

図 11 X 染色体伴性網膜色素変性家系の RP2 遺伝子解析結果  
発端者はコドン 278 に 2 塩基(TC)挿入があり、その結果、それ以降のアミノ酸翻訳にフレームシフトが生じた。

差がみられたが、家族歴を参考に遺伝子診断することにより、疾患の背景を明らかにすることが可能である。

2) 帯状疱疹による両眼性視神経症と思われた症例

症 例：65 歳，女性。

主 訴：右眼視力低下。

現病歴：2001 年 10 月，右三叉神経第 2 枝領域の帯状疱疹および右眼の虹彩炎を発症し，近医でアシクロビル点滴治療およびステロイド点眼治療を受けた。その後も右眼の虹彩炎と高眼圧が続き，ステロイド点眼薬と眼圧降下剤の点眼薬で経過をみていた。2002 年 2 月ごろから右眼の視力低下を自覚し当科を受診した。

家族歴：特記すべきことなし。

初診時所見：視力は右眼 0.01 (0.02 × +1.00 cyl - 0.75 Ax 90°)，左眼 0.7 (1.2 × +1.25 cyl - 0.87 Ax 100°) であった。瞳孔反応は，右眼の直接対光反射は遅鈍，左眼の直接対光反射は迅速で，右眼にマーカス-ガン瞳孔がみられた。眼圧は右眼 22 mmHg，左眼 17 mmHg で，右眼の前房内には cells (+)，flare (+) の虹彩炎がみられた。眼底所見は，右眼は視神経乳頭耳側が軽度の蒼白化していたが，左眼の視神経乳頭には異常所見はみられなかった。Goldmann 視野検査で，右眼は中心暗点を示した。右眼の帯状疱疹ヘルペス後の視神経炎を疑い，精査，加療目的のため 3 月 28 日に入院した。

経 過：血液検査では血清 VZ-IgG は 74 index，VZ-CF は 16 倍と軽度上昇していた。髄液検査では細胞数 0，蛋白正常，PCR 法で単純ヘルペスウイルス (HSV) および水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) は検出されなかつ

た。帯状疱疹ヘルペス性視神経炎の診断でアシクロビル内服 1,500 mg (500 mg × 3 回) を 10 日間とステロイドパルス療法 (メチルプレドニゾロン 1,000 mg を 3 日間点滴投与) を施行したが，右眼視力の改善はみられなかった (図 13)。

初診から 4 か月後に左眼の視力低下と中心暗点が出現し，7 月 4 日再入院となった。視力は右眼 0.01 (矯正不能)，左眼 0.4 (0.5 × +1.50 cyl - 1.25 Ax 90°) で，視野検査で左眼は中心暗点を呈した。眼圧は右眼 28 mmHg，左眼 24 mmHg で，前眼部は右眼前房内 cells (+)，flare (-)，左眼前房内 cells (-)，flare (-) であった。血液検査は血清 VZ-IgG は 71 index，VZ-CF は 16 倍とほぼ前回入院時と同じ値であった。髄液検査では細胞数 0，蛋白正常であった。この時点では，帯状疱疹ヘルペス後の両眼性の視神経炎と診断し，再度アシクロビル内服 1,500 mg を 15 日間とステロイドパルス療法 (メチルプレドニゾロン 1,000 mg を 3 日間点滴投与) を施行したが，左眼視力は 0.04 まで低下した。蛍光眼底造影で左眼視神経乳頭からの蛍光漏出はなかった。

治療に抵抗性の予後不良な両眼性の視神経症の鑑別診断として，7 月 10 日にミトコンドリア DNA 検査を施行し，11778 番塩基の変異が検出され，レーベル病と診断した。

レーベル病は両眼性の遺伝性視神経疾患 (遺伝形式は母系遺伝) で，10~20 代の男性に好発し，視力障害は急性または亜急性に出現する<sup>20)</sup>。その発症時期に左右差はあるが両眼性である。急性期には視神経乳頭の発赤・腫

