

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592238

研究課題名（和文） TACSTD2 遺伝子による上皮タイトジャンクション機能制御機構の解明に関する研究

研究課題名（英文） The elucidation of the mechanism regulating the epithelial tight-junction by the TACSTD2 gene

研究代表者

川崎 諭（KAWASAKI SATOSHI）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：60347458

研究成果の概要（和文）：

本研究では膠様滴状角膜変性症（GDL）の原因遺伝子である TACSTD2 遺伝子が GDL の病態にどのように関わっているのかについて検討し、治療法の開発についても検討した。TACSTD2 タンパクは 1 型膜タンパクであり、1 個の膜貫通ドメインと短い細胞内領域を持っている。免疫沈降実験によって TACSTD2 タンパクはタイトジャンクション関連タンパクの一つであるクロードイン 1 および 7 と結合することが明らかとなった。また TACSTD2 遺伝子に対する shRNA を用いて角膜上皮細胞においてノックダウンを行うとクロードイン 1、7 のみならず他のタイトジャンクション関連タンパクの細胞内局在が変化し、同時に上皮バリアー機能の低下を来した。GDL より手術時に得た角膜組織を用いてクロードイン 1、4、7 タンパクの発現を免疫染色およびウエスタンブロットで検討したところ、GDL 患者角膜では正常角膜に比べこれらのタンパクの発現が著しく低下していた。レーザーマイクロキャプチャー法にて角膜上皮を組織切片より採取して定量 PCR を行うと、mRNA レベルではクロードイン 1、4、7 遺伝子の発現は変化していなかった。そこで HeLa 細胞に TACSTD2 およびクロードイン 1、4、7 遺伝子を共導入したところ、TACSTD2 と共導入している時にはクロードイン 1、7 タンパクの発現が亢進した。またプロテアソーム阻害剤である MG-132 で処理した場合にもクロードイン 1、7 タンパクの発現が亢進した。これらのことから TACSTD2 タンパクはクロードイン 1、7 タンパクのユビキチン・プロテアソーム経路によるタンパク分解を阻害してタイトジャンクション機能を正に制御しているものと推測された。そこで免疫沈降実験でクロードイン 1 および 7 が実際にユビキチン化されているかどうかを検討したが、これらのタンパクはユビキチン化されていないことが明らかとなった。このことは GDL 患者由来の不死化角膜上皮細胞に MG-132 を処理しても上皮バリアー機能が改善しないことから確からしい結果であると判断した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we sought to investigate the mechanism by which the loss of function mutation of the TACSTD2 gene - the responsible gene for gelatinous drop-like dystrophy (GDL) - is involved in the pathogenesis of the GDL, as well as to develop a therapy for this disease. The TACSTD2 gene encodes a type I membrane protein with 1 transmembrane domain and a short intracellular region. We found that the TACSTD2 protein binds to the claudin 1 and 7 proteins, which are major components of epithelial-tight-junction-using immunoprecipitation assay. We also found that if we knocked down the TACSTD2 gene, the subcellular localization of the tight-junction-related proteins, including the claudin 1 and 7 proteins, was significantly altered with the decrease in epithelial barrier function. We also found that the expression level of the claudin 1, 4, and 7 proteins in the corneal epithelium of GDL patients was significantly decreased, while their mRNA level was unchanged compared to normal corneal epithelium. We transduced the claudin 1, 4 or 7 gene to HeLa cells, with or without the TACSTD2 gene, and found that the expression level of claudin 1 and 7 was significantly increased when they were co-transduced with the TACSTD2 gene. We next treated the HeLa cells, which were transduced with the claudin 1 or 7 gene, with MG-132, a strong proteasome inhibitor. In accordance with the above

results, we found that the MG-132 treatment significantly increased the expression level of the claudin 1 or 7 proteins. These data suggest that the TACSTD2 protein has a protective role against the protein degradation of claudin 1 and 7, possibly through the ubiquitin-proteasome protein degradation pathway. We next investigated the ubiquitination of the claudin 1 and 7 proteins using immunoprecipitation assay. However, we unexpectedly found that the claudin 1 and 7 proteins were not at all ubiquitinated. This was in good agreement with the results that the epithelial barrier function of immortalized corneal epithelial cells derived from a GDL D patient was not improved by the treatment of MG-132.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼生化学・分子生物学・タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

