

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500496

研究課題名(和文) 新たな白内障モデル動物の開発：水晶体破裂と眼内炎抑制に関する研究

研究課題名(英文) Development of new cataract model animals: A Study on the lens rupture and endophthalmitis suppression

研究代表者

岡田 利也 (Okada, Toshiya)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：00169111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：CF#1系由来遺伝性水晶体破裂マウスの発症の兆候は、赤い眼に小さい白い点が出現することであった。その後、その白い点が大きくなり、最終的には眼球全体が白くなった。本マウスの水晶体の破裂は乳がん関連遺伝子(Bcar3)の異常によって起こることが分かった。水晶体破裂には眼内炎を伴うことが多いが、本マウスは眼内炎を発症しない。本マウスにおいて、水晶体を保護する熱ショック蛋白(Bクリスタリン)は減少するが、ストレスなどの原因で生じるリン酸化Bクリスタリンは増加しない。このことが、水晶体破裂を示すにもかかわらず、眼内炎を発症しないという本マウスの特性に関係していると推察された。

研究成果の概要(英文)：In the inherited lens rupture cataract mouse model derived from CF#1 mice (CF#1/lr mice), the white pin head opacity is the first sign of lens rupture. Then, the opacity becomes enlarged and finally results in an entirely white eye. The lens rupture is induced by abnormality of gene (Bcar3) related to the breast cancer. Although lens rupture is often complicated by endophthalmitis, CF#1/lr mice do not develop endophthalmitis. The levels of B crystallin, one of the heat shock proteins protecting lens, and phosphorylated B crystallin (P B crystallin) which is increased by stress were decreased in the lens of CF#1/lr mice. This may be related to the characteristics of CF#1/lr mice do not develop endophthalmitis despite lens rupture.

研究分野：実験動物学

キーワード：遺伝解析 眼内炎 細胞増殖因子 疾患モデル動物 水晶体破裂 Bcar3

## 1. 研究開始当初の背景

白内障は病態の進行に伴って失明に陥る重大な眼疾患であり、白内障には様々な type が存在する。それゆえ、多くの白内障モデルが開発され、その解析に用いられている。我々は、クローズドコロニー由来遺伝性白内障マウスに関して遺伝的及び形態的特性を明らかにし、原因遺伝子のマッピングを行ってきた。現在、CF-1 系由来遺伝性水晶体破裂白内障マウスを維持している。水晶体破裂白内障モデルも幾つか報告されており、原因遺伝子のマッピングも行われているが、候補遺伝子の検出、原因遺伝子の同定には至っていない。

水晶体破裂はイヌにおける白内障過熟期の特徴の一つで、水晶体表面が溶けたり、穴があいたりして中身が溶け出す。重篤な場合は眼球内部に炎症(眼内炎)をおこし、失明する。また、眼内炎はヒトの白内障手術後に起こることがあり、発生頻度は高くないが、永久的な視力障害を残す危険性の高い合併症である。さらに、眼球外傷などでも眼内炎を発症する。眼球外傷の 38% で水晶体破裂を伴い、その 62% で眼内炎を発症するが、水晶体破裂を伴わない場合の眼内炎発症率は 3.2% と低い。このように、水晶体破裂と眼内炎には大きな関わりがある。また、眼内炎の危険因子のひとつに免疫機能不全が挙げられ、熱ショック蛋白が免疫調節作用を有していることから、他の熱ショック蛋白が眼内炎抑制に関わっていると思われる。一方、水晶体構成蛋白である A-及び B-crystallin は熱ショック蛋白の一種で、水晶体を防御する機能がある。本白内障マウスでは水晶体破裂によって水晶体内の crystallin が漏出、変性していると考えられ、熱ショック蛋白としての防御機能が破綻しているにもかかわらず、眼内炎を発症しない。本白内障マウスを用いてその点を明らかにすることによって、新たな眼内炎抑制機構の解明につながる可能性がある。

