

平成 21 年 4 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（c）
 研究期間：平成19年度～平成20年度
 課題番号：19580376
 研究課題名（和文） Analysis of volume regulating ion transporter on canine cataract development
 研究課題名（英文） イヌ白内障発症における細胞容積調節系イオン輸送体の関与の解明

研究代表者
 落合秀治 (OCHIAI HIDEHARU)
 麻布大学・附置生物科学総合研究所・講師
 研究者番号：20247307

研究成果の概要：

成熟白内障を呈したイヌのレンズ上皮細胞に SV40 T 抗原をトランスフェクションし、細胞株 (cdLEC) を樹立した。現在まで 150 代以上にわたり、安定した増殖能の獲得が示されている。抗 α B クリスタリン抗体を用いたウェスタンブロットおよび細胞染色より、この細胞株がレンズ上皮細胞の特性をよく維持していることが確認された。今後この細胞株を用いることで、これまで量的な面で困難であったレンズ上皮細胞の生理学的機能検討が可能となった。白内障を呈した個体のレンズ上皮からの株化は例がなく、本研究テーマで樹立した cdLEC 株が今後白内障発症メカニズム解明に重要なツールになる可能性が高い。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：イヌ、不死化、白内障、レンズ上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

白内障は眼科領域で最も重要な疾病の一つであり、なかでもイヌはヒトを含む哺乳類の中でその発症頻度が最も高い。白内障の発症原因についてはさまざまな要因が報告されている。最も臨床例が多いのが老齢性白内障であり、糖尿病などの疾病による代謝異常や

紫外線、放射線などの酸化傷害、ウイルスや細菌などの感染症が原因となることが知られている。イヌにおける白内障の発症頻度は犬種ごとで大きく異なっていることが知られており (Wallace et al. Vet. Ophthalm. 2005)、発症頻度の高い犬種では白

内障発症に特定の遺伝子関与が強く疑われる。水晶体の最も重要な役割は角膜、房水を通過した光を硝子体に導き網膜に正しく焦点をあわせることである。このために水晶体は透明で、常に一定の屈折率を保つ必要があり、水晶体の生理学的な機能はこの透過性と屈折性の維持に注がれているといえる。水晶体は主に2種類の細胞（上皮細胞と線維細胞）で構成されており、レンズ線維細胞は核を消失し、透明度が高く安定性の高いクリスタリンを多量に含むきわめて分化の進んだ組織である。水晶体を形成する細胞は動物の活動中、絶え間なく収縮拡張を繰り返すことでレンズとしての機能を果たしている。水晶体のレンズ上皮細胞膜内外では Na, K-ATPase により形成された Na と K の濃度勾配が形成されており、細胞収縮には K-Cl 共輸送体 (KCC) が、容積膨張には Na-K-Cl 共輸送体 (NKCC) が機能し浸透圧変化に対応していることが報告された (Lauf et al. *Exp. Eye Res.* 2006)。そして、その機能の破綻が異常な細胞の膨潤や収縮を引き起こし細胞死を招き、白内障を誘発している (Chee et al. *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* 2006)。研究代表者は現在まで主にイヌ赤血球を用い、赤血球の容積収縮調節には K と Cl を1当量ずつ排出する KCC が重要であり、KCC の4つのアイソフォームのうち、赤血球細胞で強い発現が確認されている KCC1 について全長をクローニングし、その輸送機能について HEK293 細胞を用い解析した (Ochiai et al. *J. Biochem.* 2004)。また、水の輸送にきわめて重要なイヌのアクアポリン1について、cDNA クローニングと機能発現を報告した (Higa, Ochiai et al. *B.B.A.* 2000)。さらに、遺伝的に KCC の活性が高い家系と低い家系のイヌが存在することを報告し、その活性制御機構の相違について考察した (Ochiai et al. *Exp.*

Animals 2006)。

2. 研究の目的

本研究での目標到達点は白内障治療で摘出された水晶体組織のレンズ上皮細胞で発現が欠損もしくは著しく減少しているイオン輸送タンパク質の検出と同定であり、正常水晶体と比較検討を行うことによって、白内障の原因（老齢性、遺伝性、感染性、酸化障害性）との関係を解明することを目指している。白内障を呈した水晶体細胞で RT-PCR や免疫染色により欠損もしくは発現の減少が認められた輸送タンパク質については分子生物学的手法により、DNA 変異を探索し、そのタンパク質の機能低下について詳細な機能解析を検討する。また、遺伝的に成熟白内障を呈したと見られる組織について SV40T 抗原を用いて、不死化 (immortalization) を試みて、安定した細胞株の樹立を試みる。白内障は発症してからは病巣部の外科的手術による除去しか治療の方法はない。また、その発症原因についてはいくつか報告があるが、ストレス→細胞死→水晶体の白濁化というプロセスは認められているものの、その詳細な発症メカニズムについては説明されていない。水晶体の研究の難しさはその組織の特異性にある。現在に至っても入手可能な cell line がヒトのレンズ上皮細胞 (HLE cells) の1種しかなく、研究推進の大きな妨げとなっている。本研究で遺伝性白内障のイヌ水晶体から cell line の樹立が成功し、その発症原因の糸口が解明されれば、イヌにとどまらずヒトの白内障発症予防に貴重な情報を提供しうる可能性が高い。

