

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	吉田 光一
<p>学位論文題目</p> <p>Extracellular matrix gene expression in human trabecular meshwork cells following mechanical fluid flow stimulation</p> <p>(ヒト線維柱帯細胞への水流機械刺激による細胞外マトリックス遺伝子発現に関する研究)</p> <p>共著者名</p> <p>川井基史, 宇都宮嗣了, 石羽澤明弘, 宋勇錫, Mariana, Sayuri.B Udo, 田崎嘉一, 吉田晃敏</p> <p><i>International Journal of Ophthalmology, 2022; 15(3):388-393.</i></p> <p>研究目的</p> <p>眼圧（眼球内圧）は、毛様体で産生される房水の量と主流出路である線維柱帯-シュレム管を経た流出のバランスによって規定される。線維柱帯での房水流出抵抗を増加させる要因の1つとして細胞外マトリックス (ECM) の発現増加が知られている。ECMはCollagen (COL) やFibronectin (FN) のようなタンパク質で構成されるが、この増加により流出路の閉塞が起これば、房水流出抵抗が増大し、眼圧上昇が引き起こされる。またECMを基質として分解する酵素であるMatrix Metalloproteinase (MMP) は緑内障患者の房水中において活性が低下していることが知られている。これまでの研究で、シュレム管内皮細胞が水流機械刺激（シェアストレス）の変化を感知し管腔を拡張させ眼圧を下降させる調節機構を有することが知られている¹⁾。しかしながら、ヒト線維柱帯 (HTM) における水流機械刺激とECM発現の関係は十分に解明されていない。生体では網状組織間隙を房水が通過しているため、線維柱帯細胞は常に房水による水流機械刺激を受けていると考えられる。そこで本研究では、線維柱帯を流れる房水が細胞に与えるメカニカルストレスを「水流機械刺激」として捉えることにより、生体における房水流出を再現し、眼圧上昇の要因と考えられるECM及びECM分解に関連する遺伝子発現について評価した。</p> <p>材料・方法</p> <p>HTM細胞は市販されている初代培養細胞を使用した。継代培養したHTM細胞が生理的な機能を保持しているかどうかを評価するため²⁾、デキサメタゾン (DEX) 誘導性のMyocilin発現及びTransforming growth factor (TGF) -β2誘導性のFN及びCOLタンパク質発現をWestern Blotting (WB) で、貪食能をPhagocytosis Assayで調べた。シェアストレス存在下における細胞応答の評価を行う実験系は、これまで確立されている方法と同様に平行平板型流れ負荷装置を用いた³⁾。HTM細胞をスライドガラス上に播種し、ペリスタポンプを用いて水流を生じさせ、定常的な層流によるシェアストレスを0.2, 1.0 dyne/cm²の強度で12時間負荷した。その後細胞を回収し、ECM及びECM分</p>			

解に関連する遺伝子発現についてReal Time PCRで評価した。また、TGF- β シグナルの下流に位置するSmad2タンパク質のリン酸化をWBにて評価した。

成 績

継代培養したHTM細胞はDEX誘導性のMyocilin及びTGF- β 2誘導性のFibronectinタンパク質発現は有意に増加し、また貪食能も保たれていたことから、継代培養しているHTM細胞は生理的な機能を保持していることを確認できた。次にシェアストレスを与えたHTM細胞において、Real Time PCRで遺伝子発現を評価したところ、ECMを構成するCOL4A2 (3.08 \pm 1.64倍)、6A1 (1.43 \pm 0.46倍)、FN1 (1.47 \pm 0.27倍) が1.0 dyne/cm²において有意に上昇し、ECMを分解する酵素であるMMP-2 は0.2 dyne/cm² (2.09 \pm 0.65倍) 及び1.0 dyne/cm² (2.39 \pm 0.51倍) で有意に上昇したのに対し、セリタンパク分解酵素インヒビターであるPlasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は1.0 dyne/cm² (15.49 \pm 7.03倍) のみで有意に上昇した。ECMの産生を促進するTGF- β 2シグナルの下流に位置するSmad2タンパク質は1.0 dyne/cm² (10.79 \pm 4.40倍) のみで有意に増加した。