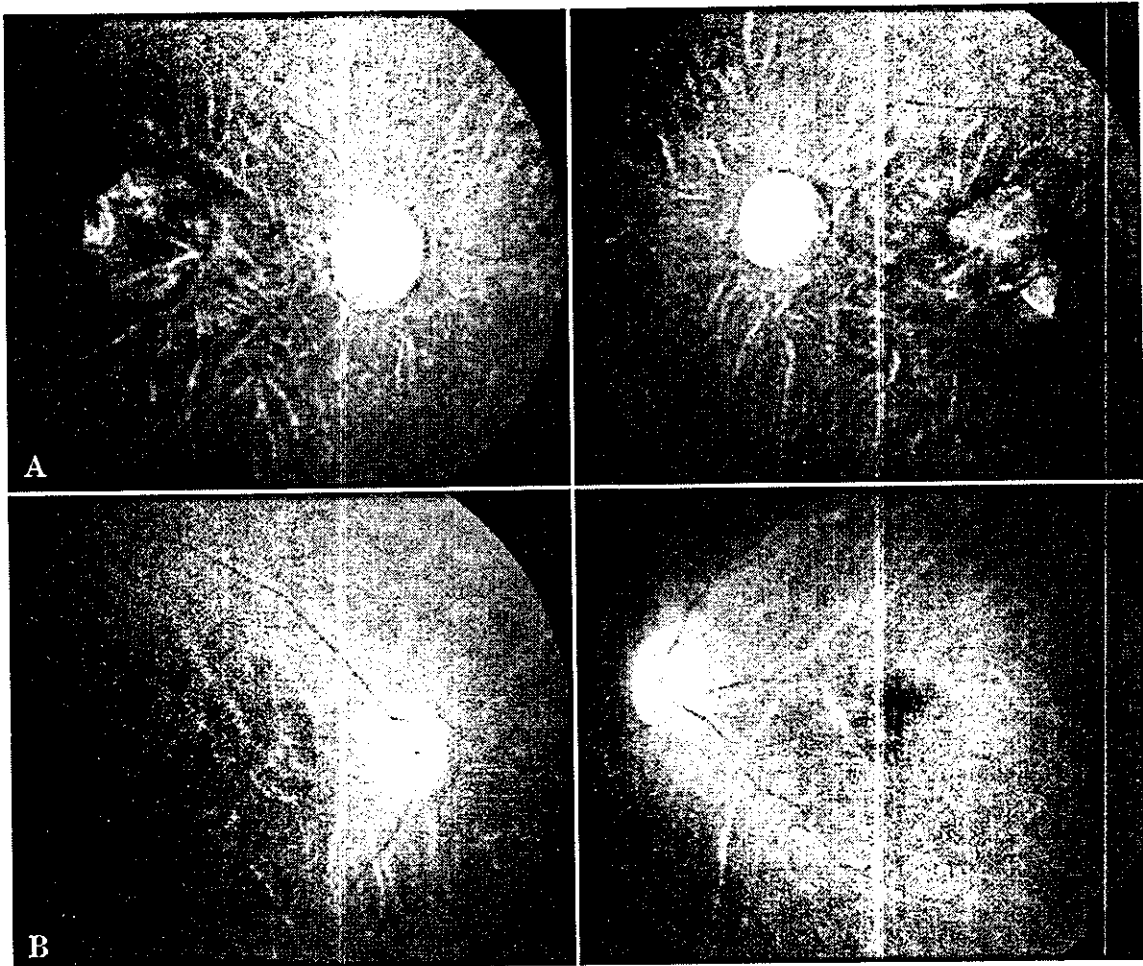


図 12 レーベル病と網膜色素変性を合併した症例の眼底写真(初診4年後)  
 A: 発端者 18歳男児, B: 弟16歳男児. 兄は網膜色素上皮の萎縮がさらに進行したが, 弟には変化があまりみられない.

