

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592027
 研究課題名（和文） ミッドカインとヘパリン結合性生理活性因子群による眼疾患の生理的・病的意義の解析
 研究課題名（英文） analyse the mechanisms of Midkine and heparin-binding growth factors in ophthalmic disease
 研究代表者
 行徳 雄二（GYOUTOKU YUJI）
 熊本大学・附属病院・助教
 研究者番号：10420639

研究成果の概要：

生理活性因子ミッドカインの発現を眼疾患および疾患モデルマウスで解析を行った。眼疾患ではミッドカインの発現は認められなかったが、レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルマウスの網膜組織ではレーザー照射後に一過性のミッドカインの発現上昇が認められた。

細胞外基質の1つヘパラン硫酸をノックアウトしたマウスでは、ヒトの発達緑内障に類似の発生異常が起こり、ヘパリン結合性生理活性因子の1つ TGF β 2 の情報伝達機能に異常を来していることが確認された。

神経保護作用を持つセリ科植物明日葉由来のカルコン類は、ラット網膜グリア細胞に作用し生体成分に発現変化を起こすことを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：(1) 眼科学 (2) 生理活性因子 (3) ミッドカイン (4) ストレス (5) 神経・組織保護 (6) プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

病的状態に置かれた生体において、多くの生理活性因子群がストレス応答の一形態として発現上昇し、組織の保護や再生に機能す

ることが報告されている。

眼科領域における生理活性因子研究については、LaVailらによりヘパリン結合型成長

因子の一つである bFGF が網膜変性モデル眼に対して神経保護効果を生じることを証明した研究が最初の報告として知られている。

我々の研究グループでは、グリア細胞系譜のミュラー細胞がストレス応答時に、GFAP の発現が上昇するとともに、CNTF などの神経栄養因子や神経保護効果を有する細胞外基質（プロテオグリカン）などが発現上昇すること、さらには、BDNF や、IL-6、LEDGF などの多様な生理活性因子が病的状態における発現変化や神経保護効果などについて解析してきた。

一方、ヘパリン結合型成長因子/分化誘導因子として同定されたミッドカインは、広汎な癌組織での発現上昇や、心筋梗塞およびラット中枢神経障害モデルにて発現上昇することが証明されている。即ちミッドカインは、病的状態に陥った組織のストレス応答として組織保護に或いは、組織の修復過程に作用することが示唆された。

眼科領域ではミッドカインの正常網膜における発現や、光網膜障害に対する光受容体保護効果が示されている。しかし、ミッドカインの眼組織における生理的機能解析や眼疾患における発現の解析については詳細な報告はなく、未だ不明な点が多いのが現状であった。

他方で、疾患の病因・病態には多くの生理活性因子・サイトカインが複雑に関連しあい病状を作り上げており、疾患を理解し薬物治療まで応用するには関連する全ての分子について解析が行われる必要がある。

ヘパリン結合性生理活性因子については現在までに十数種類に及ぶ分子が同定され、各々については様々な疾患に対する発現や機能解析が行われているが、一つの疾患に対して各分子を横断するような系統的な解析

は行われていないのが現状である。

これまで生体組織・臓器、或いは分泌物や細胞培養上清から特定の機能分子（蛋白質）の精製・単離には膨大な量の試料を準備する必要があった。また一度に扱える分子としても数個までが限界であった。それ故、臓器として小さく、大きく見積もってもせいぜい十数ミリリットルの大きさしかない眼球より、さらにはその内容物である房水、硝子体から機能分子を単離・同定することは難しく、報告のある房水・硝子体中の生理活性分子は、他の組織にて同定された既知の分子数個に対して ELISA 等の方法により測定されたものであり、系統的に解析された報告は少ない。しかし、二次元電気泳動装置の改良や高性能な質量分析装置の開発は、二次元泳動ゲル上のスポットの分離能、解像度を上げ、ナノグラム単位での分子の同定と試料中に含まれる多数の分子群の系統的な解析が可能となってきた。

2. 研究の目的

本研究は、ミッドカインの眼疾患および疾患モデルでの発現の比較を通して生理機能および病的意義の解析を行う。さらに、プロテオミクスの解析技術を用い、眼組織中に発現し病態によって増減するヘパリン結合型生理活性因子群のプロファイルを行う。

以上を通じて最終的には、ミッドカインを始めとするヘパリン結合性生理活性因子の眼疾患病態への関与を解明し、組織保護を通じた創薬を目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) 眼疾患におけるミッドカイン分子の同定

研究趣旨の同意を得た患者より、白内障および緑内障手術中に前房水を、また硝子体切

除術中に硝子体液を安全に採取した。各サンプルにおけるミッドカイン分子の同定をウェスタンブロット法により検討した。

(2) 病的モデル眼の作成とミッドカイン分子の発現

ミッドカインは従来神経保護作用があることが知られているが、近年血管新生における機能が、特に VEGF の拮抗分子となることが報告されている。マウス眼に網脈絡膜光凝固を行いレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを作製、経時的に全眼球、網膜、脈絡膜を採取し、ミッドカインの発現をウェスタンブロットにて確認した。

