

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791994

研究課題名(和文)線維柱帯の圧感受性を規定する細胞骨格および細胞接着の変化に関わる因子の網羅的研究

研究課題名(英文)Comprehensive investigation of tension-sensitive factors that related to changes in cytoskeleton and cell adhesion in trabecular meshwork cells

研究代表者

井上 俊洋(Inoue, Toshihiro)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00317025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞に静水圧をかける装置を試作したが、コントロール条件においても細胞の形態変化をみとめ、解析可能な結果が得られなかった。線維柱帯細胞をY-27632で処理後のマイクロアレイおよびGene ontology解析の結果、抗酸化機能関連の5遺伝子の発現が上昇し、うちCatalaseはリアルタイムRT-PCRでも確認された。過酸化水素刺激下にて線維柱帯細胞をY-27632で前処理するとWST-8 assayによるシグナルは高値、DCFDA試薬のシグナルは低値となった。以上より、ROCK阻害薬は線維柱帯細胞内の抗酸化作用物質の発現を誘導し、酸化ストレスによる細胞死を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We made a device to add hydrostatic pressure on cultured cells, resulting in changes in cell morphology even in the control condition, and the data were not analyzable. After treatment of trabecular meshwork cells with Y-27632, 5 genes that were related to antioxidant functions were up-regulated. Of those, the up-regulation of catalase was confirmed by realtime RT-PCR. Pretreatment with Y-27632 increased the signal of WST-8 assay and decreased the signal of DCFDA test reagent under stimulation with hydrogen peroxide. Collectively, it was indicated that ROCK inhibitor induced intracellular expression of antioxidants in the trabecular meshwork cells, and thereby suppressed oxidative stress-induced cell death.

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 線維柱帯 酸化ストレス 圧感受性

1. 研究開始当初の背景

緑内障のリスクファクターである眼圧上昇は房水流出量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。圧感受性が破綻していると考えられる緑内障患者においては、細胞死により線維柱帯細胞の数が減少していること、および緑内障患者の房水および線維柱帯には酸化ストレスが増加していること示唆されていることから、これらの変化が圧感受性のメカニズムと関連している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、通常の2次元培養に対す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。これまで線維柱帯の眼圧に関するホメオスタシス機能について、メカニズムの解明にいたった研究はこれまでに発表されておらず、その中で細胞骨格の変化と線維柱帯の圧感受性を結びつけた仮説はわれわれが初めて提唱したものである。また線維柱帯細胞の圧感受性に関わる因子について、タンパクレベルにおいては未探索である。さらに緑内障病態における圧感受性と細胞骨格の関わりにリンクして酸化ストレスの影響が示唆されていることから、酸化ストレスが房水流出率に与える影響および酸化ストレス下の線維柱帯細胞に対して ROCK 阻害剤が与える影響を検討する。

