

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6月26日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：平成21～23年度

課題番号：21390471

研究課題名（和文）：緑内障マウスモデルの分子細胞生物学的解析

研究会題名（英文）：Characterization of mouse models for glaucoma

研究代表者：岩田 岳（Iwata Takeshi）

独立行政法人国立病院機構 東京医療センター（臨床研究センター）

分子細胞生物学研究部・部長

研究者番号：90374157

研究成果の概要（和文）：緑内障は遺伝、環境、習慣、加齢など複数の因子によって発症する多因子疾患と考えられているが、未だ発症機序については不明のままである。本研究は緑内障の発症に関係する4つの遺伝子（Optineurin、WDR36、Vav2、Vav3）を対象に、これらの遺伝子改変によって緑内障を発症するマウスを作製し、緑内障の発症機序を原因から表現型まで分子レベルでの解明を行った。

研究成果の概要（英文）：Glaucoma is a multifactorial disease influenced by genetic and environment factors. The molecular mechanism of the glaucoma onset still remains unclear. In this study we focused on 4 genes, optineurin, WDR36, vav2, and vav3 to develop and characterize the mouse model for glaucoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
22年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
23年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：緑内障、オプチニューリン、WDR36、Vav2、Vav3、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

緑内障は40歳以上の5.0%が罹患し、適切に治療されなければ失明に至る重篤な視機能障害をもたらす疾患である。視覚障害者の

24.8%が緑内障と診断されており、国内に250万人以上の患者が存在すると推定されている。緑内障は遺伝、環境、習慣、加齢など複数の因子によって発症する多因子疾患と考

えられているが、未だ発症機序については不明のままである。

2. 研究の目的

本研究は緑内障の発症に関係する4つの遺伝子 (Optineurin、WDR36、Vav2、Vav3) を対象に、これらの遺伝子改変によって緑内障を発症するマウスを作製し、緑内障の発症機序を原因から表現型まで分子レベルで詳細に解明することを目的とする

3. 研究の方法

OPTN の機能解析

我々は細胞内分子間結合実験によって正常 OPTN と Rab8 はゴルジ体上で相互作用して機能し、さらに OPTN E50K によって相互作用が消失することを明らかにした (Chi, Iwata et al, Hum Mol Genet 2010)。Rab8 がゴルジ体から細胞膜への小胞輸送、分泌に関与することから、OPTN E50K によって小胞輸送および分泌機能が障害されている可能性がある。

我々は COS 細胞、RGC 細胞、HEK293 細胞を使って正常 OPTN と OPTN E50K をそれぞれ発現させた細胞の分泌機能を分泌に優れた GFP-MYOC (ミオシリン分子) を使って培養液中の蛍光量で測定した。また、E50K に特異的に結合するタンパク質を探索するために免疫沈降と質量分析計によるプロテオーム解析を行った。結合タンパク質はトリプシン消化後、我々が所有する多次元液体クロマトグラフィー (Michrom BioResources 社 Paradigm) とイオントラップ型 MS/MS 質量分析計 (ThermoElectron 社 LCQ DECA XP Plus) によってタンパク質を同定する。

WDR36 の分子相互作用

WDR3 タンパク質ファミリーは転写や細胞周期など多岐にわたる細胞内の重要な機能を担っているが、WDR36 については核小体での機能が報告されているにすぎない (Hum Mol Genet 2008)。我々は WDR36 と細胞内で相互作用するタンパク質を同定し、OPTN と同様に遺伝子変異が及ぼす細胞内タンパク質間相互作用について検証する。WDR36 結合タンパク質の探索には GST-Pull Down Assay と質量分析計の組み合わせで行い、確認実験は水晶発振子 (株イニシウム)、を用いた。未知結合タンパク質の検索には Pull Down Assay 法あるいは His タグ WDR36 をそれぞれ細胞抽出液中でインキュベートし、結合タンパク質を Ni アフィニティーカラムによって分離した。細胞抽出液はヒト、サル、ブタの線維柱帯細胞、視神経乳頭のアストロサイト、そしてオリゴデンドロサイトから調製する。

