

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19679008

研究課題名（和文）ヘパラン硫酸による神経堤細胞の分化制御機構の解明と緑内障の新しい病態概念の確立

研究課題名（英文）Elucidation for the role of heparan sulfate in neural crest cell differentiation and establishment of a new concept for glaucoma pathogenesis

研究代表者

稲谷 大（MASARU INATANI）

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40335245

研究代表者の専門分野：緑内障

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼科学

1. 研究計画の概要

（1）隅角線維柱帯組織の機能低下は、眼圧を上昇させ、緑内障の病状を進行させる。隅角線維柱帯組織の構成成分であるヘパラン硫酸の隅角線維柱帯組織における役割を解明する。

（2）緑内障手術治療に対する手術補助薬としてのヘパラン硫酸の効果を検証する。

（3）隅角線維柱帯組織の発生に必須の分子を新たに同定する。

2. 研究の進捗状況

（1）隅角線維柱帯組織は発生学的に神経堤細胞に由来する。そこで、マウス発生段階における神経堤細胞でヘパラン硫酸の合成酵素 Ext1 の遺伝子をコンディショナルノックアウトさせた。そのマウスの神経堤細胞では、ヘパラン硫酸が欠損し、耳介奇形、口蓋裂、虹彩下方欠損、角膜内皮細胞欠損、角膜実質の菲薄化がみられ、隅角線維柱帯組織の形成不全を認めた。この表現型は、ヒトの発達緑内障の一病型である Peters 奇形に酷似していた。ノックアウトマウスの眼組織を免疫染色にて評価したところ、TGFβ₂ の細胞内の下流分子である Smad2 が不活化されていた。しかし、上流の TGFβ₂ の発現は正常であった。次に神経堤細胞を培養し、アデノウィルスベクターを用いて Ext1 を欠損させると、神経堤細胞表面のヘパラン硫酸の発現が欠損し、その細胞に TGFβ₂ 刺激を加えても細胞増殖が促進されず、細胞内の Smad2 も不活化されていた。さらに、TGFβ₂ とヘパラン硫酸との相互作用をマウス生体内で低下させると、隅角線維柱帯組織の奇形（シレム管の欠損、線維柱帯細胞の減少）がみられ、

高眼圧を呈する発達緑内障モデルが作成された。TGFβ₂ とヘパラン硫酸が結合することが ELISA 法にて確認できた。以上の結果は、神経堤細胞の分化制御において、細胞表面に発現するヘパラン硫酸が TGFβ₂ リガンドと受容体との結合反応もしくは細胞内へのシグナル伝達に極めて重要な分子であることを反映している（J Clin Invest 2009）。

（2）まず我々は、緑内障手術のうち世界で最も広くおこなわれている術式である線維柱帯切除術の手術成績を調査した。血管新生緑内障は予後不良な緑内障病型であり、その中でも特に過去の硝子体手術によって結膜に癒痕を伴う症例が予後不良であった（Am J Ophthalmol 2009）。原発開放隅角緑内障、落屑緑内障、ぶどう膜炎続発緑内障では、白内障手術の既往がある症例が予後不良という結果を得た。結膜の癒痕形成には TGFβ₂ や FGF、VEGF が関与しており、これらの成長因子はヘパラン硫酸結合分子である。我々は、様々なヘパラン硫酸結合分子の作用がヘパラン硫酸欠損マウスで障害されることを確認した（J Neurosci 2007）。このようなヘパラン硫酸による生理活性物質の作用調節機構は、術後の結膜癒痕形成に関わる成長因子の作用を抑えることにも応用できる。ラット眼に線維柱帯切除術を施行し、ヘパラン硫酸の発現を調節することによって、術後の結膜癒痕を抑制する効果と濾過胞維持効果を評価した。ラット眼では手術で作成した結膜濾過胞が自然経過で癒痕化し退縮していくが、ヘパラン硫酸と成長因子との相互作用を阻害することで、濾過胞維持が達成されることを確認した。以上の研究結果は、緑内障手術治療成績を飛躍的に改善する可能性

