

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791693

研究課題名（和文） 線維柱帯の圧感受性と房水流出調節機構およびその緑内障病態との関連に関する研究

研究課題名（英文） Research for associations of tension-dependent aqueous outflow regulation by trabecular meshwork with glaucoma pathology.

研究代表者

井上 俊洋 （INOUE TOSHIHIRO）

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00317025

研究成果の概要（和文）：圧感受性に関わる因子を探索するために、線維柱帯細胞の3次元培養における加圧モデルを構築した。具体的には、コラーゲンと培地と細胞を混合した後にpHを変えることでゲル化させ、細胞をコラーゲン培地の中で3次元的に遊走・増殖させた後、このコラーゲン培地に重りを乗せることで全体を加圧し、細胞の変化を免疫染色にて観察した。共焦点顕微鏡を用いた観察によって、重合アクチンが減少することがみとめられた。アクチン重合阻害剤であるROCK阻害剤がヒトの眼圧を下降させることを考えると、この反応はROCK阻害剤の作用と同一のメカニズムをもって眼圧のホメオスターシスに寄与していると推測された。しかしながら3次元培養の細胞はタンパク質解析が困難であったため、我々は圧ストレスと酸化ストレスとに共通の細胞内反応が生じるのではないかという推測のもと、酸化ストレスを加えた後の線維柱帯細胞の反応を調べた。その結果、Akt-PI3Kシグナルやp38シグナルが活性化されることが分かった。さらにこれらのシグナルを阻害することで、酸化ストレスによる細胞死が促進されることを見出した。これらの結果はこれまでに報告されていない知見であり、圧に対応した線維柱帯細胞の生理的な房水流出調節機構の解明にむけて重要な手掛かりを得た。

研究成果の概要（英文）：To identify factors associated with the tension-dependency, we developed a pressure model by using three-dimension culture of trabecular meshwork cells. In this model, collagen, medium, and cells were mixed and then were stabilized by changing the pH. After letting cells migrate and proliferate in the model, the model was weighed, and cells in the model were observed by immunostaining. F-actin was found to be decreased by observation with the confocal microscopy. Considering ROCK inhibitors which decrease F-actin could lower intraocular pressure in human, we assumed that this response contributed to the homeostasis of intraocular pressure by using the same mechanism with ROCK inhibitors. It was difficult, however, to approach proteins in cells in the three-dimension culture. We therefore assessed the reaction of trabecular cells against oxidative stress, because we speculated that the intracellular reaction against pressure stress had similar aspects with that against oxidative stress. After exposure to oxidative stress, the Akt-PI3K signaling and the p38 signaling in the trabecular meshwork cells were revealed to be activated. Moreover, oxidative stress-induced cell death was enhanced by inhibiting these signalings. These novel findings provided us a valuable clue to understanding the mechanisms that regulate aqueous humor outflow.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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、緑内障、房水流出路、眼圧、線維柱帯

1. 研究開始当初の背景

房水流出路には圧依存性の経線維柱帯シュレム管経路と圧非依存性の経ぶどう膜強膜流出路がある。ヒトの場合前者が総房水流出量の約 80% を占め、緑内障における房水流出抵抗の増大もこの経路の異常によって生じる。線維柱帯は網の目状の細胞外マトリックスと、その中に存在する線維柱帯細胞によって構成されており、この線維柱帯は眼圧を感知し、これを一定に保つホメオスターシス反応に関わっていると推測されている (Brubaker. Surv Ophthalmol 2003)。この調節機能の破綻は眼圧上昇を伴う緑内障の病態と関連することが推測されるが、そのメカニズムの詳細はいまだ未解明であった。申請者が Duke 大学留学中に行った実験により、高眼圧灌流によって細胞骨格に関わるシグナル経路が修飾されることがわかった。ここで行われた実験において、ブタ眼を 15 ミリ水銀柱もしくは 50 ミリ水銀柱で 5 時間灌流して線維柱帯細胞の MLC リン酸化を比較したところ、後者における有意な低下が認められた。このことは線維柱帯が高い眼圧に反応して細胞骨格を変化させ、ROCK 阻害剤投与時と同様のメカニズムで房水流出を促進させている可能性を示唆していた。実際にこの時点における圧あたりの房水流出率を測定すると、50 ミリ水銀柱灌流の群でコントロールと比較して 30% 上昇していることが観察された ($p < 0.05$)。

