

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～ 2011

課題番号：21592239

研究課題名（和文） ステロイド緑内障におけるエピジェネティック因子の解析

研究課題名（英文） Investigation of epigenetic factors in the pathogenesis of glucocorticoid-induced glaucoma

## 研究代表者

松田 彰（ MATSUDA AKIRA ）

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00312348

研究成果の概要（和文）：ヒト培養線維柱帯細胞をデキサメサゾン添加状態で2週間培養しメチル化状態の変化をメチル化アレイにより網羅的に解析した。その結果有意にメチル化状態が変化した23遺伝子を検出した。それらの遺伝子のうち、R I C S, R G S 6, G P R 1 2 6 遺伝子の機能解析を施行した。その結果、ゲノムのメチル化状態の変化が単純な遺伝子発現の量的な調節にとどまらず、mRNAのスプライシングなど、遺伝子発現の質的な変化にも関係していることを示唆する所見を得た。

研究成果の概要（英文）：The effects for dexamethasone (DEX) treatment for the genomic methylation status of human trabecular meshwork cells were analyzed by whole genome methylation array analysis. DEX treatment changed the expression level of 23 genes significantly. We analyzed the functional effect of genomic methylation/demethylation of RICS, RGS6 and GPR126 and found that the change of methylation status did affect not only the quantitative expression level but also qualitative expression pattern like the change of mRNA splicing.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼生化学、分子生物学

キーワード：エピジェネティクス、緑内障、ステロイド、ゲノム、遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

ステロイド緑内障の病態生理には、細胞外マトリックスの沈着説、プロテアーゼの活性低下説、線維柱帯細胞による貪食能の低

下説などがあるものの、いまだに不明な点が多い。多くのグループからデキサメサゾン刺激培養線維柱帯（TM）細胞の遺伝子発現の網羅的解析結果が報告されているが、

経時的な遺伝子発現量の変化に関しては不明であり、それぞれの報告の結果にもばらつきが見られる。グルココルチコイドの作用点は細胞核内にある受容体であり、種々の遺伝子の転写活性に影響を与えている。また、一般的に遺伝子の転写活性はプロモーター領域のメチル化によって調節を受けているが、最近グルココルチコイド刺激により、転写調節領域の脱メチル化が誘導される例が報告された。

松田は理研遺伝子多型センターにおいて、候補遺伝子アプローチにより検出した疾患関連遺伝子が、ゲノムワイド患者対照相関研究(GWAS)では検出されない例を多く経験した。実際に種々の疾病における遺伝的素因は SNP のみでなく、コピー数多型、エピジェネティック制御等も関係していることが最近報告されており、GWAS は万能ではない。最近精神疾患の発症に MEK1 遺伝子プロモーター領域のゲノムのメチル化状態が関連することや、SNP とメチル化状態に相関が見られることが報告された。このような学術的背景から、TM 細胞における長期のグルココルチコイド刺激による遺伝子発現の変化には、元々のグルココルチコイド受容体を介した転写調節メカニズムに加えて、ゲノムのメチル化といったエピゲノムレベルでの転写調節が関与しているのではないかという着想を得た。ステロイド投与後の眼圧上昇には長期間のステロイド投与が必要な例が多いことやステロイド中止で急激に眼圧が正常化する例が多く見られることは、エピゲノムレベルでメチル化あるいは脱メチル化が起こった後にステロイド緑内障関連遺伝子の転写スイッチにおいて on/off が起こると我々の仮説を支持するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

ステロイド緑内障は50年以上前からその存在が報告され、種々の臨床研究および基礎研究が施行されてきたが、いまだ明確な発症機序は判明しておらず、遺伝的素因の関与も依然不明のままである。アトピー素因に伴う眼合併症や角膜移植後には長期間のステロイド点眼が避けられず、特にハイリスク角膜移植後にはステロイド緑内障が原因となって失明する場合も多い。本研究ではステロイド剤の使用時に眼圧が上昇するいわゆるステロイドレスポンスおよびステロイド緑内障の遺伝的背景を明らかにし、ステロイド剤の投与時におけるリスク評価に役立てること、しいてはステロイド緑内障の発症予防法を確立することを目標とする。

## 3. 研究の方法

ステロイド緑内障発症関連遺伝子の発見のために、1. TM 細胞のステロイド投与の前後で、転写調節領域配列におけるメチル化状態が変化する遺伝子をクロマチン免疫沈降法により網羅的に検出し、2. それらの結果から、患者対照相関研究を施行して、3. 有意な相関を認めた遺伝子上の多型の機能解析を施行する。1. の解析結果から、多数の遺伝子プロモーター領域におけるゲノムメチル化状態の変化が検出されると予想されるが、その結果から、遺伝子転写のスイッチ制御がなされた場合にステロイド緑内障の発症に機能的に関連すると考えられる遺伝子領域について優先的に Bisulfite シークエンスでのメチル化状態の確認と TM 細胞でのデキサメサゾンによる遺伝子発現誘導を経時的に検証する。2 に関しては、候補遺伝子における多型をリシークエンスにより SNP にこだわらず検出した上で、イルミナカスタムチップによるジェノタイピングを施行する。3 については、レポータージーン解析、mRNA の安定性解析、リコンビナントタンパクを用いた機能解析を施行する。

