

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460505

研究課題名(和文) レンズ上皮細胞の形態維持機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism to maintain the lens epithelial cell morphology.

研究代表者

清川 悦子 (KIYOKAWA, Etsuko)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80300929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：RLCはDOCK5欠損により眼球混濁を呈する自然発生マウスである。DOCK5ノックアウトマウスとRLCでは上皮・レンズ線維間に隙間が観察された。野生型およびRLCマウスからのレンズ上皮細胞のmRNAマイクロアレイデータから、既存のデータベースを元に変化の大きい信号伝達経路を解析した。炎症反応を含む抗微生物反応系と、脂質代謝の系がDOCK5の欠損によって誘導されることがわかった。

マウスの眼では、DOCKの蛋白質のみが発現しDOCK180が発現していなかったが、上皮間葉転換を起こしたレンズ上皮初代培養細胞やレンズ培養細胞株ではDOCK5とDOCK180の両方が発現していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Rupture of lens cataract (RLC) mouse showed spontaneous rupture of the lens capsule at the posterior pole, followed by dislocation of the inner nucleus. We showed previously that the Dock5 protein was hardly detectable in the RLC mice, while the Dock5 mRNA was expressed. Firstly, we observed H&E stained eyes from the wild-type BALB/c and RLC mice. We found the gap between the lens epithelial cells (LECs) and fiber cells at 3-week-old RLC and DOCK5 knock-out mice. Pathway analysis revealed that genes related to inflammatory response and lipid metabolism are altered in RLC mice. To reconstitute the LEC in vitro, we tried to isolate the LEC from the mice to culture them. However, addition of sera induced epithelial mesenchymal transition of LEC. We also found the human and mouse cell lines lost E-Cadherin expression or apico-basal polarity. Interestingly in those cell lines, DOCK180 is expressed.

研究分野：実験病理

キーワード：細胞間接着 低分子量G蛋白質

1. 研究開始当初の背景

白内障はレンズが混濁する疾患で、その原因は老齢性、糖尿病性などの疾病による代謝異常、紫外線・放射線などの酸化傷害、感染症などが挙げられる。レンズ組織は、単層のレンズ上皮細胞 (Lens Epithelial Cell, 以下 LEC) とそれらが分化したレンズ線維細胞の 2 種の細胞から構成されている。白内障において LEC の果たす役割については不明な点が多いが、ヒト老齢性白内障では、LEC の細胞密度の低下が報告されており (Oharazawa, *Ophthalmic Res*, 2001)、細胞容積の恒常性が機能に重要であると考えられている。

RLC (Rupture of Lens Cataract) マウスは、レンズ脱臼し白濁して見えるマウスである。後に、原因遺伝子が DOCK5 であると同定された (Omi, *Exp Cell Res*, 2008)。DOCK5 に見られた変異はエクソン内の 27 塩基の欠損で、mRNA の発現があるにもかかわらず、蛋白質の発現がないことも明らかにされた。同じファミリーに属する DOCK180 は元々眼では発現していないことから、DOCK5 の発現が無くなることでフェノタイプが出ると考えられた。

DOCK ファミリーは低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化因子であり、DOCK5 もその機能を持つことが申請者らによって証明されている。Rac1 は腺上皮ではラテラル側の活性が高いが (Yagi, *PLOS ONE*, 2012)、LEC での Rac1 の活性局在やその機能は明らかにされていない。また細胞外基質の受容体であるインテグリンが含まれる接着斑に DOCK ファミリーがアダプター分子 Crk との会合により局在することが知られているが、LEC においても観察されるか否かは調べられていない。

2. 研究の目的

LEC における DOCK5 とそれが関与する信号伝達を明らかにし、LEC の形態が維持される機構、それが破綻してレンズ脱臼が起こる機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) Rac1 の活性を検出する FRET バイオセンサーを用いて LEC 内での Rac1 活性局在を検出する。

(2) 野生型・RLC マウスの LEC の mRNA を単離し、マイクロアレイを行うことで、形態維持に必要な分子を同定する。

4. 研究成果

(1) アクチンプロモーター下で FRET バイオセンサーを発現するマウスから LEC を単離し共焦点顕微鏡にて観察したが、FRET バイオセンサーは LEC では発現していなかった。アクチンは LEC で発現しており、また他の組織では FRET バイオセンサーは発現していたので、なんらかのエピジェネティックな変化によってバイオセンサーが発現していない

