

令和元年6月18日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07086

研究課題名(和文) Cpx変異マウス系統群を用いた加齢白内障発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of etiology of age-related cataracts by using Cpx mutant mouse strains

研究代表者

森 政之 (Mori, Masayuki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：60273190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Coproporphyrinogen oxidase 遺伝子変異を共有しながらも異なる遺伝的背景をもつマウス系統群を用いることにより、白内障の発症、およびその遅延/早期化の分子遺伝学的機序として、小胞体ストレス反応、および細胞間結合分子であるgap junction protein, alpha、periplakin、およびarmadillo repeat gene deleted in velocardiofacial syndromeを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の多くに認められ、生活の質を大きく低下させる一因となっているにもかかわらず未だ不明な点が多い加齢性白内障の発症機序・経路の一端として小胞体ストレス反応、および細胞間結合タンパク質を明らかとすることができた。これらの経路を標的とした加齢性白内障の治療・予防の開発に新たな方向性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：By using mouse strains that share the mutant coproporphyrinogen oxidase gene but have distinct genetic background, importance of endoplasmic reticulum stress response pathway and cell adhesion molecules (gap junction protein, alpha, periplakin, periplakin, and armadillo repeat gene deleted in velocardiofacial syndrome) to development and time of onset of cataracts was revealed.

研究分野：実験動物学

キーワード：白内障 遺伝子 マウス ポルフィリン症 小胞体ストレス 細胞間結合分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢白内障は60歳代の70%、70歳代の90%に、また80歳以上になるとほぼ100%のヒトに認められ、多くの高齢者の生活の質を大きく低下させる一因となっているにもかかわらず、その発症機序には未だ不明な点が多い。加齢白内障レンズの透明度を回復させる薬剤は無く、進行した場合には手術以外に視力を回復させる手段が無い。予防/遅延が最も望ましく、例えば加齢白内障の発症を10年遅延させることができれば、多くの高齢者の生活の質を保つことができる。さらなる高齢化社会を迎えるに当たり、加齢白内障の発症機序の解明、およびその予防/遅延法の確立は喫緊の課題である。

本研究代表者は、遺伝性白内障モデルであるNCT系マウスの白内障原因遺伝子の同定を試みた。その結果、NCT系マウスにおける白内障の一義的原因は、コプロポルフィリノーゲン酸化酵素(CPOX)をコードする遺伝子の突然変異(以下*Cpox^{nct}*)であること、およびこの突然変異のためにCPOX活性が野生型の20%以下に低下し、レンズにはCPOXの基質であるコプロポルフィリノーゲンが大量に蓄積していることを明らかとした(*Exp. Eye Res.* 112: 44-50 (2013))。コプロポルフィリノーゲン酸化酵素の機能低下と白内障との関連はそれまでに報告が無く、NCT系マウスの研究から未知の発症機序の解明が期待された。

また、過去に他の研究グループによってNCT系マウスの白内障原因遺伝子座*nct*(=*Cpox^{nct}*)をBALB/c系マウスに導入したコンジェニックマウス(BALB.NCT-*Cpox^{nct}*)が確立されていた(*Exp. Eye Res.* 47: 705-711 (1988))。興味深いことに、BALB.NCT-*Cpox^{nct}*における白内障の50%発症時期は雌で8.6週齢、雄で12.9週齢であり、NCTが3週齢で雌雄ともにほぼ100%発症するのと比較して有意に遅延される。これはヒトに外挿すると、女性で約10年、男性ではそれ以上に相当する大幅な発症遅延に相当する。このことから、BALB/c系マウスには白内障発症を遅延し、逆にNCT系マウスには早期化する修飾遺伝子の存在が想定されていたが、その正体は不明であった。本研究代表者による予備的な研究で、この修飾遺伝子は第16染色体上に存在することが明らかとされた。さらに、他の研究グループによるBALB.NCT-*Cpox^{nct}*とMSM/Ms系マウスとの戻し交雑マウスを用いた遺伝解析によって、白内障発症時期を遅延/早期化する対立遺伝子がBALB/cとMSM/Msの第3、および第10染色体上にも存在することが明らかとされていた(*Exp. Eye Res.* 75: 745-751 (2002))。これらの白内障発症を遅延/早期化する修飾遺伝子の同定から、ヒトの加齢白内障の予防/遅延処方確立に有用なデータの取得が期待された。

2. 研究の目的

*Cpox*変異マウス系統群を用いて、(1)*Cpox*変異が白内障を惹起する分子遺伝学的機序の解明、および(2)白内障を遅延/早期化する修飾遺伝子を同定し、その機序を解明することを目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) *Cpox*変異が白内障を惹起する分子遺伝学的機序の解明

