

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592663

研究課題名(和文)毛様体のRab8とERMファミリーの相互作用の検討による緑内障病態の解明

研究課題名(英文)The elucidation of glaucoma pathophysiology by the investigation of Rab8 and ERM family interaction in the ocular ciliary body

研究代表者

木村 至(Kimura, Itaru)

独立行政法人国立病院機構(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・研究員

研究者番号：60296663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Rab8 deficient mouseの眼球切片を作製し、Rab8およびERM familyの共局在についてRab8 deficient mouse、wild type mouse、サル毛様体上皮の初代培養細胞について免疫染色を施行し、wild type mouseとサル毛様体上皮の初代培養細胞において共局在を確認した。毛様体上皮の初代培養細胞を用いて、各種薬剤を投与しRab8およびERM family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ことを見出した。炭酸脱水酵素阻害剤、遮断薬の投与では発現に変化を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We confirmed co-localization of Rab8 and ERM family in the ocular ciliary body of monkey and wild type mice by immunostaining method using Rab8 deficient mice, wild type mice, and primary cultured cell of monkey ciliary epithelial cells. Westernblot conducted on ciliary epithelial cell lysate revealed that the addition of steroid decreased levels of expression of Rab8 protein. No change in levels of expression of ezrin, radixin or moesin were observed. Furthermore, when cells were cultured in the same way with the addition of timolol maleate or carbonic anhydrase inhibitor, no changes in Rab8 or ezrin, radixin and moesin expression were observed.

研究分野：緑内障の病態解明と新規治療方法の開発

キーワード：原発開放隅角緑内障 毛様体 眼圧調整機構 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、失明原因としては白内障に次ぐ第 2 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% に潜在的に罹病していると考えられ、失明原因として糖尿病網膜症に次いで第 2 位である。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)。なお、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 2008-45004)。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)。

また最近になり、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。また、Rab8 との共局在も2重染色によって示された。

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た。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) Rab8 および ERM family の毛様体における正常な相互作用をサル毛様体上皮の培養細胞にて検討し、現在まで手つかずの Rab8 および ERM family の、毛様体上皮培養細胞でのシグナル伝達経路を可能な限り明らかにする、(2) 各種条件下での Rab8 および ERM family の相互作用の変化を調べ、それが緑内障の重症度に相関するかを検討する、こととなる。

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

本実験では実際にタンパク質間相互作用が生じていることを、サルの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。

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。

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。

Rab8 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図ると考えられているプロスタグランジン F2 誘導体、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図ると考えられている ROCK 阻害薬、さらに循環改善・神経保護を図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。

(2) プロテオーム解析

毛様体上皮初代培養細胞抽出物のプロテオーム解析

Rab8 が ERM family と相互作用する際、上記(1)の、 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。 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。 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クアップする。次に、これらのタンパク質をトリプシンにより ingel 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。

毛様体上皮初代培養細胞 exosome のプロテオーム解析

本課題における新たな視点として、毛様体上皮細胞が分泌する膜小胞のみを濃縮沈殿させる Exo-Quick-TC (System Bioscience 社) を用いて、毛様体上皮が分泌するタンパク質の解析を行う。上記と同様に培養細胞に各種刺激を行い、Exo-Quick-TC を用いて抽出物を調整する。評価方法は上記 に準じて施行する。これにより、毛様体上皮が分泌する膜小胞について、今までほとんど手つかずの領域の解明の一步となることが期待できる。

4. 研究成果

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

CoralHue Fluo-Chase Kit (Amalgaam 社) を用いた Protein fragment complementation method は条件設定の段階で留まり、結果を出すことはできなかった。しかし、新たに Rab8 deficient mouse を入手することができたため、その眼球切片を作製し、Rab8 および ERM family の共局在について Rab8 deficient mouse、wild type mouse、サル毛様体上皮の初代培養細胞に対して免疫染色を施行した。Wild type mouse とサル毛様体上皮の初代培養細胞において共局在を確認することができた。Rab8 deficient mouse については、一定の結果を得ることができなかった。

サル毛様体上皮の初代培養細胞を用いて、各種薬剤を投与し Rab8 および ERM family の発現についてウエスタン解析を行った。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ことを見出した。ERM family の発現に変化は認めなかった。また

炭酸脱水酵素阻害剤、遮断薬の投与では Rab8、ERM family とともに発現に変化を認めなかった。

(2) プロテオーム解析

各種条件下における網羅的解析としてのプロテオーム解析を進めるところまでは到達できなかった。

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8件)

