

令和元年6月17日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20336

研究課題名(和文)後発白内障におけるプロテオグリカン・デコリンの関係と機能解析

研究課題名(英文) Relationship and functional analysis of proteoglycan decorin in posterior capsule opacification

研究代表者

柴田 伸亮(稲垣伸亮)(SHIBATA, Shinsuke)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：30440514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット水晶体摘出術後の後囊混濁(PCO)モデルの水晶体上皮細胞(LEC)で、DNAマイクロアレイ解析を行い、PC組織移行移行の1つであるデコリン(DCN)が高発現である。上皮間葉系移行、水晶体線維分化に関与する遺伝子群の上昇が生じることを明らかにした。ヒトLECのDCN遺伝子発現量と前房水DCN濃度が年齢や水晶体混濁病型、混濁程度の相関はなかった。マウスとヒトのLECの培養細胞実験で、FGF2添加により濃度依存的にDCN mRNA発現が増加、TGF- $\beta$ 2添加によりDCN mRNA発現は低下を認めた。その結果DCNはPCO進行過程でEMTや線維分化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白内障術後の後囊混濁(PCO)の治療にはYAGレーザーによる後囊切開術があるが、術後の網膜裂孔形成やぶどう膜炎、眼圧上昇といった合併症が問題となる。我々は、ラット水晶体摘出術後のPCO組織で、プロテオグリカンの1つであるデコリン(DCN)が高発現であることを見出した。本研究では、このDCNの分子機構を解明し、PCOとの関わりを明らかにすることを目的とする。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the expression of proteoglycan decorin (DCN) was highly upregulated by analyzing gene expression using DNA microarray in lens epithelial cells (LEC) from a rat postoperative posterior capsule opacification (PCO) model. Further, genes related with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and those related with the differentiation of lens fiber were upregulated. DCN was also detected in human anterior aqueous. DCN gene expression level in human LEC and DCN concentration in human anterior aqueous did not correlate with age, opacity type or grade. In cultured mouse and human LECs, DCN mRNA was upregulated concentration-dependently after treatment fibroblast growth factor 2 (FGF2) and decreased with treatment of transforming growth factor  $\beta$  2 (TGF- $\beta$ 2).

In conclusion, DCN may be related with EMT and lens fiber differentiation in PCO development.

研究分野：眼科学

キーワード：眼生化学・分子生物

## 1. 研究開始当初の背景

白内障手術機械や手技および眼内レンズが進歩しても、術後の PCO による後発白内障はまだまだ多く発生する。小児の白内障では PCO が必発であり、大人にできる YAG レーザー治療もできず再手術が必要となる。また、YAG レーザー術後の網膜裂孔形成やぶどう膜炎、眼圧上昇といった合併症もあるため、PCO の予防、治療法の開発が望まれる。そこで、PCO 発症に関与する因子を網羅的に解析するため、ラット PCO モデルを用い、水晶体摘出術後 1 週目の LEC の上皮間葉系移行 (EMT) を生じる時期に、DNA マイクロアレイ解析を施行した。その結果、デコリン (DCN) の発現が 100 倍近く上昇することを見出した。DCN は、コラーゲン線維の形成に関与するプロテオグリカンの 1 種であり、創傷治癒にも関与し、過剰な瘢痕形成を抑制することが知られている。よって、PCO の発症における DCN の役割は、大変興味深い課題であるといえる。

## 2. 研究の目的

まず初めに、ラット PCO の発症機構を解明するためにラット PCO モデルを用いて、水晶体摘出術後の LEC の遺伝子発現の経時的変化を DNA マイクロアレイ法を用いて、網羅的に解析する。

次に、術後 1 週目の PCO 組織で発現が上昇していた DCN に注目した。DCN は分泌たんぱくであるが、ヒトの水晶体に対する機能は明らかにはなっていない。そこで、ヒト前房水における DCN タンパク発現の解析とヒト LEC における DCN の発現変化を測定し、加齢及び白内障発症との関係を明らかにすることにした。

さらに、PCO で上昇することが知られている炎症性サイトカインである Transforming growth factor (TGF) や Fibroblast growth factor (FGF) が、DCN 発現に与える影響について培養 LEC を用いて解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) ラットモデルにおける PCO の進行に伴う LEC の遺伝子発現変化の網羅的な解析

