

酵母の自動解析ソフトウェア開発とラット糖白内障
の予防薬探索

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-05-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金田, 文人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/10895

福井大学審査
学位論文〔博士（工学）〕

酵母の自動解析ソフトウェア開発と ラット糖白内障の予防薬探索

2020 年 3 月
金田文人

目次

第1章 序論	1
第2章 出芽酵母におけるタイムラプス画像追跡の自動化	2
2.1 緒言	2
2.2 試薬と機器	4
2.3 実験方法	7
2.3.1 滅菌操作	7
2.3.1.1 オートクレーブ処理	7
2.3.1.2 加熱滅菌	7
2.3.1.3 DNase free、RNase free 滅菌	7
2.3.1.4 フィルター滅菌	7
2.3.2 培地組成	8
2.3.3 菌株の保存	9
2.3.4 酵母・プライマー一覧	9
2.3.5 タイムラプス	10
2.4 結果・考察	13
2.4.1 手動による解析	13
2.4.2 外周エッジ強調と Watershed 法を用いた細胞領域の分割と追跡	15
2.4.3 セル間のエッジ強度を用いた親娘分析	17
2.4.4 自動解析システムで起こりうるミスとその対策	19
2.5 参考文献	24
第3章 エピジェネティックな視点に着目した糖尿病白内障予防薬の開発	26
3.1 緒言	26
3.2 試薬と機器	28
3.3 実験方法	32
3.3.1 滅菌操作	32
3.3.1.1 オートクレーブ処理	32
3.3.1.2 DNase free、RNase free 滅菌	32
3.3.1.3 フィルター滅菌	32
3.3.1.4 UV 滅菌	32

3.3.2	ラット・プライマーの一覧	33
3.3.2.1	使用するラット	33
3.3.2.2	プライマーリスト	33
3.3.3	水晶体の培養操作	39
3.3.3.1	ラット水晶体の摘出	39
3.3.3.2	ラット水晶体の培養	39
3.3.4	RNA 実験	40
3.3.4.1	TRIZOL での RNA 抽出	40
3.3.4.2	Qubit による RNA 濃度測定	40
3.3.4.3	RNA からの DNA の分解 (DNase 処理)	40
3.3.4.4	逆転写 (cDNA サンプルの調整)	40
3.3.4.5	リアルタイム PCR による RNA 発現の解析	41
3.3.4.6	DNA マイクロアレイ	41
3.3.4.7	マイクロアレイ解析	44
3.3.5	組織切片の作製	53
3.3.5.1	凍結切片の作製	53
3.3.5.2	ヘマトキシリン - エオシン (HE) 染色	53
3.3.5.3	パラフィン切片の作製	53
3.3.6	ラット個体での実験	54
3.3.6.1	ラットへの麻酔	54
3.3.6.2	前房内注射	54
3.4	結果・考察	55
3.4.1	in vitro 系の条件検討	55
3.4.1.1	iphone6s での撮影	55
3.4.1.2	DP73 での撮影	56
3.4.1.3	切片の条件検討	57
3.4.2	HAT 阻害剤は糖白内障予防効果を有する	58
3.4.3	HAT 阻害剤は水晶体混濁度を減弱させる	62
3.4.4	Plk3 は HAT/HDAC によって制御される	64
3.4.5	Plk3、Atm は白内障原因遺伝子のひとつである	68
3.4.6	マイクロアレイによる白内障原因遺伝子探索	69
3.5	考察	71

3.6 参考文献	73
第4章 総括	78
謝辞	79

第1章 序論

近年、形態学的に同一に思われる細胞でもそれぞれ多様な個性を持っていることが明らかになってきた。個々の細胞の持つ情報を解析するためにごく少量の RNA から PCR を行う手段などが開発されているが、簡易的に表現型を見る場合、それぞれの細胞の蛍光融合タンパク質を追う方法が有効である。特に蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス実験による 1 細胞の追跡はタンパク質の時空間的定量化に最適なツールである。現在までに、我々は出芽酵母をモデル生物に用い、エピジェネティックな発現制御に関わるヘテロクロマチン領域が、個々の細胞間で変動し、近傍の遺伝子の発現状態を制御していることを見出した。上記、ヘテロクロマチン領域の変動が母細胞から娘細胞へと世代を超えて行く過程でどのような規則性があり、どのような遺伝子が制御に関わっているかを明らかにするためには、継時的なタンパク質発現状態の定量、細胞集団すべてにおける母娘関係の明確化、そしてこれらのデータを統合した樹形図の作成を行う必要があった。しかし、大量の画像データからデータ解析を行うためには膨大な時間を必要とする。本研究では自動で解析できるソフトウェアを開発することによって、解決を試みた。

一方、本研究室では酵母のエピジェネティクス研究から得られた知見をヒトの疾患、特に白内障に応用できるのではないかと考え、研究を行っている。白内障は眼球内の水晶体が白く濁ることで視力の低下を引き起こす疾患であり、世界の失明原因の第一位である。病因として老化や糖尿病、紫外線といった様々な因子があるが、中でも糖尿病による白内障（糖尿病性白内障）は若年でも発症しうるリスクを持つ。濁った水晶体を摘出することでしか完治できず、予防薬で症状を低減することが望ましい。しかし、既存の予防薬はその有効性が十分に検証されておらず、新たな創薬アプローチが望まれていた。ここで私は新規予防薬の開発を目的として、当研究室のメインテーマである「エピジェネティクス」に着目した解析を行った。さらに、上記ソフトウェア開発で学んだ知見を生かし、R 言語を用いた DNA マイクロアレイ解析から白内障原因候補因子を探索した結果をまとめる。

本論文は 2 部構成であり、第 1 章では酵母の自動解析ソフトウェア開発について、第 2 章では糖白内障の予防薬探索について述べている。また、詳細な背景については各章の緒言に記した。

第2章 出芽酵母におけるタイムラプス画像 追跡の自動化

2.1 緒言

DNA 配列に依存しない、エピジェネティックな遺伝子の発現状態変化は、個々の細胞が多様性を生み出す上で重要な機構の1つであり、癌をはじめとする様々な後天性疾患との関係も報告され注目を集めている¹⁻³。エピジェネティックな発現制御は個々の細胞間で異なるが、現在までのエピジェネティクス分野の研究成果のほとんどは、発現状態の異なる細胞集団での解析結果である。しかし、混ざりの状態での解析では、個々の細胞の持つ特性を明らかに出来ないため、分子レベルでのメカニズム解明においては、未だ、不明な点が多い。そこで、我々は出芽酵母をモデル生物に用い、独自の手法を開発し、1細胞でのエピジェネティックな発現状態変化を追跡するシステムを確立し、多くの集団の中で、異なる挙動を示す少数派の集団がいることを見出した⁴。1細胞を用いて解析することは、細胞集団に埋もれて検出出来なかった、少数派の表現型も解析が可能であり、現在までの解析では見落としていた、生物における重要な機能を見出すことも期待出来る。

我々以外にも様々な生物種で新たな1細胞解析手法が開発され、細胞集団の中に少数派ではあるが異なる発現制御を受けている細胞が存在し、少数派の表現型が細胞集団での重要な機能を担っていることが明らかになってきた⁵⁻⁷。このように、現在は1細胞を対象として解析し、細胞集団に埋もれて検出されなかった少数派の持つ生物における重要な機能を解明することが求められている。

我々が開発した一細胞追跡システムは、エピジェネティックな発現制御機構に重要なヘテロクロマチン領域の近傍に蛍光タンパク質をコードする *EGFP* 遺伝子を導入し、ヘテロクロマチン領域が広がることで *EGFP* 遺伝子の発現が弱まり、蛍光顕微鏡を用いて継時的に蛍光を定量することで、エピジェネティックな発現状態の変化を一細胞レベルで解析することを可能とした⁴。

蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス実験は、長時間に渡り追跡し続ける必要があり、多量の蛍光画像データを取得していくため、人の手で解析するには膨大な時間と労力が必要となる。具体的な作業は、フレームごとの細胞の対応付け、親子の関連付け、蛍光画像と明視野画像の対応付けなどの単純作業の繰り返しであるため、自動化することによって大幅に時間を削減することが可能となる。実際に、自動的に細胞追跡を分析する多くの方法が開発されてきた^{8,9}。Liらは様々な運動モデルを持つカルマンフィルタにより構成される追尾フィルターであるIMM (Interacting Multiple Models) を用いることで細胞の追跡を可能とした¹⁰。また、Winterらは、系統情報を用いて追跡の精度を自動的に

改善した^{7,11}。近年では、**machine learning**を用いて同じシステムで複数の細胞種に対応できるソフトウェアも開発されてきた^{12,13}。

動物細胞だけでなく、より密なコロニーを形成しセグメンテーションや追跡に支障をきたす酵母や大腸菌でも多くの研究が行われてきた¹⁴⁻¹⁷。しかし、その多くはセグメンテーションのアルゴリズムの改良に偏重しており、系統樹の作成が出来なかったり、蛍光タンパク質の発現を伴っていなかったりといった問題点があった

本研究は、外周エッジの強調と **watershed** 法による蛍光マーカーに依存しないセグメンテーション、面積や周囲長、重心の差を用いたトラッキング、細胞間エッジを用いた親子の関連付けによって酵母のタイムラプス解析を試みた。これらの結果は、本ソフトウェアはそれぞれのステップで精度よく解析を行うことができ、蛍光タンパク質の発現と紐付いた系統樹の作成に成功した。

2.2 試薬と機器

本章の研究に用いた試薬と機器を以下に示す。試薬に関してはここに示した以外のものはナカライテスク株式会社の特級あるいは分子生物学用の試薬を用いた。

Table 2-1 試薬と器具

Bacto TM Yeast Extract (No.212750)	BD
Bacto TM Peptone (No.211677)	BD
Bacto TM Tryptone (No.211705)	BD
Difco TM Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (No.291940)	BD
分光光度計 (V-630BIO)	日本分光
カナマイシン硫酸塩(No.113-00343)	Wako
Agarose S (No.312-01193)	和光純薬株式会社
制限酵素	タカラバイオ株式会社
Primer	ニッポンイージーティー
2 x Gflex PCR Buffer	タカラバイオ株式会社
Tks Gflex DNA Polymerase	タカラバイオ株式会社
Expand HighFidelityPLUS PCR System, dNTPack (No.04-743-733-001)	Roche
Emerald Amp MAX PCR Master Mix	タカラバイオ株式会社
滅菌フィルター (MILLEX-GS) (No.SS-05SZ)	ADVANTEC
シリンジ	テルモ株式会社
キュベット	Bio-Rad
遠心分離機 (FB-4000)	KURABO
冷却遠心分離機 (centrifuge 5417R)	eppendorf
遠心分離機 (centrifuge 5418)	eppendorf
高速冷却遠心機 (6200)	KUBOTA
クリーンベンチ (MCV-710ATS)	三洋電機株式会社
クリーンベンチ (MCV-B161S)	三洋電機株式会社
高圧蒸気滅菌器 (MLS-3020)	三洋電機株式会社
高圧蒸気滅菌器 (MLS-2420)	三洋電機株式会社
乾燥機 (MOV-212(U))	三洋電機株式会社
分光光度計 (UV-1200)	島津製作所
振とう培養器 (TB-C-50R)	高崎科学機械株式会社
振とう培養器 (TC-C-200R)	高崎科学機械株式会社

インキュベーター (CI-310)	ADVANTEC
インキュベーター (MIR-553)	三洋電機株式会社
インキュベーター (CI-450SM)	Iuchi
ドライバスインキュベーター (FG-01N)	FastGene
ドライバスインキュベーター (MD-02N110)	Major science
ブロックインキュベーター (BI-516)	ASTEC
シェーカー (EYELA)	東京理科機械株式会社
シェーカー (DOUBLE SHAKER NR-3)	TAITEC
マイクロチューブローテーター (MTR-103)	Iuchi
サーマルサイクラー (PC320)	ASTEC
ハンディー UV ランプ	フナコシ
UV トランスイルミネーター (UVT-2126)	ASTEC
アガロースゲル電気泳動装置	ADVANCE
ゲル撮影装置	ASTEC
pH メーター	東亜 DKK 株式会社
蒸留水製造装置 (RFD210TA)	ADVANTEC
超純水製造装置	日本ミリポア株式会社
ボルテックスミキサー	M&S 機械株式会社
上皿天秤 (AV2102C)	Ohaus
微量天秤 (R1800)	カールツァイス株式会社
ハイエンド電動倒立顕微鏡 Axio Observer.Z1	カールツァイス株式会社
LED 光源 Colibri	カールツァイス株式会社
AxioCam MRm	カールツァイス株式会社
EMCCD カメラ Cascade II	NIPPON ROPER
メタルハライドランプ HXP	OSRAM
Cell Asic	ONIX
Y2 Microfluidic Plate	ONIX
Hoechst33342	Calbiochem
塩化ナトリウム (No.191-01665)	和光純薬株式会社
塩化カリウム (No.163-03545)	和光純薬株式会社
塩化マグネシウム (No.135-00165)	和光純薬株式会社
-80°Cstock チューブ 1.2 ml (No.430487)	CORNING
D (+)-Glucose (No.041-00595)	和光純薬株式会社
Agar (No.010-15815)	和光純薬株式会社
One STEP Ladder 100	NIPPON GENE

(0.1~2kbp) (No.313-05241)	
塩化カルシウム (No.031-00435)	和光純薬株式会社
EDTA (No.15111-45)	ナカライテスク株式会社
水酸化ナトリウム (No.198-13765)	和光純薬株式会社
酢酸ナトリウム (No.31137-25)	ナカライテスク株式会社
酢酸 (No.017-00251)	和光純薬株式会社
BigDye terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (No.4336917)	Applied Biosystem
エタノール (No.057-00456)	和光純薬株式会社
塩酸(No.080-01066)	SIGMA-ALDRICH
Tris (No.204-07885)	和光純薬株式会社
リン酸水素二ナトリウム (No.31726-05)	ナカライテスク株式会社
リン酸二水素カリウム (No.164-04315)	和光純薬株式会社
ソルビトール (No.198-03755)	和光純薬株式会社
L-ヒスチジン塩酸塩-水和物 (No.084-00702)	和光純薬株式会社
L-ロイシン (No.124-00852)	和光純薬株式会社
L-リジン-塩酸塩 (No.121-01462)	和光純薬株式会社
L-トリプトファン (No.204-03382)	和光純薬株式会社
L-メチオニン (No.21719-02)	ナカライテスク株式会社
アデニン硫酸塩・二水和物 (No.100195)	和光純薬株式会社
ウラシル (No.212-00062)	和光純薬株式会社
Ethidium Bromide(No.315-90051)	和光純薬株式会社
Ligation-Convenience Kit (No.319-05961)	タカラバイオ株式会社
ONPG (No.142-04691)	和光純薬株式会社
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O (No.196-02835)	和光純薬株式会社
Hi-Di formamide (No.4311320)	Applied Biosystems
KOH (No.163-03545)	和光純薬株式会社
DMSO (No.043-07216)	和光純薬株式会社
PEG4000 (No.162-09115)	和光純薬株式会社
SDS (No.196-08675)	和光純薬株式会社
酢酸リチウム二水和物(No.126-01532)	和光純薬株式会社

2.3 実験方法

2.3.1 滅菌操作

2.3.1.1 オートクレーブ処理

作成した培地、培養に用いた試験管、三角フラスコ、バッフルフラスコ、シリコン栓はオートクレーブ処理したものを使用した。オートクレーブ処理は 121 °C、20 分を行った。

2.3.1.2 加熱滅菌

本研究で使用した白金耳は、使用時にエメラルド部分が赤くなるまで加熱し、これを滅菌操作とした。

2.3.1.3 DNase free、RNase free 滅菌

本研究で DNA や RNA 操作に用いたピペットチップ、サンプルチューブ、爪楊枝はオートクレーブ処理したものを使用した。オートクレーブ処理は 121 °C、20 分を行い、乾燥機内で完全に水蒸気を取り除いたものを使用した。

2.3.1.4 フィルター滅菌

本研究で用いたアンピシリン、SDS などのオートクレーブ処理が不可能なものは滅菌フィルターを用い滅菌処理を行った。

2.3.2 培地組成

本研究で用いた培地の組成を以下に示す。

YMD 培地

0.67 % Yeast Nitrogen Base (without amino acids)、2 % Bacto-Agar (プレート作製時) を蒸留水で混合し、121°C 20 分でオートクレーブ後、20 % グルコースを 2 % になるように加えた。

Casamido acid 培地

0.67 % Yeast Nitrogen Base (without amino acids)、2 % casamido acid、2 % Bacto-Agar (プレート作製時) を蒸留水で混合し、121 °C 20 分でオートクレーブ後、20 % グルコースを 2 % になるように加えた。

YPD 培地

1 % Yeast Extract、2 % Peptone、2 % Bacto-Agar (プレート作製時) を蒸留水で混合し、121°C 20 分でオートクレーブ後、20 % グルコースを 2 % になるように加えた。

YPD 培地 + G418

冷めている YPD 培地に最終濃度 0.2 mg / ml となるように G418 を加えた。

Amino Acid Mixes (100×)

以下の組成で混合した後フィルター滅菌した。0.3 % Adenine、0.2 % Histidine、0.4 % Leucine、0.4 % Lysine、0.3 % Tryptophan、0.2 % Uracil。同様に Tryptophan の無いもの、Uracil の無いもの、Tryptophan と Leucine が無く Methionine があるもの、Leucine が無く、Lysine と Uracil のないもの、Adenine と Leucine のみのもの、Adenine のみの Amino Acid Mixes (100×) も作成した。

Amino Acid Mixes (100×) Casamido acid 培地用

以下の組成で混合した後フィルター滅菌した。0.3 % Adenine、0.2 % Histidine、0.4 % Leucine、0.4 % Lysine、0.3 % Tryptophan、0.2 % Uracil。同様に Tryptophan の無いもの、Uracil の無いもの、Tryptophan と Leucine が無く Methionine があるもの、Leucine が無く、Lysine と Uracil のないもの、Adenine と Leucine のみのもの、Adenine のみの Amino Acid Mixes (100×) も作成した。

YMD 培地 + Amino Acid Mixes

冷めている YMD 培地に最終濃度 (1×) になるように Amino Acid Mixes (100×) の溶液を加えた。

2.3.3 菌株の保存

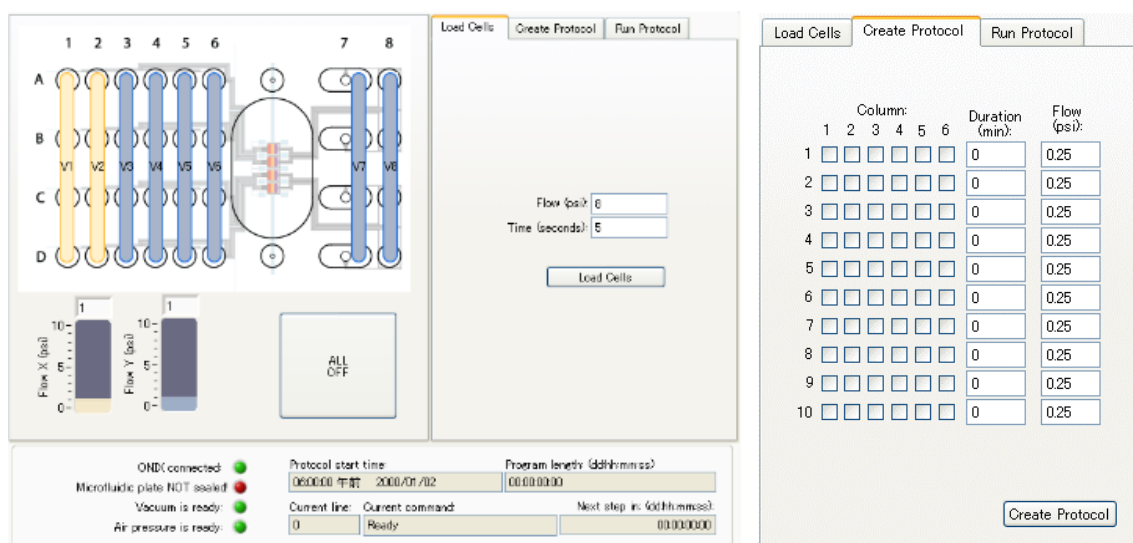
本研究で用いた酵母の短期保存はプレートを用いて行った。滅菌爪楊枝を用いてプレートに植菌し、37 °C で 2 日培養したプレートを低温（4 °C）で保管した。酵母がプラスミドを持つ場合、YMD 培地に酵母に対応するアミノ酸を塗り培養した。

本研究で用いた酵母の長期保存はグリセロールストック法を用いて行った。酵母を 30 °C, 220 rpm で 1 日培養した培養液 750 ml を 60 % グリセロール 250 µl 入ったスクルーキャップ付きチューブに加え、混合後、−80 °C で保存した。培養液はすべて YPD を用いた。

2.3.4 酵母・プライマー一覧

酵母株	遺伝型
FUY1679	<i>MATa ADE2 lys2 his3 leu2 trp1 ura3 HMR(t-RNA bound delete)</i> <i>trp1-1::HTB1-2mCherry::TRP1 HMR-leftHTB1_ECFP</i> <i>HMR-left-HTB1-ECFP HML-right-HTB1EYFP HMR-right-tDNA</i>

2.3.5 タイムラプス



液体 YPD で前培養した後、 $OD_{600} = 0.00025 \sim 0.0005$ になるように濃度調整した菌体 1 mL をエッペンに用意した。アルコールで vacuum のフタ (ゴム部分) を拭き、使うレーンの保存液をすべて取り除き、YPD (150~200 mL) を 1~8 に壁面を洗い流すように入れた (保存液が足りなければ次回以降のレーンへ加え補う)。ONIX と専用 PC の電源を入れ、vacuumを開始した。専用 PC で ONIX FG を起動し、以下の操作を行った: 「yeast」→「Y4」→ Create Protocol で Flow 2 以下、Duration 1 min で 1~6 →「CreateProtocol」→「Run」。Load Cells (8 専用プログラム) で同様に以下の操作を行った: Flow 2、Duration 60 sec。Vacuum を消し 1~8 の液をすべて取り除き、1~6 に培地 (通常 YPD)、8 に菌体をそれぞれ 150~200 mL 入れ、7 には何も入れない。再び vacuum を点け、以下の操作を行う: Load Cells Flow 2、Duration 120 sec。vacuum OFF にし 8 の菌体を取り除き、8 に培地を入れて vacuum を入れる。上の概略図 (V1~V8 が記載されたもの) で Flow 2 で V1, V2 から 1 つ、V3~V6 から 1 つ、V8 をクリックして流す (5 分程度)。自分が用いるサンプルと光源の GFP or CFP が一致しているか確認する。Definite Focus (音 2 回), Power Supply (音 0 回), 顕微鏡 (音 1 回), COLIBRI (音 1 回), PC の順で電源を入れ、AxioVision を起動する。レンズに油が差してなければ差し、タイムラプスできそうな酵母を探す、なければ菌体を入れるところからやり直す。Flow2 で V1-8 の流路を流した後、最後に 7, 8 の液をすべて取り除く。「Multidimensional Acquisition」→「マルチプルタイムラプス」→「Load」→使うプログラムを選択する。テンプレートごとのチャンネルから明視野の「露出の計算」をし最適な露出時間を、「固定」にチェックを入れ、必要なサイクル数を設定する。ピントを合わせ、Definite Focus を ON にしたら、Create Protocol

