（別紙様式第３号）

論　文　要　旨

論　文　題　目

Myocilin Gene Expression in the Trabecular Meshwork of Rats in a Steroid-Induced Ocular Hypertension Model

（ステロイド点眼高眼圧ラットモデルの隅角線維柱帯におけるミオシリン遺伝子の発現）

氏名　澤口　桂

論文要旨

目的：点眼あるいは内服によるステロイド治療により高眼圧、緑内障が発症することが知られている。しかしその発症機序に関してはいまだに不明の点が多い。本研究ではステロイド点眼によりラットに高眼圧モデルを作製し、緑内障遺伝子の一つであるミオシリンの発現を調べ、ミオシリンとステロイド高眼圧の関係について検討した。

方法：ラット眼に1日4回連日デキサメタゾンを点眼し高眼圧モデルを作製した（デキサメタゾン点眼群）。点眼期間は1週、2週、および4週とした。同じ週齢の無処置のラットを対照群とした。眼圧は麻酔下にトノペン眼圧計を用いて測定した。房水流出抵抗の場である線維柱帯およびシュレム氏管内壁におけるミオシリンの発現を調べるために、1）蛋白発現量の検討には、抗ミオシリン抗体を用いた免疫染色を行い、2）mRNA発現量の検討にはin situハイブリダイゼーション法を行った。NIHソフトウェアを用いて染色陽性部位の面積を

＊論文要旨は3枚（1200字以内）にまとめること。

論文要旨

数値化し染色の程度を半定量化し対照群とデキサメタゾン点眼群でそれぞれ比較検討した。

結果：眼圧はデキサメタゾン点眼開始後2週間目より、対照群（2週間目）に比して有意に上昇した（P<0.01）。しかしながら線維柱帯、シレム氏管内壁におけるミオシリンの発現は蛋白およびmRNA発現量において対照群と比較して有意な差を認めなかった。

結論：ミオシリンは緑内障遺伝子としてはじめて発見され、in vitroでの研究では培養線維柱帯細胞にステロイドの負荷で発現が増強されることが報告されている。またステロイド緑内障との関連ついてもこれまでに示唆されてきた。しかしながら遺伝子工学を用いた近年の研究では、ミオシリンのノックインおよびノックアウトマウスにおいては、眼圧上昇は来さないことが報告され、変異のない正常ミオシリンの発現の増減は高眼圧、緑内障発症に関連がない可能性が示唆されていた。今回

＊論文要旨は3枚（1200字以内）にまとめること。　（20×20）

論文要旨

の実験では、ステロイド点眼によりラット眼に高眼圧が誘発されたが、それにもかかわらず房水流出抵抗の場である隅角線維柱帯においてミオシリンの蛋白およびmRNAの発現量に明らかな変化は認められなかった。このことは緑内障遺伝子の一つであるミオシリンは、比的短期間に誘導されたステロイド誘発高眼圧モデルの発症には、関与していない可能性が高いのが示された。

＊論文要旨は3枚（1200字以内）にまとめること。

(20×20)

平成17年12月27日

（別紙様式第７号）

論文審査結果の要旨

報告番号	＊課程博／論文博　第　　号	氏　名	澤口　桂子
論文審査委員	審査日	平成17年12月21日	
	主査教授	小杉忠誠	印
	副査教授	金澤浩二	
	副査教授	植田夏一郎	

（論　文　題　目）

Myocilin Gene Expression in the Trabecular Meshwork of Rats in a Steroid-induced Ocular Hypertension Model

（ステロイド点眼高眼圧ラットモデルの隅角線維柱帯におけるミオシリン遺伝子の発現）

（論文審査結果の要旨）

上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究の成果の意義、学術的水準につき慎重に審査し、以下の審査結果を得た。