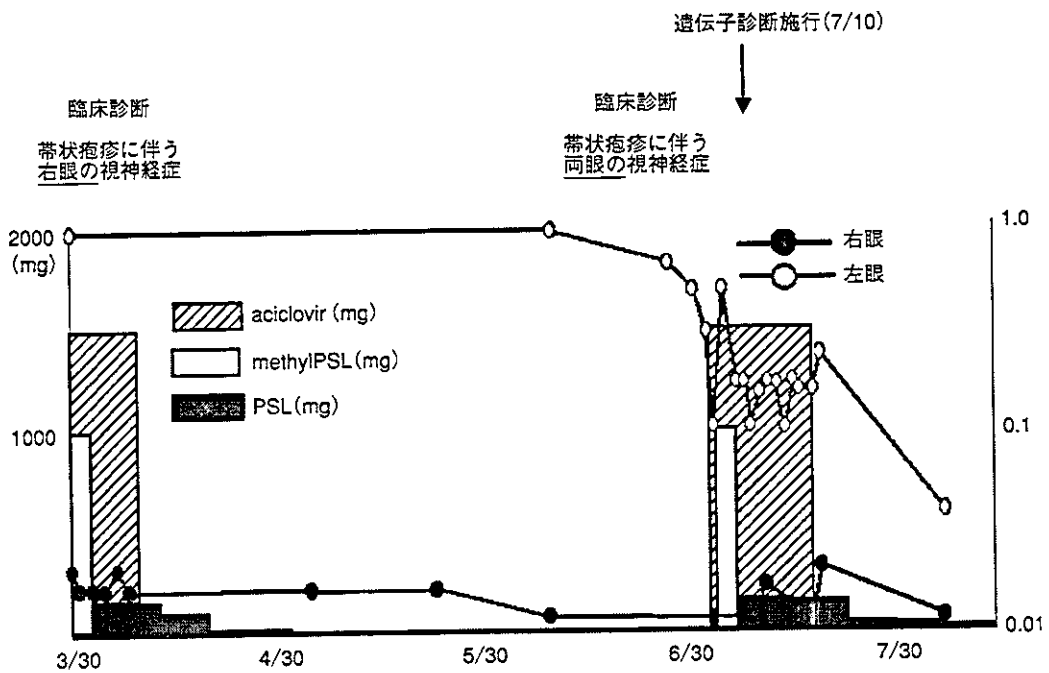


図 13 帯状疱疹後に発症したレーベル病患者の臨床経過。  
 右三叉神経第2枝領域の帯状疱疹4か月後に右眼, 8か月後に左眼の視神経症を発症した。  
 PSL: プレドニゾロン

脈、網膜血管の蛇行、時に網膜出血がみられ、蛍光眼底造影上、乳頭周囲に血管拡張性の微細血管症がみられるのが特徴とされ、また全経過を通じて蛍光色素の漏出がないことが多発性硬化症による視神経炎(乳頭炎)との極めて重要な鑑別所見である。

本症例では、65歳女性と高齢であり、右三叉神経第2枝領域の帯状疱疹発症4か月後に右眼、8か月後に左眼の視神経症を発症した。文献的にも、稀ではあるが帯状疱疹に伴う両眼性の視神経症の報告があり、予後が不良と報告<sup>21)~23)</sup>されている。左眼にも発症した時点でも我々は帯状疱疹後の左眼視神経炎として治療したが、ステロイドパルス療法や治療にも抵抗性であったため、鑑別診断としてレーベル病の遺伝子診断を施行した。その結果、レーベル病と診断された症例である。本症例の経過を振り返ってみても、レーベル病を疑う特徴的な所見はなく、治療に抵抗性の予後不良な両眼性の視神経症の鑑別診断として、発症年齢に関係なくミトコンドリアDNAの遺伝子診断は臨床上有用である。もし、右眼が発症した時点でレーベル病と診断できれば、左眼発症時のステロイドパルス療法は施行されなかった。これまで当科では多くのレーベル病患者が受診しているが、他院で診断が付かないままステロイドパルス療法を繰り返し施行されてきた症例も何例か経験している。

### 3. 早期診断、早期治療のための遺伝子診断

治療法のある遺伝性疾患における遺伝子診断は、早期診断、早期治療のために有用である。眼科領域では緑内障がその適応と考える。前述したが、我々はmyocilin遺伝子解析において新たな変異として、Phe369Leu変異を見出した<sup>12)</sup>。この変異を持つ患者の発症年齢は、一般の開放隅角緑内障患者と同じであった。この家系における遺伝子診断の意義を述べる。

発端者は49歳の女性で、数年前から左眼の霞視を時々自覚し、1998年2月に当科を受診した。問診上、家族に緑内障患者はいなかった(図14)。初診時、矯正視力は両眼とも1.0で、眼圧は右眼45mmHg、左眼57mmHgであった。Humphrey視野検査(30-2)と眼底写真を図15に示す。ダイアモックス®内服、2%ミケラン®点眼薬およびレスキュラ®点眼薬による治療が開始され、両眼とも眼圧は20mmHg前後となった。5月に左眼の線維柱帯切除術が施行され、眼圧は10台前半にコントロールされた。その後、右眼はキサラタン®点眼薬と0.5%チモプトール®点眼薬で15mmHg前後にコントロールされている。