*Cpox*変異マウスのレンズにおける分子的变化を明らかとするために、4週齢、および12週齢のBALB.NCT-*Cpox^{nct}*、およびBALB/cマウス(正常対照)のレンズからトータルRNAを抽出し、RNA-Seq解析を行った。

(2) 修飾遺伝子が白内障を遅延/早期化する機序の解明

第3染色体上の白内障早期化遺伝子に関しては、(BALB.NCT-*Cpox^{nct}*-Chr3^{MSM} x BALB.NCT-*Cpox^{nct}*) F₁ x BALB.NCT-*Cpox^{nct}*戻し交雑マウス群を作成して解析した。戻し交雑マウスのうち、*D3Mit208* (26.57 cM)と*D3Mit315* (50.09 cM)の間で組み換えが生じている個体に関して、当該染色体領域におけるハプロタイプと白内障発症までの日数との相関を調査することにより、修飾遺伝子の存在領域を確定した。次いで、この領域に存在し、白内障との関連が想定される遺伝子に関して、BALB.NCT-*Cpox^{nct}*とMSM/Msの間での塩基多型をゲノムDNAまたはcDNAをテンプレートとしてPCR/ダイレクトシーケンシング法により検索した。

第16染色体の修飾遺伝子に関しては、BALB.NCT-*Cpox^{nct}*の遺伝的背景にNCT由来の第16染色体の*D16Mit32* (2.33 cM)~*D16Mit45* (30.66 cM)の領域を導入したダブルコンジェニックマウス(BALB.NCT-*Cpox^{nct}*-Chr16^{NCT})を確立し、白内障発症時期を比較することで、この領域に白内障早期化遺伝子が存在することを確認した。次いで、NCTマウスのゲノムDNAを用いて全ゲノムの塩基配列を決定し、塩基の置換、挿入/欠失多型(変異)、コピー数多型、構造変異をゲノムワイドに同定した。PCR法によりゲノムDNAより当該塩基多型(変異)を含む領域を増幅取得し、その塩基配列をサンガー法により解析して当該塩基多型(変異)を確認した。

4. 研究成果

(1) *Cpox*変異が白内障を惹起する分子遺伝学的機序の解明

レンズのRNA-Seq解析の結果、BALB.NCT-*Cpox^{nct}*マウスのレンズにおいて4週齢(病理学的には正常)および12週齢(白内障発症)に共通したトランスクリプトーム変化として、小胞体ストレス反応とコレステロール生合成経路の亢進が明らかとなった。ATF4とDdit3(=CHOP)の転写発現の亢進が認められたことから、小胞体ストレス反応の3つのセンサー(IRE1, ATF6, PERK)経路のうち、PERKを介した経路の亢進が示唆された。こ

のことから、「BALB.NCT-*Cpox^{nct}* マウスにおいては *Cpox^{nct}* 変異の結果としてレンズ内に蓄積したコプロポルフィリンが何らかのタンパク質の凝集を惹起するために小胞体ストレス反応が亢進される。小胞体ストレス反応による対応の限度を超えるためにアポトーシスが誘導され、細胞は自死する。これが白内障へと帰結する」との発症機序が示唆された。

(2) 修飾遺伝子が白内障を遅延/早期化する機序の解明

(BALB.NCT-*Cpox^{nct}*-Chr3^{MSM} x BALB.NCT-*Cpox^{nct}*) F₁ x BALB.NCT-*Cpox^{nct}* 戻し交雑マウス群において、第3染色体上の *D3Mit39* (47.69 cM) よりもセントロメア側の領域が BALB 由来のホモ型個体の白内障発症時期 (♀7.2 週、♂10.2 週) は、BALB 由来と MSM 由来のヘテロ型個体の発症時期 (♀5.8 週、♂7.3 週) よりも有意に遅延していることから、BALB/c 系マウスの第3染色体の *D3Mit39* (47.69 cM) よりもセントロメア側に白内障発症遅延遺伝子が存在することが確認された。この領域に存在し、白内障に関連することが想定される3個の遺伝子 (gap junction protein, alpha 8 (*Gja8*) 遺伝子 (42.03 cM)、Na,K-ATPase α サブユニット 1 (*Atp1a1*) 遺伝子 (44.30 cM)、glutathione S-transferase, mu 1 (*Gstm1*) 遺伝子 (46.83 cM)) に関して塩基多型を検索した結果、*Gja8* 遺伝子において MSM 系マウスに特異的な I345R アミノ酸置換を生じるミスセンス変異が同定された。GJA8 はレンズでのみ発現されるギャップジャンクションタンパク質で、抗酸化分子であるグルタチオンの細胞膜輸送体としての活性も有する (*Exp. Eye Res.* 84: 513-528 (2006))。このことから、「BALB/c 型の GJA8 はレンズの細胞間結合、あるいはグルタチオン輸送活性が MSM 型よりも優れるために白内障発症を遅延する」との機序が想定された。

