

分子細胞生物学研究部

部長 岩田 岳

平成22年度はこれまで数年間にわたって研究してきた内容をインパクトのある科学雑誌に投稿できたことである。国立病院機構、厚生労働省、文部科学省、喫煙科学財団、企業からの研究費を用いて緑内障、加齢黄斑変性、オカルト黄斑ジストロフィーに関する基礎・臨床研究を行った。

1) オカルト黄斑ジストロフィー (三宅病) の原因遺伝子解明

今から20年前に日本人眼科医によって発見された家族性黄斑症の一種であるオカルト黄斑ジストロフィー (Occult Macular Dystrophy) の原因遺伝子が、感覚器センターと東京大学医学部神経内科 (辻 省次教授) との共同研究によって解明された。オカルト黄斑ジストロフィーは1989年に眼科医三宅養三 (前感覚器センター長、現愛知医大理事長) によって発見された家族性の網膜疾患で、網膜中心部 (黄斑部) の機能が徐々に傷害され両眼の視力が低下する。これまで原因が分かっておらず治療法も存在しなかった。また本疾患は他の黄斑ジストロフィーと異なり黄斑部が全く正常に見えるため、その診断には黄斑部局所網膜電図という特殊な装置が必要であり、視神経疾患、弱視など他の眼疾患と誤診されるケースが多い。国内における患者家族の疾患調査を行い、辻教授によって開発された SNP HiTLink 法を用いて原因遺伝子が染色体8番短腕にあることが明らかにされた。この領域に存在する128遺伝子の中から RP1L1 遺伝子に R45W と W960R のアミノ酸置換が発見された。RP1L1 遺伝子は網膜の視細胞 (錐体細胞と桿体細胞) に発現するタンパク質で、網膜色素変性の原因遺伝子である RP1 とアミノ酸配列の相同性がある。これまでの研究から、2つのタンパク質は相互作用しながら視細胞の構造や細胞内輸送に関与していると推測される。黄斑における視細胞の構造は周辺網膜とは異なり、細長く、密に存在しており、オカルト黄斑ジストロフィーの患者では細胞の構造に異常があるとの報告もある。黄斑は視力を決定する重要な部位であり、高い視力を獲得した霊長類や一部の鳥類にしか存在しない。RP1L1 の機能が解明されることにより、黄斑の特徴が明らかになり、適切な治療法の開発に役立つと考えられる。今回は遺伝性感覚器疾患の原因遺伝子をポジショナルクローニング法 (候補となる遺伝子が無い状態でクローニングに成功すること) によって、日本人のみで解明した初めてのケースとなった。感覚器疾患の発見者が原因解明に関わった世界的にも珍しいケースでもある。日本人が発見した数少ない感覚器疾患の原因を解明できたことは幸運であった。この研究成果は米国遺伝学雑誌の *The American Journal of Human Genetics* 2010 に発表された。

2) 3種類の緑内障マウスモデルの作製とその解析

緑内障は視神経萎縮による神経乳頭陥凹を特徴とし、失明原因として最も多い眼疾患である。緑内障には単独遺伝子の変異によって発症するものが知られており、この15年間の間にミオシリン、オプチニューリン、WDR36、ニュートロフィン4の4遺伝子が報告されている。我々はこの中からオプチニューリンとWDR36に注目し、その遺伝子変異による発症メカニズムを遺伝子改変マウスの作製によって研究した。オプチニューリンおよびWDR36について、患者で観察された遺伝子変異を高発現させるトランスジェニックマウスを作製し、その病理学的解析を行った。眼底観察、眼圧の測定そして眼球切片を用いた各種免疫染色によって網膜周辺における視神経細胞とその周辺の細胞に障害が観察された。オプチニューリンの遺伝子変異による視覚障害は視細胞から始まり、神経節細胞の萎縮と進行するが (Chi, Akahori et al, Hum Mol Genet 2010)、WDR36 遺伝子変異はその逆で神経節細胞の萎縮から視細胞へと進行することが明らかになった (Chi et al, Hum Mol Genet 2010)。また、オプチニューリンはオートファジーにも関連していることが明らかとなった (Shen, Chi, Iwata et al, JBC 2010)。ヒトとマウスの眼球構造は大きく異なる部分もあるが、本研究によって両遺伝子による緑内障の診断方法について改良が必要なこと、このマウスが新たな治療法の開発に有効であることが示唆された。また、隅角閉塞緑内障 (牛眼) マウスモデルとして、Vav2/Vav3 遺伝子のダブルノックアウトマウスについて北海道大学と共同研究した結果、毛様体および線維柱帯の発育不良によって、隅角が閉塞し、眼圧上昇による網膜の肥大と伸長による網膜全体の萎縮が観察された (Fujikawa, Iwata, Akahori et al, PLOS One 2010)。

3) 若年性と加齢性の黄斑変性カニクイザルの解析

加齢黄斑変性は米国では失明率の最も高い眼疾患であり、日本でも高齢化によって、患者数は急増しており、その原因解明と予防・治療法の開発が急がれている。黄斑は高い解像度の視力を獲得した霊長類で発達しており、通常の実験に使用される夜行性のゲツ歯類 (マウス、ラット等) には存在しない。当研究部では遺伝子変異によって生後2年でドルーゼンが観察される世界で唯一の霊長類モデル (Umeda et al, IOVS 2005, Umeda et al, FASEB J 2005) を使って、加齢黄斑変性の初期における網膜下の状況を分子レベルで研究してきた。現在の加齢黄斑変性の治療法は主に病気の末期に現れる血管新生の抑制に絞られており、我々はこの霊長類モデルを使ってより早い時期における予防法の開発を行っている。本研究では、遺伝性黄斑変性カニクイザル疾患個体と正常個体から網膜色素上皮細胞 (RPE 細胞) を初代培養し、マーカー蛋白の免疫染色及びマイクロアレイ、プロテオーム解析によって遺伝子、蛋白発現の比較を行った。11歳と14歳の正常個体及び黄斑変性を発症する17歳 (重症) と19歳 (軽症) からそれぞれ RPE 細胞を分離し、初代培養を行った。眼底写真、ERG、蛍光眼底などの臨床所見に基づいて重症と軽症に分類した。遺伝子と蛋白解析には Passage 3 の細胞を使用した。増殖アッセイ、免疫染色、マイクロアレイ、二