一方、水晶体上皮細胞から線維細胞への分化に fibroblast growth factor (FGF)-1、FGF-2 及び transforming growth factor (TGF)- が関係しており、過剰な TGF- によって白内障が誘導される。また、白内障発症時に変化する水晶体構成蛋白として上述の crystallin に加えて calpain などがある。このように原因遺伝子と水晶体構成蛋白の変化を関連づけることは白内障モデル動物の特性を明らかにする上で重要なことである。

## 2. 研究の目的

本研究では、CF-1 系由来水晶体破裂白内障マウスに関して、A) 遺伝学的解析{原因遺伝子の染色体上での位置決定、候補遺伝子の検出、原因遺伝子の同定及びヒトにおける相

同遺伝子の探索)、B) 水晶体に関する解析{病理学的変化(水晶体構造の変化、TGF-、FGF の局在の変化)}を明らかにする。さらに、C) 水晶体破裂を特性としているにもかかわらず、眼内炎を発症しない要因を解明することにより、新しい疾患モデル動物を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用動物および飼育方法

2~22 週齢の CF#1/lr マウス、ddY 系マウスおよび BALB/c 系マウスを用いた。室温(23±1.0 ) 湿度(55±10%) および照明時間(8:00~20:00、12L: 12D)をコントロールされた室内で飼育し、固形飼料(CE2; 日本ククリア社製)および水道水を自由に摂取させた。

### (2) 遺伝的特性に関する実験

#### 遺伝様式

CF#1/lr マウス 55 匹(雌 24 匹,雄 21 匹)について、5 週齢から 20 週齢まで肉眼的に観察し、発症の有無を調べた。さらに、CF#1/lr マウスと BALB/c 系マウスとの交雑子第 1 世代(F1 世代) 第 2 世代(F2 世代) および戻し交配世代を作出し、発症率を調べた。

#### 遺伝解析

戻し交配世代の発症個体を用いて連鎖解析を行った。戻し交配世代では遺伝子型は CF#1/lr マウスホモ型あるいは CF#1/lr マウス/BALB/c マウスヘテロ型のいずれかを示す。遺伝子型が CF#1/lr マウスホモ型に有意に偏っているマーカーが、原因遺伝子近くに存在すると判断し、発症個体 250 例を用いてマッピングを行った。

#### 原因遺伝子の解明:

(2) で得た結果による原因遺伝子の存在領域内で、最も可能性の高いと思われる Bcar3 (breast cancer anti-estrogen resistance 3) の塩基配列を、PCR を用いたダイレクトシーケンシング法で解析した。

### (3) 週齢による変化に関する実験

#### 水晶体混濁の出現時期の特定

CF#1/lr マウス 117 匹について、2 週齢より 22 週齢まで眼球を肉眼的に観察し、figure 1A に示すような水晶体に点状の混濁(pinhead)が認められた日を発症日とした。

#### 水晶体の組織学的変化の観察

生後 1、2、3、4、5、6、7、10 週齢の CF#1/lr マウスを用いた。イソフルラン麻酔下で左心室より 10% 中性緩衝ホルマリンで灌流し、眼球摘出後 48 時間同液で浸漬固定した。定法により脱水、透徹、包埋後、厚さ 4 μm の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色

を施した。対照には ddY 系マウスを用いた。

#### (4) 混濁病変進行に関する実験

##### 肉眼的病変の進行時期

(3) における肉眼的観察の際に水晶体に pinhead の混濁が出現し、その混濁が大きくなり (large)、ついには水晶体全体が真っ白になる (white) ことを観察した (Fig. 1)。そこで、CF#1/lr マウス 22 匹 (雌 8 匹、雄 14 匹) について、2 週齢より 15 週齢まで週 3 回、眼球を肉眼的に観察し、3 つの肉眼的発症パターンへの出現する週齢を記録した。



Fig. 1 CF#1/lr マウスの肉眼的発症パターン  
A; pinhead, B; large, C: white

##### 肉眼的発症パターン別水晶体における組織学的変化の観察

Pinhead, large, white の肉眼的発症パターン別の CF#1/lr マウスを 5 例ずつ用い、(3) と同様に処置しヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

