

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659755

研究課題名(和文)眼圧コントロール作用点の同定：高眼圧性疾患モデルマウスの原因分子Vavによる研究

研究課題名(英文)Identification of the target molecule to control the intraocular pressure: A study of Vav deficient mice with ocular hypertension

研究代表者

井上 馨 (Inoue, Kaoru)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：80133718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Vav遺伝子欠損マウスを用いて眼圧のコントロールに関する分子を同定する試みを行った。しかし、その分子を同定することは出来なかった。これは眼圧のコントロールメカニズムが我々の当初想定していたものより複雑であったためと考えられた。

これにより有用なことはVav遺伝子欠損マウスを用いて眼圧と網膜神経節細胞の関係を明らかにすることだと考えられた。その結果、緑内障を起こす網膜神経節細胞の細胞死は高眼圧の影響を受けるのみならず、それ以外の要因も存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify the target molecule to control the intraocular pressure (IOP) with Vav-deficient mice, lead to an ocular phenotype. However it failed to identify the specific molecule, because the molecular mechanism of intraocular pressure control is complicated more than our initial assumption.

Therefore we decided first to clarify the relationship between the intraocular pressure and the retinal ganglion cell (RGC) of Vav-deficient mice. As results, We demonstrate here Vav2,3 KO and Vav2 KO mice show not only the pressure-dependent RGCs death, but also under the normal IOP level, pressure-independent RGC death. It implies that Vav2,3 and Vav2 deficiency in mice may cause RGC death apart from that of pressure insult.

研究分野：解剖学

キーワード：緑内障 高眼圧モデル動物 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) Vav 分子は、1981 年に発見されて以来、分化・増殖・発生などヒトの生命機能の基本的働きに関わる重要な分子として、欧米で研究されてきた。免疫に関わる Vav1 と神経系などにかかわる Vav2、Vav3 の 3 分子が Vav ファミリー分子として発見された。われわれも 1996 年から Vav3 新規遺伝子を世界で初めてクローニングし、その遺伝子欠損マウスを作成して Vav 分子の生体内の機能をアメリカ合衆国との共同研究にて検討してきた。Vav 分子は細胞骨格系に關与する必須な分子であり、RhoA などの RhoGTPases を制御する分子として知られている。Vav 分子は細胞内のシグナル伝達分子であるため、われわれの NK 細胞の研究では、Vav の作用機序を明らかにするため、イーストツーハイブリッドシステムを用いて相互作用する分子(作用点)を同定し、NK 細胞での抗腫瘍効果のあらたなメカニズムのブレークスルーとして報告した。(文献 1)

(2) われわれは、Vav 分子が眼組織に発現し、大きな役割を担っていることを発見した。Vav2 分子と Vav3 分子を欠損したマウスでは高眼圧を自然発症し、その後 RGC の欠損・乳頭陥凹といったヒト緑内障病変を表現型として示す。またヒト単塩基多型解析にて Vav2、Vav3 分子の緑内障疾患関連性を認めた。これまで Vav において行われてきた免疫系細胞研究と、眼組織系研究では研究方法に違いがあるとしても、細胞内の分子機序の解析では共通のシステムがあることが推察される。

(3) 現在、ヒトの病態の解析では、使える方法が限られているのが現状である。ヒトの遺伝子解析から、病態に關与する分子を捜していくことは有用ではあるが、本研究においてわれわれが提案する、疾患モデル動物における原因分子から病態の作用点を同定していく、眼組織機能へのアプローチも、疾患の病態解明・治療のために必要な研究である。

2. 研究の目的

(1) ヒト緑内障の発症機序については、眼圧の上昇の關与は疑いがなく、また治療上の観点からも、眼圧のコントロールを可能とする分子レベルでの眼圧上昇機序を明らかにする研究は大きな意義がある。われわれは、自然発症的に高眼圧を示すヒト緑内障のモデルとなる Vav 分子欠損マウスの表現型を報告した(文献 2)。今回は、Vav 分子がどのようにして眼圧上昇と RGC の欠損過程に關与しているかを、Vav 分子を手がかりにして分子レベルで解明する。イーストツーハイブリッドシステムを利用して作用する分子を同定し、そこから眼圧上昇にはどの情報伝達経路が關与しているのか、切り口を発見したい。マウスにおいて眼圧コントロールに關

