

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861461

研究課題名(和文) 膠様滴状角膜ジストロフィにおけるタイトジャンクション構成機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism constructing a tight junction in GDLD cornea

研究代表者

中司 美奈 (Nakatsukasa, Mina)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：70614022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膠様滴状角膜ジストロフィ(GDLD)と類似した臨床像を示す二次性角膜アミロイドーシスの角膜は、TACSTD2、CLDN1、CLDN7のいずれも発現しており、角膜へのアミロイド沈着のメカニズムがGDLDと異なる可能性がある。

GDLD患者由来の不死化角結膜上皮細胞では正常由来細胞と比べると、PKC- $\delta$ の発現が上昇しており、TACSTD2遺伝子を導入すると、CLDN1、CLDN7の発現が回復し、PKC- $\delta$ の発現が低下した。さらに、PKC- $\delta$ 阻害剤処理により、GDLD細胞でのPKC- $\delta$ の発現が低下し、CLDN1の発現がわずかに回復した。以上の結果から、GDLDの病態においてPKC- $\delta$ の関与が示された。

研究成果の概要(英文)：In the cornea of secondary corneal amyloidosis which indicates a clinical image similar to gelatinous drop like dystrophy (GDLD), TACSTD2, CLDN1 and CLDN7 proteins were found, which suggests the possibility that a mechanism of amyloid deposition to cornea of secondary corneal amyloidosis is different from GDLD.

The expression level of PKC- $\delta$  in immortalized human GDLD corneal epithelial cells (iHGCEpi) and immortalized human GDLD conjunctival epithelial cells were highly expressed compared to corneal and conjunctival epithelial cells derived from a normal patient. And the expression level of CLDN1 and CLDN7 proteins in iHGCEpi was recovered after the transduction of TACSTD2 gene, while PKC- $\delta$  was significantly decreased by transducing of TACSTD2 gene.

Further, the expression level of PKC- $\delta$  was decreased, and CLDN1 and CLDN7 were recovered in iHGCEpi by the treatment of PKC- $\delta$  inhibitor. In summary, relationship of PKC- $\delta$  was indicated in the pathological process of GDLD.

研究分野：角膜

キーワード：膠様滴状角膜ジストロフィ TACSTD2 CLDN1 CLDN7 タイトジャンクション PKC- $\delta$  二次性角膜アミロイドーシス

## 1. 研究開始当初の背景

膠様滴状角膜ジストロフィ (Gelatinous drop-like dystrophy; GDLD) は、TACSTD2 (Tumor-associated calcium signal transducer 2) 遺伝子の変異によって、角膜上皮バリア機能が破綻し、角膜上皮、角膜実質に涙液中のアミロイドが沈着する疾患である。我々は、TACSTD2 が CLDN (claudin) 1 および CLDN 7 と直接結合し、角膜上皮におけるタイトジャンクションの形成にとって必須の分子であることを示してきたが、TACSTD2 と CLDN タンパクがどのような分子結合をしているのかは依然不明である。一方で、今まで GDLD 角膜において TJP1 や Occludin といったタイトジャンクション関連タンパクの発現がないとされていたが、我々の実験では正常角膜に比べて発現量が低下しているものの TJP1 の存在を認めた。さらに GDLD 患者からの不死化角膜上皮細胞の樹立に成功しているが、この不死化角膜上皮細胞においても細胞境界に TJP1 や occludin が存在していることがわかっている。

## 2. 研究の目的

今回、膠様滴状角膜ジストロフィにおけるタイトジャンクション形成状態についてさらに詳細に検討し、膠様滴状角膜ジストロフィの病態を解明することを目的とする。また、類似の臨床像を呈する二次性角膜アミロイドシスについても病態解明を目的とし、この二疾患の類似点、相違点から、角膜におけるタイトジャンクションの特殊性について解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 二次性角膜アミロイドシスにおけるタイトジャンクション関連タンパクの発現について

