

論文内容の要旨

Effect of geranylgeranylacetone on ultraviolet radiation type B-induced cataract in heat shock transcription factor 1 heterozygous mouse

(HSF1 ヘテロ欠損マウスの紫外線 B 波誘導白内障に対するゲラニルゲラニルアセトンの効果)

(小笠原聡, 橋爪公平, 奥野孟, 今泉利康, 猪俣結衣, 手塚優, 三部篤, 黒坂大次郎)

(Current Eye Research 42 巻, 5 号 平成 28 年 10 月掲載)

I. 研究目的

白内障は最も一般的な眼疾患の 1 つで世界の失明原因の第一位を占める。そのため、白内障の発症や進行の予防は重要な課題であり、薬剤治療などの開発が望まれている。発症には遺伝的要因や環境要因(紫外線, 喫煙, 糖尿病など)が関与していることが知られている。

一方、生体は外的刺激に対応するために多様な応答システムを備えており、その一つに熱ショック応答がある。熱ショックなどのストレスが起こると、Heat shock transcription factors (HSFs) が誘導され、Heat shock proteins (HSPs) の gene promoter である heat shock elements (HSE) と結合し、HSPs の発現を調節する。脊椎動物の HSF ファミリー (HSF1-4) の 1 つである HSF4 は水晶体線維細胞の分化に関係し、HSF4 ホモ接合体 (HSF1^{-/-}) マウスでは白内障が自然発症することが報告されている。HSF1 は HSE-HSF 相互作用を経て多くの HSPs の発現を調整する。HSF1 は水晶体上皮細胞に存在し、HSPs の発現を調整し水晶体の透明維持に関与していると考えられているが、HSF1 ホモ接合体 (HSF1^{-/-}) マウスでは白内障の自然発症はみられなかった (Fujimoto, et al. EMBO. 2004)。しかし、水晶体上皮細胞を含む多くの細胞はストレス下において、タンパク質の変性を防ぐために HSP を誘導することはよく知られており、我々は HSF1 がストレス下の白内障の発症において何らかの役割を果たす可能性があるかと仮定した。

そこで我々は、白内障を誘発するストレス下での HSF1 の役割を明らかにする目的で、HSF1 ヘテロ接合体 (HSF1^{+/-}) マウスに対し紫外線照射を行って白内障を誘発し、野生型 (wild type: WT) マウスとの水晶体混濁の程度を比較した。更に、HSPs を誘導するゲラニルゲラニルアセトン (geranylgeranylacetone:GGA) を投与し、この白内障が影響を受けるかを調べた。また、HSPs である α A-crystallin, α B-crystallin および γ -crystallin と、生体内に普遍的に存在し GGA で誘導されることが知られている HSP25 が、これらの変化に関与するかを検討した。

II. 研究対象ならび方法

HSF1 が欠損しているマウス (SV129) は The Jackson Laboratory から購入し、C57BL/6 背景にコンジェニック化した。この HSF1 ジーンターゲティングマウスの HSF1^{-/-} は胎生仮

死と思われ生まれてこないため、HSF1^{+/-}でを使用した。

雄性 16 週齢の HSF1^{+/-} マウス及び同腹の WT マウスの右眼に紫外線 B 波 (UVR-B : 302nm) を照射した (計 1200mJ)。それぞれのマウスを GGA 投与群と非投与の vehicle 群との 4 群に分け、投与群は GGA500mg/kg を照射 2 日前から連日経口投与した。UVR-B 照射後、水晶体を単離し混濁面積を測定した。測定後の水晶体を細胞溶解液中でホモジネートし、ウエスタンブロット法のサンプルとし水晶体関連タンパク質の発現を測定した。