WDR36 De1657-659 トランスジェニックマウスの網膜及び視神経乳頭の病理学的解析

WDR36De1657-659 は生後 48 週齢でまで周辺網膜の萎縮が進行する (Chi, Iwata et al, Hum Mol Genet 2010)。疾患個体の神経乳頭を含む網膜切片について各視神経細胞に対する特異的抗体を用いて神経乳頭を含む網膜の免疫染色を行う。抗体には抗 β Tubulin III 抗体や抗 Thy1 抗体による神経節細胞の染色、抗 GFAP 抗体によるアストロサイトの染色、そして抗 Vimentin 抗体によるミューラー細胞の染色を行い、疾患マウスにおける各細胞の状態を観察する。さらに疾患個体の網膜内の細胞層、神経乳頭における神経線維、細胞内の小胞体やゴルジ体などのオルガネラについて電子顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

開放隅角緑内障遺伝子オプチニューリン (OPTN) と WDR36 の変異体トランスジェニックマウスを作製し、それぞれのマウスについて、病理学的解析、分子レベルでの解析が行われた。両遺伝子がユビキタスに発現していることから、両トランスジェニックマウスはアクチンプロモーターを用いて作製された。OPTN マウスについては複数の変異体をそれぞれ発現するマウスが作製されたが、変異体 E50K のみに網膜の異常が観察された (Chi, Iwata et al. Hum Mol Genet 2010)。OPTN E50K マウスにおいて、生後 12 ヶ月から網膜視細胞から網膜神経節細胞までの全視神経細胞での萎縮、視神経繊維の菲薄化が観察された。眼球内においては網膜だけが障害されていた。また、細胞内分子間相互作用の実験によって正常 OPTN と Rab8 がゴルジ体上で相互作用し、OPTN E50K 変異体によって相互作用が消失することを明らかにした。Rab8 がゴルジ体から細胞膜への小胞輸送、分泌に関与することから、OPTN E50K によって小胞輸送および分泌機能が障害されている可能性がある。さらに E50K は Gain of function として変異体のみ結合するタンパク質があり、これを同定することに成功した (manuscript in preparation)。新たな結合タンパク質は OPTN を不安定にさせ、小胞体に正常な OPTN を巻き込んで蓄積することが明らかにされた。これらの原因は正常眼圧緑内障を分子レベルで解き明かす重要なデータと考えている。

同様な方法によって複数の WDR36 変異体を高発現するマウスを作製したが、3つのアミノ酸 605-607 を欠損する WDR36 を発現するマウスにおいて、最も重篤な網膜障害を観察した (Chi, Iwata et al. Hum Mol Genet 2010)。OPTN E50K マウスと同様に WDR36 Del605-607 マウスは網膜特異的に、そして周辺網膜に障

害が集中している。これまでに緑内障マウスとして報告されている DBA/2J マウスやミオシリン T437H 変異体と発現するとトランスジェニックマウスでは、何れも周辺網膜での障害が顕著である。我々の研究を含めると4つの例で緑内障における周辺網膜の障害が観察されたことになる。現在の技術において、緑内障患者の周辺網膜を詳しく観察することは難しいが、今後、光干渉断層撮影 (OCT) などの技術が改良されて周辺網膜の障害が診断されることを期待している。

最後に Vav2 と Vav3 のダブルノックアウトマウスを作製したところ、牛眼と高眼圧マウスの作製に成功した (Fujikawa, Iwata et al. PLOS One 2010)。このマウスは生後数か月で光彩が閉塞し、眼圧が急上昇することによって眼球の肥大および網膜の変性が観察された。

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 5 件)

Shen X, Ying H, Qiu Y, Park J-S, Shyam R, Chi Z-L, Iwata T, Yue BYJT. Processing of optineurin in neuronal cells. The Journal of Biological Chemistry 2011;286:3618-29