BALB.NCT-*Cpox^{nct}*-Chr16^{NCT} ダブルコンジェニックマウスの白内障発症時期 (♀5.0 週、♂4.8 週) は、BALB.NCT-*Cpox^{nct}* の発症時期 (♀8.4 週、♂10.7 週) よりも有意に早期化していることから、BALB/c 系マウスの第16染色体の *D16Mit32* (2.33 cM) ~ *D16Mit45* (30.66 cM) の領域に白内障発症遅延遺伝子が存在することが確認された。NCT 系マウスの全ゲノム塩基配列データを取得して第16染色体の 2.33 cM ~ 30.66 cM の染色体領域内での塩基変異(多型)を検索した結果、periplakin (*Ppl*) 遺伝子 (2.50 cM) に2個のミスセンス塩基置換変異 (p.Gly179Arg と p.Ala1276Thr) を見出した。また、armadillo repeat gene deleted in velocardiofacial syndrome (*Arvcf*) 遺伝子 (11.37 cM) に1個の3塩基欠損多型 (p.Gly172del) と1個の3塩基挿入多型 (p.Ser604-Thr605 ins Thr) を見出した。periplakin タンパク質はレンズにおいて中間フィラメントやビーズフィラメントと相互作用する。ARVCF タンパク質はβ-カテニン関連タンパク質であり、カドヘリンなどを含む他のタンパク質と結合して相互作用し、細胞接着に関与する。また、マウスにおいて、その機能喪失が白内障の原因となることが報告されている。periplakin タンパク質と ARVCF タンパク質の機能の測定法が無いために、これらの多型の影響は検証できなかったが、「BALB/c 型の periplakin タンパク質、または ARVCF タンパク質のレンズの細胞骨格や構造の維持能力は NCT 型のそれよりも優れるために白内障発症を遅延する」との機序が想定された。

本研究において明らかとなった小胞体ストレス反応経路、および修飾遺伝子は、白内障の予防・遅延のための新たな標的となりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

森 政之, 樋口京一. 老化研究のためのモデルマウス -老化促進モデルマウスを軸にして- 日本薬理学雑誌 153: 179-185 (2019)

Huo J, Xu Z, Hosoe K, Kubo H, Miyahara H, Dai J, Mori M, Sawashita J, Higuchi K: Coenzyme Q10 prevents senescence and dysfunction caused by oxidative stress in vascular endothelial cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018: 3181759 (2018)

Ding X, Liu Y, Yang M, Li L, Miyahara H, Dai J, Xu Z, Matsumoto K, Mori M, Higuchi K, Sawashita J: Amyloidosis-inducing activity of blood cells in mouse AApoAII amyloidosis. *Exp. Anim.* 67: 105-115 (2018)

Yang M, Liu Y, Dai J, Li L, Ding X, Xu Z, Mori M, Miyahara H, Sawashita J, Higuchi K: Apolipoprotein A-II induces acute-phase response associated AA amyloidosis in mice through conformational changes of plasma lipoprotein structure. *Sci. Rep.* 8: 5620 (2018)

Miyahara H, Sawashita J, Ishikawa E, Yang M, Ding X, Liu Y, Hachiya N, Kametani F, Yazaki M, Mori M, Higuchi K: Comprehensive proteomic profiles of mouse AApoAII amyloid fibrils provide insights into the involvement of lipoproteins in the pathology of amyloidosis. *J. Proteomics* 172: 111-121 (2018)

Xu Z, Huo J, Ding X, Yang M, Li L, Dai J, Hosoe K, Kubo H, Mori M, Higuchi K, Sawashita J: Coenzyme Q10 improves lipid metabolism and ameliorates obesity by regulating CaMKII-mediated PDE4 inhibition. *Sci. Rep.* 7: 8253 (2017)

Yang M, Liu Y, Li L, Miyahara H, Ding X, Dai J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K: Apolipoprotein A-II accelerates reactive AA amyloidosis. *Amyloid* 24: 147-148 (2017)

Li L, Sawashita J, Ding X, Yang M, Xu Z, Miyahara H, Mori M, Higuchi K: Caloric restriction reduces the systemic progression of mouse AApoAII amyloidosis. *PLoS ONE* 12:

〔学会発表〕(計 15 件)