TACSTD2(Tumor-associated calcium signal transducer 2)遺伝子は1999年に Tsujikawaらによって膠様滴状角膜変性症 (Gelatinous drop-like dystrophy; GDL D)の原因遺伝子であることが解明され、その後も数多くの変異が報告されている。GDL Dは日本に多い疾患で、角膜上皮直下にアミロイド沈着が生じる疾患として1914年に中泉によって初めて報告された疾患である。アミロイド構成タンパクとしてはラクトフェリンが主成分であることが判明している。GDL Dでは角膜上皮透過性が著明に充進し、タイトジャンクション機能が低下していることが明らかとなっており、角膜内に浸透した涙液構成タンパクが断片化や架橋形成などによるタンパク変性の結果、不溶性のアミロイド原線維を形成して沈着するものと推測されている。しかしながらTACSTD2遺伝子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に影響しているのかは研究開始当初は全く知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目標はTACSTD2遺伝子・タンパク機能の詳細な理解とそれに基づくGDL Dの病態の分子レベルでの完全解明であり、最終的にはそれらの成果に基づいてGDL Dの治療法を開発することを考えていた。本研究期間

の3年間にTACSTD2遺伝子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に影響しているのかを明らかにするとともに、プロテアソーム阻害剤によるGDL Dの治療の可能性を検討したいと考えている。

3. 研究の方法

1. TACSTD2遺伝子、クローディン1、4および7のノックダウンによる上皮バリア機能変化の検討

GDL D患者では角膜上皮バリア機能が著名に低下しているが、このことがTACSTD2遺伝子、クローディン1、4および7のノックダウンによってin vitroで再現可能かどうかについて検討する。方法としては不死化ヒト角膜上皮細胞に対し、shRNAにてTACSTD2遺伝子、クローディン1、4および7をノックダウンしてトランスウェル上に播種し、ボルトメーターにてTER(trans-epithelial resistance)の経時的変化を調べる。

2. TACSTD2タンパクとタイトジャンクション関連タンパクとの結合に関する検討
TACSTD2遺伝子の機能喪失性変異によって角膜上皮バリア機能の低下が臨床的に認められることから、TACSTD2タンパクはタイトジャンクションと機能的に関連している可能性が示唆される。そこで免疫沈降実験およびProximity Ligation Assay (PLA)によってTACSTD2タンパクとタイトジャンクション関

連タンパクとの結合を検討した。

3. クローディン1、4および7の安定性に関する検討

クローディン1、4および7はGDL患者の角膜上皮細胞では発現していないことから、TACSTD2遺伝子の機能喪失によって細胞膜上より消失することが考えられる。そこでHeLa細胞にTACSTD2遺伝子およびクローディン1、4および7を強制発現させ、TACSTD2遺伝子がある場合とない場合でクローディン1、4および7の発現がどうなるかを免疫染色にて検討する。また細胞膜上からの消失がユビキチン・プロテアソーム系を介した分解反応によって制御されているかどうかを調べるため、TACSTD2遺伝子を強制導入したHeLa細胞において、プロテアソーム阻害剤であるMG-132で処理してクローディン1、4および7の発現がレスキューされるかどうかを検討する。

4. GDL角膜上皮におけるクローディン1、4および7の発現に関する検討

GDL患者より手術時に採取した角膜組織の凍結切片を作製しクローディン1、4および7に対する免疫染色を行う。またレーザーマイクロキャプチャー法で上皮細胞だけを採取してRNAを採取し、逆転写後に定量PCR法にてクローディン1、4、および7の発現を定量した。

