

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893239

研究課題名(和文) アトピー白内障発症関連遺伝子の探求

研究課題名(英文) Investigation for the causative genes for atopic cataracts

研究代表者

堀 寛爾 (Hori, Kanji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30529227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー白内障は、青年期の罹患者に対して白内障手術の施行を余儀なくさせる疾患であり、調節力の喪失や網膜剥離の合併といった問題を引き起こす。本研究ではアトピー白内障の手術時に得られた線維化を伴う水晶体前囊組織を用いて、網羅的遺伝子発現解析を施行し、新たなアトピー白内障関連遺伝子の検出を目的に研究を遂行した。

その結果、炎症性サイトカインIL-8、細胞外マトリックスであるペリオスチン、ならびに脂質代謝関連遺伝子Xの発現がアトピー白内障の水晶体前囊組織において亢進していることを発見した。これらの遺伝子は将来的にアトピー白内障の発症予防あるいは治療のターゲットとなりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Atopic cataracts occurs in young atopic patients and often require cataract surgeries to restore their visual functions. Cataract surgery at young age deprived their accommodative functions, and it sometimes accompany other complications like atopic retinal detachments. In this study, we carried out genome wide expression analysis of the fibrotic anterior lens capsules obtained from atopic cataract patients and compared to the specimens obtained from senile cataract patients. We found significantly higher expression of an inflammatory cytokine-interleukin-8 (IL-8), and of an extracellular matrix-periostin expression in the anterior lens capsules obtained from atopic cataract patients. We also find significant up regulation of gene 'X' (which have known roles for lipid metabolism). We supposed these genes might be some potential targets for the prevention and therapy of atopic cataract.

研究分野：眼科学

キーワード：アトピー 白内障

### 1. 研究開始当初の背景

アトピー白内障は、青年期の罹患者に対して白内障手術の施行を余儀なくさせる疾患であり、調節力の喪失や網膜剥離の合併といった問題を引き起こす。我々の研究グループはアトピー白内障の患者対照相関研究から、IFNGR1 遺伝子プロモーター上で同遺伝子の発現量を増加させる遺伝子多型を持つ場合に発症のリスクが増加すること(Matsuda A et al. IOVS 48:583-589, 2007)また、IFNG シグナル下流にあって、プロテアーゼインヒビターである PAI-1 分子がアトピー白内障において高発現していること、さらに水晶体上皮細胞が PAI-1 の発現によって筋線維芽細胞に転換(EMT)をすることが、アトピー白内障の発症に関連していることを報告してきた。(Hori K et al. IOVS 53:1846-1851, 2012)

我々の研究グループは、多数のアトピー眼症の患者を日常的に診察しており、臨床的な観察と患者サンプルの収集・解析を進めている。一方で、分子生物学的な手法や実験生物学的な解析手法も取り入れた研究を行っており、これまでのアトピー白内障の病態研究を土台にして、網羅的遺伝子解析手法とノックアウトマウスを用いた機能解析、さらには免疫電顕の手法を導入したアトピー白内障の病態生理研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では TGF- $\beta$ 1, PAI-1 とアトピー白内障の発症の関連を PAI-1 ノックアウトマウスの水晶体を用いて解析する。また、アトピー白内障の手術時に得られた線維化を伴う水晶体前囊組織を用いて、網羅的遺伝子発現解析と網羅的 miRNA 発現解析を施行し、新たなアトピー白内障関連遺伝子の検出ならびに miRNA 発現と水晶体での EMT の関連を明らかにする。アトピー白内障の病態生理を深く探求することで、発症予防に向けての基礎的データを収集することを目的に本研究を遂行する。本研究は、アトピー白内障の病態の一端を明らかにすることで、将来的な疾患の予防を目標にすえた研究であり、臨床的な意義も考慮して研究を推進してきた。一方、水晶体は水晶体上皮細胞のみから構成される組織であり、他の細胞の混入が無いことから、EMT 現象の評価には最適な組織であり、水晶体の EMT 現象に関わる組織の網羅的遺伝子発現解析は EMT 研究のモデルケースとして他の学問領域への貢献も目指して研究を進めてゆく。

### 3. 研究の方法

1. **PAI-1 KO および対照マウスの水晶体を用いた水晶体上皮細胞の器官培養**: 摘出したマウス水晶体をそのまま、あるいは水晶体前囊を剥離して器官培養を施行する。EMT 誘導の陽性コントロールとしてリコンビナント TGF- $\beta$ 1 を用いる。まずは PAI-1 の有無

