

論文の内容の要旨

論文題目 緑内障病態における TGF- β とオートタキシンの関与

氏名 五十嵐 希望

緑内障は不可逆性の視力、視野障害をきたす進行性の難治性の視神経症である。眼内圧である眼圧は眼内を循環する房水の産生と流出路からの排出のバランスで制御されている。眼圧上昇は緑内障の最も重要なリスクファクターであり、眼圧下降治療のみが現在のところ唯一エビデンスのある緑内障治療手段である。しかし、緑内障病態における眼圧上昇機序にはいまだ詳細は不明な点が多い。

本論文では我々が行ってきた研究の結果から新たになった知見について述べる。

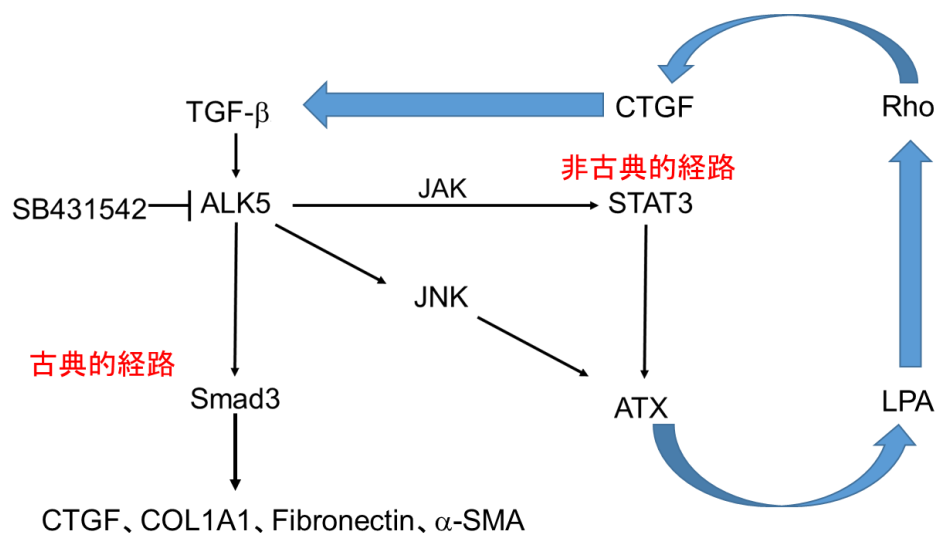
緑内障眼での眼圧上昇は房水流出路のうちの主流出路の抵抗増大によるとされ、房水流出路である隅角で観察される隅角線維柱帯 (TM) の線維化、細胞外マトリックス (ECM) の異常沈着、シュレム管内皮細胞 (SCE) におけるバリア機能亢進等に対して、房水中の様々な生理活性物質の関与が指摘されている。特に線維化に関わる代表的サイトカインの一つ、トランスフォーミング増殖因子- $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) は代表的病型である開放隅角緑内障 (POAG) での房水中高値が報告され緑内障病態への関与が示唆されたてきたが、非常に高い眼圧値や大きな眼圧変動を示すことが多い続発緑内障 (SOAG) や落屑緑内障 (XFG) では低値であり、これらの病型で眼圧上昇に関わる房水中の因子は不明であった。

これまで我々のグループによる検討で、線維化に関与し房水流出抵抗増加に寄与することが報告されている脂質メディエーターの一つ、リゾフォスファチジン酸 (LPA) およびその産生酵素オートタキシン (ATX) に着目し各緑内障病型の房水解析を行ったところ、緑内障眼で LPA、ATX が有意に上昇、特に SOAG、XFG で POAG と比較しても高値であり、また眼圧上昇と有意な相関を示すことを見出した。また、ヒト隅角組織および培養ヒト線維柱帯細胞 (hTM) の解析から、緑内障眼、特に SOAG で TM に ATX の発現上昇がみられることから、ATX-LPA 経路が SOAG や XFG の病態に関与している可能性が示唆された。さらに SOAG の病態に注目して行った検討では、SOAG をしばしば併発する炎症性ぶどう膜炎のポスナーシュロスマン症候群 (PSS) において、房水中のサイトメガロウイルス (CMV) 陽性症例では特に高眼圧を伴う難治性緑内障が多いことが知られているが、房水中の ATX および TGF- $\beta 1$ 濃度が SOAG を発症している CMV 陽性 PSS において、SOAG を発症していない CMV 陽性 PSS 症例および CMV 陰性 PSS 症例と比較して有意に上昇していることが確認できた。hTM における CMV 感染は ATX および TGF- $\beta 1$ の発現を有意に上昇させ、CMV 感染させた hTM の培養上清によって hTM や SCE における線維化、ECM の沈着、SCE の透過性低下が誘導されることが確認された。眼内での ATX および LPA の発現誘導と長期の TGF- $\beta 1$ の発現上昇が SOAG 病態の主経路の流出抵抗増大および眼圧上昇に関与していると考えられた。