二次性角膜アミロイドシスについて、タイトジャンクション関連タンパクである TJP1 や Occludin に対する抗体を用いてタンパク

発現を調べる。また、GDLD 角膜では発現低下している TACSTD2 や CLDN タンパクの発現状態を調べる。

### (2) GDLD 患者由来の不死化角膜上皮細胞、不死化結膜上皮細胞における3次元培養の検討

我々は、GDLD 患者より得られた角膜上皮細胞、結膜上皮細胞を用いて、SV40 large T 抗原遺伝子と hTERT 遺伝子の導入によって角膜上皮細胞、結膜上皮細胞を不死化することに成功しており、これらの細胞を用いて重層化を試みる。重層に成功すれば、フリーズフラクチャー電子顕微鏡検査を行い、タイトジャンクション形成状態を確認する。

### (3) GDLD 患者由来不死化細胞と正常不死化細胞を用いて、PKC- の発現を検討

GDLD 患者由来の不死化角膜上皮細胞と正常不死化角膜上皮細胞、また GDLD 患者由来の不死化結膜上皮細胞と正常不死化結膜上皮細胞を用いて、細胞内における様々なシグナル伝達に関与しており、タイトジャンクションの制御に関係があるタンパク質リン酸化酵素である PKC- の mRNA レベルとタンパク発現レベルを調べる。

### (4) 不死化 GDLD 角膜上皮に wild type TACSTD2 を遺伝子導入し、PKC- の発現を検討

GDLD 患者由来の不死化角膜上皮細胞に wild type TACSTD2 を遺伝子導入すると CLDN1 および CLDN7 のタンパク発現が改善することを以前に報告しており、遺伝子導入後に PKC- の発現変化がおこるかを検討する。

### (5) PKC- 阻害剤を加えて、CLDN1、CLDN7 のタンパク発現を検討

PKC- の発現変化を考慮して、阻害剤を用いる事で CLDN1 および CLDN7 の発現変化を検討し、臨床応用への可能性を検討する。

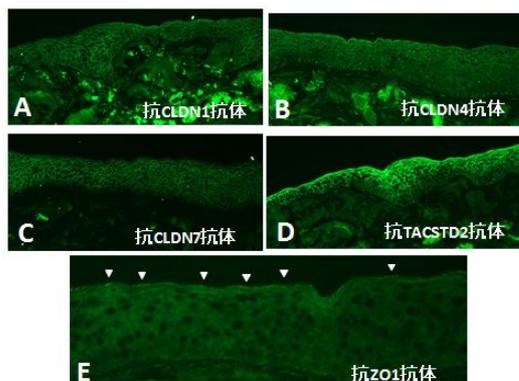
## 4. 研究成果

### (1) 二次性角膜アミロイドシスにおけるタイトジャンクション関連タンパクの発現について

二次性角膜アミロイドシスにおいて、CLDN1, CLDN4, CLDN7, 及び TACSTD2 は、アミロイド沈着部、非沈着部ともに角膜上皮全層

の細胞境界に存在していた。TJP1 はアミロイド沈着部、非沈着部ともに角膜上皮のアピカルに存在していた。

以上の結果から、アミロイド沈着のメカニズムが GDLD と異なる可能性が示唆された。



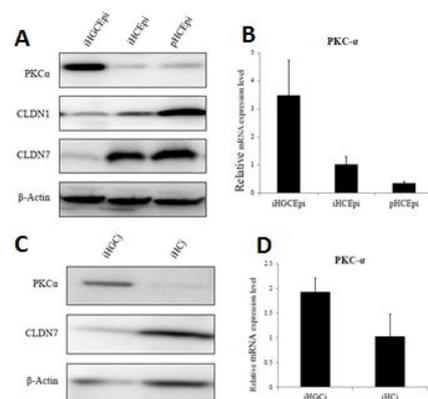
- A : 二次性角膜アミロイドーシスの角膜における抗CLDN1抗体による免疫染色
- B : 抗CLDN4抗体による免疫染色
- C : 抗CLDN7抗体による免疫染色
- D : 抗TACSTD2抗体による免疫染色
- E : 抗TJP1抗体による免疫染色

### (2) GDLD患者由来の不活化角膜上皮細胞、不活化結膜上皮細胞における3次元培養の検討

不活化細胞を用いて3D培養を試みたが、既存の培養方法では重層化させることができなかったため、2D培養での解析をおこなった。2D培養において、GDLD患者由来の角膜および結膜上皮細胞はいずれもCLDN1およびCLDN7の発現が低下していた。