金沢医科大学眼科で、確立したラット水晶体嚢外摘出術 (ECLC) によるラット PCO モデルを用いた動物実験を行った。動物実験は金沢医科大学動物実験指針に沿って、実験委員会の承認を得ている。12 週齢 Sprague Dawley ラットに ECLC を施行し、術直後、1 週後、2 週後に水晶体上皮細胞を含めた残存水晶体嚢のみを摘出した。摘出したサンプルから Total RNA を抽出後、Affymetrix- GeneChip Array を用いて、網羅的な遺伝子発現変化を解析した。変動の有る遺伝子群のパスウェイ解析および ontology 解析により PCO 発現メカニズムの分子機構の解析を行った。予備実験で、ECLC 術後 1, 2 週目に発現上昇が見られた DCN と、他の変動が見られた因子を、リアルタイム RT-PCR 法とウェスタンブロット法にて発現確認を行った。

### (2) ヒト白内障病型における DCN の発現変化と、手術時の前房水における分泌 DCN の量の解析

本実験は、研究代表者により、金沢医科大学臨床研究倫理委員会申請し、承認済みである。金沢医科大学病院で白内障手術を行い、口頭と文書にて同意を得た患者の白内障手術時に、房水、前嚢切開後の LEC を採取した。前房水は、房水ピペットで約 100  $\mu$ L 採取後すぐにドライアイスにて凍結し、後日 Human DCN ELISA 法 (Sigma) にて分泌タンパクであるデコリン含有量を測定した。LEC は、採取後すぐに RNAlater 液にて固定し、後日 Total RNA を抽出

した。DCN mRNA 発現動態をリアルタイム PCR 法 (Taq Man human DCN Probe, 内因性コントロール:18srRNA) で解析した。デコリン発現量と水晶体混濁病型 (WHO 分類で皮質、核、後囊下白内障の 3 病型および前囊下混濁に分類し評価した) や年齢の関連を解析した。コントロール群は、黄斑前膜と黄斑円孔治療のため硝子体手術 + 水晶体再建術の際に採取される、ほぼ透明の水晶体からの水晶体上皮細胞を使用した。

### (3) PCO で上昇する炎症性サイトカインによる DCN 発現の変化や、DCN 添加による細胞増殖能の解析

白内障術後後囊混濁 (PCO) 発症には、TGF- $\beta$ 2 や FGF2 等のサイトカインの関与が報告されている。今回、TGF- $\beta$ 2 と FGF2 添加による LEC での DCN 発現変化と、DCN が細胞増殖に与える影響について解析した。マウス培養 LEC (MLEC) とヒト不死化培養 LEC (HLEC: SRA01/04) を用いて、TGF- $\beta$ 2 と FGF2 の添加実験を行った。DCN、トロポミオシン (TPM) の LEC における遺伝子発現を Real time RT-PCR 法にて解析した。さらに、DCN 添加による LEC 生細胞の測定は、MTS Cell Proliferation Colorimetric Assay Kit (測定波長 490nm) にて施行した。

## 4. 研究成果

### (1) ラットモデルにおける PCO の進行に伴う LEC の遺伝子発現変化の網羅的な解析

ラット PCO に関連する LEC の変化は、図 1 に示すように、術後 1 週、2 週目ともに発現が上昇していた遺伝子は TGF $\beta$ 1 や Tropomyosin など EMT に関与する遺伝子があり、そのなかでも DCN 発現が高値を示した。1 週目には発現が減少していたが 2 週目に上昇した遺伝子は水晶体の分化に関与する遺伝子群が上昇していた (表 1)。

リアルタイム PCR とウェスタンブロットにて、DCN の mRNA および蛋白発現が術後 1,2 週目の PCO 組織で上昇していることを確認した (表 2)。