１　研究の背景と目的

原発性開放隅角緑内障とステロイド誘発高眼圧症との関連が臨床的に知られており、ステロイドによる反応を制御する遺伝子が原発性開放隅角緑内障の発症に関与することが、これまでに示唆されていた。ミオシリン遺伝子の変異が若年性開放隅角緑内障患者の3－5%にみられるとの報告もある。一方培養線維柱帯細胞においてミオシリン遺伝子がステロイド応答性に発現誘導され、その発現の時間経過、用量反応の特徴がステロイド誘発高眼圧症の発現経過に相関しているのが示されている。このような in vitro の実験結果から、ミオシリンがステロイド誘発高眼圧症およびステロイド緑内障の発症に重要な関与をしている可能性が指摘されている。しかしながら、ステロイドによるミオシリン遺伝子、蛋白の過剰発現が、高眼圧の直接的な原因となっているのか、単に随伴する現象なのかは in vivo においては未だに結論を得ていない。本研究の目的は、短期間に誘導されたステロイド誘発高眼圧ラットモデルを用いて、そのモデルラットの隅角線維柱帯組織におけるミオシリン遺伝子、蛋白の発現変化を、摘出した組織で検討することである。すなわち、高眼圧の発症と線維柱帯領域のミオシリン発現に直接的相関性がみられるかを検討した。

備考　１　用紙の規格は，Ａ４とし縦にして左横書とすること。
　　２　要旨は800字～1200字以内にまとめること。
　　３　＊印は記入しないこと。

平成 17年 12月 27日

（別紙様式第７号）

論文審査結果の要旨

2　研究内容

実験方法：実験動物には７週齢の雄性 Wistar ラットを用いた。両眼に１日４回デキサメタゾン点眼を行った（デキサメタゾン点眼群）。点眼期間は１週間、２週間、４週間とした。対照として同じ週齢で点眼を行わずに飼育したラット（対照群）を用いた。点眼開始前と点眼期間の終了時に体重、および TONO-PEN による眼圧を測定した。点眼期間終了後、過剰の麻酔薬投与後に灌流固定を行い、抜眼を行った。得られた組織切片を用いて免疫組織染色と in situ hybridization を行った。免疫組織染色は、LSAB II kit を用いて行った。１次抗体はヒトミオシリン蛋白のアミノ酸組成に一致する抗原を家兎に感作し作成したものを用いた。すなわち、anti-TIGR-33（TIGR の 33-43 アミノ酸残基）抗体、anti-TIGR-148（TIGR の 148-161 アミノ酸残基）抗体を用いた。ラットミオシリン cDNA の 925-1421 塩基配列部位を PCR 反応により増幅して得られた cDNA フラグメントを pBluescript II KS(−)にサブクローニングし、in situ hybridization に用いる cRNA プローブ合成用鋳型プラスミドを作製した。digoxigenin (DIG)-UTP 標識化 cRNA プローブは in vitro transcription 法により合成した。免疫組織染色および in situ hybridization の組織像は、デジタル画像として取り込み、線維柱帯とシュレム氏管を含む領域を特定の閾値で２階調化した後、染色陽性である黒色部位の面積を測定し、その値を発現強度として半定量化した。

実験結果：デキサメタゾン点眼群では、対照群に比して、体重の減少が有意にみられた。またデキサメタゾン投与群では、投与開始２週後、４週後に、対照群に比して眼圧の有意な上昇がみられた。またデキサメタゾン投与４週後では、デキサメタゾン投与１週後の眼圧に比して、有意の上昇がみられたが、２週後ではそれらの間には有意差はみられなかった。免疫組織染色では、対照群において週齢の増加と共にミオシリン遺伝子発現量の増加傾向がみられた。しかしながら、デキサメタゾン投与群と対照群の比較では、発現量に有意差はみられなかった。また、in situ hybridization の検討では、対照群の線維柱帯、シュレム氏管周囲にミオシリン mRNA の発現がみられた。しかしながら、デキサメタゾン投与群と対照群の間には、mRNA 発現量に有意差はみられなかった。以上の結果から、比較的短期間に誘導されたステロイド誘発高眼圧症の発症には、ミオシリンは直接的には関与していないのが示唆された。

3　研究成果の意義と学術的水準

本研究は、動物実験において、ステロイド誘発による早期発症の高眼圧症モデルでの、高眼圧とミオシリンの発現の直接的関係性をはじめて追及したものである。ミオシリンが高眼圧症の発症に直接的関係性を有していない点を明らかにしたものである。これらの学術的意義は高いと考えられる。

以上により、本論文は学位授与に十分に値する内容であると判断した。