

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462741

研究課題名(和文)マトリックス蛋白質LTBP2の機能と眼疾患への関与

研究課題名(英文)Biological function of matrix protein LTBP-2 and its involvement in eye diseases

研究代表者

赤間 智也 (AKAMA, Tomoya)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10548788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは遺伝子ノックアウトマウスの解析により、これまで機能が不明であった細胞外マトリックスタンパク質Latent TGR binding protein-2 (LTBP-2)が眼球内の水晶体(レンズ)をつなぎ止める線維状構造体(毛様小体)の形成に必須であり、その欠損は水晶体脱臼を引き起こすことを明らかにした。またDBA2系統においてLTBP-2欠損マウスは野生型に比べて眼圧が上昇することを確認した。これらの結果はヒトの遺伝性眼疾患に見られるLTBP-2遺伝子変異の報告と一致しており、遺伝子ノックアウトマウスがヒトの眼疾患モデル動物となり得ることを示していた。

研究成果の概要(英文)：Using gene knockout mice, we studied biological function of latent TGR-beta binding protein-2 (LTBP-2) and found the mutant mice develop lens dislocation due to malformation of ciliary zonules, which anchors lens to ciliary bodies in the eye. Since mutations of LTBP2, a gene encoding LTBP-2, have been found on patients of inherited eye diseases, such as primary congenital glaucoma and ectopia lentis, we analyzed any phenotypes related to glaucoma in the mutant mice. We observed LTBP-2-deficient DBA2 mice show higher intraocular pressure compared to wild type mice, but this phenotype was not observed in B6 strain. These results indicated that LTBP-2 deficient mice will be one of the model animals for analysis of human ocular diseases.

研究分野：生化学

キーワード：細胞外マトリックス構築 ミクロフィブリル 遺伝子改変動物 遺伝病

1. 研究開始当初の背景

LTBP(Latent TGF binding protein)蛋白質はその名の通り TGF と結合して不活性型として細胞外マトリックス中に保持し、インテグリンなどによる刺激に応じて活性型 TGF を放出すると考えられている蛋白質群である。アミノ酸配列の相同性からこれまでに LTBP1-4 の 4 種類が報告されているが、これらの中で LTBP2 だけは TGF と結合しないことが示されており、その生物学的機能が不明であった。しかしながらこれまでにいくつかの論文でヒトの遺伝性眼疾患である先天性緑内障や遺伝性球状水晶体の患者での LTBP2 の遺伝子異常が報告され LTBP-2 の眼組織構築への機能が示唆されたが、LTBP-2 の機能を実験的に確認するシステムが存在せず、直接的な証明はされていなかった。そこで申請者らは Ltpb2 遺伝子欠損マウスを作成し、その表現型を解析した。

2. 研究の目的

Ltpb2 遺伝子欠損マウスは緑内障発症につながるヒトの遺伝性眼疾患のモデル動物と考えられたことから、このマウスの表現型を解析することで細胞外マトリックス蛋白質 LTBP2 の生体内における機能解明を目指した。さらには緑内障発症との関連を調べることで緑内障の発症原因の分子メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

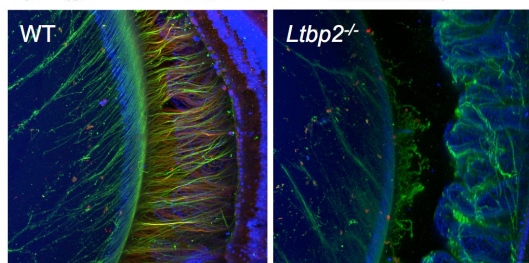
野生型および Ltpb2 変異マウスの毛様小帯の構築を成長の段階を追って解析し、毛様小帯がどのようにして構築され、そこに LTBP-2 がどのように機能しているのか詳細な解析を行なった。解析方法は摘出したマウス眼球組織を蛍光抗体法で染色して共焦点レーザー顕微鏡にて解析し、毛様小帯を構築するタンパク質である fibrillin-1 と LTBP-2 の局在を調べた。また電子顕微鏡観察により毛様小帯の実体であるマイクロフィブリル線維束の構築を経時的に解析した。ヒトの LTBP2 の変異は先天性緑内障を発症すると報告されていることから、Ltpb2 変異マウスにおける緑内障の表現型を詳細な眼圧測定や電子顕微鏡等を用いた組織の観察にて調べた。ヒトの LTBP2 変異による眼疾患は球状水晶体や水晶体脱臼が直接の表現型であり、緑内障はそれに伴う二次的な表現型であるとの報告もあることから、Ltpb2 変異マウスの表現型解析は成体のみならず生後 1 年以上を過ぎた高齢マウスについても行った。また近交系マウスの一種である DBA/2J は緑内障を発症しやすいと報告されているので、DBA/2J バックグラウンドを持つ Ltpb2 変異マウスを作成して、このマウスの表現型も解析した。