2. 研究の目的

緑内障のリスクファクターである眼圧上昇は房水流出低下が主な原因である。房水流出路の一部を構成する線維柱帯は圧感受性組織であり、眼圧を一定に保つホメオスターシス反応に関わっていると考えられているが、そのメカニズムの詳細は明らかではない。本研究の目的は、房水流出率の測定を可能とする装置ならびに 3 次元培養による加圧モデルの確立と、それを用いた線維柱帯による眼圧調節メカニズムの解明である。本研究は眼生理学的な意義を持つに留まらず、眼圧調節メカニズムの破綻による高眼圧緑内障モデルの理解と、そのメカニズムに関わる因子をターゲットにした眼圧下降薬開発といった臨床医学にも貢献することが可能であると考えられる。

3. 研究の方法

まず初年度に房水流出率の測定を可能とする装置を確立し、これを用いて高眼圧還流時の線維柱帯細胞の変化、特に細胞骨格に関わる細胞内シグナル因子の変化を明らかにする。次に次年度に 3 次元培養による加圧モデルを確立し、これを用いて線維柱帯細胞を加圧し、その分子生物学的な手法を

用いて加圧に反応するタンパクを網羅的に検索し同定する。さらに同定したタンパクについて細胞内シグナルとの関連を検討し、可能であれば同定したタンパクの役割を調べ、圧感受性とそれに伴う房水流出調節メカニズムの解明を試みる予定である。

4. 研究成果

われわれは房水流出率の測定装置を確立し、さらに 3 次元培養による加圧モデル作成にも成功した。その結果、加圧によるアクチンの脱重合化が *in vitro* でも確認されたが、タンパク解析に至って、3 次元培養に使用したコラーゲンゲルがノイズを増加させるという限界も判明した。一方で線維柱帯細胞の細胞骨格成分は他の平滑筋細胞と類似しているが、ROCK 阻害剤に対する感受性は比較的高いことが最近の著者らの研究で分かった (Inoue et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010)。このことは線維柱帯が圧に敏感である可能性を示唆し、われわれの仮説を裏付けるものと考えている。

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 9 件)

1. Inoue T, Tanihara H. ROCK inhibitors: a novel approach to glaucoma therapy. Progress in Retinal and Eye Research, in press. 査読有。
2. Takihara Y, Inatani M, Hayashi H, Adachi N, Iwao K, Inoue T, Iwao M, Tanihara H. Dynamic Imaging of Axonal Transport in Living Retinal Ganglion Cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science, in press. 査読有。
3. Takihara Y, Inatani M, Seto T, Iwao K, Iwao M, Inoue T, Kasaoka N, Murakami A, Futa R, Tanihara H. Trabeculectomy with mitomycin C for open-angle glaucoma in phakic eyes vs pseudophakic eyes after phacoemulsification. Archives of Ophthalmology 129: 152-157, 2011. 査読有。
4. Inoue T, Pattabiraman PP, Epsteina DL, Rao PV. Effects of chemical inhibition of N-WASP, a critical regulator of actin polymerization on aqueous humor outflow through the conventional pathway. Experimental Eye Research 90: 360-367, 2010. 査読有。
5. Inoue T, Kagawa T, Inoue-Mochita M, Isono K, Ohtsu N, Nobuhisa I,

- Fukushima M, Tanihara H, Taga T. Involvement of the Hpk family in regulation of eyeball size, lens formation and retinal morphogenesis. *FEBS Letters* 584: 3233-3238, 2010. 査読有。
6. Inoue T, Malone P, Maddala R, Skiba N, Pattabiraman PP, Epsteina DL, Rao PV. Characterization of Cytoskeletons Enriched Protein Fraction of the Trabecular Meshwork and Ciliary Muscle Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51: 6461-6471, 2010. 査読有。
 7. Yoshinaga Y, Kagawa T, Shimizu T, Inoue T, Takada S, Kuratsu J, Taga T. Wnt3a promotes hippocampal neurogenesis by shortening cell cycle duration of neural progenitor cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30: 1049-1058, 2010. 査読有。
 8. 大平さおり, 稲谷大, 井上俊洋, 谷原秀信: 円蓋部基底結膜切開トラベクトミーを6時方向に施行した5眼の術後検討. *眼科* 52: 1835-1839, 2010. 査読有。
 9. Inoue-Mochita M, Inoue T, Epstein DL, Blumer KJ, Rao PV. RGS2-deficient mice exhibit decreased intraocular pressure and increased retinal ganglion cell survival. *Molecular Vision* 15:495-504, 2009. 査読有。

[学会発表] (計 28 件)

