

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11470

研究課題名(和文) 水晶体混濁を透明化させる制御機構と治療戦略の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism and treatment strategy to reverse lens opacity

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、遺伝性のShumiya Cataract Rat (SCR)にみられる白内障では、水晶体タンパクの不溶化が生じており、その水晶体上皮細胞(LEC)のDNAマイクロアレイ解析結果より、線維分化、抗酸化、浸透圧維持など水晶体の透明性維持に必要な遺伝子発現が減少していることが明らかになった。抗酸化タンパクPeroxioredoxin (Prdx6)のSUMO化による不活化を抑制したりコンビナント蛋白の投与は、培養LECにおける酸化ストレス防御能を高め、SCRに結膜下注射することで、白内障発症を遅らせた。よって脱SUMO化Prdx6には、白内障抑制効果があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白内障は世界の中途失明原因第一位の疾患である。現在は、手術が唯一の治療法であり、有効な白内障薬物治療はない。また、有効な加齢白内障動物モデルがないため、薬物治療の開発研究が難航することが多い。本研究結果より、加齢白内障動物モデルとしてのShumiya Cataract Ratの有用性が明らかになった。また、加齢白内障の主原因の一つである酸化ストレスを抑制する抗酸化タンパクPrdx6が、SCR白内障を遅延させることが明らかになった。よって、Prdx6が、ヒト加齢白内障の進行を遅らせ、手術加療が必要となる時期を遅らせることができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that lens proteins were insolubilized in cataracts of hereditary Shumiya Cataract Rats (SCRs). DNA microarray analysis of lens epithelial cells (LECs) revealed that the expression of genes related with lens fiber differentiation, antioxidant and regulation of osmolarity, which are required for maintaining lens transparency were decreased. Administration of antioxidant protein, sumoylation (SUMO)-deficient Peroxioredoxin (Prdx6) recombinant protein, enhanced the anti-oxidative ability in cultured human LEC, and delayed the onset of cataract in SCR after subconjunctival injection. Therefore, administration of SUMO-deficient Prdx6 may prevent cataract progression.

研究分野：眼科

キーワード：白内障 Peroxioredoxin 6 酸化ストレス Shumiya Cataract Rat

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

白内障における水晶体混濁を再透明化させる薬剤は、現在はない。加齢白内障は、喫煙・紫外線・酸化的ストレス等が危険因子とされており、これらは水晶体の主なタンパク質であるクリスタリン  $\alpha$  の凝集を誘発する。抗白内障研究において日本で入手可能な Shumiya Cataract Rat (SCR)は、ラノステロール合成酵素(Lss)の突然変異をもつ遺伝性白内障モデルラットである。2015年にステロールの1種であるラノステロールがクリスタリンの凝集を抑制し、イヌ白内障を抑制したという報告が Zhao et al.により Nature に発表されたため、われわれが保有する SCR は、白内障動物モデルとして注目されている。われわれは、SCR の水晶体では、活性酸素種(ROS)が上昇していることや、抗酸化蛋白である Peroxiredoxin 6 (Prdx6)の遺伝子発現量が減少していることを報告した(Kubo E et al. Am J Physiol Cell Physiol、2008)。PRDX6 は、水晶体上皮細胞 (LEC) の細胞内で ROS の消去、アポトーシスの抑制作用がある (Fatma N et al. Cell Death Diff、2005)。われわれは、この Prdx6 を細胞膜に通過させるため、HIV 遺伝子産物の TAT 蛋白の一部を負荷した TAT-Prdx6 融合蛋白の投与により SCR の白内障発症を遅延させることを報告してきた(Kubo E et al. Am J Physiol Cell Physiol、2008)。近年この PRDX6 は、加齢により、Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)化という翻訳後修飾を受け、その抗酸化活性が低下することが明らかになっている(Chunchha B、Kubo E et al. FEBS J. 2014)。われわれは、SUMO 修飾を受ける PRDX6 の領域を変異させた融合蛋白(SUMO 化抑制 Prdx6)を作成し、抗酸化能の増強に成功している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、SCR の白内障発症メカニズムと Prdx6 およびラノステロールの白内障治療薬の可能性と Prdx6 の白内障抑制効果と白内障術後の後発白内障抑制効果を解析し、水晶体透明化のメカニズムを解明することである。

