

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09446

研究課題名(和文) クローディンの多量体形成に着目した膠様滴状角膜ジストロフィの病態解明

研究課題名(英文) Unveiling of the molecular pathogenesis of gelatinous drop-like dystrophy in a view of multimerization of claudin proteins

研究代表者

川崎 諭 (Kawasaki, Satoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：60347458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膠様滴状角膜ジストロフィ(GDLD)は、角膜上皮細胞におけるタイトジャンクション機能が低下することが知られているが、本研究以前においてはTACSTD2遺伝子の機能喪失性変異がタイトジャンクションの機能低下を導くメカニズムは明らかでなかった。本研究により我々はTACSTD2遺伝子およびそのパラログ遺伝子であるEpCAM遺伝子はクローディン1および7のオリゴマー形成に関わり、それらが発現しない状況下ではクローディン1および7が凝集体を形成することを明らかにした。このことがGDLDの角膜上皮細胞においてタイトジャンクション機能が低下する主要なメカニズムであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠様滴状角膜ジストロフィ(GDLD)は世界的にはまれな疾患であるが本邦では比較的に見られる疾患である。それまでにGDLDにおいてタイトジャンクション機能が低下することは知られていたが、その詳細な分子病態は不明であった。本研究によってTACSTD2あるいはEpCAM遺伝子が発現しない状況ではクローディン1および7タンパクが多量体形成して凝集することが明らかとなった。凝集したクローディンタンパクは恐らく小胞体に関連した分解システムによって分解され、タイトジャンクション機能の低下につながるものと推察される。本邦で比較的に見られるGDLDの分子病態がより詳細になったことで創薬などへの発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：GDLD is known to cause impaired tight junction function in corneal epithelial cells, but prior to this study, the mechanism by which loss-of-function mutations in the TACSTD2 gene lead to impaired tight junction function had not been clarified. In this study, we show that the TACSTD2 gene and its paralogous gene, the EpCAM gene, are involved in the formation of claudin 1 and 7 oligomers, and that in the absence of the expression of TACSTD2 and EpCAM genes, claudins 1 and 7 form aggregates. This may be the primary mechanism for the impaired tight junction function in GDLD corneal epithelial cells.

研究分野：眼科学

キーワード：遺伝性角膜ジストロフィ 膠様滴状角膜ジストロフィ クローディン タイトジャンクション

## 1. 研究開始当初の背景

膠様滴状角膜ジストロフィ(GDLD)は、常染色体劣性遺伝を示す疾患で、tumor-associated calcium transducer 2 (TACSTD2)遺伝子の両アレルの機能喪失性変異によって生じる。(文献1) GDLDは10歳代に発症することが多く、両眼性に角膜にアミロイド沈着による隆起性病変が出現し、経過とともにその数と量が増し、視力を低下させる疾患である。(文献2)アミロイドの原因タンパクは涙液中に存在するラクトフェリンであることが明らかとなっており、(文献3)涙液中のラクトフェリンが角膜組織に浸透してアミロイドを形成し角膜実質内で沈着するものとされている。しかしながらどのようなメカニズムによってTACSTD2遺伝子機能の喪失がラクトフェリンのアミロイド沈着につながるのかは明らかではなかった。

我々は研究開始以前にTACSTD2遺伝子産物であるTACSTD2タンパクがタイトジャンクション構成タンパクのクローディン1および7と直接結合することを免疫沈降実験で明らかにした。さらにProximity ligation assayによってTACSTD2タンパクがクローディン1、4および7と距離的に近接していることを明らかにした。さらにクローディン1および7がGDLD患者の角膜上皮細胞において正常な角膜上皮細胞と比較して著明に発現減少していることを明らかにした。(文献4)これらのことから、TACSTD2遺伝子の機能喪失性変異によってTACSTD2タンパク発現が消失し、そのことが何らかのメカニズムによってクローディン1および7の発現減少を来しており、最終的にタイトジャンクション機能を低下させ、涙液中のラクトフェリンが角膜組織に浸透しアミロイドの形成に至るものと推察された。

しかしながら、TACSTD2遺伝子の機能喪失性変異がどのようなメカニズムによってクローディン1および7の発現減少を来たしてタイトジャンクション機能の低下に結びつくのかについては研究開始時点においては仮説さえない状況であった。