次元電気泳動による解析を行った。正常個体及び軽症個体から培養された RPE 細胞に比べて重症個体の RPE 細胞は顕著に増殖能が低下していた。また、RPE 細胞のマーカーでタイトジャンクションの構成蛋白質である Zonula Occludens-1 (ZO-1) の発現量が疾患個体において顕著に減少し、重症個体では発現がほぼ認められなかった。さらに、初代培養 RPE 細胞におけるマイクロアレイではそれぞれ発現増加と低下が見られた。2 次元電気泳動では明らかに異なる発現パターンが得られた。今回初めて疾患個体の RPE 細胞が初代培養され、ZO-1 の発現が病態の進行に伴って減少していることが明らかになった。加齢黄斑変性症の発症メカニズムとして RPE 細胞のバリアー機能の低下はこれまで示唆されてきたが、今回黄斑を持つ霊長類モデルにおいてこの事実が確認された。マイクロアレイ解析で発現変化のあった遺伝子については、ドルーゼン生成及び RPE 細胞死との関係を含む更なる機能解析を行っている。

4) 加齢黄斑変性の予防法の開発

我々含む内外の研究によって加齢性黄斑変性症の原因遺伝因子として HTRA1 や ARMS2 遺伝子、さらに C3、C5、FB、CFI、CFH などの補体系タンパク質の関与が明らかになってきた。我々は補体抑制剤による予防・治療効果を検証するために、黄斑変性カニクイザルを用いて、硝子体投与による実験を行った。補体抑制薬はアメリカのベンチャー製薬会社から提供され、週に一回(50 μ g/100 μ l)、1 年間にわたって硝子体投与が行われた。毎月眼底写真が記録され、その評価が行われた。その結果、補体抑制薬を投与された疾患サルのだルーゼン(疾患に特徴的な黄斑に蓄積する物質)が徐々に消失することが観察された。現在はさらに改良された補体抑制薬を硝子体投与しており、その効果について解析が行われている。加齢性黄斑変性症の新たな予防・治療薬として、世界的に注目されている。

5) 加齢黄斑変性個別化医療

京都大学、神戸大学、埼玉大学、そして感覚器センターが中心となって、さらに 10 施設が参加して、これまで発見された加齢黄斑変性と相関する遺伝子多型と血管新生阻害薬の治療効果との関連で解析することになった。このプロジェクトは日本の加齢黄斑変性の研究において初めて複数の大学が共同で遺伝子解析を試みる。これらの施設の中で感覚器センターは臨床的な貢献だけでなく、症例情報システムの提供や DNA 抽出と管理など、このプロジェクトのインフラを支える重要な役割を担うこととなった。これまで国立病院機構の病院を中心に展開してきた感覚器ネットワーク共同研究事業から全国規模の研究へと拡大し、「皆の役立つ感覚器センター」へと評価が高まるように努力する次第である。

分子細胞生物学研究部スタッフ

部長		岩田 岳
流動研究員		赤堀 正和
流動研究員		岡本 はる
流動研究員		池 在龍
流動研究員		高田 雄一郎 (7月退部)
外部研究員	順天堂大学浦安病院眼科准教授	木村 至
外部研究員	慈恵医科大学眼科助教	大熊 康弘
外部研究員	順天堂大学眼科大学院生	小林 宏明
外部研究員	順天堂大学浦安病院眼科大学院生	田邊 和彦
客員研究員	京都大学大学院薬学研究科特定教授	内海 潤
客員研究員	東海大学医学部客員教授	笠口 隆重

オカルト黄斑ジストロフィー(OMD)の原因遺伝子解明

赤堀 正和¹、角田 和繁²、板橋 剛¹、岩田 岳¹

(¹分子細胞生物学研究部、²視覚生理学研究室)

要 約

オカルト黄斑変性症(OMD)は両眼の黄斑中心部の機能が徐々に障害される黄斑ジストロフィーであるが、これまでその発症原因は解明されておらず治療法も開発されていない。そこで、我々は、家族性 OMD の連鎖解析による疾患連鎖遺伝子座および原因遺伝子の同定をおこなった。

常染色体優性遺伝と考えられる国内の罹患者 12 名、健常者 6 名を含む 5 世代、罹患者 4 名、健常者 5 名を含む 3 世代 2 家系から末梢血を採取しゲノム DNA を精製した。Affymetrix 社 Genome-Wide Human SNP array 6.0 を用いて SNP タイピングし、Allegro プログラムを使用し、パラメトリック解析をおこなった。その結果、8p22-23 の領域が LOD スコア 3.77 を示した。8 番染色体のこの候補領域にある 128 遺伝子から後眼部に発現が認められる 22 遺伝子からまず 4 遺伝子について Exon 領域の塩基配列解析をおこなったところ、全ての疾患患者において、RP1L1 遺伝子の第 2Exon(c.362C>T)に 45 番目アルギニンがトリプトファンに置換される変異を発見した。次に 2 家系の家族性 OMD の罹患者について RP1L1 遺伝子の解析をおこなったところ、一方の家系の罹患者からは同様に c.362C>T を、他方の家系の罹患者からは新たに第 3Exon(c.3107T>C)に 960 番目のトリプトファンをアルギニンに置換する変異を見出した。RP1L1 はマウスでは視細胞桿体にのみ局在することが報告されているが、カニクイザルの網膜凍結切片を用いた免疫染色法をおこなったところ視細胞桿体に加え錐体にも存在することが示された。

今回本疾患の原因遺伝子を同定したことにより、今後、発症機序の解析および治療法の開発が進むことが期待される。また、通常の検査では診断が難しい本疾患の診断に RP1L1 遺伝子の解析が役立つものと考えられる。

