

令和元年6月24日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20280

研究課題名（和文）LOXL1遺伝子発現低下とTGFβに注目した落屑症候群合併症抑制の新規戦略の樹立

研究課題名（英文）LOXL1

研究代表者

石川 伸之（Ishikawa, Nobuyuki）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00458077

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：LOXL1ノックアウトマウスで野生型マウス角膜と比較して、角膜実質の切開創の癒合が遅延していた。炎症細胞浸潤は強いように思われたが、治癒遅延に伴う二次的な所見と考えた。結果は、LOXL1の実質治癒過程での細胞挙動の解析の必要性和今後の課題を提示した。LOXL1ノックアウトマウスで野生型マウス角膜と比較して、角膜実質の切開創の癒合が遅延していた。炎症細胞浸潤は強いように思われたが、治癒遅延に伴う二次的な所見と考えた。結果は、LOXL1の実質治癒過程での細胞挙動の解析の必要性和今後の課題を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

落屑症候群ではLOXL1遺伝子の異常と発現低下が報告されている。LOXL1遺伝子異常の落屑症候群の病態分子メカニズムへの関与の実態は解明されていない。LOXファミリーメンバーのプロトタイプであるLOXにTGFβ生理活性の抑制作用があることが報告されている。LOXL1が同様の作用を有しているか否かは報告が無いが、その同様の作用を有する可能性は大いに想定できる。解明できれば、落屑症候群の合併症である緑内障リスク、前嚢切開窓の線維化や濾過手術後の結膜癒痕に対する対策にTGFβシグナル抑制の戦略が盛り込めると期待できる。

研究成果の概要（英文）：The healing of incisions in the corneal stroma was delayed compared to wild type mouse cornea in LOXL1 knockout mice. Inflammatory cell infiltration appeared to be strong, but was considered a secondary finding with delayed healing. The results presented the need for analysis of cell behavior during the real healing process of LOXL1 and future issues. The healing of incisions in the corneal stroma was delayed compared to wild type mouse cornea in LOXL1 knockout mice. Inflammatory cell infiltration appeared to be strong, but was considered a secondary finding with delayed healing. The results presented the need for analysis of cell behavior during the real healing process of LOXL1 and future issues.

研究分野：水晶体

キーワード：落屑症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

落屑症候群では、緑内障、白内障・眼内レンズ手術での手術遂行に不利な要因（術中のチン小帯断裂や水晶体脱臼、術後高眼圧、前囊切開窓の線維化）が複数合併する。チン小帯の脆弱化や前囊切開窓の高度の線維化は、白内障手術で眼内（水晶体嚢内）に固定された眼内レンズの位置（XYZ軸方向）に影響しうると考えられる。

落屑症候群の病態分子メカニズムとして、候補コラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックス会合に関与する Lysyl oxidase (LOX)ファミリー(5種)のうち、Lysyl oxidase-like 1 (LOXL1)遺伝子の異常とそれに伴う LOXL1 発現の低下が報告されている。LOXL1 活性の低下がチン小帯のマトリックス成熟を障害して、脆弱化させていると考えられるが、緑内障リスクや眼内レンズ手術後の前囊切開窓の線維化については LOXL1 活性の低下だけでは説明できていないのが現状である。

以前から一般的に緑内障の発症分子メカニズムや前囊切開窓の過剰な線維化ではトランスフォーミング成長因子 b(TGFb)の関与が知られている。原発開放隅角緑内障では、房水の TGFb2濃度が高い事が報告されている。他の研究者からマウス眼内で TGFb(TGFb2)をウイルスベクターで過剰発現させた場合も眼圧が上昇すると報告されている。また、緑内障の濾過手術の成績（長期眼圧下降）は、原発開放隅角緑内障眼において、落屑症候群眼よりも良好で、濾過胞の線維・癒痕化が落屑症候群眼で強いと報告されている。しかし、落屑症候群で報告されている LOXL1 発現低下が TGFb2 発現やその生理活性やシグナル伝達に影響し、落屑症候群の病態分子メカニズムに関与しているか否かは不明である。

申請者の所属では、過去十数年、雑賀司珠也教授の指導で TGFb とそのシグナル伝達(Smad, MAPキナーゼ群)の眼組織での創傷治癒過程での線維化に焦点を当てた研究が継続されている。過去その他施設から、LOX ファミリーのプロトタイプである LOX が TGF $\beta$ に結合して培養骨芽細胞の基質に沈着していること、LOX そのものが TGF $\beta$ 1 による Smad3 の活性化（リン酸化）をプロモーターレベルで抑制していることが報告された。