1. 井上俊洋, 稲谷大, 亀田隆範, 笠岡奈々子, 井上みゆき, 藤本智和, 吉村長久, 谷原秀信: 緑内障房水サンプルに対するサイトカインの多項目同時解析. (第64回日本臨床眼科学会、神戸国際会議場、神戸、平成22年11月11~14日)。
2. 笠岡奈々子, 井上俊洋, 川口淳, 瀧原祐史, 瀬戸孝彦, 稲谷大, 岩尾美奈子, 布田龍佑, 谷原秀信: 線維柱帯切除術後の白内障手術が眼圧経過に与える影響の検討. (第64回日本臨床眼科学会、神戸国際会議場、神戸、平成22年11月11~14日)。
3. 亀田隆範, 井上俊洋, 稲谷大, 中西秀樹, 赤木忠道, 豊川紀子, 熊谷京子, 西脇弘一, 黒田真一郎, 栗本康夫, 吉村長久, 谷原秀信: 原発隅角閉塞に対する白内障手術併用隅角癒着解離術における眼圧予後不良因子の検討. (第64回日本臨床眼科学会、神戸国際会議場、神戸、平成22年11月11~14日)。
4. 岩尾美奈子, 稲谷大, 瀧原祐史, 岩尾圭一郎, 井上俊洋, 笠岡奈々子, 谷原秀信:

- 開放隅角緑内障に対するトラベクトミーの術後早期前房内炎症の前向き調査. (第21回日本緑内障学会、アクロス福岡、福岡、平成22年9月24~26日)。
5. 井上俊洋: シンポジウム「緑内障薬物療法の科学」房水流出路の細胞骨格と眼圧依存性. (第21回日本緑内障学会、アクロス福岡、福岡、平成22年9月24~26日)。
 6. Inoue T, Inatani M, Tanihara H. The concentrations of MCP-1 and IL-8 are dependent on intraocular pressure in aqueous humor of cataract patients. 28th Congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons (September 4-8, 2010, Palais des Congres, Paris, France).
 7. Kameda T, Inoue T, Inatani M, Nakanishi H, Nakamura H, Yoshimura N, Akagi T, Nishiwaki H, Kumagai K, Kurimoto Y, Tanihara H. Risk factors of goniosynechialysis combined with phacoemulsification and intraocular lens implantation for treatment of primary angle closure. 28th Congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons (September 4-8, 2010, Palais des Congres, Paris, France).
 8. Kasaoka N, Inoue T, Takihara Y, Atsushi K, Inatani M, Iwao M, Tanihara H. The impact of PEA on failure of trabeculectomy with mitomycin C. 28th Congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons (September 4-8, 2010, Palais des Congres, Paris, France).
 9. 小島祥, 稲谷大, 井上俊洋, 谷原秀信: 外眼手術による結膜癒着のある症例への線維柱帯切除術の術後成績. (第80回九州眼科学会、ホテルマリターレ創世、佐賀、平成22年5月28~30日)。
 10. Eiki D, Inatani M, Inoue T, Kasaoka N, Takihara Y, Tanihara H. Intraocular Pressure Elevation After Intraocular Lens Suture Fixation for Ectopia of Crystalline or Intraocular Lenses. 2010 ARVO Annual Meeting (May 2-6, 2010, Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA).
 11. Tanaka A, Inatani M, Inoue T, Kasaoka N, Takihara Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. Risk Factors for Secondary Glaucoma After Vitrectomy for