## 2. 研究の目的

角膜上皮細胞で発現するクローディンの主なものはクローディン1、4および7であったが、そのうちクローディン1および7についてはGDLDの角膜上皮細胞において著しい発現低下を来していた。クローディン1および7については分子進化上も類似しており、恐らく同じメカニズムによって発現低下を来すものと我々は推測していた。免疫染色を詳細に観察すると、GDLDの角膜上皮細胞においてクローディン1および7は完全に発現消失しているわけではなく、細胞膜上や細胞質内においてやや粒子状の局在を示していた。一般的にクローディンはモノマーで機能するというよりも数個程度のオリゴマーを形成することが知られている。我々はTACSTD2遺伝子の機能喪失性変異によって、クローディン1および7が適切なオリゴマーを形成せずに凝集体となることがタイトジャンクション機能を低下させるのではないかと考えた。本研究の目的は、この仮説のもとでTACSTD2遺伝子の機能喪失性変異がどのようなメカニズムによってタイトジャンクション機能の低下を導くかについて明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究を行うにあたり、まずモデル細胞を作製した。HeLa細胞にテトラサイクリン制御下にTACSTD2遺伝子を発現するレンチウイルスを感染させ、さらに恒常的にクローディン7遺伝子を発現させるレンチウイルスを感染させた細胞を作製した。このモデル細胞ではテトラサイクリンで誘導する前は細胞質クローディン7が局在していたが、テトラサイクリンで誘導すると24時間程度でクローディン7が細胞膜に局在ようになる。

HeLa細胞は子宮頸がん由来の細胞で上皮系細胞とされているが、EMTを起こしているためにE-cadherin発現を消失している。そのため、タイトジャンクション機能を測定するためのTrans-epithelial resistance (TER)の測定による評価ができない。そこで我々是不死化ヒト角膜上皮細胞(HCE-T, RCB2280)をベースとしたモデル細胞についても作製した。まず最初にHCE-T細胞を限界希釈法によってリクローニングし、細胞形態の異なる2種類の細胞に分離した。ひとつは上皮バリア機能が強い細胞で、もう一つはバリア機能が比較的弱い細胞であった。上皮バリア機能が強いクローンの一つを選択し、CRISPR-Cas9テクニックによってTACSTD2遺伝子を両アレルにおいてノックアウトした細胞(TACSTD2\_KN\_HCE-T細胞)をクローニングした。このTACSTD2\_KN\_HCE-T細胞について調べたところ、予想とは異なりクローディン1および7の発現はノックアウトしていない細胞とほぼ同程度であり、TERについてもやや減少した程度であった。TACSTD2遺伝子にはEpCAMというパラログ遺伝子が存在するため、EpCAM遺伝子が機能代償している可能性を考え、さらにEpCAM遺伝子をノックアウトした細胞(TACSTD2\_EpCAM\_DKN\_HCE-T細胞)を作製した。TACSTD2\_EpCAM\_DKN\_HCE-T細胞においてはクローディン1および7の発現はノックアウトしていない細胞と比較して著明に低下しており、TERについても、TACSTD2\_EpCAM\_DKN\_HCE-T細胞においてはノックアウトしていない細胞と比較して著明に低下していた。

これらの細胞をもちいてウエスタンブロット、免疫染色、Blue Native PAGEによってTACSTD2タンパクの発現がクローディン1および7の発現に与える影響について調べた。

#### 4. 研究成果

テトラサイクリン誘導前、つまり TACSTD2 遺伝子を発現しない状況ではクローディン7タンパクはモノマーに加えてダイマー、トリマー、テトラマー・・・と高分子のラダーパターンを示した。(図1, 図2) このことは TACSTD2 タンパクが発現しない状況ではクローディン7タンパクはマルチマーとなっているのではないかという我々の仮説を支持するものであった。また Blue Native PAGE を用いて非変性条件でのクローディン7タンパクの検討したところ、CLDN7 タンパクは TACSTD2 タンパクが存在しない状況では高分子域に泳動され、TACSTD2 タンパクが存在する状況では低分子域に泳動される成分が出現することがわかった。(図3, 図4) これらのことから、クローディン1および7タンパクはマルチマーを形成しやすい cohesive なタンパクであり、TACSTD2 タンパクは恐らくそれらと結合して過剰なマルチマー形成を抑制してオリゴマー形成を促しているのではないかと考えられた。過剰なマルチマーとなったクローディン1および7は恐らく細胞膜へとトラフィックされずに小胞体内にとどまり、ERAD などの小胞体とカップルしたタンパクのクオリティコントロールシステムによって異常タンパクと認識されて分解されるものと推察される。