で Flow 2 , Duration はタイムラプス時間に合わせて設定し「Run」を押す。その後タイムラプスをスタートした。

画像解析

「ギャラリー表示」→「チャンネルタイムラプス」から調べたい画像の蛍光画像と Phase を選択し、「選択を抽出」した。各蛍光画像で画像補正後、「測定」→「手動計測」→「測定のロード」→「Densime max」を選択し、「測定開始」。「円」で細胞番号順に蛍光点を囲い「OK」を選択する。「計測」から「表の作成」を選択し、「パラメータ」の「モード」から「Table」を選択し「スタート」。データを保存し Excel で開いた。それぞれの蛍光の輝度からノーマライズの輝度を引き、最高輝度の値で割った。GFP/m-cherry のように、それぞれ最高輝度で割った値同士で割った。得られた数値をその蛍光輝度とした。

機能

・撮影時

<Z-stuck>

Z で切りたいテンプレートを選択し、「Z スタック」にチェックを入れた。「Z」からモードを中央にし、ピントを合わせ「中央」。枚数を決め「最適間隔」を選択した。「セクション毎に全てのチャンネル取得」、「現在のフォーカス位置から Z-スタック」にチェックを入れた。このとき、テンプレートに複数のチャンネルが存在し、その内 1 つだけ Z-stuck をする場合「チャンネル」から「機能拡張パラメータ」で、Z が必要なチャンネル以外のチャンネルの「Z スタックモード」を「中心面-コピー」もしくは「中心面-黒」に設定した。

<多点>

それぞれのテンプレートに対し、「ポジションリスト」にチェックを入れた。「XY」から「Use 'Definite Focus' at each position」にチェックを入れ、「リスト取得」を選択した。タイムラプスする細胞を中心に合わせ、ピントも合わせた。上の青、緑、赤、黄のボックスいずれかを押せば、XY が記憶される。以上を多点で追跡する細胞全てに対して行った。

<画像サイズの変更>

「カメラ」から「AxioCamMR3」を選び、「フレーム」→「カメラモード」で通常「1388×1040 standard mono」になっているが、これを落とすことで、1/4 , 1/9 , 1/16 , 1/25 になる。「ツ

ール」→「オプション」→「画像取得」で、「画像取得の設定」を「8bitに変換」で 1/2 になる。

また、「多次元画像取得」で「オートセーブ」にチェックし、保存形式を「Carl Zeiss Vision Image」を「Tagged Image File」に変更し、「長時間タイムラプスモード」にチェックを入れると、撮影ごとに画像を保存するので処理溜まりがなくなる。「Carl Zeiss Vision Image」では、タイムラプス終了後にすべての画像をファイル化した。また多点では、それぞれのポジションに対してフォルダが作成されるため、処理溜まりは生じないが、「Z-stuck」をすると Z の枚数倍データ量が膨らむ。

画像処理

<全焦点画像の作成>

「画像処理」→「拡張フォーカス」→「サブセット」で、Z で切ったチャンネルのみにチェックを入れた。すべて、もしくは必要な範囲の Z スタック、必要な範囲のタイムラプスにチェックし「OK」、「手法」を「ウェーブレット」にし、「OK」を選択した。

<画像分割>

「画像処理」→「その他の処理」→「イメージサブセットの作成」を選択した。「チャンネル」に必要なチャンネル、「Z ポジション」に必要な Z、「タイムポイント」に必要な T を入力、「OK」を選択した。

<画像連結 (異なる T)>

「画像処理」→「タイムラプス処理」→「タイムラプス連結」を選択した。「Input1」に最初にデータを、「Input2」に次のデータを選択し、「OK」を選択した。

<画像連結 (同じ T)>

「画像処理」→「タイムラプス処理」→「Time Stitching」を選択した。「Input1」、「Input2」をそれぞれ選択した。Z-stuck があるデータを連結させる場合、「copy」は Z に合わせて複製、「projection」は 1 枚に、「plane」はそのまま連結させた。

<チャンネルの追加>

「画像処理」→「その他の処理」→「チャンネル追加」を選択した。「入力 1」と「入力 2」に、それぞれのファイルを選択し、「OK」を選択した。

2.4 結果・考察

2.4.1 手動による解析

使用した細胞株は三番染色体の HMR 領域左側に ECFP、HML の右側に EGFP を挿入した。ヒストンタンパク質である HTB1 と融合したこれらは発現しても核内に止まることができる。HMR と HML 領域では Sir タンパク質によって遺伝子発現が負に制御されており、E サイレンサーもしくは I サイレンサーによって境界が形成されている。以前の研究において、世代ごとにサイレシングのゆらぎによって遺伝子発現が切り替わることを報告しており、本研究では系統樹上でタンパク質発現の変動を観察できるツールとして用いた (Fig. 2-1a)。また、mCherry は酵母の核の位置を補正するため挿入している。

40 min 毎に撮影した蛍光画像に対応する明視野画像をそれぞれ抽出し、全細胞の挙動を追跡した。それぞれの細胞には生まれた順で 1 から番号を割り振った (Fig. 2-1b)。異なるフレームでも同一の細胞には同じ番号が割り振られるが、フレームの前後で細胞の位置は微妙に移動する。フレーム間の細胞の対応付けが必要となり、4 min 毎の明視野画像を見比べ 40 min 後に細胞の移動先を見つけなければならない。この作業はフレーム数と追跡細胞数が増えるに従って、急激に作業量が増え、手動による解析を著しく困難にする最も大きな原因である。我々はこのステップに 10 時間以上の作業を要した。フレーム毎に細胞に番号を付けた後、それぞれの細胞の親子の関連付けを行った。細胞同士が密集しているとどの細胞が母細胞なのか判定することが難しい。実際、幾つかの親子は 40 min 毎の明視野画像では判別がつかなかったため、4 min 毎の明視野画像を見比べ判定した。この作業も解析を困難にする原因のひとつである。細胞番号とそれに対応する親子関係を明らかにした後、それぞれのフレームで生まれた娘細胞と生んだ母細胞の蛍光を測定した。このとき、蛍光値は細胞内の最大の輝度が示されている (Fig. 2-1c)。すべての細胞を測定し終えたら、Excel に蛍光値等を記入した (Fig. 2-1d)。また、特定のフレームで細胞分裂が発生した場合、対応する母、娘細胞の flag 列に 1 を記入し、娘細胞の parent 列に母の細胞番号を記入した。Excel ファイルはフレームごとに番号を振り発現量解析ソフトで読み取らせ、樹形図を完成させた。

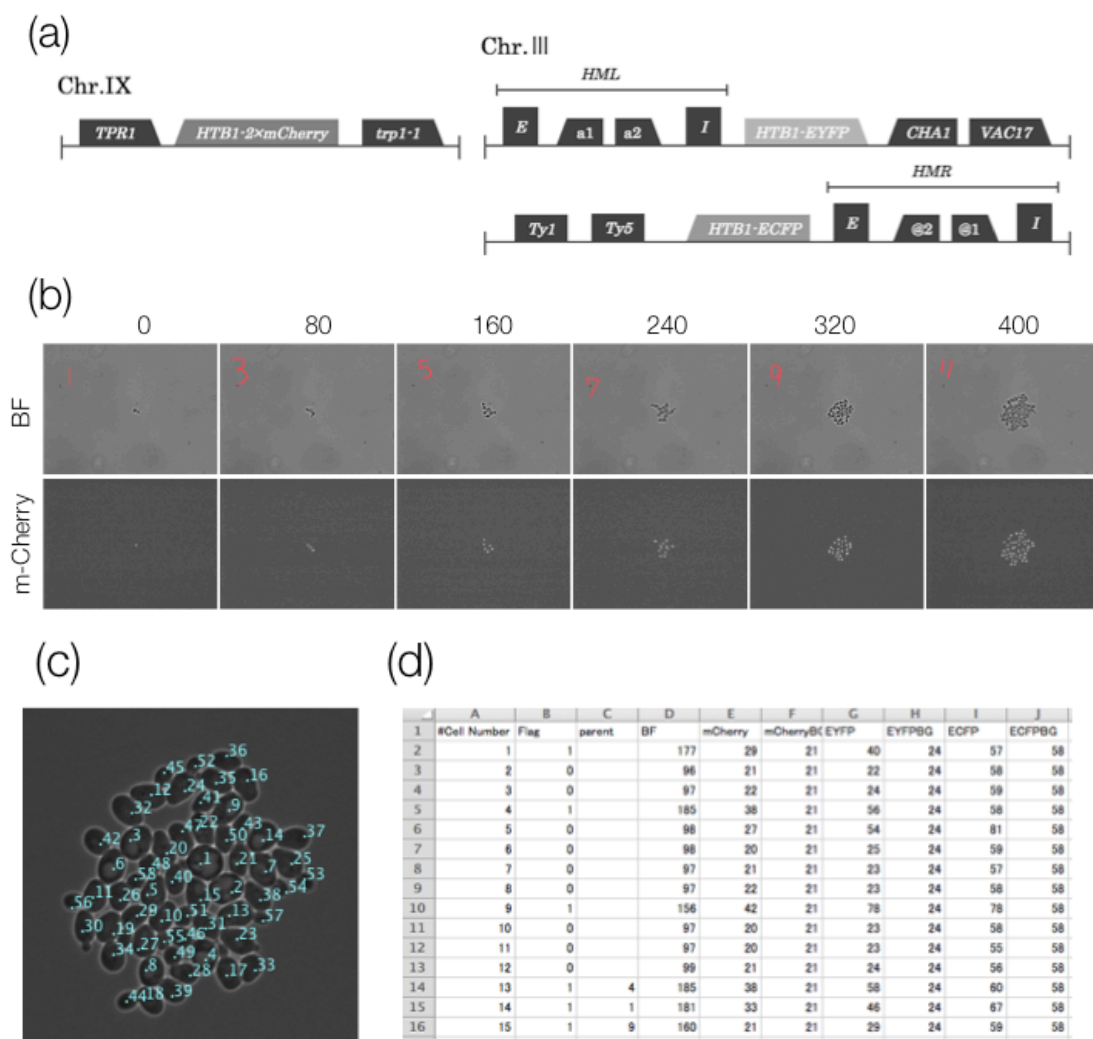


Fig. 2-1 Manual analysis procedure. (a) Schematic representation of loci for *gfp*-fusion proteins. *mCherry* was inserted for nuclear position correction. (b) Time-lapse image of cells used for analysis (every 80 min). Bright field images and fluorescent images were taken every 4 and 40 min, respectively. (c) Frame of manual cell tracking. All cells were assigned a unique number, and cells in each frame were associated. (d) An example of an Excel file for data aggregation. The daughter cell, its mother cell, and the fluorescence value of each frame was entered into Excel.

2.4.2 外周エッジ強調と Watershed 法を用いた細胞領域の分割と追跡

先述の分析を完了するにはほぼ 1 日かかるため、ソフトウェアベースのコンピュータ支援分析システムを開発して、分析に必要な時間を短縮した。ソフトウェアベースのシステムでは、細胞の周辺境界を用いて、4 分ごとにキャプチャされた各明視野画像フレームで細胞領域抽出を実行した。しかし、被写界深度および照明に関連する顕微鏡の問題により、細胞の周辺境界がしばしば弱く検出されたため、エッジの強調と補間を適用して、各明るい領域の弱い境界を強調し、細胞領域を抽出した (Fig. 2-2a)。ここで、細胞のセグメンテーションには流域画像セグメンテーションアルゴリズム (watershed 法) を使用した (Fig. 2-2b) ¹⁸。この方法では、画像のエッジ強度を地形と見なし、地形の各集水域で水流プロセスをシミュレートして、その流域を検出する。細胞抽出では、このアルゴリズムによって検出された各集水域と流域は、細胞領域とその境界に対応した。作業は約 2 分程度の時間を要し、結果、ほぼ全ての細胞の領域がミスなく分割された (99.8 %)。

各フレームのセルは、フレーム間の一貫性を無視して独立して抽出した。2 つの連続するフレームの同一のセルを関連付けるため、以下の手法を用いた。 C_0 と C_k はそれぞれ現在のフレームのターゲットセルと次のフレームの k 番目の候補セルを示す。追跡プロセスでは、評価値 F_k を使用して、セル C_0 とその候補 C_k の一致度を推定した。 p_k 、 l_k 、 a_k をそれぞれ (輪郭から求めた) 重心、円周長、セル C_x の面積とする ($x = 0, k$)。この幾何学的情報を使用して、 F_k は次のように定義された。

$$F_k = W_p |p_0 - p_k| + W_l |l_0 - l_k| + W_a |a_0 - a_k| \quad (2)$$

ここで、 W_p 、 W_l 、 W_a は評価値に対する重み係数で、実験により、 W_p 、 W_l 、 $W_a = 20 : 1 : 2$ と決定した。 F_k は、現在のフレームの p_0 を中心とする次のフレームの特定の近傍にある各候補セル C_k に対して評価された (Fig. 2-2c)。 C_0 の対応するセルを識別する最も簡単な戦略は、 F_k がすべての候補の中で最も低い C_k を見つけることであったが、この戦略はターゲットセルの識別に矛盾を生じ、対応エラーの増加につながる。これを克服するためにアニーリングテクニックを導入した。この手法では、最小 F_k が所定のしきい値よりも小さい各ターゲットセルについて次のフレームの対応するセルが決定され、その後、しきい値が所定のステップサイズで徐々に増加し残りのセルを特定する。

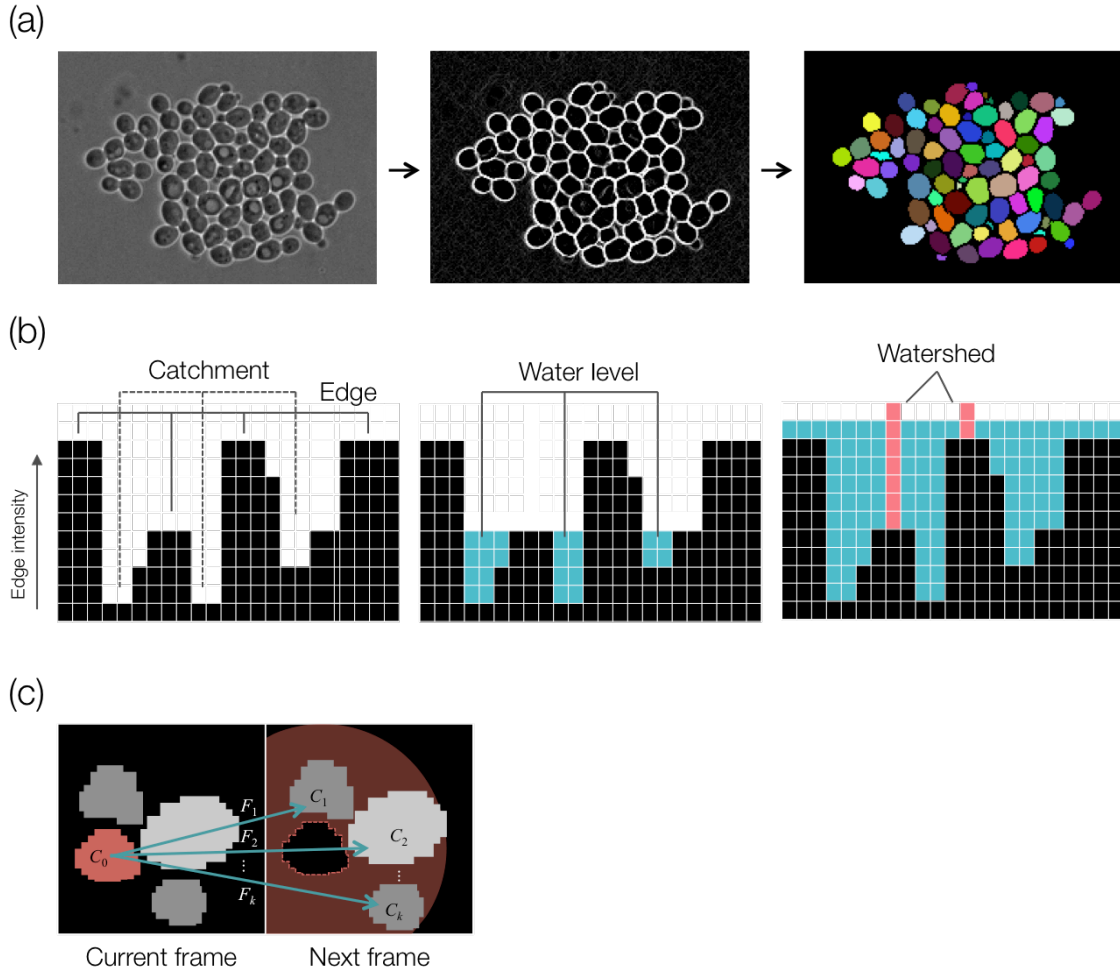


Fig. 2-2 Cell region extraction and association of cells between frames. (a) Left panel, outer peripheral edge of cells in a raw image; Middle panel, after edge enhancement and interpolation to enhance outer peripheral edges; Right panel, result of cell region extraction after the watershed algorithm was applied to the middle panel. Each cell is shown in a different color. (b) Watershed segmentation algorithm used in cell region extraction (a). Left panel, edge intensity of an image regarded as topological terrain; middle panel, simulation of a water-filling process for each catchment; right panel, position where waters in two different catchments meet is detected as a watershed (shown in red), which gives the boundary between the catchments. (c) Association of an identical cell between two successive frames. C_0 and $C_1 - C_k$ represent the target cell in the current frame and its candidates in the next frame, respectively. F_k denotes the evaluation value for the candidate cell C_k . The cell C_k whose F_k is the minimum is fundamentally associated with the target cell C_0 , in the next frame.

2.4.3 セル間のエッジ強度を用いた親娘分析

細胞の中には、連続するフレームに娘細胞が出現するものもある。追跡システムを使用してこれらの細胞を母細胞に割り当てることはできない。これに対応するために、形態分析を用いて母細胞の娘を特定した。Fig. 2-3a に示すように、娘細胞と母細胞の境界は親細胞の境界よりも弱い。この特性に基づいて、これらの細胞の近くに位置する娘候補と母候補の間の境界の強度を評価することにより、娘細胞を母細胞に割り当てた。境界強度を安定的に評価するために、対象となる各娘がその面積が規定のしきい値を超えるように成長した後に、娘と母の関連付けを実行した。最初に、標的娘細胞 D_0 とその母候補 M_k との間の境界強度を評価するために、 D_0 と M_k との間の境界領域 R_k と定義した (Fig. 2-3b)。次に、娘と親細胞のラベル番号を含む (背景領域や他の親細胞のラベル番号を含まない) 3×3 画素を抽出した (Fig. 2-3c)。抽出した領域と同位置にある明視野画像の輝度値の中央値を求め、エッジの強さとした。対応付けには親細胞候補数が一つの娘細胞を対応付けさせ、これによって親細胞候補数が 1 つになる娘細胞も対応付けさせた。上記操作を繰り返しても 2 つ以上の親細胞候補を有する娘細胞に対しては、細胞間エッジの強さが基準値以下で最も弱い親子を対応付けさせ、確定しなかった娘細胞は閾値を上げて再度対応付けさせた。この手法は同時に複数の娘細胞を生まない酵母の性質に上手く適合し、その結果、親子の関連付けで 92.7 % の精度を達成した。

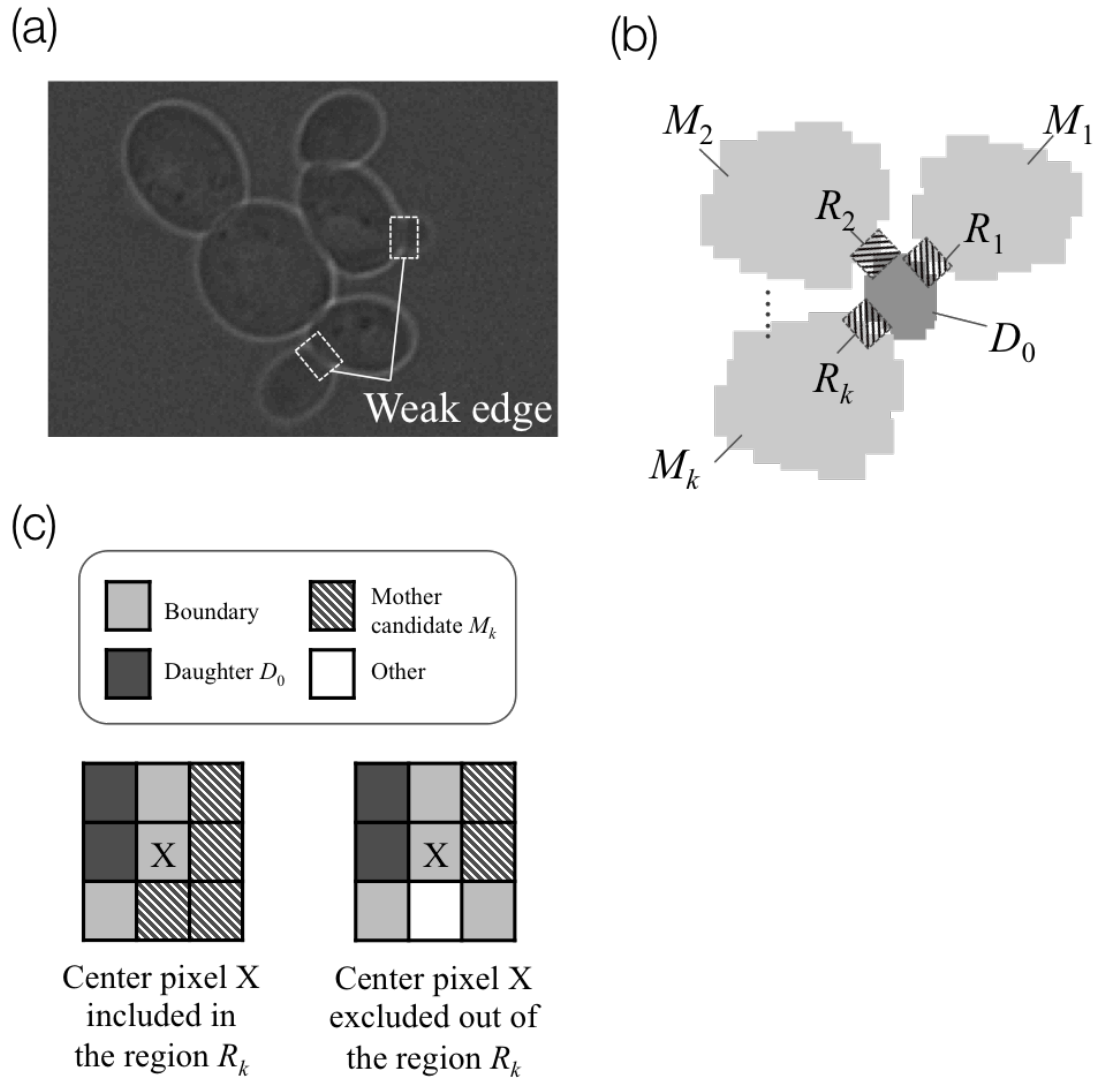


Fig. 2-3 (A) Raw image including a daughter-mother pair. Note that the boundaries between the daughter and mother cells in the white box are very weak. (B) Boundary region R_k (shaded region) between the daughter cell D_0 and its mother candidate M_k defined by using the 3×3 mask shown in (C). (C) Center pixel X in the 3×3 mask included in or excluded out of the boundary region R_k . Bottom left panel, center pixel X included in R_k , whose 3×3 vicinity includes pixels belonging to D_0 , M_k , or boundaries; Bottom right panel, center pixel X excluded out of R_k , whose 3×3 vicinity includes at least a pixel other than the one in D_0 , M_k , and boundaries.

