

小児白内障における細胞骨格蛋白質の変化

松島 博之, 向井公一郎, 小原 喜隆

獨協医科大学眼科学教室

要 約

目 的：小児に発症する白内障の約 50% は原因不明で、分子細胞生物学的な報告は少ない。小児白内障の発症機序を明らかにするために、混濁水晶体の細胞骨格蛋白質を中心に解析した。

方 法：対象は、白内障手術を施行した小児白内障患者 10 例 10 眼で、解析方法としてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動(SDS-PAGE)、densitometry analysis, western blotting を使用した。

結 果：SDS-PAGE で、後囊下混濁の水晶体で細胞骨格蛋白質を含む高分子領域のバンドで減少があった。

Densitometry analysis, western blotting では後囊下混濁の水晶体で、spectrin (235 kDa), filensin (100 kDa), vimentin (57 kDa) の減少が生じ、クリスマスツリー白内障、層間白内障の水晶体では densitometry analysis で filensin, vimentin の増加がみられた。

結 論：小児白内障の発症機序に細胞骨格蛋白質の変動が関与していることが推測された。(日眼会誌 103: 647-652, 1999)

キーワード：先天白内障, 小児白内障, 細胞骨格蛋白質

Changes in Cytoskeletal Proteins in Childhood Cataract Lenses

Hiroyuki Matsushima, Kouichirou Mukai and Yoshitaka Obara

Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine

Abstract

Purpose : Approximately 50% of congenital and childhood cataract seen in the clinic is of undetermined origin. Biochemical analysis of the cataracts is rare. This study analyzes lens proteins to determine the mechanism of congenital and childhood cataracts.

Method : We analyzed the lens proteins from 10 young patients after cataract operations, using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), densitometry analysis, and western immunoblotting.

Results : Densitometry of separated proteins showed a decrease in the high molecular protein bands of posterior subcapsular cataract (PSC). Spe-

cifically, spectrin (235 kDa), filensin (100 kDa), and vimentin (57 kDa) were absent from the SDS-PAGE of PSC. Increases in filensin and vimentin were observed in a Christmas tree cataract and lamellar cataracts. Western immunoblots confirmed the densitometry of SDS-PAGE.

Conclusion : These results suggest that changes in cytoskeletal proteins may contribute to congenital and childhood cataract. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 647-652, 1999)

Key words : Congenital cataract, Childhood cataract, Cytoskeletal protein

I 緒 言

白内障の原因を特定することは難しい。とりわけ小児に発症する白内障では、遺伝性、感染症、薬物、放射線、外傷、代謝異常、そして皮膚疾患などが存在する場合は原因が明らかになる可能性があるが、大半は原因不明のままである。また、発症機序に関してはなおさらのこと解明されていない^{1)~3)}。分子生物学的には α , β_2 , γ_2 クリスタリン

の増加⁴⁾・ α , γ クリスタリンの消失^{5)~9)}や sorbitol dehydrogenase の欠損¹⁰⁾などの報告がある程度である。

水晶体は蛋白質を 33% も含む高蛋白質の器官である。蛋白質はクリスタリンを主体とするバッファー溶性蛋白質(以下、水溶性蛋白質)で構成されているが、白内障ではバッファー不溶性蛋白質(以下、不溶性蛋白質)の増加が指摘されている。不溶性蛋白質は不溶化したクリスタリンと細胞骨格蛋白質、膜蛋白質などで構成されている。近

別刷請求先：321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880 獨協医科大学眼科学教室 松島 博之

(平成 11 年 1 月 22 日受付, 平成 11 年 5 月 10 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroyuki Matsushima, M.D. Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0293, Japan

(Received January 22, 1999 and accepted in revised form May 10, 1999)

年,細胞骨格蛋白質は水晶体蛋白質の2~4%を占め水晶体の透明性維持に対する重要性が着目されている¹¹⁾が,未だにその透明性維持に対する作用と白内障の関係に関する研究は少ない。

