

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：13401

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)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：40335245

研究成果の概要（和文）：

隅角線維柱帯組織の異常は緑内障を発症させる。隅角線維柱帯組織の構成成分であるヘパラン硫酸の役割を解明した。マウスでヘパラン硫酸が欠損すると神経堤細胞の分化が阻害され、緑内障を発症した。神経堤細胞の分化誘導における $TGF\beta_2$ シグナリングは、細胞表面に発現するヘパラン硫酸に依存していた。ヘパラン硫酸と $TGF\beta_2$ との相互作用を阻害する事で、線維芽細胞の活性化を抑制し、濾過手術の成績を動物眼で改善することができた。

研究成果の概要（英文）：

The anomaly of the anterior chamber angle causes glaucoma. We elucidated the role of heparan sulfate in the anterior chamber angle development. The deficiency of heparan sulfate disturbs the differentiation of neural crest cells, which causes glaucoma in mice. We revealed that $TGF\beta_2$ signaling in the differentiation of neural crest cells depends on the expression of heparan sulfate on the cell surface. We can inactivate fibroblasts by inhibiting the interaction between heparan sulfate and $TGF\beta_2$, which improves the surgical outcome of filtration surgery in glaucoma animal models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2008 年度	19,000,000	5,700,000	24,700,000
2009 年度	18,400,000	5,520,000	23,920,000
2011 年度	18,400,000	5,520,000	23,920,000
2012 年度	18,400,000	5,520,000	23,920,000
総計	88,100,000	26,430,000	114,530,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

緑内障による視神経障害の最も重要な因子は眼圧である。前房内に房水が滞留することで眼圧が上昇し、視神経が障害されることが緑内障発症機序の基本的な概念である。前

房は、発生学的に神経堤細胞によって構成される組織であり、神経堤細胞の分化に異常が生じると、房水の循環が妨げられ、緑内障が発症する。一方、緑内障眼の隅角組織には、細胞外マトリックスの異常発現が報告され

ており、神経堤細胞の分化には、細胞外マトリックスの発現が関わっていることも示唆されているが、その分子メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

ヘパラン硫酸は、線維柱帯組織に豊富に発現する細胞外マトリックスの一つであるため、神経堤細胞の分化に関連する分子である可能性を考えた。さらに、その分子メカニズムを明らかにすることによって、ヘパラン硫酸を介した緑内障治療戦略を検討した。

3. 研究の方法

ヘパラン硫酸合成酵素 *Ext1* の神経堤細胞選択的なコンディショナルノックアウトマウスを解析することによって、ヘパラン硫酸の神経堤細胞に対する役割と隅角線維柱帯組織発生のメカニズムを検証した。明らかにされたヘパラン硫酸の役割を利用し、緑内障治療に応用する研究をおこなった。緑内障手術（濾過手術）動物モデルを作成し、生体内のヘパラン硫酸の機能を制御し、その手術成績を改善する研究をおこなった。

4. 研究成果

Ext1 コンディショナルノックアウトマウスの顔面には口蓋裂、耳介奇形がみられた。これらの奇形の見られた組織は神経堤細胞により構成される組織である。眼には、角膜の菲薄化と隅角の形成不全がみられ、発達緑内障の一型である Peters 奇形に酷似していた（図1）。ヘパラン硫酸の欠損によって神



経堤細胞の $TGF\beta_2$ シグナリングが阻害されていた。 $TGF\beta_2$ とヘパラン硫酸が結合すること

を確認し、この結合が、神経堤細胞の $TGF\beta_2$ シグナリングに必要であることが示された。さらに、 $TGF\beta_2$ とヘパラン硫酸との相互作用を阻害することによって、隅角線維柱帯組織に奇形が生じ、緑内障モデルマウスが作成された（図2）。

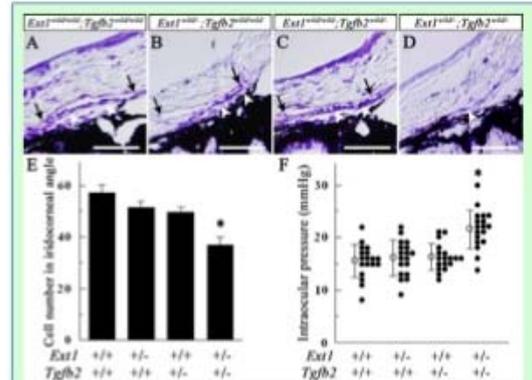


図2 $TGF\beta_2$ とヘパラン硫酸の相互作用阻害による緑内障モデルマウス。

野生型 (A)、 *Ext1* ヘテロ欠損マウス (B)、 *Tgfb2* ヘテロ欠損マウス (C) では隅角奇形はみられなかった。矢印はシュレム管、白矢頭は線維柱帯細胞。 *Ext1*、 *Tgfb2* ダブルヘテロ欠損マウス (D) では、シュレム管の欠損及び野生型と比較して線維柱帯細胞数の有意な (E, * $p < 0.01$) 減少がみられた。また、眼圧も有意に上昇した (F, * $p < 0.01$)。