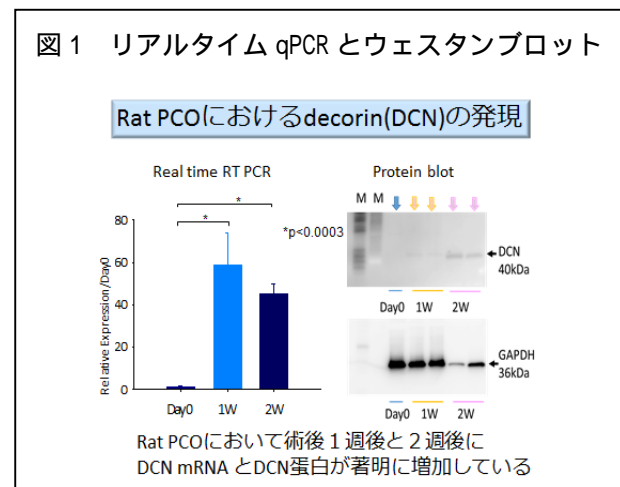


表 1

Day0に比べて、1W, 2W後に発現が2倍以上に  
なっていた遺伝子上位30



Gene	1W	2W	Gene	1W	2W
1 Dcn	108.983	112.149	16 RT1-Da	14.273	8.18
2 Col5a2	22.268	20.243	17 Cybb	12.223	10.09
3 Fn1	18.284	19.288	18 Col6a3	13.024	28.29
4 Cyr61	21.240	7.058	19 Rnase4	12.140	10.89
5 Col5a2	22.215	22.928	20 Runx1	11.856	8.42
6 Col1a1	22.229	48.713	21 Tpm2	11.725	4.24
7 Mylk	20.252	11.217	22 Ptgs2	10.749	7.20
8 Col3a1	19.783	22.851	23 Tgfb1	10.991	8.42
9 Actg2	18.983	9.888	24 Mgp	10.628	17.83
10 Gbp2	18.592	18.258	25 Ednrb	10.233	8.54
11 Emp1	14.923	13.025	26 Lyz2	10.203	8.47
12 Gprmb	14.770	7.188	27 Car3	10.141	12.83
13 Cd74	14.425	9.148	28 Sfrp2	10.105	4.32
14 Dct	14.214	8.712	29 Fcrl3	9.446	4.87
15 Scn7a	14.178	8.083	30 Ifitm1	8.829	9.93

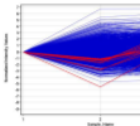
Day0(Control)に比べて、1W, 2W後に発現が2倍以上に  
なっていた遺伝子の機能解析

遺伝子オントロジー (Gene Ontology:GO)  
解析物の機能を表示する言葉

GO ACCESSION	GO Term
GO:0006952 GO:0002217 GO:0042829	defense response
GO:0009605	response to external stimulus
GO:0051707 GO:0009613 GO:0042828	response to other organism
GO:0009607	response to biotic stimulus
GO:0050898 GO:0051869	response to stimulus
GO:0043207	response to external biotic stimulus
GO:0001944	vasculature development
GO:0031012	extracellular matrix
GO:0030334	regulation of cell migration
GO:0006950	response to stress

表 2

Day0に比べて、1W後に発現が1/2以下になり、  
2W後に発現が2倍以上になっていた遺伝子



順位	Gene	1W	2W
1	Crygb	0.021	2.29
2	Crygc	0.139	4.44
3	Crygd	0.148	2.45
4	Colq	0.300	2.32
5	Bfsp1	0.321	11.61
6	Slc24a2	0.323	5.87
7	Snhg11	0.380	6.66
8	Slc46a3	0.423	2.121
9	Anxa9	0.466	2.295

分化した水晶体線維に発現する遺伝子群が2W後には上昇

Day0に比べて、1W後に発現が1/2以下になり、  
2W後に発現が2倍以上になっていた遺伝子の機能解析

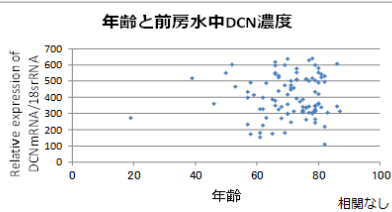
GO ACCESSION	GO Term
GO:0005212	structural constituent of eye lens
GO:0002088	lens development in camera-type eye
GO:0007601	visual perception
GO:0070306	lens fiber cell differentiation
GO:0050953	sensory perception of light stimulus
GO:0005198	structural molecule activity
GO:0043010 GO:0001747 GO:0031075	camera-type eye development
GO:0001654 GO:0042460	eye development
GO:0070307	lens fiber cell development
GO:0007600	sensory perception

## (2) ヒト白内障病型におけるDCNの発現変化と、手術時の前房水における分泌DCNの量の解析

ヒト前房水中にもDCN蛋白が検出された。前房水DCN濃度は年齢や水晶体混濁病型および程度との相関は認めなかった(図2)。ヒトLECにも、DCNmRNA発現は認めしたが、前房水と同様に年齢や水晶体混濁の病型及び程度との相関はなかった(図3)。結論として、ヒトLECと前房水中にDCNが発現し分泌していることが初めて明らかになった。