Hara K, Akahori M, Tanito M, Kaidzu S, Ohira A, Iwata T. Analysis of LOXL1 gene variants in Japanese patients with branch retinal vein occlusion. Molecular Vision 2011;17:3309-13

Fujikawa K, Iwata T, Inoue K, Akahori M, Kadotani H, Fukaya M, Watanabe M, Chang Q, Barnett EM, and Swat W. Vav2 and Vav3 as candidate disease gene for spontaneous glaucoma in mice and human. PLOS One 2010;5:e9050

Chi Z-L, Akahori, A, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T, Noda S, Sasaoka M, Shimazaki A, Takada Y, and Iwata T. Overexpression of *optineurin* E50K

disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive retinal degeneration in mice. Human Molecular Genetics 2010;19:2605-2615

Chi Z-L, Yasumoto F, Sergeev Y, Minami M, Obazawa M, Kimura I, Takada Y, and Iwata T. Mutant *WDR36* directly affects axon growth of retinal ganglion cells leading to progressive retinal degeneration in mice. Human Molecular Genetics 2010;19:3806-3815

[学会発表] (計8件)

I. Kimura, H. Okamoto, Z.-L. Chi, M. Akahori, M. T. Suzuki, T. Iwata. Analysis of Colocalization of Rab8 and ERM Family in the Ocular Body. Association for Research in Vision and Ophthalmology May 2010

T. Iwata, Z.-L. Chi, M. Akahori, Y. Takada, N. Nakaya, S. Tomarev, Y. Sergeev. CHARACTERIZATION OF GLIA CELLS IN OPTN AND WDR36 TRANSGENIC MICE 19th International Congress for Eye Research. July 2010

Chi ZL, Akahori M, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T, Noda S, Sasaoka M, Shimazaki A, Sergeev Y, Takada Y, Iwata T. Overexpression of mutant OPTN and WDR36 leads to a progressive retinal degeneration in mice. 50th American Society for Cell Biology. November 2010

Takeshi Iwata et al., Overexpression of Mutated Optineurin and WDR36 Leads to Normal Tension Glaucoma in Mice. Association for Research in Vision and Ophthalmology May 2009

岩田岳 他 遺伝情報を応用した病態解析とモデル作成 第113回日本眼科学会総会 4月 2009

池在龍 他 緑内障遺伝子WDR36トランスジェニックマウスの解析 第113回日本眼科学会総会 4月 2009

木村至 他 毛様体における Rab8 と ERM Family の局在についての検討 第113回日本眼科学会総会 4月 2009

Takeshi Iwata et al., Susceptibility genes and animal models of glaucoma. Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology. Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology January 2009

[図書] (計3件)

岩田岳, 「眼科と補体」、『補体への招待』木下タロウ編、189-193、メディカルビュー社 (2011)

岩田岳, 「視力・資格を司る黄斑の生理機能と黄斑変性の分子メカニズム」、『実験医学』、加我君孝編、526-532、羊土社 (2011)

岩田岳, 緑内障遺伝子改変動物の基礎、眼薬理 2009;23:67-70

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: 神経障害の検定のための組成物、キットおよび方法
発明者: 岩田岳
権利者: 国立病院機構東京医療センター
種類: 特願
番号: 2008-091522

出願年月日: 2008
国内外の別: 国内

名称: 代謝障害を伴う疾患の検定のための組成物、キットおよび方法
発明者: 岩田岳
権利者: 国立病院機構東京医療センター
種類: 特願
番号: 2008-091522
出願年月日: 2008
国内外の別: 国内

名称：緑内障のリスクの予測方法
発明者：岩田岳
権利者：国立病院機構東京医療センター
種類：特願
番号：2008-272161
出願年月日：2008
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.eye.go.jp>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者：岩田 岳 (Iwata Takeshi)
独立行政法人国立病院機構 東京医療センター（臨床研究センター）
分子細胞生物学研究部・部長
研究者番号：90374157
- (2) 連携研究者：溝田 淳 (Mizota Atsushi)
帝京大学・眼科学講座・教授
研究者番号：10239262