今回,小児白内障の発症機序を明らかにするために,小児白内障の手術で得た水晶体を水晶体の透明性維持に何らかの重要な役割を持つと思われる⁶⁾細胞骨格蛋白質の変化について検討した。

II 実験方法

1. 水晶体の観察と不溶性蛋白質の分離

小児白内障患者10例10眼の水晶体を細隙灯で観察し,前囊,核,後囊に分けて水晶体の混濁を分類した。混濁水晶体は超音波乳化吸引術で摘出し,直ちに-80℃に凍結した。解凍後,摘出した各々の水晶体をホモジェネートし〔20 mM sodium phosphate+1.0 mM ethyleneglycol-bis (β-aminoethylether) -N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), pH 7.0〕, 12,000 g で15分間遠心することにより,不溶性蛋白質を分離した。上清を他のマイクロチューブに移し,再び同じ手順を2回繰り返した。集めた上清を水溶性蛋白質とし,残った沈殿物に8Mの尿素溶液を加えて溶解した成分を不溶性蛋白質溶液とした。蛋白質はBCA protein assay reagent (PIERCE)とスタンダードとしてウシ血清アルブミンを使用して定量した。

2. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動(SDS-PAGE)

各々のバッファー不溶性蛋白質は4~20%のTris-glycine gradientゲル(TEFCO)を用いたSDS-PAGEで解析を行った。各々のウェルに8μgの蛋白質を対象に表示してある番号順(年齢順,図1)に注入した。ゲルは200Vで1時間15分泳動した後,coomassie brilliant blue R-250を使用して染色後,脱色を行った。ゲルはゲルドライキット(TEFCO)を使用して乾燥保存した。

3. Densitometry analysis

SDS-PAGEゲル上の微細な変化を観察するためにdensitometry analysisを行った。ゲルは乾燥した後にスキャナーを使用し,8 bit/pixelグレイスケールイメージとして取り込み,ゲル上のバンドの密度についてNIH image 1.60を使用して解析した。細胞骨格蛋白質である42 kDa (actin), 57 kDa (vimentin), 100 kDa (filensin), 235 kDa (spectrin)のバンドについて解析を行った。

4. Western blotting

蛋白質の同定と細胞骨格蛋白質の変化をみるため,western blottingをPVDF(TEFCO)を使用して行った。サンプルの注入はSDS-PAGEと同様に対象に示した番号順に行った。SDS-PAGEを行った後,26Vで2時間転写を行った。ブロッキング液としてBLOTTO(5% non-fat dry milk+0.1% Tween-20)を使用した。一次抗体としてanti-actin(ICN), anti-vimentin (Sigma), anti-file-

症例	水晶体混濁程度			年齢	性別	白内障のタイプ
	前囊	核	後囊			
1				1歳10か月	女	後囊下混濁 層間白内障
2				4歳	男	アトピー性皮膚炎 クリスマスツリー 白内障
3				6歳6か月	男	後囊下混濁
4				6歳8か月	男	ステロイド 白内障 後囊下混濁
5				8歳	女	後囊下混濁
6				10歳	女	家族性 層間白内障
7				11歳	女	ぶどう膜炎 後囊下混濁
8				12歳	男	家族性 層間白内障
9				13歳	男	層間白内障
10				17歳	男	網膜色素変性 後囊下混濁

図1 対象。

左側から順に,症例番号,白内障のタイプ,年齢,性別,その他を示す。対象は先天白内障,小児白内障で1歳10か月~17歳までの10例。白内障のタイプは後囊下混濁,層間白内障,クリスマスツリー白内障であり,アトピー性皮膚炎,ステロイドの長期投与,ぶどう膜炎,網膜色素変性症を伴う症例があった。

nsin (Sigma), anti-spectrin (Sigma)を用意し,二次抗体としてalkaline phosphataseを含んだanti-mouse, anti-rabbit IgG (Bio-Rad)で標識し,BCIP/NBT (Bio-Rad)で発色させた。

III 結果

1. 水晶体の細隙灯による観察(図1)

