

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592558

研究課題名(和文) 白内障発症におけるトロポミオシン遺伝子の役割と白内障予防に関する研究

研究課題名(英文) A study on the role of Tropomyosin gene for cataractogenesis and the prevention of cataract

研究代表者

久保 江理 (KUBO, Eri)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10262619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：トロポミオシン(Tpm)遺伝子は、細胞骨格蛋白であり水晶体の分化との関与が示唆されている。

我々の研究により、ヒトの水晶体では、Tpmは、前嚢下白内障および、強い核白内障の発症に関与していることがわかった。またTpmは、水晶体の上皮間葉系移行と白内障術後の視機能の原因となる後嚢混濁の発症にも関与していた。上記結果より、Tpmは、水晶体の分化と上皮間葉系移行に関与する重要な遺伝子と推測された。

研究成果の概要(英文)：Tropomyosin is an extracellular matrix protein related with differentiation of lens. Our study revealed that Tpm is related with the onset of human anterior subcapsular cataract and severe nuclear cataract. Further, Tpm was also related with the progression of posterior capsular opacity after cataract, which induces the impaired visual function.

From these results, Tpm may be an important gene related with lens differentiation and epithelial mesenchymal transition.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：トロポミオシン 白内障 後嚢混濁 細胞分化 上皮間葉系移行

## 1. 研究開始当初の背景

水晶体は、一層からなる水晶体上皮細胞(LEC)の部位によって、細胞周期が異なるきわめて特徴的な器官である。現在、唯一の白内障治療は、白内障手術である。白内障術後には、LECの再生、線維化や増殖、上皮間葉系移行(EMT)が生じ、後囊混濁(PCO)を生じる。それら変化を誘導する遺伝子として、われわれは FGF2 および細胞骨格蛋白、トロポミオシン(Tpm)に注目して研究を進めてきた。白内障を含めた加齢現象は、遺伝子と環境因子により制御されている。microRNA(miRNA)制御システムは、蛋白質の翻訳を制御し、病気の進展にも関与する。われわれは、水晶体の成長段階では、miR29c が上昇することを発見した。この miR29c は、白内障眼で減少し、miR29c が制御(抑制)する遺伝子: Tpm1 $\alpha$ /2 $\beta$  の発現が上昇する。この Tpm は、細胞骨格蛋白であり水晶体の分化や酸化ストレスとの関与が示唆される注目すべき遺伝子である。

## 2. 研究の目的

本研究において、白内障における Tpm 発現上昇のメカニズムと miR29c の白内障眼における遺伝子制御機構を解明し、Tpm および miRNA を標的とした加齢眼疾患に対する予防薬開発の可能性を検討する。

白内障や PCO におけるトロポミオシンの発現上昇のメカニズムを解明し、トロポミオシンを標的とした LEC の EMT 制御と PCO 発症予防の可能性を検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1). マウス、ラット水晶体上皮細胞(LEC)における Tpm 発現制御

ラット LEC(RLE) の GFP-Tpm1 $\alpha$  と GFP-Tpm2 $\beta$  の過剰発現とマウス LEC(MLEC)を用いて、Tpm1 $\alpha$ /2 $\beta$  siRNA, および miR29c mimics (Tpm を抑制制御する miRNA)による Tpm 発現抑制を、リポフェクタミン 2000 をもちいた遺伝子導入により行った。EMT マーカーである  $\alpha$  平滑筋アクチン( $\alpha$ SMA)の発現をプロテインブロット法にて確認し、細胞形態の観察を行った。

後発白内障(PCO)の発症に関与する、FGF2 と TGF $\beta$ 2 によるトロポミオシン(Tpm1 $\alpha$ /2 $\beta$ )の発現変化を、LECを用いて検討した。通常ではTpm1 $\alpha$ /2 $\beta$ の発現が少ない培養MLECとTpm1 $\alpha$ /2 $\beta$ の発現が高いペルオキシレドキシニン6(Prdx6)ノックアウト(Prdx6 $^{-/-}$ )MLEC, ヒト不死化LECを使用

