているにもかかわらずリガンドを投与しても細胞増殖活性と細胞死に影響は見られなかった。生後マウス涙腺におけるFGF10の働きは不明であった。上田ら³⁵⁾はさらに、細胞外基質を主成分としたゲルの上で涙腺上皮細胞を培養し、オルガノイドを作製することに成功した。電子顕微鏡による観察で、このオルガノイドでは上皮細胞が腺腔に向かって微絨毛を伸ばし、細胞間には細胞間接着装置と分泌細管が確認された。

さらに我々は、胎生後期～新生仔期のマウス涙腺において、EGFとHGFがともに、パラクライン作用とオートクライン作用を併せもって涙腺上皮細胞の増殖と生存の維持に作用していることを明らかにした⁴⁰⁾。この研究ではまず、EGFとHGFの受容体が涙腺上皮細胞で発現していることを免疫組織化学染色で証明したのち、EGFとHGFと、それぞれの受容体のチロシンキナーゼ阻害剤を用いて、刺激実験と阻害実験を行った。その結果、EGFとHGFはともに涙腺上皮の増殖に働き、細胞死を抑制し、両者の阻害剤を同時に投与すると涙腺上皮細胞は全滅したことから、出生前後のマウス涙腺上皮細胞は、その生存のためにはEGFまたはHGFの少なくともいずれか一方が必須であることが示された。

以上に示した通り、我々は、新生仔期の涙腺上皮の単離・培養には成功し、解析に用いてきたが、マウス成獣の涙腺からの涙腺上皮細胞の単離・培養には成功していなかった。成獣由来の涙腺上皮細胞は我々の方法では増殖が極めて悪かったためである。しかし、この問題は、その後、慶應義塾大学の坪田教授の研究室に所属していた小林らによって解決された⁴¹⁾。彼らはそれまでに開発していたマウス成獣由来の角膜上皮細胞の長期培養法⁴²⁾で用いたコレラトキシンを培地に添加する方法を応用することで、マウス成獣涙腺から単離した涙腺上皮細胞の長期培養と、そこから涙腺オルガノイドを作製することに成功している。

涙腺再生医療に向けた基礎研究

この節では、我が国における涙腺再生医療に向けた基礎研究を二つ紹介する。

2013年に慶應義塾大学の平山博士と東京理科大学の辻孝教授らのグループは、涙腺発生のメカニズムを*in vitro*で再現して再生させた涙腺原基を、涙腺を切除したマウス成獣に移植して機能発現を確認している⁴³⁾。この再生涙腺原基は、発芽後のマウス涙腺組織から上皮細胞と間葉細胞をそれぞれ採取し、両者を併せて3次元的に培養して作製したものである。その方法原理は、辻孝教授らのグループで歯胚や唾液腺などで確立していた器官原基法 (organ germ method)^{44, 45)}をベースとしたものであり、上皮細胞と間葉細胞の相互作用を人為的に調節したものであると言える。

2012年に山中伸弥博士がノーベル賞を受賞したことで特に注目されている人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の技術は現在、眼組織を含む様々な器官の再生に応用されつつある。涙腺組織については、2022年には大阪大学の林竜平教授と西田幸二教授らのグループにより、ヒトiPS細胞に由来する涙腺オルガノイドが作成されNature誌に発表された⁴⁶⁾。彼らは、それまでに報告していた2次元的な眼オルガノイド^{47, 48)}の同心円的な層構造の中から3次元的な涙腺構造を作る細胞集団を見出し、これをマトリゲル上で培養し、分枝構造を有する3次元涙腺オルガノイド

を作出した。そしてさらに、このオルガノイドをヌードラットの涙腺近傍に生着させ、成熟涙腺として機能させることに成功した。この成功は重症ドライアイなどの眼表面疾患に対する幹細胞治療のための方法論的基盤となるのみならず、疾患モデルの開発や創薬研究にも応用できるものとして期待される。

結 語

涙腺の器官発生において基礎的なメカニズムである上皮間葉相互作用の分子メカニズムについて、今日までに報告されてきた研究の中からいくつかを紹介した。涙腺再生医療の技術は幹細胞技術などをもとに開発が進んでおり、今後さらなる発展が期待されるが、それを支える基盤的知見となる発生メカニズムに関する基礎研究の重要性は今後も変わらないものと思われる。基礎研究と臨床応用への研究が車輪の両輪となってこれからは涙腺再生に関する研究が進展してゆくことを期待したい。