症例は1歳10か月~17歳までの10例10眼で,症例1,3,4,5,7,10は後囊下混濁を生じていた。症例4は6歳8か月の男児で,長期のステロイドが原因とみられる典型的な後囊下混濁を生じていた。症例2は4歳のアトピー性皮膚炎の症例であったが,クリスマスツリー白内障を呈していた。先天白内障によくみられる層間白内障は症例1,6,8,9でみられ,症例6と8は兄弟で,家族性白内障が疑われた。症例7の11歳の症例はぶどう膜炎発作を繰り返しているうちに白内障が進行した症例で,症例10の17歳の症例は網膜色素変性症を合併していた。

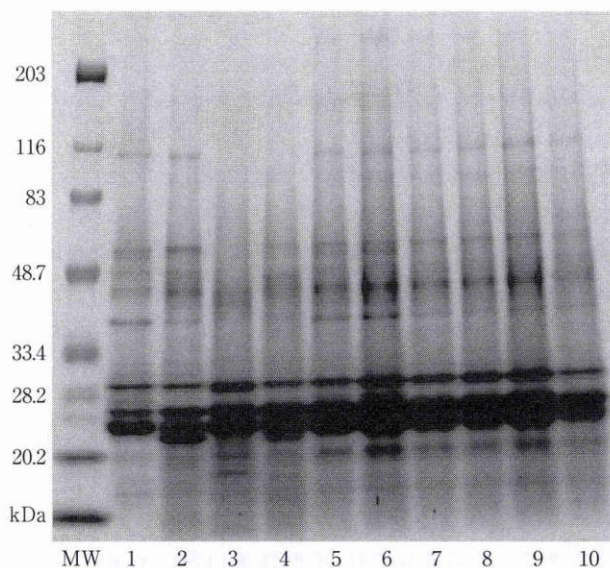


図2 小児白内障水晶体不溶性蛋白質のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動(SDS-PAGE)。

最初のレーンが分子量マーカー(MW)を示し、番号が対象に示してある症例番号を示す。症例3,4で高分子領域のバンドが減少していた。また、年齢の増加とともに高分子領域のバンドは減少する傾向にあった。

2. SDS-PAGE(図2)

SDS-PAGE では、後囊下混濁の症例3,4で細胞骨格蛋白質を含む高分子領域のバンドである235,100,60,57,42,38 kDaの減少があった。症例2のクリスマスツリー白内障では、クリスタリン領域24 kDa付近に新たなバンドが出現していたが、バンドの同定までには至らなかった。その他の症例では、年齢の増加とともに高分子領域235,100,60,57,42,38 kDaのバンドは減少していく傾向があった。クリスタリン領域は、バンドの濃さに各々の症例で相違はあったが、大きな変化はなかった。

3. Densitometry analysis(図3)

詳細な変化を観察するため、SDS-PAGE で得たゲルを NIH image を使用して解析を行った。後の western blotting(図4)で示すように235,100,57,42 kDaのバンドは各々 spectrin, filensin, vimentin, actin の抗体と反応した。Spectrin(235 kDa)は、SDS-PAGE 上に0.07~0.33%で、症例3,4,10でバンドが消失していた。Filensin(100 kDa)は0.31~0.76%, vimentin(57 kDa)は1.05~2.55%で、症例3と4でバンドが消失していた。また、filensin, vimentin は層間白内障である症例1,8,9とクリスマスツリー白内障の症例2で他の症例より増加していた。Actin(42 kDa)は0.5~5.3%で、症例5では他の症例と