目 的 (または研究目的)

1989 年に名古屋大学の三宅養三教授により発見されたオカルト黄斑ジストロフィー (OMD) は、網膜中心部の機能が徐々に低下し次第に視力が低下する疾患である。

OMD の特徴として、検眼鏡的所見、フルオレセイン蛍光眼底造影は末期まで正常であり、フルフィールド ERG も正常だが、中心部の錐体活性が著しく低下しているため確定診断は黄斑部局所 ERG もしくは多局所 ERG によってのみ行われる。このように、通常の眼底検査では異常が見つからず、確定診断には特殊な電気生理学的検査が必要になるため、弱視、視神経症、などと誤診されることが多い疾患である。

また、常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性 OMD も知られているが、原因遺伝子や発症機序は未だよく分かっていない。そこで今回の研究では、OMD 発症機構解明の第一歩として、連鎖解析による原因遺伝子の同定をおこなった。

対象および方法（または方法）

ゲノム DNA サンプル

まず佐渡島で発見された家系と愛知県の家系の調査をおこなった。発症者および非発症者は、黄斑部局所 ERG あるいは多局所 ERG による黄斑部機能の低下の有無で最終判定した。また、徐々に進行する疾患であることから、30 歳以下の非発症者は対象としなかった。その結果、発症・非発症ふくめ 27 名分の血液検体を収集した。各血液検体は新たに ID を付け直し、自動ゲノム DNA 精製装置（プレジジョン・システム・サイエンス社 Magratration System 8Lx）を用いてゲノム DNA の抽出精製をおこなった。

連鎖解析

2 家系 27 名分の DNA サンプルについて Affymetrix 社 Genome-Wide Human SNP array 6.0 を用いてゲノムワイドに 100 万 SNP のジェノタイピングをおこない、次に、SNP チップと連鎖解析プログラムのパイプラインである SNP HiTLink により連鎖解析に用いる SNP の選別およびフォーマットの調整をおこなった。Hardy-Weinberg p value > 0.001 、call rate = 1.0、maximum confidence score > 0.02 の SNP を抽出しタイピングエラーを起している可能性のある SNP を除去し、次に、日本人集団で minor allele frequency が 0 の SNP を除き、連鎖不平衡にある SNP が多点連鎖解析で不正確なロッドスコアになることを防ぐために約 100kb 間隔になるように SNP を選別した。連鎖解析プログラムは統合パッケージの一つである Allegro を用いた。常染色体優性遺伝を仮定し、パラメーターを age-dependent penetrance (0-20:0.19, 21-40:0.55, 41-:0.91)、disease frequency = 0.000001 とし、ノンパラメトリック連鎖解析をおこなった。

ダイレクトシーケンス

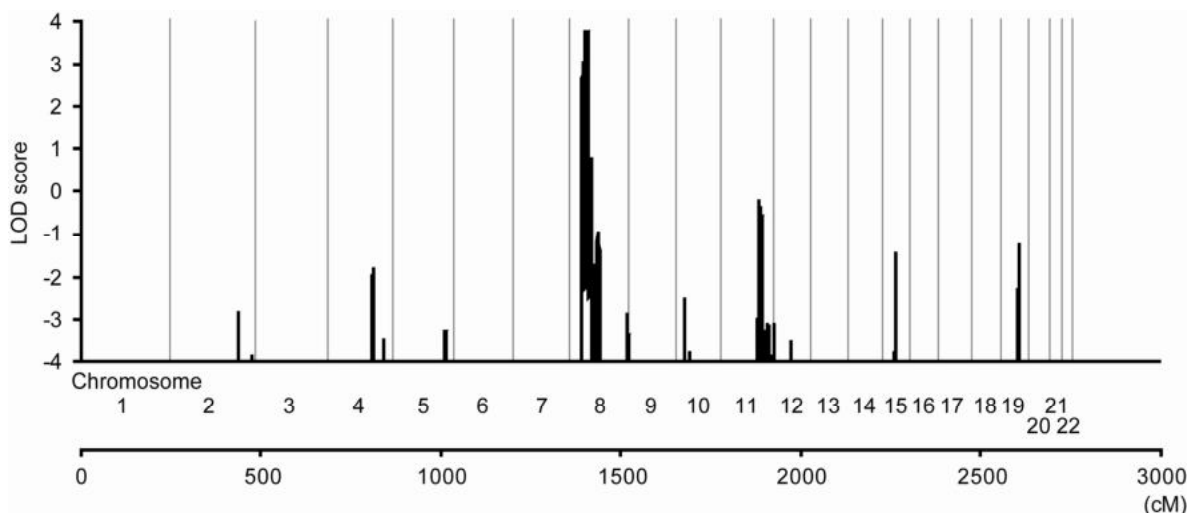
候補遺伝子について NCBI のゲノムデータベースを参考に全エクソンを増幅可能な PCR プライマーを設計し合成する。この PCR プライマーを用いて候補遺伝子のエクソン部分を PCR 増幅し、ミリポア社の MultiScreen PCR μ 96 Filter Plates を用いて PCR 増幅産物を精製した。得られた各 PCR 増幅産物に PCR 反応に用いたプライマーおよびシーケンスキット（ABI 社ビッグダイターミネーター ver3.1）を加えシーケンス反応を行い、エタノール沈殿法によりシーケンス反応産物の精製をおこなった。各シーケンス反応産物は ABI 社キャピラリーシーケンサー 3130xl を用いて解析し、解析波形は専用ソフトウェアを用いて塩基配列を決定した。

免疫染色

カニクイザル眼球は固定後、凍結切片を作製し、マーモセット眼球については、固定後パラフィン切片を作製した。カニクイザルは市販のヒト RP1L1 の N 末を抗原としたサンタクルーズ社抗 RP1L1 抗体を、マーモセットでは C 末を抗原としてウワギを免疫した抗血清を用いた。

