

助成番号 0839

水晶体発達と白内障発症メカニズムにおける Na-Ca 交換体の役割

毛利 聡

川崎医科大学 生理学1

概要 【目的】 Ca は多くの細胞種においてセカンドメッセンジャーとして細胞内情報伝達に関わっており水晶体機能発達にも不可欠であるが、その一方で Ca の蓄積が白内障を惹起するメカニズムに関しても明らかになってきた。しかし、水晶体発達・白内障発症にどのようなイオンチャネル・トランスポータが関与して Ca の蓄積を起しているかについては現時点で不明である。我々は水晶体細胞における Ca 流入・流出に関わるイオンチャネル・トランスポータのうち、Ca 排出系である Na-Ca 交換体に注目し、発育期における生理的役割を調べるとともに白内障発症メカニズムにおける役割を明らかにするため、生化学的手法による検討と、組織レベルでの新しい評価法として X 線位相差断層像による水晶体タンパク濃度の可視化に取り組んだ。

【方法】 ウサギを用いて Na-Ca 交換体(アイソフォーム:I・II・III 型)抗体を作成し、正常ラット摘出水晶体にて I 型 Na-Ca 交換体が発現しているのを確認し、ヒト白内障水晶体、カルシウムイオノフォア(A23187)存在下でのラット培養水晶体、ストレプトゾシン投与白内障水晶体について検討した。

【結果と考察】 ラット水晶体には心筋での報告と一致して 120 kD 付近にリン酸化などによる修飾を受けていると考えられる複数のバンドとして現れ、Na-Ca 交換体の活性調節とそれによる Ca ホメオスタシス制御の可能性が示唆された。ヒトの白内障治療のため人工レンズ植え込み術の際に摘出した水晶体を検討したところ、正常の I 型 Na-Ca 交換体は極少量であり、70 kD に断片化されたものが観察された。水晶体線維細胞内への Ca 急性増加の影響を観察するためにラット摘出水晶体をカルシウムイオノフォア(A23187)存在下に培養したところ、ヒト白内障水晶体と同様に Na-Ca 交換体の切断が確認された。ストレプトゾシン投与白内障モデルによる検討では、水晶体の白濁に先行して Na-Ca 交換体が切断されており、白内障の進行には Na-Ca 交換体の細胞内 Ca 排出能低下が関与している可能性が示唆された。また、X 線位相差断層像による水晶体の非破壊タンパク分布評価法を開発したので、今後 Na-Ca 交換体の修飾や機能低下が水晶体の発達や白内障進行にどのような影響を及ぼしているか検討する予定である。

1. 研究の目的

水晶体は胎生期より外側に新たな細胞を付け加えて遠心的に成長する(**Figure 1** 左図)。その過程で中心の細胞から順次核や細胞内小器官を消失させることで光の散乱を防いでいるが、細胞内に残された高濃度タンパク(クリスタリン)は代謝されることなく数十年にわたり凝集を免れて水晶体の透明性を保ち続ける。しかも、水晶体には中心部のタンパク濃度が高く、周辺部に向かうに従って濃度が低くなる勾配があり(**Figure 1** 右図)、これは球面収差を補正して網膜への適切な結像に役立っている。このような発

育期の細胞制御及びその後の長期にわたる透明性維持における驚くべき特性に関して、水晶体細胞内 Ca ホメオスタシスが深く関わっていることを示す知見が蓄積されてきている。Ca は多くの細胞種においてセカンドメッセンジャーとして細胞内情報伝達に関わっており水晶体機能発達にも不可欠であるが、その一方で Ca の蓄積が白内障を惹起することも明らかになってきた。しかし、水晶体発達・白内障発症にどのようなイオンチャネル・トランスポータが関与して Ca の蓄積を起しているかについては現時点で不明である。