- Proliferative Diabetic Retinopathy. 2010 ARVO Annual Meeting (May 2-6, 2010, Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA).
12. Takihara Y, Inatani M, Seto T, Iwao K, Iwao M, Inoue T, Kasaoka N, Murakami A, Futa R, Tanihara H. Trabeculectomy With Mitomycin C for Open-Angle Glaucoma in Phakic Eyes vs. Pseudophakic Eyes After Phacoemulsification. 2010 ARVO Annual Meeting (May 2-6, 2010, Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA).
 13. Kameda T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Fujimoto T, Kasaoka N, Yoshimura N, Tanihara H. Antioxidative Effect of Thymosin Beta 4 for Porcine Trabecular Meshwork. 2010 ARVO Annual Meeting (May 2-6, 2010, Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA).
 14. Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Inoue T, Ohtsu N, Kameda T, Kasaoka N, Kimoto K, Tanihara H. RhoA/ROCK Pathway Mediated the Expression of Type1 Collagen Induced by TGF- β 2 in Trabecular Meshwork Cells. 2010 ARVO Annual Meeting (May 2-6, 2010, Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA).
 15. Kasaoka N, Inoue T, Kameda T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. The Response to Trabecular Meshwork Cells for Oxidative Stress Mediated by Akt Activation. 2010 ARVO Annual Meeting (May 2-6, 2010, Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA).
 16. 井上俊洋, 藤本智和, 井上みゆき, 大津直樹, 亀田隆範, 笠岡奈々子, 木許賢一, 谷原秀信: 線維柱帯細胞の TGF- β 2 誘発コラーゲンタイプ 1 発現上昇における Rho/ROCK 経路の関与. (第 114 回日本眼科学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、平成 22 年 4 月 15 日~18 日) .
 17. 笠岡奈々子, 井上俊洋, 亀田隆範, 藤本智和, 井上みゆき, 谷原秀信: 酸化ストレスに対する Akt を介した線維柱帯細胞の反応. (第 114 回日本眼科学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、平成 22 年 4 月 15 日~18 日) .
 18. 亀田隆範, 井上俊洋, 井上みゆき, 笠岡奈々子, 藤本智和, 吉村長久, 谷原秀信: 線維柱帯細胞の酸化ストレスに対する thymosin beta 4 の抗酸化作用. (第 114 回日本眼科学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、平成 22 年 4 月 15 日~18 日) .
 19. 柴木大輔, 稲谷大, 井上俊洋, 笠岡奈々子, 瀧原祐史, 谷原秀信: 水晶体偏位と眼内レンズ偏位に対する眼内レンズ縫着術後の眼圧上昇. (第 114 回日本眼科学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、平成 22 年 4 月 15 日~18 日) .
 20. 瀧原祐史, 稲谷大, 瀬戸孝彦, 岩尾圭一郎, 岩尾美奈子, 井上俊洋, 笠岡奈々子, 村上晶, 布田龍佑, 谷原秀信: 開放隅角緑内障への線維柱帯切除術 有水晶体眼と超音波水晶体乳化吸引術既往眼の比較. (第 114 回日本眼科学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、平成 22 年 4 月 15 日~18 日) .
 21. 田中章子, 稲谷大, 井上俊洋, 笠岡奈々子, 瀧原祐史, 伊藤康裕, 福島美紀子, 谷原秀信: 硝子体切除術後に眼圧上昇を合併する増殖糖尿病網膜症の術前術中因子. (第 114 回日本眼科学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、平成 22 年 4 月 15 日~18 日) .
 22. 笠岡奈々子, 井上俊洋, 稲谷大, 瀧原祐史, 岩尾美奈子, 谷原秀信: 緑内障手術既往眼へのトラベクトミーの術後予後因子の検討. (第 20 回日本緑内障学会、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市、平成 21 年 11 月 13 日-15 日) .
 23. 井上俊洋, 稲谷大, 瀧原祐史, 笠岡奈々子, 岩尾美奈子, 谷原秀信: 硝子体切除術既往のあるトラベクトミー症例の予後因子の検討. (第 20 回日本緑内障学会、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市、平成 21 年 11 月 13 日-15 日) .
 24. 瀧原祐史, 稲谷大, 井上俊洋, 岩尾圭一郎, 岩尾美奈子, 笠岡奈々子, 谷原秀信: 血管新生緑内障に対する線維柱帯切除術予後不良群への術後ベバシズマブ硝子体内複数回投与の検討. (第 20 回日本緑内障学会、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市、平成 21 年 11 月 13 日-15 日) .
 25. 岩尾美奈子, 稲谷大, 瀧原祐史, 岩尾圭一郎, 井上俊洋, 笠岡奈々子, 谷原秀信: 開放隅角緑内障に対するトラベクトミー単独手術と白内障同時手術との前向き比較研究. (第 20 回日本緑内障学会、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市、平成 21 年 11 月 13 日-15 日) .

26. 大平さおり、稲谷大、井上俊洋、谷原秀信：円蓋部基底結膜切開トラベクレクトミーを6時方向に施行した5眼の術後検討。（第79回九州眼科学会、アクロス福岡、福岡市、平成21年5月29日-31日）。
27. 井上俊洋：「眼科治療のアップデート」房水流出路と眼圧下降治療薬。ー細胞骨格制御薬の作用。（第79回九州眼科学会、アクロス福岡、福岡市、平成21年5月29日-31日）。
28. 井上俊洋、井上みゆき、谷原秀信、Epstein DL、Rao PV：線維柱帯における細胞骨格関連タンパクのプロファイル。（第113回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム、東京都、平成21年4月16日-19日）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 俊洋 (INOUE TOSHIHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：00317025

(2) 研究分担者

()

研究者番号：