利益相反

本論文に関して開示すべき利益相反はない。

文 献

- Gleeson M.: Chapter 44. Orbit and accessory visual apparatus. In: Gray's Anatomy, 42nd ed.- Anatomical Basis of Clinical Practice. Ed. by S. Standring, ELSEVIER, Amsterdam, 2020, pp 787-788.
- Rawles ME.: Tissue Interactions in Scale and Feather Development as Studied in Dermal-Epidermal Recombinations. *J Embryol Exp Morphol.* 11: 765-789, 1963.
- Sengel P.: Pattern formation in skin development. *Int J Dev Biol.* 34: 33-50, 1990.
- Mizuno T, Yasugi S, Takiguchi K.: Gland formation and pepsinogen expression in the gizzard endoderm as affected by the proventricular mesenchyme in the chick embryo. *C R Seances Soc Biol Fil.* 180: 113-116, 1986.
- Jaskoll Y, Melnick M.: Submandibular gland morphogenesis: Stage-specific expression of TGF- α /EGF, IGF, TGF- β , TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF- β 2, TGF- β 3, and EGF-r null mutations. *Anat Rec.* 256: 252-268, 1999.
- Jernvall J, Thesleff I.: Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev.* 92: 19-29, 2000.
- Bellusci S, Grindley J, Emoto H, et al.: Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development.* 124: 4867-4878, 1997.
- Min H, Danilenko DM, Scully SA, et al.: Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to Drosophila branchless. *Genes Dev.* 12: 3156-3161, 1998.
- Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, et al.: Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet.* 21: 138-141, 1999.
- Williams SC, Altmann CR, Chow RL, et al.: A highly conserved lens transcriptional control element from the Pax-6 gene. *Mech Dev.* 73: 225-229, 1998.
- Lovicu FJ, Kao WW, Overbeek PA.: Ectopic gland induction by lens-specific expression of keratinocyte growth factor (FGF-7) in transgenic mice. *Mech Dev.* 88: 43-53, 1999.
- Govindarajan V, Ito M, Makarenkova HP, et al.: Endogenous and ectopic gland induction by FGF-10. *Dev Biol.* 225: 188-200, 2000.
- Makarenkova HP, Ito M, Govindarajan V, et al.: FGF10 is an inducer and Pax6 a competence factor for lacrimal gland development. *Development.* 127: 2563-2572, 2000.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, et al.: Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *J Biol Chem.* 271: 15292-15297, 1996.
- Hogan BL, Horsburgh G, Cohen J, et al.: Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 97: 95-110, 1986.
- Bellusci S, Henderson R, Winnier G, et al.: Evidence from normal expression and targeted misexpression that *Bone Morphogenetic Protein-4 (Bmp-4)* plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development.* 122: 1693-1702, 1996.
- Weaver M, Yingling JM, Dunn NR, et al.: Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development.* 126: 4005-4015, 1999.
- Lamm ML, Podlasek CA, Barnett DH, et al.: Mesenchymal Factor Bone Morphogenetic Protein 4 Restricts Ductal Budding and Branching Morphogenesis in the Developing Prostate. *Dev Biol.* 232: 301-314, 2001.
- Wawersik S, Purcell P, Rauchman M, et al.: BMP7 Acts in Murine Lens Placode Development. *Dev Biol.* 207: 176-188, 1999.
- Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ.: A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* 9: 2795-2807, 1995.
- Godin RE, Takaesu NT, Robertson EJ, et al.: Regulation of BMP7 expression during kidney development. *Development.* 125: 3473-3482, 1998.
- Dean C, Ito M, Makarenkova HP, et al.: Bmp7 regulates branching morphogenesis of the lacrimal gland by promoting mesenchymal proliferation and condensation. *Development.* 131: 4155-4165, 2004.
- Izvolosky KI, Shoykhet D, Yang Y, et al.: Heparan sulfate-FGF10 interactions during lung morphogenesis. *Dev Biol.* 258: 185-200, 2003.
- Izvolosky KI, Zhong L, Wei L, et al.: Heparan sulfates