2.4.4 自動解析システムで起こりうるミスとその対策

ここまでの作業が自動的に行われるが、発生する幾つかのミスは手動で直す必要がある。例えば、細胞分割において、2つの細胞を1つと見做す、反対に1つの細胞を2つと見做すことがある (Fig. 2-4a)。これらのミスは、細胞自体が大きく変形しする、もしくは細胞核の発光によって周囲長を読み取れなかった場合に発生した。誤った分割が起きたときは領域の結合、分割を修正することができる。この修正は抜けた領域を線で塗りつぶす、または結合した領域を線で切り離すなどマウス操作で直感的に行える。次に前後関係の特定において、細胞が大きく移動するなどして元の細胞を特定できない場合が存在した (Fig. 2-4b upper)。各フレームの各細胞は固有の情報 (座標軸、周囲長、面積、前フレームでの対応する細胞番号、母娘の関係にある細胞番号等) を持っており、本システムでは画面上の細胞をクリックすることでこれを閲覧できる。Fig. 2-4b のような前後関係の特定ミスであれば、情報を手動で書き換えることで修正を可能にした (Fig. 2-4b bottom)。

Fig. 2-4c はエラーの伝播を示している。今回の解析に用いた画像では 51 フレーム目に母娘関係のエラー (Cell#1 の子孫であるにも関わらず、Cell#2 の子孫であると判定された) が起きた。ミスが修正されない場合、エラーは一つの細胞にとどまらず、85 フレーム目にて別の細胞にも伝播した。修正ステップにおけるエラーの許容は別のエラーを発生させるため、必ずこのステップで修正する必要がある。

最後に蛍光画像を読み込み、明視野画像と対応づけることで蛍光値を細胞の情報に組み込んだ。その結果、手動入力と同様に Excel ファイルとして結果が算出され、樹形図が完成した (Fig. 2-5)。末枝では両者で色が違う円があるが、これは手動では目測で生まれた順から 50 個番号を振っているが、自動解析システムでは細胞サイズが一定値以上になったものから順に番号が振られるためである。選んでいる細胞の違いであり、本質的な違いはない。細胞領域 i の発現量は以下の式で算出した (4)。ECFP を用いた際の蛍光輝度を Y_i 、背景の蛍光強度を Y_{bg} 、輝度の最大値を Y_{max} (ユーザー指定) とした。また、mCherry を用いた際の蛍光輝度を C_i 、背景の蛍光強度を C_{bg} 、輝度の最大値を C_{max} (ユーザー指定) とした。

$$F_i = ((Y_i - Y_{bg}) / Y_{max}) / ((C_i - C_{bg}) / C_{max}) \quad (4)$$

樹状図の円は、特定のフレームの1つの細胞であり、2種類の蛍光を円の左右に濃淡をつけて表示した。また、あらかじめ表示する規定の数を超えた細胞、または死細胞は灰色である。すべての作業は樹状図の出力までで完了するが、ここまでに手作業では

15 時間以上を費やした（400 分間で 50 個のセルを追跡した場合）。一方、この研究で開発されたシステムは、修正作業を含めても 50 分で終了した（Fig. 2-6）。このように本研究では、追跡方法と親娘の識別に異なる方法を使用することにより、最小限の人的努力で高精度の分析を迅速に実行することに成功した。フレーム間で大きく移動した細胞が誤って処理されるという問題や親細胞の認識ミスが改善されると、より便利な分析サポートシステムになりえるだろう。

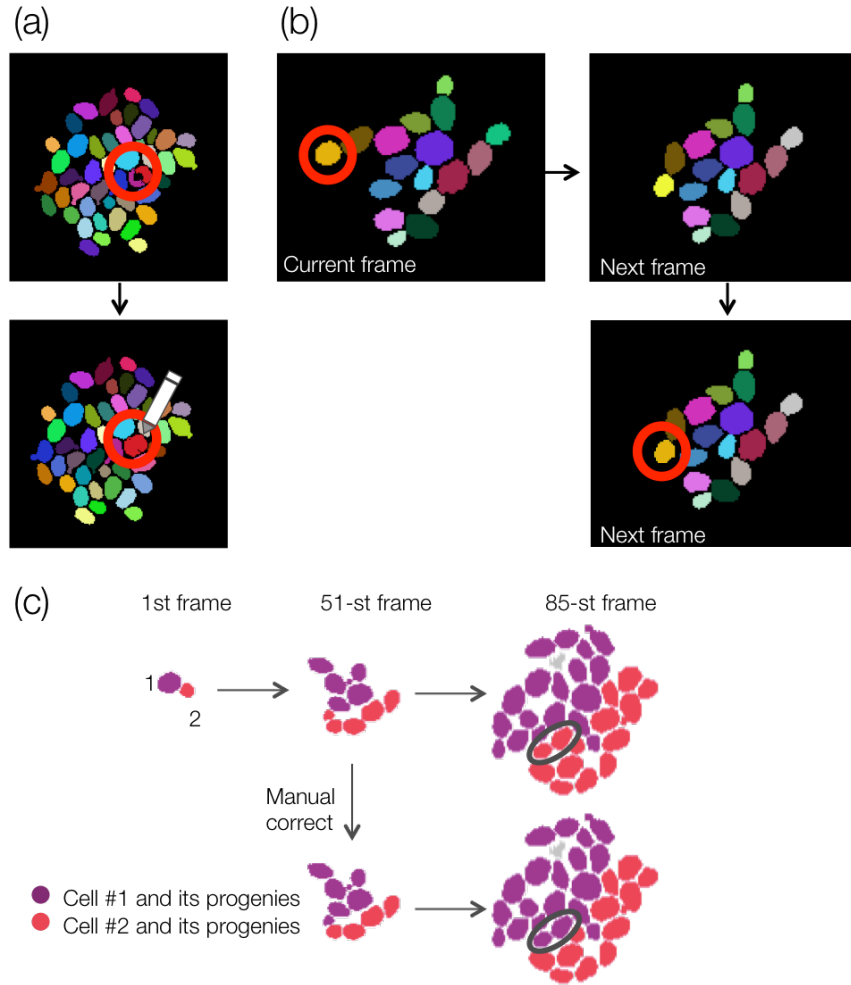


Fig. 2-4 Examples of errors in the software system. (a) Error in cell region extraction and its manual correction. Top panel, error in the cell extraction step, where the cell in the red circle fragments; Bottom panel, manual error correction using the painting tool. (b) Error in cell association between frames due to large motion. Top left panel, the target cell for cell association; Top right panel, without manual correction. The corresponding cell is not identified in the next frame; Bottom right panel, manual correction that associates the target cell with the one in the red circle in the next frame. (c) Error propagation between frames. Red cells represent the progenies of cell #2. A daughter-mother association error in the 51-st frame propagates to successive frames, which produces erroneous identifications of the progenies shown in the ellipse in the 81-st frame. Manual correction of the error once in the 51-st frame prevents all successive errors, leading to correct identifications in the 51-st frame.

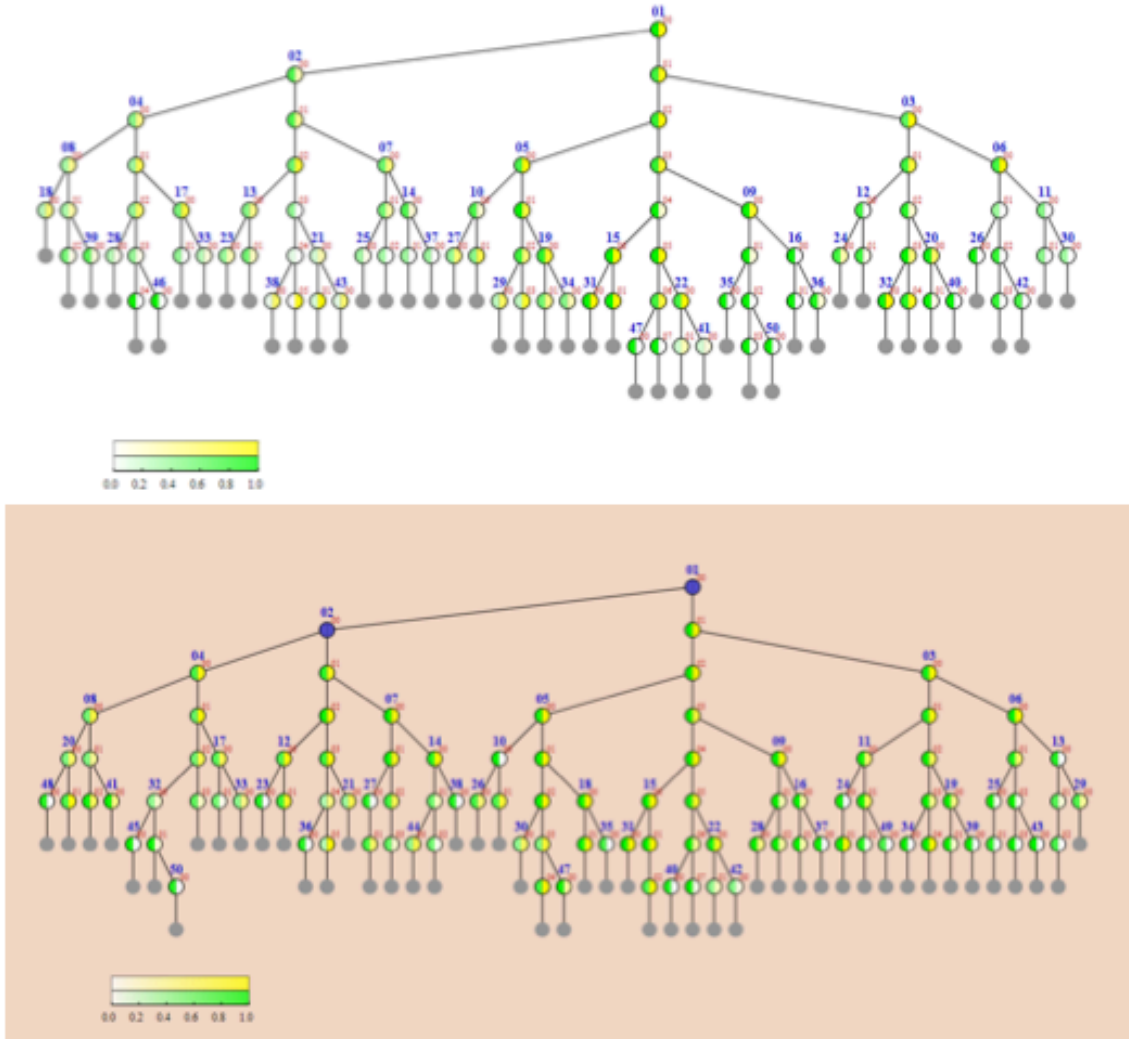


Fig. 2-5 Dendrogram generation. Top panel, the dendrogram obtained after full manual analysis; Bottom panel, the dendrogram obtained using the software with manual error correction. Circles on the vertical lines indicate identical cells in different frames, and branching indicates cell division. The ECFP signal is shown in green, the EYFP signal is shown in yellow. Cells that were no longer tracked or dead are shown in gray circles. The daughter-mother relationships of cells that divided from those in the first frame are set manually and shown as a blue circle to distinguish them from those identified using the analysis method in Fig. 1-4.

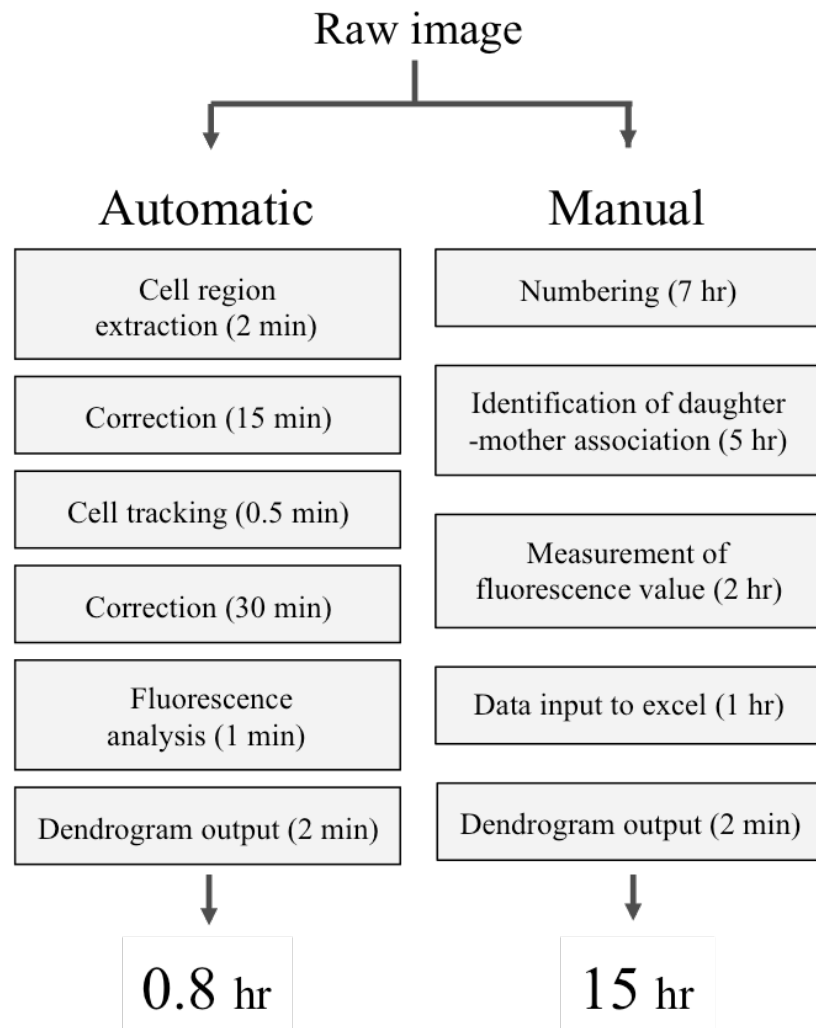


Fig. 2-6 Manual and automatic analysis times. Each step is displayed in a gray column and arranged in the order of analysis.

2.5 参考文献

- 1 Egger, G., Liang, G. N., Aparicio, A. & Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457-463, doi:10.1038/nature02625 (2004).
- 2 Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Buklijas, T., Low, F. M. & Beedle, A. S. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nature Reviews Endocrinology* **5**, 401-408, doi:10.1038/nrendo.2009.102 (2009).
- 3 Jones, P. A. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* **3**, 415-428, doi:10.1038/nrg816 (2002).
- 4 Mano, Y., Kobayashi, T. J., Nakayama, J., Uchida, H. & Oki, M. Single cell visualization of yeast gene expression shows correlation of epigenetic switching between multiple heterochromatic regions through multiple generations. *PLoS Biol.* **11**, e1001601, doi:10.1371/journal.pbio.1001601 (2013).
- 5 Kitada, T. *et al.* Mechanism for epigenetic variegation of gene expression at yeast telomeric heterochromatin. *Genes Dev.* **26**, 2443-2455, doi:10.1101/gad.201095.112 (2012).
- 6 Osborne, E. A., Hiraoka, Y. & Rine, J. Symmetry, asymmetry, and kinetics of silencing establishment in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by single-cell optical assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1209-1216, doi:10.1073/pnas.1018742108 (2011).
- 7 Winter, M. R. *et al.* Computational Image Analysis Reveals Intrinsic Multigenerational Differences between Anterior and Posterior Cerebral Cortex Neural Progenitor Cells. *Stem Cell Reports* **5**, 609-620, doi:10.1016/j.stemcr.2015.08.002 (2015).
- 8 Meijering, E., Dzyubachyk, O. & Smal, I. METHODS FOR CELL AND PARTICLE TRACKING. *Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells: Optical and Spectroscopic Techniques* **504**, 183-200, doi:10.1016/b978-0-12-391857-4.00009-4 (2012).
- 9 Shen, H. *et al.* Single Particle Tracking: From Theory to Biophysical Applications. *Chem. Rev.* **117**, 7331-7376, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00815 (2017).
- 10 Li, K. *et al.* Cell population tracking and lineage construction with spatiotemporal context. *Med. Image Anal.* **12**, 546-566, doi:10.1016/j.media.2008.06.001 (2008).
- 11 Winter, M. *et al.* Vertebrate neural stem cell segmentation, tracking and lineaging with validation and editing. *Nat. Protoc.* **6**, 1942-1952, doi:10.1038/nprot.2011.422 (2011).
- 12 Tsai, H. F., Gajda, J., Sloan, T. F. W., Rares, A. & Shen, A. Q. Usiigaci: Instance-aware cell tracking in stain-free phase contrast microscopy enabled by machine learning.

- Softwarex* **9**, 230-237, doi:10.1016/j.softx.2019.007 (2019).
- 13 Van Valen, D. A. *et al.* Deep Learning Automates the Quantitative Analysis of Individual Cells in Live-Cell Imaging Experiments. *PLoS Comput. Biol.* **12**, doi:10.1371/journal.pcbi.1005177 (2016).
 - 14 Kvarnstrom, M., Logg, K., Diez, A., Bodvard, K. & Kall, M. Image analysis algorithms for cell contour recognition in budding yeast. *Opt. Express* **16**, 12943-12957, doi:10.1364/oe.16.012943 (2008).
 - 15 Wang, Q. L., Niemi, J., Tan, C. M., You, L. C. & West, M. Image Segmentation and Dynamic Lineage Analysis in Single-Cell Fluorescence Microscopy. *Cytometry Part A* **77A**, 101-110, doi:10.1002/cyto.a.20812 (2010).
 - 16 Hashimoto, M. *et al.* Noise-driven growth rate gain in clonal cellular populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 3251-3256, doi:10.1073/pnas.1519412113 (2016).
 - 17 Versari, C. *et al.* Long-term tracking of budding yeast cells in brightfield microscopy: CellStar and the Evaluation Platform. *Journal of the Royal Society Interface* **14**, doi:10.1098/rsif.2016.0705 (2017).
 - 18 Najman, L. & Schmitt, M. WATERSHED OF A CONTINUOUS FUNCTION. *Signal Processing* **38**, 99-112, doi:10.1016/0165-1684(94)90059-0 (1994).

第3章 エピジェネティックな視点に

着目した糖尿病白内障予防薬の開発

3.1 緒言

ほとんどの白内障は加齢に関連しており、ほぼ 100 %の人が 80 歳までに白内障を発症する¹⁹。糖尿病も白内障の主な原因であり、糖尿病患者は白内障を早期かつ 5 倍の頻度で発症する²⁰。糖尿病の世界的な発生率が増加し続けるにつれて、糖尿病性白内障の発生率が増加し、早期発症の視覚障害の主要な原因になるだろう。白内障の唯一の治療法は、水晶体の外科的除去と眼内レンズの交換である。しかし、このアプローチはいくつかの副作用を伴い、医療設備の不十分な地域では利用できない。したがって、必要なレンズ交換までの時間を延長することが臨床的に望ましいものの、現在、糖尿病性白内障に対する薬理学的アプローチは知られていない²¹。

ポリオール蓄積および水晶体上皮細胞 (LEC) アポトーシスによる細胞内浸透圧の増加は、糖尿病性白内障の主な原因である。高い細胞内浸透圧は、細胞の膨張とそれに続く水晶体皮質の分解を増加させることで水晶体の濁度を促進する^{22,23}。これは、アルドース還元酵素阻害剤を使用してポリオールの蓄積を阻害することで予防できる²⁴。一方、LEC アポトーシスを誘導するための過酸化水素の添加は、皮質白内障と水晶体皮質の究極の崩壊を引き起こす²⁵。過去の研究では、ポリオールの蓄積が LEC アポトーシスを増加させることも実証されており、これらの要因が相互に関連していることが示唆されている⁸。糖尿病性白内障の形成に寄与する細胞内の変化が報告されているが^{22-24,26}、これらの事象の詳細な分子メカニズムは十分に理解されていない。白内障形成の分子事象を解明することは、糖尿病性白内障形成の予防または遅延させるために重要である。

エピジェネティクスとして知られている DNA 配列に依存しない遺伝子発現調節メカニズムは、多様な生理学的および病理学的現象を調節するため、エピジェネティックな調節因子は多くの疾患プロセスの実行可能な治療標的である²⁷。エピジェネティックな修飾は、DNA メチル化と翻訳後ヒストン修飾によって部分的に調節されており、どちらも遺伝子転写を抑制または促進することができる²⁸。加齢性白内障では、抗酸化酵素 Gstm3 プロモーター領域の高メチル化による転写抑制が確認されており、白内障の形成に寄与する可能性があるだろう²⁹。糖尿病性白内障では、抗酸化阻害剤 Keap1 はプロモーター領域の低メチル化により転写的に活性化される³⁰。他にも、Cryaa、Ercc6、

および Ogg1 のメチル化率も白内障で変化することが知られている³¹⁻³³。また、メチル化だけでなくアセチル化による翻訳後ヒストン修飾も、白内障の形成に関連している可能性がある。一般に、ヒストンアセチルトランスフェラーゼはヒストンのアセチル化によりクロマチン構造を緩和し、近傍遺伝子の発現を増加させる。HAT は、GNAT ファミリの Pcaf と Gcn5、MIST ファミリの Tip60 と Moz、p300 / Cbp ファミリの p300 と Cbp など、機能的役割と構造的特徴に従って分類できる³⁴。いくつかの先行研究は、ヒストンのアセチル化と他のタイプの白内障形成との関係を調査していた。例えば、UV 曝露は白内障の既知のリスクであり、LEC における UV-B 照射はヒストン脱アセチル化を誘発する³²。Rong らはウサギのレンズを HAT 阻害剤のアナカルド酸で処理すると、レンズの表面に白濁が形成されることが報告された³⁵。さらに、アナカルジン酸とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤トリコスタチン A (TSA) を共添加した場合、この濁度は形成されなかった。ラットの Tgf- β 誘発白内障も水晶体表面の混濁を引き起こし、TSA によって同様に阻害される^{36,37}。これらの報告は、エピジェネティックな修飾が白内障の形成に関与しており、修飾を防ぐことで白内障の形成が抑制されることを示唆する。しかし、糖尿病性白内障におけるエピジェネティックな修飾の役割は不明であった。

本研究では、ラット糖尿病様白内障における HAT および HDAC 阻害剤の予防効果を評価するために、ガラクトース含有培地でのインキュベーションにより *ex vivo* のレンズ混濁を誘導した。次に、HDAC / HAT 阻害剤がこのモデルの水晶体混濁に影響するかどうかを評価した。さらに、ラットレンズのマイクロアレイ分析 ± HAT / HDAC 阻害剤を使用して、ガラクトース誘発性白内障形成に寄与する標的遺伝子 Plk3 を特定した。これらの結果は、Plk3 を介した糖化白内障の HAT 調節の新しいメカニズムを提示した。

