

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20日現在

機関番号：82643
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592253
 研究課題名（和文） 毛様体における Rab8 および ERM family の相互作用の検討
 研究課題名（英文） The study of interaction between Rab8 and ERM family in the ocular ciliary body
 研究代表者
 木村 至（KIMURA ITARU）
 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・外部研究員
 研究者番号：60296663

研究成果の概要（和文）：野生型マウスおよびサル眼球切片を作製し、Rab8 および ERM family の毛様体上皮での共局在を免疫染色にて確認した。Rab8 ノックアウトマウスでは意義ある結果が得られなかった。また、サル毛様体上皮の初代培養細胞を用いて、培養液に各種薬剤を投与し Rab8 の発現についてウェスタン解析を行ったが、ステロイドを投与した際に濃度依存的に Rab8 の発現が抑えられるという結果を得た。他の薬剤では明らかな変化を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：Using wild type mice and healthy cynomolgus monkeys, we prepared ocular sections, performed immuno-staining and found the co-existence of Rab8 and ERM family in the ocular ciliary body. However, significant results from immuno-staining of ocular sections in Rab8-deficient mice were not found. We performed western blot analysis of Rab8 using cultured ocular ciliary epithelium cells of cynomolgus monkeys, and found that the Rab8 reduced concentration-dependently when dexamethasone was added to culture medium, whereas obvious changes were not found when other drugs were added.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
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：緑内障、眼圧、房水、毛様体、Rab8、ERM family

1. 研究開始当初の背景

緑内障は全世界でおよそ 6000 万人以上が罹患し、わが国の後天性失明原因としては首位の疾患である。病型としてはそのうち 74% が開放隅角緑内障 (open angle glaucoma; OAG) である。OAG により両眼失明する患者数は 2020 年には 590 万人に達すると推計されている (Quigley HA, Broman AT, Br J

Ophthalmol, 2006)。我が国においては緑内障は 250 万人以上存在し、40 歳以上の人口の約 5% に潜在的に罹患していると考えられる。病型としては 78% が OAG であり、そのうち眼圧が正常範囲内にある正常眼圧緑内障 (normal tension glaucoma; NTG) が 9 割以上を占めるため、我が国の緑内障患者の 72% は NTG 患者である (Iwase A, et al,

Ophthalmology, 2004)。2020年には日本の緑内障患者は300万人を超えると推計され、今後増え続けることが予測されている。また家族歴が患者のおよそ20%に認められ、遺伝的要因の存在も考えられ、実際にOAGの原因遺伝子であるMyocillin (Kubota, et al, Genomics, 1997. Stone EM, et al, Science, 1997) や Optineurin (Rezaie T, et al, Science, 2002)、若年発症の発達緑内障の原因遺伝子としてCYP1B1 (Stoilov I, et al, Hum Mol Genet, 1997)等が現在までに明らかにされている。しかし、緑内障の発症メカニズムは未だ充分には解明されておらず、現在までの治療方法は、早期に発見し、眼圧を対症療法的に下降させることであった。日本人に多い病型であるNTGの場合、眼圧を下降させることが困難であるばかりでなく、眼圧下降が病状の進行を阻止できるかさえも明らかではない。最近では視神経乳頭の血流障害の要素が報告されるようになり、さらに視神経乳頭篩板部の軸策流や血流障害により神経節細胞が細胞死を起こしていることがわかってきた。視神経の循環障害を引き起こすものとして、血管内皮細胞で産生される強力な血管収縮因子であるエンドセリン-1の血漿濃度がNTG患者で正常人と比較して有意に大きいことなども報告されている(Cellini M, et al, Acta Ophthalmol Scand, 1997)。また、エンドセリン-1の血漿濃度は動脈硬化の重症度に相関して高いという報告がそれ以前になされており(Lerman A, et al, N Engl J Med, 1991)、NTGの病因としての血管生理の機能異常が関与していることが示唆される。