(3) 神経堤細胞分化に対するヘパリン結合性生理活性因子の影響

ヘパリン結合性生理活性因子は細胞膜上の特異的受容体に結合することで細胞内情報伝達が行われるが、生体内では細胞外マトリックスのプロテオグリカン類に蓄積された形で常在する。

プロテオグリカンの1つであるヘパラン硫酸の神経堤細胞特異的ノックアウトマウスを作成し表現型を解析した。口蓋裂、耳介奇形(図 1-B, D, F)などはヘパリン結合性生理活性因子の1つである TGF β 2 の欠損マウスに酷似しており、TGF β 2 との関連につき解析を進めた。

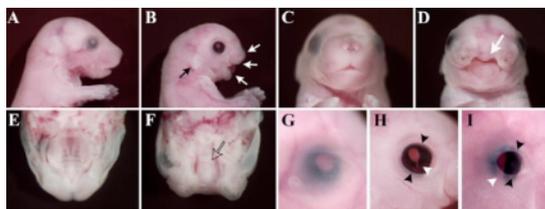


図 1: 神経堤細胞特異的にヘパラン硫酸遺伝子をノックアウトしたマウスの表現型

(4) カルコンによる神経保護作用の解析

セリ科植物明日葉より抽出された黄色物質カルコン類には、神経グリア細胞に働き神経保護作用を有することが知られている。カルコン類による網膜神経保護の可能性として、カルコンにより誘導される生体内生理活性因子の網羅的解析を行っている。網膜神経グリア細胞(ミュラー細胞)をラット眼球より単離後に、カルコン類添加の有無で培養を行った。培養上清中のタンパク質量の変動を解析、さらに幾つかの分子についてプロテオミクスの手法を用いて同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 患におけるミッドカイン分子の同定

白内障の前房水中、増殖疾患ではない黄斑円孔、網膜上膜などの硝子体液中からはミッドカインの同定は出来ていない。同様に現在までに増殖性糖尿病網膜症の硝子体液中でも同定は出来ていない。術中採取のサンプルでは希釈されている可能性もあり、今後は症例数を増やし解析を続けて行く予定である。

(2) 病的モデル眼の作成とミッドカイン分子の発現

ミッドカイン(MK)の発現は(図 2)網膜組織(R)にて照射1日目(1D)より増加し、3日目(3D)にピークとなり7日目(7D)までに漸減していた。しかし、脈絡膜組織(P)中での発現は何れの時点でも確認出来なかった。また相同分子であるプレイオトロフィン(PTN)の発現は網膜・脈絡膜どちらでも確認出来なかった。ミッドカインの網膜神経保護的な機能と共に、脈絡膜新生血管の発生にも作用する可能性が示唆された。

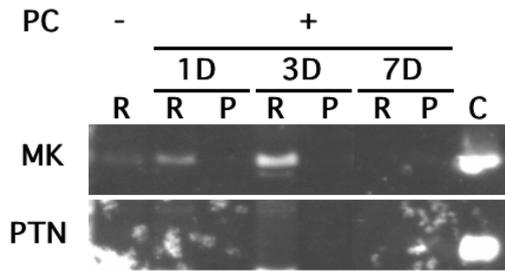


図 2：レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルにおけるミッドカインの発現

(3) 神経堤細胞分化に対するヘパリン結合性生理活性因子の影響

先の奇形に加え、眼組織では眼瞼欠損、虹彩欠損 (図 2-H, I)、隅角線維柱帯の奇形や角膜形成異常などヒトの発達緑内障に類似した発生異常を生じた (図 3-A, B)。

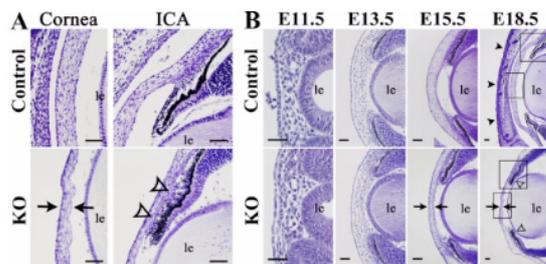


図 3：ヘパリン硫酸ノックアウトマウスではヒト発達緑内障に類似の眼発生異常が生じた

ヘパリン硫酸の欠損マウスの眼組織では、TGFβ2 の細胞内シグナル分子 SMAD のリン酸化が抑制されていること (図 4-A) や、TGFβ2 刺激による角膜組織でのコラーゲンの産生が著しく低下していることが確認された。また、ヘパリン硫酸の欠損した神経堤細胞を培養すると TGFβ2 による反応が低下していた (図 4-B)。さらに、TGFβ2 とヘパリン硫酸との相互作用を低下させると、隅角形成異常と眼圧上昇を合併する発達緑内障マウスが生まれた。