ヘパラン硫酸とヘパラン硫酸に親和性を有する成長因子との相互作用を制御することによって、緑内障治療への応用をおこなった。濾過手術動物モデルを作成し、ヘパラン硫酸と成長因子との作用を阻害したところ、コントロールと比較して、有意に手術効果が改善した。さらに、線維芽細胞を培養し、細胞表面に発現するヘパラン硫酸を阻害したところ、成長因子に対する細胞応答が著しく抑制され、線維芽細胞の活性化が抑制された。

線維芽細胞の活性化が、濾過手術の成績を悪化させる因子であることを臨床試験であきらかにするために、結膜における手術痕によって線維芽細胞が活性化している緑内障患者と結膜に痕がなく内眼手術歴のない緑内障患者の手術成績を比較する臨床試験をおこなった。結膜に痕があり内眼手術歴のある緑内障患者群のほうが、濾過手術の成績が有意に悪いことがあきらかになった（図3）。さらに、緑内障患者の濾過手術直前に採取した前房水のタンパク組成をスクリーニングしたところ、多数の成長因子が内眼手術のある緑内障患者の前房水において、有意に発現上昇していた（図4）。成長因子による線維芽細胞の活性化に対してヘパラ

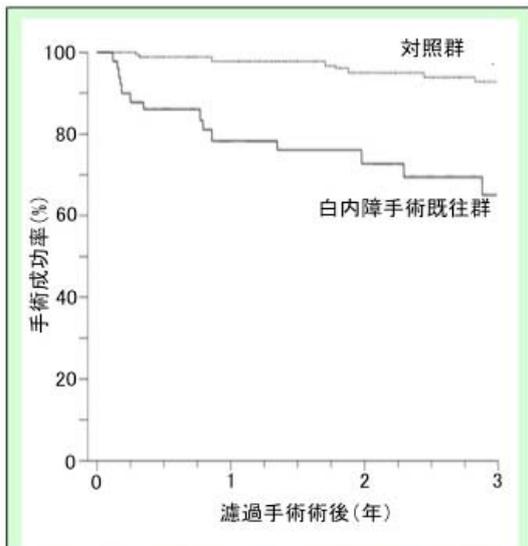


図3 トラベクトミーの術後成績比較
手術歴のない症例(対照群)よりも内眼手術である白内障手術の既往のなる症例(白内障手術既往群)の方が有意に($P<0.0001$)成績が悪い。