ことが考えられた。

次に、LEC の初代培養を試みた。単離したマウス眼球より LEC と基底膜 (カプセル) を単離し、プラスチック皿にピンセットで四隅を押しつけて固定した後、血清入りの培地を添加する。血清添加によって上皮間葉転換を起こして上皮の形態を取ることがなく、また血清がない状態では死滅した。

マウスおよびヒトの LEC 由来の培養細胞株を入手して、極性マーカー (アピカルマーカーとして mCherry-GPI、ラテラルマーカーとして、GFP-Syntaxin4) を恒常的に発現する細胞株を樹立したが、Apico-Basal 極性を形成しないことがわかった。この時、E-Cadherin の発現は見られなかった。E-Cadherin-GFP の発現ベクターを構築し恒常的に発現株を樹立したが、形態に影響はなかった。またマウスの眼組織では発現が見られなかった DOCK180 の発現が見られた。以上のことから、現行のシステムでは上皮細胞の形態や性質を持ったまま、Rac1 の活性局在を検討することは困難であることがわかった。また、DOCK180 は上皮間葉転換により発現が上昇することが示唆された。近年肺癌においては DOCK4 の発現と転移能に相関があることや (Yu et al., *Gene. & Dev.*, 2015)、DOCK180 の発現と乳がん患者の予後に相関があること (Laurin et al., *PNAS.*, 2013) が報告されているので、本結果もそれと関連がある可能性がある。

以上の情報を得る前に、培養細胞株において、siRNA を用いて DOCK5 の発現を低下させたが、Rac1 の活性や細胞移動距離に変化は見られなかった。その原因として DOCK180 の発現が考えられる。そこで、遺伝子編集技術の CRISPR を用いて遺伝子変異を導入しノックアウトする系を導入した。標的 RNA 配列と CRISPR を有するプラスミドには GFP も共発現するようにデザインされているので、FACS にて GFP 陽性細胞を単離し 1 細胞としてまき直し、十分に増殖したところでゲノム DNA を抽出し PCR 増幅後、遺伝子を読み、両アリルに変異が導入されていることを確認した。細胞の形態や増殖速度は細胞間ではらついており、DOCK180 の発現と形態などの相関はえられなかった。現在のところ、これらの細胞に FRET バイオセンサーを発現させ、更に DOCK5 のノックダウンを行い、Rac1 活性に与える影響を調べているところである。

(2) レンズ脱臼が明らかになる前の、3 週齢の若い野生型および RLC マウスから単離した LEC から RNA を抽出し、マイクロアレイで mRNA の発現を比較したところ、2 倍以上の差を示す遺伝子群は 149 あり、そのうち RLC で発現が上昇していたのは 93 遺伝子で、低下していたのは 56 遺伝子であった。これら変動のある遺伝子群を既存のデータベース (Ingenuity Knowledge Base) を用いて、変

化の大きい信号伝達経路を解析した。炎症反応を含む抗微生物反応系と、脂質代謝の系が DOCK5 の欠損によって誘導されることがわかった。

これまで報告があった RLC と同様に DOCK5 ノックアウトでもレンズ脱臼が観察された。但し、RLC は BALB/c マウス由来で赤色の眼であり、DOCK5 ノックアウトは C57BL/6 由来で黒眼であるためか、黒眼はレンズ脱臼を肉眼で判定することが困難であったため、病理標本を作製し判定を行った。更に詳細な形態観察を行うと、リンパ球、好中球などの炎症性の細胞の浸潤は見られないことが確認された。上記の IPA の結果は上皮細胞における遺伝子発現の変化であると考えられた。