5. ミスセンス変異によって生じるGDLの妥当性の検討

これまで報告されたGDLの多くはTACSTD2遺伝子のノンセンス変異あるいは欠失変異、挿入変異であり、これらによって膜貫通ドメインのN末端側で翻訳が終了するために機能喪失となるものと考えられる。しかしながら少数のGDL家系ではミスセンス変異によるアミノ酸置換が報告されており、これらが本当にGDLの原因となるかは疑問が残る。そこで内因性TACSTD2 mRNAはノックダウンするが、コーディング配列のみの外因性TACSTD2 mRNAはノックダウンしないよう、TACSTD2遺伝子の3' UTRにsiRNAをデザインする。これをミスセンス変異を加えたTACSTD2遺伝子発現ベクターとともに不死化ヒト角膜上皮細胞に共導入して、上皮バリア機能が野生型TACSTD2遺伝子を共導入した場合と比較して検討し、ミスセンス変異が病的変異であるかどうかを調べる。

6. プロテアソーム阻害剤によるGDL治療の可能性の検討

GDL患者ではクローディン1、4および7が細胞膜上より消失する。このことが角膜上皮バリア機能低下の直接の原因であるとする、その安定性を高めることがGDLの治療となりうるのではないかと考えられる。そこでまず培養ヒト角膜上皮細胞を様々な種類の様々な濃度のプロテアソーム阻害剤にて

処理して細胞毒性、細胞増殖、アポトーシスについて検討する。またウサギにプロテアソーム阻害剤を点眼して同様の検討を行う。さらに倫理委員会の承認を得た上でGDL患者に対し細胞毒性の少ない濃度域のプロテアソーム阻害剤を点眼し、上皮バリア機能が回復するかどうかをフルオロメーターにて調べる。また現時点では存在しないが、TACSTD2のノックアウトマウスが今後作成された際にはそれを用いて同様の検討を行う。

4. 研究成果

1. TACSTD2遺伝子、クローディン1、4および7のノックダウンによる上皮バリア機能変化の検討

TACSTD2、クローディン1、4および7に対するshRNA発現レンチウイルスを作製した。これを不死化角膜上皮細胞(HCE-T)に感染させたところ、上皮バリア機能の著しい低下が認められた。(図1)

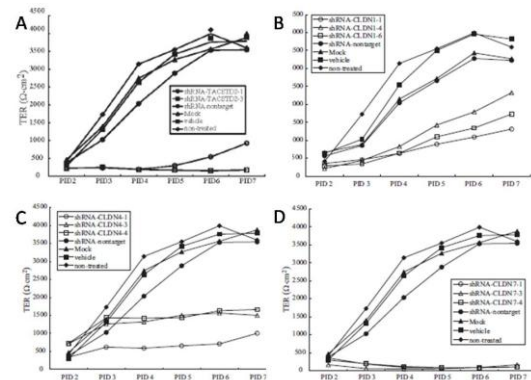


図1 TACSTD2遺伝子(A)、クローディン1(B)、4(C)および7(D)のノックダウンにより、上皮バリア機能の著しい低下を認めた。

2. TACSTD2タンパクとタイトジャンクション関連タンパクとの結合に関する検討

TACSTD2タンパクに対する抗体を用いて免疫沈降実験を行い、得られたサンプルに対してウェスタンブロットを行った。検討したタイトジャンクション関連タンパクのうち、クローディン1および7は明確なバンドが得られた。(図2:A) またPLAアッセイではTACSTD2タンパクとクローディン1、4および7、Zo-1の間に明瞭なシグナルが得られた。(図2:B) 免疫沈降実験とPLAアッセイの結果の違いは前者が分子同士の結合を見ているのに対し、後者が分子同士の距離を見ているために起こるのではないかと推測され、少なくとも両方でシグナルの得られたクローディン1および7についてはTACSTD2タンパクと結合している可能性は極めて高いものと考えられた。免疫沈降実験結果をさらにサポートするためプルダウンアッセイを試みたが、TACSTD2タンパクの全長の大腸菌での発現が