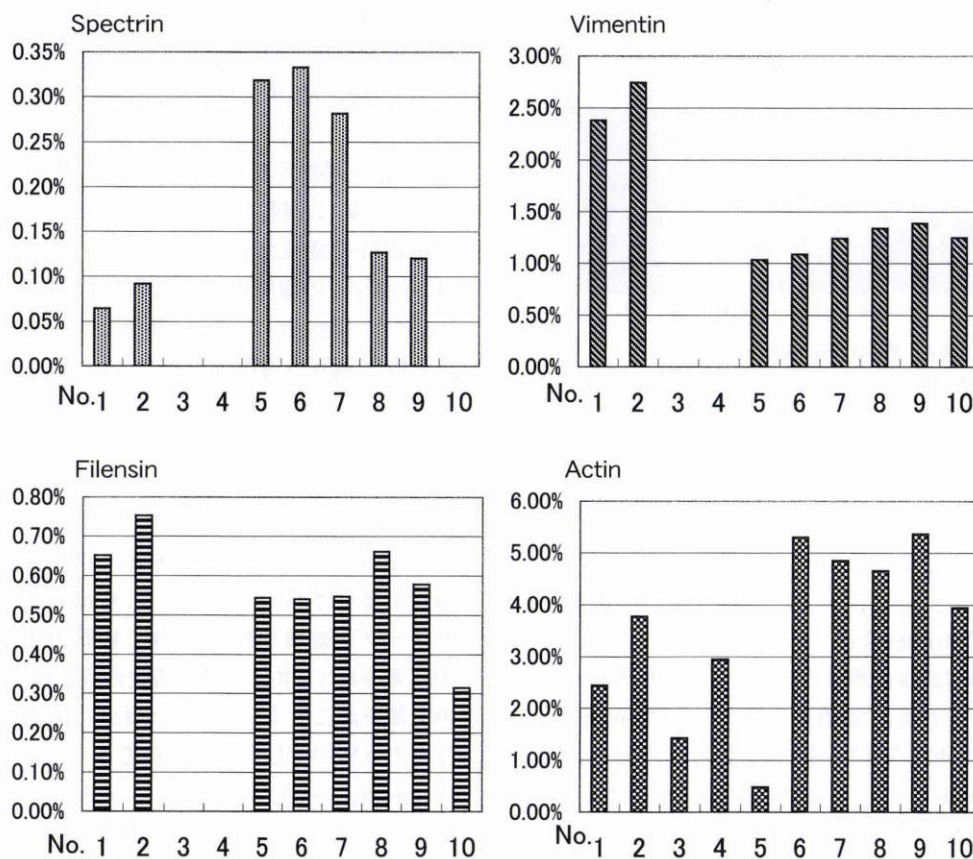


図3 Densitometry analysis.

図2の結果を用いて densitometry analysis を施行した。図下の番号が症例番号を示す。235 kDa の spectrin は症例3,4,10で密度が消失,100 kDa の filensin と57 kDa の vimentin で症例3,4で密度が消失していた。42 kDa の actin は大きな変化はなかった。