結 果（または成績）

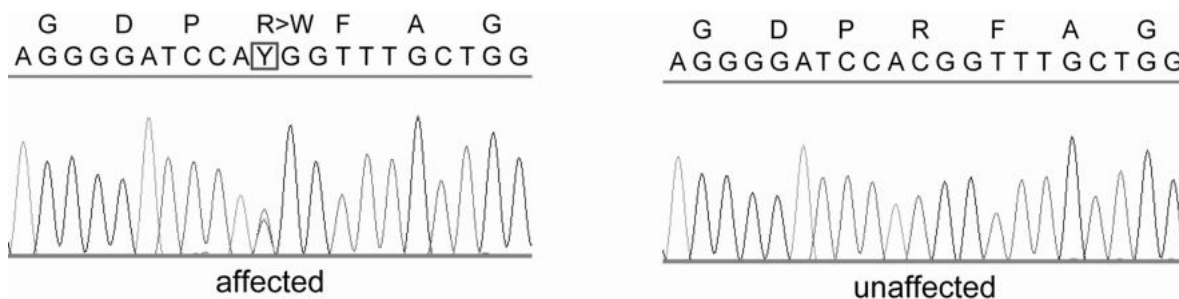
ノンパラメトリック連鎖解析



SNP を用いて全ゲノムでパラメトリック連鎖解析をおこなったところ、8 番染色体の短腕部分にマキシマムロッドスコア 3.77 が得られた。さらにこの領域の SNP タイピング結果を解析したところ、rs365309 と rs2632841 の間、約 10Mb の領域には罹患者で共通のハプロタイプをもっていたので、この領域を OMD 原因遺伝子の候補領域とした。

この約 10Mb の候補領域には発現が確認されている遺伝子が Ensemble Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) 上で 128 あることが分かった。この 128 遺伝子から、まず網膜あるいは神経細胞に発現が認められている 22 遺伝子に絞込み、この中から網膜疾患や神経疾患と関連する遺伝子を 4 遺伝子抽出し、次に、ダイレクトシーケンス法により、Exon シークセンス解析をおこなった。

ダイレクトシーケンス



3 遺伝子には特に疾患と関連した変異は認められなかったが、retinitis pigmentosa 1-like 1 (RP1L1)の第 2Exon に、45 番目のアルギニンをトリプトファンに置換するミスセンス変異を罹患者全員が共通してヘテロで持っていることを発見した。

dbSNP rs ID	Position	Family 1	Family 2
rs10086673	10,342,727	B	A
rs9329223	10,369,164	A	B
rs6601491	10,453,427	B	A
RP1L1 (Arg45Trp)	10,517,989	+	+
rs10097570	10,586,268	A	B
rs10111051	10,590,882	A	B
rs2163379	10,769,460	A	B

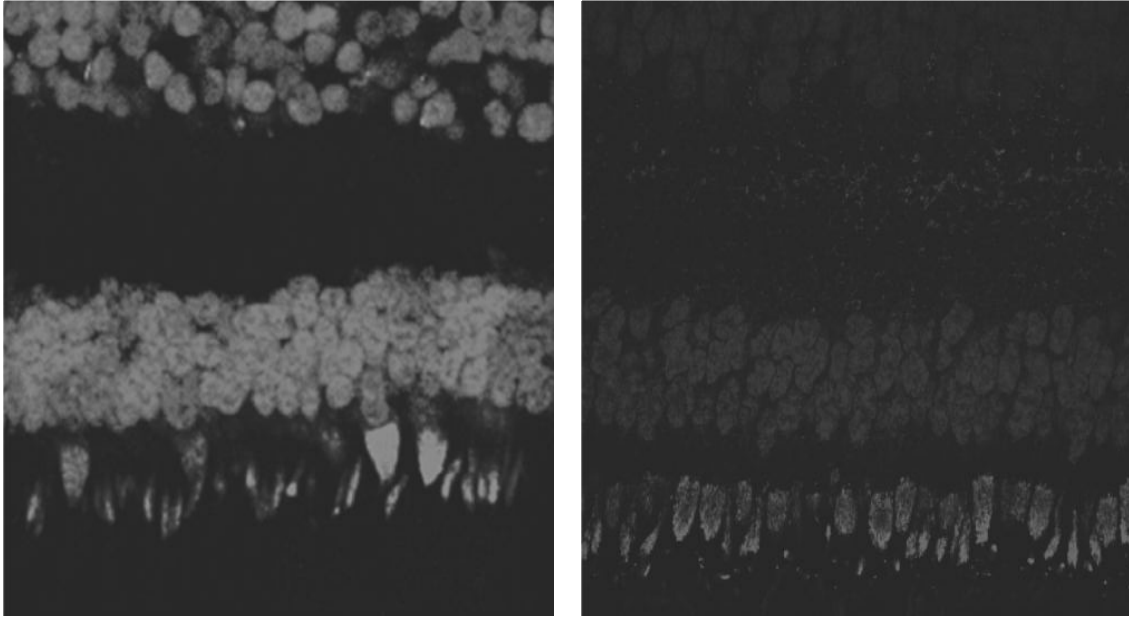
しかしながら、2家系でまったく同じミスセンス変異が見つかったので、このミスセンス変異が近い祖先に由来している可能性も考えられた。そこで、RP1L1のR45W付近のハプロタイプを2家系の罹患者でひかくしたところ、ハプロタイプがまったく異なることから二つのOMD家系が独立してRP1L1にミスセンス変異を持っている可能性が高いことが示された。

RP1L1の免疫染色

RP1L1は、ゲノム構造や、タンパクのN末部分は色素変性症の原因遺伝子であるRP1と相同性が高いことが知られており、RP1, RP1L1共にN末にDCXドメインと呼ばれるマイクロチューブルとの結合ドメインを持つ。

	mito	nucl	cyto_nucl	cyto
human	29	-	-	-
macaca	23	4.5	4	2.5
mouse	-	18.5	15.5	11.5