4. 研究成果

(1) Ltpb2 ノックアウトマウスの水晶体脱臼発症の解析

LTBP-2 をコードする遺伝子のノックアウトマウス (Ltpb2 KO マウス) は胎生致死として 2000 年に論文報告がされており、LTBP-2 は発生段階で重要な機能を有するものと考えられていたが、申請者らが独自に作成した Ltpb2 KO マウスは成体において目立った表現型は見られず、交配も可能であった。2009 年以降から先天性緑内障や遺伝性の水晶体脱臼の患者で LTBP-2 遺伝子に変異が検出され、LTBP-2 と眼疾患との関係が報告されたことから申請者らは Ltpb2 KO マウスにおける眼疾患の表現型を詳細に解析した。その結果、Ltpb2 KO マウスでは成体において眼球の水晶体を毛様体につなぎ止める線維状構造体である毛様小帯が見られず、水晶体脱臼を発症していることが明らかとなった。眼発生の初期の段階においては水晶体と毛様体は接触しているが、発生が進むにつれて水晶体と毛様体とは徐々に離れていく。毛様小帯はこの段階で水晶体上皮細胞と毛様体上皮細胞とをつなぐ細胞外の線維状の構造体として毛様体上皮細胞から分泌される細胞外マトリックスタンパク質により構築されると考えられている。毛様小帯の実体はマイクロフィブリルという線維状細胞外マトリックスで、その主成分は fibrillin-1 と fibrillin-2 からなるものと考えられてきたが、申請者らの解析で LTBP-2 も正常の毛様小帯の構成成分として局在することが示された。より正常に近い状態での毛様小帯の観察を行なうべく、いくつかの発生段階におけるマウス眼球を薄切せずにそのまま抗 fibrillin-1 抗体などで蛍光染色し共焦点レーザー顕微鏡にて詳細な観察を行なった (Fig. 1)。生後 3 週目のマウス眼球では毛様小帯は Ltpb2 KO マウスでも正常マウスと同様に形成されていたが、生後 4 週目の Ltpb2 KO マウスでは毛様小帯の長い線維状のシグナルは弱くなり、生後 5 週目以降の Ltpb2 KO マウス眼球では水晶体から毛様体につながる毛様小帯の線維はほぼ消失していた。正常マウスの眼球では 3 週齢の段階でも LTBP-2 は毛様小帯に局在しているにもかかわらず、同週齢の Ltpb2 KO マウスの毛様小帯は正常マウスと同じように毛

Fig. 1 confocal microscopy of immunostained mouse eyes (green:fibrillin-1, red:LTBP-2, blue:nuclei)

