

論文内容の要旨

論文提出者氏名 北澤 耕司

論文題目

Establishment of a Human Corneal Epithelial Cell Line Lacking the Functional *TACSTD2* Gene as an In Vitro Model for Gelatinous Drop-Like Dystrophy.

論文内容の要旨

膠様滴状角膜ジストロフィ (GDL) は 1914 年に中泉によって初めて報告された。遺伝形式は常染色体劣性遺伝で、原因遺伝子は tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2) 遺伝子であることが 1999 年に発見された。日本で数多く報告され、有病率は 1/30,000 であるが、欧米では極めてまれな疾患である。角膜上皮のバリア機能低下による角膜上皮へのアミロイドの沈着を特徴とし、10 歳代に羞明、異物感、流涙といった症状が出現し、最終的には角膜は混濁し著明な視力低下を引き起こす。角膜混濁に対しては角膜移植手術、層状角膜移植などが適応ではあるが、容易に再発し予後不良である。早期にはソフトコンタクトレンズによる角膜上皮保護やレーザー表層切除が行われているが、根本的な治療法はない。新しい治療法の開発や病態の解明には病態モデルの開発が必要である。今回、in vitro モデルとして、GDL 患者由来の不死化角膜上皮細胞の樹立を試みた。

GDL 不死化角膜上皮細胞を樹立するために、GDL 患者にインフォームドコンセントを行い、同意を得た後、手術時に角膜組織を採取し、角膜上皮細胞を単離した。ドナー由来の正常角膜上皮細胞をコントロールとして使用した。初代培養したのちに、レンチウイルスベクターにクローニングした SV40 large T 遺伝子と hTERT 遺伝子を導入した。遺伝子導入後の細胞形態は GDL 由来と正常由来間で差異は認めなかった。また遺伝子導入細胞は SV40 large T と hTERT タンパクを発現していることを免疫染色、ウェスタンブロッティングで確認した。また GDL 由来角膜上皮細胞は TACSTD2 タンパクの発現を認めず、また GDL 患者と同様に Q118X の変異を認めた。

次にこれらの細胞を用いて、樹立細胞の不死化機能を以下の 4 項目について検討した。1) 培養初期、中期、後期で細胞形態や細胞サイズを解析した。2) 老化マーカーである SA-β gal 染色を用いて老化細胞の有無を検討した。3) TRAP アッセイを行い、テロメラーゼ活性の有無を検討した。4) コロニーフォーミングアッセイを用いて、細胞増殖能力を検討した。Population doubling 解析では不死化操作を加えていない細胞では 20PD で増殖が止まったのに対し、不死化操作を加えた

細胞では 100PD を超えても増殖し続けた。細胞形態は不死化操作を加えた場合は培養後期であっても小さいままであったが、不死化操作を加えていない細胞では大きく平べったくなり、SA β gal 染色は陽性の細胞を数多く認めた。また、不死化操作を加えた細胞では、HeLa 細胞や不死化角膜上皮細胞と同様にテロメラーゼ活性を認めた。コロニーフォーミングアッセイでは不死化操作を加えた細胞ではより多くのコロニーを形成した。以上の結果から、SV40 large T と hTERT 遺伝子の導入による不死化細胞の樹立に成功した。

次に樹立した不死化細胞が GDL の病態を反映しているかどうかを検討するため、不死化細胞のバリア機能、タンパク発現パターンについての解析を行った。まずバリア機能を電気抵抗値で測定した。不死化細胞を増殖培地で培養し、コンフルエント後に分化培地に変更し、電気抵抗値を測定した。GDL 由来の不死化細胞は正常由来の不死化細胞と比較すると有意にバリア機能の低下を認めた。また、タイトジャンクション関連タンパクである Claudin 1 (CLDN1) と Claudin 7 (CLDN7) タンパクは、in vivo の GDL 角膜上皮と同様に、発現レベルの低下を示した。さらに CLDN1 と CLDN7 の局在が、細胞膜上から細胞質へと変化していた。

最後に、GDL に対する遺伝子治療の可能性について、樹立した不死化細胞を用いて検討した。wild type の TACSTD2 をレンチウイルスベクターにクローニングして、GDL 患者由来の不死化細胞に wild TACSTD2 遺伝子を導入した。遺伝子導入後、CLDN1 と CLDN7 のタンパク発現レベルは正常角膜上皮細胞とほぼ同等の発現レベルまで改善した。また発現レベルだけでなく、CLDN1 と CLDN7 の局在は正常角膜上皮と同様に細胞膜上に正常化した。このことは、TACSTD2 による遺伝子導入が GDL のバリア機能を改善させる新たな治療法の可能性を示唆する。

我々は、GDL 患者由来の角膜上皮から SV40 large T 遺伝子と hTERT 遺伝子を導入し、不死化角膜上皮細胞の樹立に成功した。樹立した GDL 不死化角膜上皮細胞は in vivo と同様に、タイトジャンクション関連タンパクである CLDN1 と CLDN7 の発現レベルが低下していた。また TACSTD2 遺伝子の導入を行うと、タイトジャンクション関連タンパク発現レベルの正常化と、その局在の改善を認めた。本研究で樹立した細胞ラインを用いて更なる解析をすることで、新たな病態解明や治療法の開発につながることを期待される。