が TGF- $\beta$ 1 の存在下における EMT 現象の誘導にどのような影響を与えるかを、超微形態と EMT 現象のマーカーである  $\alpha$ -SMA および E-cadherin 発現量(タンパクおよび遺伝子レベル)の変化を指標に検討する。

2. **アトピー白内障の病理組織における PAI-1 免疫電顕解析**: アトピー白内障発症における PAI-1 分子が果たす役割を超微形態の手法を用いて解析する。PAI-1 の局在が EMT を生じている細胞のどのような部位にみられるのかを精密に明らかにする。例えば、水晶体上皮細胞が有する細胞極性の喪失、細胞遊走と PAI-1 局在の関連、細胞内あるいは細胞周囲のどの位置に PAI-1 が発現しているのか、他のマトリックスとの位置関係を精査する。

3. **アトピー白内障患者からの臨床サンプル収集および網羅的遺伝子発現解析**: アトピー白内障患者の白内障手術時に臨床サンプル(前房水、前囊組織)を収集する。採取した前房水サンプルは液体窒素下で急速凍結し、解析までそのまま液体窒素下で保存する。前囊組織は RNA 保存液を用いて保存する。前囊組織からは RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析(アフィメトリクス社マイクロアレイを用いる)を施行する。対照群として、加齢性白内障手術時に得られた前囊混濁のない水晶体前囊組織を用いる。

4. **アトピー白内障前囊組織での miRNA 発現解析**: アトピー白内障の前囊から miRNA を抽出し、網羅的 miRNA 発現解析(agilent 社のマイクロアレイを用いる)を施行する。miRNA は専用の抽出カラムを用いて精製し、実際のアレイ解析は共同研究先において施行する。

5. **アトピー白内障発症に関連する遺伝子・シグナル経路のタンパクレベルにおける検証**: 前囊組織の網羅的遺伝子発現解析の結果から、アトピー白内障の前囊組織で発現が上昇している遺伝子(あるいはシグナル経路)について、タンパクレベルで検証する。具体的にはアトピー白内障前囊組織を用いた免疫組織染色および前房水のウエスタンブロット法による発現解析を行う。

6. **培養ヒト水晶体上皮細胞を用いて、アトピー白内障関連遺伝子ならびに関連 miRNA を強制発現またはノックダウンで制御した際の  $\alpha$ -SMA および E-cadherin 発現量の変化**: 培養ヒト水晶体上皮細胞に対するトランスフェクションは既に方法論を確立している。候補遺伝子は PCR 法を用いて cDNA ライブラリーから哺乳類細胞発現ベクター-pEF6 のシステムにサブクローニングして使用する。遺伝子ノックダウンは合成オリゴヌクレオチドを用いた siRNA/miRNA のトランスフェクションにより施行する。各々の効率を realtime PCR 法にて確認した後に、水晶体上皮細胞の上皮細胞マーカーである E-cadherin 発現と線維化(EMT)のマーカーである  $\alpha$ -SMA 発現を定量して、関連遺伝子および miRNA の役割を評価する。EMT 現象との関連が示唆される遺

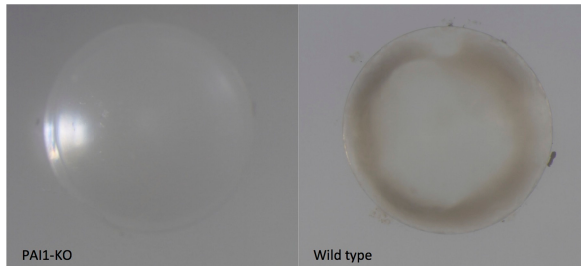
伝子については、マウス水晶体器官培養の系で、白内障の表現型への影響を評価する。

**7. PAI-1 阻害低分子化合物の効果検討:** PAI-1 分子には既にいくつかの阻害剤が開発されており、そのうち入手が可能な Tiplaxtinin と T1776Na を用いた EMT 抑制実験を試行する。マウス水晶体器官培養系を利用した TGF-刺激による白内障誘発モデルにこれらの PAI-1 阻害剤を加えることで、EMT および白内障の発症の予防効果がみられるかを検証する。

