


医研第293号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目 Proteomic Analysis of the Trabecular Meshwork of Rats in a Steroid-Induced Ocular Hypertension Model: Down-Regulation of Type I Collagen C-propeptides

(ステロイド誘発高眼圧ラットモデルにおける線維柱帯のプロテオミクス解析研究：1型コラーゲンCプロペプチドの発現低下)

氏名 新里学 

## (目的)

開放隅角緑内障とステロイド緑内障における眼圧上昇は、隅角線維柱帯における房水流  
出抵抗の増大が原因とされる。線維柱帯の組  
織病理学的所見もこれらの緑内障で類似して  
おり、抵抗増大の機序も同様と推測されるが、  
その詳細は不明である。抵抗増大機序解明の  
手がかりを得るため、ラットのステロイド緑  
内障モデルを用いてプロテオミクス解析を行  
った。

## (方法)

ラットにステロイド（デキサメタゾン）を4  
週間点眼して高眼圧モデルを作成し、ステロ  
イド群と対照群の線維柱帯蛋白質発現プロフ  
ァイルを、二次元蛍光ディファレンシャル電  
気泳動（2D DIGE）とペプチドマスフィンガー  
プリンティング（PMF）により解析した。

具体的には、両群の蛋白質を異なる蛍光色  
素で標識し、固定化 pH 勾配法と SDS-PAGE  
により同一ゲル内で 2 次元展開した。ステロ

イド群で変化を示したスポットは、蛋白質をペプチドに消化し、ペプチドの飛行時間型質量分析（MALDI-TOF/MS）を行い、質量をデータベースと照合して蛋白質を検索した。

（結果）

ステロイド群は対照群に比べ有意に高い眼圧を示した。2D DIGE では線維柱帯蛋白質は約1,000 スポットに分離され、14 スポットがステロイド群で有意に増減した。2 倍以上増加した2 つのスポットを PMF により  $\alpha$ -A クリスタリンおよび  $\beta$ -A3/A1 クリスタリンと同定した。一方、2 倍以上減少した2 つのスポットは、PMF では I 型コラーゲンの  $\alpha$ 1 鎖および  $\alpha$ 2 鎖の前駆体と出力された。しかし、ヒットしたペプチド全てが両者の C-末端 180 アミノ酸に集中していたことから、両者の C-プロペプチドと判断した。

（考察）

C-プロペプチドは、コラーゲン線維の形成過程で切断・除去される副産物であり、コラーゲ

ンの分解と生成からなるターンオーバーの指標とされる。本研究ではステロイド群における I 型コラーゲンのターンオーバーの減少が示唆された。I 型コラーゲンの分解障害によりターンオーバーが減少した変異マウスでは、線維柱帯の房水流出抵抗増大と眼圧上昇が報告されている。また、開放隅角緑内障関連染色体領域に C-プロペプチド切断関連酵素の遺伝子が存在するとの報告もある。緑内障における線維柱帯コラーゲンの量的異常には現時点でコンセンサスは無いが、眼圧上昇と線維柱帯のコラーゲンターンオーバーの関係は今後さらに解析する必要があるだろう。

一方、 $\alpha$ -A クリスタリンおよび  $\beta$ -A3/A1 クリスタリンはいずれもストレス応答性の蛋白質であり、房水流出抵抗の増大に伴って線維柱帯にかかる張力や眼圧の上昇が増加の引き金になった可能性がある。

平成19年7月4日

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨 (1)

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	新里 学
論文審査委員	審査日	平成 19年7月4日		
	主査教授	須加原 一博 (須加原印)		
	副査教授	加藤 誠也 (加藤印)		
	副査教授	高須 信行 (高須印)		
(論文題目)				
Proteomic Analysis of the Trabecular Meshwork of Rats in a Steroid-Induced Ocular Hypertension Model: Down-Regulation of Type I Collagen C-propeptides				
(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、研究成果の意義と学術水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
開放隅角緑内障とステロイド緑内障における眼圧上昇は、隅角線維柱帯における房水流出抵抗の増大が原因とされる。線維柱帯の組織病理学的所見も類似しており、抵抗増大機序も同様と推測されるが、詳細は不明である。抵抗増大機序解明の手がかりを得るため、著者らはラットのステロイド緑内障モデルを用いてプロテオミクス解析を行った。				
2. 研究内容				
ラットにステロイド(デキサメタゾン)を4週間点眼して、対照群より有意に高い眼圧を示す高眼圧モデルを作成した。ステロイド群と対照群の線維柱帯蛋白質発現プロファイルを、二次元蛍光ディフレンシャル電気泳動により解析した。すなわち、両群の蛋白質を異なる蛍光色素で標識し、固定化 pH 勾配法と SDS-PAGE により同一ゲル内で二次元展開した。その結果、蛋白質は約 1,000 スポットに分離され、14 スポットがステロイド群で有意に増減した。				

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 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。

次に、ステロイド群で2倍以上の増減を示したスポット蛋白質をペプチドマスマフィンガープリント法により解析した。すなわち、蛋白質をペプチドに消化し、飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS) を行い、ペプチドの質量スペクトルをデータベースと照合して蛋白質を同定した。

ステロイド群で2倍以上増加した2つのスポットは $\alpha$ -A および $\beta$ -A3/A1 クリスタリンと同定した。一方、2倍以上減少した2つのスポットは、データベース検索ではI型コラーゲンの $\alpha$ 1 および $\alpha$ 2 鎖の前駆体と出力された。しかし、ヒットしたペプチド全てが両者のC-末端180アミノ酸に集中していたことから、コラーゲンのプロセッシング過程で切断されるC-プロペプチドと判断した。この結果から、ステロイド群ではI型コラーゲンのターンオーバーが減少していると推察した。

### 3. 研究結果の意義と学術水準

I型コラーゲンの分解障害によりターンオーバーが減少した変異マウスでの眼圧上昇の報告や、開放隅角緑内障関連染色体領域にC-プロペプチド切断関連酵素の遺伝子が存在するとの報告があるが、本研究も眼圧上昇と線維柱帯のコラーゲンターンオーバー異常の関係を示唆するものであり、緑内障における眼圧上昇の機序を解明する端緒となる有意義で高い水準の研究と考えられる。

以上により、本論文は学位授与に値すると判断した。