発端者は40歳以降の発症が考えられたことや家族歴がなかったことから、myocilinに関連する緑内障とは考えていなかったため、当初myocilin遺伝子変異の検索は行わなかった。しかし、2002年以降は、発症年齢や家族歴の有無にかかわらず、インフォームド・コンセントが得られた開放隅角緑内障患者を中心にmyocilin

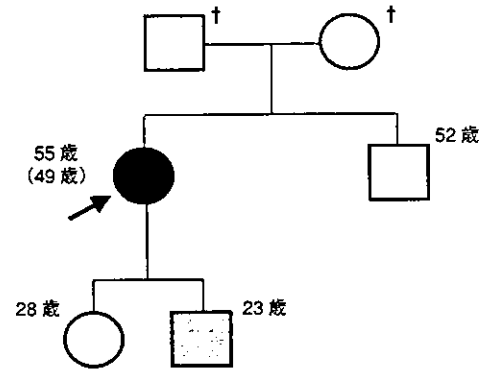


図 14 緑内障遺伝子ミオシリン Phe369Leu 変異を持つ家系図。

□：男性，○：女性，●：開放隅角緑内障，◻：高眼圧症。括弧内は初診時の年齢。

遺伝子解析を開始したところ、本症例に Phe369Leu 変異が同定された。図 14 は家系図であるが、52歳の弟、23歳の長男からインフォームド・コンセントが得られ、遺伝子検査および臨床検査を行った。その結果、弟は正常であり、遺伝子変異は持ってなかった。一方、長男は遺伝子変異を持っていた。長男の眼圧は両眼とも 20~22 mmHg を変動しており、視神経乳頭には陥凹がみられた(C/D 値は右眼 0.6、左眼 0.8)(図 16)。静的視野検査では異常所見はみられなかった。現在は無治療で経過をみているが、将来視神経障害が進行することは確実なため、患者と相談の上治療開始の時期を検討している。長男の場合は自覚症状が全くないため、遺伝子診断により早期診断が可能になった症例であった。早期診断・早期治療を開始することで、母親のように強い視機能障害を来すリスクはなくなる。

## IV 多遺伝子(多因子)疾患の感受性遺伝子解明

ゲノムプロジェクトの成果により、多因子疾患である高血圧、糖尿病、虚血性心疾患など common disease としての生活習慣病の疾患感受性遺伝子の解明が可能になった<sup>24)</sup>。単一遺伝子疾患との違いは、対立遺伝子の浸透率の違いで、発症リスクは数倍程度にすぎず、また一般に観察されるありふれた遺伝的多型がターゲットになる。すなわち、疾患発症に対するリスク診断として意義がある<sup>1)</sup>。今回、我々は多因子疾患であるレーベル病と緑内障を対象に危険因子の検索を行った。

### 1. レーベル病

レーベル病は、主として 10~20 代にかけて両眼性に急性あるいは亜急性の視力低下で発症し、通常 1 年以内に高度の視神経萎縮に至る予後不良の遺伝性疾患である<sup>20)</sup>。レーベル病は、発症年齢、視力予後、性差など臨床経過が多彩である。レーベル病発症にはミトコンドリア DNA 変異は必須であるが、発症にはその他二次的な