## 3. 研究の方法

**(1) SCR水晶体のタンパクの不溶化の解析:** 10週齢の軽度の水晶体混濁を生じる SCR の Cat+ と、Cat-において、水晶体を摘出し蛋白を可溶性画分と不溶性画分抽出に分離した。その後、ウェスタンブロットを施行し1次抗体に  $\alpha$ B クリスタリン抗体を用いて検出した。

**(2) SCR の LEC における遺伝子発現変化の網羅的解析:** SCR の LEC における遺伝子発現変化の網羅的解析をマイクロアレイ法にておこなった。5週齢の SCR の Cat+ の LEC と Cat- LEC のサンプルから Total RNA を抽出後、GeneChip® Rat gene 2.0 ST array (Affymetrix、ThermoFisher Scientific)を用いて、網羅的な遺伝子発現変化を解析した。また、5、8、10週齢の SCR LEC の Total RNA を抽出し、マイクロアレイで同定された、いくつかの遺伝子について、リアルタイム RT-qPCR 法により発現変化を確認した。

**(3) SUMO 化抑制 PRDX6 の酸化ストレスへの影響:** 初代培養マウス LEC (MLEC)を用い、SUMO 化抑制 PRDX6 とラノステロールの影響を検討する。培養 LEC に対し H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による酸化ストレスを与え、各種濃度の TAT-PRDX6、SUMO 化抑制 TAT-PRDX6、ラノステロールと陰性コントロールの Mutant-PRDX6 を添加し、細胞生存率を MTS アッセイで測定した。

**(4) SUMO 化抑制 PRDX6 とラノステロール投与による後発白内障で観察される LEC の上皮間葉系移行(EMT)への影響:** ラット水晶体上皮伸展標本培養モデルと Gel contraction assay をもちいて、TGF $\beta$ (1-10 ng/mL)により誘導される EMT の抑制効果を形態観察し、EMT マー

カーである  $\alpha$  平滑筋アクチン ( $\alpha$ SMA)と F-actin の免疫染色を施行した。

(5) SUMO 化抑制 PRDX6 投与における SCR 白内障抑制効果の観察：白内障発症前の 6 週齢(W)SCR を 3 群に分け、SUMO 化抑制 Prdx6 および TAT-Prdx6 投与群、コントロール(投与無し)群の 3 群にわけ、3 週間毎日結膜下注射を行った。3 週目に水晶体を摘出し、水晶体を暗視野実体顕微鏡下で撮影し、混濁度を測定した。

#### 4 . 研究成果

##### (1) SCR 水晶体のタンパクの不溶化の解析

SCR Cat+水晶体においては、Cat-の水晶体に比べて  $\alpha$ B クリスタリンの不溶化が有意に高く認められ、蛋白の不溶化が SCR では明らかであった。

##### (2) SCR の LEC における遺伝子発現変化の網羅的解析

5 週齢の SCR Cat+ では、水晶体後嚢下に軽度混濁が認められた。マイクロアレイ上の 28、407 の遺伝子の内、110 個の遺伝子が 0.5 未満に減少していた。表 1 に 5 週齢 SCR(Cat+)の LEC で 0.5 未満に発現低下した遺伝子の上位 20 を示す。そのうち MIP (Aquaporin0)、Dnase2b、Hspb1、and  $\gamma$ Cry B、C、and F など水晶体の恒常性の維持に必要な遺伝子の mRNA 発現が有意に減少していた(表 1)。8 週齢または 10 週齢の SCR Cat+ でも、Dnase2b、Hspb1、MIP mRNA 発現が有意に減少していた。

