

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4日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592240

研究課題名（和文）酸化ストレスが落屑緑内障線維柱帯ならびに水晶体・虹彩上皮細胞に与える影響の検討

研究課題名（英文）Evaluation of oxidative stress on trabecular meshwork cells and lens or iris epithelial cells in pseudoexfoliation glaucoma patients

研究代表者

森 和彦（MORI KAZUHIKO）

京府立医科大学・医学（系）研究科・講師

研究者番号：40252001

研究成果の概要（和文）：

落屑物質が線維柱帯に沈着する落屑緑内障は、眼圧変動が大きく点眼加療によるコントロールが困難な難治緑内障の1つである。落屑物質形成には細胞ストレスとTGF- β 1が関与しているという仮説があり、我々も過去に落屑緑内障の前房水中でTGF- β 3が上昇していることを示している。本研究の目的は各種TGF- β が酸化ストレスと呼応して落屑物質形成に関与していることを示し、原因遺伝子とされるLOXL1との関連を明らかにすることであった。平成21年度から22年度までの研究において種々の手術サンプルをもとに落屑緑内障眼由来細胞の培養系を検討した結果、線維柱帯細胞は術中のマイトマイシンC処理のために増殖させ難く、また虹彩色素上皮細胞は単一細胞群として培養するには純度の問題で難しかったことから、最終的には落屑物質の産生能が示唆されており、かつ単一細胞群として培養が容易な結膜下線維芽細胞を主体として実験系を構築するのが実際であると判明した。平成23年度においてはこの実験系を用い、最初に非緑内障眼由来の結膜下線維芽細胞に対して、培地に曝露時間を変えて各種濃度のTGF- β 1,2,3を作用させ、LOXL1、fibrillin-1遺伝子のmRNA発現量を検討した。その結果、すべてのTGF- β において両遺伝子それぞれのmRNA発現量の亢進を認めた。また過酸化水素を付加した状態で結膜下線維芽細胞を培養し、酸化ストレス下での反応を確認した。続いて落屑緑内障眼由来の結膜下線維芽細胞を用いて同様の実験を予定していたところ、当科とゲノム医科学との共同研究として実施した落屑緑内障に対するゲノムワイド関連研究の結果から、落屑緑内障にはLOXL1遺伝子のみならず、他の遺伝子の関与も疑われることが明らかとなった。またLOXL1遺伝子自体も欧米人と日本人の間ではSNPの方向性が異なっており、遺伝子の関与の仕方に人種差が認められることから、一義的に原因遺伝子とは言い切れない状況にあることが判明した。このような現状を鑑み、酸化ストレスがLOXL1遺伝子関連物質のみならず、新たに判明した遺伝子の産生物質に対する影響も合わせて検討すべきであると考えられたため、研究計画の再検討を行ない、遺伝子解析を先行させた後にこれらの検討を行うべきであるとの結論に達した。

研究成果の概要（英文）：

Pseudoexfoliation glaucoma is one of the intractable types of glaucoma, which resist to the medical treatment due to the large fluctuation of intraocular pressure. There is a hypothesis that the cellular stresses including oxidative stress and TGF-beta are related to the formation of pseudoexfoliation substances. Previously, we had demonstrated that TGF-beta3 concentration in the aqueous humor also increased in pseudoexfoliation glaucoma patients. The purpose of this study was not only to evaluate the role of the oxidative stress along with the TGF-beta to the formation of the pseudoexfoliation substances, but also to clarify the relationship to the LOX-L1 gene. From the experimental data through 2009 and 2010, we could evaluate the specimens and culture conditions from the surgical samples of pseudoexfoliation glaucoma patients, such as trabecular meshwork, lens capsule, iris, and conjunctivae. Trabecular meshwork cells had a difficulty to culture due to the mitomycin C which is routinely utilized for the surgical procedure,

and iris pigmented epithelial cells could not be cultured as a single cell types because of the cell purification. Therefore, we decided to utilize the subconjunctival fibroblasts, which grow easily and are suggested to produce pseudoexfoliation substances, as our experimental system. In 2011, we confirmed not only the increase of the mRNA expression levels of LOXL1 and fibrillin-1 gene after the induction of TGF-beta 1, 2, and 3 with different duration and concentration, but also the response to the oxidative stress loading of the hydrogen peroxide, utilizing subconjunctival fibroblasts culture system. Since our new genome-wide association study data suggest that other genes but LOXL1 also relates to the pseudoexfoliation glaucoma (unpublished data), we concluded to re-evaluate the oxidative stress not only to the LOXL1 but also our new genetic loci after the genetic analysis has done.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼生化学・分子生物学