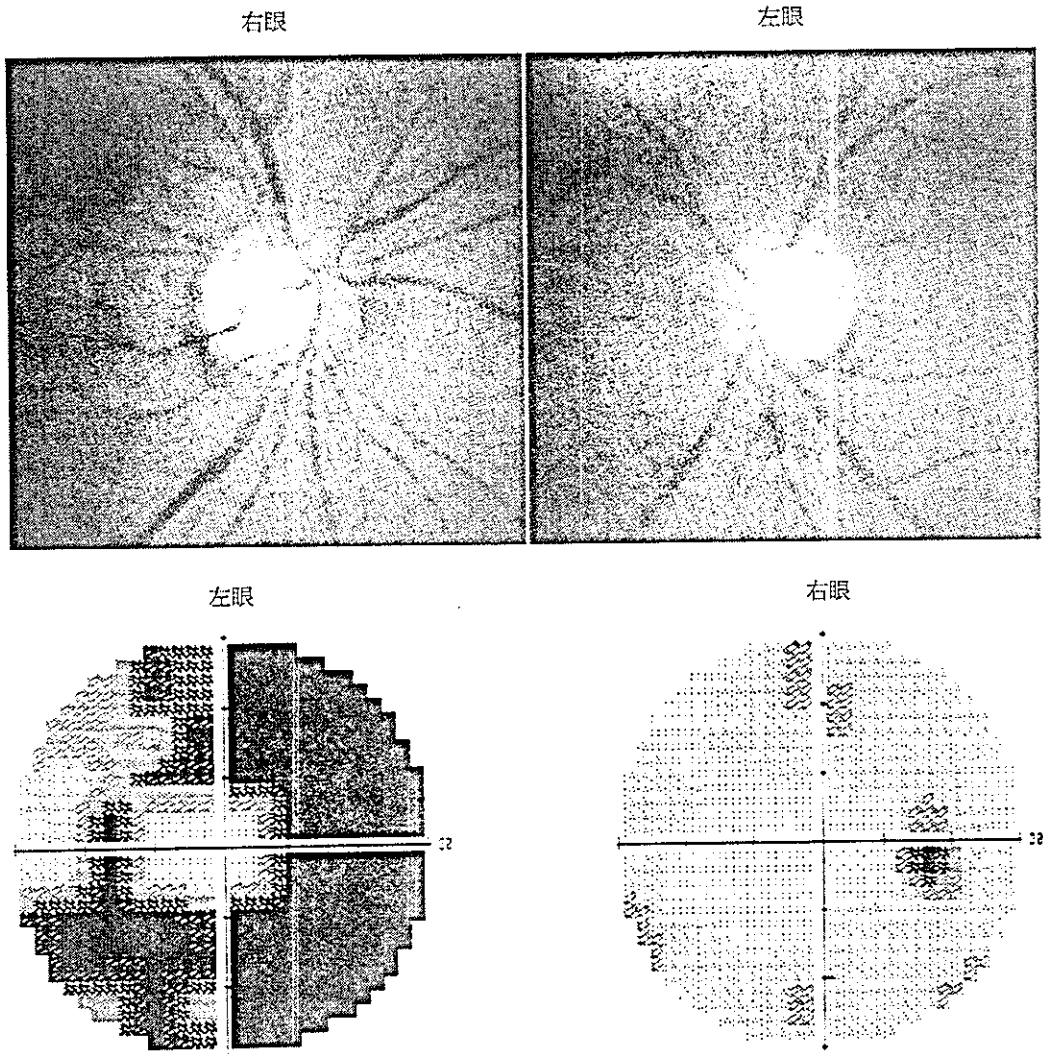


図 15 ミオシリン Phe369Leu 変異を持つ発端者の初診時の視神経乳頭写真(上段)と Humphrey 静的視野(下段)

因子, すなわち環境因子や遺伝因子が関与していると考えられている(図 17)<sup>25)</sup>. 遺伝因子として他のミトコンドリア DNA 変異(いわゆる secondary mutations)や X 染色体上の遺伝子の関与が報告されているが, 確定したものはなく未だ不明である. 一方, 動物実験や *in vitro* の実験から酸化ストレス(SOD<sup>26)</sup>, 8-OHdG<sup>27)</sup>, アポトーシス<sup>28)29)</sup>に関連する核 DNA 変異の影響が考えられている. 今回, レーベル病患者において, 酸化ストレス, アポトーシスに関連する遺伝子多型と多彩な臨床所見のうち, 発症年齢および最終視力との関連を検討した.

#### 1) 対象

11778 変異を有するレーベル病患者 87 例(男性 79 例, 女性 8 例)を対象とした. 発症年齢は 3~65 (平均 25.0 ± 13.0)歳で, 10 代をピークとして 30 代までが 8 割以上を占めていた(図 18). 最終視力として視力の良い方の眼の最終視力を解析対象とし(視力検査が施行できなかった 1 例を除く), 分布を図 19 に示した. 0.1 未満の症

例が 8 割以上であったが, 中には 1.0 まで回復する場合もあり, 発症年齢が低いほど視力が回復しやすい傾向があった.