酸化ストレス抑制剤の継続摂取によるマウス AApoAll アミロイドーシスの進行抑制効果(2). 代 健, 丁 欣, 宮原大貴, 徐 哲, 崔 小冉, 五十嵐祐一, 澤下仁子, 森 政之, 樋口京一. 第 33 回老化促進モデルマウス(SAM)学会学術大会 2018 年 7 月 14 日 静岡

KKAy と SAMP8 マウスを用いたグラボノイド摂取が脂質代謝、および筋肉組織へ及ぼす効果の解析. 霍 佳, 徐 哲, 代 健, 五十嵐祐一, 崔 小冉, 宮原大貴, 森 政之, 澤下仁子, 細江和典, 樋口京一. 第 33 回老化促進モデルマウス(SAM)学会学術大会 2018 年 7 月 14 日 静岡

SAMP1 マウスへの還元型コエンザイム Q10 の投与が促進老化を抑制するメカニズムの検討. 五十嵐祐一, 徐 哲, 澤下仁子, 細江和典, 森 政之, 樋口京一. 第 33 回老化促進モデルマウス(SAM)学会学術大会 2018 年 7 月 14 日 静岡

モデルマウスを用いた高圧加工米の生体調節機能の検討. 宮原大貴, 宮坂幸弘, 徐 哲, 霍 佳, 五十嵐祐一, 森 政之, 藤田智之, 植田 豊, 樋口京一. 第 33 回老化促進モデルマウス(SAM)学会学術大会 2018 年 7 月 14 日 静岡

Comprehensive proteomic profiles of mouse AApoAll amyloid fibrils provide insights into the involvement of lipoproteins in the pathology of amyloidosis. Miyahara H, Mori M, Higuchi K. 第 18 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ 2018 年 6 月 26 日 新潟

老化研究のためのモデルマウス -老化促進モデルマウスを軸にして-. 樋口京一, 森 政之 日本実験動物学会 第 65 回総会 シンポジウム 4「健康長寿を目指した老化研究の推進」 2018 年 5 月 17 日 富山

Proteomic profiles of mouse AApoAll amyloid fibrils suggest the involvement of lipoproteins in the pathology of amyloidosis. Miyahara H, Ding X, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. The XVIth International Symposium on Amyloidosis 2018 年 3 月 26 日 熊本

Coenzyme Q10 prevents senescence and dysfunction caused by oxidative stress in vascular endothelial cells. Huo J, Xu Z, Hosoe K, Kubo H, Miyahara H, Dai J, Mori M, Sawashita J, Higuchi K. Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan with International Symposium on Coenzyme Q10 2017 年 12 月 9 日 八王子

Apolipoprotein A-II が反応性(AA)アミロイドーシスの病態に及ぼす影響. 楊 沐, 劉 穎業, 李 琳, 宮原大貴, 丁 欣, 代 健, 森 政之, 澤下仁子, 樋口京一. 第 32 回老化促進モデルマウス(SAM)学会学術大会 2017 年 7 月 22 日 岐阜

The mechanism of reduced coenzyme Q10 supplementation to ameliorate obesity and improve lipometabolism. Xu Z, Huo J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. 第 40 回 日本基礎老化学会 (JSBMG) 大会 2017 年 6 月 16 日 名古屋

Apolipoprotein A-II accelerates reactive AA amyloidosis. Yang M, Liu Y, Li L, Miyahara H, Ding X, Dai J, Sawashita J, Mori M, Higuchi K. The XVth International Symposium on Amyloidosis 2016 年 7 月 4 日 Uppsala, Sweden

還元型コエンザイム Q10 はカルシウムシグナルを介して老化を抑制する. 徐 哲, 霍 佳, 澤下仁子, 森 政之, 樋口京一. 日本基礎老化学会 第 39 回大会 2016 年 5 月 27 日 伊勢原

血管内皮に対する還元型コエンザイム Q10 の酸化ストレス及び抗老化効果. 霍 佳, 徐 哲, 澤下仁子, 森 政之, 樋口京一. 日本基礎老化学会 第 39 回大会 2016 年 5 月 27 日 伊勢原

マウス *Cpox* 遺伝子変異に起因する白内障の発症時期に影響する遺伝子が第 16 染色体上に存在する. 森 政之, 樋口京一. 日本実験動物学会 第 63 回総会 2016 年 5 月 18 日 川崎

Apolipoprotein A-II の反応性(AA)アミロイドーシスに及ぼす影響(第 2 報). 楊 沐, 劉 穎業, 李 琳, 宮原大貴, 丁 欣, 代 健, 澤下仁子, 森 政之, 樋口京一. 第 105 回 日本病理学会総会 2016 年 5 月 13 日 仙台

〔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:
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/doctor/grdkarei/i-byotai/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。