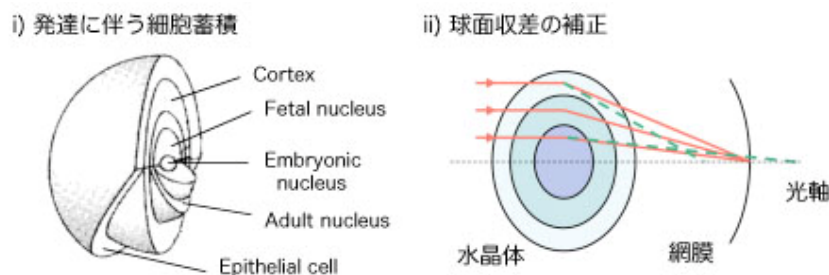


Figure 1. 水晶体は外側から幼弱な細胞が加わる成長形態により中心部ほどクリスタリン濃度が高くなり、これは ii) に示すように「球面収差」と呼ばれる内外の層での入射角の違いによる焦点面の「ずれ」を補正する役割を果たしている。このような視機能維持に必要な成長期のタンパク濃度勾配形成にも Na-Ca 交換体が関与していると考えられる。

そこで我々は水晶体細胞における Ca 流入・流出に関わるイオンチャネル・トランスポーターのうち、Ca 排出系である Na-Ca 交換体に注目し、発育期における生理的役割を調べるとともに白内障発症メカニズムにおける役割を明らかにしようと考えた。これまで Na-Ca 交換体は心筋収縮のための Ca ハンドリングを司る重要なイオントランスポーターとして様々な研究がなされ、心筋の肥大にも関わっていることが解明されている。心臓における Na-Ca 交換体の分子機能や病態生理が次々と解明される一方で、他臓器では Na-Ca 交換体が発現しているにも拘わらずその役割は明らかになっていない。水晶体も例外でなく、Na-Ca 交換体アイソフォーム特定や成長に伴う変化、部位による発現の違いも報告されていない。また、白内障においては Ca の蓄積が認められること、水晶体細胞からの Ca 排出は Na-Ca 交換体と Ca-ATPase (ATP を消費して Ca を細胞外に排出する分子システム) の 2 経路であり前述のように水晶体細胞は分化に伴って細胞内小器官を消失し ATP 生成能も失うため Ca-ATPase の役割が減弱することを考えれば、水晶体細胞からの Ca 排出にはエネルギーを消費しない Na-Ca 交換体が重要な役割を果たしている可能性がある。このように水晶体の発達や白内障の発生機序には Na、Ca といった無機塩類の制御が深く関わっており、水晶体タンパクとの相互関係を明らかにしていくことで Na-Ca 交換体の水晶体における生理的役割や白内障の病態における分子メカニズムを明らかにすることが出来る。また、水晶体の組織レベルでの制御を検討するためには、水晶体のレンズとしての機能を非破壊で評価する必要がある。そこで大型放射光施設;SPring-8 にて X 線位相差 CT による水晶体タンパク濃度勾配の可視化法を開発する。

2. 方法と結果

1) 水晶体における Na-Ca 交換体発現と、発達に伴う変化を確認するために、ウサギを用いて Na-Ca 交換体(アイソフォーム:I・II・III 型)抗体を作成し、正常ラット摘出水晶体にて I 型 Na-Ca 交換体のみが発現しているのを確認した。心筋での報告と一致して、120 kD 付近に複数のバンドとして現れ、リン酸化などによる修飾を受けて Na-Ca 交換体の活性が変化し、Ca ホメオスタシスを制御している可能性を示している。成長に伴って、単位タンパク量あたりの Na-Ca 交換体量は減少していた (Figure 2)。

2) 白内障発症の病態への Na-Ca 交換体関与の可能性を調べるために、白内障治療のため人工レンズ植え込み術の際に摘出した水晶体では正常の I 型 Na-Ca 交換体は極少量であり、70 kD に断片化されたものが観察された (Figure 3)。

3) 白内障を起こしたヒト水晶体における Na-Ca 交換体の変化を動物を用いた白内障モデルにて検討できるか確認するために、カルシウムイオノフォア (A23187) を用いた急性実験モデルにて検討した。生後 4 週齢のラット摘出水晶体を DMEM 培地にて組織培養したものを対照とし、A23187 を 10 mM となるように加えて 24 時間後に DMEM 培地に置換して 3 日、5 日、7 日でウェスタンブロットを行った。A23187 存在下で培養された水晶体は Figure 4 に示されるように培養 3 日目まで白濁を認め、Figure 5 に示されるように正常 Na-Ca 交換体の減少を認めた。