野生型マウスでは、RP1L1は視細胞外節のAxonemeに局在していることと、垂体にはRP1L1は検出できず、桿体でのみタンパクがあることが報告されている(Yamashita T *et al. J Neurosci.* 2009 August 5; 29(31): 9748–9760)。しかし、細胞内局在予測プログラムのWolf PSORT (<http://wolfpsort.org/>)を用いると、ヒトやカニクイザルのDCXドメインは、マウスのRP1L1のDCXドメインとは、かなり異なる局在予測になった。



そこで、霊長類での RP1L1 の局在を調べるために、カニクイザルとマーモセットの切片を用いて、免疫染色をおこなった。その結果、カニクイザル、マーモセット共に視細胞の桿体と椎体両方の内節部分にシグナルが見られ、外節に近いミトコンドリアや微小管に富む内節部分に局在していることが示されました。

結論

今回見つかった RP1L1 の変異により、ミトコンドリアのエネルギー産生に影響を及ぼす結果、特にエネルギー消費量の高い黄斑中心窩の錐体外節で障害を受ける可能性と、微小管による外節への物質輸送に影響を及ぼし、視細胞外節の機能維持に障害をおよぼす可能性を考えられる。OMD は診断が難しく、他の疾患と間違われやすい疾患であるが、RP1L1 の遺伝子解析が進むことにより、診断の一助になることを期待している。

また、OMD は物を見るときに重要な部位である黄斑の中心部分の機能が低下する疾患であるので、RP1L1 の機能解析を進めることにより、視力を維持するメカニズムの解明に繋がると考えている。

黄斑変性カニクイザルの網膜色素上皮細胞の解析及び新規治療法の開発

池 在龍、岩田 岳
(分子細胞生物学研究部)

要約

加齢黄斑変性は米国では65歳以上の失明率が最も高い眼疾患であり、日本でも患者数は急増しており、その原因解明と予防・治療法の開発が急がれている。黄斑は高い解像度の視力を獲得した霊長類で発達しており、通常の実験に使用される夜行性のゲツ歯類（マウス、ラット等）には存在しない。当研究部では遺伝子変異によって生後2年でドルーゼンが観察される世界で唯一の霊長類モデルを使って、加齢黄斑変性の初期における網膜下の状況を分子レベルで研究してきた。現在の加齢黄斑変性の治療法は主に病気の末期に現れる血管新生の抑制に絞られてあるが、その効果は限定的である。

研究目的

我々は黄斑変性症発症霊長類モデルを使ってより早い時期における診断法及び予防法の開発を行っている。本研究では、遺伝性黄斑変性カニクイザル疾患個体と正常個体から網膜色素上皮細胞(RPE細胞)を初代培養し、表現型解析を行った。さらに、補体抑制剤とプロテアソーム抑制剤による治療効果の評価を行った。

研究方法

4頭の正常個体及び2頭の黄斑変性を発症するカニクイザルからそれぞれRPE細胞を分離し、初代培養を行った。眼底写真、局所ERG、蛍光眼底などの臨床所見に基づいて個体をスクリーニングした。表現型解析にはPassage 3の細胞を使用した。病因を探るべく、初代培養細胞からトータルRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。補体抑制剤は月1回に発症個体サルの片眼硝子体内に注射し、眼底撮影を行い1年後の効果の評価をした。また、レーザー光凝固による網膜新生血管(CNV)マウス或いはラットモデルを作製し、プロテアソーム抑制剤をその硝子体内に投与した2週間後に評価をした。

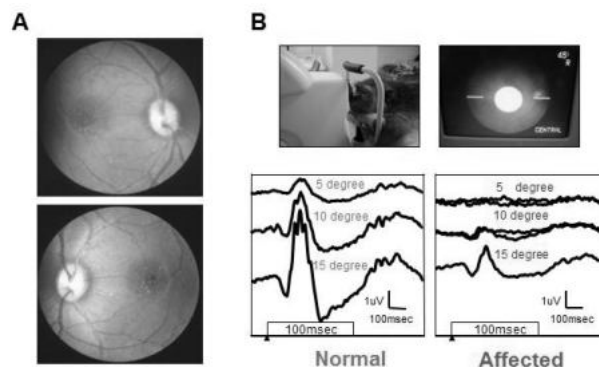


図1. 黄斑変性症発症カニクイザルの眼底写真 (A) と局所 ERG (B)。

結果及び考察

正常個体に比べて発症個体の RPE 細胞は増殖能が顕著に低下した。細胞間のタイトジャンクションの構成蛋白質である Z0-1 の発現量や RPE 細胞の主な機能である貪食作用も疾患個体では著しく減少した。

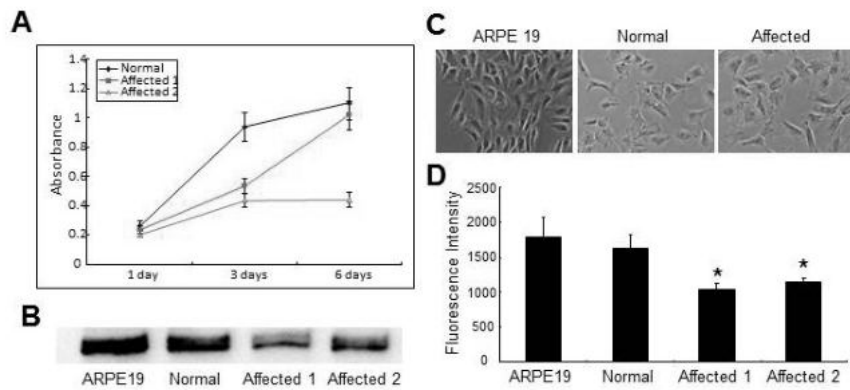


図 2. RPE 細胞における表現型解析。A. 増殖アッセイ；B. Z0-1 タンパク質の発現変化；C, D. 貪食作用解析を示す。

マイクロアレイ解析では、今まで報告のあったケモカインや補体系分子の発現増加などが確認された。疾患個体における補体抑制剤の治療効果を評価した結果、病気の進行を有意に抑制することが分かった。