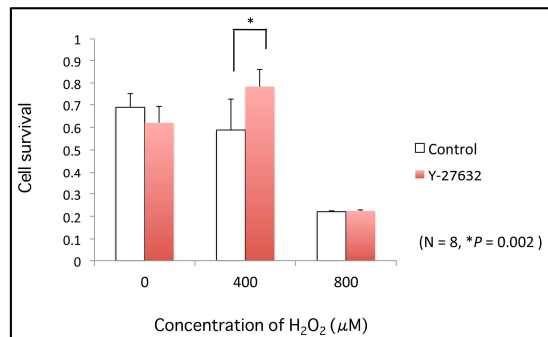
3. 研究の方法

2次元培養に対して静水圧をかけるために当施設に設置済みのチューブを介して水圧を測定する器械に培養皿を入れるための気密性容器を接続し、別のルートから培養液で加圧を行った。この装置を用いてコントロール条件は大気圧で培養し、加圧条件はこれに10 mmHg ごと圧を上昇させて培養し、時間経過に伴う細胞骨格の変化を確認した。ブタ摘出眼に酸化ストレス惹起薬剤メナジオンを灌流し、われわれが作成した分単位でモニターが可能な房水流出率測定器を用いて測定した。カニクイザル培養線維柱帯細胞を ROCK 阻害薬 (Y-27632、25 μM) で30分処理したあと mRNA を回収し、マイクロアレイを用いて12613 遺伝子を網羅的に解析し、発現に変化のあった遺伝子を同定した。重要と思われた因子に対してはリアルタイム PCR を用いて発現変化の確認を行った。さらに Gene ontology analysis を用いて遺伝子の機能毎にカテゴリー化して統計学的に解析を行った。酸化ストレスによる細胞死において ROCK 阻害薬が与える影響を検討するため、カニクイザル線維柱帯細胞を無血清培地で一晚処理し、25 μM の Y-27632 で30分前処理し、600 および 800 μM の濃度の過酸化水素刺激をした後

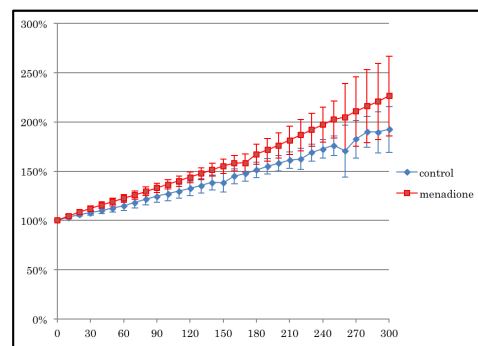
に WST-8 assay、DCFDA 試薬を用いた活性酸素の定量を行った。また細胞が存在しない状況で Xanthine oxidase でスーパーオキシドを発生させ、そこに Y-27632 を加えた後に発光試薬でシグナルを検出した。

4. 研究成果

2次元培養に対して静水圧をかけたが、CO₂の循環が十分でなく、コントロール条件においても線維柱帯細胞の形態変化をみとめた。圧条件などを調節したが問題の解決にいたらず、本実験からは解析可能な結果を得ることは出来なかった。カニクイザル培養線維柱帯細胞を ROCK 阻害薬 (Y-27632、25 μM) で30分処理後のマイクロアレイおよび Gene ontology analysis の結果、抗酸化機能関連の5つの遺伝子の発現が上昇していることがわかった (P = 0.014)。このうち Catalase についてはリアルタイム PCR で発現が上昇していることが示された。また WST-8 assay によるシグナルは、600 μM の濃度の過酸化水素刺激下で Y-27632 前処理を行った細胞の方がコントロールと比較して有意に高値であった。



細胞内における活性酸素の発現は DCFDA を用いた実験の結果、Y-27632 の前処理によって抑えられていることが確認された。また細胞が存在しない状況では Y-27632 自体に抗酸化能は発揮されないことが Xanthine oxidase を用いた実験で明らかになった。これらの結果から、ROCK 阻害薬は細胞内における抗酸化作用物質の発現を誘導し、酸化ストレスによる細胞死を抑制する可能性が示唆された。摘出眼を用いた房水流出率の実験においては、酸化ストレス惹起薬剤メナジオンを灌流した眼においてコントロールと比較して房水流出率が高い傾向があったが、群間において有意な差ではなかった。



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 10 件)

1. Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Monocyte chemotactic protein-1 level in the aqueous humor as a prognostic factor for the outcome of trabeculectomy. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, in press. doi: 10.1111/ceo.12204 査読有り
2. Takahashi E, Inoue T, Fujimoto T, Kojima S, Tanihara H. Epithelial mesenchymal transition-like phenomenon in trabecular meshwork cells. **Experimental Eye Research** 118:72-79, 2014. doi: 10.1016/j.exer.2013.11.014 査読有り
3. Awai-Kasaoka N, Inoue T, Kameda T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Tanihara H. Oxidative stress response signaling pathways in trabecular meshwork cells and their effects on cell viability. **Molecular Vision** 19:1332-1340, 2013. 査読有り
4. Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Elevated levels of multiple biomarkers of Alzheimer's disease in the aqueous humor of eyes with open-angle glaucoma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 54:5353-5358, 2013. doi: 10.1167/iovs.13-12245 査読有り
5. Kameda T, Inoue T, Inatani M, Fujimoto T, Honjo M, Kasaoka N, Inoue-Mochita M, Yoshimura N, Tanihara H. The effect of Rho-associated protein kinase inhibitor on monkey Schlemm's canal endothelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 53:3092-3103, 2012. doi: 10.1167/iovs.11-8018 査読有り
6. Inoue T, Kawaji T, Inatani M, Kameda T, Yoshimura N, Tanihara H. Simultaneous increases in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor of pseudophakic glaucomatous eyes. **Journal of Cataract and Refractive Surgery** 38:1389-1397, 2012. doi: 10.1016/j.jcrs.2012.04.028 査読有り
7. Tsuboi N, Inoue T, Kawai M, Inoue-Mochita M, Fujimoto T, Awai-Kasaoka N, Yoshida A, Tanihara H. The effect of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 on aqueous humor outflow facility. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 53:6702-6707, 2012. doi:10.1167/iovs.12-10376 査読有り
8. Fujimoto T, Inoue T, Kameda T, Awai-Kasaoka N, Inoue-Mochita M, Tsuboi N, Tanihara H. Involvement of RhoA/Rho-associated kinase signal transduction pathway in dexamethasone-induced alterations in aqueous outflow. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 53:7097-7108, 2012. doi: 10.1167/iovs.12-9989 査読有り
9. Kawai M, Inoue T, Inatani M, Tsuboi N, Matsukawa A, Yoshida A, Tanihara H. Elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 in the aqueous humor after phacoemulsification. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 53:7951-7960, 2012. doi: 10.1167/iovs.12-10231 査読有り
10. Inoue T, Matsumura R, Kuroda U, Nakashima KI, Kawaji T, Tanihara H. Precise identification of filtration openings on the scleral flap by three-dimensional anterior segment optical coherence tomography. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 53:8288-8294, 2012. doi: 10.1167/iovs.12-10941 査読有り

[学会発表](計 8 件)

1. **The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 5-9, 2013, Washington State Convention Center, Seattle, Washington, USA)** ; Inoue-Mochita M, Inoue T, Fujimoto T, Awai-Kasaoka N, Tanihara H. Identification of TGF- β 2-induced proinflammatory cytokines secreted from cultured trabecular meshwork cells.
2. **World Glaucoma Congress 2013 (July 17-20, 2013, Convention Centre, Vancouver, Canada)** ; Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Kasaoka N, Shobayashi K, Tanihara H. Visualization of actin filament using time-lapse fluorescent microscopy in trabecular meshwork cells.
3. **第117回日本眼科学会総会 東京 国際フォーラム 平成25年4月4日~7日** ; 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:線維柱帯細胞において ROCK 阻害薬が酸化ストレスに与える影響.

4. **The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA)** ; Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Kameda T, Kasaoka N, Tanihara H. The effects of Rho/ROCK activation in dexamethasone-induced increase of aqueous-outflow resistance.
5. **The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA)** ; Tsuboi N, Inoue T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Kasaoka N, Kawai M, Shobayashi K, Yoshida A, Tanihara H. The effect of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 on the aqueous humor outflow facility
6. **European Glaucoma Society 2012 (June 17-22, 2012, Tivoli Hotel & Congress Center, Copenhagen, Denmark)** ; Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Kameda T, Kasaoka N, Tanihara H. Involvement of RhoA/Rho-associated kinase signal transduction pathway in the dexamethasone-induced alterations in aqueous outflow.
7. **European Glaucoma Society 2012 (June 17-22, 2012, Tivoli Hotel & Congress Center, Copenhagen, Denmark)** ; Tsuboi N, Inoue T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Kasaoka N, Kawai M, Shobayashi K, Yoshida A, Tanihara H. The effect of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 on the aqueous humor outflow facility
8. **World Glaucoma Congress 2011 (June 29 - July 2, 2011, Palais des Congrès, Paris, France)** ; Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Kameda T, Kasaoka N, Tanihara H. The effects of Rho/ROCK activation in dexamethasone induced increase of aqueous outflow resistance

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 井上 俊洋 (INOUE, Toshihiro)
 熊本大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号： 00317025