### (3) GDLD患者由来不活化細胞と正常不活化細胞を用いて、PKC- の発現を検討

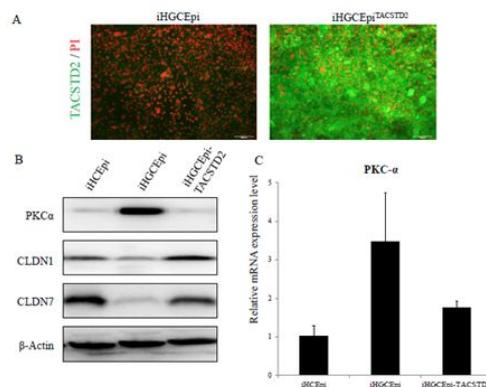
GDLD患者由来の不活化角膜上皮細胞と正常不活化角膜上皮細胞、またGDLD患者由来の不活化結膜上皮細胞と正常不活化結膜上皮細胞を用いて、PKC- のmRNAレベルとタンパク発現レベルを検討したところ、角膜および結膜ともに、GDLD患者由来の細胞では正常由来の細胞と比べると、PKC- の発現が上昇していた。これはタンパク発現レベルでも同様の結果であった。



- A : Western blotting; 不活化GDLD角膜上皮 (左)、不活化正常角膜上皮 (中央)、初代培養角膜上皮 (右)
- B : mRNAレベルでのPKC- 発現 (角膜)
- C : Western blotting; 不活化GDLD結膜上皮 (左)、不活化正常結膜上皮 (右)
- D : mRNAレベルでのPKC- 発現 (結膜)

### (4) 不活化 GDLD 角膜上皮に wild type TACSTD2 を遺伝子導入し、PKC- の発現を検討

GDLD 患者由来の wild type の TACSTD2 遺伝子を導入し、PKC- の発現を検討したところ、遺伝子導入で CLDN1 および CLDN7 の発現が回復するとともに、PKC- の発現が低下し、PKC- が CLDN1 および CLDN7 の発現制御に関わっている可能性が示唆された。

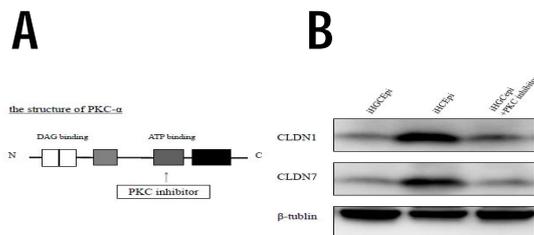


- A : wild type TACSTD2 の遺伝子導入後の TACSTD2 の免疫染色
- B : western blotting ; 不活化正常角膜上皮 (左) 不活化 GDLD 角膜上皮 (中央) 不活化 GDLD 角膜上皮+TACSTD2 遺伝子導入後
- C : mRNA での PKC- 発現変化

### (5) PKC- 阻害剤を加えて、CLDN1、CLDN7

## のタンパク発現を検討

PKC- 阻害剤処理後 24 時間で、GDL D 細胞での PKC- の発現レベルが低下し、CLDN1 の発現がわずかに回復した。以上の結果から、GDL D の病態において、PKC- の関与が示され、PKC- 阻害剤が GDL D の治療薬の候補となる可能性が示唆された。



A : PKC- の構造

B : Western blotting : 不死化正常角膜上皮 (左) 不死化 GDL D 角膜上皮 (中央) 不死化 GDL D 角膜上皮+ PKC- 阻害剤

## 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 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

1 . 永原祐紀子、辻川元一、瀧川徹、甲斐千舟、徐鵬、川崎諭、中司美奈、稲富勉、西田幸二 . 膠様滴状角膜ジストロフィにおける新規 TACSTD2 遺伝子変異の同定とその病原性の検討 . 第 4 1 回日本角膜学会総会 2 0 1 7 年 2 月 1 6 日 ~ 2 0 1 7 年 2 月 1 8 日 福岡 日本

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 0 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

中司 美奈 ( MINA NAKATSUKASA )  
京都府立医科大学医学部付属病院・客員講師  
研究者番号 : 70614022