図 2

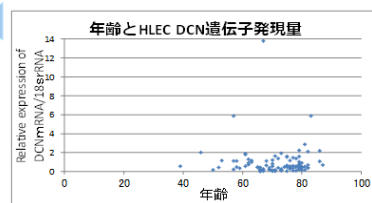
結果



- > ヒト前房水中にもDCNが検出された。
- > 年齢や水晶体混濁の有無や程度に関わらずデコリンが全ての症例の前房水中に検出され、濃度は個体差が極めて大きかった。前房水中DCN濃度範囲: 111.0~639.2 平均: 403.5±126.3

図 3

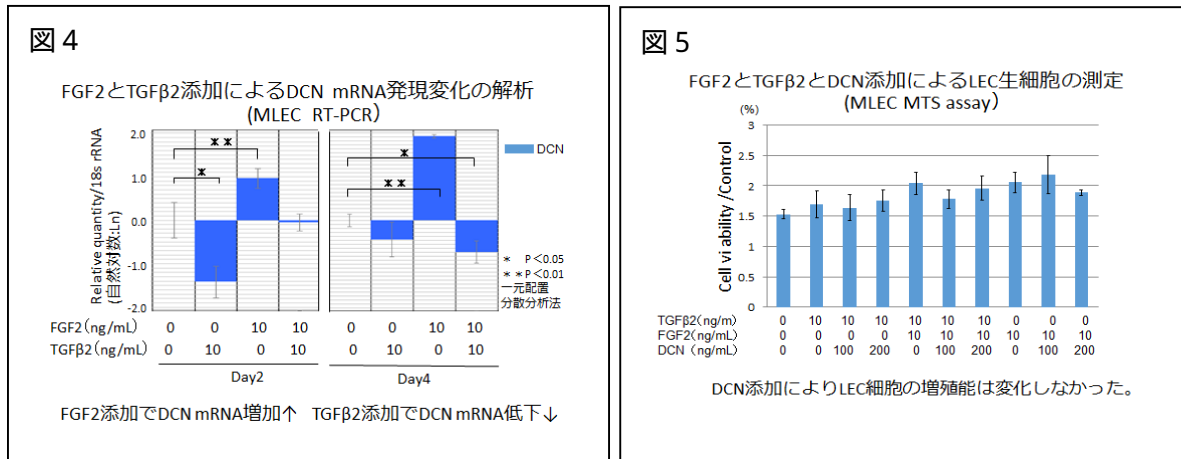
結果②



- > HLECからもDCN遺伝子発現が認められた。
- > DCN遺伝子発現が全ての症例に検出され、年齢に相関は認めなかった。
- > DCN遺伝子発現量範囲: 0.089~13.815 平均: 0.9141±1.185(混濁のないコントロール症例を1として比例計算した)

### (3) PCOで上昇する炎症性サイトカインによるDCN発現の変化とDCN添加による細胞増殖能の解析

培養ヒトLEC、マウスLECともに、FGF2の培養液への添加により濃度依存的にDCN mRNA発現の増加を認めたと、TGFβ2添加によりDCN mRNA発現は低下した(図4)。また、DCN添加によりマウスLECの細胞増殖能の亢進や減少は認めなかった(図5)。これらの結果より、DCNは細胞増殖ではなくEMTや分化に関与している可能性が示唆された。



引用文献 Yamaguchi Y et al. Nature 1990 ; Kwan P et al. PLoS One, 2015  
Kubo E et al. Cell Mol Med.17:212-21,2013

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

**E.Kubo, S.Shibata, T.Shibata, E.Kiyokawa, H.Sasaki, : FGF2 antagonizes aberrant TGFβ regulation of tropomyosin: rterior capsule opacity. J. Cell. Mol.Med. 21(5):916-928, 2017**

[学会発表](計 3 件)

**S.Shibata, N.Shibata, T.Shibata, H.Ishida, E.Kiyokawa, H.Sasaki, E.Kubo: Expression of proteoglycan decorin in opacified posterior capsule and its suppression by TGFβ in mouse lens epithelial cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. (Honolulu,'18.04)**

**S.Shibata, N.Shibata, T.Shibata, N.Tanimura, H.Sasaki, E.Kubo : Effects of proteoglycan decorin on lens epithelial cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (Baltimore, 2017.05)**

**S.Shibata, N.Shibata, T.Shibata, H.Sasaki, E.Kubo : Expression of decorin, and its relation to posterior capsular opacification. 5th International Conference on the Lens (Kona Hawaii, 2017.12)**

#### 6. 研究組織

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。