

論文の内容の要旨

原発開放隅角緑内障遺伝子 *MYOC* に関する臨床的・基礎的研究

中島（谷口） 富美子

近年、原発開放隅角緑内障 (primary open angle glaucoma、以下 POAG) の原因遺伝子として同定された *myocilin gene (MYOC)* は、欧米においては、その点突然変異が、主に常染色体優性遺伝形式で家族性の POAG を発症させることが報告されている。その遺伝子産物 *myocilin* 蛋白の機能は未だ不明であるが、正常眼に比べ緑内障眼の線維柱帯において発現が増加していることから、房水の流出抵抗を左右して緑内障の発症に関与する可能性が示唆されている。

本研究では、多数の緑内障患者及び正常人の *MYOC* 変異を調査して、我が国における *MYOC* 変異の頻度を調べるとともに、その表現型の特徴を明らかにした。更に、*myocilin* の機能解析に供する実験系の確立を目的として、牛眼を用いて房水流出の主経路である隅角線維柱帯細胞の培養を行い、また牛 *MYOC* をクローニングしてその全塩基配列を明らかにして、その眼内における発現分布や誘導について研究した。

I. 日本人緑内障患者における *MYOC* 変異

277 人の遺伝子解析の結果、POAG 患者の多発している 3 家系から 2 種類の遺伝子変異 (Pro370Leu 及び Gly367Arg) が発見された。家族歴のない POAG 患者、他の病型の緑内障患者、及び正常人からは遺伝子変異は検出されなかった。この遺伝子変異の出現頻度は、家族歴のある POAG 患者の 5.2%、POAG 患者全体の 1.9% であり、我が国には約 4500 人の *MYOC* 遺伝子変異を伴う POAG 患者が存在すると推計された。

II. 遺伝子変異を有する緑内障患者の家系調査及び表現型の特徴

遺伝子変異の見られた患者の血縁者で同意の得られた者について眼科的検査を施行し、その表現型の特徴を明らかにした。いずれの家系においても、緑内障発症時の眼圧が非常に高い (40~50mmHg) こと、また保存的治療が無効で観血的治療を必要としたことが特徴的であった。*MYOC* は元来 10~20 代で発症する若年発症原発開放隅角緑内障の連鎖解析から発見されたものであり、欧米においては若年発症の家系がしばしば報告されてきたが、自験例の Pro370Leu の 2 家系では平均発症年齢が 13 才、21 才と若年発症型であったのに対し、Gly367Arg の家系の平均発症年齢は 36.7 歳で、従来の報告より発症がやや遅い傾向にあった。

III. 牛眼を用いた *MYOC* 遺伝子機能解析のための実験系の構築

III-1. 牛 *MYOC* 遺伝子の配列決定

牛 *MYOC* のクローニングを行い、全塩基配列を決定した。その特徴は、

- (1) 牛 *MYOC* は 490 個のアミノ酸で構成されており、これはヒト *MYOC* より N 末端側が 14 アミノ酸残基短く、またマウスと同じ大きさであった。
- (2) 牛とヒト、ラット、マウスの相同性は、アミノ酸でそれぞれ 81.6、78.8、78.2% で、また核酸では 83.1、80.2、80.6% であった。
- (3) 牛とヒトの exon1、2、3 の相同性はそれぞれ 75.9、71.4、87.4% であり、exon3 の相同性が高か

った。

(4) 牛 *MYOC* にはヒトと同様に leucin zipper motif (103-152 aa) がみられた。

(5) 1-18aa, 412-426aa に疎水基があり、他は親水性のアミノ酸で構成されていた。

牛とヒトのアミノ酸配列は exon3 で最も相同性が高かったこと、また緑内障患者で報告されている点突然変異は exon3 に集中していることから、exon3 が *MYOC* の機能発現に重要な役割を果たしている可能性が高いと推測される。現在までに *MYOC* の全配列が明らかになっているのはヒト、マウス、ラットであるが、これらのすべての種で leucine zipper が保存されていたこと、また *MYOC* 遺伝子のヘテロ接合変異では緑内障を発症するがホモ接合変異は発症しないことから、myocilin 蛋白は 2 量体あるいは多量体を形成しており、遺伝子変異がこの複合体の形成を阻害することによって蛋白の本来の機能を妨げ、緑内障を発症させる可能性がある。

III-2. in situ RNA hybridization による牛 *MYOC* の眼内組織分布の検討

牛眼球における myocilin の発現分布を in situ hybridization 法で検討した。線維柱帯、虹彩、網膜（神経節細胞層、内顆粒層）、強膜に発現が見られた。やや弱い発現が毛様体に認められた。角膜と視神経乳頭には発現が認められなかった。

眼球における *MYOC* の分布について、ヒトでは線維柱帯、毛様体、虹彩、強膜、網膜、脈絡膜で、マウスにおいては線維柱帯、毛様体、虹彩、網膜、強膜における発現が報告されている。牛 *MYOC* が線維柱帯、網膜、虹彩、強膜に発現していることはヒト、マウスと同様であったが、ヒトでは網膜の視細胞外節に存在すると報告されており、神経節細胞層や内顆粒層に発現を認めた我々の知見とは異なっていた。

房水流出路に myocilin の発現が多く認められることは、いずれの種においても同様であった。また抗 myocilin 抗体を用いた免疫組織染色において、myocilin 蛋白が線維柱帯やシュレム氏管に発現していること、緑内障患者ではさらに強い発現が認められることが報告されており、myocilin 蛋白

が房水流出抵抗の増大に関与している可能性が高いと考えられる。しかしながら、**myocilin** 蛋白の蓄積そのものが房水流出抵抗を増大させているのか、あるいは細胞外マトリックスなど他の蛋白の発現を左右することにより緑内障発症に関与しているのかは不明であり、今後の更なる解析が必要である。また、牛眼球において神経節細胞層、内顆粒層に *MYOC* の発現がみられたことから、**myocilin** が網膜内において情報伝達や視神経の栄養・代謝等、視神経の生理的機能に関与している可能性も考えられる。

III-3.ステロイド負荷による牛*MYOC*発現の誘導

牛線維柱帯細胞にデキサメサゾン 50-500nM を負荷した後の *MYOC* mRNA の変化を定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。*MYOC* の発現量は、デキサメサゾンの 50nM 負荷で約 7 倍 (7.1 ± 2.5 倍, mean \pm SEM)、500nM 負荷で約 14 倍 (14.1 ± 5.1 倍) 増幅した。牛 *MYOC* はヒトと同様にステロイドにより誘導される性質を有していた。

IV. 総括

緑内障は先進諸国の中途失明原因の上位を占める疾患であるにもかかわらず、その根本的な原因は不明で、決定的な治療手段は確立されていない。*MYOC* の発見は、緑内障の病因解明に新たな手がかりを与える貴重な報告であり、その機能の解析は遺伝子変異により発症する緑内障のみならず、緑内障全般の病態の理解に寄与する可能性もあると期待される。我々が樹立した牛眼球を用いた実験系は **myocilin** の機能解析のための有用な動物実験モデルとなりうると考えられた。