以上のことから、TACSTD2 遺伝子および EpCAM 遺伝子はクローディン1および7のオリゴマー形成に関わり、それらが発現しない状況下ではクローディン1および7が凝集体を形成することが明らかとなり、このことが GDLD の角膜上皮細胞においてタイトジャンクション機能が低下するメカニズムであると考えられた。

#### <引用文献>

1. Tsujikawa et al, Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. Nat Genet. 1999 Apr;21(4):420-3.
2. Kawasaki and Kinoshita, Clinical and basic aspects of gelatinous drop-like corneal dystrophy. Dev Ophthalmol. 2011;48:97-115.
3. Klintworth et al, Familial subepithelial corneal amyloidosis--a lactoferrin-related amyloidosis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997 Dec;38(13):2756-63.
4. Nakatsukasa et al, Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy. Am J Pathol. 2010 Sep;177(3):1344-55.

#### <図>

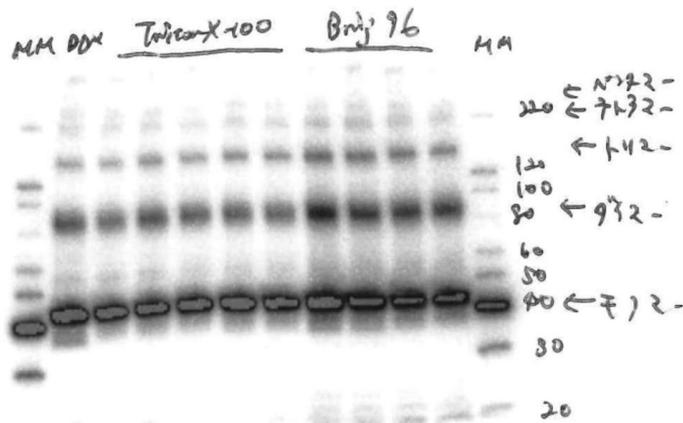


図1  
TACSTD2遺伝子発現がない状態でのクローディン7タンパクのウエスタンブロット実験結果。3種類の界面活性剤で可溶化しているが、いずれもラダーパターンを示しており、モノマーに加えダイマー、トリマー、テトラマー、ペンタマーのバンドが認められる。モノマーの分子量は40kDa程度である。

Tet	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
SDS	2	2	1	0.5	0.25	2	2	1	0.5	0.25
UREA	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

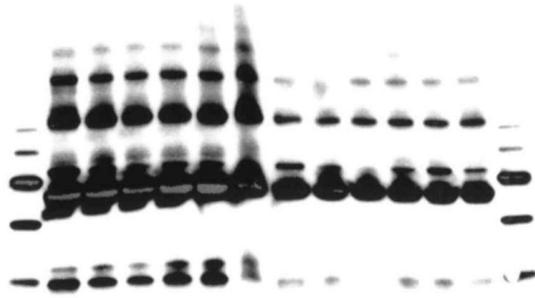


図2  
TACSTD2遺伝子が発現していない状況 (Tet (-)) と比較して、TACSTD2遺伝子が発現している状況 (Tet (+)) では、クローデイン7タンパクのマルチマーの発現量が減少した。またマルチマーはUREAやSDSでも分解できないほど強固に凝集していた。