申請者はこれまでNTGにおける病因論として循環障害説に着目し、緑内障患者の視神経乳頭循環不全や動脈硬化の進行についていくつかの知見を報告してきた。また、血管生理に関わる生理活性脂質とその受容体に着目し、受容体のアミノ酸変異を伴う1塩基多型を持つ症例が緑内障患者群にのみ存在し、正常コントロール群には存在しないことを見出した。その緑内障の病型はNTGだけではなく、眼圧が正常範囲を超える狭義の原発開放隅角緑内障(Primary Open Angle Glaucoma; POAG)患者がNTGと同数存在していた(特願2008-045004)。

このことは、主として循環障害や動脈硬化など、血管生理に関わる生理活性物質と考えられているものが、眼圧にも深く関与していることを示唆しており、また、高眼圧から生じる灌流圧低下による視神経血流の低下といった単純な図式とは別の、血管生理に関わ

る生理活性物質由来の循環障害と眼圧という因子が、密接に関わっている可能性をも示唆している。

本研究ではこれらのことを踏まえ、血管生理と眼圧調整機構が密接に関わると考えられる毛様体に着目し、従来より精力的に研究が進められている房水流出機構担当部位である線維柱帯とあわせ、血管生理と房水産生、房水流出に至るまでの包括的な眼圧調整機構についての解明に向け、緑内障、とくにNTGと狭義のPOAGを包含した開放隅角緑内障の病態解明とその新たな治療方法の確立を目指す。

その端緒として、申請者はこれまでカニクイザルの毛様体のプロテオーム解析を行い、その構成タンパクを検索した。毛様体を構成するタンパクとして500種類以上のタンパクが同定されたが、そのなかにはNTGの原因遺伝子の1つとされるOptineurinと相互作用をもつことが明らかになっているRab8が含まれていた。

Rab8はsmall GTP binding proteinの1つであり、ゴルジ体から細胞膜へのvesicle traffickingに関わり、様々なタンパクとの相互作用があるが、その1つがOptineurinであり、そのmutationの1つであるE50KではRab8との相互作用が生じないことが報告されている(Daniela et al; Journal of Cell Biology 2005)。またRab8が小腸上皮においてapical proteinの局在をコントロールしていること、Rab8ノックアウトマウスでは小腸のapical microvilliが短縮し、本来そこに局在すべきpeptidaseやtransporterがlysosomeに蓄積してしまうことが報告されている(Sato T, et al, Nature, 2007)。そこで申請者は、細胞膜とアクチンフィラメントのlinker proteinであり、microvilliのcore proteinともいえるERM family(Ezrin, Radixin, Moesin)に着目した。Ezrin, Radixin, Moesinの3つのタンパクはいずれも今回の毛様体のプロテオーム解析によって同定されており、マウス及びサルの眼球組織切片を用いた免疫染色においても毛様体での局在が示されている。

ERM familyは細胞膜とアクチンフィラメントのlinker proteinであることより、Rho-A kinase, ROCKとの関わりも深く、現在臨床試験が進んでいる眼圧下降薬としてのROCK inhibitorとも何らかの相互作用をもつことは想像に難しくなく、またERM family自身が眼圧に関与することも可能性として十分に考えられる。また酸化ストレスの観点においても興味深い対象であり、血管生理と眼圧調整機構を探る検討対象として適切であると

考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①Rab8 および ERM family の毛様体における正常な相互作用をマウスにおいて確認し、②緑内障のモデルマウスである Optineurin と WDR36 のトランスジェニックマウスを用いて Rab8 および ERM family の相互作用を検討する。分子細胞生物学および病理組織学の手法を用いた検討のほか、③モデルマウスに各種薬剤を投与し、眼圧変動および網膜神経節細胞死についても検討を行い、④緑内障発症の頻度に差がつくかどうかを検討する、こととなる。