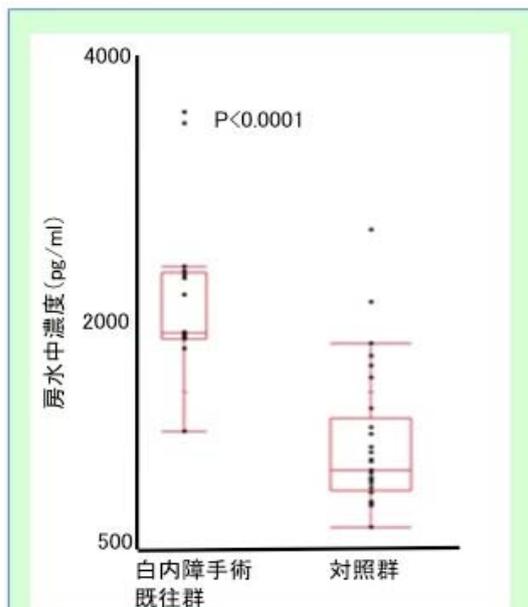


図4 房水中のタンパク組成の変化
白内障手術既往群では、前房水中の炎症性サイトカインの濃度が上昇している。

ン硫酸を阻害する事で、ヒトの緑内障手術治療の成績を改善させることが期待できる。

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 15 件) すべて査読有り。

- ① Kameda T, Inoue T, Inatani M, 9人3番目. The effect of Rho-associated protein kinase inhibitor on monkey Schlemm's canal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53:3092-3103. DOI:10.1167/iovs.11-8018
- ② Goto A, Inatani M, 8人2番目. Frequency and risk factors for neovascular glaucoma after vitrectomy in eyes with proliferative diabetic retinopathy. J Glaucoma In press.
- ③ Inoue T, Inatani M, 6人2番目. Simultaneous increases in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor of pseudophakic glaucomatous eyes. J Cataract Refract Surg In press.
- ④ Awai-Kasaoka N, Inoue T, Takihara Y, Kawaguchi A, Inatani M, 7人5番目. Impact of phacoemulsification on failure of trabeculectomy with mitomycin C. J Cataract Refract Surg 2012;38:419-424. DOI:10.1016/j.jcrs.2011.09.035
- ⑤ Takihara Y, Inatani M, 8人2番目. Trabeculectomy with mitomycin C for open-angle glaucoma in phakic eyes vs pseudophakic eyes after phacoemulsification. Arch Ophthalmol 2011;129:152-157. DOI:10.1001/archophthamol.2010.348
- ⑥ Iwao K, Inatani M, 17施設2番目. Success rates of trabeculectomy for steroid-induced glaucoma: a comparative, multicenter, retrospective, cohort study. Am J Ophthalmol 2011;151:1047-1056. DOI:10.1016/j.ajo.2010.11.028
- ⑦ Takihara Y, Inatani M, 7人2番目. Combined intravitreal bevacizumab and trabeculectomy with mitomycin C versus trabeculectomy with mitomycin C alone for neovascular glaucoma. J Glaucoma 2011;20:196-201. DOI:10.1097/IJG.0b013e3181d9ce12
- ⑧ Yamaguchi Y, Inatani M, 5人2番目. Role of heparan sulfate in mammalian brain development current views based on the findings from Ext1 conditional knockout studies. Prog Mol Biol Trans Sci 2010;93:133-152. DOI:10.1016/S1877-1173(10)93007-X

- ⑨ Iwao K, Inatani M, 9人2番目. Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice by disturbing neural crest TGF- β_2 signaling. J Clin Invest 2009;119:1997-2008. DOI:10.1172/JCI38519.
- ⑩ Takihara Y, Inatani M, 6人2番目. Trabeculectomy with mitomycin C for neovascular glaucoma: Prognostic factors for surgical failure. Am J Ophthalmol 2009;147:912-918. DOI:10.1016/j.ajo.2008.11.015
- ⑪ Iwao K, Inatani M, 5人2番目. Restricted post-trabeculectomy bleb formation by conjunctival scarring. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2009;247:1095-1101. DOI:10.1007/s00417-009-1051-4
- ⑫ Inatani M, 15人1番目. Intraocular pressure elevation after injection of triamcinolone acetonide: A multicenter retrospective case-control study. Am J Ophthalmol 2008;145:676-681. DOI:10.1016/j.ajo.2007.12.010
- ⑬ Tanihara H, Inatani M, 7人2番目. Intraocular pressure-lowering effects and safety of topical administration of a selective ROCK inhibitor, SNJ-1656, in normal volunteers. Arch Ophthalmol 2008;126:309-315. DOI:10.1001/archophthalmol.2007.76
- ⑭ Iwao K, Inatani M, 4人2番目. Fate mapping of neural crest cells during eye development using a *Protein 0* promoter-driven transgenic technique. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2008;246:1117-1122. DOI:10.1007/s00417-008-0845-0
- ⑮ Matsumoto Y, Irie F, Inatani M, 5人3番目. Netrin-1/DCC signaling in commissural axon guidance requires cell autonomous expression of heparan sulfate. J Neurosci 2007;27:4342-4350. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0700-07.2007

[学会発表] (計6件)

- ① Inatani M Aqueous humor composition of glaucoma patients. Blood flow and aqueous flow in glaucoma. World Glaucoma Congress 2011, Paris, France, 2011 July 1.

- ② Inatani M Potential new drugs acting on the conventional outflow system. The 25th APAO Congress- A Joint Meeting of APAO/AAO, Beijing, China, 2010 September 18.
- ③ Inatani M The molecular mechanism of optic nerve head formation: The essential role of heparan sulfate proteoglycans. The 25th APAO Congress- A Joint Meeting of APAO/AAO, Beijing, China, 2010 September 18.
- ④ Inatani M Heparan sulfate: the key regulator of optic nerve guidance. Nakajima Award Lecture APSEG-molecular pathology I APAO AAO Joint Congress, Bali, Indonesia, 2009 May 19.
- ⑤ Inatani M Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice, disturbing TGF- β_2 signaling in neural crest. The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2010 May 5.
- ⑥ 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 2009年4月18日 東京都

[図書] (計4件)

- ① 稲谷 大 日本眼科学会雑誌 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 2010;114:280-296. 日本眼科学会
- ② 稲谷 大 生化学 軸索ガイダンスにおけるヘパラン硫酸の役割 2011;83:224-230. 日本生化学会
- ③ 稲谷 大 臨床眼科 眼疾患の臨床と動物モデル 2010;64:1821-1825. 医学書院
- ④ 稲谷 大 他 実験医学 中枢神経発生におけるヘパラン硫酸の役割 2007;25:984-989. 羊土社

[その他]

ホームページ等
<http://ganka-fukuimed.jp/class/pages/kenkyu.html>
<http://ganka-fukuimed.jp/class/pages/gyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲谷 大 (MASARU INATANI)
 福井大学・医学部・教授
 研究者番号: 40335245