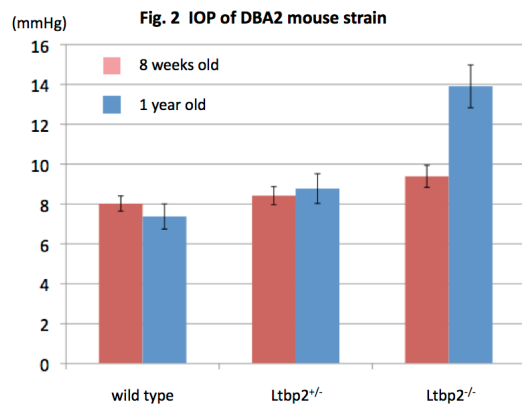


様小帯線維が形成されていることから、LTBP-2 は毛様小体の線維形成に必須というわけではないものと考えられた。この時期にマウスの眼球は徐々に大きくなり、水晶体と毛様体の距離も長くなっていることから毛様小体に加わる物理的な力も大きくなるものと考えられるので、毛様小体における LTBP-2 の機能はその線維の強度を増すためにあり、LTBP-2 の局在しない毛様小体はより脆弱で眼球の成長に従って水晶体に加わる物理的な力に耐えられず断裂し消失することが考えられた。しかしながらこの仮説は直接的に証明されていないので毛様小体の力学的強度を直接測定するなど、更なる解析が必要である。

(2) Ltpb2 ノックアウトマウスの緑内障様表現型の解析

ヒトでは先天性緑内障の原因として LTBP2 の変異が報告されているが、予備的な解析では Ltpb2 K0 マウスの眼球に高眼圧や網膜神経節細胞の脱落といった緑内障様の表現型は発見されなかった。しかしながらヒトの遺伝子解析でも緑内障患者に LTBP2 遺伝子上の変異の割合は高くなく、逆に LTBP2 遺伝子に変異がある場合でも緑内障を発症していない場合も多く発見されたことから、LTBP2 遺伝子変異が直接的に緑内障発症を引き起こすのではなく、水晶体脱臼など何らかの疾病に関連して二次的に発症するのではないかと現在では考えられている。マウスにおいても同様のことが生じており Ltpb2 変異から緑内障発症に至るまでに何らかの要因が重なる必要があるのではないかと考えた。一つの要因としては加齢を、もう一つの要因としては遺伝的背景を考え、これを検証した。申請者らが作成した Ltpb2 K0 マウスは C57BL/6J(B6) 系統のマウスで作成しているが、別のマウスの系統である DBA-2/J(DBA2) マウスは緑内障を好発するとして実験に用いられている。そこで申請者らは B6 Ltpb2 K0 マウスを DBA2 マウスと戻し交配を行うことで DBA2 Ltpb2 K0 マウスを作成し、このマウスの眼球にガラスキャピラリーを穿刺することで眼内圧を測定した。また生後1年を経過した加齢マウスについても同様の方法で眼圧測定を行なった。B6 マウスについては8週齢でも1年経過したマウスでも正常マウスと Ltpb2 K0 マウスの眼圧に有意な差は得られなかった。一方で DBA2 マウスでは有意な差は得られなかったものの8週齢のマウスで Ltpb2 K0 マウスの眼圧は正常マウスの眼圧よりも多少高く、更には1年経過したマウスでは Ltpb2 K0 マウスの眼圧は正常マウスの値よりも有意に高かった(Fig. 2)。この加齢 DBA2 マウスについて網膜神経節細胞数を比較したところ Ltpb2 K0 マウスでは網膜神経節細胞数が大きく減少していた。網膜神経節細胞の減少は緑内障での直接的な原因であり、この結果は

Ltpb2 K0 マウスが緑内障を発症していること



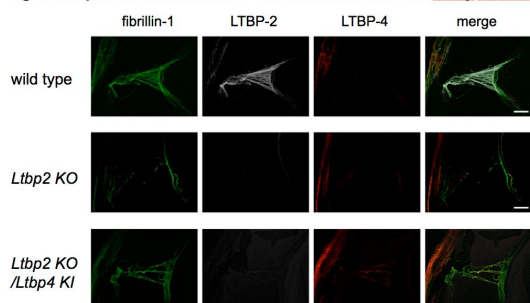
を示しているものの、Ltpb2 K0 マウスでは毛様小体の断裂により水晶体が脱落しており、また加齢マウスでは硝子体が萎縮しているため脱落した水晶体が直接網膜に接触して神経節細胞を破壊している可能性があるため、現在のところ Ltpb2 K0 マウスで網膜神経節細胞が減少している明らかな証拠は得られていない。何れにせよ DBA2 系統の Ltpb2 K0 マウスは高眼圧を呈するマウスとして緑内障研究に利用できる可能性がある。

