

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18860

研究課題名（和文）水晶体におけるデコリンの上皮間葉系移行抑制効果と水晶体再生への影響

研究課題名（英文）Inhibitory Effects of Decorin on Epithelial-mesenchymal transition in the Lens and Its Effects on Lens Regeneration

研究代表者

柴田 伸亮（稲垣伸亮）（SHIBATA (INAGAKI), 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） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：ラット後嚢混濁（PCO）モデルのPCO組織でデコリン(DCN)が高発現であった。ヒト前房水中にもDCNが分泌しており、ヒト水晶体上皮細胞(LEC)でもmRNA発現を確認した。LECのDCN発現量や前房水DCN濃度は、年齢や水晶体混濁程度との相関はなかった。培養ヒトLECにおいてFGF2添加によりDCN mRNA発現増加し、TGF-2添加で低下した。DCN添加でLECの細胞増殖能亢進や減少はなかった。DCNトランスジェニックマウス(DCN-Tg)水晶体は、野生型マウスと変化なかった。外傷実験では、DCN-Tgで線維芽細胞様変化面積がコントロールより減少し、上皮間葉系移行変化が抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、Rat PCO組織のマイクロアレイを用いた網羅的な解析にて、デコリン(Dcn)が上昇し、水晶体の創傷治癒を促進させて線維化を抑制することを国内外で初めて報告した。DCNはヒト房水に分泌されているタンパク質であり、眼内での毒性もない。分泌タンパク質DCNが、EMTを抑制していることが今回の研究で解明され、DCNはEMTに関連する眼疾患(後発白内障や増殖硝子体網膜症など)を抑制する新しい治療薬のターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The expression of Decorin (DCN) was significantly upregulated in rat PCO tissues compared to that observed in the control using a microarray-based approach. LECs treated with fibroblast growth factor (FGF) 2 displayed an enhanced level of DCN expression, while LECs treated with transforming growth factor (TGF) -2 showed a decrease in DCN expression. No phenotypic changes were observed in the lenses of 8- and 48-week-old transgenic mice for lens-specific hDCN (hDCN-Tg). Injury-induced EMT of the mouse lens, and the expression patterns of smooth muscle actin, were attenuated in hDCN-Tg mice lenses. Overexpression of DCN inhibited the TGF-2-induced upregulation of Tpm1 and EMT observed during wound healing of the lens, but it did not affect mouse lens morphology until 48 weeks of age.

研究分野：後発白内障

キーワード：デコリン 水晶体 後発白内障 水晶体再生 上皮間葉系移行

1. 研究開始当初の背景

(1) 水晶体は再生可能か:

白内障術後の PCO においても、水晶体再生は赤道部組織の再構成または Elshnigh Pearl として観察される。しかし、赤道部の再生水晶体組織は白濁し、透明性が失われている。PCO では、図 1 のような残存 LEC の変化をきたす (Cheng et al., J Cataract Ref Surg 2001) (図 1)。近年、乳幼児のヒト白内障手術時に水晶体嚢を小さく開窓し、水晶体線維を吸引するという手技で、透明水晶体が再生されたとの報告がある (Lin H et al. Nature, 2016)。乳幼児では、赤道部の胎生帯の細胞増殖能、分化能は高く、透明を維持したまま水晶体線維細胞が再生されると予測される。成人水晶体の場合、その再生はゆっくりで、それと同時に残存 LEC の EMT や線維化も誘発されるため白濁する。したがって、EMT が抑制されれば、成人でも透明な水晶体の再生を望むことができる。そこで、DCN がどのような机上によって EMT を抑制するのかが明らかになれば、新たな治療法開発への道図自我示され、その後の創薬にもつながると考えられる。

(2) 房水で DCN はどのような役割をしているのか:

我々は、ヒト白内障手術時に採取した房水中に DCN が分泌されていることを初めて発見した。白内障術後に、残存水晶体嚢内への房水の還流がヒト PCO や有水晶体眼内レンズ挿入後の白内障発症を抑制することが報告され、房水が PCO や白内障を抑制するために重要であることは明らかである。しかし、房水中のどの因子がそれらの抑制に重要なのかはわかっていない。DCN は、房水中の EMT を抑制する因子の一つであるかもしれない。

(3) DCN は、EMT を抑制するのか:

我々は、過去の研究において、ラットおよびマウス PCO モデルにおいて DCN の発現が上昇していることを明らかにした。また、DCN ノックアウトマウスは、水晶体創傷治癒モデルで EMT を抑制しなかった (我々の未発表データ)。つまり PCO 組織において、DCN 上昇が、EMT を誘導しているのではない。DCN は、EMT を誘導する TGF を抑制する作用があることがわかっており、DCN は EMT を間接的に抑制する可能性がある。しかし、DCN の水晶体の EMT における役割は、国内外でまだ報告はされていない。本研究では、DCN を過剰発現するモデル (培養系およびマウス) を用い、DCN の EMT 制御機構を解明する。