表1：5週齢SCR(Cat+) LECで0.5未満に発現低下した遺伝子  
Fold Change (FC)<0.5 (Top20)

Gene Symbol	Gene Description	FC
Lgsn	lens protein with glutamine synthetase domain	0.064
Clic5	chlorideintracellularchannel5	0.094
Snhg11	smallnucleolarRNAhostgene11	0.124
Crygf	crystallin,gammaF	0.138
Srd5a2	steroid-5-alpha-reductase,alphapolypeptide2	0.165
Cryge Crygd	crystallin,gamma E  crystallin,gamma D	0.185
Mip	major intrinsic protein of lens	0.202
Hspb1	heat shock protein B1	0.204
Crygc	crystallin,gamma C	0.206
Dnase2b	deoxyribonuclease II beta	0.207
Lctf	lactase-like	0.227
Bfsp1	beaded filament structural protein1, filensin	0.231
Clic3	chlorideintracellularchannel3	0.260
Fam89a	family with sequence similarity 89,memberA	0.272
Cbln2	cerebellin2precursor	0.273
Mall	mal,T-celldifferentiationprotein-like	0.281
Wnt7a	wingless-typeMMTVintegrationsitefamily,member7A	0.284
Slc24a2	solute Carrier Family 24 Member 2	0.284
Hmox1	hemeoxygenase1	0.289
Lpin1	lipin1	0.302

##### (3) SUMO 化抑制 PRDX6 の酸化ストレスへの影響

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による MLEC の細胞生存率の低下は、TAT-PRDX6、SUMO 化抑制 PRDX6 のみ有意に抑制されていたが、ラノステロールと Mutant-PRDX6 には細胞死抑制効果は認めなかった。SUMO 化抑制 PRDX6 は、TAT-PRDX6 より細胞死抑制効果が有意に高かった。

##### (4) SUMO 化抑制 PRDX6 とラノステロール投与による後発白内障で観察される LEC の上皮間葉系移行(EMT)への影響

TGF $\beta$ 2 1-10 ng/mL 添加すると、ラット水晶体上皮における  $\alpha$ SMA の発現が上昇し陽性染色像が増加し、F-actin 染色で水晶体上皮内にストレスファイバー形成が見られた。1-10 $\mu$ g/mL の SUMO 化抑制 PRDX6 添加により、 $\alpha$ SMA の発現とストレスファイバー形成も抑制されていた。しかし、ラノステロール添加およびコントロールの DMSO 添加により、染色やストレスファイバー形成の抑制は観察されなかった。

##### (5) SUMO 化抑制 PRDX6 投与における SCR 白内障抑制効果の観察

SUMO 化抑制 PRDX6 投与群で有意に水晶体混濁が抑制されていた(図 1)。これらの結果より、SUMO-PRDX6 は、EMT を抑制し SCR の白内障を遅延させることが明らかになった。

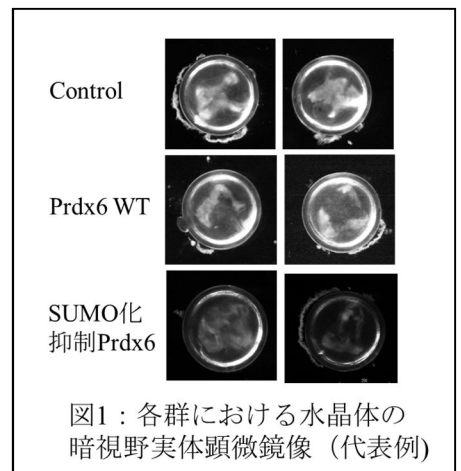


図1：各群における水晶体の暗視野実体顕微鏡像(代表例)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kubo E
2. 発表標題 Gene expression profiling of lens epithelial cells in Shumiya cataract rats
3. 学会等名 ARVO 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----