#### 2) 方法

酸化ストレスに関連する遺伝子多型として, SOD2(Val 16Ala), GSTT1(positive or null), GSTM1(positive or null), EPHX1(Tyr113His と His138Arg), NQO1(Pro187Ser), p22PHOX(His72Tyr), NOS3(-786 T>C と Glu298Asp), アポトーシスに関連する遺伝子多型として TP53(Arg72Pro)および CD95(-670 A>G), また網膜特異的アミノキシダーゼ AOC2(-81 A>G)の遺伝子多型を検討した. これらの遺伝子多型の検出には PCR-RFLP 法を用い, 各遺伝子型とレーベル病患者の発症年齢および最終視力(logarithmal of minimum angle of resolution(log MAR)視力に換算)との関連を解析した. 統計学的解析には Mann-Whitney の U 検定を用い, 有意水準は 5% 未満とした.

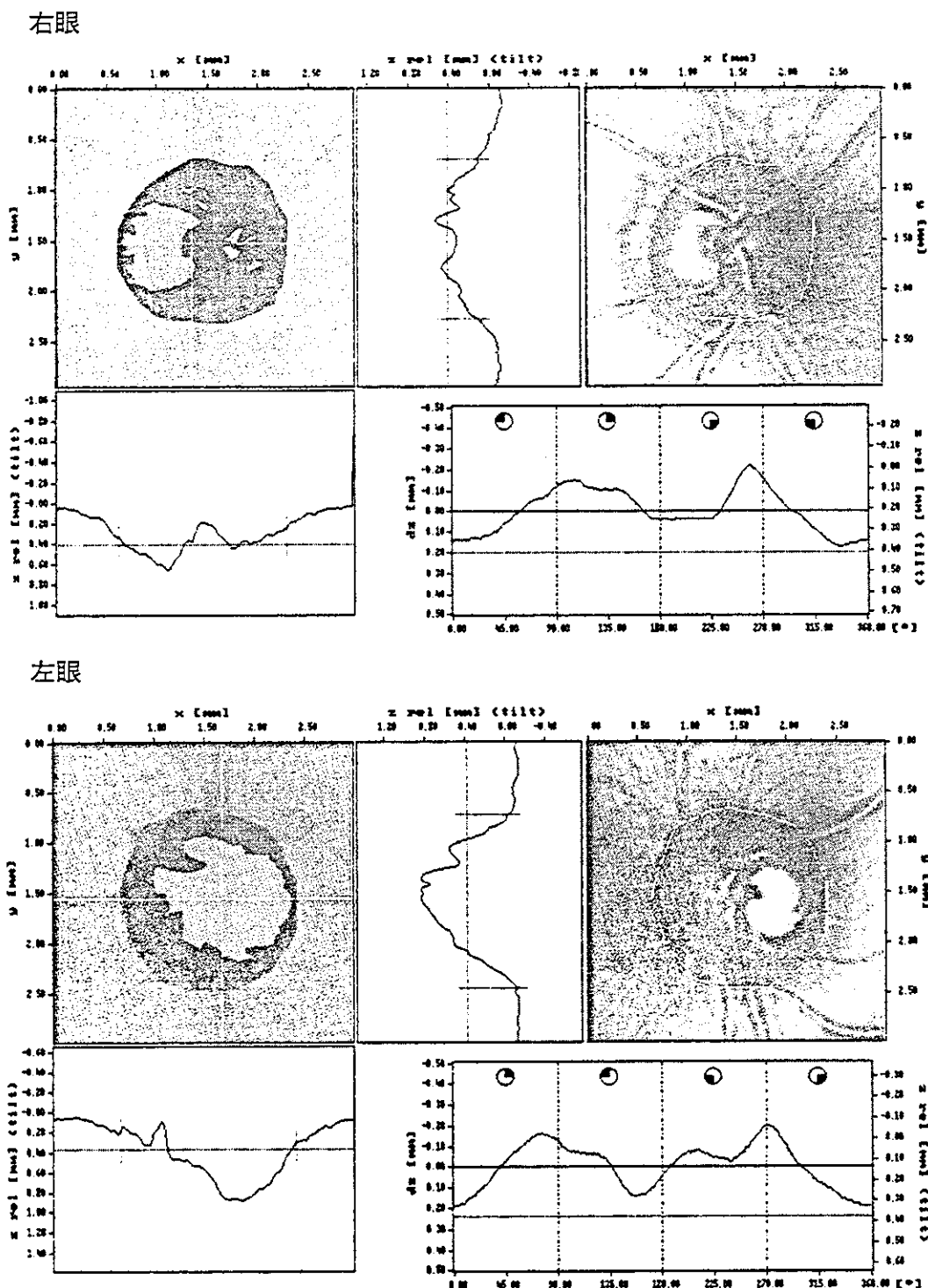


図 16 ミオシリン Phe 369 Leu 変異を持つ長男(高眼圧症)の Heidelberg Retina Tomography (HTR) による視神経乳頭解析.