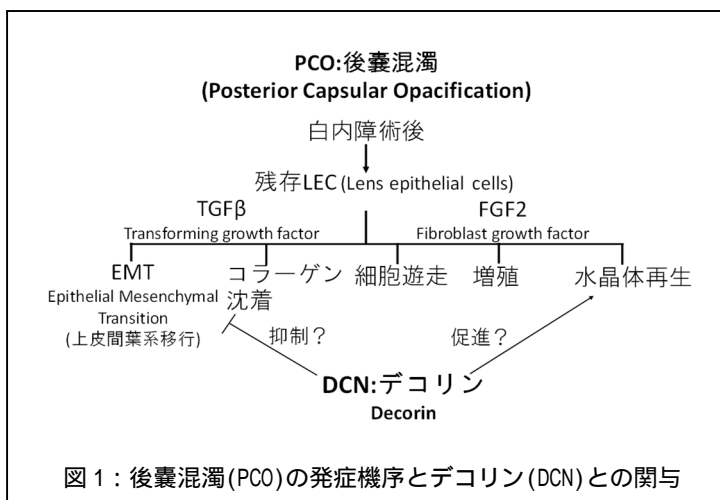


図 1: 後囊混濁(PCO)の発症機序とデコリン(DCN)との関与

2. 研究の目的

DCN は房水に分泌されているプロテオグリカンである。現在まで DCN の眼圧上昇抑制効果や角膜保護効果などの報告はあるが、水晶体における報告は PCO 組織での RNA 局在を見た 1 報しかない (Azuma N et al. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998)。我々の過去の投稿準備中のデータより、DCN は FGF により発現が誘導され、EMT を誘導する TGF により抑制されることがわかっている。DCN が LEC の線維化や EMT を抑制して水晶体の再生のみ誘導できれば、将来の水晶体再生の線維化の制御、PCO の抑制、水晶体上皮の線維化による白内障である前嚢下白内障 (ASC) の抑制といった新規治療に有効である可能性が期待できる。以下を大きな目的とする。

(1) DCN 過剰発現細胞における EMT 抑制効果の解明。

(2) DCN を発現するトランスジェニックマウスにおける水晶体変化および EMT 抑制効果を解析。

3. 研究の方法

(1) DCN を過剰発現させるプラスミドの作成: DCN は分泌タンパク質であるため、hDCN-IRES-EGFP プラスミドを作成する。マウスおよびヒト培養 LEC に、hDCN-IRES-EGFP プラスミドをトランスフェクションし、培養細胞中と培養液中の DCN 発現量をウェスタンブロット法にて確認する。トランスフェクション効率は DCN とは別に発現する細胞質の EGFP 発現で観察できる。

(2) DCN 過剰発現細胞の LEC の EMT 変化と細胞収縮能、遊走能、ストレスファイバー形成機序の解析: マウス LEC に TGF を投与すると EMT マーカーである 平滑筋アクチン ( SMA) 発現および Tropomyosin2 の発現が誘導され、細胞内にストレスファイバーが形成される。DCN が、細胞のストレスファイバー形成、遊走能、細胞収縮能を抑制する効果持つのか否かを証検討るために、以下の実験を施行する。

マウスおよびヒト培養 LEC を hDCN-IRES-EGFP プラスミドおよび EDGF ベクター (対照群) をト

ランスフェクションする。24 時間後に、TGF 1 および 2 (0-10ng/mL) を添加した培養液に交換し、48 時間後に以下の - の実験に使用する。

MTS アッセイにて細胞生存率を測定

細胞遊走能の測定 cell scratch キットを使用する

細胞内ストレスファイバー形成を F-actin 染色にて蛍光顕微鏡にて観察する

培養細胞の Total RNA およびタンパク質を抽出する。Real time 定量 PCR 法およびウェスタンブロッティング法にて、EMT マーカーである 平滑筋アクチン( SMA) 発現および Tropomyosin2 の発現を測定する

(3) DCN トランスジェニックマウス(Tg)の作成:発現プラスミド構築:水晶体の上皮細胞と線維細胞でのみ DCN 発現をさせるため、Pax6-consensus binding site を挿入したマウス Crystallin