4) カルシウムイオノフォアによる急性実験に続き、ストレプトゾシン投与による糖尿病性白内障における水晶体 Na-Ca 交換体について検討した。6 週齢 SD ラットに 70mg/kgBW を 1 回腹腔内投与し、14 日目、25 日目、35

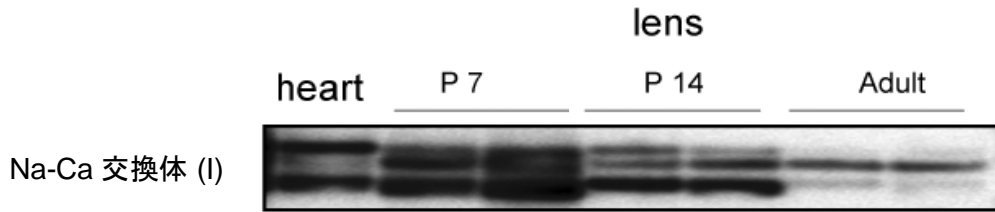


Figure 2. 抗 Na-Ca 交換体(アイソフォーム I)抗体を用いたウエスタンブロットにより、ラット水晶体において心臓に発現しているものと同じ 120 kD のタンパクが検出され、リン酸化などによると思われる複数のバンドが確認された。単位タンパク量あたりの Na-Ca 交換体は発達とともに減少していた。(心臓は 0.2 mg/lane、水晶体はそれぞれ 40 mg/lane で解析)

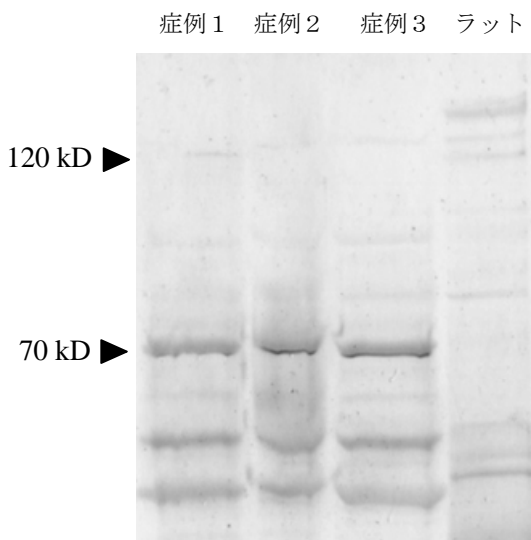


Figure 3. Na-Ca 交換体の白内障発症への関与を検討するために白内障にて人工レンズへの置換術を受けた症例の水晶体のウエスタンブロットを行った。3 症例とも正常 Na-Ca 交換体が減少し、70 kD に断片化されたものが観察された。ヒト正常水晶体と比較出来ないため、対照としてラット水晶体を示している。

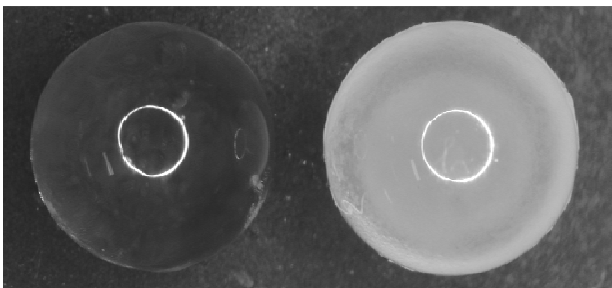


Figure 4. カルシウムイオノフォア (A23187, 10 mM) にて 24 時間培養し、さらに 2 日間 DMEM 培地にて培養を行うと水晶体に強い白濁を認めた。