困難であったため、断念した。

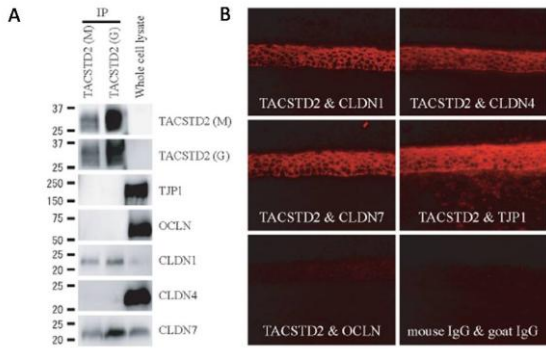


図 2

A: TACSTD2タンパクに対する抗体を用いた免疫沈降実験においてクロードイン 1 および 7 は明確なバンドが得られた。

B: PLA アッセイにおいてTACSTD2タンパクとクロードイン 1、4 および 7、TJP2の間に明瞭なシグナルが得られた。

3. クロードイン 1、4 および 7 の安定性に関する検討

HeLa細胞にTACSTD2遺伝子とクロードイン 1、4 および 7 を強制導入し、それぞれのクロードインタンパクに対して免疫染色した。TACSTD2が共導入されている場合はクロードイン 1 および 7 の発現はない場合に比較して著しく亢進していた。(図 3: A) またクロードイン 1、4 および 7 を強制導入しHeLa細胞に対してMG-132の処理を行うとクロードイン 1 と 7 では発現の増加が認められた。(図 3: B) 一方でクロードイン 4 については共導入実験とMG-132処理実験のどちらも発現量に変化はなかった。これらの結果はクロードイン 1 および 7 はユビキチン・プロテアソーム系のタンパク分解システムによって分解されることを示唆している。

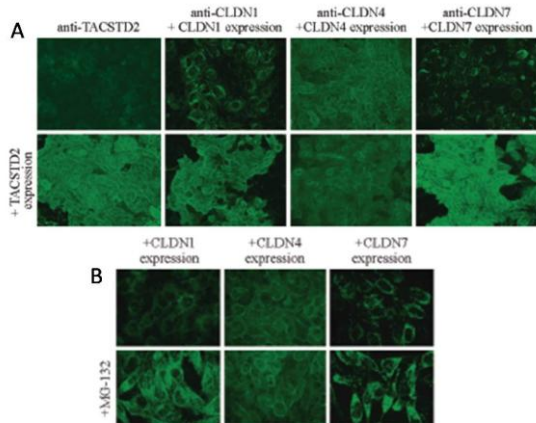


図 3

A: HeLa細胞にTACSTD2遺伝子とクロードイン 1、4 および 7 を強制導入し、さらにTACSTD2を共導入すると、共導入されている場合はクロードイン 1 および 7 の発現はない場合に

比較して著しく亢進していた。

B: クロードイン 1、4 および 7 を強制導入したHeLa細胞に対してMG-132の処理を行うとクロードイン 1 と 7 では発現の増加が認められた。

4. GDL D角膜上皮におけるクロードイン 1、4 および 7 の発現に関する検討

GDL D患者角膜ではクロードイン 1、4 および 7 タンパクのすべてで発現量の著しい低下が認められた。(図 4: A) 一方でRNAレベルでは正常角膜上皮と同レベルの発現量であった。(図 4: B) このことは上記で示唆されたクロードイン遺伝子のタンパクレベルでの分解がGDL D患者角膜上皮で起こっていることを示唆する。

