

## ヘパラン硫酸による神経堤細胞の分化制御機構の解明と 緑内障の新しい病態概念の確立

Elucidation for the role of heparan sulfate in neural crest cell differentiation and establishment of a new concept for glaucoma pathogenesis.

稲谷 大 (MASARU INATANI)

熊本大学・医学部附属病院・講師



### 研究の概要

隅角線維柱帯組織の異常は緑内障を発症させる。隅角線維柱帯組織の構成成分であるヘパラン硫酸の役割を解明した。マウスでヘパラン硫酸が欠損すると神経堤細胞の隅角線維柱帯組織への分化が阻害され、発達緑内障、Peters 奇形を発症した。神経堤細胞の分化誘導における TGFβ<sub>2</sub> シグナリングは、細胞表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンに依存していた。

研究分野：緑内障

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼科学

### 1. 研究開始当初の背景

眼組織は、その発生過程において、表層外胚葉、神経外胚葉、中胚葉に由来する組織と神経堤細胞に由来する組織に分類される。そのうち、神経堤細胞は、前房に分化する。前房は、眼内を循環し栄養を供給するための水分（房水という）を産生（毛様体で産生される）し排出（隅角線維柱帯組織）するために重要な組織である。この房水の循環異常によって、眼圧が上昇し緑内障を発症する。隅角線維柱帯組織にはグリコサミノグリカンと呼ばれる糖鎖がタンパクと結合して、プロテオグリカンとよばれる糖タンパクとして豊富に存在しており、緑内障では、その異常発現が以前から指摘されている。

### 2. 研究の目的

我々は、グリコサミノグリカンのうちヘパラン硫酸による神経堤細胞の分化制御機構を解明し、ヘパラン硫酸の発現異常によって緑内障がマウスにおいて発症するのかを検討した。さらに、その分子メカニズムを明らかにすることによって、ヘパラン硫酸糖鎖を介した緑内障治療戦略を検討した。

### 3. 研究の方法

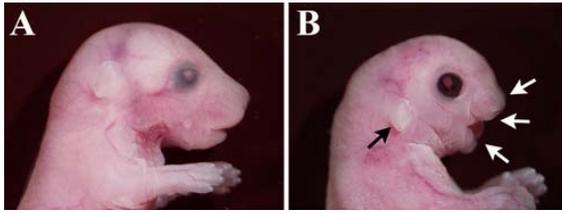
ヘパラン硫酸合成酵素 *Ext1* の遺伝子に対する神経堤細胞選択的なコンディショナルノックアウトマウスを作成し、その解析をお

こなうことによって、神経堤細胞の分化に対する役割と隅角線維柱帯組織発生のメカニズムを検証した。

明らかにされたヘパラン硫酸の役割を緑内障治療に応用するために、緑内障手術モデルとしてラットの濾過手術モデルを作成し、生体内のヘパラン硫酸の機能を制御し、その手術予後を改善するための研究をおこなった。また、どのような緑内障病型が手術成績に問題点を抱えているのかを明らかにするために、緑内障手術予後悪化因子の調査をおこなった。

### 4. これまでの成果

神経堤細胞選択的に発現する分子である *Wnt1* のプロモーターで誘導される *Cre* トランスジェニックマウスを *Ext1 flox* マウスと交配させ、発生段階の神経堤細胞でヘパラン硫酸を欠損させる実験をおこなった。変異マウスの顔面には口蓋裂、耳介奇形がみられ、眼組織には、眼瞼の欠損や虹彩裂、角膜の菲薄化と隅角の形成不全がみられた（図1）。これらの表現型は、ヒトの発達緑内障に合併する Peters 奇形に酷似していた。変異マウスの神経堤細胞ではヘパラン硫酸と結合能のある TGFβ<sub>2</sub> シグナリングが抑制されており、神経堤細胞の表面に発現するヘパラン硫酸が欠損すると、TGFβ<sub>2</sub> 刺激による細胞応答が抑制されることが確認された。さらに、TGFβ<sub>2</sub>