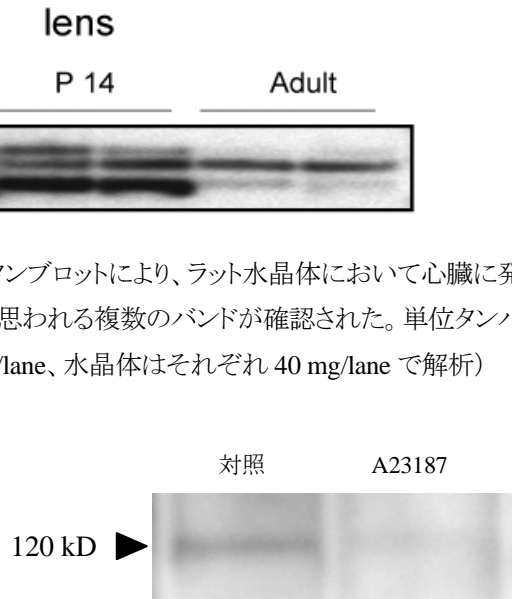


Figure 5. カルシウムイオノフォア (A23187, 10 mM) にて培養した水晶体のウエスタンブロット。正常 Na-Ca 交換体の減少を認める。



Figure 6. ストレプトゾチン投与後 14 日目、25 日目、35 日目の Na-Ca 交換体。肉眼的白濁を認めない 14 日目から正常 Na-Ca 交換体の減少を認める。

日目でウエスタンブロットを行った。水晶体は 14 日目、25 日目では肉眼的白濁を認めなかったが、正常 Na-Ca 交換体は 14 日目より減少しており、Na-Ca 交換体の減少・機能低下が細胞内カルシウム排出を低下させて白内障を惹起させている可能性が示唆された (Figure 6)。

5) 水晶体内のタンパク濃度勾配が視機能に重要な役割を占めることは前述したが、水晶体中心部のタンパク濃度が高く周辺部が低いことは、これまで生化学的手法にて示されてきたが、水晶体を破壊せずに評価する方法が無かったため、正確な位置情報を得ることが出来なかった。今回のプロジェクトでは X 線位相差 CT による水晶体タンパク濃度可視化法の開発を行うことで、世界で初めて水晶体内のタンパク濃度勾配を可視化した。

生体軟部組織は軽元素からなりX線吸収の差が小さいため吸収X線CTでは臓器・組織の内部情報を得ることが出来ない。一方 SPring-8 での位相差 X 線 CT では、1%の密度差を 10 mm の空間分解能で可視化できるため、軟部組織内の性質を評価可能である (Figure 7)。

Bonse-Hart 型干渉計を用いた位相差 CT 装置を組み立てパラホルムアルデヒドにて固定したラットの摘出眼球を撮影した。X 線エネルギーは 25 keV とし、X 線検出器は、BM2 (f = 50 mm, 視野 12 mm) と C4880-41S (f = 105 mm) の組み合わせを用いた (Figures 8-10)。

生後週齢と水晶体タンパク濃度の実際の解析 (Figure 8, 9) と生後週齢による水晶体内最大及び平均タンパク濃度変化 (Figure 10) を示す。水晶体内では中心の核部においてタンパク濃度が高く、周辺部に行くに従って濃度が低くなっていることを観察し、定量することが出来た。また、経時変化に関しては、発達に伴って生殖週齢 (8 週齢) まで水晶体内タンパク濃度が上昇していることを観察できた。

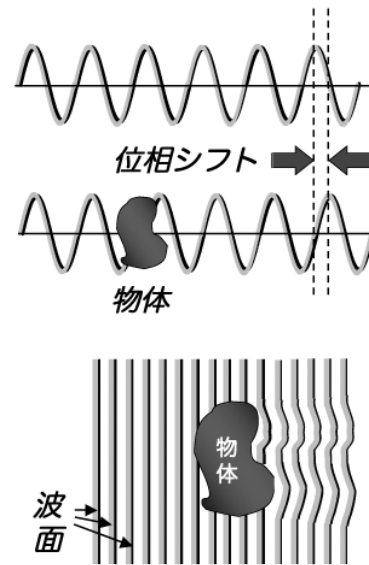


Figure 7. X 線位相差 CT は物体にX線が衝突した際の位相のずれを検出するため、通常の吸収X線 CT では X 線吸収の差が小さいために描出出来ない軟部組織内の性質を検出することが可能である。