#### (5) 水晶体における細胞増殖因子および熱ショック蛋白の局在の観察

Pinhead, large, white の肉眼的発症パターン別の CF#1/lr マウスを用い、(3) と同様に処置し、パラフィン切片を作製した。酵素抗体法により FGF-1、2 とそのレセプター (FGFR1、2、3、4)、TGF- $\beta$ 1 とそのレセプター (TGF- $\beta$ RI, II)、リン酸化 (P)  $\alpha$ B クリスタリン、 $\alpha$ B クリスタリン、heat shock protein (Hsp) B1 の局在を観察した。比較対照として ddY 系マウスを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝的特性に関する実験

#### 遺伝様式

CF#1/lr マウスと BALB/c マウスとの F1 世代では発症個体が認められず、F2 世代では発症率は 25.2% で雌雄間に有意差は見られなかった。また、戻し交配世代での発症率は 45.6% で雌雄間に有意差は見られなかった。このことから、CF#1/lr マウスの遺伝様式は常染色体劣性で、原因遺伝子は単一であることが分かった。

#### 遺伝解析

水晶体破裂の原因遺伝子の存在領域は第 3 染色体上 D3Mit79 ~ D3Mit216 の 2.4cM の領域であることが分かった (Fig. 2)。

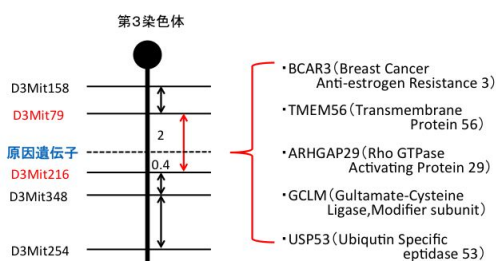


Fig. 2 水晶体破裂原因遺伝子の存在する領域とその領域に存在する主な既知遺伝子

### 原因遺伝子の解明

Bcar3 の塩基配列をダイレクトシーケンシング法によって解析した。正常個体では 1445 番目から 1451 番目まで C (シトシン) が 7 個連続しているのに対して発症個体では 1452 番目まで C が 8 個連続し (Fig. 3)、1 塩基の挿入変異が生じていることがわかった。その結果、フレームシフト変異が生じ、新たな終止コドンが形成されることが分かった。

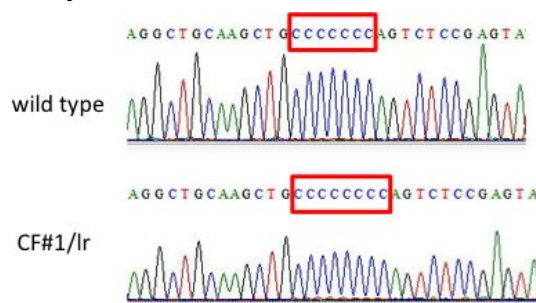


Fig. 3 CF#1/lr マウスの Bcar3 遺伝子の塩基配列  
赤い枠で囲んだ部分に変異が見られる

### (2) 週齢による水晶体の変化

#### 水晶体混濁の出現時期の特定

生後 3 週齢で初めて発症個体が出現し、その数は片眼発症が 8 匹、両眼発症が 3 匹であった。発症個体数のピークは片眼発症、両眼発症ともに 5 週齢 ~ 7 週齢であった。

本マウスにおいて水晶体混濁は 3 週齢から出現し、6 週齢前後で多く認められると考えられた。しかし、6 週齢から大きく外れた週齢でも発症する個体がいることから、本マウスの水晶体破裂発症には個体差が大きいと考えられる。

#### 週齢による水晶体の組織学的変化

生後 3 週齢では CF#1/lr マウスの水晶体前部の皮質領域に水晶体線維の膨化が、4 週齢では、水晶体後部の縫合線の破れ、水晶体前部皮質領域の線維の膨化、水晶体前部、赤道部付近の上皮細胞の空胞化が認められた。5 週齢では水晶体後部縫合線の破れ、水晶体赤道部付近の上皮細胞に空胞化、水晶体前部皮質領域に線維の膨化が観察された。6 週齢では水晶体後部縫合線の破れ、水晶体前部皮質領域に線維の膨化が観察されたが、水晶体赤道部、前部付近の上皮細胞における空胞は