与する分子を同定することで、ヒトでの高眼圧病態のブレークスルーが起ることを確信している。

3. 研究の方法

(1) マウスに眼圧上昇を生じさせる Vav2、Vav3 分子の眼組織での作用点となりうる分子を、タンパク・タンパク相互作用点の同定のため利用されるイーストツーハイブリッドシステム(YTH)によって、クローニングする。

(2) 眼圧をコントロールしている情報伝達経路は、分子の關与を示唆する報告はあるが、まだ未知である。そのため、眼圧コントロールに關与している分子として、YTH からのデータを解釈するため、いくつかの分子生物学的・組織学的・細胞学的検討を行う。

(3) これらの検証のため、眼圧上昇している Vav2/Vav3 欠損マウスに発現している遺伝子とコントロールマウス(眼圧は正常範囲)に発現している遺伝子の増減を検討するため cDNA サブストラクション方法、クローニングされた分子の、眼組織での局在などの組織学的検討など行う。

(4) Vav2/Vav3 欠損マウスと CFP マウスを交配して高眼圧を呈して RGC 数が定量的に計測できる CFP/Vav マウスを作成した。これを用いて眼圧と RGC の関係を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 2012 年度は、その欠失によって高眼圧マウスモデルを自然発症するシグナル分子 Vav と会合する分子を検討することによって、眼圧上昇の分子メカニズムの解明に近づくため、Yeast Hybrid System(イーストハイブリッドシステム)による Vav 分子への相互作用分子のスクリーニングと、マイクロアレイ法などによる Vav 分子の欠失により動く分子を検索することによる、眼圧上昇にどのシグナル経路が關与しているかを検討することがおもな研究課題であった。

イーストツーハイブリッドシステムの構築について：

cDNA ライブラリーを C57BL/6J 正常マウスの眼球組織(隅角部)より作成した。それに、以前作成した Vav3 分子と Vav2 分子の cDNA 部分をサブクローニングして作成したパイプラスミドを使用してパイロットスタディを行った。その結果 Vav2、Vav3 とともに非特異的な反応が強すぎるため、スクリーニングの系として使えないことが判明した。

關わるシグナル経路の検討：

正常マウス(C57BL/6J)と Vav2/3KO マウスからそれぞれ眼組織の隅角部分を取り出し、RNA を抽出して逆転写酵素により組織特異的な cDNA ライブラリーを作成した。この二つのライブラリーを比較して動いている分子群を判定したが、特異性のある分子は同定できなかった。

(2) Vav マウス眼圧の詳細：シグナル分子に特異性が認められなかったのは、緑内障の発症が多因子により複雑な経過をたどって起こることによると考えられたため、眼圧コントロールの作用点を同定するためには眼圧と RGC の関係を詳細に明らかにした。

眼圧上昇の時間的な変化：Vav2/3, KO, Vav2KO、野生型 (WT) マウスでの眼圧上昇は生後 6 週から始まり、少なくとも 28 週までは継続した(図 1)。