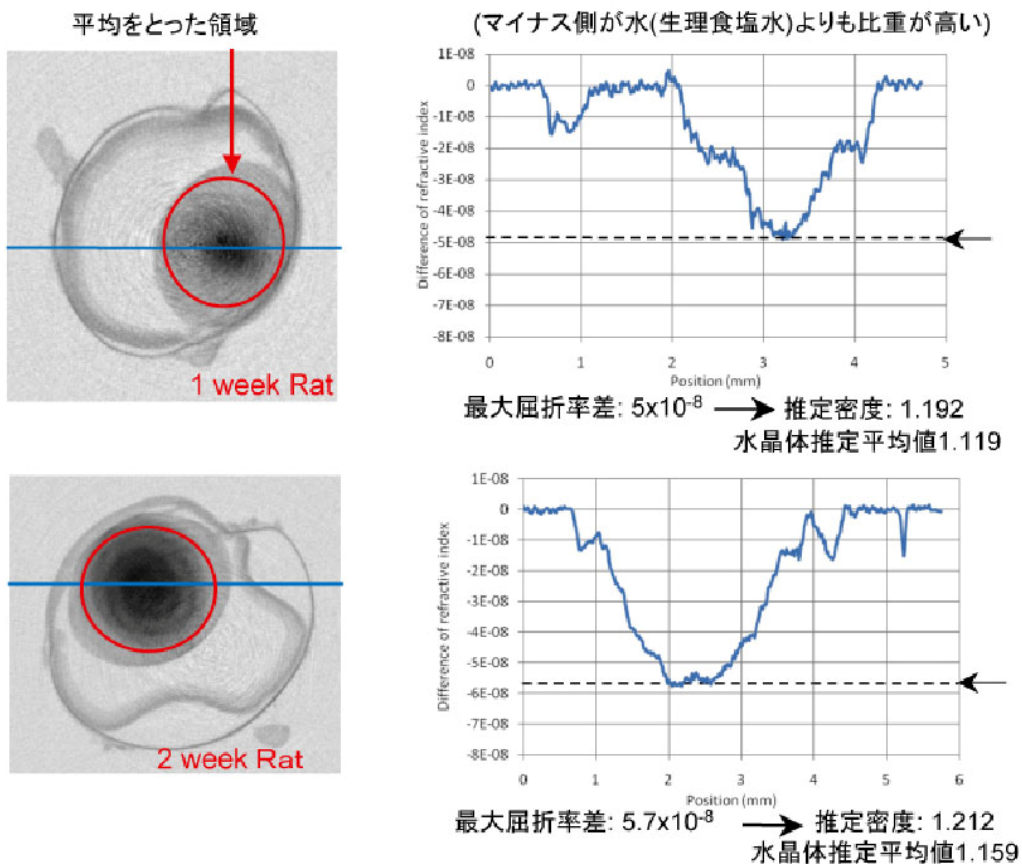


Figure 8. 生後 1 週および 2 週のラット眼球の X 線位相差 CT 像

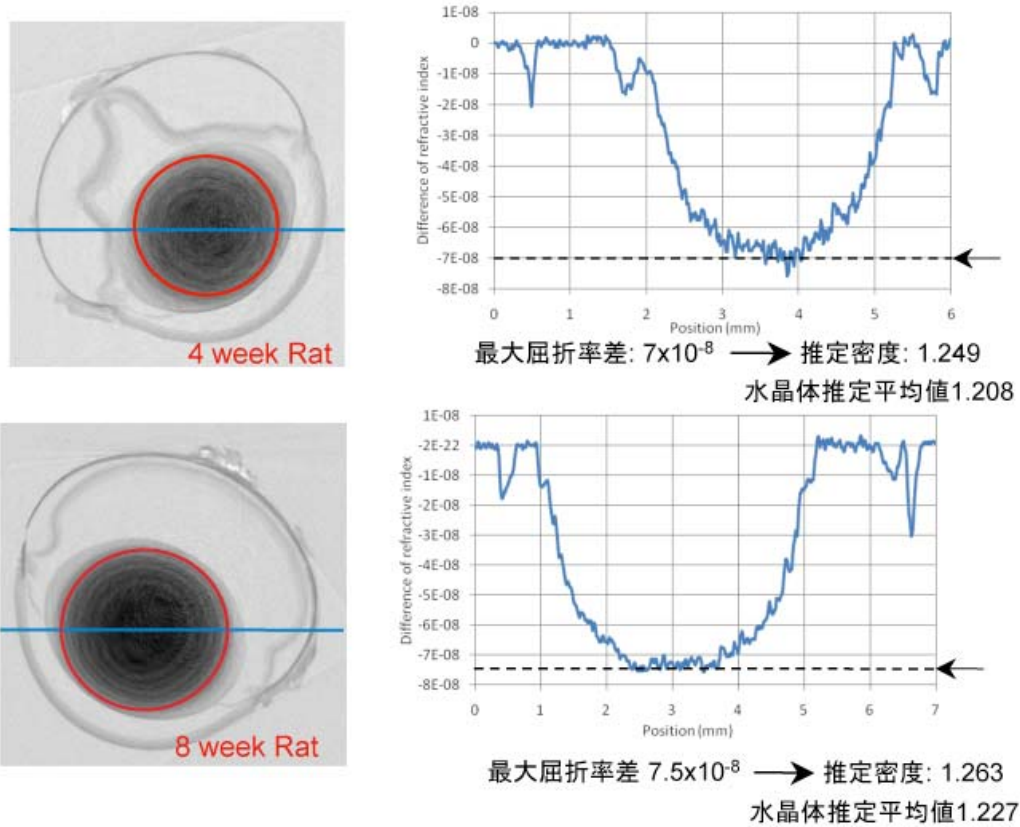


Figure 9. 生後4週および8週のラット眼球のX線位相差CT像

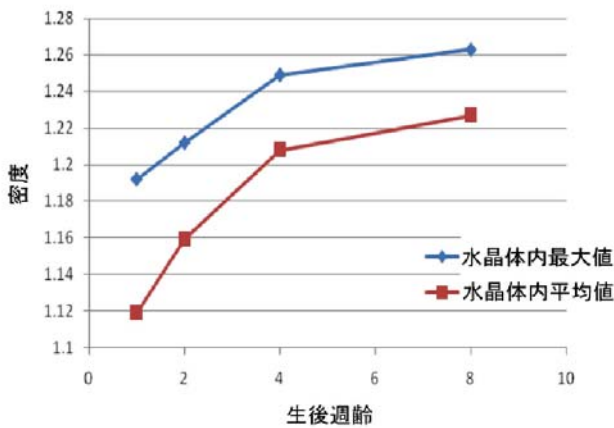


Figure 10. 生後週数と水晶体内タンパク濃度の相関

これまでの研究で、齧歯類の水晶体を用いたタンパク濃度勾配の可視化法を確立することが出来た。その正当性を確認するために水晶体タンパク濃度の異なる生後週齢の動物を用いて発達に伴う濃度上昇を初めて定量することが出来た。

3. 考察

水晶体の生理機能は眼内に入射する光を網膜に結像することであり、高濃度のタンパクにより透明且つ高屈折率なレンズの役割を果たしている。水晶体はその発達において、細胞内小器官である核やゴルジ体も順次消失して最終的には高濃度クリスタリンを含む袋となり、新たなタンパクの合成・吸収も行われなくなる。本研究では発育過程においてNa-Ca交換体の発現が変化していること、またヒト白内障発症水晶体およびカルシウムイオノフォア誘発白内障モデル、ストレプトゾシン誘発糖尿病モデルにおいてもNa-Ca交換体が減少していることを発見することが出来、水晶体細胞の分化や白内障の発症にはNa-Ca交換体を介したカルシウム制御機構とその破綻が関与している可能性が示された。