III. 研究結果

1. WT マウスと HSF1^{+/-} マウスの水晶体の HSF1 の mRNA レベルは、HSF1^{+/-} マウスが WT マウスよりも有意に減少していた (p<0.001)。
2. 全ての UVR-B 照射群で水晶体混濁を認め、HSF1^{+/-} マウスでは WT マウスよりも HSF1^{+/-} 混濁面積が有意に増加していた (p<0.01)。また両者の GGA 投与群では、非投与群に比べて混濁面積が減少していた (p<0.01)。
3. UVR-B 照射前の水晶体タンパク質の発現は、WT マウスと HSF1^{+/-} マウスの間に有意差を認めなかった。
4. UVR-B 照射前後の水晶体タンパク質の発現を比較し、 α A-crystallin, α B-crystallin, γ -crystallin では有意差を認めなかった。一方、HSP25 では UVR-B 照射後に WT マウスと HSF1^{+/-} マウスの両者で有意に発現が低下していた (p<0.01)。また、HSF1^{+/-} マウスと WT マウスを比較し、HSF1^{+/-} マウスの方が有意に HSP25 の発現が低下していた (p<0.05)。
5. UVR-B 照射群のうち、GGA 投与群と非投与群とで水晶体タンパク質の発現を比較し、HSP25 では GGA 投与群では WT マウスと HSF1^{+/-} マウスの両者で有意に発現が上昇していた (p<0.01)。他のタンパク質では有意差を認めなかった。

IV. 結 語

HSF1 が HSP25 のような HSPs の発現調節をすることで、UVR-B 誘発白内障の発症において重要な役割を果たすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 平 英一 (薬理学講座:情報伝達医学分野)

副査 講師 木村 英二(解剖学講座:人体発生学分野)

副査 講師 村井 憲一(眼科学講座)

白内障は全世界の失明原因の第一位を占める眼疾患であり、発症や進行の予防は重要な課題である。発症には遺伝的要因や紫外線などの環境要因が関与している。生体は外的刺激に対する応答システムの一つに熱ショック応答を有しており、ストレスが起こると Heat shock transcription factors (HSFs) が誘導され、Heat shock proteins (HSPs) の発現を通して細胞保護作用を示す。一方、HSP の点変異あるいは欠損変異、HSF の遺伝子変異は白内障の発症に関与していることが知られている。しかし、外因性の環境ストレスなどで発症する白内障に対する HSP および HSF の詳細な役割は不明な点が多い。本研究論文は、HSF1 が欠損した HSF1 ヘテロ接合体マウス (HSF1^{+/-}) を用いて、外因性ストレスによって発症する白内障における HSF1 の役割およびゲラニル基を有する化合物の HSP の発現誘導作用および白内障発症への効果を検討しようとする意欲的な研究である。

HSF1^{+/-}では野生型マウス (WT) と比べて HSF1 の遺伝子発現が半分程度まで低下しており、HSF1 の働きが悪いことが分かった。また、紫外線 B 波 (UVR-B) 照射により、HSF1^{+/-}で WT よりも水晶体混濁が増加し、GGA 投与群ではその混濁が減少した。UVR-B 照射後および GGA 投与群で α A-, α B-, γ -crystallin のタンパク発現は WT マウスと HSF1^{+/-}マウスの間で有意差を認めなかったが、HSP25 は UVR-B 照射後に発現が低下し、GGA 投与群で発現が上昇していた。

本論文は遺伝的な要因に紫外線などの外因性ストレスを関連付けた白内障の発症過程およびその治療薬の探索という点で極めて有用な情報を与える。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

実験に用いた紫外線誘発白内障モデルの意義、導入方法、観察された結果の意義についての試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。

参考論文

- 1) マルフアン症候群に伴う水晶体偏位術後 20 年して前房内に脱臼した Soemmering' s ring の 1 例 (小笠原聡, 他 5 名と共著)
日本白内障学会誌 第 28 巻, 第 1 号 2016 年 6 月 掲載予定
- 2) 電動式眼内レンズ挿入において眼内レンズ度数が切開幅へ及ぼす影響への比較検討 (大久保雅俊, 他 6 名と共著)
眼科 第 58 巻, 第 4 号 2016 年 4 月 掲載予定