3.2 試薬と機器

本章の研究に用いた試薬と機器を以下に示す。試薬に関してはここに示した以外のものはナカライテスク株式会社の特級あるいは分子生物学用の試薬を用いた。

Table 3-1 試薬と器具

Primer	SIGMA-ALDRICH
研究実験用はさみ 反剪刀 両尖 (HSB 545-09)	三商
超精密ピンセット (No.DU5-45)	DUMONT
スプリング剪刀 (No.15003-08)	Fine Science Tools
12well plate (MS-8012R)	住友ベークライト
100mm×15mm dish	Fisherbrand
φ40×13.5mm シャーレ	アズワン
パラフィン 1 号 (4565)	SFJ
マイJECTター (ss-10M2913)	テルモ株式会社
滅菌フィルター (MILLEX-GS) (No.SS-05SZ)	ADVANTEC
シリンジ	テルモ株式会社
キュベット	Bio-Rad
遠心分離機 (FB-4000)	KURABO
冷却遠心分離機 (centrifuge 5417R)	eppendorf
遠心分離機 (centrifuge 5418)	eppendorf
高速冷却遠心機 (6200)	KUBOTA
クリーンベンチ (MCV-710ATS)	三洋電機株式会社
クリーンベンチ (MCV-B161S)	三洋電機株式会社
クリーンベンチ (PCV-1303ARG3)	日立
高圧蒸気滅菌器 (MLS-3020)	三洋電機株式会社
高圧蒸気滅菌器 (MLS-2420)	三洋電機株式会社
乾燥機 (MOV-212 (U))	三洋電機株式会社
分光光度計 (UV-1200)	島津製作所
実体顕微鏡 (SZX12)	OLYMPUS
照明用光源 (LG-PS2)	OLYMPUS
顕微鏡デジタルカメラ (DP12)	OLYMPUS
クリオスタット (LEICA CM3050S)	LEICA

炭酸ガス培養器 (BNA-111)	タパイエスベック
ドライバスインキュベーター (FG-01N)	FastGene
ドライバスインキュベーター (MD-02N110)	Major science
ブロックインキュベーター (BI-516)	ASTEC
マイクロチューブローテーター (MTR-103)	Iuchi
サーマルサイクラー (PC320)	ASTEC
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
アガロースゲル電気泳動装置	ADVANCE
ゲル撮影装置	ASTEC
pH メーター	東亜 DKK 株式会社
蒸留水製造装置 (RFD210TA)	ADVANTEC
超純水製造装置	日本ミリポア株式会社
ボルテックスミキサー	M&S 機械株式会社
上皿天秤 (AV2102C)	Ohaus
微量天秤 (R1800)	カールツァイス株式会社
プレートリーダー (infinite F500)	TECAN
Realtime PCR (7300 Real time PCR System)	Applied Biosystem
Realtime PCR (StepOne Real time PCR System)	Applied Biosystem
Power SYBR Green Master Mix	Applied Biosystem
Qubit® RNA HS Assay kit	Life technologies
ケタラル (1119400A2038)	第一三共
キシラジン (セラクター®2 %注射液)	バイエル薬品
One STEP Ladder 100 (0.1~2kbp) (No.313-05241)	NIPPON GENE
塩化カルシウム (No.031-00435)	和光純薬株式会社
EDTA (No.15111-45)	ナカライテスク株式会社
水酸化ナトリウム (No.198-13765)	和光純薬株式会社
酢酸ナトリウム (No.31137-25)	ナカライテスク株式会社
酢酸 (No.017-00251)	和光純薬株式会社
エタノール (No.057-00456)	和光純薬株式会社
マイヤーヘマトキシリン (No.3000-2)	武藤化学
ピュア・エオシン (32042)	武藤化学
ホルマリン (No.2110-1)	武藤化学

グータルアルデヒド (079-00533)	和光純薬株式会社
組織脱水溶液 (200-13877)	和光純薬株式会社
組織用迅速固定液 (KY-500)	クラボウ
PFA (162-16065)	和光純薬株式会社
Entellan (1.07961.0100)	Merck
Tris (No.204-07885)	和光純薬株式会社
PBS (045-29795)	和光純薬株式会社
M199 (M4530)	Sigma
BSA (11BSASG100)	MP Biomedicals, LLC
Penicillin-Streptomycin (15140-122)	Thermo Fisher Scientific
TRIZOL (15596026)	Thermo Fisher Scientific
Ethidium Bromide (No.315-90051)	和光純薬株式会社
DMSO (No.043-07216)	和光純薬株式会社
SDS (No.196-08675)	和光純薬株式会社
SDS (No.196-08676)	和光純薬株式会社
Curcumin (ab120618)	abcam
HAT inhibitor II (ab144556)	abcam
CTK7A (382115-10MG)	EMD Millipore
Epigenetic Multiple Ligand (sc-221591)	santa cruz
Garcinol (ab141503)	abcam
Anacardic Acid (ab120892)	abcam
MG149 (s7476)	selleck chemical
CTPB (19570)	cayman chemical
C646 (SML0002-5MG)	sigma
NU9056 (sc-397052)	santa cruz
CPTH2 (12086)	cayman chemical
Butyrolactone 3 (ab141255)	abcam
gallic acid (g7384)	sigma
(-)-Epigallocatechin gallate (059-05411)	和光純薬株式会社
EML425 (1675821-32-5)	Tocris
L002 (17778)	cayman chemical
ISOX DUAL (PZ0331-5MG)	sigma

Plumbagin (p7262)	sigma
TH1834 (2339)	axon medchem
SPV106 (SML0154-5MG)	sigma
Windorphen (SML0899)	sigma
Chetomin (14437)	cayman chemical
Remodelin (17346)	cayman chemical
Embelin (ab141061)	abcam
Ischemin (4695)	Tocris
CBP30 (14469)	cayman chemical
KG501 (70485-250MG)	sigma
ガラクトース(G750-1KG)	sigma

3.3 実験方法

3.3.1 滅菌操作

本研究では、菌体や DNA、RNA 等の混入を防ぐため、必要に応じて次のように各種滅菌操作を行った。

3.3.1.1 オートクレーブ処理

実験に用いる水や一部の溶液はオートクレーブ処理したものを使用した。オートクレーブ処理は 121°C、20 min 行った。

3.3.1.2 DNase free、RNase free 滅菌

本研究で DNA や RNA 操作に用いたピペットチップ、サンプルチューブ、爪楊枝はオートクレーブ処理したものを使用した。オートクレーブ処理は 121 °C、20 min 行い、乾燥機内で完全に水蒸気を取り除いたものを使用した。

3.3.1.3 フィルター滅菌

オートクレーブ処理が不可能なものは滅菌フィルターを用い滅菌処理を行った。

3.3.1.4 UV 滅菌

クリーンベンチ内で扱うピペットチップやピペットマンなどは、クリーンベンチに付属する UV ランプ下に静置することで滅菌処理を行った。

3.3.2 ラット・プライマーの一覧

3.3.2.1 使用するラット

本研究で用いた全てのラットは三共ラボサービス株式会社から購入したSDラットのオスである。福井大学ライフサイエンス支援センター生物資源部門の動物棟に搬入後、1週間飼育し、環境に順応させてから実験に用いた。

3.3.2.2 プライマーリスト

本研究で用いたプライマーを以下に示した。

Table 3-2 プライマーリスト

プライマー名	サイズ	塩基配列
3362-NF- κ B-F	24	TCTTCGACTACGCGGTTACGGGAG
3363-NF- κ B-R	24	CATCATCCACCTTCATGCTCAGCT
3364-Bcl-2-F	20	GGGATGCCTTTGTGGA ACTA
3365-Bcl-2-R	20	CTCACTTGTGGCCCAGGTAT
3366-TGF- β 3-F	23	AATCTGCCCCACGAGAGGCACCGC
3367-TGF- β 3-R	23	CATGTCATACCTTTCAGCCCAAT
3368-IGFBP-F	20	ACACCGAGTCTGGCTTCACT
3369-IGFBP-R	20	GAACACTGTGTCAGGCAGGA
3370-IGF-1-F	20	CCGCTGAAGCCTACAAAGTC
3371-IGF-1-R	20	GGGAGGCTCCTCCTACATTC
3372-AOP2-F	21	CCAGAGTTTGCCAAGAGGAC
3373-AOP2-R	20	TCCAATCAACTGCTGCTGTC
3374-LEDGF-F	20	GGGGTTACGTCAACCTCTGA
3375-LEDGF-R	20	TTGGCCTTTTAGCATGTTCC
3376-Beta actin-F	22	TGTAACCAACTGGGACGATATG
3377-Beta actin-R	20	ATTAGAGAAGGGCGTGCTGA
3393-nfkb-F	20	AGCCCTGAAAGGCCATCATA
3394-nfkb-R	20	ACCTTGGGATGCGTTTTTTG
3395-bcl2-F	24	AGAATGCAAAGCACATCCAATAAA
3396-bcl2-R	19	CGGCCCCGAAAGAGAGAAAA
3397-tgfb3-F	22	TCAGAGATGCTGGACTCAAAGG

3398-tgfb3-R	19	GGCCCCGAGGGAATACATGA
3399-igfbp-F	22	GACATGCGCTGTACAGAGCTTT
3400-igfbp-R	21	GGCAGGCAGAATGTCTCAAGA
3401-igf1-F	20	CACGTCACCGCAAGATCCTT
3402-igf1-R	20	GGCAGGTGTTCCGATGTTTT
3403-aop2-F	20	CGTTATACGCCCCAGCCTTA
3404-aop2-R	18	AGTGCTGGGCGAGCAGTT
3405-ledgf-F	21	CCACCCAAAAAGCAGCTTAAA
3406-ledgf-R	24	TCTGGTTCTTTTCTTGGCTTCTCT
3407-actb-F	19	TTCAACACCCCAGCCATGT
3408-actb-R	22	CAGAGGCATACAGGGACAACAC
3411-HDAC1-F	20	TCCTCTGACAAACGCATTGC
3412-HDAC1-R	22	TCCTTCTCCCTCCTCATCAGAA
3413-HDAC2-F	20	TTGTTTCCAAGCCCGACTGT
3414-HDAC2-R	21	GGGTCTCTGCCACTGAAATCA
3415-HDAC3-F	23	GGAGACCATGACAATGACAAGGA
3416-HDAC3-R	18	GGACACGGCATCCATGCT
3417-HDAC4-F	20	TGCCTTGGTGCTCTCTCTGA
3418-HDAC4-R	18	TCCCGTTGCTGCTTCACA
3419-HDAC5-F	19	GAGAGGCAGGCCCTTCAGT
3420-HDAC5-R	23	ATGGAGGATGTGCTCATGAACTT
3421-HDAC6-F	19	TTCTGAGGCCCCACACAGA
3422-HDAC6-R	20	CCACCCCATCCAAGGTACAG
3423-HDAC7-F	19	TCGCCTGCTTCCTCAGATG
3424-HDAC7-R	21	AGCAGCTCAGAATGGCTCTCA
3425-HDAC8-F	24	CGATTGGAAGTAGGAGATGGAGAT
3426-HDAC8-R	21	GGGTAGCGAATGCCCCACTATT
3427-HDAC9-F	19	GGGCATGCTGCAGACAATT
3428-HDAC9-R	20	GGCCACTCCATCTGAGGAAA
3429-HDAC10-F	19	CGTTTGGAGCCACGCTTAG
3430-HDAC10-R	18	CCCGCCCGATAGTCAGAA
3431-HDAC11-F	24	TGCCAAAGTCACCAGTTGTCTAAA

3432-HDAC11-R	24	GGTGTGGAGCTGCATTAGTACTGT
3433-GAPDH-F	23	CACTGAGCATCTCCCTCACAATT
3434-GAPDH-R	17	CCAGGCCCTCCTGTTG
3590-TXNIP-F	18	TGACCGTGCAGCCTGTGA
3591-TXNIP-R	20	CGCTCCACGGTTAGTCAAC
3595-AKR1B1-F	22	TGTGCCAAACACAAGGATTACC
3596-AKR1B1-R	20	GGATTCGTCCACCACAGCTT
3602-FOXO1-F	20	CCAGGAGAAGCTCCCAAGTG
3603-FOXO-R	20	GTCACAGTCCAAGCGCTCAA
3604-NEFH-F	22	TTATCGTAGCCGAACGTGATGT
3605-NEFH-R	22	GGCAGTTTTTAGTCACGCGTTT
3606-TGFB1-F	16	CCAGCCGCGGGACTCT
3607-TGFB1-R	20	TTCCGTTTCACCAGCTCCAT
3612-EGR1-F	19	AAGACACCCCCCATGAAC
3613-EGR1-R	18	GGCGATCGCAGGACTCAA
3614-TAGLN-F	23	TGGAGTGGATTGTAATGCAGTGT
3615-TAGLN-R	15	CCAGGCGCCACGAT
3616-GAPDH-F	21	ACTCTACCCACGGCAAGTTCA
3617-GAPDH-R	21	ATGACCAGCTTCCCATTCTCA
3618-GAPDH-1-F	24	GGTGTGAACCACGAGAAATATGAC
3619-GAPDH-1-R	19	TGGTGCAGGATGCATTGCT
3620-GAPDH-2-F	19	CGTATCGGACGCCTGGTTA
3621-GAPDH-2-R	22	GATGGCAACAATGTCCACTTTG
3622-GAPDH-3-F	19	CAGGGTGGTGGACCTCATG
3623-GAPDH-3-R	19	TGGGTGGTCCAGGGTTTCT
3624-ACTB-1-F	21	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC
3625-ACTB-1-R	20	GTGGACAGTGAGGCCAGGAT
3626-ACTB-2-F	20	CTGGCCTCACTGTCCACCTT
3627-ACTB-2-R	22	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT
3628-ACTB-3-F	20	TAGCCATCCAGGCTGTGTTG
3629-ACTB-3-R	21	TCCATCACAATGCCAGTGGTA
3630-RPS18-F	23	GAGATACGCTCATGTGGTGTGA

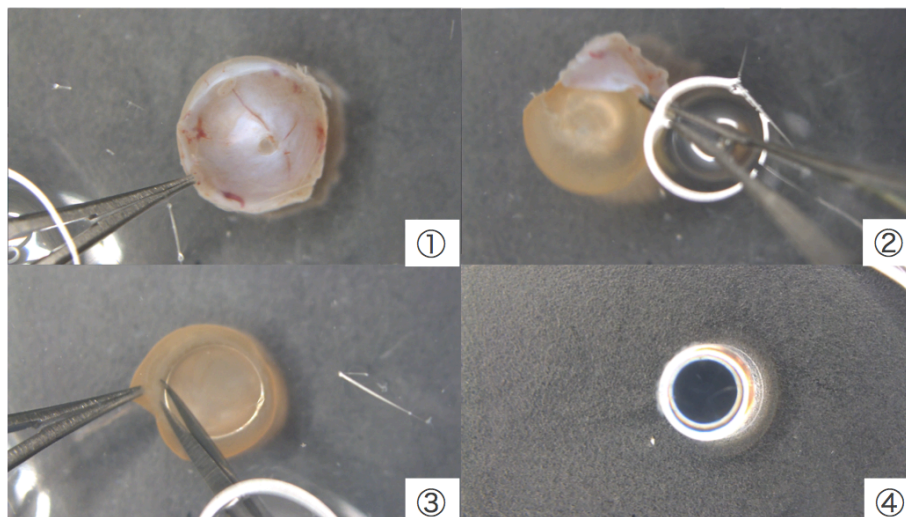
3631-RPS18-R	18	AGCTCCCCAGCCCTCTTG
3632-GUSb-F	19	TGAGCTGTTGCCCCATTTC
3633-GUSb-R	16	CCCCTCCCCCACATG
3634-B2m-F	18	GCGTGGGAGGAGCATCAG
3635-B2m-R	20	TGTGCTGTAGGCCCAACAGA
3645-PTGR1-F	23	CTGATGGGAATGGACTGAGAAAG
3646-PTGR1-R	23	CCAAAGACAGTGGTAGCTTGTC
3647-NQO1-F	21	CTGGCTTGCTTTTCAGTTTTCG
3648-NQO1-R	19	GCGAGCCTCCTCCTTTTCC
3649-LCN2-F	19	GCAGTGGCCTGATGGTTCA
3650-LCN2-R	21	TCTGGCAACAGGAAAGATGGA
3651-RCAN1-F	19	CGCGTTCTGATTCCCACAT
3652-RCAN1-R	20	TGACCAGCCACTTGCACAGT
3653-PLK3-F	21	CCTCACCTTCTCTCGGAGAT
3654-PLK3-R	23	TCCATAAATAATGCCCCCTAGCT
3655-MT1F-F	19	GTGGGCTGCTCCAAATGTG
3656-MT1F-R	17	TTGCCCGAGGCACCTTT
3663-GAPDH-F	22	TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC
3664-GAPDH-R	24	GGCCTCTCTCTTGCTCTCAGTATC
4005-NR4A1-F	20	CGTGCCTTTAAGCCCATAGC
4006-NR4A1-R	26	TCTGGAATGAGGAGATACATCAGTCT
4007-GSTM2-F	20	TTCGCCTGTTCTGAGTAT
4008-GSTM2-R	20	TTGCTCTGGGTGATCTTG
4009-SLC7A11-F	21	CCTGGCATTGGACGCTACAT
4010-SLC7A11-R	22	TCAGAATTGCTGTGAGCTTGCA
4011-S1PR3-F	20	CCTGGGCGCATCCACATGCA
4012-S1PR3-R	20	GCAGGGCACCCAGCGAGAAG
4015-SLC7A11-F	21	TGCTGGCTTTTGTTTCGAGTCT
4016-SLC7A11-R	19	GCAGTAGCTCCAGGGCGTA
4017-ATF3-F	21	CACCTTTGCCATCGGATGTCC
4018-ATF3-R	18	CTTTCCCGCCGCCTCCTT
4019-NR4A1-F	19	GCGGCTTTGGTGACTGGAT

4020-NR4A1-R	22	GGCCATGTCGATCAGTGATGAG
4021-SLC25A23-F	19	TGTGGCCAGATTGCCAGTT
4022-SLC25A23-R	17	GCTTGGGCCTGCATTCTG
4069-GSTM2-F	20	TTCGCCTGTTCTCTGGAGTAT
4070-GSTM2-R	20	CCATAGCCTGGTTCTCCAAA
4071-GSTA1-F	20	AGTTGGGAGCTGAGTGGAGA
4072-GSTA1-R	20	TTTGGTGGCGATGTAGTTGA
4073-ARID5B-F	18	CTGCTCGCCCCATAAAGC
4074-ARID5B-R	18	TTTTTCCCGGCGATCACA
4075-EFNA1-F	20	CCGCTGCTGACCGCCACATC
4076-EFNA1-R	20	TGGTAGATAGGTTTGGAGAT
4077-LIF-F	21	CATGACGGATTTCCCACCTTT
4078-LIF-R	21	GCAGCCCAACTTCTTCCTTTG
4079-MARCKSL1-F	19	GGGCTGGTGGGTGATCTCT
4080-MARCKSL1-R	22	GTCCAGATGGTGACCTCACAAG
4081-MCART1L-F	14	TCGCCCCCCCCAAA
4082-MCART1L-R	26	TGAGCTGAGAAAAAATGAATATCACA
4083-RGD1565033-F	23	CCCGAAAAGGAAGCAGGTATATT
4084-RGD1565033-R	20	GGAGCTGCCGTCTCTTATGG
4085-RSAD2-F	21	GCTGGCTGAGAATAGCATTGG
4086-RSAD2-R	18	ACCCGTGGCTGTCCCTTT
4087-SLC20A1-F	22	CCGTCAGCAACCAGATCAACTC
4088-SLC20A1-R	21	CCCATGCAGTCTCCCACCTTG
4089-SLC24A2-F	20	CCGAGGAAGATGATGACCAG
4090-SLC24A2-R	20	TCCAGAGAGGGAACACGATG
4091-CAR14-F	20	CTCAGAAGCCTCAGGGACTG
4092-CAR14-R	20	TTGTGAGCGAGCCATTGTAG
4093-RGD1561694-F	20	CGCCGAGTTCTCGAAGAAAT
4094-RGD1561694-R	21	TCGACTTTTCCTTGGCAGACA
4101-RGD1565033-F	22	CCATAAGCCGTGTCCAGAATTT
4102-RGD1565033-R	21	GGTAGATGTGGCCCATCACAA
4105-LIF-F	20	CTGCTCATTCTGCACTGGAA

4106-LIF-R	20	TCTGATCCCAGGTGATGTTG
4107-LIF-F	22	CAGTGCCAATGCCCTCTTTATT
4108-LIF-R	19	CCACGTTGTTGGGAAATGG
4109-MCART1L-F	25	GGGTGCTATCCCTATTACATGAAGA
4110-MCART1L-R	22	CATCCAAAAGGCATGTGTCTCA
4161-EFNA1-F	23	GCACCCAAACCTATCTACCATCA
4162-EFNA1-R	21	TGCCATTGACAGTCACCTTCA
4167-NQM1F	20	ATTGGCTGCTTCAAAGTTGG
4168-NQM1R	20	TATCCATGGCGTTCTCGATT
4222-GSTA1-F	22	TGGGAAGGACATGAAGGAGAGA
4223-GSTA1-R	20	CAGATCCGCCACTCCTTCTG

3.3.3 水晶体の培養操作

3.3.3.1 ラット水晶体の摘出



ラットを CO₂ ガスで殺害後、キムタオルを敷いた台の上に乗せた。次に、眼球周りの皮膚を左右に引っ張り、眼窩から飛び出させた。鉗を眼窩に潜りこませ、視神経を切断して眼球を摘出した後、PBS を入れた 35 mm dish に眼球を入れ、ラットの死骸死体は専用のゴミ袋に入れ -20 度の冷蔵庫で保管した。顕微鏡を覗き込みながら、ピンセットで赤道部のひだをつまみながら固定し、視神経乳頭にハサミで切れ込みを入れた①。網膜（オレンジ色）を切らないように、赤道部に切れ込みをいれて強膜（白色）のみを剥がした②。ハサミの腹を水晶体に当てながらピンセットで網膜を引っ張り、網膜と水晶体を繋ぐ虹彩を切った③。鉤付きピンセットで水晶体をすくい上げるように網膜から引き離す④。最後に、PBS からコントロール（0 mM）培地に移し、培養まで保管した。

3.3.3.2 ラット水晶体の培養

M199 培地 48 ml に 10 %BSA 500 μ l、ペニシリン&ストレプトマイシン 100 μ l、20 %ガラクトース溶液 1.35 ml を加え、これをガラクトース培地とした。コントロール培地はガラクトース溶液ではなく滅菌水を等量加えた。阻害剤を添加する際は 50 ml ストックから使用分（4 日なら 5 ml）分注し、DMSO 濃度が 0.8 %になるように調整した。培養時にはクリーンベンチ内で、適切な培地を 12 well plate に 2 ml、wash のためのコントロール培地を 35 mm dish に適量入れた。摘出した水晶体をコントロール培地で洗浄し、12 well plate に移した。インキュベーター（37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂）で 4 日間培養し、培地交換は 2 日に 1 度、水晶体を plate から取り出さずに行った。

3.3.4 RNA 実験

3.3.4.1 TRIZOL での RNA 抽出

摘出した水晶体試料に 1 ml の TRIZOL を入れ、ホモジナイズした後、5 min 室温で静置した。200 μ l のクロロホルムを入れてボルテックスし、12,000 g 15 min 4 °C で遠心した。水層を回収し、等量のイソプロピルアルコールを加えてボルテックスし、10 min 室温で静置した。12,000 g 10 min 4 °C で遠心し上清を除去、75 % EtOH を加え、ボルテックスした。最後に、7,5000 g 5 min 4 °C で遠心後、乾燥させ RNase free 液に溶かした。