(3) LTBP-2 と LTBP-4 の重複した機能の解析

申請者らは以前の研究で LTBP-2 が全身の多くの臓器に発現していることを確認しており、そのため Ltpb2 K0 マウスの表現型が毛様小帯に限局していることを説明できなかった。一つの可能性としては LTBP タンパク質ファミリーの他のタンパク質が LTBP-2 と同じ生物学的機能を有しており、毛様小帯以外の臓器では LTBP ファミリータンパク質の存在で LTBP-2 欠損を補償していることが考えられた。マウスの LTBP ファミリータンパク質の遺伝子発現を調べたところ LTBP-4 のみが毛様体組織で発現していなかったことから LTBP-4 が LTBP-2 と同様の機能を有しており、毛様体以外の臓器では LTBP-4 の存在が LTBP-2 欠損を補償している可能性が示唆された。このことから、LTBP-2 K0 マウスの毛様体に LTBP-4 を発現させることでその表現型である水晶体脱臼が緩和されることが期待された。そこで申請者らはマウスの ROSA26 座位に CAG-LTBP4 ミニジーンを挿入したノックインマウス (Ltpb4 KI マウス) を作成してこのマウスと Ltpb2 K0 マウスを掛け合わせることで、本来は LTBP-2 が発現して LTBP-4 が発現していない毛様体細胞に LTBP-4 を発現させて LTBP-2 をノックアウトしたマウスを作成し、毛様小体の形成の有無を調べた(Fig. 3)。Ltpb2 K0/Ltpb4 KI マウスは3週齢において LTBP-4 が局在した毛様小体の形成が確認され、この毛様小体線維は6週齢でも断裂せずに正常マウスと同様に維持されていた。この結果は LTBP-4 が LTBP-2 の機能を代替している証明であり、LTBP-4 が LTBP-2 と同じ機能を有していることが明ら

かとなった。LTBP-4 欠損マウスは LTBP-2 が発現しているにもかかわらず肺気腫や大動脈

Fig. 3 Compensative effect of LTBP-4 for the lack of LTBP-2 in ciliary zonules



の蛇行といった表現型を呈するので、LTBP-4 の欠損は LTBP-2 の存在では補償できないものと考えられる。これらの結果は現在論文投稿準備中である。

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 1 件)

- (1) Inoue T, Ohbayashi T, Fujikawa Y, Yoshida H, Akama TO, Noda K, Horiguchi M, Kameyama K, Hata Y, Takahashi K, Kusumoto K, Nakamura T. Latent TGF-binding protein-2 is essential for the development of ciliary zonule microfibrils. Hum. Mol. Genet. (査読あり) 2014, 23, pp5672-82, doi: 10.1093/hmg/ddu283

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 吉田秀之、藤川雄介、井上唯史、赤間智也、中邨智之、LTBP-2 と LTBP-4 は弾性線維形成において重複する機能を有する、第 47 回日本結合組織学会学術集会 (ポスター発表) 2015 年 5 月 16 日、東京、コクヨホール
- (2) 藤川雄介、赤間智也、井上唯史、中邨智之、Mutant LTBP-2 proteins lack secretion ability and fibrillin-1 binding activity, 第 36 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表) 2013 年 12 月 4 日、神戸、神戸国際会議場
- (3) Akama, Tomoya O.; Fujikawa, Yusuke; Inoue, Tadashi; Nakamura, Tomoyuki, Mutant LTBP-2 proteins lack secretion ability and fibrillin-1 binding activity, Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) annual meeting (ポスター発表) 2013 年 5 月 6 日、米国ワシントン州シアトル、Washington State Convention Center

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕
ホームページ等

特になし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
赤間 智也 (AKAMA, Tomoya)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10548788

- (2) 研究分担者
該当なし

- (3) 連携研究者
該当なし