

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09731

研究課題名（和文）MALDIを用いたフックス角膜内皮ジストロフィ患者におけるタンパク質発現解析

研究課題名（英文）Protein Expression Analysis in Patients with Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy Using MALDI

研究代表者

奥村 直毅（Okumura, Naoki）

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：10581499

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：フックス角膜内皮ジストロフィ（FECD）は、角膜内皮細胞が障害され視力が低下する疾患である。Guttaeと呼ばれる細胞外マトリックス（ECM）を主たる構成成分とする疣状の突起が角膜内皮と基底膜の間に形成され、光の散乱を生じることで視力が低下する。Guttaeのすべての構成成分や角膜における局在には不明点が多い。そこで本研究では、ショットガン解析によりFECD患者のguttaeを含む基底膜にのみ発現する32のタンパク質を同定した。さらにMALDIにより、これらの分子の局在の分布を明らかにできることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フックス角膜内皮ジストロフィ患者の角膜内皮の直下に生じるイボ状の細胞外マトリックス（guttae）は光の散乱による視力低下に加えて、タンパク質の過剰産生による小胞体ストレスによる角膜内皮細胞死の原因の可能性も指摘されている。このような病態の中心的役割を占めるguttaeの構成成分を網羅的に明らかにし、さらに最新のMALDIにより解析できるプロトコルを提案したことは新規性の高い研究である。今後、ショットガン解析によるタンパク質の網羅的解析とMALDIによる画像化を組み合わせたパイプラインを使用した研究が進むことで病態のさらなる解明や、バイオマーカーの発見につながると考える。

研究成果の概要（英文）：Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD) is a disorder characterized by the degeneration of corneal endothelial cells, leading to visual impairment. The formation of wart-like protrusions, known as guttae, composed primarily of extracellular matrix (ECM), occurs between the corneal endothelium and the basement membrane, causing light scattering and reduced vision. The complete composition and localization of guttae in the cornea are not fully understood. In this study, shotgun analysis identified 32 proteins exclusively expressed in the basement membrane containing guttae in FECD patients. Moreover, the use of MALDI demonstrated the potential to elucidate the distribution of these molecules' localization.

研究分野：眼科学

キーワード：フックス角膜内皮ジストロフィ 角膜 MALDI

## 1. 研究開始当初の背景

フックス角膜内皮ジストロフィ (Fuchs endothelial corneal dystrophy; FECD) は、角膜の透明性維持に不可欠である角膜内皮細胞が進行性に障害される疾患である。この疾患では、角膜内皮と基底膜の間に「Guttæ」と呼ばれる細胞外マトリックスを主成分とする疣状の突起が形成され、これが光の散乱を引き起こし、視機能を障害する。さらに進行すると、角膜内皮細胞の障害が進行することで角膜浮腫が生じ、視力障害が現れる。

これまで、guttæ の形成と角膜内皮障害という 2 つの病的イベントが FECD でなぜ同時に発生するのかは不明であった。申請者らの研究により、TGF- $\beta$  の活性化が角膜内皮細胞に細胞外マトリックスを過剰に産生させることで、guttæ の形成を引き起こし、小胞体ストレスを誘導して細胞死をもたらすことが明らかになった。

過剰なタンパク質の合成は FECD の中心的な病態である一方で、その「過剰なタンパク質」とは具体的に何を指すのか、角膜内皮組織のどの部位で、病期のどの時期に産生されるのか、さらには遺伝的背景とどのように関連するのかがほとんど明らかにされていない。これらの点を解明することは、FECD の病態理解にとって重要であり、バイオマーカーの発見や新たな治療法の開発にも寄与すると考えられる。

このように、FECD の病態解明にはまだ多くの未知の領域があり、さらなる研究が必要である。特に、TGF- $\beta$  の活性化メカニズムやそれによる角膜内皮細胞の変化、過剰なタンパク質の具体的な役割とその産生部位・時期の特定、そして遺伝的要因との関連を明らかにすることが、今後の研究の重要な課題となる。これらの課題を克服することで、FECD のより効果的な診断法や治療法の開発が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、FECD 患者組織および正常ドナー角膜を用いてショットガン解析によるタンパク質の網羅的発現解析を行うことである。さらに、マトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析法 (MALDI-IMS) を用いて質量分析を実施し、双方のデータを照らし合わせてアノテーションを行うことで、どのようなタンパク質が角膜内皮組織のどの部位に発現しているのかを網羅的に明らかにすることを目指している。