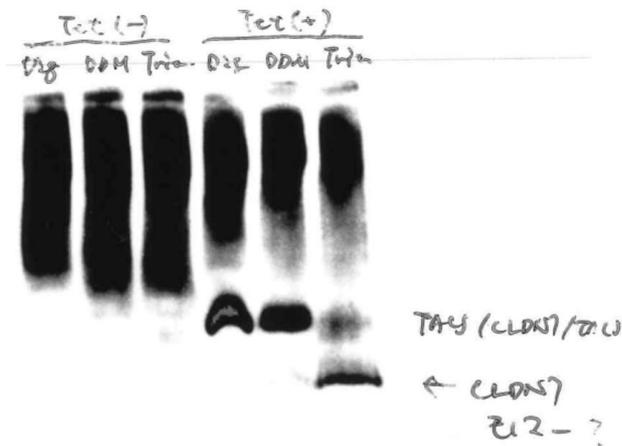


図3  
TACSTD2遺伝子を発現させない状態 (Tet (-)) とTACSTD2遺伝子を発現させた状態 (Tet (+)) でのクローデイン7タンパクのBlue-Native PAGE実験結果。3種類の界面活性剤で可溶化している。Tet (-) ではスメアパターンとなっているが、Tet (+) ではスメアが減少して低分子域にバンドが認められる。

Tet (-)			Tet (+)		
Dig	DDM	Triton	Dig	DDM	Triton



←  
←

図4  
図3のメンブレンを抗体ストリップして抗TACSTD2抗体で再度ウェスタンブロットした結果。TACSTD2遺伝子を発現させた時に出現した低分子バンドの位置にTACSTD2が存在しており、高分子領域のスメア部分には全く存在していないことがわかる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nagahara Y, Tsujikawa M, Koto R, Uesugi K, Sato S, Kawasaki S, Maruyama K, Nishida K.	4. 巻 190
2. 論文標題 Corneal Opacity Induced by Light in a Mouse Model of Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 2330-2342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.08.017. Epub 2020 Oct 1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okubo T, Hayashi R, Shibata S, Kudo Y, Ishikawa Y, Inoue S, Kobayashi Y, Honda A, Honma Y, Kawasaki S, Nishida K.	4. 巻 295
2. 論文標題 Generation and validation of a PITX2-EGFP reporter line of human induced pluripotent stem cells enables isolation of periocular mesenchymal cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 3456-3465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.010713.	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 -

1. 著者名 Hara S, Tsujikawa M, Kawasaki S, Nishida K.	4. 巻 188
2. 論文標題 Homeostasis of SLC4A11 protein is mediated by endoplasmic reticulum-associated degradation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Eye Res.	6. 最初と最後の頁 107782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2019.107782.	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 -

1. 著者名 Asao K, Hashida N, Ando S, Motooka D, Kurakami H, Nakamura S, Yamashita D, Maruyama K, Kawasaki S, Yamada T, Iida T, Nishida K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Conjunctival dysbiosis in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44861-5.	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 -

1. 著者名 Maeno S, Soma T, Tsujikawa M, Shigeta R, Kawasaki R, Oie Y, Koh S, Maruyama K, Kawasaki S, Maeda N, Nishida K.	4. 巻 104
2. 論文標題 Efficacy of therapeutic soft contact lens in the management of gelatinous drop-like corneal dystrophy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 241-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2018-313809.	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 -

1. 著者名 Xu P, Kai C, Kawasaki S, Kobayashi Y, Yamamoto K, Tsujikawa M, Hayashi R, Nishida K	4. 巻 7
2. 論文標題 A New in Vitro Model of GDLD by Knocking Out TACSTD2 and Its Paralogous Gene EpCAM in Human Corneal Epithelial Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transl Vis Sci Technol.	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.7.6.30.	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Satoshi Kawasaki , Kohji Ohmoto , Kohji Nishida
2. 発表標題 GENERATION OF AN IN VITRO DISEASE MODEL OF ANIRIDIA BY INTRODUCING HETEROZYGOUS LOSS-OF-FUNCTION MUTATION OF PAX6 GENE IN HUMAN IPS CELLS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前野紗代, 辻川元一, 繁田龍二郎, 大家義則, 相馬剛至, 高静花, 川崎諭, 前田直之, 西田幸二
2. 発表標題 膠様滴状角膜ジストロフィでの治療用ソフトコンタクトレンズ装用と細菌性角膜炎の検討
3. 学会等名 第62回日本コンタクトレンズ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Nagahara, k. uesugi, P. Xu, S. Kawasaki, M. Tsujikawa, K. Nishida.
2. 発表標題 The phenotype of knockout mouse of tumor-associated calcium signal transducer2 as a model of gelatinous drop-like corneal dystrophy.
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting 2019
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
研究分担者	辻川 元一  (Tsujikawa Motokazu)  (70419472)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授    (14401)	

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
---------	---------