

# 論 文 要 旨

Controllable Urokinase Gene Expression in Trabecular Meshwork Cells

(線維柱帯細胞における発現制御可能なウロキナーゼ遺伝子導入)

関西医科大学眼科学講座  
(指導：高橋 寛二 教授)

美井 メイ

## 研究目的

緑内障は視神経が傷害されて視野障害を引き起こす疾患で、本邦における中途失明原因の第一位である。そのメカニズムには眼圧の上昇が関与しており、現在のところ有効な治療は眼圧を下げて視神経障害の進行を予防する方法しかない。病因については未だに不明な点が多いが、眼球内を循環している房水の流出が減少して眼圧が上昇し、視神経が傷害されることが分かっている。そこで房水産生を抑制、あるいは房水流出抵抗を減少させて眼圧を下降させるために薬物療法や手術療法が行われているが、しばしば副作用や合併症が問題となる。房水流出路である線維柱帯は、加齢により細胞が細胞外基質に置き換わっていくことが明らかにされている。これらを分解することで房水流出抵抗を減少させられるのではないかと考え、線溶系酵素の遺伝子導入による新しい治療法の可能性を求めた。その基礎実験として、線維柱帯細胞に線溶系酵素を必要な量だけ制御可能な状態で発現させることが出来るかどうかを検討した。

## 研究方法

緑内障手術の一つである線維柱帯切除術を受ける緑内障患者からインフォームド・コンセントを得たうえで、切除した線維柱帯からヒト線維柱帯細胞を採取した。またブタ眼球から線維柱帯細胞を採取、DMEM/F12 培地で培養した。線維柱帯細胞は、DiI-labeled acetylated low density lipoprotein(DiI-Ac-LDL)受容体の発現を確認し同定した。ヒト線維柱帯細胞から RNA を抽出し、cDNA を作製、ウロキナーゼ遺伝子の全長を含むデザインでプライマーを合成して PCR 法によりヒトウロキナーゼ遺伝子を得た。そして最初に、線維柱帯細胞に遺伝子を導入できたかが蛍光色素で容易に確認できるよう、pEYFP-N1 ベクターにヒトウロキナーゼ遺伝子を組み込み、リポフェクタミン 2000 を用いてブタ線維柱帯細胞に導入した。次に、ヒトウロキナーゼ遺伝子を Tet-On システムの表現ベクターに組み込み、ブタ線維柱帯細胞に導入した。Tet-On システムの表現ベクターはドキシサイクリン存在下で遺伝子発現が増強するため、培養液にドキシサイクリンを添加してブタ線維柱帯細胞がヒトウロキナーゼを産生するかどうかを ELISA 法により検討した。

## 結果

pEYFP-N1 ベクターを用いた実験では、蛍光を発する線維柱帯細胞を確認し、ブタ線維柱帯細胞にヒトウロキナーゼ遺伝子が導入できることを確認できた。培養液中のウロキナーゼ蛋白の濃度は 3.5ng/ml であった。ヒトウロキナーゼ遺伝子を組み込まない pEYFP-N1 ベクターのみの線維柱帯細胞からはウロキナーゼ蛋白は検出しなかった。次に、遺伝子導入を行ったブタ線維柱帯細胞にドキシサイクリンを 1、5、10  $\mu\text{g/ml}$  添加したところ、48 時間後にそれぞれ 0.07、1.13、3.91ng/ml のヒトウロキナーゼを培養液に検出した。ドキシサイクリンの量依存的にヒトウロキナーゼが産生されていた。

## 考察

Tet-On システムを用いて線維柱帯細胞に制御可能な状態で線溶系酵素の遺伝子導入が可能であることが分かった。この実験系を発展させて発現を制御できる生体への遺伝子導入が可能となれば、従来の治療法におこる副作用や合併症のない新しい緑内障の治療法の開発につながる可能性がある。