具体的には、FECD 患者の角膜組織および正常ドナーの角膜を収集し、それらをショットガンプロテオミクス解析によって詳細に調査する。この解析により、角膜内のタンパク質の発現パターンを網羅的に把握し、そのデータを基に MALDI-IMS を用いた質量分析を実施する。MALDI-IMS 解析により、タンパク質やペプチドの空間分布を視覚化し、それらの分子プロファイルを詳細に解析する。

さらに、異なる病期にある複数の FECD 患者の組織を用いて解析を行うことも計画している。これにより、病期に応じたタンパク質の発現変化を詳細に調べるとともに、それぞれの患者の TCF4 遺伝子における CTG トリプレットリピートの伸長の有無についても検討する。これにより、病期や遺伝的背景に応じたタンパク質発現の基盤的データを得ることができると考えられる。

以上のアプローチにより、FECD の病態解明に寄与する詳細なタンパク質発現データを提供し、新たな診断法や治療法の開発に向けた重要な知見を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、FECD において病態の中心的役割をする、過剰に産生される細胞外マトリックスなどのタンパク質の網羅的発現解析を行い、MALDI-IMS により空間的なマッピングまでを行い、本分野の研究者が今後使用できる基盤となるデータを作製する。さらにタンパク質の網羅的発現データをもとに FECD に関するシグナル経路の変化を見出し、FECD 疾患モデル細胞を用いてそのシグナルの詳細を検証する。

Thuret 教授 (University of Saint-Etienne、フランス) により角膜移植を施行された FECD 患者より同意を得た上で、角膜内皮組織の提供を受けて日本でショットガン解析を行った。コントロールとして正常ドナー角膜を用いた。さらに、タンパク質の網羅的発現解析をもとに KEGG パスウェイ解析、GO 解析を行う。さらに、これまでに申請者らが行った RNAseq や FECD 疾患モデル細胞におけるプロテオミクスの情報と合わせて解析を加えた。さらに、角膜内皮の基底膜であるデスメ膜をフラットマウントの標本として、組織切片を作成することなく、MALDI により生体での位置情報をそのままに局在を検討した。

## 4. 研究成果

ショットガンプロテオミクス解析によりデスメ膜におけるタンパク質を網羅的に解析した。正常者と比べて特に発現が高かったタンパク質を 5 つ選択し、検証のため免疫染色を行ったところ fibrinogen、hemoglobin、SRPX2、tenascin-C、hemoglobin の全てが Fuchs 角膜内皮ジストロフィ患者の guttæ において強く発現していた。これらのタンパク質は我々の知

る限り guttae の構成成分としては初めて発見されたものである。タンパク質の網羅的解析により guttae が想像以上に多くの物質により構成されていることが判明した。さらに、デスメ膜を半分に分割し、半分をショットガンプロテオミクス、残りの半分を MALDI-IMS による解析を行うことができるかを検討した。デスメ膜は、厚みが約 10  $\mu\text{m}$  のシート構造であるため未固定でフラットマウントによる MALDI-IMS 解析が可能であった。MALDI-IMS で取得されたタンパク質・ペプチド由来分子プロファイリングを行い、セグメントごとに異なるカラーを割り当てたところ、Fuchs 角膜内皮ジストロフィ患者で guttae が早期より発生する角膜中央部分と周辺でタンパク質などの分子の構成成分が変化する様子が明らかになった。現在、ステージの異なる複数の Fuchs 角膜内皮ジストロフィ患者の組織の解析を進めており、guttae を構成する多くの成分が角膜の中でどの様に分布しており、ステージの進行によりどう変化するのかということ明らかにしようとしている。

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 Nakagawa Tatsuya, Okumura Naoki, Ikegawa Masaya, Toyama Yumiko, Nirasawa Takashi, Mascarelli Frederic, Vaitinadapoule Hanielle, Aouimeur Ines, He Zhiguo, Gain Philippe, Thuret Gilles, Koizumi Noriko	4. 巻 13
2. 論文標題 Shotgun proteomics identification of proteins expressed in the Descemet's membrane of patients with Fuchs endothelial corneal dystrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-37104-1	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0件

〔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		
フランス	University of Saint-Etienne		