## 4. 研究成果

ヒト培養線維柱帯細胞をデキサメサゾン添加状態で2週間培養しメチル化状態の変化をイルミナ社製メチル化アレイを用いて網羅的に解析した。その結果有意にメチル化状態が変化した23遺伝子を検出した。それらの遺伝子のうち、R I C S, R G S 6, G P R 1 2 6 遺伝子の機能解析を施行した。G T P a s e 調節因子である R I C S は、デキサメサゾン添加により遺伝子のエクソン部位にメチル化が生じ、その発現量が減少していることが判明した。また7回膜通過型受容体である G P R 1 2 6 遺伝子は、デキサメサゾン添加により遺伝子のエクソン部位に脱メチル化が生じ、

その発現量が減少していることが判明した。さらにGTPase活性化因子であるRICSはCpGサイトがアイソフォーム1 特異的エクソン上に存在し、エクソン上のCpGサイトのゲノムメチル化がスプライシングに影響し、RICSアイソフォーム1の発現量がデキサメサゾン添加により減少することを発見した。このことはヒト培養線維柱帯細胞のデキサメサゾン添加によるゲノムのメチル化状態の変化が単純な遺伝子発現の量的な調節にとどまらず、mRNAのスプライシングなど、遺伝子発現の質的な変化にも関係していることを示唆する所見と考える。

さらに、ゲノムのメチル化と合わせて他のエピジェネティクス因子であるヒストンのアセチル化の影響を調べるため、あらかじめデキサメサゾン処理した培養線維柱帯細胞を脱アセチル化剤であるTSAと24時間反応させ、デキサメサゾン未処理のサンプルと合わせてデキサメサゾンの影響によるヒストンアセチル化によってその発現に影響を受ける遺伝子を網羅的に解析した。その結果組織の線維化に影響するフィブリノーゲン遺伝子がヒストンアセチル化により制御されていることを発見し、現在その機能的意義を解析中である。現在これらの結果から得られたステロイド緑内障発症とエピジェネティクスの影響に関連する遺伝子群について、組織学的な解析および遺伝子多型の影響を検討中である。また、ゲノムメチル化、アセチル化の解析結果を投稿準備中である。

#### 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8件)

1. Hori K, Matsuda A, Ebihara N, Imai K, Mori K, Funaki T, Watanabe Y, Nakatani S, Okada K, Matsuo O, Murakami A. Involvement of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in the Pathogenesis of Atopic Cataracts. Invest Ophthalmol Vis Sci. in Press 査読有
2. Inomata T, Ebihara N, Funaki T, Matsuda A, Watanabe Y, Ning L, Xu Z, Murakami A, Arikawa-Hirasawa A. Perlecan-Deficient Mutation Impairs Corneal Epithelial Structure. Invest Ophthalmol Vis Sci. in Press 査読有
3. Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, Matsuda H and Murakami A. Role of the IL-6 classic and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci. in Press 査読有
4. Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Maruyama K, Hamuro J, Kinoshita S, Murakami A. Lymphoid neogenesis in the giant papillae of patients with chronic allergic conjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 2010; 126:1310-1312 査読有
5. Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Okayama Y, Watanabe Y, Kawasaki S, Tanioka H, Walls AF, Hamuro J, Kinoshita S, Murakami A. Basophils in the giant papillae of chronic allergic keratoconjunctivitis. Br J Ophthalmol 2010; 94 :513-518 査読有
6. Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Kawasaki S, Tanioka H, Inatomi T, de Waal Malefyt R, Hamuro J, Kinoshita S, Murakami A. Functional Roles of Thymic Stromal Lymphopoietin for Chronic Allergic Keratoconjunctivitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010; 51:151-155 査読有
7. Nakano M, Ikeda Y, Taniguchi T, Yagi T, Fuwa M, Omi N, Tokuda Y, Tanaka M, Yoshii K, Kageyama M, Naruse S, Matsuda A, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K. Three

susceptible loci associated with primary-open angle glaucoma identified by genome-wide association study in Japanese population. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106:12838-12842 査読有

8. Matsuda A, Okayama Y, Terai N, Yokoi N, Ebihara N, Tanioka H, Kawasaki S, Inatomi T, Katoh N, Ueda E, Hamuro J, Murakami A, Kinoshita S. The Role of Interleukin-33 in Chronic Allergic Conjunctivitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009; 50:4646-4652 査読有

〔学会発表〕(計2件)

① 松田 彰、海老原 伸行、村上 晶  
Th2サイトカイン環境は結膜繊維芽細胞の  
コラーゲンゲル収縮能を増加させる  
第20回日本緑内障学会、2009年11月14  
日、沖縄

②松田 彰、海老原 伸行、村上 晶  
デキサメサゾンによるヒト培養線維柱帯細  
胞のゲノムメチル化状態の変化  
第21回日本緑内障学会、2010年9月24日、  
福岡

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松田 彰 (MATSUDA AKIRA)  
順天堂大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：00312348

##### (2) 研究分担者

川崎 諭 (KAWASAKI SATOSHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60347458

森 和彦 (MORI KAKUHIKO)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：40252001

##### (3) 連携研究者

田代 啓 (TASHIRO KEI)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10263097

池田 陽子 (IKEDA YOUKO)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00433243

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：30116024

丸山 和一 (MARUYAMA KAZUICHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：10433244