### 慶應義塾大学学術情報リポジトリ

Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head.
Sub Title	線維柱帯細胞と視神経乳頭由来アストロサイトにおける豚オプチニュリンおよびミオシリンの発 現機構の解析
Author	尾羽澤, 実
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.45-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0045

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって 保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head.

(線維柱帯細胞と視神経乳頭由来アストロサイトにおける豚オプチニュリン およびミオシリンの発現機構の解析)

## 尾羽澤 実

#### 内容の要旨

【目的】豚のオプチニュリンおよびミオシリン遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定し、さらに、ブタ線維柱帯および視神経乳頭部より分離培養された線維柱帯細胞(TMCs)とアストロサイトにdexamethasone(DEX)投与、静水圧負荷、低酸素負荷、さらにブタTMCsでは、伸展刺激をかけ、それぞれのオプチニュリンおびミオシリンの発現量変化を調べた。

【材料・方法】培養ブタTMCsからmRNAを抽出し、既に塩基配列が決定しているヒト、マウス、ラット、およびウシの遺伝子配列から配列が一致する部分でprimer pairを設計し、RT-PCR法を行い、豚オプチニュリンおよびミオシリン遺伝子の一部を増幅した。PCR産物をサブクローニングした後、オートシークエンサーにより塩基配列を決定した。残りの上流および下流の塩基配列は、それぞれ5/3′RACE法を用いて、同様に決定した。

TMCsおよびアストロサイトをコンフルエントになるまで培養した後、培養液中に500nM DEXを投与し2週間培養、マルチガスインキュベーターにより、酸素濃度を7%に調節し72時間培養、33mmHgの静水圧を負荷し72時間培養した。さらに、ブタTMCsには、専用のチャンバーと装置を用いて10%の伸展刺激を負荷し、24時間培養した。それぞれの培養細胞からTotal RNAを抽出し、豚オプチニュリンおよびミオシリンmRNAの発現レベルを、Real-time quantitative PCR法により測定した。

【結果】豚オプチニュリンおよびミオシリンは、TMCsとアストロサイトの両方に発現し、各アミノ酸配列はヒトと比較して、オプチニュリンで84%、ミオシリンで82%の相同性が認められた。

DEX投与では、オプチニュリンの発現は、TMCsでコントロールの67%、アストロサイトで48%に減少した。ミオシリンの発現は、TMCsで8.02倍、アストロサイトで5.57倍に増加した。

低酸素負荷では、オプチニュリンの発現量に、明らかな変化は認められなかったが、ミオシリンでは、アストロサイトで12時間後にコントロールの44%、72時間後は4%に減少した。TMCsでは、72時間後で11%に減少した。

静水圧負荷では、両培養細胞においてオプチニュリンおよびミオシリンの発現量に、明らかな変化は認められなかった。

伸展刺激では、TMCsで、オプチニュリンおよびミオシリンの発現 量に変化は認められなかった。

【結論】今回の実験では、DEX投与、低酸素負荷、静水圧負荷、または伸展刺激など、細胞環境を変えることにより、オプチニュリンとミオシリンは、それぞれ異なる反応を示した。これらの結果により、これら2つの遺伝子の異常により緑内障が引き起こされる際には、それぞれ異なったメカニズムの関与が示唆された。

#### 論文審査の要旨

オプチニュリン (OPTN) およびミオシリン (MYOC) 遺伝子は、 開放隅角緑内障の原因遺伝子であるが、両遺伝子の変異による開放 隅角緑内障の発症機序は解明されていない。本研究では、豚の眼球 を用いて実験を行った。先ず、OPTNおよびMYOC遺伝子をクローニ ングし、cDNAの塩基配列を決定した。さらに、豚の線維柱帯および 視神経乳頭部から分離培養して得られた培養線維柱帯細胞と培養ア ストロサイトを用いて、緑内障発症時に眼球内の組織にかかると考 えられる負荷 (ステロイド投与、低酸素負荷、静水圧負荷、伸展刺 激)によるOPTNおよびMYOCの発現量の変化をリアルタイム定量 PCR法にて検討した。その結果、豚OPTNおよびMYOCタンパクのア ミノ酸配列は、ヒトと比較した場合、OPTNで84%、MYOCで82%の 相同性を認めた。ステロイド投与では、OPTNの発現は減少しMYOC の発現は増加した。一方、低酸素負荷では、OPTNの発現量に明らか な変化は認められず、MYOCの発現は減少した。静水圧負荷および 伸展刺激では、両遺伝子の発現に明らかな変化は認められなかっ た。培養条件を変えることにより、OPTNとMYOC遺伝子はそれぞれ 異なる発現パターンを示すことから、両遺伝子の変異による緑内障 の発症機序は、それぞれ異なることが示唆された。

審査では、OPTNとMYOCの遺伝子変異による緑内障の遺伝形式について質問された。これに対し、いずれも常染色体優性遺伝であると回答された。負荷実験にアストロサイトを用いたことに関して、緑内障との関連について質問され、緑内障の進行に伴い視神経乳頭陥凹が生じ、アストロサイトが強く関与していると回答がなされた。低酸素負荷では、培養細胞の形態に変化が認められ、生残率の問題について質問された。これに対し、負荷時間の経過に伴って浮遊細胞が増えてくるが、通常の培養条件に戻すと再び静着し、増殖し始めたことから生残率に問題はないと回答された。

眼圧上昇による視神経障害は必ずしも視神経への圧迫によるとは 限らず、むしろ血管が圧迫されて生じる血流障害などの影響も考慮 すべきで、組織から分離された培養細胞で静水圧をかけても、その 結果は眼圧上昇を反映したものにならないとの指摘を受けたが、す でに眼球そのままの灌流組織培養を試みてうまくいかなかったの で、培養細胞で実験したと回答された。

以上により、本研究は今後なお検討すべき課題が残るものの、 OPTNとMYOC遺伝子の発現調節機構に相違があることを明らかに し、開放隅角緑内障の発症機序を解明する上で有意義な研究である と評価された。

論文審查担当者 主查 分子生物学 清水 信義

解剖学 仲嶋 一範 外科学 河瀬 凝

生理学 岡野 栄之

研究指導者:小口 芳久(眼科学)

学力確認担当者:北島 政樹、仲嶋 一範

審査委員長:仲嶋 一範

試問日: 平成16年3月31日