A プロモーター(pPB-aCryAAP6-hDCNnlslacZpA)によって水晶体のみで作動させるベクターを作成する。プロモーターは、ネブラスカ医科大学眼科 Singh 教授より譲渡していただいた。作成された、DCN Tg マウスの水晶体における DCN 発現をプロテインプロット法とリアルタイム PCR にてタンパク質レベルと mRNA レベルで確認する。水晶体組織、白内障の有無を手持ち細隙灯顕微鏡にて確認し、マウス眼球組織切片と水晶体の透明度を暗視野実体顕微鏡にて観察、撮影する。

(4) DCN Tg マウスの水晶体器官培養系をもちいた TGF 1 に誘導される前嚢下混濁(ASC)の抑制効果:12 週齢の DCN Tg マウスとワイルドタイプ (WT)の対照マウス各 6 匹を使用する。水晶体摘出後、器官培養する。24 時間後に、TGF 1 (0-100ng/mL) 添加した培養液に交換し ASC を誘導する。0, 48, 72 時間後に水晶体を暗視野実体顕微鏡で撮影し、混濁程度を測定する。

(5) DCN Tg マウスの水晶体創傷モデルを用いた、DCN の創傷治癒効果の解析:12 週齢の DCN Tg マウスと WT マウス各 6 匹を使用する。マウスを 3 種混合全身麻酔下で、水晶体穿刺創傷モデルを作成。24 時間、48 時間後に眼球摘出し、片眼は組織切片を作成して創傷治癒部位の形態変化を観察する。同時に、片眼はタンパク質を抽出し、EMT マーカーである抗 SMA 抗体を用いたプロテインプロットを施行し、LEC の EMT に関与する因子の発現変化を測定する。

(6) DCN Tg マウスの PCO モデルを用いた PCO 抑制効果、水晶体再生への影響の解析:12 週齢の DCN Tg マウスと WT マウス各 6 匹を使用、瞳孔を散瞳後、3 種混合全身麻酔下に、手術顕微鏡下で角膜切開によりマウス水晶体囊外摘出術を施行する。水晶体囊外摘出術を施行し、マウス PCO モデルを作成する。術直後、1、2 週間後に眼球を摘出し、片眼は組織切片を作成し PCO 形成の有無、形態変化を観察する。同時に、片眼はタンパク質を抽出し、EMT マーカーである抗 SMA 抗体を用いたプロテインプロットを施行し、LEC の EMT に関与する因子の発現変化を測定する。

#### 4. 研究成果

ラット水晶体摘出術後の後嚢混濁(PCO)モデルにおいて DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、PCO 組織でプロテオグリカンの 1 つである DCN が高発現であった。

ヒト前房水中にも DCN が分泌されており、ヒト水晶体上皮細胞(LEC)において mRNA 発現を確認した。LEC の DCN 発現量や前房水の DCN 濃度は、年齢や水晶体混濁病型及び混濁程度との相関はなかった。

LEC の培養細胞実験において、培養ヒト LEC、マウス LEC 共に、FGF2 添加により濃度依存的に DCN mRNA 発現が増加し、TGF 2 添加により DCN mRNA 発現が低下を認めた。また、DCN 添加により LEC の細胞増殖能の亢進や減少は認めないことが分かった。

DCN トランスジェニックマウス(DCN-Tg)の水晶体および眼球組織は、野生型マウスの組織と比較して変化は認められなかった。この結果より、DCN が水晶体組織に悪影響を及ぼさないことが明らかになった。

外傷実験では、DCN-Tg で線維芽細胞様変化の面積がコントロールより減少しており、組織学的に上皮間葉系移行(EMT)変化が抑制されていることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinsuke Shibata, Naoko Shibata, Satoshi Ohtsuka, Yasuo Yoshitomi, Etsuko Kiyokawa, Hideto Yonekura, Dharendra P. Singh, Hiroshi Sasaki and Eri Kubo,	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of Decorin in Posterior Capsule Opacification and Eye Lens Development.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10040863	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田伸亮、柴田奈央子、柴田哲平、石田秀俊、吉富泰央、大塚哲、清川悦子、米倉秀人、佐々木洋、久保江理
2. 発表標題 Decorin過剰発現がマウス水晶体組織に与える影響
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田伸亮、柴田奈央子、柴田哲平、石田秀俊、吉富泰央、大塚 哲、清川悦子、米倉秀人、佐々木洋、久保江理
2. 発表標題 Decorin過剰発現がマウス水晶体とヒト水晶体上皮細胞に与える影響
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田伸亮、柴田哲平、石田秀俊、武田峻、佐々木洋、久保江理
2. 発表標題 ラット水晶体嚢外摘出術後の後嚢混濁(PCO)におけるペリオスチン(POSTN)の発現
3. 学会等名 第60回日本白内障学会総会・第47回水晶体研究会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------