した。TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ 2 + FGF2、FGF2含有培地でMLECまたはPrdx6 $^{-/-}$  MLECを培養した。プロテインブロット法とリアルタイムPCR法でTpmと上皮間葉系移行(EMT)マーカーである $\alpha$ 平滑筋アクチン( $\alpha$ SMA)の発現量を測定した。また、形態変化を位相差顕微鏡で撮影した。

(2). ひとLECにおけるTpm発現の変化の解析患者の同意を得て、白内障手術時に破棄される前囊試料(LEC付き)を採取しtotal RNAを抽出した。ひとLECにおけるTpm2 $\beta$ 発現の変化を解析した。

### (3). ラット PCO モデルにおける Tpm 発現と PCO 抑制効果の検討

ラット後発白内障モデルの、発症時期 (Day0、1W、2W) 病態変化での FGF2 レセプター(FGFR2)と Tpm1 $\alpha$ /2 $\beta$ の発現変化を免疫組織化学染色にて観察した。ラット水晶体囊外摘出術時に、FGF レセプター抑制薬(SU5402)と TGF $\beta$  タイプ 1 受容体阻害剤(LY 2157299)を前房内投与し、PCO の形態変化を観察した。さらに、この PCO モデルに細胞内に抗酸化タンパク Prdx6 蛋白をデリバリー可能にする TAT-Prdx6 点眼を、1日1回施行し、PCO の抑制を観察した。

(4). Tpm トランスジェニックマウス(Tgm)と Tpm ノックアウトマウスの作成水晶体特異的にヒト Tpm1 $\alpha$  と 2 $\beta$  を発現させるために PAX6 プロモーターの下流にヒト Tpm 全長を配置するベクターを作成した。

## 4. 研究成果

### (1). マウス、ラット、ヒト LEC における Tpm 発現制御

・Tpm1 $\alpha$ とTpm2 $\beta$ の過剰発現により、細胞が伸長しEMT様の形態変化を呈し、 $\alpha$ SMA

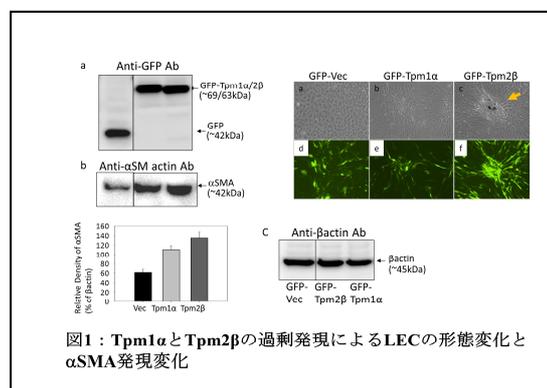


図1: Tpm1 $\alpha$ とTpm2 $\beta$ の過剰発現によるLECの形態変化と $\alpha$ SMA発現変化

の発現が上昇した(図1)。つまりTpmの発

現は、RLECのEMTを促進する。  
 ・ TGFβ2含有培地培養後、2, 4日目に Tpm1α/βとαSMAの発現が上昇した(図2A)。しかしTGFβ2 + FGF2含有培地および

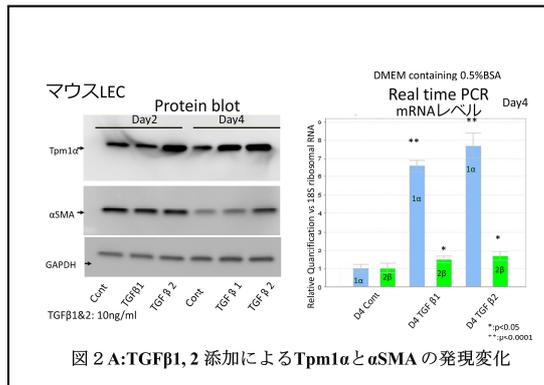


図2A:TGFβ1, 2添加によるTpm1αとαSMAの発現変化

FGF2含有培地培養では2,4日目は、Tpm1α/βとαSMAの発現が有意に抑制された。TGFβ2 10ng/ml + FGF2 10ng/mL添加培地で培養すると、Tpm1α/β発現が有意に抑制される(図2B)と同時に細胞増殖能が有意に低下し、アポトーシス細胞が増加した。

