

ヒト角膜特異的マイクロアレイの開発による角膜疾患の分子病態の解明

●木下 茂 ◆西野 輔翼 ◆足立 和加子

京都府立医科大学医学部

〈研究の目的と進め方〉

本研究の目的は、角膜特異的なマイクロアレイを用い、円錐角膜と正常角膜における遺伝子の発現量比較の大規模解析を行い円錐角膜の病態の解明に踏み込むことにある。また円錐角膜のモデルマウスを用い、連鎖解析によって円錐角膜に関連する染色体領域、特にHLAとの関係を調べる。これらによって円錐角膜の原因遺伝子や修飾遺伝子を絞り込み、次に個々の遺伝子の変異や多型解析を行い、最終的にはアトピー素因との関連を含め、円錐角膜の関連遺伝子を明らかにし、早期発見のためのスクリーニング法の開発を目指す。具体的な手順としては、我々独自の正常ヒト角膜cDNAライブラリーのデータを参照しcDNAマイクロアレイは作成する。次に円錐角膜を自然発症するマウスをバッククロスしたのち、マイクロサテライトマーカーにて連鎖解析を行い、円錐角膜と関連するMHC領域を同定する。これらを元に円錐角膜患者と正常者の間で差のあるHLA領域を同定する。

〈研究開始時の研究計画〉

1. 角膜特異的cDNAマイクロアレイの作成
角膜上皮細胞特異的な約1000個の遺伝子クローンに対して特異性の高い配列を決定して、その配列を増幅させるために必要なプライマーを作成する。PCRにより増幅したcDNA断片をマイクロアレイスポッターを用いてスライドグラス上に固定する。
2. 円錐角膜と正常角膜における遺伝子発現の比較
角膜移植時に採取した最重症の円錐角膜組織（アトピー性皮膚炎合併症例および非合併症例）と海外ドナーから得た正常角膜組織のそれぞれからRNAを抽出し逆転写反応により蛍光標識dNIPを取り込ませたcDNAとする。これを角膜特異的マイクロアレイにハイブリダイズさせ、蛍光イメージスキャナーによって蛍光強度を測定、解析する。正常角膜と円錐角膜で発現量に差の見られた遺伝子を検索し同定する。
3. 円錐角膜マウスを用いた円錐角膜関連遺伝子の同定。
円錐角膜自然発症モデルマウス（SKC/A/J Hybrid）をSKCマウスとバッククロスして連鎖解析を行う。
4. ヒト円錐角膜に関連するタイプの同定。
円錐角膜患者より血液を採取し、細胞障害試験により円錐角膜と関連するHLAタイプを同定する。
5. ヒト円錐角膜におけるCathepsinV/L2の発現解析。
RT-PCRおよび免疫染色にてヒト円錐角膜におけるCathepsinV/L2の発現を検討する。

〈研究期間の成果〉

我々はヒト角膜上皮の遺伝子発現プロファイルのデータをもとに角膜特異的なマイクロアレイの作成に必要な遺伝子を絞り込み、配列の検定を行った。発現頻度の高いものから順に既知遺伝子、未知遺伝子を問わず角膜上皮で優位に発現しかつ特異性の高い遺伝子を約100個選択し、既知遺伝子ではデータベース検索から特異性の高い配列を、未知遺伝子では比較的特異性が高いといわれて

いる3'UTR領域の配列を、各々200bp以上を確保した。

角膜上皮は組織が小さく得られるRNA量は非常に少ない。角膜上皮から抽出したtotal RNAの量的、質的検定を市販のマイクロアレイで検討した。角膜移植時に得られた角膜上皮よりtotal RNAを抽出したところ、質的にはマイクロアレイに充分使用しうるものであることが明らかになった。しかしながらこれをマイクロアレイで使用するには2ラウンド以上の増幅を行う必要があり、少数の遺伝子を対象として予備実験を行ったところ、増幅前後のデータの再現性に大きな問題があることが明らかとなった。

円錐角膜のモデルマウスにおいては、円錐角膜は常染色体劣勢遺伝の形式で遺伝し、通常雄のマウスにのみ認められたが、興味深いことにアンドロゲンを投与すると雌のマウスでも発症を認めた。連鎖解析では円錐角膜の形質はマウスの17番染色体にあるMHC領域と極めて高い相関を認めた1。