のある結果と考える。

(3) 柴犬の正常眼のゲノムサンプルと緑内障のゲノムサンプルを採取し、マイクロサテライトマーカーを用いて homozygosity mapping をおこなった。いとこ婚の犬から生まれた緑内障犬すべてにハプロタイプがホモで揃っている領域を同定した。さらに有意に連鎖不平衡がかたまっている領域を確認した。隅角線維柱帯組織の発生に關与する遺伝子が同定できる可能性がある。

3. 現在までの達成度

1 当初の計画以上に進展している。ヘパラン硫酸による神経堤細胞の分化制御機構が解明できただけでなく、細胞表面に発現するヘパラン硫酸は、TGFβ₂をはじめとした様々な生理活性物質が細胞に作用するために重要な因子であることを哺乳動物の生体内で証明した。さらに、線維柱帯切除術の結膜濾過胞の術後癒着、退縮に關連する生理活性物質の作用を抑制する治療戦略が新たに示された。以上の研究成果をまとめて、第113回日本眼科学会総会の評議員会指名講演にて約50分間の発表をおこない、多くの眼科研究者に研究成果を公開することができた。

4. 今後の研究の推進方策

ヘパラン硫酸による神経堤細胞の分化制御機構の解明に關しては研究目的は果たせた。今後、ヘパラン硫酸の生理活性物質に対する制御機構を応用した緑内障治療研究に重点を置いて研究を推進する。また、ゲノム解析によって得られた候補領域から、さらに候補遺伝子を絞り込んでいく。

5. 代表的な研究成果

(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11件、すべて査読有り)

1. Iwao K, Inatani M, et al. Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice by disturbing neural crest TGF-β₂ signaling. **Journal of Clinical Investigation** 2009;119:1997-2008.
2. Iwao K, Inatani M, et al. Heparan sulfate deficiency in periocular mesenchyme causes microphthalmia and ciliary body dysgenesis. **Experimental Eye Research** 2010;90:81-88.
3. Takihara Y, Inatani M, et al. Trabeculectomy with mitomycin C for neovascular glaucoma: Prognostic factors for surgical failure. **American Journal of Ophthalmology** 2009;147:912-918.
4. Iwao K, Inatani M, et al. Restricted post-trabeculectomy bleb formation by conjunctival scarring. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology** 2009;247:1095-1101.
5. Takihara Y, Inatani M, et al. Combined intravitreal bevacizumab and trabeculectomy with mitomycin C versus trabeculectomy with mitomycin C alone for neovascular glaucoma. **Journal of Glaucoma** In press.
6. Inatani M, Iwao K, et al. Intraocular pressure elevation after injection of triamcinolone acetonide: A multicenter retrospective case-control study. **American Journal of Ophthalmology** 2008;145:676-681.
7. Iwao K, Inatani M, et al. 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** 2008; 246:1117-1122.
8. Tanihara H, Inatani M, et al. Intraocular pressure-lowering effects and safety of topical administration of a selective ROCK inhibitor, SNJ-1656, in normal volunteers. **Archives of Ophthalmology** 2008;126:309-315.
9. Matsumoto Y, Irie F, Inatani M, et al. Netrin-1/DCC signaling in commissural axon guidance requires cell autonomous expression of heparan sulfate. **Journal of Neuroscience** 2007;27:4342-4350.
10. Iwao K, Inatani M, et al. Frequency and risk factors for intraocular pressure elevation after posterior sub-Tenon's capsule triamcinolone acetonide injection. **Journal of Glaucoma** 2007;16:251-256.
11. Tokushige H, Inatani M, et al. Effects of topical administration of Y-39983, a selective Rho-associated protein kinase inhibitor, on ocular tissues in rabbits and monkeys. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 2007;48:3216-3222.

[学会発表]

稲谷 大 眼発生の分子メカニズムの探究と眼疾患モデルへの展開 評議員会指名講演「眼疾患と動物モデル」第113回日本眼科学会総会 平成21年4月16日-19日 東京都

[その他]

(研究代表者の研究期間中における受賞歴)
Nakajima Award 2009
第13回 Rohto Award
第22回須田記念緑内障治療研究奨励基金
平成21年日本眼科学会評議員会賞
平成21年日本医師会医学研究助成

ホームページ

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ganka/kyousitu/staff.html#inatani>