3. 研究の方法

Adenovirus12-SV40 を用い、株化細胞の樹立を試みた。また、得られた株化細胞について、テロメラーゼ活性を測定するために TRAP

assay を実施した。その characterization を進め、もっとも研究遂行に適した株を選定する。得られた細胞株の特性を調べるため、抗 α B クリスタリン抗体を用いたウェスタンブロットおよび細胞染色を行った。また、水晶体内には多量の還元型グルタチオン (GSH) が存在し、その量は前囊上皮細胞から核に移るにしたがって減少している。GSH 合成基質であるグルタミン酸輸送体 1 - 5 の有無を検討した。

4. 研究成果

成熟白内障を呈したイヌのレンズ上皮細胞の初代培養細胞に SV40 T 抗原をコードするプラスミドをトランスフェクションした結果、遺伝子導入群では活発な細胞増殖が確認された。非導入群では 3 回の継代後、細胞分裂を停止した。導入細胞群からシリンダー法により、最も増殖が盛んな細胞株 (cdLEC) を樹立した。この細胞を基本的に 1 : 20 の割合で 4 日おきに継代し、現在まで 150 代以上にわたり、安定した増殖能の獲得が示された。この細胞株について、TRAP assay を行った結果テロメラーゼ活性が上昇していたことが確認された。抗 α B クリスタリン抗体を用いたウェスタンブロットおよび細胞染色より、この細胞株がレンズ上皮細胞の特性をよく維持していることが確認された。レンズ上皮細胞では高 GSH 濃度を維持するためにその基質の一つであるグルタミン酸の輸送が報告されている。この細胞株では 5 つあるサブタイプすべてが発現していることが RT-PCR により確認された。さらに、イヌグルタミン輸送体 (EAAT) 5 について、この細胞株を用いて、cDNA 塩基配列を決定した。イヌ EAAT5 の cDNA は全長 2497 塩基からなり、うちアミノ酸にコードされる領域は 1680 塩基であった。これらはヒトやマウスと 90% 以上の相同性を持ち、アミノ酸のモチーフ配列箇所もよく保存されていた。抗ヒト EAAT5

抗体を用いたウェスタンブロット解析で、cdLEC および小脳で約 60 k Da のバンドが検出された。この細胞株はイヌレンズ上皮細胞の特徴をよく保存しており、今後この細胞株を用いることで、これまで量的な面で困難であったレンズ上皮細胞の生理学的機能検討が可能となった。レンズ上皮細胞株は現在に至ってもヒト胎児由来のものしかない。また、白内障を呈した個体からの株化は例がなく、本研究テーマで樹立した cdLEC 株が今後白内障発症メカニズム解明に重要なツールになる可能性がある。細胞の容積調節については相反する機能を有する KCC と NKCC は赤血球を用いた研究では、細胞内 GSH 濃度や酸化剤添加により活性が大きく左右されることが明らかになり、これまでにその活性制御モデルが提唱されているが、水晶体細胞でもこれがあてはまる可能性が高い。何らかの異常をきたした水晶体細胞では、酸化ストレスの増大 \rightarrow GSH 濃度の低下 \rightarrow KCC の活性化と NKCC の不活性化 \rightarrow 異常な細胞収縮 \rightarrow 細胞死 \rightarrow タンパク質凝固 という経路が水晶体内で生じている可能性が高い。今後は樹立された株化細胞についてジアミドや NO₂ などの酸化物質の応答をイオン輸送と細胞容積を中心に精査する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Hideharu Ochiai, Nobuyuki Kanemaki, Shino Kamoshida, Masaru Murakami, Nobutsune Ichihara, Masao Asari, Toshiho Nishita. Determination of full-length cDNA nucleotide sequences of equine carbonic anhydrase VI and its expression in various tissues. *IN PRESS J. Vet. Med. Sci.* (2009).

2. Junya Ito, Masumi Kawabe, Hideharu Ochiai, Chika Suzukamo, Masahiko Harada, Yusuke Mitsugi, Yasunari Seita, Naomi Kashiwazaki^{*}. Expression and immunodetection of aquaporin 1 (AQP1) in canine spermatozoa. *Cryobiology* 57(2008) p312-314.
3. Hideharu Ochiai, Hiroshi Fujise, Nobuya Hishiyama, Shin Hisamatsu, Nobuyuki Kanemaki. Aquaporin 1 Expression in Tissues of Canine Possessing Inherited High K Erythrocytes. *J. Vet. Sci.* 9 (2008) p203-205

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合秀治 (OCHIAI, HIDEHARU)
麻布大学・附置生物科学総合研究所・講師
研究者番号：20247307

(2) 研究分担者

印牧信行 (KANENAKI, NOBUYUKI)
麻布大学・獣医学部附属動物病院・准教授
研究者番号：40139530

(3) 連携研究者

なし