またヒト円錐角膜に関連するHLAタイプとしてHLA-A26,B40,DR9を世界で最初に見いだした2。このことは円錐角膜の病態に免疫系が関与していることを示唆するものと考えられ、円錐角膜患者にアトピー性皮膚炎の合併例が極めて多いことと考え合わせると非常に興味深い。また我々独自の正常ヒト角膜cDNAライブラリーのデータより角膜上皮細胞に特異的であることがわかったCathepsinV/L2については、円錐角膜にて発現が亢進していることが明らかとなった3。このことは円錐角膜においてはOxidative stressによる組織破壊が起こっていることを示唆する。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究成果は初めて円錐角膜のモデルマウスを報告し、さらに関連するMHC領域およびHLAタイプを発見したという点で画期的なものであると我々は考えている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初の計画では角膜上皮に特異的なcDNAマイクロアレイを作成した後、角膜上皮細胞より得られた微量のRNAを増幅し、これを用いて遺伝子発現解析を行う予定であったが、当時の技術ではRNAを増幅した場合、再現性のあるデータを得ることが非常に困難であることが予備実験で明らかとなった。このためマイクロアレイの作成自体を断念せざるを得なかった。

〈今後の課題〉

現在のRNA増幅技術を用いれば角膜上皮細胞のように微量のRNAしか得られない場合でも十分に再現性のあるデータを得ることが可能であると思われ、ヒト角膜特異的マイクロアレイの開発については今後の課題であると考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0602071112

Tachibana, M., Adachi, W., Kinoshita, S., Kobayashi, Y., Honma, Y., Hiai, H. and Matsushima, Y., Androgen-dependent hereditary mouse keratoconus: linkage to an MHC region, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (1) , 51-57 (2002) .

2. 0602071105

Adachi, W., Mitsuishi, Y., Terai, K., Nakayama, C., Hyakutake, Y., Yokoyama, J., Mochida, C. and Kinoshita, S., The association of HLA with young-onset keratoconus in Japan, *Am J Ophthalmol*, 133 (4) , 557-559 (2002) .

3. 0602071117

Kenney, M. C., Chwa, M., Atilano, S. R., Tran, A., Carballo, M., Saghizadeh, M., Vasiliou, V., Adachi, W. and Brown, D. J., Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46 (3) , 823-832 (2005) .

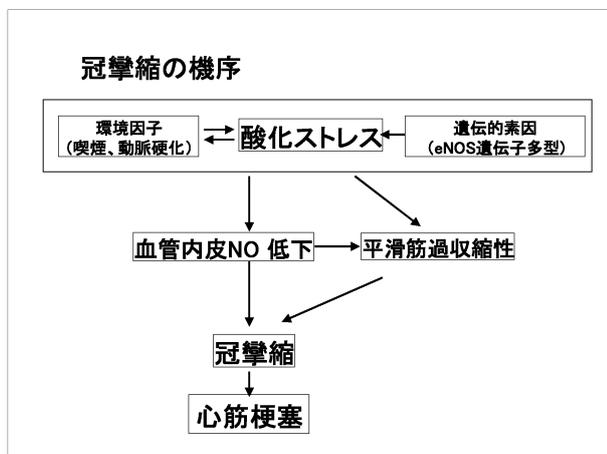
酸化ストレス関連分子の遺伝子多型を基盤とする冠攣縮の病態解明と診断・治療法の開発

●久木山 清貴 ◆川端 健一 ◆齊藤 幸生 ◆藤岡 大佑

山梨大学大学院医学工学総合研究部内科学講座第二教室

＜研究の目的と進め方＞

酸化ストレスに対する防御システムに重要である還元型グルタチオン（GSH）産生の律速酵素であるγ-Glutamate-cysteine ligase（GCL）に関して、この遺伝子多型を基盤として冠動脈攣縮（冠攣縮）の発症・病態の機序解明とともに本症の新しい診断・治療法の開発を行う。GCL遺伝子多型に関しては我々によって見出された直後で未だ詳細には解析されておらず、本研究にて解析する。



＜研究開始時の研究計画＞

- (1) GCL遺伝子多型の同遺伝子機能に及ぼす影響とその機序の解明。
- (2) GCL遺伝子多型が冠攣縮の発症および病態と関連することを示す。
- (3) GCL遺伝子多型の冠攣縮の疾患感受性と臨床的表現型に与える影響を検討する。

＜研究期間の成果＞

- (1) GCL遺伝子多型の同遺伝子機能に及ぼす影響とその機序

GCL調節サブユニット（GCL modifier subunit; GCLM）遺伝子の5' 非翻訳領域の遺伝子多型を検索した結果、-588C/Tと-23G/Tの2つの完全にリンクした遺伝子多型を発見した。