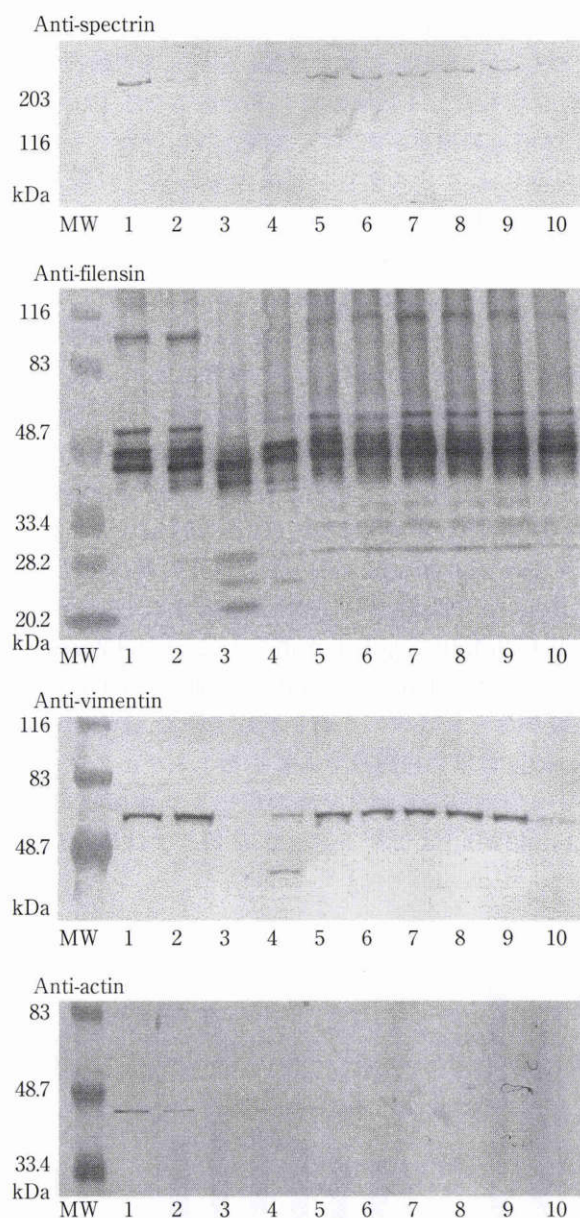


図4 Western blotting.

SDS-PAGE で使用したサンプルを使って western blotting を行った。図下の番号が症例番号を示す。Spectrin は症例 2, 3, 4, filensin と vimentin では症例 3, 4, actin では症例 3~10 で反応の減少もしくは消失があった。

比べて密度が減少していた。完全にバンドが消失している症例はなかった。

4. Western blotting (図4)

Spectrin (235 kDa) は症例 2 クリスマスツリー白内障と症例 3, 4 の後囊下混濁で消失していた。Filensin (100 kDa) の結果では、40~50 kDa 付近に交差反応様の所見がみられたが、filensin の分子量である 100 kDa 付近で強く反応があり、症例 3 と 4 でこの 100 kDa のバンドの消失と同時に低分子量領域のバンドが増加していた。Vimentin (57 kDa) の結果では、症例 3, 4, 10 でバンドの消失や減少があった。Actin (42 kDa) に関しては densitometry analysis の結果と異なり、症例 3~10 でバンド

が消失していた。

IV 考 按

今回の結果から、① 小児水晶体の性状について蛋白質の解析を免疫電気泳動法を行うことにより検討した。② 症例の中には高度の蛋白質の degradation が生じている水晶体 (症例 3, 4) があった。③ ステロイド白内障を含む後囊下混濁の 2 例 (症例 3, 4) では spectrin, filensin, vimentin の変化が高度であった。④ 層間白内障、クリスマスツリー白内障の水晶体 (症例 1, 2, 8, 9) で filensin, vimentin の割合が亢進していたなどの事実が明らかになった。

水晶体は蛋白質に富む組織で、90% を占める水溶性蛋白質と 10% を占める不溶性蛋白質とから構成される¹²⁾¹³⁾。水溶性蛋白質は、主に α クリスタリンと $\beta \cdot \gamma$ クリスタリンから構成され、不溶性蛋白質は不溶化したクリスタリンと細胞骨格蛋白質、膜蛋白質などから構成される¹³⁾。また、白内障を生じることにより、水晶体中の不溶性蛋白質の割合が増加することが過去に報告¹⁴⁾¹⁵⁾されている。細胞骨格蛋白質は不溶性蛋白質に含まれ、2~4% 水晶体中に存在し、主に水晶体上皮と水晶体皮質に存在する vimentin-actin-tubulin component と水晶体皮質から核にかけて存在する beaded chain filament (filensin-CP 49) から成る¹⁶⁾。機能については種々の報告があり、水晶体線維細胞の増殖伸長に関与していることや、水晶体の透明性維持に重要な役割があることが報告¹¹⁾されている。

今回の実験で、特に特徴的であったのは後囊下混濁の 2 例において細胞骨格蛋白質である spectrin, filensin, vimentin の変化が高度であったことである。文献上では、spectrin の血球中での蛋白質同士のネットワークの形成¹⁷⁾¹⁸⁾、filensin の crystallin や vimentin とネットワーク形成と細胞の透明性維持¹⁹⁾、vimentin の水晶体上皮細胞での脱核、水晶体上皮細胞の分化・伸長に対しての関与が報告²⁰⁾²¹⁾されている。これらの報告を基に考按すると、後囊下混濁発症機序として一つの仮説ができる。後囊下混濁を起こすような症例では、spectrin, filensin, vimentin といった細胞骨格蛋白質が水晶体細胞の成長過程で障害されることにより、水晶体蛋白質同士のネットワークが破壊され、水晶体上皮細胞の脱核、分化、伸長が障害されて、水晶体線維細胞の成長障害が生じ、後囊下の混濁を起こすものと推測される (図5)。しかしながら、今回の症例中では後囊下混濁を生じた 5 例中 2 例において spectrin, filensin, vimentin の変化がみられたが、他の症例ではみられなかった。白内障の発症機序はその発症原因が多数あるのと同様に、決して一つの仮説で説明が付くとは考えられない。他のタイプの白内障については、層間白内障、クリスマスツリー白内障の症例で、vimentin と filensin の存在が亢進していた。過分な水晶体線維細

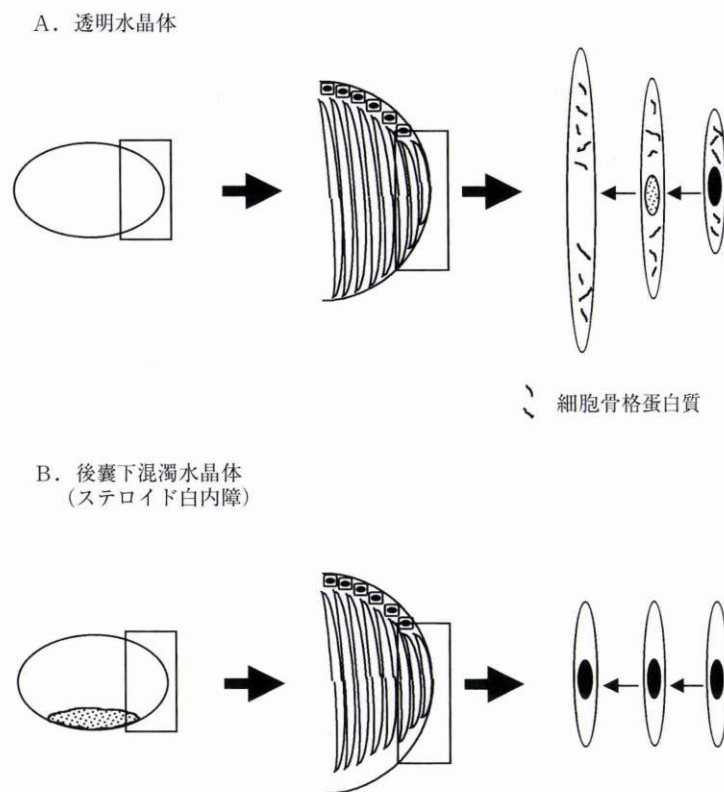


図 5 後囊下混濁(仮説).

A の透明水晶体では, 水晶体細胞内に正常な細胞骨格蛋白質が存在し, 細胞の脱核, 分化, 伸長が進み正常の水晶体構造を形成して, 透明性を維持できる. B の後囊下混濁を生じた水晶体は, 水晶体内の細胞骨格蛋白質が減少, 消失しているため, 細胞の脱核, 分化, 伸長が障害され, 水晶体後極部に混濁を生じる空間ができることが推測できる.

胞の伸長に關与する細胞骨格蛋白質の存在により, 水晶体皮質から核への細胞伸長が障害され, 核周辺および核部の混濁を生じることも推測できる.

細胞活性の豊かな小児期においても, 細胞骨格蛋白質の構成に異常な動態がみられることが明らかとなった. 小児白内障の原因として, 新たに細胞骨格蛋白質の減少・過剰が關与していることがわかった.

本研究に当たり, ご指導していただいたワシントン州立大学 John I Clark 先生, Dundee 大学 Roy A Quinlan 先生と獨協医科大学学生化学教室の五十嵐吉彦先生に謝意を表する.

本論文の要旨は第 52 回日本臨床眼科学会で報告した.

文 献

- 1) Merin S, Crawford JS: The etiology of congenital cataracts. Can J Ophthalmol 6: 178—182, 1971.
- 2) Barry AK: The differential diagnosis of cataracts in infancy and childhood. Am J Dis Child 130: 184—192, 1976.
- 3) Jain IS, Pillay P, Gangwar DN, Dhir SP, Kaul VK: Congenital cataract: Etiology and morphology. J Pediatr Ophthalmol Strabismus 20: 238—242, 1983.
- 4) de Jong PTVM, Bleeker-Wagemakers EM, Vrengs GFJM, Broekhuysse RM, Peereboom-Wynia JDR, Delleman JW: Crystalline cataract and uncombable hair. Ophthalmology 97: 1181—1187,

1990.

- 5) 田淵昭雄, 池田 章, 三島 昇: 先天性白内障の水晶体蛋白合成異常. 臨眼 40: 256—257, 1986.
- 6) 田淵昭雄, 池田 章, 梶川 泉, 高羽仁子: 小児水晶体タンパク質と先天性白内障. あたらしい眼科 4: 862—865, 1987.
- 7) 田淵昭雄, 池田 章, 錦織敏治, 高羽仁子: 両眼性先天性白内障水晶体タンパクの水不溶性画分の生化学的研究. 日眼会誌 92: 130—137, 1988.
- 8) 田淵昭雄, 錦織敏治, 高羽仁子, 池田 章: 小眼球先天性白内障水晶体の水不溶性画分. あたらしい眼科 5: 1067—1070, 1988.
- 9) Lubsen NH, Renwick JH, Tsui LC, Breitman ML, Schoenmakers: A locus for a human hereditary cataract is closely linked to the gamma-crystallin gene family. Proc Natl Acad Sci USA 84: 489—492, 1987.
- 10) Vetter V, Shin YS: Lens sorbitol dehydrogenase deficiency in a patient with congenital cataract. Eur J Pediatr 154: 389—391, 1995.
- 11) Matsushima H, David LL, Hiraoka T, Clark JI: Loss of cytoskeletal proteins and lens cell opacification in the selenite cataract model. Exp Eye Res 64: 387—395, 1997.
- 12) 岩田修造: 水晶体 その生化学的機構. メディカル薬出版, 東京, 65—111, 1986.

- 13) **William MH Jr** : Adler's Physiology of the Eye. Mosby-Year Book, St Louis, 348—390, 1992.
 - 14) **Kramps HA, Hoenders HJ, Wollensak J** : Protein changes in the human lens during development of senile nuclear cataract. *Biochem Biophys Acta* 434 : 32—43, 1976.
 - 15) **Spector A** : The search for a solution to senile cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 130—146, 1984.
 - 16) **Maisel H** : The Ocular Lens. Structure, Function, and Pathology. Mercel Dekker, Inc, New York, 169—222, 1985.
 - 17) **Lazarides E, Nelson WJ** : Expression of spectrin in nonerythroid cells. *Cell* 31 : 505—508, 1982.
 - 18) **Green J, Maisel H** : Lens fodrin binds actin and calmodlin. *Curr Eye Res* 3 : 1433—1440, 1984.
 - 19) **Georgatos SD, Gounari F, Remington S** : The beaded intermediate filaments and their potential functions in eye lens. *Bioessays* 26 : 413—418, 1994.
 - 20) **Bagchi M, Caporale MJ, Wechter RS, Maisel H** : Vimentin synthesis by ocular lens cells. *Exp Eye Res* 40 : 385—392, 1985.
 - 21) **Capetanaki Y, Smith S, Heath JP** : Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *J Cell Biol* 109 : 1653—1664, 1985.
-