とヘパラン硫酸との相互作用が阻害される

図1 : A, 野生型マウス。 B, 神経堤細胞選択的ヘパラン硫酸欠損マウス。白矢印は口蓋裂、黒矢印は耳介奇形を示す。虹彩下方欠損も見られる。

ことによって、隅角線維柱帯組織に奇形を有するマウスが生じ、そのマウスは眼圧が上昇することがしめされた。以上の結果は、神経堤細胞の分化制御において、細胞表面に発現するヘパラン硫酸が  $TGF\beta_2$  リガンドと受容体との結合反応もしくは細胞内へのシグナル伝達に極めて重要な分子であることを反映している (J Clin Invest 2009)。

さらに、我々は、様々なヘパラン硫酸結合分子の作用がヘパラン硫酸の欠損によって抑制されることを確認した。このようなヘパラン硫酸による生理活性物質の作用調節機構は、緑内障手術の術後に眼圧上昇が再発する原因となる結膜癒痕形成に関わる成長因子の作用を抑えることにも応用できる。我々は、緑内障手術のうち世界で最も広くおこなわれている術式である線維柱帯切除術の手術成績を調査した。血管新生緑内障は予後不良な緑内障病型であり、その中でも特に若年者の血管新生緑内障の症例と過去の硝子体手術によって結膜に癒痕を伴う症例が予後不良であった (Am J Ophthalmol 2009)。この2つの因子は、線維芽細胞の活性化されやすい、もしくは、活性化していることと関連していると考えられる。今後、線維芽細胞のヘパラン硫酸を阻害することで、線維芽細胞の活性化を抑え、結膜癒痕形成を抑制し、ヒトの緑内障手術治療の成績を改善させることが期待できる。

## 5. 今後の計画

発達緑内障の発症メカニズムだけでなく、原発開放隅角緑内障などの成人でみられる緑内障での隅角線維柱帯組織の機能異常がヘパラン硫酸の欠損によって合併するのかを検証する。

また、ヘパラン硫酸の生理活性物質に対する制御機構を応用した緑内障治療研究に重点を置いて研究を推進する。

## 6. これまでの発表論文等

主な国際学術論文

1. Iwao K, Inatani M, et al. Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice by disturbing neural crest  $TGF-\beta_2$  signaling. **Journal of Clinical Investigation** 2009;119:1997-2008.
2. Iwao K, Inatani M, et al. Heparan sulfate deficiency in periocular mesenchyme causes microphthalmia and ciliary body dysgenesis. **Experimental Eye Research** 2010;90:81-88.
3. Takihara Y, Inatani M, et al. Trabeculectomy with mitomycin C for neovascular glaucoma: Prognostic factors for surgical failure. **American Journal of Ophthalmology** 2009;147:912-918.
4. Matsumoto Y, Irie F, Inatani M, et al. Netrin-1/DCC signaling in commissural axon guidance requires cell autonomous expression of heparan sulfate. **Journal of Neuroscience** 2007;27:4342-4350.
5. Iwao K, Inatani M, et al. Restricted post-trabeculectomy bleb formation by conjunctival scarring. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology** 2009;247:1095-1101.
6. Inatani M, Iwao K, et al. Intraocular pressure elevation after injection of triamcinolone acetonide: A multicenter retrospective case-control study. **American Journal of Ophthalmology** 2008;145:676-681.
7. Iwao K, Inatani M, et al. Fate mapping of neural crest cells during eye development using a *Protein 0* promoter-driven transgenic technique. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology** 2008; 246:1117-1122
8. Tanihara H, Inatani M, et al. Intraocular pressure-lowering effects and safety of topical administration of a selective ROCK inhibitor, SNJ-1656, in normal volunteers. **Archives of Ophthalmology** 2008;126:309-315.

研究代表者の受賞歴

1. Nakajima Award 2009
2. 第13回 Rohto Award
3. 第22回須田記念緑内障治療研究奨励基金
4. 平成21年日本眼科学会評議員会賞
5. 平成21年日本医師会医学研究助成ホームページ

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ganaka/kyousitu/staff.html#inatani>