Disk Area(右眼 2.199 mm<sup>2</sup>, 左眼 2.534 mm<sup>2</sup>), Cup Area(0.568 mm<sup>2</sup>, 1.142 mm<sup>2</sup>), Cup/Disk Area Ratio(0.258, 0.451), Rim Area(1.632 mm<sup>2</sup>, 1.392 mm<sup>2</sup>), Cup Volume(0.061 cmm, 0.263 cmm), Rim Volume(0.276 cmm, 0.278 cmm), Mean Cup Depth(0.138 mm, 0.291 mm), Maximum Cup Depth(0.363 mm, 0.745 mm), Cup Shape Measure(-0.114, -0.133), Height Variation Contour (0.394 mm, 0.390 mm), Classification(-1.70, -1.40).

### 3) 結果

12 種類の遺伝子多型と発症年齢および最終視力との関連において、統計学的に有意差がみられたのは、TP-53(Arg72Pro)多型と発症年齢、および EPHX1(Tyr

113His)多型と発症年齢であった。TP53 Arg/Arg 型の発症年齢は 20.5±10.5 歳と、それ以外(Arg/Pro 型および Pro/Pro 型)の発症年齢 28.1±13.8 歳より有意に低く(p=0.007)、また、EPHX1His/His 型の発症年齢

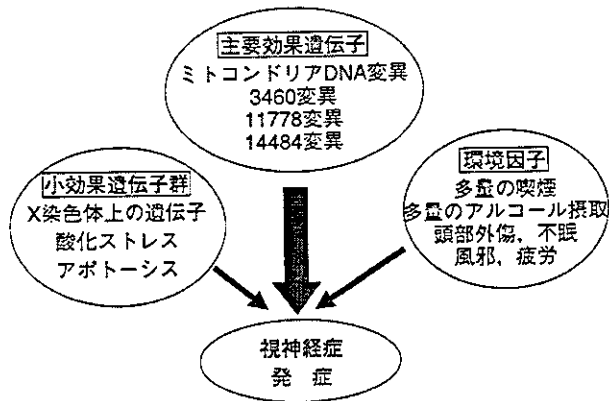


図 17 レーベル病の発症モデルのシエーマ。

レーベル病の発症にはミトコンドリア DNA 変異の他に、核遺伝子変異や環境因子が影響すると考えられている。

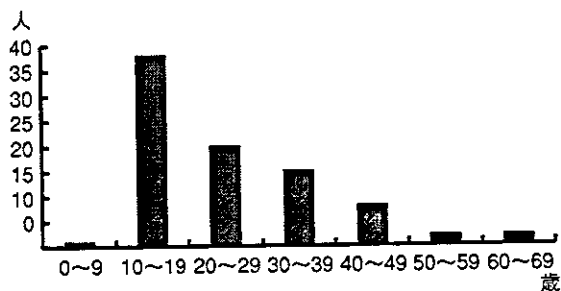


図 18 レーベル病患者 87 名の発症年齢分布。平均発症年齢は  $25.1 \pm 13.0$  (平均値  $\pm$  標準偏差) 歳であった。

は  $21.9 \pm 11.3$  歳と、それ以外 (Tyr/Tyr 型および Tyr/His 型) の発症年齢  $27.9 \pm 13.9$  歳より有意に低かった ( $p=0.026$ )。次に、これら 2 つの多型を組み合わせ二元配置分散分析と Sceffé 法を行ったところ、*TP53* Arg/Arg 型かつ *EPHX1* His/His 型を持つ患者 (A 群) の発症年齢は  $17.5 \pm 9.1$  歳、*TP53* Arg/Arg 以外の型、かつ *EPHX1* His/His 以外の型を持つ患者 (C 群) の発症年齢は  $29.8 \pm 15.1$ 、それ以外の型を持つ患者 (B 群) の発症年齢は  $25.3 \pm 11.3$  歳であった (図 20)。A 群は C 群より有意に発症年齢が低く ( $p=0.011$ )、*TP53* (Arg72Pro) 多型と *EPHX1* (Tyr113His) 多型に相加作用があった。今回調べた遺伝子多型と最終視力に関連はなかった。