3.3.4.2 Qubit による RNA 濃度測定

スタンダード用に 2 本、サンプル 1 つにつき 1 本ずつ専用のチューブを用意した。HS Buffer として HS Reagent を 200 : 1 で混ぜ合わせ、スタンダード用に 190 μ l、サンプル用に 199 μ l ずつ分注した。HS Standard #1 と HS Standard #2 をスタンダード用に 10 μ l 入れ、200 μ l にした。それぞれのサンプルを 1 μ l (水晶体 RNA なら 1/10 希釈で適量) ずつサンプル用に入れ、200 μ l にした Standard #1→Standard #2 の順で Qubit に読み込ませ、検量線を作成した。最後にサンプルを読み込ませ、濃度を測定した。

3.3.4.3 RNA からの DNA の分解 (DNase 処理)

RNA サンプルから DNA を除去する為に、DNase 処理を行った。DNase 処理には Deoxyribonuclease (RT Grade) for Heat Stop (NIPPONGENE code No. 312-05951) を用いた。Total RNA 2 μ L に 10 x DNase (RT Grade) buffer II 1 μ L、Deoxyribonuclease (RT grade) 1 μ L、DEPC'd water 1 μ L を加え全量を 10 μ L にした。37 °C、15 min インキュベート後、1 μ L の Stop solution を加え 70 °C、10 min インキュベートした。

3.3.4.4 逆転写 (cDNA サンプルの調整)

RNA の逆転写には、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI part No. 4368814) を用いた。2 x RT master mix として 10 x RT buffer 2 μ L、25 x dNTPs 0.8 μ L、10 x RT Random Primers 2 μ L、MultiScribe™ Reverse transcriptase 1 μ L、DEPC'd water 4.2 μ L を混合し全量を 10 μ L にした。先の 10 μ L の DNase 処理済み RNA サンプルを加え、25 °C 10 min、37 °C 120 min、95 °C 5 min、4 °C unlimited とインキュベートした。

3.3.4.5 リアルタイム PCR による RNA 発現の解析

RNA 発現の解析には、リアルタイム PCR 法を利用した。反応試薬には Applied Biosystem の Power SYBR Green Master Mix を用い、Step One Real Time PCR System を利用して解析を行った。2.3.4.4 で調整した cDNA を 2 倍希釈し、Total cDNA 5 μ L、5 μ M each primer set 3.6 μ L、2 x reaction buffer 10 μ L、滅菌水 1.4 μ L の Total 20 μ L に混合した。RTPCR 装置によって 95 °C 10 min インキュベートした後、95 °C 15 min、60 °C 1 min のサイクルを 40 回繰り返す。最後にソフトを用いて発現量の解析を行った。

3.3.4.6 DNA マイクロアレイ

試薬は GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix)、アレイは GeneChip® Rat Gene 2.0 STArray (Affymetrix, Cat.No.902124) を使用した。

RNA サンプル調製 : TRIZOL で RNA を抽出し、サンプルを 3/200 ng/mL、Poly-A RNA コントロールを 100 ng/mL に希釈し、それぞれ 3 mL と 2 mL 混合し、これを Total RNA/Poly-A RNA Control Mixture とした。

一本鎖 cDNA 合成 : First-Strand Buffer 4 mL、First Strand Enzyme 1 mL を混合し First-Strand Master Mix を作成、Total RNA/Poly-A RNA Control Mixture 5 mL と混ぜて 10 mL にして、42 °C、2 h 反応させた。

二本鎖 cDNA 合成 : 次に、Second-Strand Buffer 18mL、Second Strand Enzyme 2 mL を混ぜて Second-Strand Master Mix とし、さらに先ほどのサンプル (10 mL) にこの 20 mL を加え、16 °C 1 h、65 °C 10 min 反応させた。

ラベル化された cRNA 合成 : IVT Buffer 24 mL、IVT Enzyme 6 mL を混ぜて IVT Master Mix とし、先ほどのサンプル (30 mL) にこの 30 mL を加え、40 °C 16 h 反応させた。

aRNA 精製 : Purification beads を各サンプルに 100 mL を加え、ピペッティングし、各サンプルを U 底プレートに移し 10 min 静置した。プレートをマグネットスタンドに移し、10 min 静置し、マグネットビーズを吸い上げないように上清を注意深く吸って捨てた。80 % EtOH 200 mL 加え、30s 静置しマグネットビーズを吸い上げないように EtOH を注意深く吸って捨てる、この作業を 3 回繰り返した。5 min 静置して乾かしたらマグネットスタンドからプレートを取り外し、それぞれのサンプルに Nuclease free water (65 °C)

27 mL を加え 1 min 静置した。10 回ピペッティング後、マグネットスタンドに移し 5 min 静置し、上清をチューブに移したら cRNA の濃度および純度を測定した。

Second cycle cDNA の合成:cRNA が 625 mg になるように Nuclease free water で希釈し、70 °C 5 min、25 °C 5 min 反応させ、氷上に移した。2nd cycle ss-tDNA buffer 8 mL、2nd cycle ss-cDNA Enzyme 4 mL を Muster Mix として混合し、各サンプルに 12 mL ずつ分注、25 °C 10 min、42 °C 90 min、70 °C 10 min 反応させた。

RNaseH による分解:RNaseH をそれぞれのサンプルに 4 mL 加え、37 °C 45 min、95 °C 5 min 反応させた後、Nuclease free water をそれぞれのサンプルに 11 mL 加えた。

2nd cycle single strand cDNA の精製:Purification beads を各サンプルに 100 mL を加え、ピペッティングし、各サンプルを U 底プレートに移した。100 % EtOH 150 mL を加え、ピペッティングし、20 min 静置した。プレートをマグネットスタンドに移し、5 min 静置、マグネットビーズを吸い上げないように上清を注意深く吸って捨てた。次に、80 % EtOH 200 mL 加え、30 s 静置し、マグネットビーズを吸い上げないように EtOH を注意深く吸って捨てる工程を 3 回繰り返した。5 min 静置して乾燥させた後、マグネットスタンドからプレートを取り外し、それぞれのサンプルに Nuclease free water (65 °C) 30 mL を加え 1 min 静置した。10 回ピペッティングして完全に混ざったら、マグネットスタンドに移し 5 min 静置しビーズを取り除いた。最後に上清をチューブに移し、cDNA の濃度および純度を測定した。

ラベル化された cDNA の断片化:cDNA を 176 ng/mL になるよう希釈し、31.2 mL (5.5 mg) 分注した。Nuclease free water 10 mL、10 × cDNA Fragmentation Buffer 4.8 mL、UDG 10 U/mL 1 mL、APE 1000 U/mL 1 mL を混合し Muster Mix を調製、それぞれのサンプルに加え、37 °C 60 min、93 °C 2 min 反応させた。チューブにサンプルを 45 mL 移し、Muster Mix (5 × TDT Buffer 12 mL、DNA Labeling Reagent 5 mM 1 mL、TDT 30 U/mL 2 mL) と混合、37 °C 60 min、70 °C 10 min 反応させた。最後に上清をチューブに移し、cDNA の濃度および純度を測定した。

ハイブリダイゼーション:Fragmented and Labeled ssDNA 13.3 mL、Control Oligonucleotide B2 (3 nM) 2.5 mL、20 × Hybridization Controls 7.5 mL、2 × Hybridization Mix 75 mL、DMSO 10.5 mL、Nuclease - free Water 13.5 mL を混合した Hybridization Master Mix 109 mL を前

ステップで調整した Fragmented and Labeled ssDNA 41 mL と混合、99 °C 5 min、45 °C 5 min 反応させた。アレイの右上の Septa にピペットチップを入れ、もう片方の Septa にこの溶液を 130 mL 入れる。ピペットチップを取り除き、Tough - spots で両方の Septa を塞ぎ、ハイブリダイゼーションオープンにトレイをいれた後、45 °C 16 h 60 rpm でインキュベートした。データを取得後、解析した。

3.3.4.7 マイクロアレイ解析

R version 3.5.3 を用いてマイクロアレイ解析を行った。用いた自作関数は頭文字に\$をつけて文中に表記している。最初に、解析対象のマイクロアレイの CEL ファイルを一つのフォルダにまとめた後、RStudio を開き、自作関数を読み込んだ。次に、\$read.CEL によって CEL ファイルからシグナル値データを抽出、\$hosei.ID にてコントロール補正と cut off までを行った。\$MA、\$box.violin、\$h.cluster、\$pca でデータの形と特徴を確認し、\$pval で有意に変動した遺伝子を抽出した。

下記は実験に用いた主な自作関数を表す。

```
# CEL ファイルデータ読み込み(RMA 法のみ)####
```

```
read.CEL <- function(){  
  #引数なし  
  #作業ディレクトリ内の CEL ファイルを読み込む  
  #作業ディレクトリ内は CEL ファイルのみにしておく  
  #出力##  
  # 生データを出力  
  library(oligo)  
  cel <- list.celfiles() #CEL ファイルリスト作成  
  cel2 <- read.celfiles(cel) #CEL ファイル読み込み  
  eset <- rma(cel2) #RMA 法による前処理  
  dat <- exprs(eset) #シグナル値データの抽出  
  return(as.data.frame(dat))  
}
```

```
# 生データ処理####
```

```
hosei.ID <- function(raw, ID, cutoff, ctrl = 0){  
  # この関数は生データをコントロール補正するまでの処理を行う。  
  # この関数は tidyverse パッケージに依存している。  
  # なければ install.packages("tidyverse") を実行する。  
  # 引数の説明####  
  # raw: 生データ(log 未変換の場合は log2 に自動的に変換する) のデータフレーム。  
  # ID: Probe ID と遺伝子名の対応表。1 列目に遺伝子名を設定しておく。  
  # cutoff: すべてのサンプルで cutoff 値以下の遺伝子を除く。
```

```

# ctrl: コントロールサンプルの列番号。デフォルトは 0 でコントロール補正を行わな
い。
# コントロール補正を行う場合はコントロールサンプルの列番号を入力。
# 出力変数について####
# 行名に遺伝子名、列名にサンプル名。
# コントロール補正後の遺伝子発現データを出力する。
# ただし、コントロールに用いたサンプルは除かれる。

library(tidyverse)
if(!is.data.frame(raw)) raw <- as.data.frame(raw)
if(max(raw) > 100) raw <- log2(raw) #log 値に変換されていない場合は log2 に変換
raw <- raw %>%
  mutate(genes = ID[rownames(.),1]) %>% #遺伝子名を最後の列に追加する。
  dplyr::filter(!is.na(.$genes) | (.$genes != "---")) %>% #遺伝子名がついていないブ
ローブ ID を除去
  group_by(genes) %>% #重複する遺伝子名をまとめる。
  summarise_all(mean) %>% #重複する遺伝子はその平均値をシグナル値とする。
  dplyr::filter(apply(.,[-1], 1, max) > cutoff) %>% #シグナル値が cutoff 値以下の遺
伝子を除去
  as.data.frame() %>% # tibble 型からデータフレームへの変換
  column_to_rownames("genes") #行名を遺伝子名に変更。

if(ctrl == 0) {
  return(raw)
}else if(ctrl != 0) {
  if(!is.character(ctrl)) data <- raw[, -ctrl] - raw[, ctrl] # コントロール補正を行う。
  else if(is.character(ctrl)) data <- raw[, !(colnames(raw) %in% ctrl)] - raw[, ctrl]
  return(data)
}
}

#ボックスプロット + ヴァイオリンプロット####
box.violin <- function(data, type = 1, Font = "Arial", Font.size = 15){
  # ボックスプロットと、ヴァイオリンプロットを重ね合わせる関数。

```

```

# tidyverse(ggplot2)に依存している。
# インストールしていない場合は install.packages("tidyverse")を実行する。
# 引数の説明####
# data: シグナル値データフレーム。
# type プロットの種類選択。1: デフォルト 2: 論文推奨
library(tidyverse)

# データフレームではない場合、データフレームに変換。
if(!is.data.frame(data)) data <- as.data.frame(data)

# サンプル名の並び順の保存
sample.names <- colnames(data)

#行列データを縦長のデータに変換。
data <- data %>% rownames_to_column("Gene.Names") %>%
  gather(-1, key = "Samples", value = "Expression")

# サンプルの並び順がプロットに反映されるように設定。
data <- transform(data, Samples = factor(Samples, levels = sample.names))

#プロット。type 1 は色付き、2 は白黒。
if(type == 1){
  data %>% ggplot(aes(x = Samples, y = Expression, fill = Samples)) + #データと色設定。
    geom_violin(alpha = 0.5) + #ヴァイオリンプロット(透明度 0.5)
    geom_boxplot(alpha = 0.5, outlier.alpha = 0) + #ボックスプロットを重ね書き(透明度 0.5)。
    guides(fill = "none") + # レジェンドの削除
    labs(y = "Expressions") + #y 軸ラベルの設定。
    theme(axis.title.x = element_text(size=Font.size), # フォントの指定。
          axis.title.y = element_text(size=Font.size),
          axis.text.x = element_text(size=Font.size, colour = 1, angle = 45, hjust = 1),
          axis.text.y = element_text(size=Font.size, colour = 1))
}

```

```

} else if(type == 2){
  data %>%
    ggplot(aes(x = Samples, y = Expression, fill = gray(0.4))) + #データと色設定。
    geom_violin(alpha = 0.5) + #ヴァイオリンプロット(透明度 0.5)
    geom_boxplot(alpha = 0.5, outlier.alpha = 0) + #ボックスプロットを重ね書き(透明
    度 0.5)。
    scale_fill_grey() + #白黒に設定。
    theme_classic() + #グリッドの削除
    theme(axis.title.x = element_text(size=Font.size, family = Font), # フォントの指定。
          axis.title.y = element_text(size=Font.size, family = Font),
          axis.text.x = element_text(size=Font.size, colour = 1, family = Font, angle = 45,
          hjust = 1),
          axis.text.y = element_text(size=Font.size, colour = 1, family = Font)) +
    guides(fill = "none") + #レジェンドの削除
    labs(y = "Expressions") #y 軸ラベルの設定
}
}

```

#MA プロット####

```

MA <- function(data, x, y, color = FALSE,
               xlim = NA, ylim = NA, siz = 1,
               smooth = FALSE){
  # MA plot を作成する関数。
  # tidyverse(ggplot2)に依存している。
  # インストールしていない場合は install.packages("tidyverse")を実行する。
  # 引数の説明####
  # data: log 値変換されたシグナル値データフレーム。
  # x: 対象 (分子)
  # y: コントロール (分母)
  # color: TRUE と入力すると転写量変化に応じてドットに色が付けられる。
  # xlim: c(min, max)で指定する。x 軸の最小値、最大値の指定。
  # ylim: c(min, max)で指定する。y 軸の最小値、最大値の指定。
  library(tidyverse)

```

```
# 入力したデータがデータフレーム型ではない場合、データフレームに変換する。
if(!is.data.frame(data)) data <- as.data.frame(data)
if(max(data) > 100) data <- log2(data)
MA <- data.frame(M = data[,x] - data[,y], # M: 変化量、A: 平均値をデータフレームに
格納
```

$$A = (data[,x] + data[,y]) / 2$$

```
# xlim, ylim の設定。xlim と ylim の指定がある場合、そのまま使用。
# 指定がない場合、データの最小値、最大値を x 軸、y 軸の範囲とする。
if(is.na(xlim[1]) & is.na(ylim[1])) {
  xlim = c(min(MA[,2]), max(MA[,2]))
  ylim = c(min(MA[,1]), max(MA[,1]))
}else if(is.na(xlim[1])){
  xlim = c(min(MA[,2]), max(MA[,2]))
}else if(is.na(ylim[1])){
  ylim = c(min(MA[,1]), max(MA[,1]))
}
if(is.numeric(x)) x <- colnames(data)[x]
if(is.numeric(y)) y <- colnames(data)[y]
# 引数 color が TRUE の場合、ドットに色をつける。
if(color){
  p <- MA %>% ggplot(aes(x = A, y = M, colour = round(M, 0))) + #プロットに用い
るパラメータ設定
  geom_point(size = siz) + #ドットプロットの作図
  labs(title = paste("MA plot of", x, "vs", y))+#グラフタイトル
  xlim(xlim) + ylim(ylim) + # x 軸、y 軸の設定
  scale_color_continuous(name = "M") #レジェンドのタイトル設定。
} else { #color = FALSE の場合、ドットの色はすべて黒。
  p <- MA %>% ggplot(aes(x = A, y = M)) + #プロットに用いるパラメータ設定
  geom_point(size = siz) + #ドットプロットの作図
  labs(title = paste("MA plot of", x, "vs", y))+#グラフタイトル
  xlim(xlim) + ylim(ylim) #x 軸、y 軸設定。
}
```

```

    }
    if(smooth) p <- p + geom_smooth(method = loess)
    print(p)
  }

#階層クラスタリング####
h.cluster <- function(data, output = FALSE){
  # この関数はサンプルの ward 法による階層クラスタリングを行う。
  # 引数の説明####
  # data: コントロール補正したデータ
  # 出力の説明####
  # data: ward 法によるクラスター順に並べ替えたデータ
  # 階層クラスター結果をプロットする。
  par(mfrow = c(1,1))
  d <- dist(t(data)) #サンプル間の距離の計算
  h_D <- hclust(d, "ward.D") #ward 法によるクラスタリング
  plot(h_D, hang = -1, #縦線の下端を揃える
        xlab = "", ylab = "", axes = F, sub = "", main = "") #各軸を削除
  if(output){
    data <- data[h_D$order] #クラスター結果順に並べ替えを実行。
    return(data)
  }
}

#相関行列ヒートマップ####
heat.cor <- function(data, color = bluered(256), output = TRUE, zero = F){
  # この関数は相関行列のヒートマップを作図する。
  # この関数は gplots と RcmdrMisc に依存している。
  # install.packages("gplots")や install.packages("RcmdrMisc")でインストール
  # 引数の説明 ####
  # data: 転写量データ
  # color: ヒートマップのカラースケール (bluered, redblue, greenred 等様々)
  # output: 相関行列の出力の有無

```

```

# zero: 相関係数 0 未満を 0 として扱う場合は T(TRUE) を入力する。
# 転写量に応じてワード法によりクラスタリングした並び順で出力。
library(gplots)
library(RcmdrMisc)
d <- dist(t(data))
h.out <- hclust(d, method = "ward.D")
data <- data[,h.out$order]
out <- RcmdrMisc::rcorr.adjust(data)
out2 <- out$R$r
if(zero) {
  TF <- out$R$r < 0
  out2[TF] <- 0
}
par(oma = c(3, 1, 1, 3))
heatmap.2(as.matrix(out2), dendrogram = "none", col = color,
          Rowv = FALSE, Colv = FALSE,
          denscol=NULL, trace = "none", density.info = "none")
par(oma = c(1, 1, 1, 1))
if(output) return(out)
}

# p_value, q_value 検定 #####
pval <- function(data){
  # 各サンプルの遺伝子転写量が有意かどうかを判断する。
  # この関数はパッケージ "qvalue" に依存している。
  # "qvalue" をインストールしていない場合、以下の 2 行を実行する。
  # source("https://bioconductor.org/biocLite.R")
  # biocLite("qvalue")
  # p_value < 0.05 もしくは q_value < 0.05 を有意とする。
  # p_value のみの判断では多重検定問題がはらむ。
  # 従って、q_value が 0.05 以下の遺伝子とそのサンプル内で有意に変動した遺伝子と
  # みなすことが出来る。
  # q_value の算出方法は Storey (ST) 法を用いている。詳しくは調べる。

```

```

# 引数の説明####
# data: コントロール補正後のデータフレーム。
# 出力の説明####
# pvalue と qvalue を出力する。
# データフレームの左半分に pvalue、右半分に qvalue を格納している。
library(qvalue)
d <- scale(data) #データの正規化
pq <- as.data.frame(2 * pt(abs(d), nrow(d) -1, lower.tail = F)) # p_value の算出
n <- ncol(pq) #列数 (サンプル数)
for(i in 1:n){ #サンプル数の分だけ繰り返し
  nor_p <- pq[,i] #p_value の格納
  qobj <- qvalue(p = nor_p) #q value の算出(ST 法)
  qvalues <- qobj$qvalues #q value の格納
  summary(qobj) # FDR のサマライズ
  pq[, (ncol(pq)+1)] <- qvalues # q value 列を追加
}
colnames(pq)[1:n] <- paste(colnames(d), "_p", sep = "") # サンプル名に "_p" を追加
colnames(pq)[(n+1):(2*n)] <- paste(colnames(d), "_q", sep = "") # サンプル名に "_q" を追加
return(pq)
}

# 主成分分析 #####
PCA <- function(data){
  # 主成分分析を行い、その結果をプロットする関数。
  # tidyverse(ggplot2)に依存している。
  # インストールしていない場合は install.packages("tidyverse")を実行する。
  # 引数の説明####
  # data: コントロール補正後のデータフレーム。
  # プロット: 横軸 主成分 1、縦軸 主成分 2、ラベルでサンプルの位置を表示。ラベルの中央がサンプルの位置。
  library(tidyverse)
  pc <- prcomp(t(data)) #主成分分析

```



```

as.data.frame(pc$x) %>% ggplot(aes(x = PC1, y = PC2)) + #プロットするデータの指
定
  geom_label(aes(label = rownames(pc$x))) + #プロットをラベルで行う。
  xlim((min(pc$x[,1]) - 10), (max(pc$x[,1]) + 10)) + # x 軸の指定
  ylim((min(pc$x[,2]) - 10), (max(pc$x[,2]) + 10)) + # y 軸の指定
  labs(title = "PCA") #グラフタイトル
}

```

3.3.5 組織切片の作製

3.3.5.1 凍結切片の作製

パラフィン 1 号を 2 枚用意し、それぞれに OCT コンパウンドを適量入れた。パラフィン内に水晶体を入れてピンセットでかき混ぜることで共洗いした。もう 1 枚に水晶体を移し、赤道面が垂直になるよう配置し、ドライアイス上で凍らせ、 -80°C で保存した（以降、試料と表示）。凍結後、クリオスタット内に試料とディスクを入れ十分に冷やした。粗動ボタンをゼロポジションに戻し、刃とカバーを取り付けたら OCT コンパウンドで試料とディスクを固定し、固まったらクリオスタットにセットした。ハンドルを回して試料と刃を接近させ、微動ボタンとハンドルを使いながら、試料を削った。水晶体が露出した段階から、その切片をスライドガラスに貼り付けていくが、切片は丸まっているので細筆 2 本で延ばし、筆の腰で押さえつけることで台座に固定した。素早くスライドガラスで挟み込み、スライドガラス 1 枚あたり 10 切片貼り付けたらクリオスタット内で冷やした。最後に -80°C で保存した。

3.3.5.2 ヘマトキシリン - エオシン (HE) 染色

スライドガラス上の試料をドライヤーで 30 - 60 min 乾かし、4 % PFA 溶液に浸けて 10 min 静置した。流水で 3 min 洗浄し、水気を落としたらマイヤーヘマトキシリン液に浸けて 5 min 静置した。キムワイプ上で溶液を落とし、再び流水で 3 min 洗浄した。その後、1/5 エオシン液 (in EtOH) に 5 min、組織脱水溶液に 3 min を 4 回、キシレンに 3 min を 3 回、それぞれ浸けた。カバーガラスに 1 ml チップで Entellan 大粒 4 滴垂らし、スライドガラスの裏面を拭いた後、空気が入らないようにカバーガラスに被せた。O/N で静置したのち、常温で保存した。