認められなかった。7、10 週齢では水晶体核の脱落、赤道部付近ならびに前部の皮質および上皮に大小様々な空胞化が認められた。しかし、Fig. 3 に示すように、皮質領域の空胞化が 10 週齢に比べ 7 週齢の水晶体の方が顕著な例も認められた。

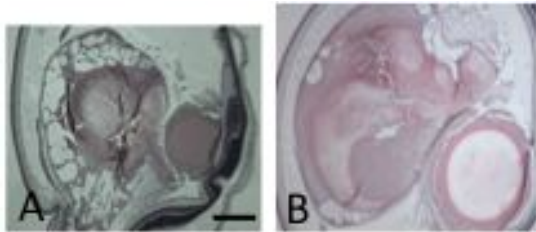


Fig. 3 CF#1/lr マウス眼球の H.E. 染色像  
A: 7 週齢, B: 10 週齢, Bar=500 $\mu$ m.

このように、本マウスにおいて水晶体破裂は 3 週齢から起こり、最初に水晶体に起こる組織異常は線維の膨化である。しかし、4 週齢で認められた水晶体赤道部付近と水晶体前部の上皮細胞に空胞が、5 週齢および 6 週齢でも認められなかったり、10 週齢よりも 7 週齢の方が病変の顕著な例が認められたりしたことから病態の進行具合にはばらつきが大きいと考えられる。

### (3) 混濁病変進行に関する実験

#### 肉眼的病変の進行時期の特定

Pinhead、large、white の病変が認められる個体はそれぞれ 3 週齢、4 週齢、6 週齢から出現した。正常な個体は 9 週齢で認められなくなり、pinhead は 12 週齢で、large は 15 週齢でそれぞれ認められなくなった。Pinhead、large の眼球が多く観察されたのはそれぞれ 3~6 週齢、5~8 週齢で、white の病変が多く認められたのは 6~10 週齢であった。

#### 水晶体における組織学的変化の観察

Pinhead、large、white のパターン別で観察された結果を表 1 に示している。

	pinhead	large	white
水晶体前部皮質	線維の膨化	線維の膨化	大小様々な空胞
水晶体前部上皮細胞	部分的な空胞化	扁平な空胞化	全て空胞化
水晶体赤道部付近皮質		空胞化	大小様々な空胞化
水晶体後部	縫合線の破れ	縫合線の破れ 水晶体核脱落の開始	水晶体核の脱落

線維の膨化 → 上皮の空胞化  
縫合線の破れ → 皮質の空胞化 → 核領域の脱落

表 1 CF#1/lr マウス水晶体の組織学的変化

本マウスではまず水晶体線維の膨化が起こると考えられる。しかし、水晶体前部上皮細胞の部分的な空胞化~水晶体前部上皮細胞の扁平な空胞化(水晶体赤道部皮質領域の空胞化)~水晶体上皮のほぼ全ての空胞化(水晶体皮質領域の空胞化)という病変と水晶体後部縫合線の破れ~水晶体核の脱落という病変が認められた。どちらの病変が先に

出現するかは不明で、二つの病変の発症に規則性がない。それゆえ、これら二つの病変は別々の機序で起こっていると考えられる。

### (4) 水晶体における細胞増殖因子および熱ショック蛋白の局在の観察

#### FGF および FGF レセプター

FGF-1 抗体に対する陽性反応は、水晶体前部上皮細胞で ddY 系、pinhead、large の混濁を示すマウスに比べて white の混濁を示すマウスで強かったが、FGF-2 抗体に対する陽性反応には、差は認められなかった (Fig. 4)。水晶体上皮細胞の FGFR1 抗体、FGFR2 抗体および FGFR3 抗体に対する陽性反応は、ddY 系、pinhead、large、white の混濁を示すマウスの間に差は認められなかった。水晶体上皮細胞において FGFR4 抗体に対する陽性反応は認められなかった。

