OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Analysis of the role of Src kinase in intraocular pressure elevation in glaucoma
Author(s)	塚本, 晃久
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/70720
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　塚本　晃久　）	
論文題名	Analysis of the role of Src kinase in intraocular pressure elevation in glaucoma （緑内障の眼圧上昇におけるSrcキナーゼの役割の解析）

論文内容の要旨

緑内障は、進行性で不可逆の視野欠損が生じる疾患で、世界中で中途失明を引き起こす主要な原因疾患の一つになっている。緑内障の原因は不明であるが、眼圧上昇が危険因子であり、眼圧下降は唯一エビデンスのある治療法となっている。緑内障の病型のうち、最も患者数の多い原発開放隅角緑内障の眼圧上昇は、角膜と強膜の境界に位置する線維柱帯流出路において房水流出抵抗が増大することで生じると考えられている。房水流出抵抗増大の原因として、線維柱帯における細胞外基質の蓄積や線維柱帯の細胞骨格の変化が関与している可能性が示唆されているが、その分子機序は不明のままである。そこで本研究では、緑内障における眼圧上昇の分子機序を明らかにすることを目的として、線維柱帯細胞の機能変化の分子機序の解析を行った。

緑内障の眼圧上昇において重要な役割を果たしていると考えられているTransforming growth factor -β2（TGF-β2）をラットの眼球に注入すると眼圧上昇が誘発された。この時、細胞外基質や細胞骨格の制御を担う重要なシグナル伝達分子として知られているSrc family kinase（SFK）の強力な阻害剤であるdasatinibを同時投与すると眼圧上昇が有意に抑制された。このことから、TGF-β2誘導の眼圧上昇にSFKの活性が関与している可能性が示唆された。そこで、主要なSFKであるSrcに焦点をあてて、線維柱帯細胞を用いてSrcが関与する眼圧上昇の分子機序を解析することとした。まず、ヒト初代培養線維柱帯細胞にTGF-β2を添加すると、活性化したSrcが接着斑に集積すると同時に、細胞骨格再構成、細胞接着、細胞外基質の蓄積が促進されることが観察された。一方で、SFKの特異的阻害因子であるC-terminal Src kinase（Csk）をノックダウンした場合も、TGF-β2添加と同様の変化が誘導され、TGF-β2による線維柱帯細胞の変化にはSrc活性化が関与している可能性が示唆された。

さらに、TGF-β2により変動する遺伝子のマイクロアレイ解析を実施したところ、フィブロネクチンなどの細胞外基質遺伝子の発現亢進が定量的PCRにより確認され、それと同時に、TGF-β2自体の発現誘導も認められた。一方で、細胞外基質分解に関与するtissue-type plasminogen activator（tPA）の発現はTGF-β2により低下し、その発現調節にはSrcが関与していることが示唆された。また、TGF-β2により、Srcの足場タンパク質として知られるCasL（NEDD9）の発現が亢進し、Srcと相互作用して活性化させる可能性が示唆された。最後に、ラット眼球を用いたin vivo実験から、TGF-β2の投与により線維柱帯組織にフィブロネクチンが蓄積し，dasatinib処置によりその蓄積が抑制された。

以上の結果より、原発開放隅角緑内障との関連が示唆されるTGF-β2による眼圧上昇にはSrcシグナル経路の活性化が関与し、その分子機序として以下のような仮説が考えられた。TGF-β2は、Src活性化、CasL発現、アクチン線維集積、細胞外基質の蓄積、接着斑の形成を促進する。また、TGF-β2自体も発現亢進して正の制御を行う。発現亢進したCasLはSrcの活性化に関わることによりtPAの発現を低下させ、細胞外基質の分解を低下させる。これらの変化が、線維柱帯の組織リモデリングに影響して、その結果として、線維柱帯における房水流出抵抗が増大して眼圧上昇を誘発すると考えられる。この仮説は緑内障の眼圧上昇のメカニズムに新しい知見を与え、原因解明に寄与するものと考えられる。また、Srcシグナル経路は原発開放隅角緑内障における眼圧上昇の有望な薬剤標的になる可能性が考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ 塚本　晃久 ）	
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	岡田　雅人
	副 査　教授	三木　裕明
	副 査　教授	古川　貴久