マイクロアレイで発現が変動した市販の抗体が入手可能であった CLEC11A、COL4A6、CCBE1 を眼の標本で免疫染色を行ったが、抗体が標的蛋白質を認識していない可能性が示唆された。これらのリストの上位の遺伝子群 (COL4A6、CCBE1、COL9A1) は、コラーゲンあるいはコラーゲン類似物質であったので、3週齢の野生型、RLC、DOCK5 ノックアウトマウスより、鍍銀染色を行いコラーゲン全般の発現量を見た。LEC と接する基底膜 (カプセル) には、野生型はほとんど染色されなかったが、RLC では弱く、DOCK5 ノックアウトマウスでは強い陽性像が見られた。また線維細胞にも点状に染まる像が観察され、DOCK5 の欠損によりコラーゲンが産生されていることが示唆された。レンズのカプセルは外界とのバリアであるが、レンズ内の老廃物を排出する機構もある。コラーゲンが産生・沈着することで、栄養の取り込みや老廃物の排泄に異常が生じ、細胞のストレスとなっていることが示唆された。

発現が RLC において大きく減少するもののなかに、FGF1 があった。市販の FGF1 抗体を用いた免疫染色およびウエスタンブロットで発現量を比較したが、野生型と DOCK5 ノックアウト、RLC の間で差を認めることはなかった。しかし、免疫染色では、野生型では核に存在するのに対し、ノックアウトマウスでは細胞質 (小胞の周囲) に局在していた。FGF1 の局在変化は細胞のストレスの結果であるとの報告があることから、上皮細胞はなんらかストレスを受けている状況にあると考えられる。

以上のことから、炎症性の蛋白質群が発現されることで LEC-線維細胞間の接着が弱まるか、あるいは、細胞接着が弱まることで LEC にストレスがかかり蛋白質群の発現が誘導されるというモデルが考えられた。DOCK5 の発現が LEC であることは以前報告されているので、LEC における発現が無くなることで、上皮細胞がストレスを受け、上皮細胞・線維細胞間の接着が障害されるというモデルが有力であると考えている。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

Xiaohe, Xu Hisayoshi Yoshizaki, Yasuhito Ishigaki, Eri Kubo, and Etsuko Kiyokawa Regulation of lens epithelial cell morphology by DOCK5. The Second International Meeting for Epithelial Tubulology, 2015 年 8 月 22 - 23 日 北海道大学 医学部学友会館「フラテ」(北海道札幌市)

Xiaohe, Xu Hisayoshi Yoshizaki, Yasuhito Ishigaki, Eri Kubo, and Etsuko Kiyokawa Regulation of lens epithelial cell morphology by DOCK5 第 67 回 細胞生物学会 2015 年 6 月 30 日から 7 月 2 日 タワーホール船堀 (東京都江戸川区) Xiaohe, Xu Hisayoshi Yoshizaki, Yasuhito Ishigaki, Eri Kubo, and Etsuko Kiyokawa Regulation of lens epithelial cell morphology by DOCK5 第 66 回 細胞生物学会 2014 年 6 月 11 日から 13 日 奈良県新公会堂 東大寺総合文化センター (奈良県奈良市)

清川悦子 DOCK5 によるレンズ上皮細胞形態維持機構 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 24 日 6 日 広島国際会議場 (広島県広島市)

吉崎尚良、久保江理、清川悦子 DOCK5 によるレンズ上皮細胞形態維持機構 第 40 回 水晶体研究会 2014 年 1 月 11 日 12 日 ホテルコスモスクエア国際交流センター (大阪府大阪市)

清川悦子、吉崎尚良、春田優衣、西濱晴美、石垣靖人、久保江理 DOCK5 によるレンズ上皮細胞形態維持機構 Regulation of lens epithelial cell morphology by DOCK5 第 65 回 細胞生物学会 2013 年 6 月 19 日から 21 日 ウィンクあいち (愛知県名古屋)

清川悦子、吉崎尚良、春田優衣、西濱晴美、石垣靖人、久保江理 DOCK5 によるレンズ上皮細胞形態維持機構 Regulation of lens epithelial cell morphology by DOCK5 日本生化学会北陸支部 第 31 回支部大会 2013 年 5 月 25 日 金沢大学 (石川県金沢市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~pathol1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清川 悦子 (KIYOKAWA, Etsuko)

金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：80300929

(2)研究分担者

吉崎 尚良 (YOSHIZAKI, Hisayoshi)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：00443490