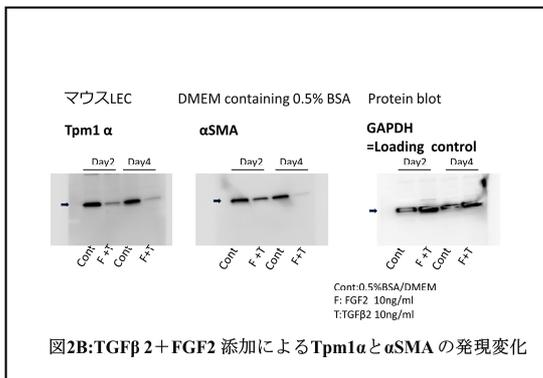


図2B:TGFβ 2+FGF2添加によるTpm1αとαSMAの発現変化

マウス水晶体上皮細胞(MLEC)は、通常の状態ではTpm1 /2 の発現は微量である。MLECのTpm発現をTpm2 siRNAにて抑制すると、10.0ng/mlTGF- 投与によるTpm発現誘導が抑制された。さらに、上皮間葉系移行(EMT)マーカーである平滑筋アクチン(SMA)の発現も抑制された。つまり、MLECのEMTは、Tpmの発現亢進によるものであることが示唆される。

MLECに、miR29c mimics (Tpmを抑制制御するmiRNA)のトランスフェクションにより、Tpm発現が抑制された。さらにFGF2の細胞への投与により、miR29cが誘導されていた。このmiR29cは、Tpm1 /2 発現を抑制することが、われわれの過去の報告で分かっており、FGF2によるTpm発現抑制はmiR29cにより制御されている可能性がある。

## (2). ヒトLECにおけるTpm発現の変化の

解析 白内障手術時に破棄される前囊試験料(LEC付き)を用い、ひとLECにおけるTpm発現の変化を解析した。水晶体前極部の異常な細胞分化を呈する前囊下白内障では、Tpm2βの発現が有意に上昇していた(図3)。強い核白内障(LOCS III分類NO5, NC5以上)でも、有意にTpm2βの発現が亢進していた。ひと白内障におけるLECの上皮間葉系移行、白内障変化にもTpmの発現上昇が関与している可能性が示唆された。

## (3). ラットPCOモデルにおけるTpm発現とPCO抑制効果の検討

ラットPCOモデルでは、FGF発現が高い赤道部再生水晶体上皮部位で、トロポミオシン発現は減少していた。FGFR2は、再生水晶体を呈する赤道部、硝子体側と増殖しているLECに発現が認められた(図4)。

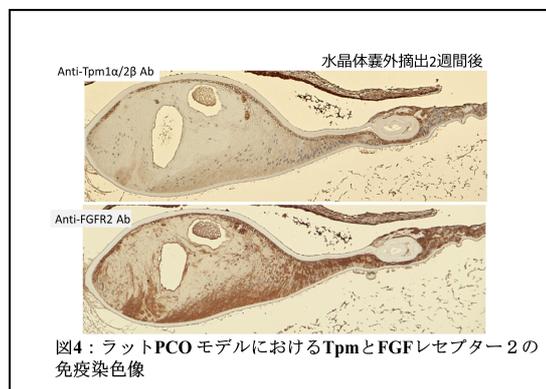


図4: ラットPCOモデルにおけるTpmとFGFレセプター2の免疫染色像

FGFレセプター抑制薬(SU5402)とTGFβタイプ1受容体阻害剤(LY 2157299)の前房内投与においては、PCOの形態変化の違いは観察されなかった。さらに、TAT-Prdx6点眼においても、PCOの抑制はみられなかった。今後投与方法の検討が必要と思われる。