Rab8 および ERM family の相互作用について言及した論文は PubMed 上現在のところ 1 本だけであり、視細胞において moesin, actin, rac1 等が rab8 と協調して働きロドプシン輸送を行う、という内容である (Deretic D, et al. Mol Biol Cell, 2004)。緑内障の病態解明を目指す研究においては最初の試みであると考えられ、かつ相互作用が存在すること自体はほぼ確実であると考えられ、さらには対象が緑内障に深く関わっていると考えられるもの同士の相互作用であり、緑内障の病態解明に関わる何らかの知見が得られる可能性が非常に高く、新しい治療法に直結する可能性も高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) Rab8 および ERM family の培養細胞における相互作用の検討

Rab8 と Ezrin, Radixin, Moesin が実際にタンパク質間相互作用が生じていることを、サルノ毛様体無色素上皮および色素上皮の初代培養細胞を用いて確認する。方法としては CoralHue Fluo-Chase Kit (Amalgaam 社) を用いた Protein fragment complementation method を行う。これは 2 つのタンパクが相互作用してはじめて緑色蛍光を発するという原理を用いた方法である。

①培養細胞に上記 kit にて標識した Rab8 および ezrin, radixin, moesin を transfection し、Rab8 と ezrin, Rab8 と radixin, Rab8 と moesin との相互作用を確認する。

②上記の組み合わせのうち、相互作用の認められたものに対して、相互作用の生理学的意義を詳細に解析するために、緑内障発症に関与することが予想される種々の因子(酸化ストレス、ステロイド剤添加、圧力、虚血)を与えた時の相互作用および培養細胞への影響を調べる。評価方法としては、相互作用の程度を検討するための蛍光発色数カウント、細胞形態の観察、アポトーシスを生じた細胞数のカウントを行う予定である。形態観察を行う

際には詳細な変化を観察する目的のために、細胞骨格系(アクチン、中間系フィラメント、およびピンキュリン等)および細胞外基質タンパク質(フィブロネクチン、コラーゲン、あるいはラミニン等)の染色実験も併せて行う。また、これらを認識する抗体を用いたウエスタン解析を行い消長・局在を調べる。

③Rab8 と ERM family の相互作用の生理学的意義をさらに詳細に解析するために、緑内障治療薬として考えられている薬剤を上記②の条件下に培養液中に投与し、相互作用および培養細胞への影響を調べる。具体的には、眼圧下降薬として、毛様体筋収縮による線維柱帯網開大により房水流出抵抗を減弱させる副交感神経刺激薬、房水産生を抑制する薬剤としての β 遮断薬、炭酸脱水酵素阻害薬、ぶどう膜強膜流出路からの房水流出促進を阻ると考えられているプロスタグランジン F₂ α 誘導体、 α 遮断薬、そして現在臨床試験が進められている、主経路としての線維柱帯からの房水流出促進を阻ると考えられている ROCK 阻害薬、さらに循環改善・神経保護を阻ると考えられているカルシウム拮抗薬、NMDA 拮抗薬を投与し、検討を行う。評価方法は上記②に準じる。

(2) プロテオーム解析

Rab8 が ERM family と相互作用する際、上記(1)の②、③に記載した各種条件下において、どのような変化が生じているのかを網羅的に調べるために、以下の項目をコントロールと比較する。

①各々の細胞より抽出物を調製後、各種リン酸化抗体を用いたウエスタン解析を行うことにより量的な変化を比較し、どのような情報伝達系の働きが変化しているのかを検討する。

②細胞抽出物および培養液を二次元電気泳動法により分離後、量的変動が確認されたタンパク質スポットをピッキングする。次に、これらのタンパク質をトリプシンにより in gel 消化し、イオントラップ型タンデム質量分析計 LCQ DECA XP Plus (ThermoElectron 社) を用いて同定する。

(3) 各種条件下に対応する網膜神経節細胞死の検討

緑内障の程度・病期を評価するものとしては、網膜神経節細胞死が挙げられる。前述した計画(1)の各種条件下において、hanging のついた cell culture insert と 6-well plate を用いて、毛様体上皮の培養細胞とラット網膜神経節由来細胞である RGC-5 の同一培養液中での共培養を試みる。そして(1)に記載した評価方法に準じて RGC-5 について細胞の形態観察等の解析およびアポトーシスを生じた細胞数