3.3.5.3 パラフィン切片の作製

25 %グータルアルデヒドと 10 %中性緩衝ホルマリンを 1:9 の割合で混合したものを FG 液とした。FG 液に水晶体を浸けて 4°C 1h 静置し、FG 液を交換して 4°C O/N で静置した。さらに、1 日置きに FG 液を交換しながら 2 日間 4°C で保存し、10 %中性緩衝ホルマリン液で置換した。新組織科学研究所へ輸送し、切片を作製してもらった。

3.3.6 ラット個体での実験

3.3.6.1 ラットへの麻酔

ラット 100 g 当たりケタラル 100 μ l、キシラジン 25 μ l を混合した麻酔を調整した。あらかじめ、マイジェクターに必要量分の麻酔を取っておき、ラットの首元を人差し指と中指でつまみ、首が動かないようにホールドした（暴れた際は、反対の手で下半身を驚掴みして左右に数回ゆらすとおとなしくなる）。薬指と小指で腹部の皮膚を押し付けるように引っ張りながら、足の付け根あたりに対して麻酔を垂直に刺した。刺さった時点で針を寝かせ、腹部の中心に向かって最後まで刺しこんで麻酔を注入し、素早く針を抜いた。

3.3.6.2 前房内注射

マイクロシリンジと 33 G 2 重針、パラフィルム、キムタオルを用意した。最初に、ラットに麻酔をかけ眠らせた。パラフィルム上に注入したい薬剤を 200 μ l 垂らし、マイクロシリンジに針をつけ、針先がパラフィルムに触れないように、薬剤を吸引した。指先で叩くようにして薬剤をパラフィルム上に排出することで共洗いを行った。最後に必要量吸引し、キムタオルを敷いた実体顕微鏡下にラットを配置した。眼球周りの皮膚を引っ張りながら、眼球を露出させ、片手でその状態をホールドしつつ、顕微鏡を覗きながら注射針で角膜に押し付けるように穴を開けた。水晶体に針先を当てないように針を房水内部まで押し込み、薬剤を注入した。

3.4 結果・考察

3.4.1 in vitro 系の条件検討

3.4.1.1 iphone6s での撮影

水晶体培養を行っている論文の多くは、使用した顕微鏡を記載しているが、詳細な撮影方法に言及しているものはなかった。そこで、カメラの種類や周りの明るさを変えて条件検討を行った。方法として、実体顕微鏡の接眼レンズに iphone6s のカメラを密着させて撮影した (Fig. 3-1)。このとき、水晶体はガラクトース 0 mM と 30 mM の培地でそれぞれ 4 日間培養したものを比較している。その結果、明室での撮影では水晶体が周りの風景を写してしまっていたが、暗室にして露光を少なくすることでこれを改善出来た。しかし、一番下の図であっても 0 mM と 30 mM のはっきりとした違いを映し出すことが出来なかったため、この改善を目指す。

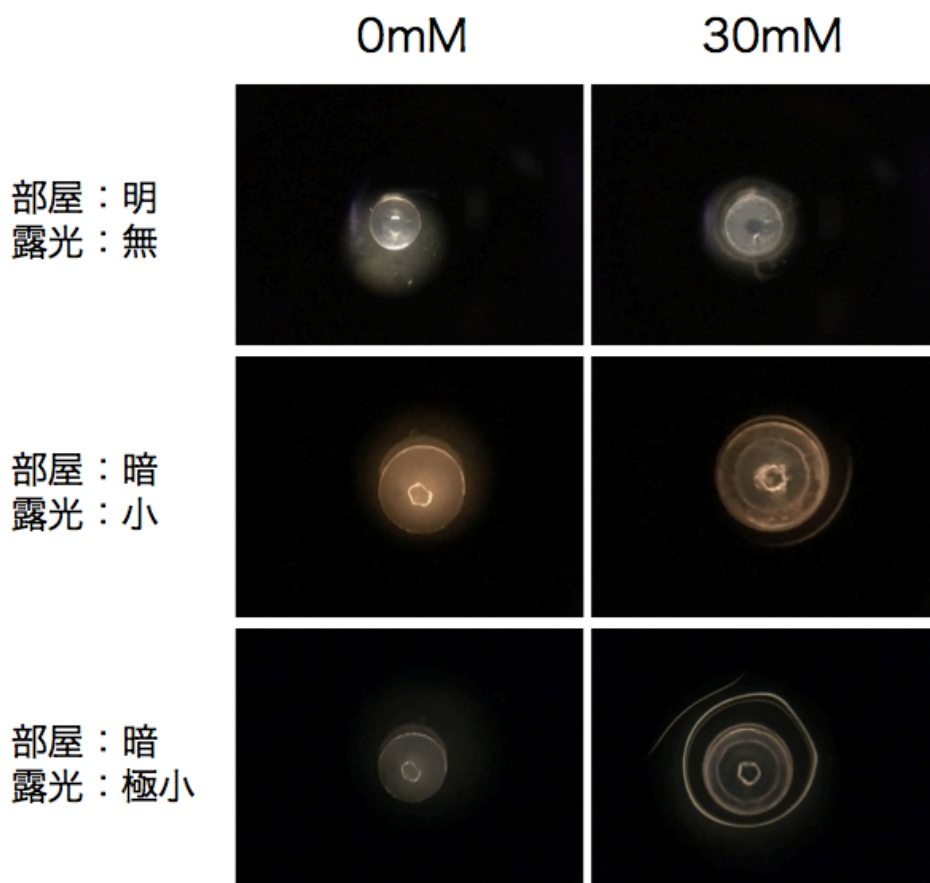


Fig. 3-1 Lens photography with iphone6s.

3.4.1.2 DP73 での撮影

iphone6s のカメラ（120 万画素）では解像度が低く、また接眼レンズに固定したまま撮影することも難しかった。そこで顕微鏡用デジタルカメラ DP73（1728 万画素）を用いることでこれを改善することを試みる。方法として DP73 を取り付け、部屋を暗室にする。40 mm dish 内に PBS 7 ml と水晶体を入れ上から、100 mm dish を逆さまにして被せる。照明用光源をのせ、倍率を 20 倍に、露光時間を 100 ms に、ISO 感度を 200/24° にして撮影した。iphone6s のときと同じく 4 日間培養した水晶体を撮影しているが、両者の違いがはっきりと見て取れる（Fig. 3-2）。また、光源を水晶体に近づけたため、余分な光が写り込まなかった。よって、以降の実験ではこの条件で撮影を行なっていく。

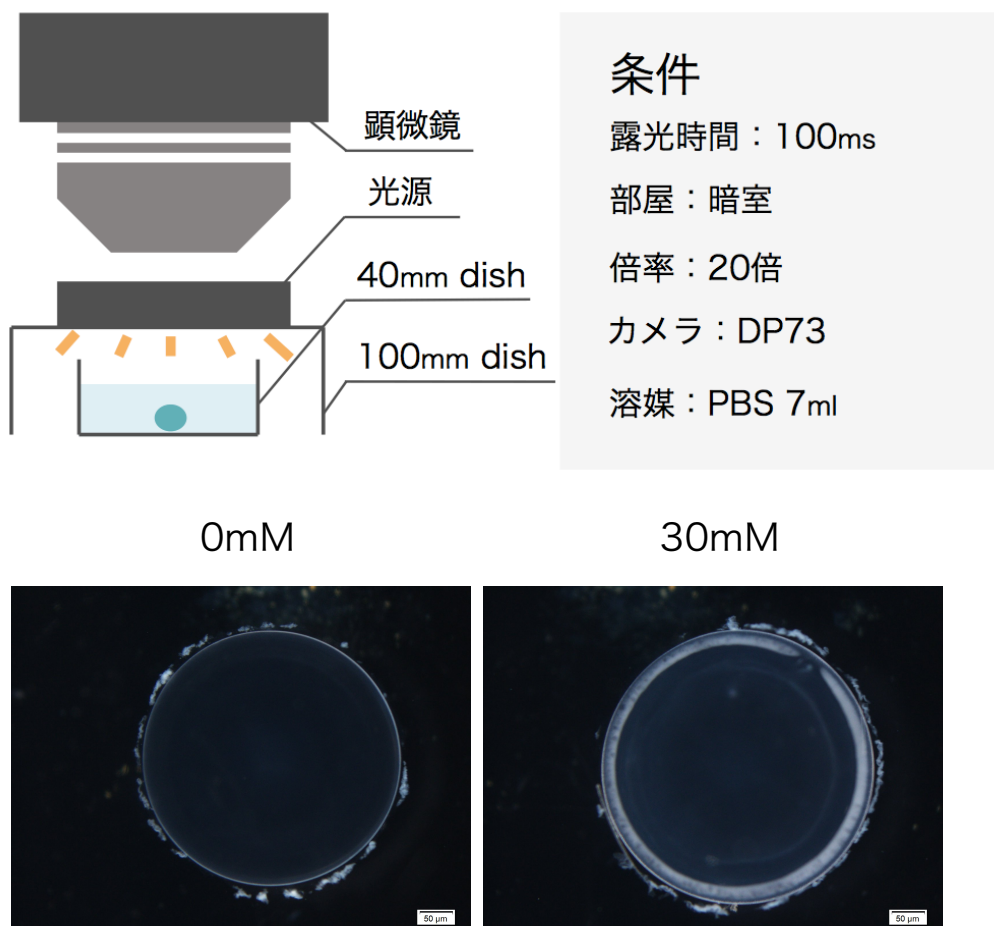


Fig. 3-2 Lens photography with microscope camera.

3.4.1.3 切片の条件検討

レンズ全体を顕微鏡で写しただけでは、内部での変化を捉えることができない。切片像でこれを観察するため、その条件検討を行った。切片の作成方法に大きく分けて2つの方法がある。最初に比較的操作が少なく短期間で作成できる凍結切片を試した。OCTコンパウンドで固定し、クリオスタットを用いて切片に、最後にHE染色で細胞質と核を染め、顕微鏡で観察した (Fig. 3-3 left)。しかし、水晶体が固すぎるためか、スライスする段階で組織がボロボロに崩壊した。そこで、組織の形態を維持しやすいパラフィン切片を次に試した。ここでは組織を Formalin - Glutaraldehyde 液で固定し、パラフィンブロックの作製と薄切作業、HE染色は新組織科学研究所に依頼した。その結果、組織を崩壊させずに切片を作製することができた (Fig. 3-3 right)。この図では上皮部分+皮質、皮質深層、核で色が変わっていることが確認できる (黒い棒線はアーティファクト)。



Fig. 3-3 Lens slice.

3.4.2 HAT 阻害剤は糖白内障予防効果を有する

最初にヒストンアセチル化が糖尿病白内障に関与するか明らかにするため、HDAC 阻害剤の添加が白濁の形成に与える影響を調べた。この実験では糖尿病白内障モデルとしてラット水晶体をガラクトース含有培地で培養した (Fig. 3-4a)。ガラクトースは細胞内でガラクトチオール、つまり糖アルコールへと変換され、ソルビトールの蓄積と同様の結果をもたらす。ガラクトース白内障モデルは短期間に白内障を引き起こすことが出来るため、阻害剤スクリーニングに向いている。ガラクトース 30 mM 含有培地で4日間水晶体を培養すると、ガラクトース培地のみの右眼では環状の白濁が形成されていたが、TSA を添加した左眼ではより白濁が増加した (Fig. 3-4b)。この白濁はレンズ中心方向に向け増強し、全体の不透明性を増加させた。ヒストンアセチル化と白濁との関係が示唆された為、次に HAT 阻害剤の添加実験を行った。阻害剤は様々な HAT を阻害する 26 種類の薬剤それぞれを試した (Table 3-3)。その結果、HAT 阻害剤を添加した左眼では、26 種類中 16 試薬で白濁が低減した (Fig. 3-5)。Embelin や ECGC では僅かに白濁が残っているが、コントロールの右眼と比較して明らかに白濁部が減少しているため予防効果ありと判断している。また、興味深いことに、TH1834 (TIP60 inh)、Embelin (PCAF inh)、CPTH2 (GCN5 inh)、C646 (p300 inh) などの specific な阻害剤であってもそれぞれ同程度の予防効果が見られた。一方、ターゲットが同じであっても効果の見られない HAT 阻害剤も存在し、特に Chetomin (p300 HIF1a inh) では白濁が悪化した (Fig. 3-6)。さらに、白濁が形成された皮質部の様子を観察するため、切片を作成しヘマトキシリン・エオシン染色ののち顕微鏡観察を行った。コントロールの右眼では赤道部の上皮に多数の空胞が見られ、皮質は大きく崩壊していた。一方、最初に p300 阻害剤の代表として C646 阻害剤を添加した左眼では組織の崩壊はほとんど見られず、わずかな空胞が見られただけで、正常なレンズ組織を維持していた (Fig. 3-4c)。

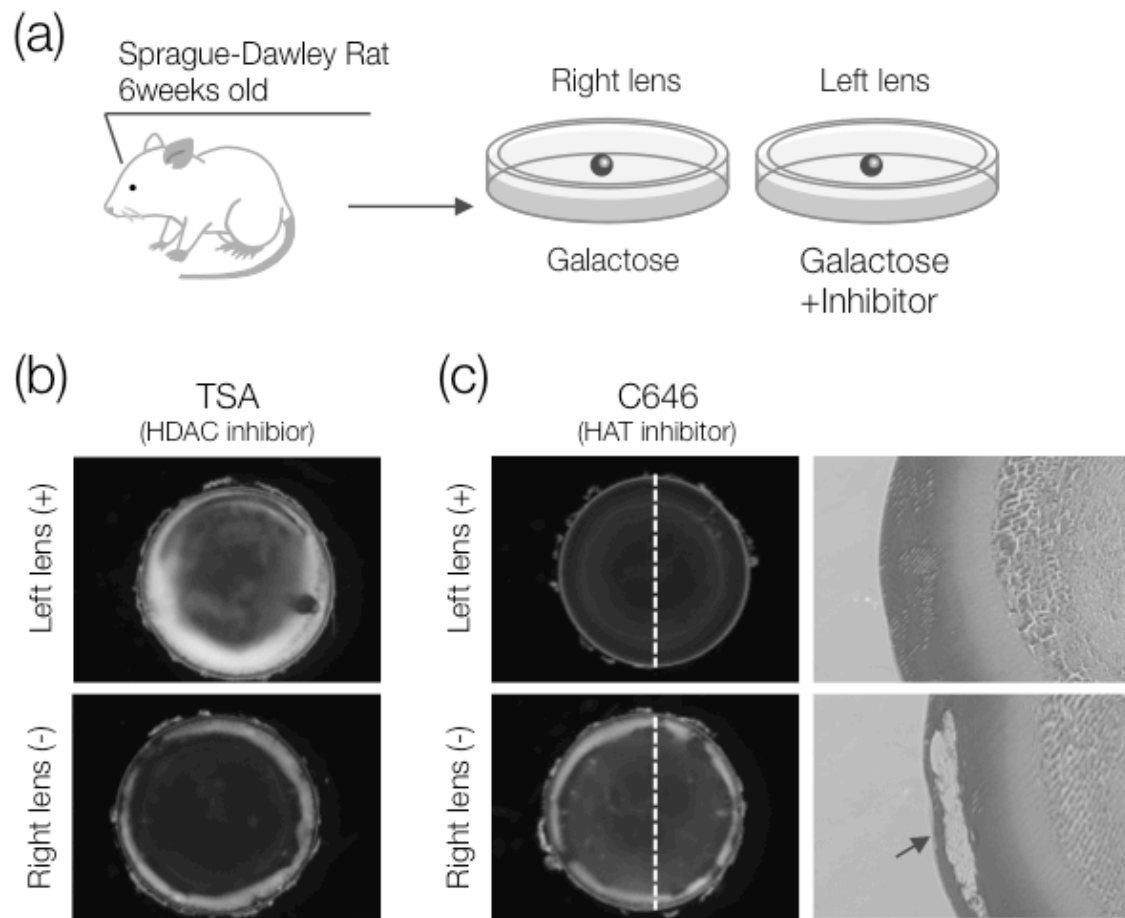


Fig. 3-4 HAT inhibition alleviates galactose-induced cataract formation. (a) Diagram of *ex vivo* experiment. The inhibitor was added to the left lens (with the right lens serving as a Ctrl) and incubated for 4 days in medium containing 30 mM galactose. (b) Representative photomicrograph of lenses on Day 4 after addition of 0.8 mM TSA or vehicle. (c) Representative histological photographs of lenses at 40 mM C646 (Day 4). Lenses tissue sections cut in the direction of the broken line were stained with hematoxylin-eosin. Only the right lens (Ctrl group) shows large vacuoles, indicated by arrows.

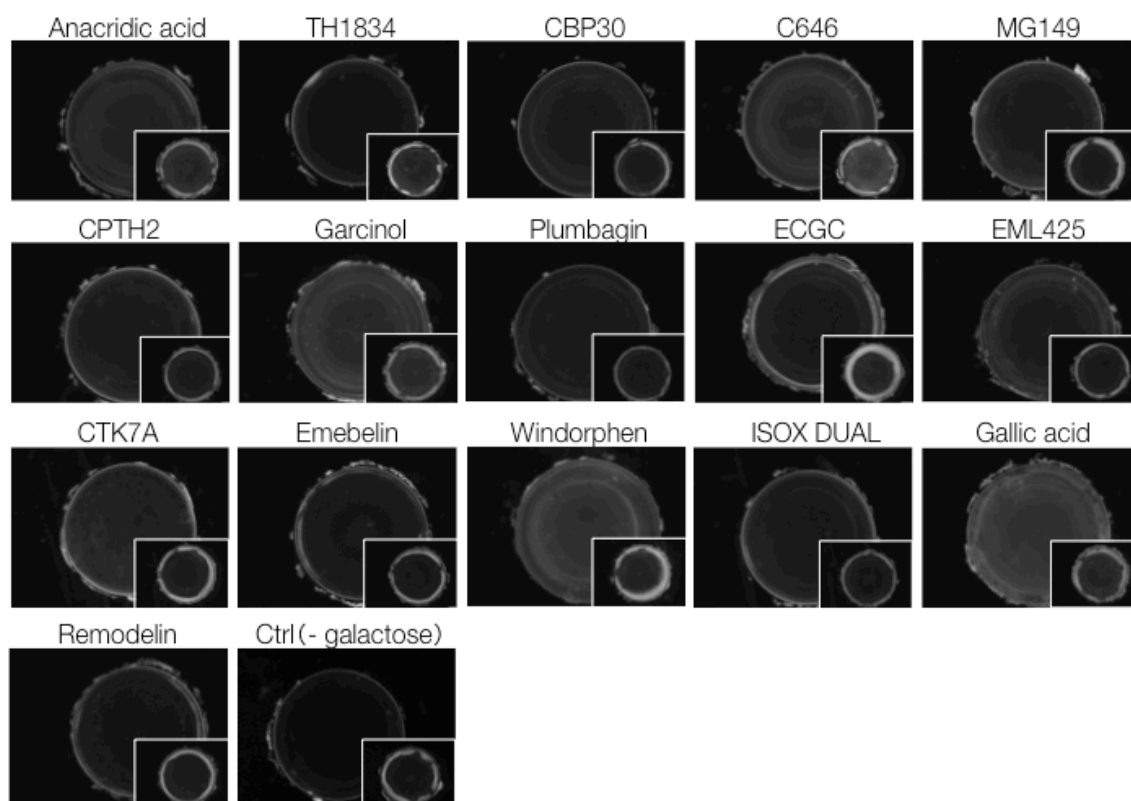


Fig. 3-5 HAT inhibitor with preventive effect. A photomicrograph of day 4 after addition of HAT inhibitors. A small picture on the bottom right shows the right lens of the control.

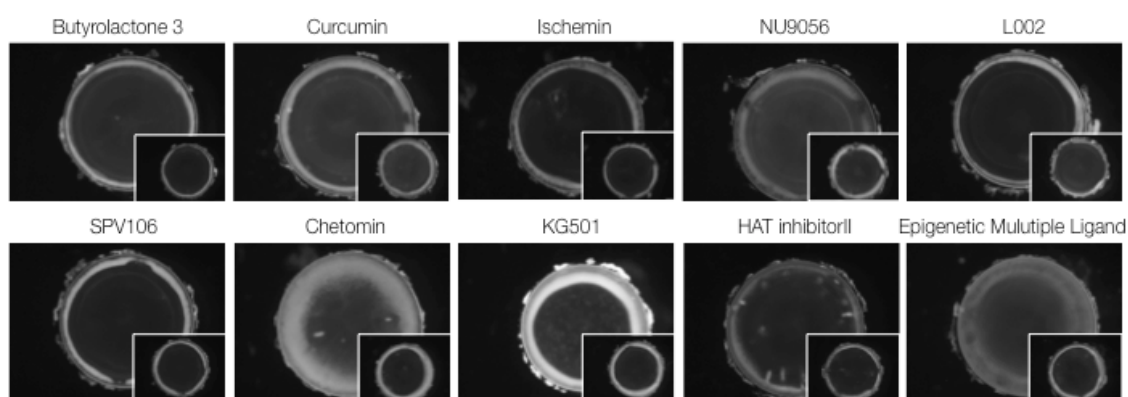


Fig. 3-6 HAT inhibitor with no preventive effect. A photomicrograph of day 4 after addition of HAT inhibitors. A small picture on the bottom right shows the right lens of the control.

