

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ー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	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0045">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0045</a>

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ー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】豚のオプチニュー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ーリンおよ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、豚オプチニュー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、オートシーケ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、豚オプチニュー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】豚オプチニュー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、オプチニューリンで 84%、ミオシリンで 82% の同一性が認められた。

DEX 投与では、オプチニューリンの発現は、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、オプチニューリンの発現量に、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ー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、オプチニュー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、オプチニュー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

オプチニューリン (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。まず、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思われる負荷 (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% の同一性を認めた。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置し、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に限らず、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ため、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。

論文審査担当者 主査 分子生物学 清水 信義  
解剖学 仲嶋 一範 外科学 河瀬 斌  
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