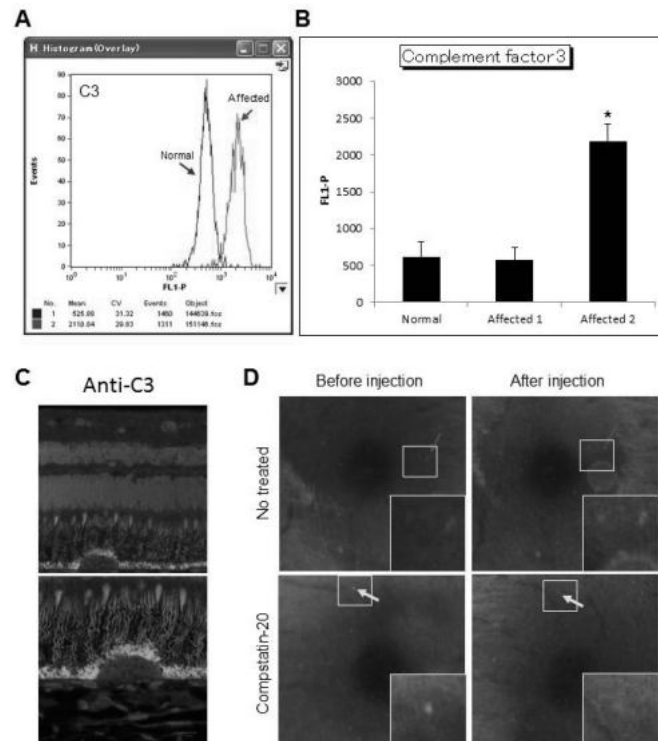


図 3. 補体 C 3 の発現及び疾患における影響。A, B. RPE 細胞内における C 3 の発現変化；C. 網膜とドルーゼンにおける C 3 の発現；D. C 3 抑制剤の疾患に及ぼす影響。

面白いことに今回のマイクロアレイ解析で、新たに主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子の多くのアレルの発現が増減していることが明らかになった。今回の研究で MHC クラス I 分子の多くのアレルが変動していることから、ある一つのアレルのみをノックダウンすることで機能評価をすることができなかった。そこで、プロテアソームを調整することで MHC クラス I 分子をコントロールできることから、その抑制剤を CNV 実験モデルに投与して効果評価を行った結果、新生血管を著しく抑制できることが確認された。

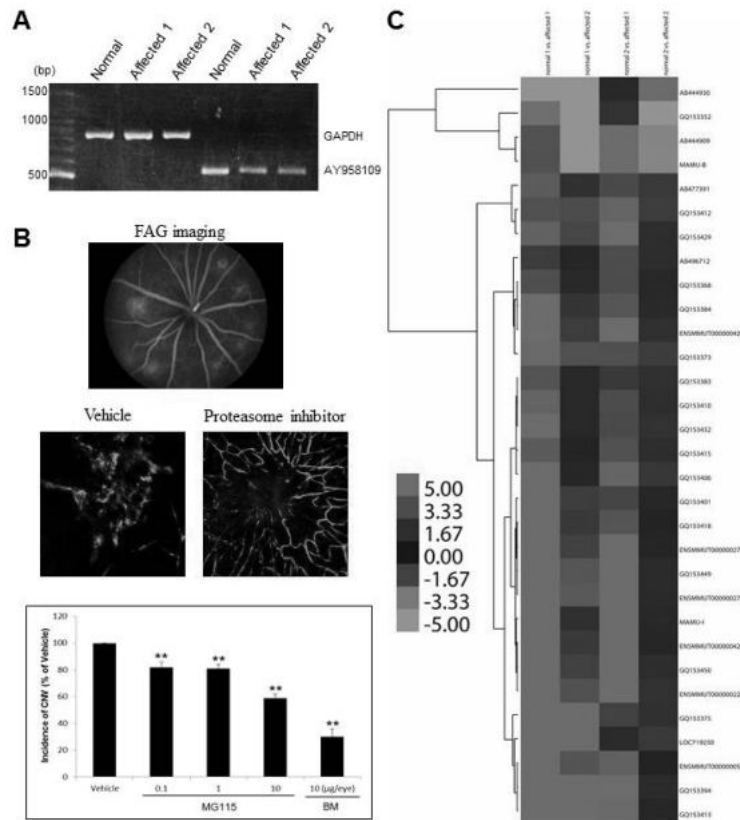


図 4. MHC クラス I の発現変化およびプロテアソーム抑制剤の CNV に及ぼす治療効果。

結論

今回初めて疾患個体の RPE 細胞が初代培養され、機能低下や遺伝子発現変化が、黄斑を持つ霊長類モデルにおいて確認された。プロテアソーム機能を抑制することで炎症性サイトカインや増殖因子などの分泌量を減少させることは既に報告されている。統合的に細胞内外の環境を整えることで RPE 細胞の機能を回復させられるプロテアソームは、網膜黄斑変性症の新たな治療標的になるのではないかと期待する。

血管内皮細胞における Tropomyosin 1 alpha chain の機能解析

岡本 はる、岩田 岳
(分子細胞生物学研究部)

要 約

カニクイザルの網膜を用いた、黄斑のプロテオーム解析から同定されたタンパク質「Tropomyosin 1 alpha chain」について、血管内皮細胞における機能解析を行った。ヒト由来の培養血管内皮細胞を用いて、Tropomyosin 1 alpha chain(*TPM1*)遺伝子の発現を一過性にノックダウンすると、ウシ胎仔血清(FBS)の添加によって誘導される Vascular endothelial cadherin(VE-cadherin)による細胞間接着の解体と、遊走性が、共に消失、または低下した。一方、VE-cadherin の接着結合の解体は、Tropomyosin 1 alpha chain の mRNA 量の増加を伴い、また、ノックダウンした細胞では、免疫染色において、コントロールには見られるアクチンフィラメントの染色が弱いレベルでしか観察されなかった。以上のことから、Tropomyosin 1 alpha chain は血管内皮細胞において、血管新生の現象にアクチンフィラメントの安定化を介して関与するタンパク質であることが示唆された。