- expressed in the distal lung are required for Fgf10 binding to the epithelium and for airway branching. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285: L838-846, 2003.
- 25) Makarenkova HP, Hoffman MP, Beenken A, et al.: Differential interactions of FGFs with heparan sulfate control gradient formation and branching morphogenesis. *Sci Signal.* 2: ra55, 2009.
- 26) Entesarian M, Matsson H, Klar J, et al.: Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor 10 are associated with aplasia of lacrimal and salivary glands. *Nat Genet.* 37: 125-127, 2005.
- 27) Shams I, Rohmann E, Eswarakumar VP, et al.: Lacrimo-Auriculo-Dento-Digital Syndrome Is Caused by Reduced Activity of the Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10)-FGF Receptor 2 Signaling Pathway. *Mol Cell Biol.* 27: 6903-6912, 2007.
- 28) Rohmann E, Brunner HG, Kayserili H, et al.: Mutations in different components of FGF signaling in LADD syndrome. *Nat Genet.* 38: 414-417, 2006.
- 29) Milunsky JM, Zhao G, Maher TA, et al.: LADD syndrome is caused by *FGF10* mutations. *Clin Genet.* 69: 349-354, 2006.
- 30) Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, et al.: Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat.* 31: 391-406, 2010.
- 31) Elmaleh-Bergès M, Baumann C, Noël-Pétrouff N, et al.: Spectrum of temporal bone abnormalities in patients with Waardenburg syndrome and *SOX10* mutations. *Am J Neuroradiol.* 34: 1257-1263, 2013.
- 32) Cocquet J, De Baere E, Gareil M, et al.: Structure, evolution and expression of the *FOXL2* transcription unit. *Cytogenet Genome Res.* 101: 206-211, 2003.
- 33) Zlotogora J, Sagi M, Cohen T.: The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. *Am J Hum Genet.* 35: 1020-1027, 1983.
- 34) Duarte AF, Akaishi PM, de Molfetta GA, et al.: Lacrimal Gland Involvement in Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus Inversus Syndrome. *Ophthalmology.* 124: 399-406, 2017.
- 35) Ueda Y, Karasawa Y, Satoh Y, et al.: Purification and characterization of mouse lacrimal gland epithelial cells and reconstruction of an acinarlike structure in three-dimensional culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 1978-1987, 2009.
- 36) Nogawa H, Takahashi Y.: Substitution for mesenchyme by basement-membrane-like substratum and epidermal growth factor in inducing branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Development.* 112: 855-861, 1991.
- 37) Morita K, Nogawa H.: EGF-dependent lobule formation and FGF7-dependent stalk elongation in branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in vitro. *Dev Dyn.* 215: 148-154, 1999.
- 38) Furue M, Okamoto T, Hayashi H, et al.: Effects of hepatocyte growth factor (HGF) and activin a on the morphogenesis of rat submandibular gland-derived epithelial cells in serum-free collagen gel culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35: 131-135, 1999.
- 39) Ikari T, Hiraki A, Seki K, et al.: Involvement of hepatocyte growth factor in branching morphogenesis of murine salivary gland. *Dev Dyn.* 228: 173-184, 2003.
- 40) Karasawa Y, Shinomiya N, Takeuchi M, et al.: Growth factor dependence of the proliferation and survival of cultured lacrimal gland epithelial cells isolated from late-embryonic mice. *Dev Growth Differ.* 64: 138-149, 2022.
- 41) Kobayashi S, Kawakita T, Kawashima M, et al.: Characterization of cultivated murine lacrimal gland epithelial cells. *Mol Vis.* 18: 1271-1277, 2012.
- 42) Ma X, Shimmura S, Miyashita H, et al.: Long-term culture and growth kinetics of murine corneal epithelial cells expanded from single corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 2716-2721, 2009.
- 43) Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, et al.: Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun.* 4: 2497, 2013.
- 44) Nakao K, Morita R, Saji Y, et al.: The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods.* 4: 227-230, 2007.
- 45) Ogawa M, Tsuji T.: Reconstitution of a bioengineered salivary gland using a three-dimensional cell manipulation method. *Curr Protoc Cell Biol.* 2:66:19.17.1-19.17.13, 2015.
- 46) Hayashi R, Okubo T, Kudo Y, et al.: Generation of 3D lacrimal gland organoids from human pluripotent stem cells. *Nature.* 605: 126-131, 2022.
- 47) Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, et al.: Coordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature.* 531: 376-380, 2016.
- 48) Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, et al.: Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nature Protoc.* 12: 683-696, 2017.

Developmental Mechanisms of Lacrimal Gland – a mini review

Masataka ITO

J. Natl. Def. Med. Coll. (2024) 49 (1) : 12 – 20

Abstract: Lacrimal gland is a serous gland secreting tear fluid to ocular surface. Dysfunctions of this gland may cause inflammation on the cornea and eventually, in severe cases, blindness. In the development of this gland, from its initial budding, the molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal interactions are working. In the past several decades, plenty of studies revealing the mechanistic details of this process have been published. In this review, several studies on these mechanisms in the lacrimal gland development and its applications for regenerative medicine are summarized.

Key words: lacrimal gland / epithelial-mesenchymal interaction /
fibroblast growth factor (FGF)-10 / mouse / iPS cells / regenerative
medicine