Luciferase reporter gene assayにより遺伝子多型がプロモーター活性に及ぼす影響を検討した。その結果、酸化ストレスに暴露させるとプロモーター活性は増加したが、-588C/T遺伝子多型は増加の程度に影響を与え、TアレルでCアレルの40～50%と低下していた。2つの遺伝子多型のうち、-588C/T遺伝子多型が機能的遺伝子多型であった。さらに、ヒト末梢血より分離した単球のGCLM mRNA発現は、酸化ストレス刺激により増加したが、その増加は、CC遺伝子型を有する細胞に比べCT遺伝子型を有する細胞で有意に減少していた。また、血漿GSHレベルを電気化学検出器を併用した高速液体クロマトグラフィにより測定した結果、CC遺伝子型グループに比べ

CT+TT遺伝子型グループで有意にGSHレベルが低下していることが明らかになった。

- (2) GCL遺伝子多型が冠攣縮の発症および病態との関連
冠動脈造影にて診断された心筋梗塞患者429例とコントロール症例428例において、アレル頻度を検討した。その結果、-588T遺伝子多型がコントロール群より心筋梗塞群において有意に高頻度に認められた（CT+TT genotypes: 心筋梗塞群 31.5% versus コントロール群 19.2%, $P < 0.001$ ）。ロジスティック重回帰分析にて-588T遺伝子多型は従来言われているような冠動脈危険因子と同様に独立した心筋梗塞の危険因子であった（odds ratio, 1.98; 95% confidence interval, 1.38 to 2.83; $P < 0.001$ ）。

-588T遺伝子多型の頻度の心筋梗塞例と対照例における比較検討

	Control subjects (n=428)	Patients with myocardial infarction (n=429)	OR (95% CI)	P
-588C/T, -23G/T				
GCLM/TT-TT	2/428 (0.5%)	16/429 (3.7%)	-	-
GCLM/CT-GT	80/428 (18.7%)	119/429 (27.8%)	-	-
GCLM/CC-GG	346/428 (80.8%)	294/429 (68.5%)	-	-
-588T allele vs C allele	-	-	1.96 (1.41-2.65)	<0.001
-588TT and CT vs CC	-	-	1.94 (1.47-2.61)	<0.001
-588TT vs CT and CC	-	-	8.25 (1.89-36.11)	<0.001

-588T遺伝子多型の心筋梗塞の危険因子として検討 -ロジスティック重回帰分析

Variables	beta	SEM	P	OR (95% CI)
-588T polymorphism	0.68	0.18	<0.001	1.98 (1.38-2.83)
Sex (men)	1.06	0.19	<0.001	2.89 (1.99-4.22)
Age (>70 y.o.)	0.77	0.17	<0.001	2.15 (1.55-3.00)
Hypercholesterolemia	0.74	0.18	<0.001	2.09 (1.48-2.96)
Diabetes mellitus	0.63	0.18	<0.001	1.88 (1.32-2.68)
Hypertention	0.51	0.16	0.002	1.66 (1.21-2.28)
Cigarette smoking	0.31	0.18	0.088	1.37 (0.96-1.96)
Body mass index	0.04	0.19	0.832	1.04 (0.72-1.51)
Constant	-1.95	0.22	<0.001	-

-588T polymorphism: -588TT and -588CT combined

そこでGCLM遺伝子多型と血管内皮NOとの関連を検討した。冠動脈造影において-588T遺伝子多型はアセチルコリン（ACh）冠動脈注入に対する冠動脈径は有意に減少し、冠血流の増加は減弱した。さらにACh投与後にNO合成阻害薬を冠動脈注入すると野生型ではAChの反応がNitric Oxide Synthase（NOS）阻害剤であるNG-monomethyl L-arginine（L-NMMA）によりブロックされるが-588T遺伝子多型ではその反応は認めなかった。これらから、-588T遺伝子多型は冠動脈内皮のNO合成と遊離が低下しており、その結果内皮機能が低下していることが示唆された。

- (3) GCL遺伝子多型の冠攣縮の疾患感受性と臨床的表現型に与える影響の検討

1) 冠動脈トーンヌスに対する喫煙の影響：

冠動脈内アセチルコリン注入により太い部分の冠動脈は、非喫煙者においては全体としてやや拡張傾向を示したが、喫煙者では収縮した。硝酸イソソルバイドによる血管内皮非依存性の冠動脈拡張反応は喫煙者と非喫煙者で同等であった。また、アセチルコリンは冠血流量を全例において増加させたが、その程度は喫煙者に比べて非喫煙者では低下していた。L-NMMAにより全例において冠動脈は収縮したが、喫煙者においては非喫煙者に比