1. 研究開始当初の背景

落屑緑内障は偽落屑物質の線維柱帯、虹彩や水晶体前囊への沈着を特徴とし、眼圧が高度に上昇して点眼加療に抵抗性を示す難治緑内障の1つである。線維柱帯は前房側からシュレム管側に向かって、ぶどう膜網、強角膜網、傍シュレム管結合組織より構成され、房水はこの3層を経由してシュレム管に流入する。傍シュレム管結合組織は房水流出抵抗の主体をなす組織であり、この部位の房水流出抵抗が上昇することが眼圧上昇、ひいては緑内障の原因となる。線維柱帯には大きく3種類の細胞成分があることが知られ、これらはシュレム管内壁に存在する内皮細胞、傍シュレム管結合組織に存在する Cribriform 細胞、ぶどう膜網と強角膜網に存在する線維柱帯細胞である。シュレム管内皮細胞は能動的な房水流出に、Cribriform 細胞は傍シュレム管結合組織における細胞外基質 (ECM) の産

生に関与している。一方、線維柱帯細胞は貪食能を有して線維柱帯ビームに蓄積した debris や ECM の処理を行うのみならず、コラーゲン再生や再構成を行うことによって、線維柱帯のメンテナンスを担っている。

落屑緑内障は前房内で形成された偽落屑物質が線維柱帯部位に沈着するために眼圧上昇を起こすと考えられている。偽落屑物質はマススペクトロメトリーにて fibrillin-1, fibulin-2, vitronectin, syndecan, versican, clusterin, lysyl oxidase などから構成されているとされるが、その産生ならびに蓄積過程の詳細はいまだ不明である。従来から提唱されている仮説として、落屑緑内障においては酸化ストレスや虚血ストレスなどの細胞ストレスの負荷から前房内サイトカインの1つである TGF-β1 が増加し、線維柱帯細胞や水晶体・虹彩上皮細胞の ECM 産生が増加することによって、偽落屑物質が形成されると

されている。TGF は数多くの機能を有するサイトカインであり、isoform として TGF- β 1 ~3 が存在し、眼内では水晶体上皮ならびに毛様体上皮で産生される。創傷治癒と密接に関わっており組織の線維化を引き起こすことが知られている。我々は落屑緑内障の前房水中では TGF- β 1 のみならず、TGF- β 3 が極めて特徴的に増加していることを初めて突き止めている。

さらに近年、落屑緑内障の発症に lysyl oxidase like-1 protein (LOXL1) 遺伝子多型が関与しているとの報告が北欧からなされた。我々もその追試を行い、日本人においても SNP の分布が北欧人種とは異なるものの、やはり LOXL1 遺伝子多型が落屑緑内障発症に関わっていることを報告した。

2. 研究の目的

我々は、落屑緑内障において酸化ストレスが TGF β 、中でも TGF- β 3 を介して線維柱帯細胞ならびに水晶体・虹彩上皮細胞における偽落屑物質蓄積に関与するとの仮説を提起した。本研究では最初に線維柱帯細胞を初代培養にて増殖させ、得られた細胞において各種 TGF β に反応して偽落屑物質構成因子が産生・蓄積するか否かを調べる。また培養線維柱帯細胞に酸化ストレスを負荷した環境で、それぞれの TGF β に反応して偽落屑物質構成因子が蓄積するか否かを検討する。これらの検討において細胞内の活性酸素 (ROS) 量を定量する。同様の検討を水晶体・虹彩上皮細胞においても行い、どの細胞における変化が落屑緑内障に最も関わっているかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