Tsumura T, Yoshikawa K, Suzumura H, Kimura T, Sasaki S, Kimura I, Takeda R: Bimatoprost ophthalmic solution 0.03% lowered intraocular pressure of normal-tension glaucoma with minimal adverse events. Clin Ophthalmol, 査読有, 6:1547-1552, 2012

DOI: 10.2147/OPHTH.S36628

Mochizuki Y, Shinoda K, Matsumoto CS, Klose G, Watanabe E, Seki K, Kimura I, Mizota A: Case of unilateral peripheral cone dysfunction. Case Rep Ophthalmol, 査読有, 3:162-168, 2012

DOI: 10.1159/000339129

中澤有吾, 木村至, 望月祐人, 佐久間葉子, 渡邊慧, 若狭玲, 田中稔, 村上晶, 海老原伸行: 三環系抗うつ薬の中止により眼圧正常化を認めた Posner-Schlossman 症候群の1例, 査読有, 眼臨紀 6:566-569, 2013

木村至, 中澤有吾, 渡邊慧, 海老原伸行: チューブシャント手術(EX-PRESS)の治療成績と術後合併症の検討. 眼科 56:79-83, 2014

Arai R, Kimura I, Imamura Y, Shinoda K, Matsumoto CS, Seki K, Ishida M, Murakami A, Mizota A: Photoreceptor inner and outer segment layer thickness in multiple

evanescent white dot syndrome. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 査読有, 252:1645-1651, 2014

DOI:10.1007/s00417-014-2747-7

渡邊慧, 木村至, 中澤有吾, 海老原伸行: 正常眼圧緑内障患者におけるタフルプロスト点眼液による治療成績の検討, 査読有, 眼臨紀 7:597-602, 2014

木村至: 血液透析患者の最適管理をめざして〜一般外来での対応 血液透析患者にみられる眼疾患. 診断と治療, 査読無, 101:1055-1059, 2013

木村至: 緑内障なんでも質問箱 25. 黄斑マップをみるコツはありますか? 臨眼, 査読無, 69:130-133, 2015

[学会発表](計52件)

田邊和彦, 木村至, 岡本はる, 村上晶, 岩田 岳: 毛様体における Rab8 および ERM family の発現変化の検討. 第23回日本緑内障学会, 2012

木村至, 座間猛, 船山智代, 眞島行彦, 海老原伸行, 村上晶, 池田康夫, 緑内障遺伝子解析研究会: プロスタサイクリン受容体異常による緑内障発症の検討. 第117回日本眼科学会総会, 2013

Tanabe K, Kimura I, Okamoto H, Chi ZL, Akahori M, Shimozawa N, Murakami A, Ebihara N, Iwata T: Proteomic analysis of ciliary body identifies abundant expression of Rab8/ERM, a secretory machinery for aqueous humor production. World Glaucoma Congress, 2013

Kimura I, Zama T, Funayama T, Mashima Y, Ebihara N, Murakami A, Ikeda Y, The Glaucoma Gene Research Group: Gene polymorphism of prostacyclin receptor in primary open angle glaucoma. International Society for Eye Research Sarasota Symposium, 2013

Kimura I, Tamaki K, Yoshikawa T, Imamura Y, Watanabe S, Nakazawa Y, Murakami A, Ebihara N: The investigation of changes in subfoveal choroidal thickness and sensitivity of visual field in highly myopic glaucoma. Association for Research in Vision & Ophthalmology Annual Meeting, 2015

〔図書〕(計6件)

木村至: Text 眼科学 第3版 視覚検査法 視機能検査 視野検査 坪田一男編 南山堂 28-31,2012

木村至: Text 眼科学 第3版 視覚検査法 視器一般検査 眼圧検査 坪田一男編 南山堂 43-47,2012

木村至: 実戦緑内障 眼底所見で診る緑内障乳頭 視神経乳頭の局所解剖と正常乳頭所見 網膜と視神経乳頭の局所解剖学 富田剛司 木村至編 文光堂 2-11,2015

木村至: 実戦緑内障 眼底所見で診る緑内障乳頭 視神経乳頭の局所解剖と正常乳頭所見 網膜神経節細胞・網膜神経線維消失と視野異常 富田剛司 木村至編 文光堂 12-13,2015

木村至: 実戦緑内障 眼底所見で診る緑内障乳頭 視神経乳頭の局所解剖と正常乳頭所見 視神経乳頭の血管構築 富田剛司 木村至編 文光堂 14-17,2015

木村至: 実戦緑内障 眼底所見で診る緑内障乳頭 OCT 所見の基本的な読み方 黄斑部を中心に診る 富田剛司 木村至編 文光堂 59-62,2015

〔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)

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・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)

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・部長
研究者番号: 90374157