論文審査の結果の要旨

緑内障は、進行性で不可逆の視野欠損が生じる疾患で、世界中で中途失明を引き起こす主要な原因疾患の一つになっている。緑内障の原因は不明であるが、眼圧上昇が危険因子であり、眼圧下降は唯一エビデンスのある治療法となっている。緑内障の病型のうち、最も患者数の多い原発開放隅角緑内障の眼圧上昇は、角膜と強膜の境界に位置する線維柱帯流出路において房水流出抵抗が増大することで生じると考えられている。房水流出抵抗増大の原因として、線維柱帯における細胞外基質の蓄積や線維柱帯の細胞骨格の変化が関与している可能性が示唆されているが、その分子機序は不明のままである。そこで本研究では、緑内障における眼圧上昇の分子機序を明らかにすることを目的として、線維柱帯細胞の機能変化の分子機序の解析を行った。

緑内障の眼圧上昇において重要な役割を果たしていると考えられているTransforming growth factor-β2（TGF-β2）をラットの眼球に注入すると眼圧上昇が誘発された。この時、細胞外基質や細胞骨格の制御を担う重要なシグナル伝達分子として知られているSrc family kinase（SFK）の強力な阻害剤であるdasatinibを同時投与すると眼圧上昇が有意に抑制された。このことから、TGF-β2誘導の眼圧上昇にSFKの活性が関与している可能性が示唆された。そこで、主要なSFKであるSrcに焦点をあてて、線維柱帯細胞を用いてSrcが関与する眼圧上昇の分子機序を解析することとした。まず、ヒト初代培養線維柱帯細胞にTGF-β2を添加すると、活性化したSrcが接着斑に集積すると同時に、細胞骨格再構成、細胞接着、細胞外基質の蓄積が促進されることが観察された。一方で、SFKの特異的阻害因子であるC-terminal Src kinase（Csk）をノックダウンした場合も、TGF-β2添加と同様の変化が誘導され、TGF-β2による線維柱帯細胞の変化にはSrc活性化が関与している可能性が示唆された。

さらに、TGF-β2により変動する遺伝子のマイクロアレイ解析を実施したところ、フィブロネクチンなどの細胞外基質遺伝子の発現亢進が定量的PCRにより確認され、それと同時に、TGF-β2自体の発現誘導も認められた。一方で、細胞外基質分解に関与するtissue-type plasminogen activator（tPA）の発現はTGF-β2により低下し、その発現調節にはSrcが関与していることが示唆された。また、TGF-β2により、Srcの足場タンパク質として知られるCasL（NEDD9）の発現が亢進し、Srcと相互作用して活性化させる可能性が示唆された。最後に、ラット眼球を用いたin vivo実験から、TGF-β2の投与により線維柱帯組織にフィブロネクチンが蓄積し，dasatinib処置によりその蓄積が抑制された。

以上の結果より、原発開放隅角緑内障との関連が示唆されるTGF-β2による眼圧上昇にはSrcシグナル経路の活性化が関与し、その分子機序として以下のような仮説が考えられた。TGF-β2は、Src活性化、CasL発現、アクチン線維集積、細胞外基質の蓄積、接着斑の形成を促進する。また、TGF-β2自体も発現亢進して正の制御を行う。発現亢進したCasLはSrcの活性化に関わることによりtPAの発現を低下させ、細胞外基質の分解を低下させる。これらの変化が、線維柱帯の組織リモデリングに影響して、その結果として、線維柱帯における房水流出抵抗が増大して眼圧上昇を誘発すると考えられる。この仮説は緑内障の眼圧上昇のメカニズムに新しい知見を与え、原因解明に寄与するものと考えられる。また、Srcシグナル経路は原発開放隅角緑内障における眼圧上昇の有望な薬剤標的になる可能性が考えられる。

以上の成果は、未だによく分かっていない眼圧の制御機構の解明に寄与し、緑内障発症の分子機序解明に繋がる新しい知見であり、また、新規治療薬開発に貢献することが期待される。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。