Table 3-3 HAT inhibitor list

Name	Target	place of purchase	Concentraion	Prevent effect	Source
CTK7A	p300/PCAF	EMD Millipore (USA)	100μM	○	(20)
Garcinol	p300/PCAF	Abcam (UK)	2μM	○	(20,21)
Anacardic Acid	p300/PCAF	Abcam (UK)	20μM	○	(20,21)
MG149	TIP60/MOZ	Selleck Chemicals (USA)	50μM	○	(22)
C646	p300	Sigma Aldrich (USA)	40μM	○	(20,21)
CPH2	GCN5	Cayman Chemical (USA)	80μM	○	(23)
gallic acid	HAT	Sigma Aldrich (USA)	100μM	○	(24)
(-)-Epigallocatechin gallate (ECGC)	HAT	Wako (Japan)	50μM	○	(20,21)
EML425	p300/CBP	Tocris (UK)	200μM	○	(20)
ISOX DUAL	CBP/BRD4	Sigma Aldrich (USA)	20μM	○	(25)
Plumbagin	p300	Sigma Aldrich (USA)	2μM	○	(20,21)
TH1834	TIP60	Axon Medchem (Netherlands)	50μM	○	(20)
windorphen	HAT	Sigma Aldrich (USA)	40μM	○	(26)
Remodelin	NAT10	Cayman Chemical (USA)	40μM	○	(27)
Embelin	PCAF	Abcam (UK)	40μM	○	(20)
CBP30	p300	Cayman Chemical (USA)	5μM	○	(20)
Curcumin	p300/CBP	Abcam (UK)	40μM	×	(20,21)
2,6-bis((e)-3-bromo-4-hydroxybenzylidene) cyclohexan (HAT inhibitor II)	p300	Abcam (UK)	40μM	×	(28)
Epigenetic Multiple Ligand	p300/CBP	Santa Cruz (USA)	50μM	×	(29)
NU9056	TIP60	Santa Cruz (USA)	100μM	×	(30)
Butyrolactone 3 (MB-3)	GCN5	Abcam (UK)	200μM	×	(20,21)
L002	p300/CBP	Cayman Chemical (USA)	10μM	×	(20)
SPV106	p300/CBP	Sigma Aldrich (USA)	50μM	×	(31)
Chetomin	HIF1a/p300 complex	Cayman Chemical(USA)	50nM	×	(21)
Ischemin	p300/CBP	Tocris (UK)	100μM	×	(20,21)
KG501(Naphthol AS-E phosphate)	p300/CBP	Sigma-Aldrich (USA)	50μM	×	(21)

3.4.3 HAT 阻害剤は水晶体混濁度を減弱させる

白濁の進行を定量的に評価するため、水晶体写真からレンズ全体の輝度の平均値を算出して混濁度を算出した(1)。 n は輝度値 0 ~ 255、 P_n は輝度値 n の全ピクセル数を示す。

$$Opacity = \sum_{k=0}^n K \cdot P_k / \sum_{k=0}^n P_k \quad (1)$$

加重平均であるため、この混濁度の値は皮質部の様な極端な白濁によって大きく増加する。HAT 阻害剤には C646、HDAC 阻害剤には TSA を用い、阻害剤を加えてから Day 1 ~ 4 の各点を計測した。その結果、Day 1 ~ 4 にかけてコントロールでは混濁度の変化が見られないが、ガラクトースでは時間依存的な増加が観察された (Fig. 3-7a)。一方、HAT, HDAC どちらの阻害剤でも Day 1 ではガラクトースと薬剤処理の間に大きな差は見られなかった。しかし、Day 2 ~ 4 ではガラクトースと TSA では時間依存的に混濁度が増加していくのに対し、C646 では Day 1 と同程度の混濁しか見られなかった。次にレンズの輝度分布の変化を観察する為、Day 4 の時点のレンズのヒストグラムを算出した (Fig. 3-7b)。ここでは先の混濁度と異なり、レンズ全体の透明性 (最もピクセル数が多い輝度帯) が一峰性の山として図示されている。こちらでも Fig. 3-7a と同等に Ctrl, C646, Gal, TSA の順に透明度が高いことが示され、C646 の白内障予防効果と TSA の白濁促進効果が示された。さらに、C646 の濃度依存性を調べるために、より薄い濃度で予防効果を確認した。すると、10 μ M から 40 μ M の範囲で段階的に混濁度が減少することが確認できた (Fig. 3-7c)。これらの結果は白内障の症状がヒストンアセチル化によって左右されることを示し、アセチル化レベルの回復は白内障を減弱させることを示唆した。

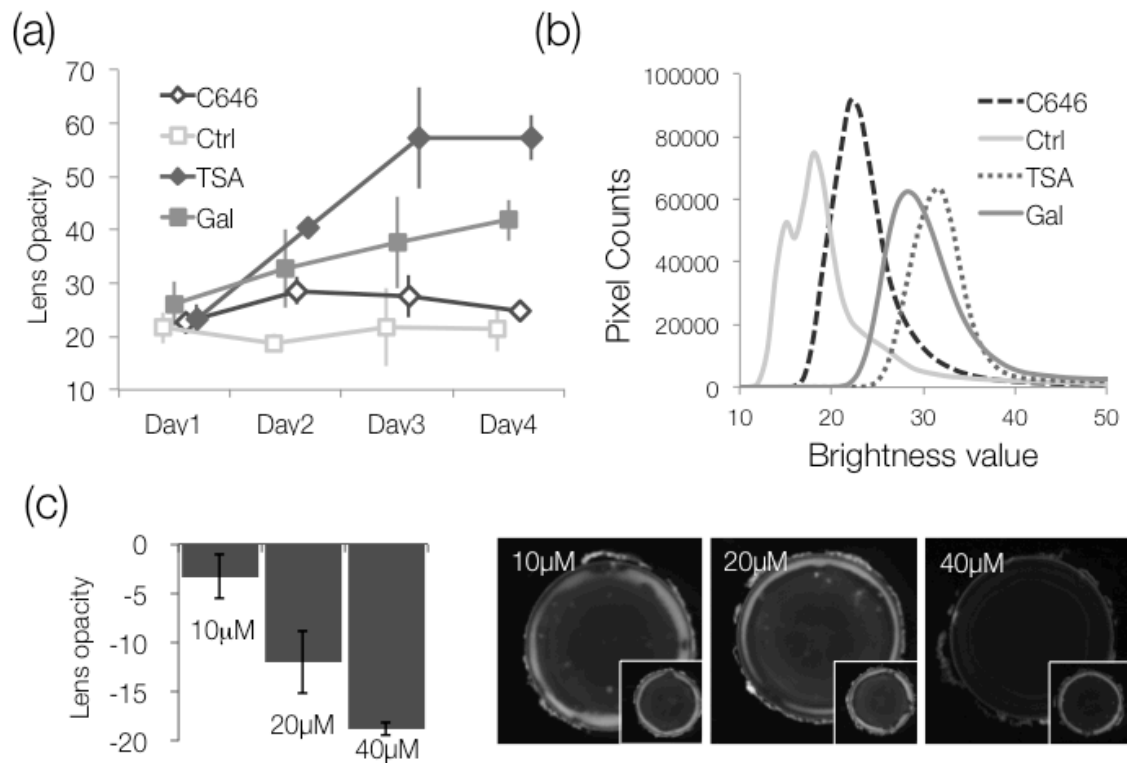


Fig. 3-7 Effects of HAT/HDAC inhibition on lens opacity. (a) Changes in lens opacity over time. Opacity, which is a weighted average of lens brightness values, is sensitive to the effects of strong white turbidity in the cortex. C646 and TSA are added to galactose medium. All lenses on each date were removed from different animals ($n = 3$, only galactose is $n = 9$). Galactose-containing medium was used as the Ctrl (right lens). (b) A histogram of luminance values is shown to visualize the opacity of the entire lens. The same lens as Day 4 of Fig. 2a was used. (c) Concentration-dependent decreases in opacity with C646 treatment. The weighted average values of the left lens (inhibitor condition) to the right lens (galactose-only condition) of the same rat were subtracted. The right picture shows the effect of the C646 HAT inhibitor by concentration. The inset is the Ctrl (right) lens. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

3.4.4 Plk3 は HAT/HDAC によって制御される

HAT 及び HDAC が白濁の形成に影響を及ぼしている可能性が示唆されたが、どの遺伝子に作用しているか不明なままだった。そこで、HAT, HDAC によって制御される白内障の原因因子を検出する為、マイクロアレイを用いた網羅的な探索を行った。最初に、ガラクトースと比較して Ctrl、HAT 阻害剤 (C646 40 μ M) で有意に減少した遺伝子群と、HDAC 阻害剤 (TSA 0.8 μ M) で有意に増加した遺伝子群でベン図を作成した (Fig. 3-8)。C646 と Ctrl で共通する遺伝子は 72 個あったが、TSA と Ctrl では 5 個、TSA と C646 では 3 個しかなかった。また、C646 と Ctrl で有意に減少し、TSA で有意に増加した遺伝子は Plk3 と Loc100362769 の 2 つだけであった。次に、これらの遺伝子と同じような機能を持った遺伝子群が糖白内障で働いていないか調べるため、DAVID

(<https://david.ncifcrf.gov>) を用いたアノテーション解析を行った。Table ではコントロールと比較してガラクトースで増加した遺伝子群 (251 個) を DAVID にアップロードし、エンリッチメントスコアの高いクラスター上位 3 つを抽出した (Table 3-4)。このリストの上位 1,3 にはアポトーシスや p53, FoxO 経路に関与する term が見られ、Plk3 とそれに関与する遺伝子が含まれていた (Table 3-5)。これらのことから、ガラクトース白内障下では Plk3 の発現増加と、HAT 阻害剤による Plk3 の減少が示唆された。

マイクロアレイの結果を確かめるため、リアルタイム PCR で Plk3 の発現量を定量的に測定した (Fig. 3-9a)。Day 1 から Day 3 の間、コントロールは Plk3 の値がほとんど変化しなかったが、Day 4 のみ 1.5 倍程度増加した。ガラクトースではコントロールと比較して Day 1 の時点で 2 倍以上の差が見られ、その後も時間依存的に増加し、Day 4 では 20 倍以上になった。一方で、C646 では Day 1 でガラクトースとほぼ同じ値だが、Day 2 以降の Plk3 発現量は徐々に減少し、Day 4 で半分以下に落ち込んだ。また、予防効果の見られた他の HAT 阻害剤では Plk3 が減少しないものもあったが、Tip60 阻害剤である TH1834 の添加でも C646 と同程度まで Plk3 を減少させた (data not shown)。また、TSA も有意な差ではないが各時点でガラクトースよりも発現量が高かった。ここで用いたガラクトース、コントロールサンプルの混濁度をそれぞれ測定し、Plk3 の発現量と比較すると、両者の間には単調増加の関係が見られた (Fig. 3-9b)。相関係数も 0.7 と高く、Plk3 が発現するにつれてレンズ混濁度が高くなっていることが明らかになった。さらに、Plk3 の増加が *ex vivo* 特有の現象ではないことを実証するため、*in vivo* 実験を行った (Fig. 3-9c)。その結果、50%ガラクトース餌を 1 週間与えられたラットは *ex vivo* と同様の白内障を形成し (Fig. 3-9d)、Plk3 発現の増加も見られた (Fig. 3-9e)。これらの結果は、Plk3 が HAT, HDAC によって発現を制御される因子であり、バイオマーカーのように白内障の症状と相関して変動することを示している。

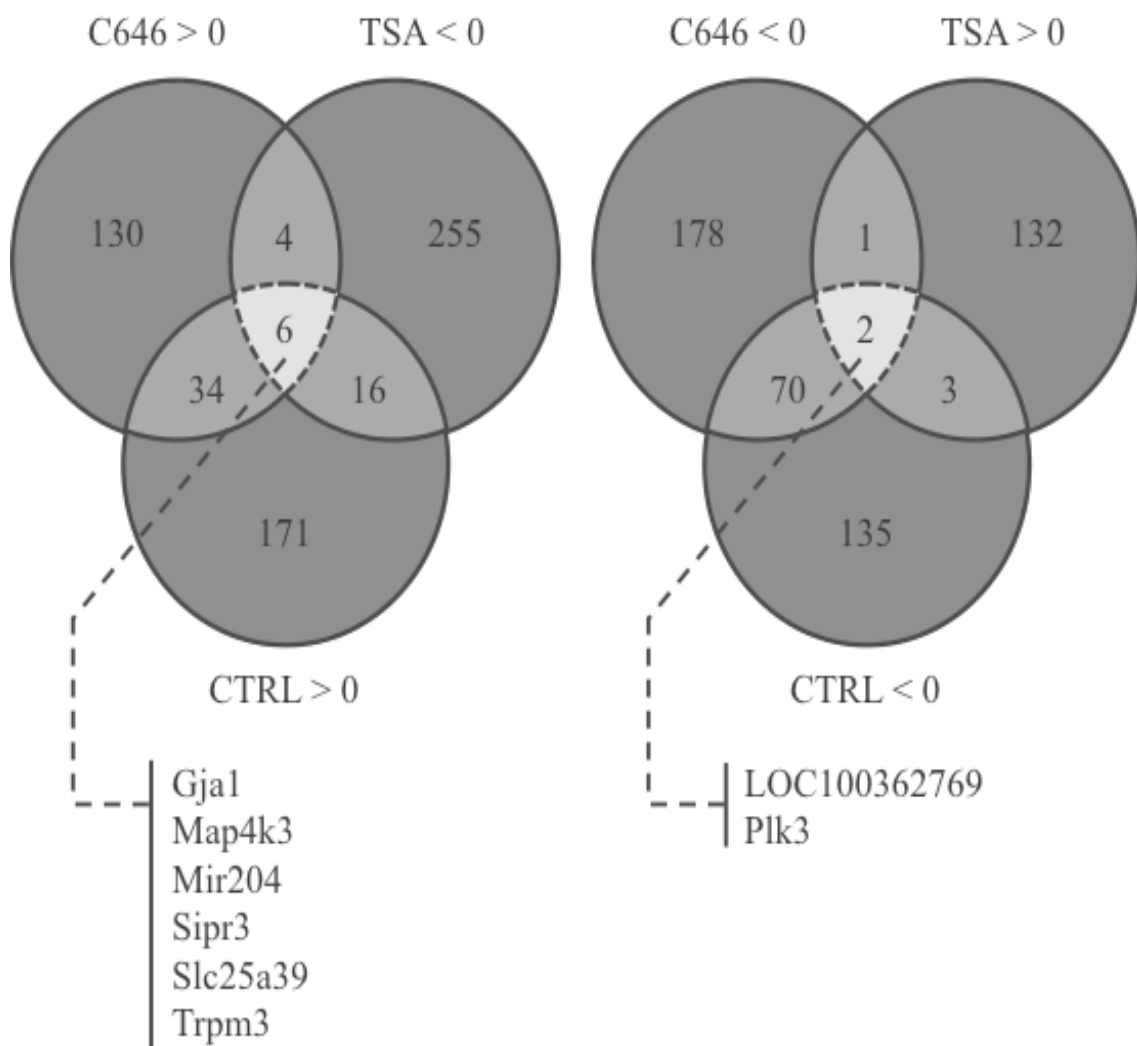


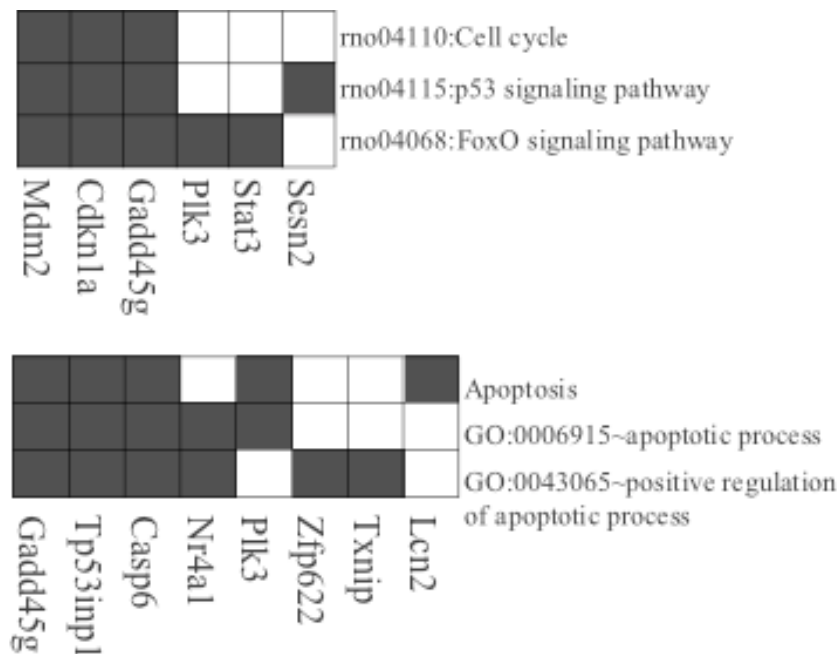
Fig. 3-8 Identification of epigenetically regulated cataract-causing factors by microarray. Venn diagram of fluctuated genes in microarray analysis. Left panel: Genes significantly reduced in C646 and ctrl and significantly increased in TSA compared to galactose ($P < 0.05$). Right panel: Genes significantly increased in C646 and ctrl and significantly reduced in TSA compared to galactose ($P < 0.05$).

Table 3-4. Annotation Cluster list

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 2.28		
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment
KEGG_PATHWAY	rno04068:FoxO signaling pathway	5	1.15E-03	10.22
KEGG_PATHWAY	rno04115:p53 signaling pathway	4	1.75E-03	15.88
KEGG_PATHWAY	rno04110:Cell cycle	3	7.12E-02	6.56
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 2.09		
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010628~positive regulation of gene expression	7	1.65E-03	5.42
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0042493~response to drug	7	9.17E-03	3.81
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0010629~negative regulation of gene expression	4	3.60E-02	5.42
Annotation Cluster 3		Enrichment Score: 1.83		
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	6	5.93E-03	5.10
UP_KEYWORDS	Apoptosis	5	1.51E-02	5.20
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0006915~apoptotic process	5	3.65E-02	3.93

Gene ontology analysis of 210 genes significantly increased as compared to the control. The top three enrichment scores were shown.

Table 3-5. Annotation Cluster



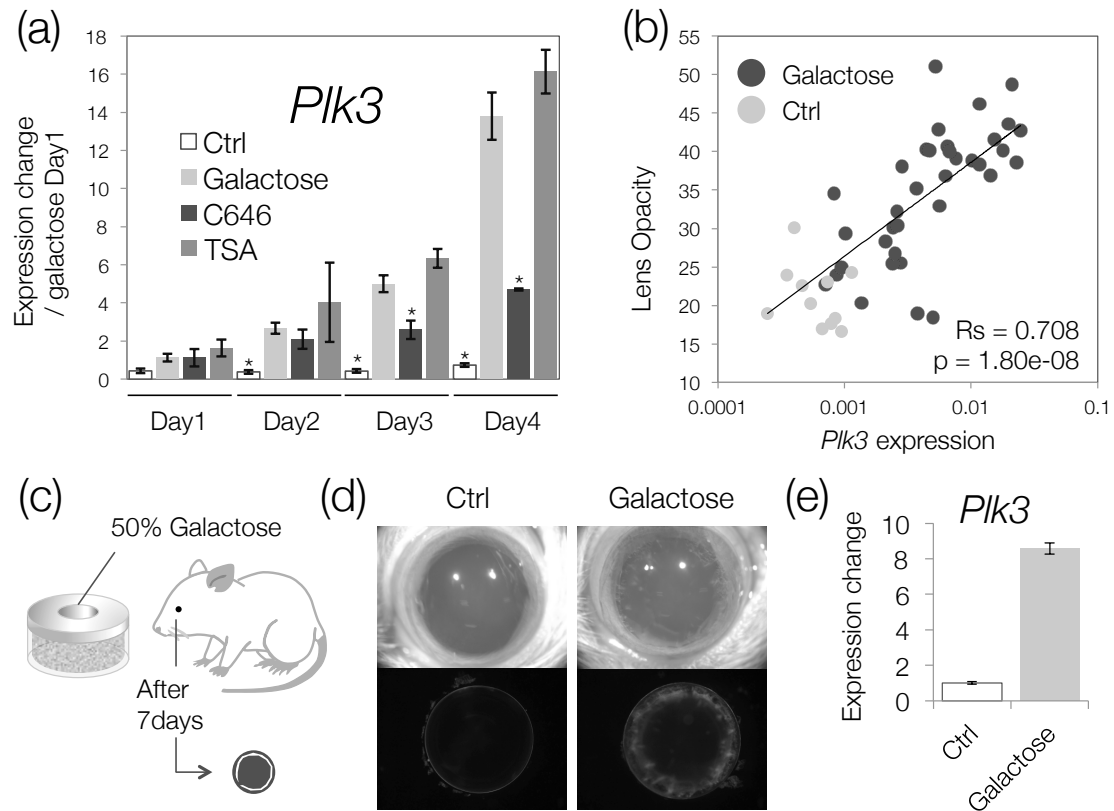


Fig. 3-9 *Plk3* expression correlates with cataract severity. (a) *Plk3* mRNA expression over time was measured using real-time qRT-PCR ($n = 3/\text{group}$, galactose only $n = 9$). C646 and TSA are added to galactose medium. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. $*P < 0.05$ versus galactose only. (b) The horizontal axis plots the logarithmic value of *Plk3* expression level, and the vertical axis plots the degree of lens opacity. Each point used galactose and control from Days 1–4. R_s and P value is cultured Spearman's rank correlation. mRNA levels were normalized to *Gapdh* expression. (c) Diagram of the in vivo experiment. (d) Photomicrograph of the eye above, and of the lens removed below. (e) mRNA expression in vivo was measured using real-time qRT-PCR ($n = 4$).

3.4.5 Plk3、Atm は白内障原因遺伝子のひとつである

Plk3 が白内障の原因因子であるか調べるために、HAT と同様に Plk3 阻害剤の添加実験を行った。Plk3 阻害剤である GW843682X を添加すると完全ではないものの白濁が減少した (Fig. 3-10a left)。ここで、Plk3 は DNA 損傷応答因子 Atm によって活性化されることが知られている。Atm 阻害剤である KU55933 を添加してみると、HAT 阻害剤と同様に予防効果が現れた (Fig. 3-10a right)。白濁を定量的に測定すると、どちらの阻害剤も C646 程度に白濁を大きく減少させていることがわかる (Fig. 3-10b)。

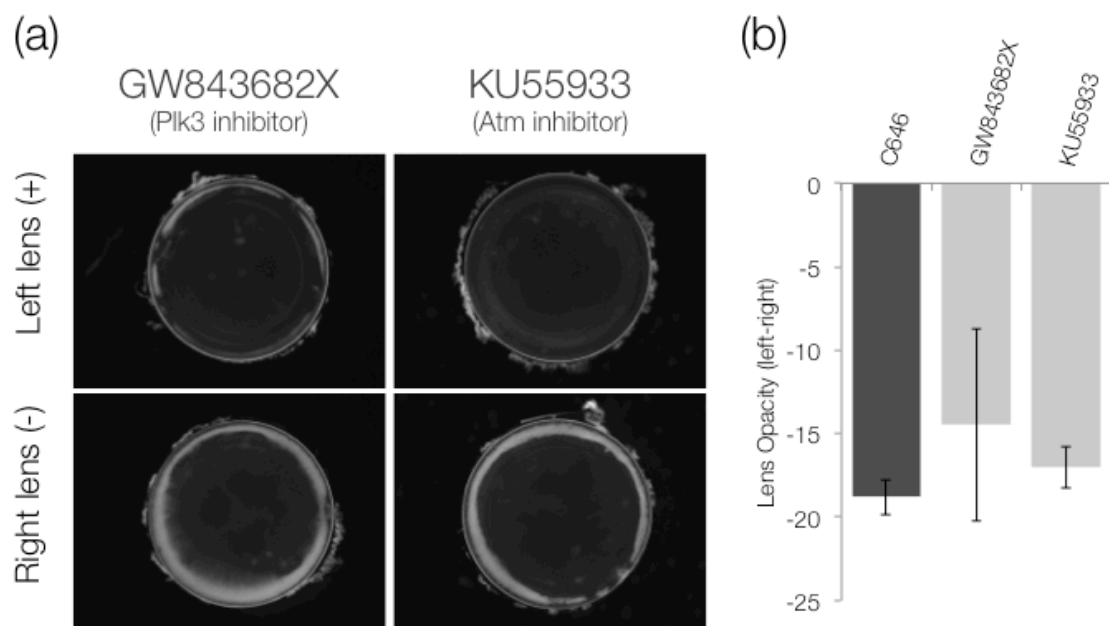


Fig. 3-10 Plk3 and Atm inhibition alleviate galactose-induced cataract formation. (a) Representative photomicrographs of Day 4 after inhibitor addition (Plk3 inhibitor GW843682X 1 μ M, Atm inhibitor KU55933 10 μ M). GW843682X and KU55933 are added to galactose medium. (b) Comparison of lens turbidity between inhibitors. The values of the left lens (inhibitor condition) to the right lens (galactose-only condition) from the same rat were subtracted. Data are expressed as mean $\pm$ SD. mRNA levels were normalized to *Gapdh* expression.