白内障の発症にはカルシウムの水晶体内蓄積が関係していることが古くから報告され¹⁾、水晶体細胞内のカルシウムは細胞外ナトリウム濃度の関係からNa-Ca交換体による制御されているという報告がなされていた²⁾。また、白

内障発症には水晶体細胞内のカルシウム濃度上昇に続いてカルパインが活性化することによるクリスタリンの分解が報告されていたが^{3,4)}、Na-Ca 交換体に関する研究は活性阻害薬と水晶体透明性の関係など、急性実験による報告⁵⁾があるのみで、白内障発症過程における Na-Ca 交換体の発現量の活性変化について検討した報告は無かった。本研究ではストレプトゾシン投与白内障糖尿病モデルで、水晶体の肉眼的白濁を認める前から Na-Ca 交換体が減少していたことから、その病態の一つとして Na-Ca 交換体の減少による細胞外へのカルシウム排出機能の低下が原因となっている可能性が示唆された。

4. 今後の展開

現在、Na-Ca 交換体を強発現させるトランスジェニックマウスを作製しており、水晶体発達過程における Na-Ca 交換体のタンパク濃度調節に関する影響や白内障モデルにおける変化を、分子レベル並びに X 線位相差 CT を用いた組織レベルでの評価を行いたいと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご援助を賜りました財団法人

人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- (1) Duncun G, Bushell AR. The bovine lens as an ion-exchanger: a comparison with ion levels in human cataract lenses. *Exp Eye Res.* 23, 341-353, 1976.
- (2) Tomlinson J, Bannister SC, Croghan PC, Duncan G. Analysis of rat lens 45Ca^{2+} fluxes: evidence for $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchange. *Exp Eye Res.* 52, 619-627, 1991.
- (3) Fukiage C, Azuma M, Nakamura Y, Tamada Y, Shearer TR. Nuclear cataract and light scattering in cultured lenses from guinea pig and rabbit. *Curr Eye Res.* 17, 623-35. 1998.
- (4) Sakamoto-Mizutani K, Fukiage C, Tamada Y, Azuma M, Shearer TR. Contribution of ubiquitous calpains to cataractogenesis in the spontaneous diabetic WBN/Kob rat. *Exp Eye Res.* 75, 611-617. 2002.
- (5) Tamiya S, Delamre NA. The influence of sodium-calcium exchange inhibitors on rabbit lens ion balance and transparency. *Exp Eye Res.* 83, 1089-1095, 2006

No. 0839

Roles of Sodium-Calcium Exchanger in Lens Development and Cataractogenesis

Satoshi Mohri

First Department of Physiology, Kawasaki Medical School

Summary

Although intracellular calcium homeostasis is essential to the control of lens fiber cell differentiation to maintain the special properties of lens, i.e., transparency and high refractivity, the molecular mechanism of calcium regulation in lens remains unclear. To keep high gradient across the plasma membrane (10 times higher in aqueous humor than lens cytoplasm), lens needs to export calcium continuously.

To assess the role of Na-Ca exchanger (NCX) that catalyzes reversible exchange of Na for Ca across the plasma membrane in lens, we characterized NCX isoforms expressed in developing rat lens and investigated the changes in cataractous lens. NCX 1 antibody recognized the molecule of 120 kD, which is mature NCX 1, in both neonatal and adult lens, while anti-NCX2 and 3 antibodies did not detect any band. NCX1 expression was prominent in younger lens and was decreased with rat development. In human cataract lenses, mature NCX 1 was decreased and degraded products were observed. Similar changes were observed in calcium ionophore (A23187, 10 μ M)-induced cataractous excised and cultured lenses. Streptozocin-treated (70 mg/kgBW, i.p.) rats showed NCX1 degradation in lenses before getting turbidity. These results indicated that the dysfunction of calcium efflux due to degradation of NCX1 can be a cause of cataractogenesis. Moreover, we visualized lens protein concentration gradient by phase-contrast X-ray CT to evaluate the protein distribution in whole lens.