目 的

本研究室ではこれまで、カニクイザルの網膜を用いて、正常な網膜について黄斑および周辺網膜のプロテオーム解析を行い、黄斑に高く発現しているタンパク質として、「Tropomyosin 1 alpha chain」を同定した。このタンパク質は、アクチンフィラメントと結合し、フィラメントの安定化や他の結合タンパク質との結合を調節していることが知られている。また、網膜における Tropomyosin 1 alpha chain の局在は、主に脈絡膜の血管内皮細胞であった。血管内皮細胞は、血管の内腔を覆う最も内層の細胞であり、血管新生を誘導する Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)等のサイトカインに反応し、増殖、遊走を開始する。脈絡膜における血管新生は、加齢黄斑変性(AMD)の特徴の1つであり、重篤な視力低下を招く病態である。血管新生のメカニズムの理解は、AMD の進行の抑制や治療に対して重要である。血管新生における血管内皮細胞の増殖や遊走には、細胞骨格の変化が伴い、アクチンフィラメントと結合する Tropomyosin 1 alpha chain は、その変化に関与している可能性がある。そこで、血管新生における血管内皮細胞での Tropomyosin 1 alpha chain の機能解析を行った。

対象および方法

I 材料

実験には、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた。HUVEC に対して形態変化と遊走の刺激を与える化学誘引物質として、本研究では FBS を使用した。

II 方法

1. HUVEC の FBS 処理

FBS の飢餓処理後の HUVEC に、24 時間、10%FBS 存在下で培養を行い、HUVEC の

形態を免疫染色で観察した。染色には、抗 tropomyosin 抗体 TM311 を用いた。また、アクチンフィラメントに特異的に結合する分子である phalloidin に FITC 標識を付けたプローブ phalloidin-FITC と、核を染色する DAPI も用いて同時に染色した。

FBS 処理後の HUVEC では、Tropomyosin 1 alpha chain の mRNA 量についても TaqMan プローブを用いて定量した。TPM1 遺伝子からは選択的スプライシングにより、複数のアイソフォームが生ずるが、今回の定量 PCR で増幅される領域は、TPM1 遺伝子由来の全てのアイソフォームに含まれるため、発現量は全てのアイソフォームの TPM1 mRNA の合計である。

2. short interfering RNA(siRNA)による TPM1 遺伝子の発現阻害

HUVEC における TPM1 遺伝子のノックダウンには、デザイン済みの合成 siRNA を用いた。この製品では、TPM1 遺伝子の全てのアイソフォームに共通するエクソンの配列のうち、下記 4ヶ所に対し、相補鎖をデザインしている。このため、アイソフォームにかかわらず、TPM1 遺伝子由来の全ての mRNA に働き、発現を抑制する。siRNA は HUVEC を撒いて 24 時間後の時点で加え、siRNA 添加後 72 時間で、再び通常の培地に置き換え、96 時間まで培養を続けた。mRNA におけるノックダウンの確認は、72 時間後の細胞において TaqMan プローブを用いて定量 PCR により行った。タンパク質については、96 時間後の細胞からタンパク質を抽出して、ウエスタンブロッティングによって評価した。

siRNA 処理後の HUVEC は、抗 VE-cadherin 抗体および phalloidin-FITC で染色し、10%FBS の曝露の有無による形態の差異を観察した。

3. 遊走性の観察

遊走実験は、「インサート」と呼ばれる底がメッシュ構造のチャンバーに HUVEC を播き、FBS の濃度勾配に応じメッシュの孔を通り、反対側に移動した細胞数を数える方法を用いた。

通常の HUVEC と siRNA 処理後の HUVEC を FBS 飢餓処理後、Trypsin-EDTA 溶液で、細胞を容器から剥し、インサートに播いた。12 時間後、インサート上の細胞を固定し、DAPI で染色後、下側の細胞を数えた。

遊走時における TPM1 遺伝子の発現を定量するために、siRNA 処理を行っていない HUVEC から total RNA を回収し、定量 PCR を行った。

結 果

1. FBS 添加後の HUVEC における Tropomyosin の細胞内局在および発現量の変化

10%FBS 添加後の HUVEC では、アクチンフィラメントのシグナルは、添加後 3 時間、6 時間、12 時間の全ての細胞で検出された。一方、抗体 TM311 による Tropomyosin のシグナルは、FBS 添加 3 時間後では弱いですが、時間経過とともに検出されるようになり、12 時間後では、一部の細胞でアクチンフィラメントと共局在していることが観察されたこの結果から、FBS 添加後の HUVEC において、Tropomyosin はアクチンフィラメントと共局在するが、FBS 添加後の比較的早い時期において形成される糸状仮足の領域では、Tropomyosin はアクチンフィラメントと共局在しないことが示唆された(図 1)。

HUVEC における 10%FBS による *TPM1* 遺伝子の発現量の変化を、FBS 添加後 0 時間から 12 時間まで測定した。0 時間における発現量を「1」として、その他の時間と比べた結果、FBS 添加後の *TPM1* 遺伝子の発現量は、12 時間で有意に変化し ($p<0.001$)、6 時間で発現量は最大となった。これは FBS 添加時(0 時間)に比べ 2.6 倍程度であった($p=0.002$)。また、飢餓処理以前の *TPM1* 遺伝子の発現量は 1.2 倍程度高かった(図 2)。

2. *TPM1* 遺伝子のノックダウンによる HUVEC の細胞間接着の変化

HUVEC における *TPM1* 遺伝子の機能を調べるために、*TPM1* 遺伝子のノックダウンを行い、細胞の形態を VE-cadherin とアクチンフィラメントの染色により観察した(図 3)。飢餓培地で処理後、通常培地(EGM-2)で培養した細胞では VE-cadherin の細胞間接着が観察された(図 3A)。またアクチンフィラメントは VE-cadherin の周囲や核の周囲に検出された。一方、siRNA 処理を行った細胞では、コントロールと同様に VE-cadherin の細胞間接着が認められ、VE-cadherin の染色については、局在、シグナル強度共に、コントロールの細胞との差異は認められなかった。アクチンフィラメントは、siRNA 処理の細胞ではシグナルが弱く、コントロールに比べ、一部にしか検出されなかった(図 3B)。

