京都大学学術情報リポジトリ
KURENAI 紅
Kyoto University Research Information Repository

京都大学
KYOTO UNIVERSITY

Title	The Effect of Rho-Associated Protein Kinase Inhibitor on Monkey Schlemm's Canal Endothelial Cells.(Abstract_要旨)
Author(s)	Kameda, Takanori
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2013-03-25
URL	http://hdl.handle.net/2433/174821
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

Kyoto University

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	亀 田 隆 範
論文題目	The Effect of Rho-Associated Protein Kinase Inhibitor on Monkey Schlemm's Canal Endothelial Cells. （サルシュレム管内皮細胞に対するROCK阻害剤の効果）		

（論文内容の要旨）

霊長類において眼内の房水は毛様体無色素上皮で産生され、主に線維柱帯とシュレム管を介する主経路と呼ばれる経路から眼外へ排出される。細胞骨格薬剤である ROCK 阻害剤は眼圧下降作用があり今後の緑内障薬物治療に有望である。ROCK 阻害剤はこれまで主に線維柱帯細胞に対する作用の解析が行われてきたが、房水流出抵抗の中心と考えられているシュレム管内皮（SCE）細胞に対する作用の解明は十分ではなかった。本研究ではまず ROCK 阻害剤（Y-27632）の房水流出率に与える影響を調べるために眼内灌流圧を一定にして薬剤を灌流する系を作成した。カニクイザル摘出眼球を用いて房水流出率を測定したところ、ROCK 阻害剤により房水流出率が増加することを確認できた。さらに灌流眼球の電子顕微鏡による観察により、ROCK 阻害剤を灌流した眼球の SCE において巨大空胞が増加することを確認した。次に ROCK 阻害剤の SCE 細胞に与える影響を調べるためにカニクイザル摘出眼球より SCE 細胞の単離培養を行った。SCE 細胞のバリア機能に対する ROCK 阻害剤の影響を調べるために細胞シートを作成し電気抵抗（TEER）とフルオレセイン色素の透過性試験を用いて測定したところ、ROCK 阻害剤処理により電気抵抗の低下と透過性の亢進を確認し、ROCK 阻害剤によるバリア機能の変化を確認できた。細胞間接着因子に与える影響を免疫細胞化学法にて行ったところ、ROCK 阻害剤処理により ZO-1、claudin-5 の局在変化と細胞間隙拡大を促すことを確認した。SCE 細胞の細胞間接着因子の局在変化は別のアクチンの重合を阻害する薬剤である latrunculin B においても確認した。一方で ROCK 阻害剤処理はアクチンフィラメントを安定化させる jasplakinolide の前処理を行うことで、F-actin の安定化と細胞間接着因子の局在変化を減少させることを確認した。さらに、ROCK 阻害剤処理後の遺伝子発現変化を調べるためにマイクロアレイを用いて網羅的に検索を行い、機能分類を行ったところ、12544 個の遺伝子のうち、57 の遺伝子の発現増加と 15 の遺伝子の発現減少を認め、細胞内カルシウム濃度調節にかかわる遺伝子群の発現変化を認めた。そこで SCE 細胞において Fluo-4/AM を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を評価したところ、カルシウムイオノフォアである A23187 処理による細胞内カルシウム濃度増加を抑制する働きが ROCK 阻害剤にあることが確認できた。さらに細胞内カルシウム濃度を直接変化させる A23187 処理により SCE 細胞シートの電気抵抗は上昇することから、細胞内カルシウム濃度の変化が SCE 細胞のバリア機能を変化させる作用があることを確認できた。これらの知見から ROCK 阻害剤の眼圧下降機序として SCE 細胞における細胞間接着の変化、細胞内カルシウム濃度の変化が新規に示唆された。さらにこれらの新規の作用機序は今後の緑内障薬物治療に有意義な知見となる可能性がある。

（論文審査の結果の要旨）

ROCK 阻害剤は、臨床試験においても眼圧下降効果が確認され、その奏功機序は房水流出の主経路にあると推定されている。房水流出抵抗の主座はシュレム管内皮（SCE）と傍シュレム管領域に局在するが、ROCK 阻害剤の SCE に対する影響はまだ解明されていない。そこで本研究では、SCE 細胞を用いた基礎研究を行った。

サル摘出眼球から SCE 細胞を単離培養し、ROCK 阻害剤投与により細胞シートの透過性の亢進を認めた。さらに ROCK 阻害剤投与で、SCE 細胞の細胞骨格（アクチン）の分布変化と細胞間結合装置の構成分子である ZO-1、クローディン 5 の局在変化を認めた。細胞間接着分子の局在変化は Rho 非依存性のアクチン重合阻害剤においても確認された一方で、アクチン安定化剤の前処理で抑制されることから、アクチン再分布と関連して細胞間結合装置の変化が起こり、流出抵抗が低下することが示唆された。さらに ROCK 阻害剤を負荷された SCE 細胞での遺伝子発現変化について、マイクロアレイにより、細胞外基質の制御と細胞内カルシウム濃度調節に関わる遺伝子群の発現変化を認めた。SCE 細胞の細胞内カルシウム濃度の変化に関連して経内皮電気抵抗が変化し、ROCK 阻害剤の細胞内カルシウム濃度増加を抑制する作用を認めた。

以上の研究は、ROCK 阻害剤の眼圧下降効果に対する新規の作用機序の解明に貢献し、今後の緑内障薬物治療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成２５年２月６日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　　年　　月　　日　以降