考 案

正常眼において房水が眼内を循環している状態は、本研究における水流機械刺激条件下と捉えることができ、生体における房水流出を再現したより生理的な反応を観察できる実験系と考えて研究を行った。本研究の結果より、水流機械刺激を与えた細胞におけるECM遺伝子及びPAI-1発現が亢進したことから、線維柱帯細胞が水流機械刺激に応答して房水流出抵抗を増大させている可能性が示唆された。さらに、TGF- β 2シグナル伝達の下流に位置するSmad2のリン酸化は水流機械刺激条件下で亢進しており、ECM遺伝子発現亢進を支持する結果であった。一方で水流機械刺激を与えた細胞上清中のTGF- β 1及びTGF- β 2タンパク質は検出できなかったため、水流機械刺激によってSmad2のリン酸化が引き起こされる機序の解明が今後の課題である。

緑内障では線維柱帯におけるCollagenやFibronectinなどのECMの異常増加による眼圧上昇が知られており、それらタンパクの産生・分解によるターンオーバーが関係している。本研究ではECMの分解酵素であるMMP-2遺伝子発現が水流機械刺激下で増加したことから、水流機械刺激がECMのターンオーバーに影響している可能性が示唆された。

しかしながら、生体では線維柱帯の網目構造を通過する際に複雑な水流が発生していると予想されることから、一定の層流を与える本実験系では限界があるため、動物の眼球に対し灌流液を流すことで隅角に機械刺激を与えるような実験系を用いた更なる研究が必要である。

結 論

水流刺激存在下において線維柱帯細胞を培養した結果、ECM及びECM代謝に関連する遺伝子変化が観察された。線維柱帯への房水の流れが機械的的刺激として細胞に影響することでECMのターンオーバーが行われ、眼内における眼圧の恒常性の維持に寄与することが示唆された。




引用文献

1. Ashpole NE, Overby DR, Ethier CR, Stamer WD. Shear stress-triggered nitric oxide release from Schlemm's canal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014; **55**: 8067-8076.
2. Keller KE, Bhattacharya SK, Borrás T, *et al.* Consensus recommendations for trabecular meshwork cell isolation, characterization and culture. *Exp Eye Res*. 2018; **171**: 164-173.
3. Ishibazawa A, Nagaoka T, Takahashi T, *et al.* Effects of shear stress on the gene expressions of endothelial nitric oxide synthase, endothelin-1, and thrombomodulin in human retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011; **52**: 8496-8504.

参考文献

1. 吉田光一, 山本譲, 田崎嘉一ほか11名と共著, 感染制御チーム薬剤師の介入による白内障手術に用いる予防注射抗菌薬の削減. *医療薬学*, 2019; **45**: 28-33.
2. Tasaki Y, Yamamoto J, Omura T, Noda T, Kamiyama N, Yoshida K, *et al.* Oxacam structure in non-steroidal anti-inflammatory drugs is essential to exhibit Akt-mediated neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cytotoxicity. *Eur J Pharmacol*. 2012; **676**: 57-63.
3. Okumura F, Yoshida K, Liang F, Hatakeyama S, MDA-9/syntenin interacts with ubiquitin via a novel ubiquitin binding motif. *Mol Cell Biochem*, 2011; **352**: 163-172.
4. Yoshida K, Watanabe M, Hatakeyama S, ZNRF1 interacts with tubulin and regulates cell morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009; **389**: 506-511.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	吉田 光一
審査委員長 川辺 淳一 			
審査委員 中山 恒 			
審査委員 宗 勇錫 			
学 位 論 文 題 目 Extracellular matrix gene expression in human trabecular meshwork cells following mechanical fluid flow stimulation (ヒト線維柱帯細胞への水流機械刺激による細胞外マトリックス遺伝子発現に関する研究) International Journal of Ophthalmology, 2022, 15(3), 388-393			
<p>緑内障発症/進行のリスク因子である眼圧上昇の機序解明のため、ヒト線維柱帯 (HTM) 細胞におけるシェアストレスの影響という観点に着目し、同機械ストレス反応について検討した研究である。</p> <p>HTM 培養細胞にシェアストレスを加えることにより細胞外マトリックス (ECM) の発現が亢進し、緑内障病態を反映する表現型を示すことを明らかにした。さらに、シェアストレスが TGFβ の下流にあるシグナル分子、Smad2 のリン酸化を引き起こしていることを明らかにし、線維柱帯を流れる房水のシェアストレスが、ECM 産生を介して眼圧上昇に影響している可能性をしめした。</p> <p>論文提出者は、各審査委員の試問において、自身の実験系の限界ならびに緑内障治療の現況を理解した上で、当該論文および関連領域に関する質問に適切な受け答えがなされた。また本研究成果は Int J Ophthalmology 誌に公表済みである。</p> <p>以上より本審査委員会は、本論文が博士 (医学) の学位に値するものと判断いたしました。</p>			