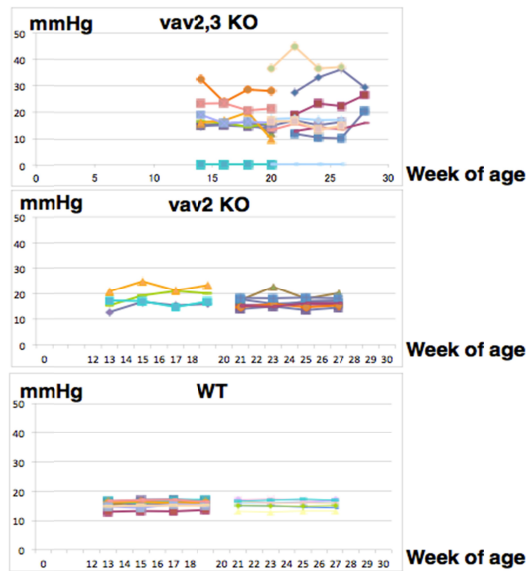


図 1

Vav マウス眼圧の日内変動：日内変動 Vav マウスでも WT マウスと同様に見られ、その振幅は WT より大きかった(図 2)。

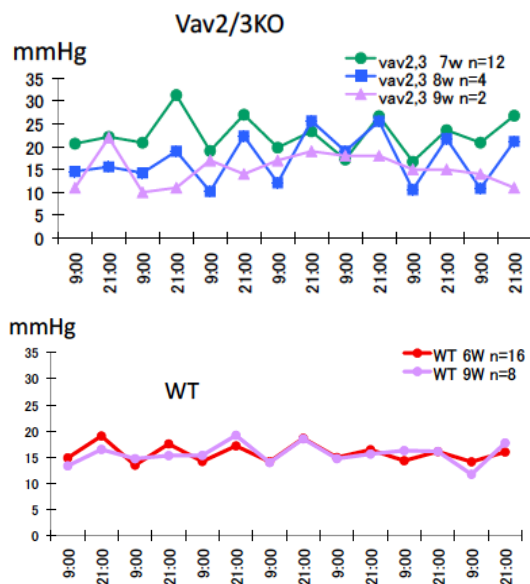


図 2

(3) 眼圧と RGC 数との関係

CFP/Vav マウスを用いて眼圧をマイクロニードル法で計測し、RGC 数を網膜フラットマウンテン法で計測した

正常眼圧群と高眼圧群：WT の平均眼圧 \pm 2 SD を正常眼圧範囲と定めた。Vav マウスのうち正常眼圧範囲内にある眼を正常眼圧群、正常眼圧範囲より高い眼圧を呈する眼を高眼圧群とした(図 3)。

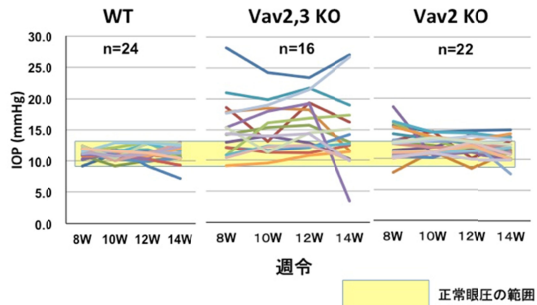


図 3

正常眼圧群の RGC 数：生後 15 週での RGC 数は WT に比較して Vav2,3KO で 79%, Vav2KO で 93% となり、ともに有意に減少していた(図 4)。

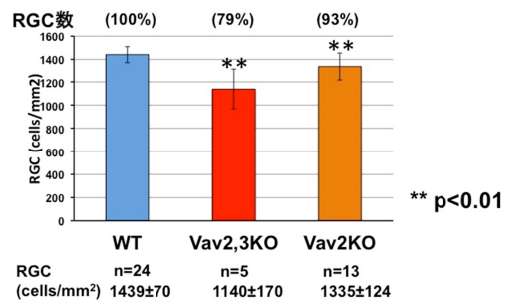


図 4

高眼圧群の眼圧と RGC 数：高眼圧群では平均眼圧は WT に比較して Vav2,3KO では 139%、Vav2KO では 110% と増加した。RGC 数は正常眼圧群と同様の傾向で減少した。しかし減少の程度は高眼圧群の方が大きかった(図 5)。

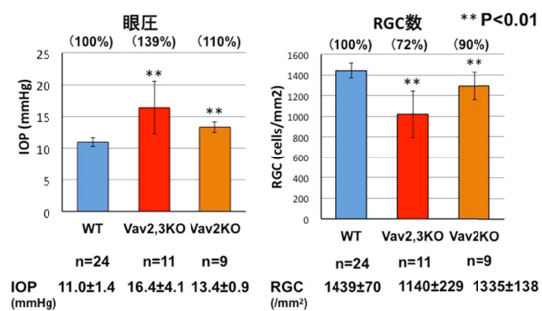


図 5

眼圧と RGC 数の相関：眼圧と RGC 数との間の相関係数を求めた。有意な相関が認められたのは、Vav2,3KO 全体の場合のみであった ($r = -0.55$)。正常眼圧群および高眼圧群、さらに WT 全体、Vav2KO 全体にも有意な相関はみられなかった(図 6)。