LOX ファミリーメンバーは、LOX と LOXL1 から L4 を含むが、LOX 以外のメンバーが同様の TGF $\beta$ リガンドの生理活性抑制と TGF $\beta$ シグナル伝達の抑制の作用を有するか否かは研究されていない。落屑症候群でその発現低下が報告されている LOXL1 は、分子構造は LOX に類似しているため、LOX 同様の TGF $\beta$ リガンドの生理活性抑制と TGF $\beta$ シグナル伝達の抑制作用を有する可能性、すなわち、落屑症候群では、LOXL1 発現低下を介した TGF $\beta$ 作用の増強が落屑症候群の表現型（緑内障、チン小帯の脆弱化、前囊切開窓の過剰な線維化、濾過手術後の濾過効率の低下）の病態分子メカニズムである可能性は大いに想定できる。

本研究から、LOXL1 遺伝子異常の落屑症候群の病態分子メカニズムへの関与の実態を解明できる可能性が多いに期待できる。落屑症候群の合併症である緑内障リスクや眼内レンズ手術後の前囊切開窓の線維化に対する対策に TGFb シグナル抑制の戦略が盛り込めると期待できる。

### 2. 研究の目的

落屑症候群の合併症である緑内障リスク、白内障・眼内レンズ手術後の前囊の過剰な線維化、濾過手術後の結膜癒痕が原発開放隅角緑内障よりも強い事はすべて TGFb 活性の増強に矛盾しない表現型である。落屑症候群では LOXL1 遺伝子の異常と発現低下が報告されている。LOXL1 遺伝子異常の落屑症候群の病態分子メカニズムへの関与の実態は解明されていない。LOX ファミリーメンバーのプロトタイプである LOX に TGFb 生理活性の抑制作用があることが報告されている。LOXL1 が同様の作用を有しているか否かは報告が無いが、その同様の作用を有する可能性は大いに想定できる。本研究では、LOXL1 欠損マウスを用いて、角膜と結膜を中心に LOXL1 遺伝子の創傷治癒への関与を解明する。解明できれば、落屑症候群の合併症である緑内障リスク、前囊切開窓の線維化や濾過手術後の結膜癒痕に対する対策に TGFb シグナル抑制の戦略が盛り込めると期待できる。

### 3. 研究の方法

遺伝子組換え実験についての承認を受けた後に、LOXL1 ノックアウトマウスを導入し、施設内で繁殖を行う。

三種混合麻酔下でマイクロサージカルナイフを用いて C57BL/6N (野生型) マウスと LOXL1 ノックアウトマウスに約 1.8mm の角膜全層切開を施行し、角膜創傷治癒モデルを作製する。安楽的に屠殺後に角膜を摘出し、ホルマリン固定の後にパラフィン切片を作成する。ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫染色（平滑筋アクチン、F4/80、TGFb1、smad3 など）を施行して角膜実質の治癒具合を比較観察した。

### 4. 研究成果

LOXL1 ノックアウトマウスで野生型マウス角膜と比較して、角膜実質の切開創の癒合が遅延していた (HE染色)。炎症細胞浸潤は強いように思われたが、治癒遅延に伴う二次的な所見と考えた (HE染色)。

免疫組織化学的検索結果では、以下のことが観察された。

(1) 野生型マウスでは切開癒合部だけでなく、創傷に隣接する角膜実質の細胞が平滑筋アクチンを発現した筋線維芽細胞に形質転換していたが、LOXL1 ノックアウトマウスでは解離してい

る切開創内に分布する細胞は筋線維芽細胞に形質転換していたが、創に隣接する実質組織の細胞は平滑筋アクチン陰性であった。

(2) 角膜上皮基底細胞の治癒過程でのSmad3の核内発現とTGFb1発現がLOX11ノックアウトで抑制されていた。

(3) マクロファージ浸潤は強いように思われたが、治癒遅延に伴う二次的な所見と考えた(F4/80染色)。

結果は、LOX11ノックアウトでTGFb1/Smad3シグナルが抑制されたことで、角膜実質の創傷治癒が遅延したと考察できた。LOXL1の実質治癒過程での細胞挙動の詳細な解析の必要性和今後の課題を提示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Ishikawa N: Cataract surgery in exfoliation syndrome patients: Errors in the prediction of postoperative refraction following IOL implantation and postoperative change of intraocular pressure. ISER. 2016.9. Tokyo, Japan.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名：

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。