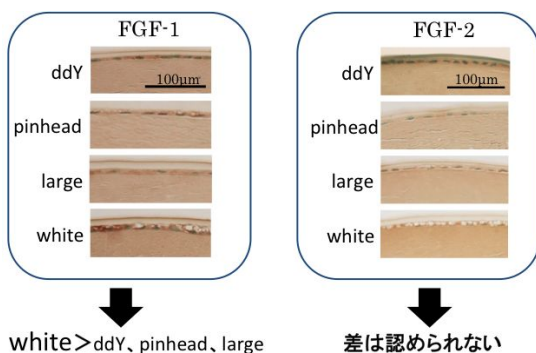


Fig. 4 マウス水晶体前部の組織写真: FGF-1 及び FGF-2 抗体を用いた酵素抗体法による染色像

FGF-1 は過剰に発現すると水晶体に異常な変化を引き起こすことから、pinhead、large、white のいずれでも反応が強くなると推測されたが、white でのみ FGF-1 抗体に対して反応が強かった。このことから、本マウスの病変が重度になった時に FGF-1 の発現が過剰になることが考えられる。

#### TGF- $\beta$ および TGF- $\beta$ レセプター

水晶体前部上皮細胞の TGF- $\beta$ 1 抗体に対する陽性反応は、ddY 系マウスに比べて pinhead、large の混濁を示すマウスで強かった (Fig. 5)。水晶体前部上皮細胞の TGF- $\beta$ RI

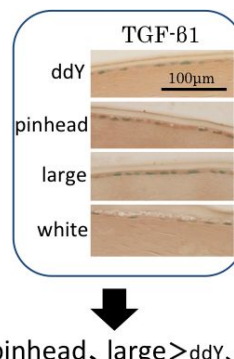


Fig. 5 マウス水晶体前部の組織写真: TGF $\beta$ 1 抗体を用いた酵素抗体法による染色像

および TGF- $\beta$ RII 抗体に対する陽性反応は ddY 系、pinhead、large、white の混濁を示すマウス間で差は認められなかった。

TGF- $\beta$ 1 の過剰な発現によって水晶体前部における線維の膨化が引き起こされることが知られている。それゆえ、pinhead、large において観察された水晶体前部皮質領域の線維の膨化は TGF- $\beta$ 1 により引き起こされたと考えられる。

PaB クリスタリン、 $\alpha$ B クリスタリン、HspB1 (Fig. 6)

Large の混濁を示すマウスにおいて水晶体上皮細胞の PaB クリスタリン抗体に対する陽性反応は ddY 系マウスに比べて弱かった。Large の混濁を示すマウスにおいて水晶体上皮細胞の  $\alpha$ B クリスタリン抗体に対する陽性反応は ddY 系マウスに比べて弱く、large の混濁を示すマウスにおいて水晶体上皮細胞の HspB1 抗体に対する陽性反応も ddY 系マウスに比べて弱かった。

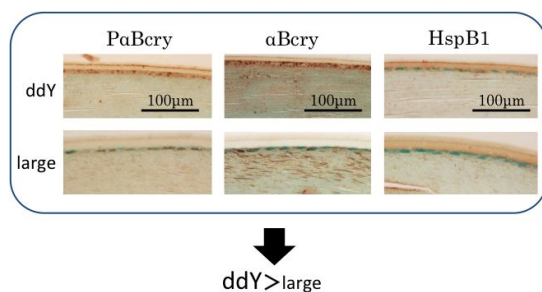


Fig. 6 マウス水晶体前部の組織写真: PaB クリスタリン (PaBery)、 $\alpha$ B クリスタリン( $\alpha$ Bery)および HspB1 抗体を用いた酵素抗体法による染色像