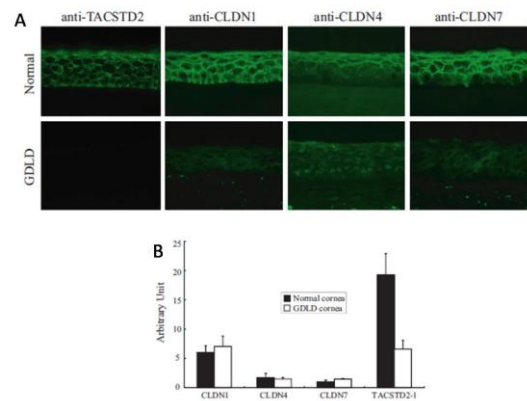


図 4

A: GDL D患者角膜ではクロードイン 1、4 および 7 タンパクのすべてで発現量の著しい低下が認められた。

B: RNAレベルではGDL D患者角膜のクロードイン 1、4 および 7 は、正常角膜上皮と同レベルの発現量であった。

5. ミスセンス変異によって生じる GDL D の妥当性の検討

部位特異的変異導入法を用いてTACSTD2遺伝子にこれまで報告のあったミスセンス変異を導入し、レンチウイルスベクターに組み込んだ。またTACSTD2遺伝子の3' UTR領域に対するshRNA発現レンチウイルスを作製した。HCE-T細胞にshRNAレンチウイルスを感染させたところ、予想通り上皮バリア機能の低下が認められた。しかし野生型のTACSTD2遺伝子をこの細胞に共導入しても上皮バリア機能の改善は認められず、さらにHCE-T細胞に野生型TACSTD2遺伝子を導入した場合でも上皮バリア機能の低下が認められたため、この実験系による判定は困難と判断し中断した。GDL D患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞の樹立に成功しているため、機会があればこれらの細胞で再度検討したいと考えている。

6. プロテアソーム阻害剤による GDL D 治療の可能性の検討

免疫沈降実験によってクローディン 1 および 7 はユビキチン化しないことが明らかとなった。(図 5) そのため、当初考えていたプロテアソーム阻害剤による GDL D の治療の可能性は困難であると判断した。

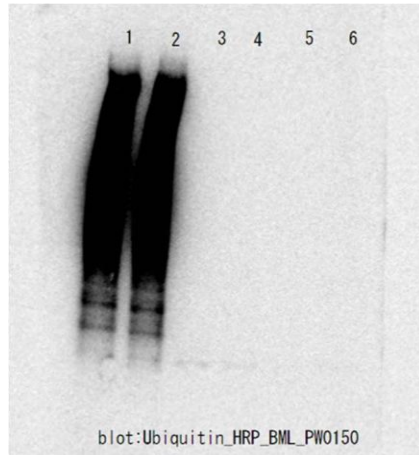


図 5 HeLa 細胞にクローディン 1 を強制導入し、上清 (lane 1, 2) および免疫沈降物 (lane 3, 4) を抗ユビキチン抗体でプロットすると免疫沈降物にはバンドが検出されなかった。

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 7 件)

- 1) Kawasaki S, Yagi H, Yamasaki K, Matsuda A, Takeda K, Kinoshita S: A novel mutation of the TGFBI gene causing a lattice corneal dystrophy with deep stromal involvement. *Br J Ophthalmol* 95: 150-151, 2011
- 2) Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, Fukuoka H, Matsuda A, Nishida K, Kinoshita S: Two novel mutations of TACSTD2 found in three Japanese gelatinous drop-like corneal dystrophy families with their aberrant subcellular localization. *Mol Vis* 17: 965-970, 2011
- 3) Ang LP, Tanioka H, Kawasaki S, Ang LP, Yamasaki K, Do TP, Thein ZM, Koizumi N, Nakamura T, Yokoi N, Komuro A, Inatomi T, Nakatsukasa M, Kinoshita S: Cultivated human conjunctival epithelial transplantation for total limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 758-764, 2010
- 4) Fukuoka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Matsuda A, Fukumoto A, Murakami A, Kinoshita S: Lattice corneal dystrophy type IV (p.Leu527Arg) is caused by a

founder mutation of the TGFBI gene in a single Japanese ancestor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 4523-4530, 2010