のカウントを行い、毛様体上皮細胞における Rab8 およびERM family の相互作用の程度との相関について検討する。

(4) コンピューターを利用した構造解析
当研究室では、タンパク質の一次構造に基づいて立体構造をシュミレーションする、最新のソフトウェア Mol Soft(ICM 社)を利用した実験を進めている。このソフトウェアから導き出される立体構造の信頼性は非常に高いと考えられ、Rab8—ERM family 複合体の立体構造を予測することにより、この複合体の働きに関して、その制御機構が理解可能になるばかりではなく、この働きを調節する分子のデザインも出来る。また、このソフトウェアはシュミレーションして得られた複合体の立体構造を基に、さらにこれに相互作用する分子の構造をデータベースから検索することも出来るため、(2)で得られたタンパク情報に加え、なんらかの生理的意義のある関与が可能な候補分子の情報を入手することが可能になる。

4. 研究成果

当初計画していた緑内障のモデルマウスである Optineurin と WDR36 のトランスジェニックマウスを用いることが困難な状況となったが、本研究テーマに直結すると考えられる Rab8 deficient mouse の眼球を入手することができ、眼球切片の作製を完了した。Rab8 および ERM family の共局在について Rab8 deficient mouse および wild type について免疫染色を施行し、wild type において Rab8 と ERM family の共局在は確認することができた。Rab8 deficient mouse においては意義のある結果は得られなかった。

また、カニクイザル毛様体上皮の初代培養細胞を用いて、培養液にステロイドであるデキサメサゾン、 β 遮断薬のマレイン酸チモロール、炭酸脱水酵素阻害薬のドルゾラミドを投与し Rab8 の発現についてウェスタン解析を行ったが、デキサメサゾンを投与した際に濃度依存的に Rab8 の発現が抑えられるという結果を得た。他の薬剤では Rab8 の発現について明らかな変化を認めなかった。

今後、この結果からさらに実験を発展させ、主として房水産生の面から、Rab8 と ERM family の毛様体における機能と緑内障病態の解明を目指してゆく。

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 Chi ZL, Yasumoto F, Sergeev Y, Minami M, Obazawa M, Kimura I, Takada Y, Iwata T. Mutant WDR36 directly affects axon growth of retinal ganglion cells leading to progressive retinal degeneration in mice. Hum Mol Genet. 査読有, 19, 2010, 3806-3815.
DOI:10.1093/hmg/ddq299

② Yuki K, Kimura I, Shiba D, Imamura Y, Tsubota K. Elevated serum immunoglobulin G titers against Chlamydia pneumoniae in primary open angle glaucoma patients without systemic disease. J Glaucoma. 査読有, 19, 2010, 535-539.
DOI: 10.1097/IJG.0b013e3181ca7868

[学会発表] (計 34 件)

① Kimura I, Normotension Glaucoma. Scientific Meeting West Java Region IOA, 31st March, 2012, Grand Royal Panghegar Hotel, Bandung, Indonesia

② 木村 至、ほか、ラタノプロスト/チモロール配合点眼への切替えによる眼圧下降効果の検討(中間報告)、第 22 回日本緑内障学会、平成 23 年 9 月 24 日、秋田ビューホテル

③ Kimura I, Iwata T, et al, Analysis of colocalization of Rab8 and ERM family in the ocular ciliary body. ARVO 2010 Annual meeting, 4th May, 2010, Fort Lauderdale, USA

④ 木村 至、岩田 岳ほか、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、平成 21 年 4 月 16 日、東京国際フォーラム

⑤ 池在龍、木村 至、岩田 岳ほか、緑内障遺伝子 WDR36 トランスジェニックマウスの解析、平成 21 年 4 月 16 日、第 113 回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム

[図書] (計 1 件)

① 木村 至、中山書店、専門医のための眼科診療クオリファイ3 緑内障診療ガイド、診断の基本 問診と診診、2010、8-13

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 至 (KIMURA ITARU)

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・外部研究員

研究者番号：60296663

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

岩田 岳 (IWATA TAKESHI)

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