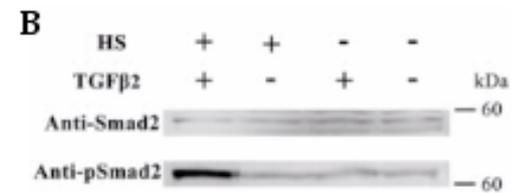
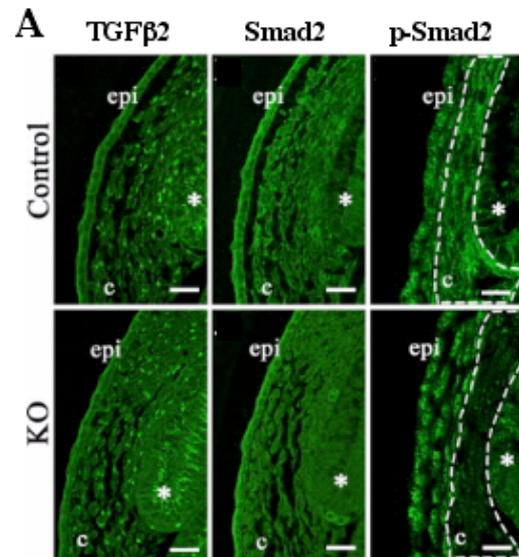


図 4：ヘパリン硫酸ノックアウトマウスでの TGFβ2 情報伝達系障害

即ちヘパリン硫酸と TGFβ2 の相互作用が神経堤細胞の分化、増殖に極めて重要であることが示された。

(4) カルコンによる神経保護作用の解析

カルコン類の添加によりミューラー細胞のタンパク質発現に増減が認められた (図 5)。この内増減が顕著なものにつき 5 個を選び、質量分析計を用いて同定を行ったところ、発現が減少する分子としてコラーゲン (D-1)、逆に増加を示す分子として tropomyosin (I-1)、Moesin (I-2)、Tpi I (I-3)、transgelin

(I-4) が同定された。

今後これら分子の増減の意義、機序につき解析を進めて行く予定である。

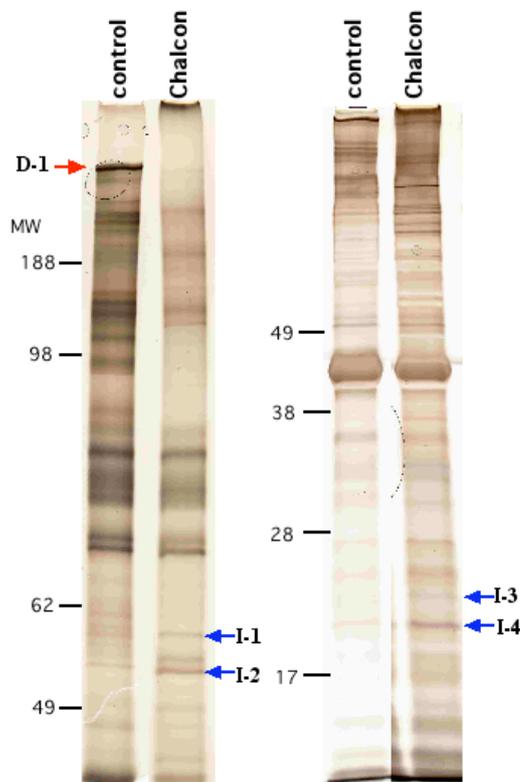


図 5 : カルコン類によるミュラー細胞のタンパク質発現変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①行徳 雄二、川路 隆博、谷原 秀信

内頸動脈無形成の合併で虹彩ルベオーシスを生じた虹彩角膜内皮症候群の一例

眼科、印刷中、査読無し

② Keiichiro Iwao, Masaru Inatani,

Yoshihiro Matsumoto, Minako Ogata-Iwao, Yuji Takihara, Fumitoshi Irie, Yu

Yamaguchi, Satoshi Okinami, Hidenobu Tanihara,

Heparan Sulfate Deficiency Leads to Peters' Anomaly in Mice by Disturbing Neural Crest TGFb2 Signaling

Journal of Clinical Investigation

印刷中、査読有り

③Iwao K, Inatani M, Okinami S, Tanihara H, Fate mapping of neural crest cells during eye development using a *Protein 0* promoter-driven transgenic technique Graefe ' s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 246, 1117-1122, 2008、査読有り

[学会発表] (計 2 件)

①Iwao K, Inatani M, Ogata-Iwao M, Okinami S, Tanihara H.

Heparan sulfate regulates Smad signaling in anterior ocular development.

The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology

2008 April 27-May 1, Fort Lauderdale, Florida, USA

②久高 久美子、行徳 雄二、小篠 史郎、谷原 秀信 : ミドリガメに関連した猫ひっかき病の一例

第 44 回日本眼感染症学会 東京 2007 年 7 月 6-8 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

行徳 雄二 (GYOUTOKU YUJI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 10420639

(2) 研究分担者

稲谷 大 (INATANI MASARU)

熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40335245

谷原 秀信 (TANIHARA HIDENOBU)
熊本大学・医学薬学研究部・教授
研究者番号：60217148

筒井 順一郎 (TSUTSUI JUNICHIRO)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：60264404