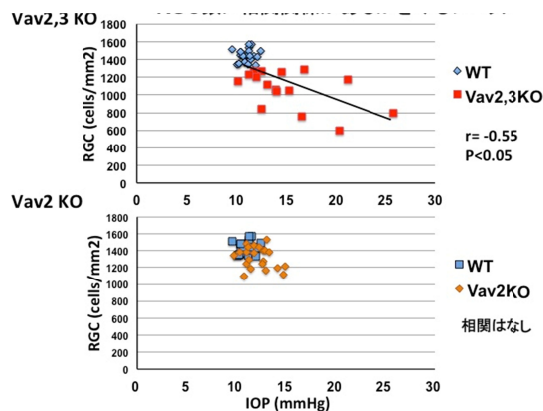


図 6

結論

高眼圧の影響で RGC 数は減少する
 正常眼圧であっても Vav2,3KO, Vav2KO は RGC 減少を示す
 RGC の減少を起こすのは高眼圧に加えて、そのほかの要因があることが明らかになった

結論を踏まえたこれからの緑内障の作用点同定の方策：

眼圧の日内変動などの眼圧制御機構を眼房水の産生機構と流出路バランスを検討し、そこに関与する分子の同定
 RGC の脆弱性に直接関与する分子の同定
 眼圧の影響を直接受ける視神経乳頭部の組織構造に関する分子の同定
 線維柱帯の圧受容器に関係する分子の同定

< 引用文献 >

M.Cella, K.Fujikawa, I.Tassi, S.Kim, K.Latinis, S.Nishi, W.Yokoyama, M.Colona, W.Swat: Differential requirements of Vav protein in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine* 200 (6): 817-823, 2004.

K.Fujikawa, T.Iwata, K.Inoue, M.Akahori, H.Kadotani, M.Fukaya, M.Watanabe, Q.Chang, E.M.Barnett, W.Swat: VAV2 and VAV3 as candidate disease genes for spontaneous glaucoma in mice and humans. *PLoS ONE* 5(2): e9050.2010.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 5 件)

Fujikawa K, Inoue K, Koshiyama T, Yamagishi R, Aihara M: Characterization of RGC death in Rho-GTPases activating proteins Vav proteins, deficient mice. 2015 ARVO, Denver (USA). 2015 May 3-9.

藤川恵子、井上馨、越山隆恵、山岸麗子、相原 一：Rho GTPase 活性化分子 Vav2,3 欠損マウスにみられる RGC 障害の検討、第 119 回

日本眼科学会(ロイトン札幌、札幌市) 2015 年 4 月 16 日-19 日

Fujikawa K, Inoue K, Koshiyama T, Yamagishi R, Aihara M: Characterization of CFP-expressed Vav2-deficient mice with spontaneous IOP elevation to evaluate pressure-dependent RGC death, 2014 ARVO, Orlando (USA). 2014 May 4-8.

藤川恵子、井上馨、越山隆恵、山岸麗子、相原 一：Vav2 欠損 CFP 発現遺伝子改変マウスを用いた眼圧の影響と RGC 障害の解析、第 118 回日本眼科学会(東京国際フォーラム、東京都) 2014 年 4 月 2 日-6 日

藤川恵子、井上馨、越山隆恵、相原一、山岸麗子：自然発症高眼圧を呈する V a v 遺伝子欠損マウスの眼圧の特徴。第 117 回日本眼科学会(東京国際フォーラム、東京都)2013 年 4 月 4 日-7 日

[ホームページ等]

「アイの広場」

<http://www.hs.hokudai.ac.jp/vision/>

(2014 年 5 月)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 馨 (INOUE, Kaoru)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授
 研究者番号：8 0 1 3 3 7 1 8

(2)研究分担者

藤川 恵子 (FUJIKAWA, Keiko)

北海道大学・大学院保健科学研究院・客員
 研究員
 研究者番号：7 0 3 7 4 2 4 6

相原 一 (AIHARA, Makoto)

東京医科歯科大学・医学部付属病院・特任
 教授
 研究者番号：8 0 2 2 2 4 6 2

朝岡 亮 (ASAOKA, Ryou)

東京大学・医学部付属病院・講師
 研究者番号：0 0 3 6 2 2 0 2