## (4). Tpm トランスジェニックマウスとTpm ノックアウトマウスの作成

Tpm トランスジェニックは、当初水晶体特異的にヒト Tm を発現させるために αAクリスタリンプロモーターの下流にヒトTpm全長を配置するベクターを作成予定であったが、水晶体上皮細胞への発現は確認できず、水晶体線維細胞にのみ発現することが予備実験結果より、明らかになった。よって、PAX6 プロモーターの下流にヒトTpm全長を配置するベクターを作成した。

Tpm ノックアウトマウスについては、ダブルノックアウトは作成困難であったため、European Mouse Mutant Archive (EMMA)よりからTpm1αコンディショナ

ルノックアウトマウス作成のための受精卵を入手した。今後、ヘテロまたはホモマウス作成を行い表現型観察する。Tpm2 $\beta$ は、受精卵の入手が困難なため、CRISPR法を用い作成しており、CRISPR/CasTpm2発現ベクターを作成した。ヘテロマウス作成に約半年かかる見込みである。

#### 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2件)

1. Kubo E\*, Hasanova N, Sasaki H, Singh DP. Dynamic and differential regulation in the microRNA expression in the developing and mature cataractous rat lens. *J Cell Mol Med.* 2013;17:1146-1159. 査読有
2. Kubo E\*, Hasanova N, Fatma N, Sasaki H, Singh DP. Elevated tropomyosin expression is associated with epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Cell Mol Med.* 2013;17:212-21. 査読有

[学会発表](計9件)

1. 久保江理. 白内障術後の水晶体上皮細胞の変化. 第118回日本眼科学会総会(招待講演). 2014年4月2-6日, 東京(東京国際フォーラム、帝国ホテル).
2. Kubo E, Osada H, Shibata N, Kiyokawa E, Sasaki H, Singh DP. Tropomyosin: Its relationship with posterior capsule opacity. International Conference of Lens 2014, 2014年1月19-24日, Kona (アメリカ合衆国).
3. 久保江理. 後発白内障にみる水晶体の再生と上皮間葉系移(EMT). 第14回金沢医科大学研究セミナー. 2013年9月30日, 金沢(金沢医科大学病院本館4階C41講義室).
4. 長田ひろみ、八サノワ ナイリア、柴田奈保子、清川悦子、佐々木洋、久保江理. 白内障術後後囊混濁におけるFGF2およびTGF $\beta$ 2によるトロポミオシン発現制御機構. 第52回日本白内障学会総会. 2013年6月27-29日, 浦安(シェラトングランデトーキョーベイホテル、ヒルトン東京ベイ).
5. Kubo E, Hasanova N, Osada H, Kiyokawa E, Sasaki H<sup>1</sup>, Singh DP. FGF2 Antagonizes the TGF $\beta$ 2-Induced Aberrant Expression of Tropomyosin and  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin in Mouse and Human Lens

Epithelial Cells and Has a Role in Posterior Capsule Opacity. ARVO 2013 Annual Meeting. 2013年5月5-9日, Seattle (アメリカ合衆国).

6. 久保江理. 後発白内障モデルを用いた薬物治療の可能性. 第117回日本眼科学会総会(招待講演). 2013年4月4-7日, 東京(東京国際フォーラム).
7. 久保江理. 白内障予防と治療の可能性. 第31回金沢医科大学眼科研究会. 2011年11月6日. 金沢(金沢市アートホール).
8. 久保江理. 後発白内障にみる水晶体再生. 第115回日本眼科学会総会. 2011年5月12-15日, 東京(東京国際フォーラム).
9. Kubo E, Hasanova N, Singh DP, Takamura Y, Akagi Y. Aberrant Expression of Tropomyosin Causes Epithelial-Mesenchymal Transition of Lens Epithelial Cells. ARVO 2010 Annual Meeting. 2011年5月1-5日. Fort Lauderdale (アメリカ合衆国).

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

久保 江理 (KUBO, Eri)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10262619