$\alpha$ B クリスタリンは変異やストレスを受けることで PaB クリスタリンになり、水晶体に障害を引き起こす。HspB1 はその PaB クリスタリンの障害から水晶体の機能を保護していることが知られている。そのことから、PaB クリスタリンと  $\alpha$ B クリスタリンの反応は逆になると思われた。しかし、これらの熱ショック蛋白の発現は ddY 系マウスに比べ large の混濁を示すマウスの水晶体で反応が弱かった。 $\alpha$ B クリスタリンが減少しているにもかかわらず、PaB クリスタリンの上昇が認められないことが、水晶体破裂を引き起こすにもかかわらず、眼内炎を発症しないという CF#1/lr マウスの特性に関連しているものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Kondo T, Nakamori T, Takeshita A, Kusakabe K, Okada T. A study of the inherited lens rupture cataract model found in CF#1/lr mice: The elucidation of a causative gene. *Congenit, Anom.* 53: A7

(2013). (査読無し).

2. Nakamori T, Okada T, Takeshita A, Mino M, Kusakabe K, Kondo T. Hereditary characteristics of the inherited lens rupture cataract model found in CF#1 mice (CF#1/lr). *Congenit, Anom.* 52: A12 (2012). (査読無し).

[学会発表](計7件)

1. 近藤友宏、徳原顕泰、中森健人、長井寛明、武下愛、三野将城、岡田利也. CF#1 系由来遺伝性水晶体破裂 (CF#1/lr) マウスの水晶体混濁の進行パターンと細胞増殖因子の局在. 第 55 回日本先天異常学会学術集会. 2015 年 7 月 25 日~7 月 27 日. パシフィコ横浜会議センター. 神奈川県・横浜市.
2. 岡田利也、徳原顕泰、中森健人、長井寛明、武下愛、三野将城、近藤友宏. CF#1 系由来遺伝性水晶体破裂マウスに関する研究: 組織学的変化と原因遺伝子の探索. 第 60 回日本実験動物学会総会. 2015 年 5 月 28 日~5 月 30 日. 京都テルサ(京都府民総合交流プラザ). 京都府・京都市.
3. 徳原顕泰、中森健人、長井寛明、武下愛、三野将城、近藤友宏、岡田利也. CF#1 系由来遺伝性水晶体破裂マウスに関する研究. 第 90 回日本解剖学会近畿支部会. 2014 年 11 月 29 日. 大阪大学医学部. 大阪府・吹田市.
4. 近藤友宏、中森健人、武下愛、日下部健、岡田利也. CF#1 系由来遺伝性水晶体破裂 (CF#1/lr) マウスに関する研究: 原因遺伝子の探索. 第 53 回日本先天異常学会学術集会. 2013 年 7 月 21 日~7 月 23 日. 大阪千里ライフサイエンスセンター. 大阪府・豊中市.
5. 近藤友宏、中森健人、武下愛、三野将城、日下部健、岡田利也. CF#1 系由来遺伝性眼白濁マウスに関する研究. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 9 月 14 日~9 月 16 日. 岩手大学. 岩手県・盛岡市.
6. 中森健人、岡田利也、武下愛、三野将城、日下部健、近藤友宏. CF#1 系由来遺伝性水晶体破裂マウスに関する研究: 交雑実験及び遺伝解析. 第 52 回日本先天異常学会学術集会. 2012 年 7 月 6 日~7 月 8 日. 東京女子医科大学弥生記念講堂. 東京都・新宿区.
7. 岡田利也. 白内障モデルマウスの遺伝解析. 第 51 回日本白内障学会総会. 2012 年 6 月 14 日~6 月 17 日. 東京国際フォーラム. 東京都・千代田区.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 利也 (OKADA TOSHIYA)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号: 00169111

(2)研究分担者

向本 雅郁 (MUKAMOTO MASAFUMI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：80231629

中川 博史 (NAKAGAWA HIROSHI)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教  
研究者番号：60336807

近藤 友宏 (KONDO TOMOHIRO)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教  
研究者番号：40585238

(3)連携研究者

松山 聡 (MATSUYAMA SATOSHI)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：10254442