PSSに伴うSOAGの房水中でTGF-β1が上昇している一方でTGF-β2低値の傾向がみられたことから、本研究ではまずTGF-βアイソフォームTGF-β1-3とATXについて新規多数例の房水解析を行った。結果、ATX、TGF-β1、TGF-β3が眼圧と正の相関を示した一方で、TGF-β2は眼圧との相関を示さなかった。また、緑内障病型毎にATX/TGF-β2比に有意差がみられ、ATXとTGF-βのバランスが緑内障病型において新しいバイオマーカーとなる可能性、これらのメディエーターの間にクロストークがある可能性が示唆された。

そこで眼組織におけるATXとTGF-β2の発現確認・相互作用を検討することとした。RNA scopeを用いた正常眼とSOAG眼の検討の結果、房水産生部位である毛様体(CB)およびTMにおいてATXとTGF-β2のmRNAの発現がともに発現し、SOAG眼では有意な発現増強がみられた。特にSOAG眼ではATXはTGF-β2の発現よりも強いことが確認され、SOAG眼の房水中におけるATXとTGF-β2の動態と一致していた。次に、*in vitro*でhTMをTGF-β2で刺激したところ、低濃度TGF-β2ではATXの発現が有意に上昇した一方、高濃度TGF-β2刺激ではATXの発現は有意に抑制された。この高濃度TGF-β2によるATXの発現抑制はTGF-β阻害剤で解除され、高濃度TGF-βによりATX転写因子signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)およびStress-activated protein kinase (SAPK)/Jun amino terminal kinase (JNK)が有意に抑制されていたことから、hTMにおけるATXの発現がTGF-β2の濃度によって制御されている可能性が示唆された(図1)。

図1 hTMにおけるATXとTGF-βの間に存在する可能性のあるクロストークの仮説



hTMにおけるATXの変化は、古典的TGF-β経路ではなく、非古典的TGF-β経路を介して行われている可能性がある。

一方、ATX 刺激では TGF- β 1、TGF- β 2 の発現が有意に上昇し、Smad 阻害および ATX 阻害によって TGF- β 1、TGF- β 2 の発現が有意に抑制されたため、ATX が hTM において TGF- β の転写活性に関与している可能性が考えられた。TGF- β 2、ATX、LPA 刺激により (CAGA)12-luc プロモーター活性が有意に上昇し、それぞれの阻害で有意に抑制された。加えて、LPA は Rho-connective tissue growth factor (CTGF) を介して TGF- β を活性化することが報告されているが、CTGF は ATX 刺激によって有意に上昇し、TGF- β および ATX の阻害によって抑制されていた。このことから、ATX-LPA 経路は TGF- β /Smad/CTGF シグナル経路の転写活性を促進し、hTM における TGF- β のポジティブフィードバックを調整している可能性が示唆された。加えて、ATX 刺激によって有意に促進される線維化マーカー Collagen, Type1, alpha 1 (COL1A1)、Fibronectin、 α -smooth muscle actin (α -SMA) の発現が ATX 阻害のみでなく、TGF- β 阻害によっても有意に抑制されたことから、ATX による hTM における線維化および上皮間葉転換には TGF- β シグナルのポジティブフィードバックも関与していると考えられた。

ここまでの検討より、緑内障病態において ATX および TGF- β の間のクロストークが示唆されたことから、ATX および TGF- β を利用した緑内障病型分類の可能性を検討した。房水中 ATX/TGF- β 濃度を機械学習法にて検討した結果、ATX と TGF- β は緑内障の病型分類において有用であり、ATX は緑内障重症度と相関していた。また、特に ATX と TGF- β 3 は XFG と正常眼やそのほかの緑内障病型との分離に高い曲線下面積 (AUC) を示すことが分かった。

本研究では、*in vitro* および臨床サンプルの結果から、ATX および TGF- β のクロストークを検証することで、緑内障病態における眼圧上昇に関与する因子、病態を明らかにすることができた。しかし緑内障病態には様々な因子が関与しているため、詳細な機序を解明するにあたっては、ATX および TGF- β を含め、その他のメディエーターとのクロストークを検証することがさらなる課題となる。現在の眼科臨床では、臨床的所見のみで緑内障病型分類を行っている。本研究の結果から、臨床現場で適切なバイオマーカーを併用することができれば、より正確な病型分類をすることができるとともに、緑内障の重症度の予測や治療方針の決定などの一助となる可能性が示唆された (図 2)。

図 2 POAG、SOAG における ATX と TGF- β 2 のクロストークと病態に関する仮説