10%FBS 添加後の HUVEC では、VE-cadherin の細胞接着が変化し、細胞間の面積が増加していた(図 3C)。また、細胞の大きさ自体が通常培地の細胞(図 3A)に比べ、縮小する傾向が見られた。アクチンフィラメントは、FBS 添加後 12 時間のコントロールの細胞で強く検出された。アクチンフィラメントは、細胞の円周の片側により強く検出される細胞が多く、細胞の可動性が増加していることが観察された。さらに一部の細胞の端では糸状仮足の形成が見られ、VE-cadherin の一部はこの糸状仮足と共局在していた。これらの結果から、10%FBS 添加によって、HUVEC では、VE-cadherin の局在を変え、細胞間の接着が緩まり、HUVEC 自身の可動性も増加することが考えられる。一方、siRNA 処理を行った細胞では、FBS 添加後 12 時間の形態は、コントロールとは異なっていた(図 3D)。VE-cadherin の染色では、細胞間接着は保持され、細胞間の面積の増加は見られなかった。しかし、通常の培地で培養した細胞(図 3B)の VE-cadherin の染色と比べるとシグナルが弱く、一部細胞間接着が破綻している部分も見られた(図 3D 矢印)。また、アクチンフィラメントはごく弱いシグナルしか検出されなかった。この結果は、培地の違いにかかわらず、siRNA を行った細胞に共通して見られた(図 3B、D)。

3. *TPM1* 遺伝子のノックダウンによる HUVEC の遊走性の変化

10%FBS による遊走実験の結果(図 4)、ポジティブコントロールにおける細胞数が平均 338 個/10.08mm²であるのに対して、*TPM1* 遺伝子をノックダウンした細胞では、ポジティブコントロールの 55%程度である、平均 186 個/10.08mm²となり、HUVEC の遊走性は、*TPM1* 遺伝子のノックダウンにより有意に低下していた($p=0.035$)、一方、濃度勾配が存在しないネガティブコントロールにおいては、ポジティブコントロールの 43%程度の数の細胞が遊走し、*TPM1* 遺伝子をノックダウンした場合の細胞数と有意な差異は見られなかった($p=0.492$)。

10%FBS による濃度勾配において、遊走した細胞の *TPM1* 遺伝子の発現量の変化を、FBS 添加後 0 時間から 12 時間まで定量 PCR 法で測定した(図 5)。発現量の有意な変化は

見られなかった($p=0.198$)。

以上の結果から、Tropomyosin 1 alpha chain は血管内皮細胞が FBS の刺激により、細胞間接着および遊走性において変化を生ずる際、何らから機能を担うタンパク質であり、その機能はアクチンフィラメントの安定性を介している可能性が示された。これは、Tropomyosin 1 alpha chain が、血管新生における血管内皮細胞の変化に必要なタンパク質であることが示すものである。今後、Tropomyosin の多様なアイソフォームのうちから、血管新生に機能する特異的なアイソフォームが同定されれば、血管新生の発症機序の理解や治療における標的分子として有用であると考えられる。

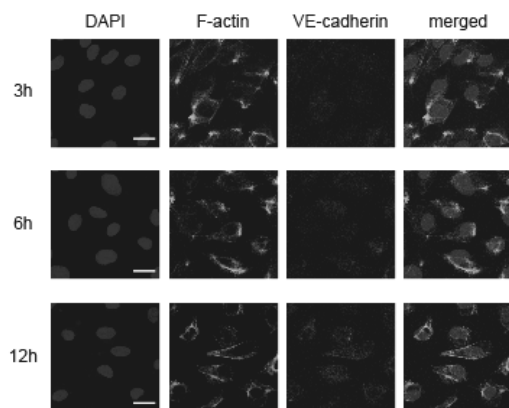


図 1

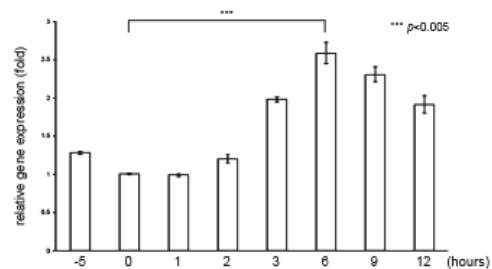


図 2

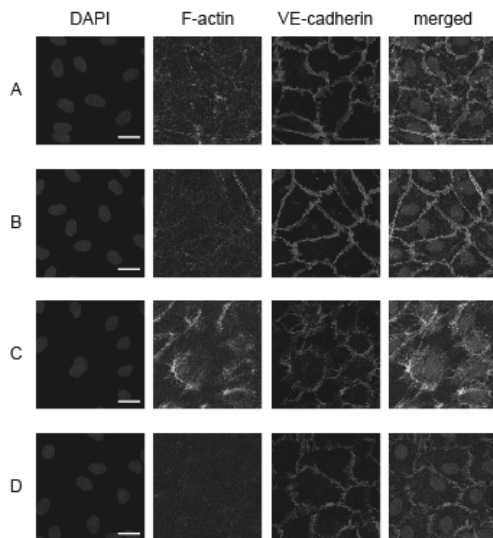


図 3

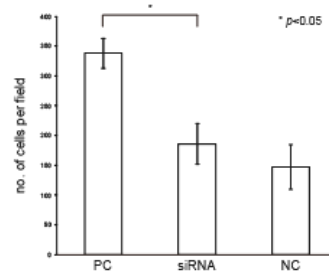


図 4

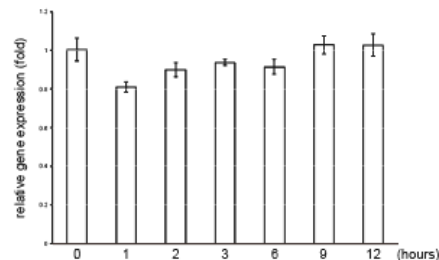


図 5