#### 4. 研究成果

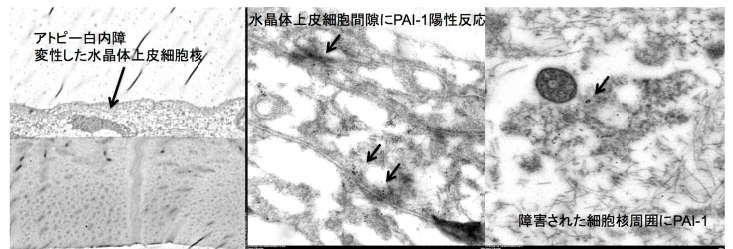
**1. PAI-1 KO および対照マウスの水晶体を用いた水晶体上皮細胞の器官培養:** PAI1 KO マウス由来の水晶体は 10ng/ml TGFβ1 添加の器官培養においても水晶体の透明性を維持することが出来た。一方、野生型マウス由来の水晶体は同条件の器官培養で白内障の発症を認めた。この結果は我々のヒトサンプルを用いた解析に一致するもので、PAI1 分子がアトピー白内障の治療ターゲットになりうることを示している。(図 1)

図 1 PAI-1 欠損マウス由来の水晶体は TGF-beta1 誘発白内障に耐性をもつ



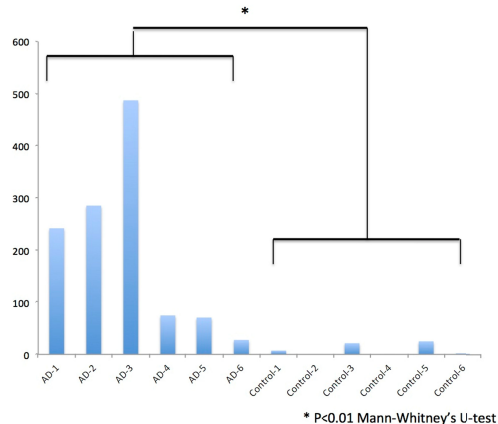
**2. アトピー白内障の病理組織における PAI-1 免疫電顕解析:** アトピー白内障発症における PAI-1 分子が果たす役割を免疫電顕の手法を用いて解析した。アトピー白内障の手術時に採取した水晶体前囊のサンプルを用い、PAI-1 免疫電顕を施行した。抗体は R&D 社製の抗ヒト PAI-1 抗体を用い、固定液の組成に試行錯誤を繰り返した。すなわち、グルタルアルデヒドを加えると抗原性が大幅に低下するため、パラホルムアルデヒド主体の固定液を用いた解析を施行した。そのため超微形態には固定が不十分な像が散見される。結果として、PAI-1 分子は EMT を生じている細胞が移動する方向の先端において、主に細胞間隙に発現しており、細胞遊走との関連が示唆された(図 2)。また変性した水晶体上皮細胞核周囲にも PAI-1 陽性顆粒を認め、細胞障害に伴い細胞内にも PAI-1 が蓄積、細胞死に伴って細胞外に放出される可能性が示唆された。