- 5) Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, Fukuoka H, Matsuda A, Tsujikawa M, Tanioka H, Nagata-Takaoka M, Hamuro J, Kinoshita S: 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* 177: 1344-1355, 2010
 - 6) Tanioka H, Kawasaki S, Sotozono C, Nakamura T, Inatomi T, Kinoshita S: The relationship between preoperative clinical scores and immunohistological evaluation of surgically resected tissues in chronic severe ocular surface diseases. *Jpn J Ophthalmol* 54: 66-73, 2010
 - 7) Matsuda A, Okayama Y, Terai N, Yokoi N, Ebihara N, Tanioka H, Kawasaki S, Inatomi T, Katoh N, Ueda E, Hamuro J, Murakami A, Kinoshita S: The role of interleukin-33 in chronic allergic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 4646-4652, 2009
 - 8) Tanioka H, Yokoi N, Komuro A, Shimamoto T, Kawasaki S, Matsuda A, Kinoshita S: Investigation of the corneal filament in filamentary keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 3696-3702, 2009
- [学会発表] (計 11 件)
1. Kawasaki S, Yamasaki K, Shinomiya K, Kinoshita S. Epigenetic Regulation and Identification of the Cis-Regulatory Region of the Keratin 12 Gene in Rabbit Cornea. ARVO 2011.5.1 Florida USA
 2. Kawasaki S. Molecular Pathophysiology of Gelatinous Drop-like Dystrophy. The Cornea and Tissue Engineering (A JSPS-Sponsored Research Symposium at Cardiff university) 2011.8.19 Cardiff UK
 3. Kawasaki S, Nakatsukasa M, Yamasaki K, Fukuoka H, Matsuda A, Tsujikawa M, Tanioka H, Hamuro J, Kinoshita S. Tacstd2 Protein Directly Binds to Claudin Proteins and is Required for the Proper Subcellular Localization of Tight Junction-Related Proteins; Roles of Tacstd2 Protein in the Pathogenesis of Gelatinous Drop-Like Dystrophy. ARVO 2010.5.5 Florida USA
 4. Imai K, Mori K, Ueno M, Ikeda Y, Kawasaki S, Yagi T, Ohmi N, Fuwa M, Tashiro K, Kinoshita S. The Rs16958477 SNP in the Promoter Region of the LOXL1 Gene is Associated With the LOXL1 Gene

Expression Level. ARVO 2010.5.6 Florida USA

5. Tanioka H, Kawasaki S, Adachi H, Inatomi T, Hieda O, Fukuoka H, Okumura N, Koizumi N, Iliakis B, Kinoshita S. The Existence of Dead Cells in Corneal Endothelium Preserved With Storage Media. ARVO 2010.5.4 Florida USA

6. Fukuoka H, Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Inatomi T, Yokoi N, Kinoshita S. Cytopathological Features of Corneal Intraepithelial Neoplasia. ARVO 2010.5.3 Florida USA

7. Kawasaki S. Functional Association of the TACSTD2 with Tight Junction Proteins. The 2nd Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting 2010.12.2 Kyoto Japan

8. 川崎 諭、中司美奈、山崎健太、福岡秀記、木下茂、松田彰、辻川元一. TACSTD2 遺伝子の膠状滴状角膜ジストロフィにおける分子病理学的意義. BMB 2010.12.10 Kobe Japan

9. Fukuoka H, Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Inatomi T, Yokoi N, Kinoshita S. Immunohistological Examination of Advanced Corneal Intraepithelial Neoplasia. ARVO 2009 Florida USA

10. Kawasaki S, Yamasaki S, Matsuda A, Fukuoka H, Murakami A, Kinoshita S. Lattice Corneal Dystrophy Type 4 Was Caused by a Founder Mutation of TGFBI Gene in a Japanese Ancestor. ARVO 2009 Florida USA

11. Tanioka H, Inatomi T, Hieda O, Matsuda A, Kawasaki S. Histological and Immunohistological Analysis of Pre-Cut Donor Corneas for DSAEK. ARVO 2009 Florida USA

[図書] (計1件)

1. Kawasaki S, Kinoshita S. Clinical and basic aspects of gelatinous drop-like corneal dystrophy. Dev Ophthalmol. 2011;48:97-115.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 諭 (KAWASAKI SATOSHI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 60347458

(2) 研究分担者

松田 彰 (MATSUDA AKIRA)

順天堂大学・医学部

研究者番号: 00312348

(3) 連携研究者

()
研究者番号: