

ラット水晶体におけるアルドース還元酵素の局在 (in situ hybridization 法による検討)

岡本庄之助¹⁾, 照林 宏文¹⁾, 堤 元信¹⁾, 池部 均¹⁾

赤木 好男¹⁾, 西村 千尋²⁾, Peter F. Kador³⁾

¹⁾京都府立医科大学眼科学教室, ²⁾国立小児病院小児医療センター, ³⁾アメリカ国立眼研究所

要 約

糖白内障やガラクトース白内障の起因酵素と考えられているアルドール還元酵素(AR)の局在は既に種々の方法により報告されている。水晶体においても AR は存在し、その分布は白内障発症部位や進展様式と深く関係すると考えられている。本実験では、ラット AR 合成遺伝子より複製した相同 DNA (complementary DNA) を用いた in situ hybridization により、生後3週齢ラットおよび胎児ラット水晶体での AR messenger RNA (ARmRNA) の検出と分布について検討を行った。その結果、生後3週齢ラット水晶体においては ARmRNA は水晶体上皮細胞と赤道部表層皮質に認められ、免疫組織化学法による AR 免疫活性の局在とはほぼ同様の分布パターンを示した。しかし、胎児ラット水晶体では ARmRNA が上皮細胞と赤道部に分布したのに対し、AR 免疫活性は生後3週齢ラットと異なり、主に水晶体の中央部に認められた。(日眼会誌 96: 1373-1378, 1992)

キーワード：ラット, 水晶体, アルドース還元酵素, メッセンジャーRNA, 免疫組織化学

The Localization of Aldose Reductase mRNA in the Rat Lens

Shonosuke Okamoto¹⁾, Hirofumi Terubayashi¹⁾, Motonobu Tsutsumi¹⁾
Hitoshi Ikebe¹⁾, Yoshio Akagi¹⁾, Chihiro Nishimura²⁾ and Peter F. Kador³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

²⁾National Children Medical Research Center

³⁾National Eye Institute, National Institute of Health

Abstract

The localization of aldose reductase (AR), which is thought to be involved in the pathogenesis of sugar and galactosemic cataracts, has been studied using various methods. The AR exists in the lens and its presence is considered to be important at the site of the cataractogenesis. In this study, the localization of AR messenger RNA (ARmRNA) in the lenses of 3-week old and fetal rats was studied by in situ hybridization using a complementary DNA to the rat AR gene. In the lens of 3-week-old rats, ARmRNA was present in the lens-epithelium and the equatorial superficial cortex. The distribution profile was similar to that of AR-immunoreactivities revealed by an immunocytochemical study. In the fetal lens, however ARmRNA was present in the epithelium and the equatorial region, while AR-immunoreactivity was observed mainly in the center of the lens. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 1373-1378, 1992)

Key words: Rat, Lens, Aldose reductase, Messenger RNA, Immunocytochemistry

別刷請求先：602 京都市上京区河原町通広小路上ル 京都府立医科大学眼科学教室 岡本 庄之助
(平成4年1月31日受付, 平成4年5月25日改訂受理)

Reprint requests to: Shonosuke Okamoto, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Received January 31, 1992 and accepted in revised form May 25, 1992)

I 緒 言

糖白内障やガラクトース白内障の起因酵素と考えられているアルドース還元酵素 (AR)¹²⁾は水晶体上皮細胞、表層皮質に局在³⁾し、白内障発症に伴い増加することが生化学的、免疫組織化学的に報告されている⁴⁾⁵⁾。しかし、これらの AR 活性の変化とは、AR 合成系の終末産物量の変化を表したものであり、果して AR 活性の変化が AR 合成系のいかなる変化に基づくものであるかは未だ不明である。近年、分子生物学的手法の発達により、眼科的領域においても遺伝子レベルでの解析が種々の分野で行われつつある。形態学的には messengerRNA (mRNA) を組織上で直接検出する *in situ* hybridization が開発⁶⁾され、種々の蛋白を合成する遺伝子の発現状態の解析が *in vivo* で可能となった。本実験では、ラット水晶体における ARmRNA の発現を検索するために AR 合成遺伝子より複製した相同 DNA (complementary DNA, 以下 cDNA) を用いて *in situ* hybridization を行い、ラット水晶体における ARmRNA の局在を確認し、免疫組織化学による AR の分布と比較検討を行った。

II 方 法

実験には Sprague-Dawley 系ラットを使用し、通常実験食餌により飼育した妊娠 17 日目ラット (3 匹) から摘出した胎児ラットと生後 3 週齢 (体重約 50 g) の雄ラット 5 匹を用いて行った。胎児ラットは妊娠ラットをペントバルビタールナトリウム (ネプタール®) 静脈内注射により致死麻酔の後、帝王切開分娩し、摘出した。また、3 週齢ラットはエーテル致死麻酔を施し、水晶体を摘出した。これらの試料は、4% paraformaldehyde を含む 0.1 M 磷酸緩衝液 (PB) 中で 12 時間浸漬後固定を行った後、20% sucrose 含有 0.1 MPB 中で cryoprotection を行い、クリオスタットを使用し、厚さ 30 μ m の凍結切片を作成した。Hybridization は既に報告した方法⁷⁾⁸⁾に準じて行った。最初に試料を proteinase K (Sigma) で脱蛋白処理の後、ethanol 系列で脱水し、2 時間の prohybridization を行った。Hybridization には ³⁵S-dATP を用いて nicktranslation 法により標識したラット AR cDNA プローブを使用し、最終濃度を 1.0×10^8 dpm/ml に調整した溶液を用いて、37°C にて 24 時間 incubation を行った。今回使用した hybridization 溶液の組成を表 1 に示した。Prehybridization には同組成の溶液から dextran sul-

表 1 hybridization 溶液

50% vol/vol formamide
10% vol/vol dextran sulphate
3 X SSC (standard saline citrate)
1 X SSC = 150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate
1 X Denhart's 溶液
100 μ g/ml yeast t-RNA
100 μ g/ml salmon sperm DNA
10 mM DTT
1.0 mM EDTA

phate を除去したものを使用した。また、全ての溶液と器具は RNase を除去するため滅菌済の使い捨て用、もしくは 0.1% diethylpyrocarbonate により処理した後、オートクレーブ滅菌を行い使用した。その後、試料は 2 X SSC で 15 分間洗浄し、0.5 X SSC 中で 37°C にて 2 時間の posthybridization を行った。また、対照としては同条件で標識したプラスミドプローブを使用し、胎児ラットについて hybridization を行った。これらの試料は予め chrome-gelatine にて表面処理したスライドガラスにマウントした後、X 線フィルム (Hyperfilm β max film, Amersham) による macro-autoradiography を行った。さらに一部の試料は乳剤 (NTB 2, Kodak) を用いての micro-autoradiography を行い光学顕微鏡の観察を行った。

また、免疫組織化学による AR の分布と比較するため一部の凍結切片は抗ラット水晶体 AR 抗体を第 1 抗体⁹⁾とし PAP 免疫組織化学¹⁰⁾を行い光学顕微鏡的観察を行った。対照としては第 1 抗体の代わりに吸収試験を行った抗血清、および羊血清を同希釈濃度にて使用し、PAP 免疫組織化学を行った。

III 結 果

1. 生後 3 週齢ラット

In situ hybridization の後行った X 線フィルム autoradiography の結果、水晶体前囊側から赤道部に弧状の陽性シグナルが得られ、線状の陽性シグナル像は赤道部にやや厚く認められた (図 1 A)。特に赤道部では陽性シグナルは弓状部に一致し、最表層部から深部へ向かって線維細胞の中心部に集積が認められた (図 1 B)。一方、水晶体上皮細胞では一列に並ぶ細胞層に陽性シグナルが認められたが (図 2)、前嚢下皮質に陽性シグナルは観察されなかった。また、後嚢や脱核した深部皮質線維、水晶体核に相当する水晶体中央部には陽性シグナルの集積はなかった。AR 免疫組織化

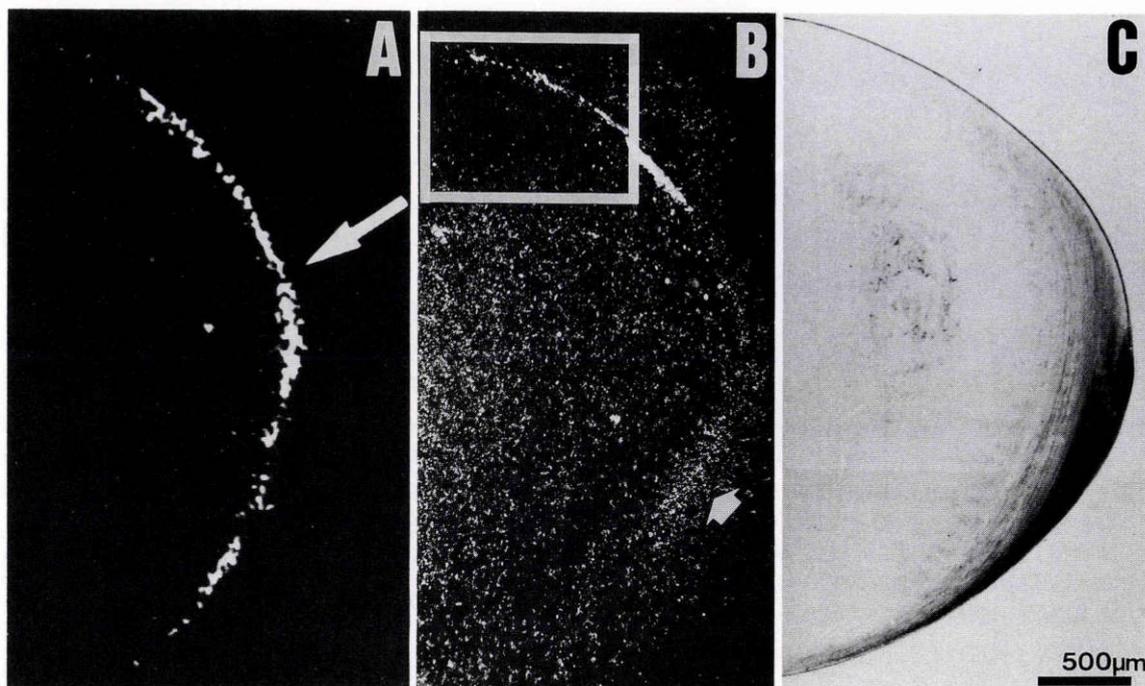


図1 生後3週齢ラットの水晶体.

X線フィルム autoradiography の拡大写真(直接印画紙へ拡大焼き付けたもの)では ARmRNA の局在を示す感光は水晶体前囊側から赤道部に弧状の陽性シグナルとして得られ, 線状の感光像は赤道部(矢印)にやや厚く認められた(A), 乳剤による autoradiography (暗視野)ではX線フィルムに比べやや非特異シグナルを多く認めたが, ARmRNA の分布は同じく水晶体上皮細胞と赤道皮質に認められ, 特に赤道部ではシグナルは弓状部(矢印)に一致し, 線維細胞に集積が認められた(B), AR免疫組織化学では水晶体上皮細胞層および赤道部を中心とした浅層皮質に陽性反応を認めた(C), $\times 40$

学では水晶体上皮細胞層および赤道部を中心とした浅層皮質に AR 免疫陽性反応を認めた(図1C).

2. 胎児ラット

眼球を含む全頭部の前額断切片を用いて hybridization を行ったが, 眼球以外に陽性シグナルの局在は認められなかった(図3A), さらに強拡大像では水晶体上皮細胞層と水晶体の中央部を除く水晶体皮質に広くシグナルが分布し, 特に赤道部にシグナルの集積を認めた(図3B), 免疫組織化学では赤道部表層皮質の AR 免疫陽性反応は生後3週齢ラット水晶体に比べ弱く, また細胞核の周囲にのみ限局し認められた, 一方, 生後ラット水晶体では免疫活性を認めなかった水晶体中央部の水晶体線維に AR 免疫活性が認められた(図3C).

対照実験として, hybridization には pBR 322 を使用し同条件で反応を行ったが, 生後ラット, 胎児ラッ

ト水晶体ともに陽性シグナルはX線フィルム autoradiography にて検出されなかった, また, 吸収試験後の抗血清, および山羊血清を用いた PAP 免疫組織化学において免疫染色は得られなかった.

IV 考 按

近年, 分子生物学の進歩とともに種々の分野で遺伝子工学を駆使した研究が可能となり, 眼科領域においても遺伝性疾患やウイルス感染に対する DNA 診断¹⁾などに応用され, 今後種々の眼科的疾患の病態解明にその有用性が期待されている, 一方, 白内障についても発症機序の解明を目的とし, 今日も多く研究が行われているが, なかでも糖尿病白内障の実験モデルであるラット糖白内障やガラクトース白内障は起因酵素である AR が, 白内障発症に伴い増加することが生化学的, 免疫組織化学的に報告⁴⁾⁵⁾され, 糖尿病白内障の

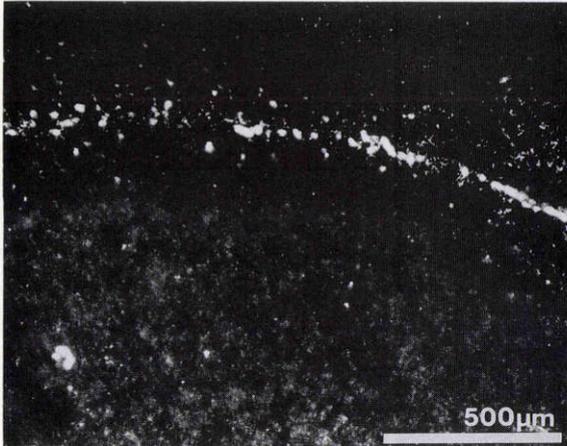


図2 乳剤による autoradiography (暗視野) の水晶体前囊側 (図1Bの白枠) の強拡大像。水晶体上皮細胞の配列と同様に ARmRNA の分布は水晶体前囊側に線状に認められたが、その深層の皮質線維には陽性シグナルが認められなかった。
×80

発症機序の解明のため様々な面からのアプローチが試みられている。最近、ラットおよびヒト AR についても合成遺伝子の核酸配列が解明¹²⁾¹³⁾され、遺伝子レベ

ルでの解析が行われつつある。既存の生化学的手法、免疫組織化学的手法が生理活性物質や酵素などの蛋白合成経路の終末産物を検出する方法であるのに対し、蛋白合成のため発現する mRNA を検出する方法は、その時点での蛋白合成を動的に把握することができる。すなわち、ARmRNA の発現はその時点で AR 合成能を反映し、特に白内障発症前や初期での AR の関与を検討する上で重要な情報を与えると考えられる。従来より水晶体は周囲組織と独立した器官であるため、様々な活性物質の変化についての水晶体全体での定量は比較的容易であり、既に mRNA レベルでの報告も認められる^{14)~17)}。しかし、我々が以前、報告したように、糖白内障やガラクトース白内障は与えられる負荷や個体の成熟度によって様々な発症、進展パターンをとる¹⁸⁾¹⁹⁾。すなわち、白内障の発症、進展は均質、一様な変化ではないため、その発症機序の検討には形態的要素を考慮することが不可欠であると考えられる。

今回行った *in situ hybridization* は hybridization という相補的な核酸間の特異的結合力を利用し、目的とする特定の mRNA を組織上で直接検出する方法である。この方法を用いて AR の hybridization を行っ

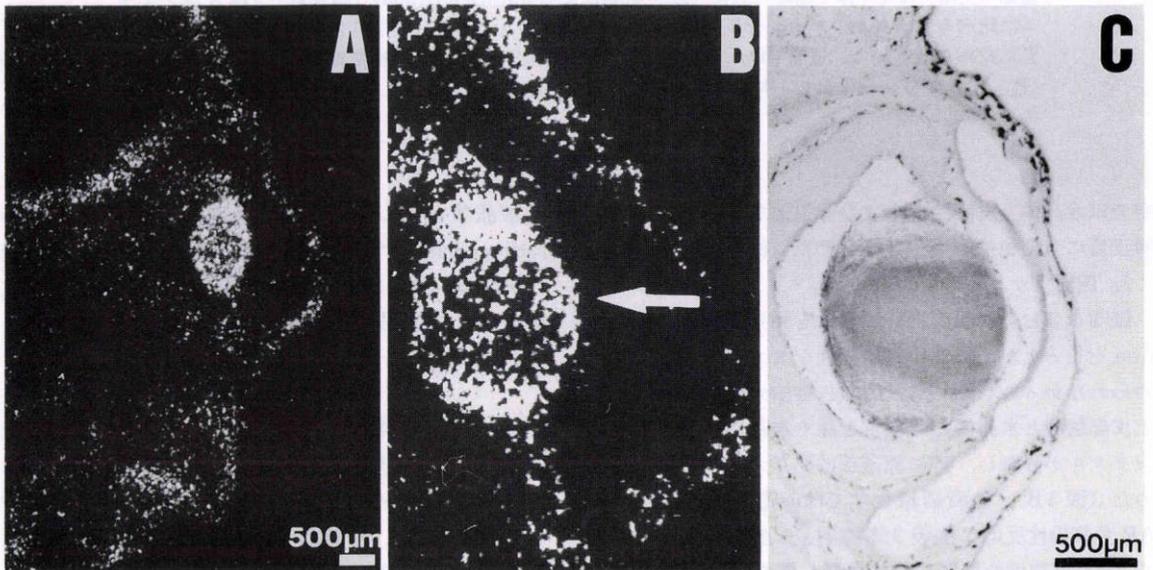


図3 胎児ラットの水晶体。

全頭部の前額断切片の X 線フィルム autoradiography では水晶体に最も強い ARmRNA の発現を認め、眼球以外の組織に陽性シグナルはみられなかった (A)。その強拡大像 (B) では水晶体の中央部を除く水晶体皮質と水晶体上皮細胞層に広くシグナルが分布するのが観察できた (矢印)。免疫組織化学 (C) では主に水晶体中央部の水晶体線維に AR 免疫活性が認められたが、赤道部表層皮質の免疫反応は生後ラットに比べ弱く、限局していた。A : ×15, B, C : ×36

た場合、水晶体の組織切片上にて ARmRNA の検出を行うため、水晶体内の局所的な AR の変化を解析することが可能となり、前述のような発症、進展様式の差異に対する AR の関与の解明や、さらに将来、遺伝子レベルでの根本的白内障発症予防法や治療法の発見というような大きな目標への有効なアプローチ法となりうると考えられた。本実験ではこのような水晶体内の ARmRNA 定量化を最終目的とし、今回は、まず最初に ARmRNA の局在を確認するために、ラット ARcDNA を使用し、比較的幼弱な生後3週齢ラットおよび胎児(17日目)ラット水晶体を使って *in situ hybridization* を試みた。この2条件のラットを使用した理由は、生後3週齢ラットは過去にわれわれが糖・ガラクトース白内障モデルとして形態学的検討を行っているためであり、また、胎児ラットは水晶体の器官形成期にあり、種々の蛋白合成が活発に行われているため、検出に十分な mRNA が発現していると推測され、陽性対照群と考えられたためである。その結果、両群の水晶体に ARmRNA の局在を示すシグナルは検出され、AR 合成は水晶体としての器官形成が終了した後も行われていると考えられた。また、生後3週齢ラットの水晶体では X 線フィルム上、水晶体前囊側から赤道部に水晶体の輪郭に一致する陽性シグナルが得られ、赤道部ではその厚みが増していることから、ARmRNA は上皮細胞と赤道部浅層の線維細胞に発現していると考えられた。この結果を AR 免疫組織化学と比較した場合、水晶体上皮細胞層では ARmRNA, AR 免疫活性ともに陽性所見が認められたが、皮質線維では ARmRNA の局在は免疫活性に比べより浅層に限局し、さらに一部の試料について行った乳剤による *micro-autoradiography* の結果、陽性シグナルは特に弓状部に集積する傾向が認められた。これらのことより水晶体線維細胞での ARmRNA は主に線維細胞へと分化を開始した直後の細胞に発現していると推測された。一方、後囊および深部皮質線維、水晶体核には ARmRNA, AR 免疫活性の局在は認められなかった。つぎに、胎児(17日目)ラットでは頭部全体の前額断切片を用いて *hybridization* を行った。陽性シグナルは眼組織に強く認められ、水晶体では中央部を除く水晶体全体に強いシグナルがみられ、赤道部では生後ラット水晶体と比べより深層にまでシグナルの集積を認めた。このような強い ARmRNA の発現がみられることは胎児期に AR 合成が活発に行われていると考えられ、AR は生理的作用の一つとして水晶体線維細

胞の分化に何らかの影響をあたえると予想された。さらに、AR 免疫組織化学と比較した場合、胎児ラット水晶体では、生後ラット水晶体とは異なり赤道部の AR 免疫活性は比較的弱く、細胞核の付近にのみ AR 染色を認めたのに対し、生後ラットではほとんど免疫活性をもたない水晶体中央部に免疫染色が認められ、先天性ガラクトース白内障にみられるような特徴的な発症部位に類似するものであった²⁰。このような mRNA と酵素活性の局在の相違については、現在のところ水晶体線維細胞の分化能と AR 合成能の速さの違いに起因すると推測しているが、そのためには水晶体線維細胞の分化能すなわち水晶体の成長を観察する必要がある。具体的には³H-thymine を用いてラベル細胞の動態を観察するというような追加実験が必要であると考えられた。また、*hybridization* の組織化学においては試料の固定を免疫組織化学と同じ条件で行った場合、核酸の検出には過剰固定となり、probe の組織透過性が減少し、陽性シグナルが得られにくくなることから、弱い固定、もしくは固定後の脱蛋白処理が必要である。その結果、凍結切片では反応行程中に組織の微細形態の保持が困難となり、X 線フィルム *autoradiography* のような、やや *macroscopic* な観察では十分な再現性を得たが、より微細な観察には凍結切片以外を用いた方法を試みる必要があると考えられた。将来、これらの問題点が改良され、細胞内レベルでの mRNA の解析が行われることにより白内障発症機序がさらに詳しく解明されることを期待する。

以上、*in situ hybridization* より ARmRNA の局在を検討した。その結果、ARmRNA は水晶体上皮細胞と赤道弓状部に存在した。また同時に行った AR 免疫組織化学では生後ラット水晶体ではほぼ同様の分布を示したが、胎児ラットでは主に水晶体中央部に AR 免疫活性を認め、異なる分布を示した。*In situ hybridization* により組織上での ARmRNA の検出が可能になったことで、今後、AR の生理的機能や白内障発症機序と AR の関連性に多くの報情を与えてくれると考えられた。

本論文の要旨の一部は第95回日本眼科学会総会、第13回アジア太平洋眼科学会(京都市)にて発表した。また、本研究は文部省科学研究費補助金(01440074, 04771367)の補助を受けた。

文 献

- 1) Kinoshita JH, Futterman S, Satoh K, et al: Factors affecting the formation of sugar alco-

- hols in ocular lens. *Biochem Biophys Acta* 74: 340—350, 1963.
- 2) **Kinoshita JH**: Mechanism initiating cataract formation. *Invest Ophthalmol* 13: 713—724, 1974.
 - 3) **Akagi Y, Kador PF, Shiono T**, et al: Aldose reductase distribution and activation in diabetic and galactosemic rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(Suppl). ARVO abstracts, 159, 1984.
 - 4) **Nishimura C, Akagi Y, Robison WG**, et al: Increased aldose reductase activity in galactosemic lens, in Sakamoto N, et al (eds): *Polyol pathway and its role in diabetic complications*, Elsevier Science Publishers BV (Biomedical division) Amsterdam, 182—188, 1988.
 - 5) **Akagi Y, Tasaka H, Terubayashi H**, et al: Aldose reductase localization in rat sugar cataract, in Sakamoto N, et al (eds): *Polyol pathway and its role in diabetic complications*, Elsevier Science Publishers BV (Biomedical division) Amsterdam, 170—181, 1988.
 - 6) **Gall JG, Pardue ML**: Formation and detection of RNA-DNA hybrid-molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 378—388, 1969.
 - 7) **Okamoto S, Okamura H, Miyake M**, et al: A diurnal variation of the vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA under a daily light-dark cycle in the the rat suprachiasmatic nucleus. *Histochemistry* 95: 525—528, 1991
 - 8) 岡本庄之助: ラット視交叉上核内 VIP 産生細胞に及ぼす光刺激の影響 (in situ hybridization 法による VIP mRNA 発現の日内変動). *日眼会誌* 95: 562—569, 1991.
 - 9) **Herrman RK, Kador PF, Kinoshita JH**: Rat lens aldose reductase: Rapid purification and comparison with human placental aldose reductase. *Exp Eye Res* 37: 467—474, 1983.
 - 10) **Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ**, et al: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315—333, 1970.
 - 11) **Hotta Y, Hayakawa M, Saito K**, et al: Diagnosis of Leber's optic Neuropathy by means of polymelase chain reaction amplification. *Am J Ophthalmol* 108: 601—602, 1989.
 - 12) **Nishimura C, Graham C, Hohman TC**, et al: Characterization of mRNA and genes for aldose reductase in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1051—1059, 1988.
 - 13) **Nishimura C, Matsuura Y, Kokai Y**, et al: Cloning and expression of human aldose reductase. *J Biological Chemistry* 265: 9788—9792, 1990.
 - 14) **Bekhor I, Shi S, Unakar NJ**: Aldose reductase mRNA is an epithelial cellspecific gene transcript in both normal and cataractous rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1876—1885, 1990.
 - 15) **Bekhor I, Shi S, Unakar NJ**: Management of aldose reductase mRNA abundance in rat lens undergoing reversal of galactose induced cataracts. A model for gene response to changes in the environment. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 95: 55—60, 1990.
 - 16) **Wen YI, Unakar NJ, Bekhor I**: Evaluation of lens epithelial cell differentiation by quantitation of MP26 mRNA relative to γ -crystallin mRNA in intiation of galactose cataracts in the rat. *Exp Eye Res* 52: 321—327, 1991.
 - 17) 岡本庄之助, 照林宏文, 堤 元信: ヒト水晶体におけるアルドース還元酵素 (AR) mRNA 1. in situ hybridization による検出の試み. *眼紀* (印刷中)
 - 18) 赤木好男, 照林宏文, 岡本庄之助: ラットガラクトース白内障の発症・進展について. *眼紀* 40: 1985—1991, 1989.
 - 19) 岡本庄之助, 照林宏文, 赤木好男: アルドース還元酵素阻害剤による糖尿病性白内障の治療(1)糖尿病性白内障モデルの作成. *日眼会誌* 92: 161—165, 1988.
 - 20) **Unakar NJ, Smart T**: Regression of cataracts in the offspring of galactose fed rats. *Ophthalmic Res* 11: 52—64, 1974.