図 2 アトピー白内障前囊サンプルの PAI-1 免疫電顕解析

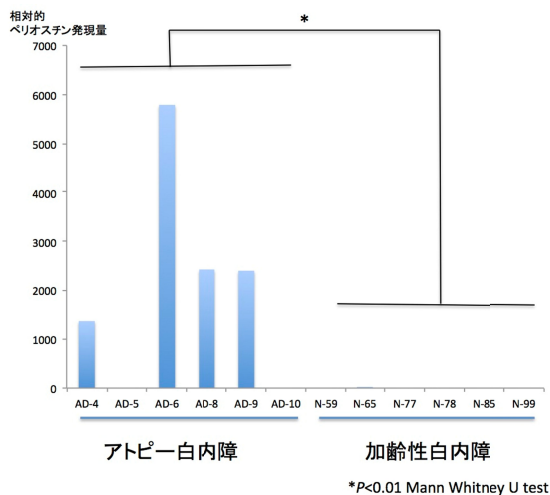


**3. アトピー白内障患者からの臨床サンプル収集および網羅的遺伝子発現解析:** アトピー白内障患者の白内障手術時に臨床サンプル(前房水、前囊組織)を収集した。前囊組織からは RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析(アジレント社マイクロアレイを用いた)を施行した。対照群として、加齢性白内障手術時に得られた前囊混濁のない水晶体前囊組織を用いた解析を同時に施行した。サンプルから RNA を採取する際に前囊の線維化が妨げになり、抽出のために種々の試行錯誤を要した。最終的にプロテイナーゼ K を用いたタンパク消化を加えることで、効率よく RNA 抽出が可能となった。また、得られた RNA がアレイ解析の必要量の下限値であったため、遺伝子増幅のステップを加えたアレイ解析を施行した。結果として、アトピー白内障群 2 例、健常対照群 2 例で解析を施行し、アトピー白内障サンプルで 5 倍以上の発現上昇を認めた 12 遺伝子、および 5 倍以上の発現低下を認めた 30 遺伝子に関して、サンプル数を増やしてリアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現解析を施行している。中でも 20-30 倍の発現上昇を認めた脂質代謝関連遺伝子 X にターゲットとして、現在タンパクレベルでの検証を遂行している。また炎症性サイトカイン IL-8(図 3)および細胞外マトリックス・ペリオスチン(図 4)についても有意な発現上昇を認めている。今後データがまとまり次第、学会および論文で発表予定である。

図 3 アトピー白内障患者由来前囊サンプル



では IL-8 の発現が有意に亢進している  
 図 4 アトピー白内障患者由来前囊サンプルでは細胞外マトリックス・ペリオスチンの発現が有意に亢進している



#### 4. アトピー白内障前囊組織での miRNA

**発現解析:** アトピー白内障患者由来の前囊組織から miRNA 抽出を試みたが、解析に耐えうる十分量の miRNA を抽出することができなかった。市販の miRNA 抽出キットを用いて、いくつかの条件を試したが、結果的にサンプルの量的な問題から解析困難であった。

#### 5. アトピー白内障発症に関連する遺伝子・シグナル経路のタンパクレベルにおける検証:

上述の脂質代謝関連遺伝子に関してマウス抗 X モノクローナル抗体を用い、アトピー白内障患者由来の前囊組織 5 サンプルに対して免疫組織染色を施行した。前囊にみられる線維化部位に一致して抗 X タンパクの沈着を全例に観察することが出来た。一方対照として観察した加齢性白内障患者由来の前囊組織には抗 X タンパクの沈着を認めなかった。今後更なる機能解析を進めてゆき、学会・論文等で発表してゆく予定である。

#### 6. 培養ヒト水晶体上皮細胞を用いて、アトピー白内障関連遺伝子を強制発現またはノックダウンで制御した際の -SMA および E-cadherin 発現量の変化:

プラスミドベクターを用いて PAI-1 遺伝子を水晶体上皮細胞に強制発現させると -SMA 遺伝子の発現量の増大を確認することが出来たが、形態学的な変化は確認することが出来なかった。これは、強制発現の効率が悪いことと、一過性の強制発現のため、表現型を把握するに至らなかったのが原因と考え、現在レンチウイルスを用いた強制発現系を構築中である。また上述の脂質代謝関連遺伝子 X に関して強制発現系を構築している。

**7. PAI-1 阻害低分子化合物の効果検討:** 上述の入手可能な阻害剤をマウス水晶体上皮細胞の器官培養系に添加したが、細胞障害を生じない濃度では明らかな EMT 阻害効果を認めなかった。他の阻害剤の入手を現在交渉中である。

#### 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)

Iwamoto S, Asada Y, Ebihara N, Hori K, Okayama Y, Kashiwakura JI, Watanabe Y, Kawasaki S, Yokoi N, Inatomi T, Shinomiya K, Murakami A, Matsuda A. Interaction between conjunctival epithelial cells and mast cells induces CCL2 expression and piecemeal degranulation in mast cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54:2465-2473. (査読あり) doi: 10.1167/iovs.12-10664.

[学会発表](計 1 件)

Akira Matsuda, Kanji Hori, Waka Ishida, Ken Fukuda, Nobuyuki Ebihara, Yousuke Asada, Susumu Nakae, Atsuki Fukushima, Akira Murakami. The role of interleukin-33 (IL-33) in mouse experimental allergic conjunctivitis. 2013 Keystone Symposia Type 2 Immunity : Initiation, maintenance, homeostasis and pathology Jan 10-15, Santa Fe. New Mexico USA, 2013

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀 寛爾 (HORI, Kanji)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：30529227

### (2) 研究協力者

松田 彰 (MATSUDA, Akira)  
順天堂大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：00312348