最初に落屑緑内障、正常眼圧緑内障を含む広義原発開放隅角緑内障ならびに非緑内障

眼由来の線維柱帯細胞の培養系の確立を試みた。虹彩上皮細胞に関しては手術サンプルからの安定した培養が可能となったが、色素上皮細胞と無色素上皮細胞の分類法を含めて培養系の安定のために改良を行った。また新たに結膜線維芽細胞の培養を行い、安定して増やすことができたため、まずはこちらで実験を動かしていくこととした。次に TGF- β 1, 2, 3 を培地に付加した状態での各種線維柱帯細胞における ECM の遺伝子発現、LOX-L1 の遺伝子発現、細胞ストレスならびに酸化ストレス応答を real time PCR 法にて検討した。また細胞内の活性酸素量についてはフローサイトメトリーを用いて測定を試みた。さらに各種酸化ストレスの存在下での TGF- β 1, 2, 3 に対する各種眼球由来細胞の反応を調べるとともに、TGF β や細胞・酸化ストレスに対する応答と比較検討することを試みた。

4. 研究成果

平成 21 年度から 22 年度にかけての研究において種々の手術サンプルをもとに培養条件を変えながら落屑緑内障眼由来細胞の培養系の確立を試みた。その結果、線維柱帯細胞は術中のマイトマイシン C 処理のために増殖させること自体が難しく、また虹彩色素上皮細胞は単一細胞群として培養するには純度の問題で困難であった。したがって最終的には落屑物質の産生能が示唆されており、かつ単一細胞群として培養が容易な結膜下線維芽細胞を主体として実験系を構築するのが実際的であると判断した。

平成 23 年度においては培養結膜下線維芽細胞の実験系を用い、最初に非緑内障眼由来の結膜下線維芽細胞に対して、培地に曝露時間を変えて各種濃度の TGF- β 1, 2, 3

を作用させ、LOXL1、fibrillin-1 遺伝子の mRNA 発現量を検討した。その結果、すべての TGF- β において両遺伝子それぞれの mRNA 発現量の亢進を認めた。次に過酸化水素を付加した状態で結膜線維芽細胞を培養し、酸化ストレス下での培養細胞の反応を確認した。

続いて落屑緑内障由来の培養結膜下線維芽細胞を用いて同様の実験を予定していたところ、当科とゲノム医科学との共同研究として実施した落屑緑内障に対するゲノムワイド関連研究の結果から、落屑緑内障には LOXL1 遺伝子のみならず、他の遺伝子の関与も疑われることが明らかとなった（未発表データ）。また LOXL1 遺伝子自体も欧米人と日本人の間では SNP の方向性が異なっており、遺伝子の関与の仕方に人種差が認められることから、一義的に原因遺伝子とは言い切れない状況にあることが判明した。

このような現状を鑑み、酸化ストレスが LOXL1 遺伝子関連物質のみならず、新たに判明した遺伝子の産生物質に対する影響も合わせて検討すべきであると考えられたため、研究計画の再検討を行ない、遺伝子解析を先行させた後にこれらの検討を行うべきであるとの結論に達した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

①池田陽子, 中野正和, 森 和彦: 緑内障の遺伝子. 特集 眼科診療:5 年前の常識は, 現在の非常識! 3 緑内障 スペシャルレクチャー. 臨床眼科 増刊号, 65: 238-241, 2011

②池田陽子, 中野正和, 田代 啓, 森 和彦, 木下 茂: 特集 緑内障の検査診断学. 3. 遺伝子診断. 眼科, 53: 207-220, 2011

〔学会発表〕（計 1 件）

Imai K, Mori K et al.: The RS16958477 SNP in the promoter region of the LOXL1 gene is associated with the LOXL1 gene expression level. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2010 Annual Meeting, 2010.5.6, Ft. Lauderdale, FL, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 和彦 (KAZUHIKO MORI)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 40252001

(2) 研究分担者

松田 彰 (AKIRA MATSUDA)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 00312348

池田 陽子 (YOKO IKEDA)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・客員講師

研究者番号: 00433243

成瀬 繁太 (SHIGETA NARUSE)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教 (平成 19 年度)

研究者番号: 80398388

(3) 研究協力者

今井 浩二郎 (KOJIRO IMAI)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・大学院生 (平成 19-20 年度)