3.4.6 マイクロアレイによる白内障原因遺伝子探索

HAT、Plk3、および Atm 阻害剤間の関係を調査するために、再びマイクロアレイを実行した。TSA 以外のサンプルでは、ガラクトースと比較して合計 1201 遺伝子が 2 倍以上増加し、多くの遺伝子の増加傾向と減少傾向は阻害剤間で一致した (Fig. 1-11 a)。クラスター分析と PCA 分析により、C646 と GW843682X の間で高い類似性が確認されたが、Ctrl は最も遠いクラスターに存在した (Fig. 3-11a, b)。全体的な発現パターンに有意な傾向はなかったため、次に 3 つの阻害剤に共通の変動遺伝子があるかどうかを確認した。Fig. 2-11a のヒートマップをベン図に置き換えると、12 個の遺伝子が Ctrl グループと 3 つの阻害剤で共通して変動していた (Fig. 3-11c)。この遺伝子クラスターはリアルタイム PCR によって発現を確認し、いずれかのサンプルで発現量の有意な増減を示す 6 つの遺伝子を抽出した (Fig. 3-11d)。その中で Arid5b、Lif、および Rsad2 には有意差があり、これらの遺伝子が HAT、Atm、および Plk3 の一般的な下流因子であることを示唆された。

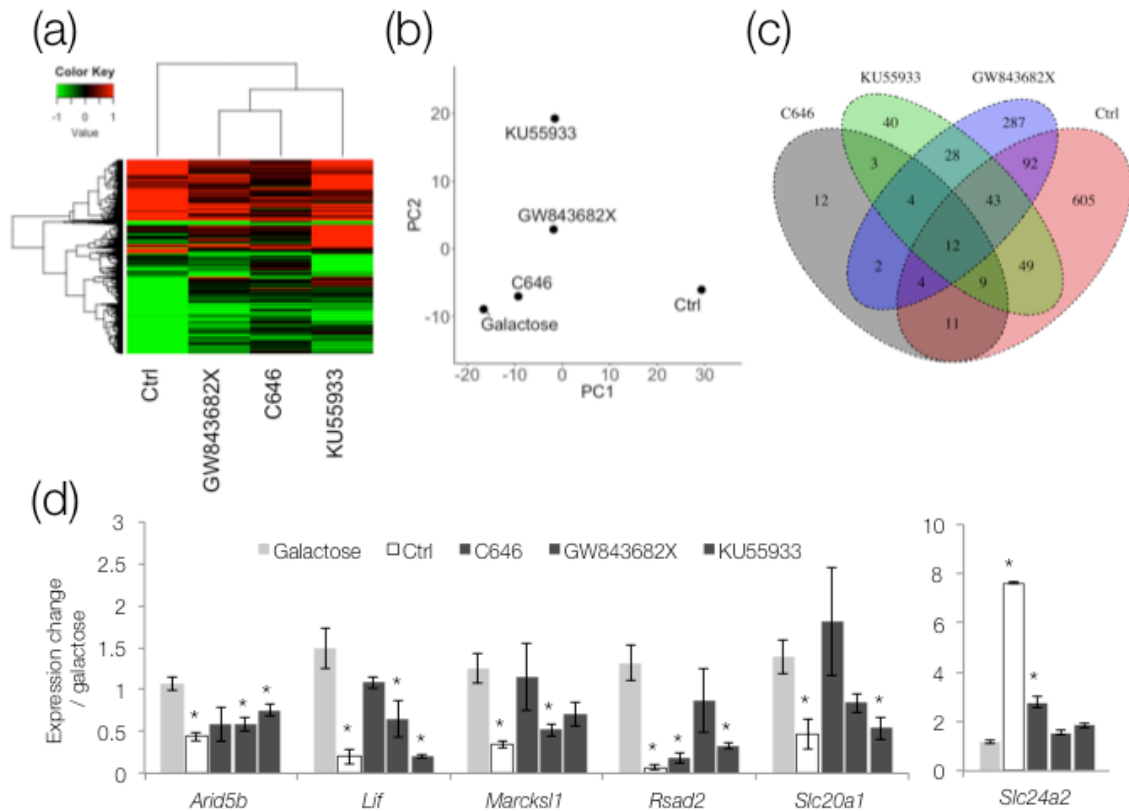


Fig. 3-11 Plk3 and Atm inhibition alleviate galactose-induced cataract formation. (a) Representative photomicrographs of Day 4 after inhibitor addition (Plk3 inhibitor GW843682X 1 μ M, Atm inhibitor KU55933 10 μ M). GW843682X and KU55933 are added to galactose medium. (b) Comparison of lens turbidity between inhibitors. The values of the left lens (inhibitor condition) to the right lens (galactose-only condition) from the same rat were subtracted. Data are expressed as mean $\pm$ SD. mRNA levels were normalized to *Gapdh* expression.

3.5 考察

糖尿病性白内障では、ソルビトールの蓄積が浸透圧ストレスとアポトーシスを増加させ、水晶体の恒常性を破壊し、最終的に白内障の形成を引き起こす^{22,23}。しかし、糖尿病性白内障の詳細な分子メカニズムは十分に理解されていない。本研究では、HAT 阻害がガラクトース誘発糖尿病様白内障形成を軽減し、ヒストンのアセチル化が白内障形成と相関することを実証した。さらに、マイクロアレイ解析により、Plk3 が HAT によって制御されていることが確認され、その後の機能解析により、Plk3 がガラクトース誘発白内障の形成に寄与することが明らかになった。これらの発見は、エピジェネティクに調節された糖尿病性白内障形成の新しいメカニズムを表す。

Plk3 はセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞周期の進行と腫瘍形成に関与する⁵¹。また、Plk3 は Atm によって活性化され、p53 の活性化を介してアポトーシスを引き起こす^{50,51}。Plk3 と白内障の直接的な関係を報告した先行研究は存在しないが、マウス LEGSKO および Mip 変異体白内障モデルの網羅的な遺伝子発現解析により、WT と比較して両方のモデルで Plk3 発現が増加している^{52,53}。また、いくつかの報告は、Plk3 が白内障の形成を調節するという仮説を間接的に支持する。例えば、白内障誘発因子 H₂O₂ と UV は両方とも Plk3 を活性化する^{54,55}。UV 誘発白内障はカフェインによって減弱され、カフェインも Atm を介して Plk3 を阻害する^{50,56,57}。さらに、浸透圧ストレスも白内障形成の危険因子であり、Plk3 を活性化する。Wang らは過剰なソルビトールによって浸透圧ストレスを受けたヒト角膜上皮細胞では、DNA 損傷が発生し、Plk3 が活性化されることを明らかにした⁵⁸。糖尿病性白内障では、浸透圧は糖から生成されるポリオールによって増加し、Plk3 はガラクトース誘発性糖尿病性白内障で増加することを我々の結果が示している⁵⁹ (Fig. 3-9)。

HDAC は加齢性白内障および Tgf- β 誘発白内障で活性化され、幾つかの白内障モデルにおける白濁形成が HDAC 阻害によって軽減される^{32,36,37}。しかし、糖尿病またはガラクトース誘発白内障形成における HDAC 活性の報告は存在しない。特に、Tgf- β 誘発の白内障は多層化した LEC によって引き起こされるため、白内障形成のメカニズムが根本的に異なる⁴²。また、糖尿病性網膜症では、ヒストンのアセチル化が増加し、HDAC の活性化により網膜症の病理が緩和される⁶¹。したがって、糖尿病および糖尿病合併症では、ヒストンのアセチル化が増加する可能性がある。

腫瘍抑制因子 p53 は、p300 に結合してアポトーシスを誘導する転写因子である。p53 の過剰発現は Plk3 を上方制御するだけでなく、Plk3 プロモーターのヒストンアセチル化も活性化する⁶²。ただし、これらの発見は癌細胞での報告であり、水晶体に適用でき

るかは不明である。したがって、水晶体でこの関係を確認し、p53 阻害が Plk3 阻害と同様の機能的効果を持っているかどうかを判断する必要がある。

また、我々は Plk3 の下流で制御される因子として Arid5b、Lif、および Rsad2 を含むいくつかの因子を特定した (Fig. 3-11d)。興味深いことに、これら 3 つの因子は共通して脂質代謝に関与しているが、脂質代謝と白内障の関係についての報告はなかった。例えば、Arid5b は血管平滑筋細胞の分化と増殖の調節因子⁶³であり、デメチラーゼ Phf2 と複合体を形成して、転写応答性プロモーターの抑制可能なヒストンメチル化マークの除去によるシグナルセンシングのエピジェネティックな決定因子として機能する⁶⁴。Phf2 過剰発現マウスは脂肪症を発症し、Arid5b ノックアウトマウスは高脂肪食による体重増加と肥満に耐性がある^{65,66}。一方、Lif は骨髄性白血病細胞の最終分化を誘導し、その継続的な成長を阻害する因子である⁶⁷。転写調節を通じてトリグリセリドの分解に関与する酵素であるリポタンパク質リパーゼの活性を低下させるといった作用も持ち⁶⁸、Lif の投与は、ラット血清トリグリセリドを用量依存的に増加させる⁶⁹。最後に、Rsad2 は広範囲の生物に見られる因子であり、ウイルスの複製を阻害する⁷⁰。ATR-FTIR 分光法を用いた肥満マウスの遺伝子型と表現型の相関分析では、Rsad2 が肥満関連疾患に関連していることが確認されている⁷¹。加えて、Rsad2 ノックダウンマウスは、抗ウイルス活性を低下させることにより脂肪組織の炎症を促進したが、高脂肪食の摂食による有害な影響は受けない⁷²。このように、糖尿病関連因子である Arid5b、Lif、Rsad2 の阻害は、上皮細胞の糖依存的なホメオスタシスに関与する可能性がある。水晶体混濁における 3 つの因子の役割は更なる検討を必要とするが、本研究は、AT を介した Plk3 の増加が糖尿病性白内障の発症に関与している可能性があることを初めて実証した。

3.6 参考文献

- 19 Iwase, A. *et al.* Prevalence and causes of low vision and blindness in a Japanese adult population: the Tajimi Study. *Ophthalmology* **113**, 1354-1362, doi:10.1016/j.ophtha.2006.04.022 (2006).
- 20 Harding, J. J., Egerton, M., van Heyningen, R. & Harding, R. S. Diabetes, glaucoma, sex, and cataract: analysis of combined data from two case control studies. *Br. J. Ophthalmol.* **77**, 2-6 (1993).
- 21 Sekimoto, M., Imanaka, Y., Kitano, N., Ishizaki, T. & Takahashi, O. Why are physicians not persuaded by scientific evidence? A grounded theory interview study. *BMC Health Serv. Res.* **6**, 92, doi:10.1186/1472-6963-6-92 (2006).
- 22 Cheng, H. M. & González, R. G. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase, and senile cataractogenesis. *Metabolism* **35**, 10-14 (1986).
- 23 Srivastava, S. K. & Ansari, N. H. Prevention of sugar-induced cataractogenesis in rats by butylated hydroxytoluene. *Diabetes* **37**, 1505-1508 (1988).
- 24 Kinoshita, J. H. Mechanisms initiating cataract formation. Proctor Lecture. *Invest. Ophthalmol.* **13**, 713-724 (1974).
- 25 Li, W. C. *et al.* Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J. Cell Biol.* **130**, 169-181 (1995).
- 26 Takamura, Y., Kubo, E., Tsuzuki, S. & Akagi, Y. Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract. *Exp. Eye Res.* **77**, 51-57, doi:10.1016/s0014-4835(03)00083-6 (2003).
- 27 Tough, D. F., Tak, P. P., Tarakhovsky, A. & Prinjha, R. K. Epigenetic drug discovery: breaking through the immune barrier. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 835-853, doi:10.1038/nrd.2016.185 (2016).
- 28 Suzuki, M. M. & Bird, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 465-476, doi:10.1038/nrg2341 (2008).
- 29 Li, B. *et al.* Relationship Between the Altered Expression and Epigenetics of GSTM3 and Age-Related Cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**, 4721-4732, doi:10.1167/iovs.16-19242 (2016).
- 30 Palsamy, P., Ayaki, M., Elanchezhian, R. & Shinohara, T. Promoter demethylation of Keap1 gene in human diabetic cataractous lenses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 542-548, doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.164 (2012).

- 31 Zhu, X. J. *et al.* Epigenetic regulation of α A-crystallin in high myopia-induced dark nuclear cataract. *PLoS One* **8**, e81900, doi:10.1371/journal.pone.0081900 (2013).
- 32 Wang, Y., Li, F., Zhang, G. W., Kang, L. H. & Guan, H. J. Ultraviolet-B induces ERCC6 repression in lens epithelium cells of age-related nuclear cataract through coordinated DNA hypermethylation and histone deacetylation. *Clin. Epigenetics* **8**, doi:10.1186/s13148-016-0229-y (2016).
- 33 Wang, Y. *et al.* Altered DNA Methylation and Expression Profiles of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase 1 in Lens Tissue from Age-related Cataract Patients. *Curr. Eye Res.* **40**, 815-821, doi:10.3109/02713683.2014.957778 (2015).
- 34 Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A. & Harel-Bellan, A. Histone acetylation and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 728-736, doi:10.1007/pl00000896 (2001).
- 35 Rong, X. F. *et al.* Effects of histone acetylation on superoxide dismutase 1 gene expression in the pathogenesis of senile cataract. *Sci. Rep.* **6**, doi:10.1038/srep34704 (2016).
- 36 Xie, L., Santhoshkumar, P., Reneker, L. W. & Sharma, K. K. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and vorinostat inhibit TGF β 2-induced lens epithelial-to-mesenchymal cell transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 4731-4740, doi:10.1167/iovs.14-14109 (2014).
- 37 Chen, X. *et al.* The epigenetic modifier trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Cell Death Dis.* **4**, doi:10.1038/cddis.2013.416 (2013).
- 38 Dancy, B. M. & Cole, P. A. Protein Lysine Acetylation by p300/CBP. *Chem. Rev.* **115**, 2419-2452, doi:10.1021/cr500452k (2015).
- 39 Simon, R. P., Robaa, D., Alhalabi, Z., Sippl, W. & Jung, M. KATching-Up on Small Molecule Modulators of Lysine Acetyltransferases. *J. Med. Chem.* **59**, 1249-1270, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01502 (2016).
- 40 Ghizzoni, M. *et al.* 6-alkylsalicylates are selective Tip60 inhibitors and target the acetyl-CoA binding site. *Eur. J. Med. Chem.* **47**, 337-344, doi:10.1016/j.ejmech.2011.11.001 (2012).
- 41 Chimenti, F. *et al.* A Novel Histone Acetyltransferase Inhibitor Modulating Gcn5 Network: Cyclopentylidene- 4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazon. *J. Med. Chem.* **52**, 530-536, doi:10.1021/jm800885d (2009).
- 42 Choi, K. C. *et al.* Gallic Acid Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Nuclear Factor-kappa B Signaling by Preventing RelA Acetylation in A549 Lung Cancer Cells.

- Mol. Cancer Res.* **7**, 2011-2021, doi:10.1158/1541-7786.mcr-09-0239 (2009).
- 43 Chekler, E. L. P. *et al.* Transcriptional Profiling of a Selective CREB Binding Protein Bromodomain Inhibitor Highlights Therapeutic Opportunities. *Chem. Biol.* **22**, 1588-1596, doi:10.1016/j.chembiol.2015.10.013 (2015).
 - 44 Hao, J. J. *et al.* Selective Small Molecule Targeting beta-Catenin Function Discovered by In Vivo Chemical Genetic Screen. *Cell Rep.* **4**, 898-904, doi:10.1016/j.celrep.2013.07.047 (2013).
 - 45 Larrieu, D., Britton, S., Demir, M., Rodriguez, R. & Jackson, S. P. Chemical Inhibition of NAT10 Corrects Defects of Laminopathic Cells. *Science* **344**, 527-532, doi:10.1126/science.1252651 (2014).
 - 46 Costi, R. *et al.* Cinnamoyl compounds as simple molecules that inhibit p300 histone acetyltransferase. *J. Med. Chem.* **50**, 1973-1977, doi:10.1021/jm060943s (2007).
 - 47 Mai, A. *et al.* Epigenetic multiple ligands: Mixed Histone/Protein methyltransferase, acetyltransferase, and class III deacetylase (Sirtuin) inhibitors. *J. Med. Chem.* **51**, 2279-2290, doi:10.1021/jm701595q (2008).
 - 48 Coffey, K. *et al.* Characterisation of a Tip60 Specific Inhibitor, NU9056, in Prostate Cancer. *PLoS One* **7**, doi:10.1371/journal.pone.0045539 (2012).
 - 49 Sbardella, G. *et al.* Identification of long chain alkylidenemalonates as novel small molecule modulators of histone acetyltransferases. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 2788-2792, doi:10.1016/j.bmcl.2008.04.017 (2008).
 - 50 Xie, S. *et al.* Reactive oxygen species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. *J. Biol. Chem.* **276**, 36194-36199, doi:10.1074/jbc.M104157200 (2001).
 - 51 Xie, S. Q. *et al.* Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 43305-43312, doi:10.1074/jbc.M106050200 (2001).
 - 52 Whitson, J. A. *et al.* Transcriptome of the GSH-Depleted Lens Reveals Changes in Detoxification and EMT Signaling Genes, Transport Systems, and Lipid Homeostasis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 2666-2684, doi:10.1167/iovs.16-21398 (2017).
 - 53 Zhou, Y., Bennett, T. M. & Shiels, A. Lens ER-stress response during cataract development in Mip-mutant mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1862**, 1433-1442, doi:10.1016/j.bbadis.2016.05.003 (2016).
 - 54 Wang, L., Dai, W. & Lu, L. Stress-induced c-Jun activation mediated by polo-like kinase

- 3 in corneal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 32121-32127, doi:10.1074/jbc.M702791200 (2007).
- 55 Xie, S. Q. *et al.* Genotoxic Stress-Induced Activation of Plk3 is Partly Mediated by Chk2. *Cell Cycle* **1**, 424-429, doi:10.4161/cc.1.6.271 (2002).
- 56 Kronschläger, M. *et al.* Caffeine eye drops protect against UV-B cataract. *Exp. Eye Res.* **113**, 26-31, doi:10.1016/j.exer.2013.04.015 (2013).
- 57 Varma, S. D., Hegde, K. R. & Kovtun, S. UV-B-Induced Damage to the Lens In Vitro: Prevention by Caffeine. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **24**, 439-444, doi:10.1089/jop.2008.0035 (2008).
- 58 Wang, L., Dai, W. & Lu, L. Osmotic Stress-induced Phosphorylation of H2AX by Polo-like Kinase 3 Affects Cell Cycle Progression in Human Corneal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 29827-29835, doi:10.1074/jbc.M114.597161 (2014).
- 59 Kador, P. F., Akagi, Y. & Kinoshita, J. H. The effect of aldose reductase and its inhibition on sugar cataract formation. *Metabolism* **35**, 15-19 (1986).
- 60 42 Lovicu, F. J. *et al.* TGFbeta induces morphological and molecular changes similar to human anterior subcapsular cataract. *Br. J. Ophthalmol.* **86**, 220-226 (2002).
- 61 Kim, Y. H., Kim, Y. S., Roh, G. S., Choi, W. S. & Cho, G. J. Resveratrol blocks diabetes-induced early vascular lesions and vascular endothelial growth factor induction in mouse retinas. *Acta Ophthalmol* **90**, e31-37, doi:10.1111/j.1755-3768.2011.02243.x (2012).
- 62 Vrba, L., Junk, D. J., Novak, P. & Futscher, B. W. p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters. *BMC Genomics* **9**, doi:10.1186/1471-2164-9-486 (2008).
- 63 Watanabe, M. *et al.* Regulation of smooth muscle cell differentiation by AT-rich interaction domain transcription factors Mrf2 alpha and Mrf2 beta. *Circ. Res.* **91**, 382-389, doi:10.1161/01.res.0000033593.05545.7b (2002).
- 64 Baba, A. *et al.* PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. *Nat. Cell Biol.* **13**, 668-U101, doi:10.1038/ncb2228 (2011).
- 65 Whitson, R. H., Tsark, W., Huang, T. H. & Itakura, K. Neonatal mortality and leanness in mice lacking the ARID transcription factor Mrf-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 997-1004, doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.026 (2003).
- 66 Bricambert, J. *et al.* The histone demethylase Phf2 acts as a molecular checkpoint to prevent NAFLD progression during obesity. *Nature Communications* **9**, doi:10.1038/s41467-018-04361-y (2018).

- 67 Gearing, D. P. *et al.* Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* **6**, 3995-4002 (1987).
- 68 Marshall, M. K., Doerrler, W., Feingold, K. R. & Grunfeld, C. LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR INDUCES CHANGES IN LIPID-METABOLISM IN CULTURED ADIPOCYTES. *Endocrinology* **135**, 141-147, doi:10.1210/en.135.1.141 (1994).
- 69 Nonogaki, K. *et al.* LIF and CNTF, which share the gp130 transduction system, stimulate hepatic lipid metabolism in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* **271**, E521-E528 (1996).
- 70 Zhu, H., Cong, J. P. & Shenk, T. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: Induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13985-13990, doi:10.1073/pnas.94.25.13985 (1997).
- 71 Dogan, A. *et al.* ATR-FTIR spectroscopy reveals genomic loci regulating the tissue response in high fat diet fed BXD recombinant inbred mouse strains. *BMC Genomics* **14**, doi:10.1186/1471-2164-14-386 (2013).
- 72 Qi, Z. T. *et al.* Targeting viperin improves diet-induced glucose intolerance but not adipose tissue inflammation. *Oncotarget* **8**, 101418-101436, doi:10.18632/oncotarget.20724 (2017).
- 73 Sivak, J. G., Yoshimura, M., Weerheim, J. & Dovrat, A. Effect of hydrogen peroxide, DL-propranolol, and prednisone on bovine lens optical function in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**, 954-963 (1990).
- 74 Sakai, H., Takata, K., Fukuda, M., Fujiwara, T. & Hirano, H. An improved fixation method for transmission electron microscopy for the histological study of the lens. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **68**, 295-298 (1991).

第 4 章 総括

2 章 | 酵母の蛍光タンパク質発現解析から系統樹作成まで含めた統括的な一細胞タイムラプス解析を精度よく自動で行えるようになった。当研究室において、一細胞タイムラプス解析は解析者に膨大な負担を強いていたが、これを大きく改善した。現在、本システムは酵母にしか対応していないが、他の細胞種にも拡張させていくことで、利便性を向上させていきたい。

3 章 | ラット糖白内障の発症にヒストンアセチル化が関与しているという新たな知見が得られた。さらに、エピジェネティックに制御される白内障原因遺伝子 *Plk3* を発見し、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) 阻害剤や *Plk3* 阻害剤の顕著な白濁形成阻止効果は、これらが新規白内障予防薬になり得る可能性を示した。しかし、*ex vivo* と *in vivo* の相関性は *Plk3* の発現増加でしか示せていない。HAT、*Plk3* 阻害剤の点眼実験によって生体でも予防効果があるか確認することが今後の課題である。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切な御指導、御鞭撻を賜りました内田博之教授、沖昌也教授、共同研究者である稲谷大教授、高村佳弘准教授、三宅誠司助教授、吉田俊之教授、井波真弓博士、釜田和馬博士、荻野裕平氏に厚く感謝の意を表します。

また、的確なアドバイスを下さった富山大学医学薬学研究部の甲斐田大輔准教授、DNA マイクロアレイ解析をサポートして下さった福井大学バイオ実験機器部門の柄谷和宏助教授、ソフトウェアのプログラミングを行って下さった吉田研究室の渡會晃平氏、吉村広幸氏その他お世話になった本研究室、吉田研究室の方々に深く感謝とお礼を申し上げます。

2020 年 3 月

福井大学大学院工学研究科 総合創成工学専攻
生物応用化学分野 生物化学研究室 金田文人