4) 考按

レーベル病は明らかな炎症所見を示さず網膜神経節細胞層や視神経が変性し、乳頭黄斑線維束の萎縮により多くの症例で中心暗点と視力低下を来す。この病態に関しては未だ明らかではないが、活性酸素種やアポトーシスが関与することが示唆されている<sup>25)</sup>。Qi ら<sup>26)</sup>はマウスを用いた実験で活性酸素種がレーベル病の病因の鍵となることを指摘した。また、ミトコンドリア DNA の 11778 変異により電子伝達系酵素複合体 I (NADH 脱水素酵

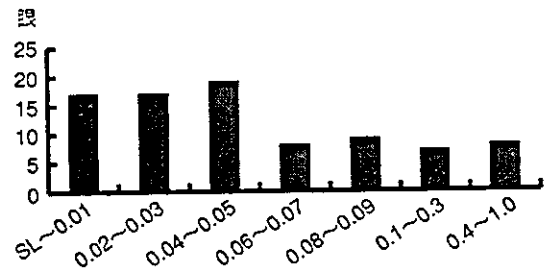


図 19 レーベル病患者 87 名の最終視力分布。両眼で良い方の視力を採用した。

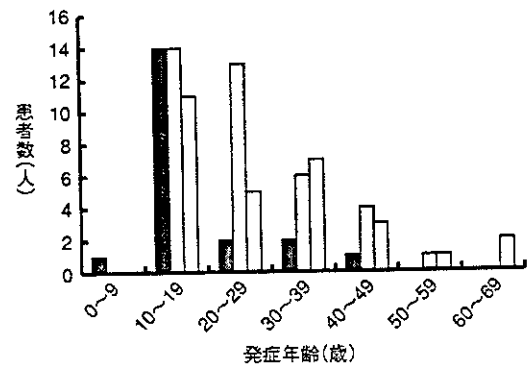


図 20 レーベル病患者 87 名の発症年齢分布と遺伝子多型。  
 ■: A 群 (*TP53* Arg/Aeg 型かつ *EPHX1* His/His 型を持つ患者で平均発症年齢は  $17.5 \pm 9.1$  歳), □: B 群 (A 群, C 群以外の型を持つ患者で発症年齢は  $25.3 \pm 11.3$  歳), ◻: C 群 (*TP53* Arg/Arg 以外の型かつ *EPHX1* His/His 以外の型を持つ患者で平均発症年齢は  $29.8 \pm 15.1$  歳)

素)の活性が低下し、細胞の最大呼吸率が 20~28% 減少するため<sup>30)</sup>、レーベル病患者では活性酸素種の慢性的な蓄積もしくは産生増加が起こり<sup>31)</sup>、網膜神経節細胞などが傷害されて神経萎縮に至ることが推定されている。

p53 をコードする *TP53* は、主に細胞周期の停止やアポトーシスの誘導といった機能を持ち、DNA 損傷などのストレスに反応して p53 蛋白レベルが上昇し、標的遺伝子の活性化を誘導してアポトーシスを惹き起こすと考えられている。*TP53* に存在する Arg72Pro 多型について、Arg/Arg 型の方が Arg/Pro 型よりもアポトーシスを起こしやすく<sup>32)</sup>、また、Arg72 の方がより多くミトコンドリアに局在することなどにより、Pro72 よりも数倍アポトーシスを誘導しやすいことが報告<sup>33)</sup>されている。我々の結果において、Arg/Arg 型の発症年齢がそれ以外の型 (Arg/Pro 型および Pro/Pro 型) の発症年齢より有意に低かった ( $p=0.007$ ) ことから、レーベル病患者のうち Arg/Arg 型を持つ患者は、ミトコンドリア DNA 変異による視神経障害をより助長し、発症年齢を早める可能性が示唆された。

一方の今回我々が調べたアポトーシスに関連する遺伝子 *CD95* については、サイブリッドを用いた実験から

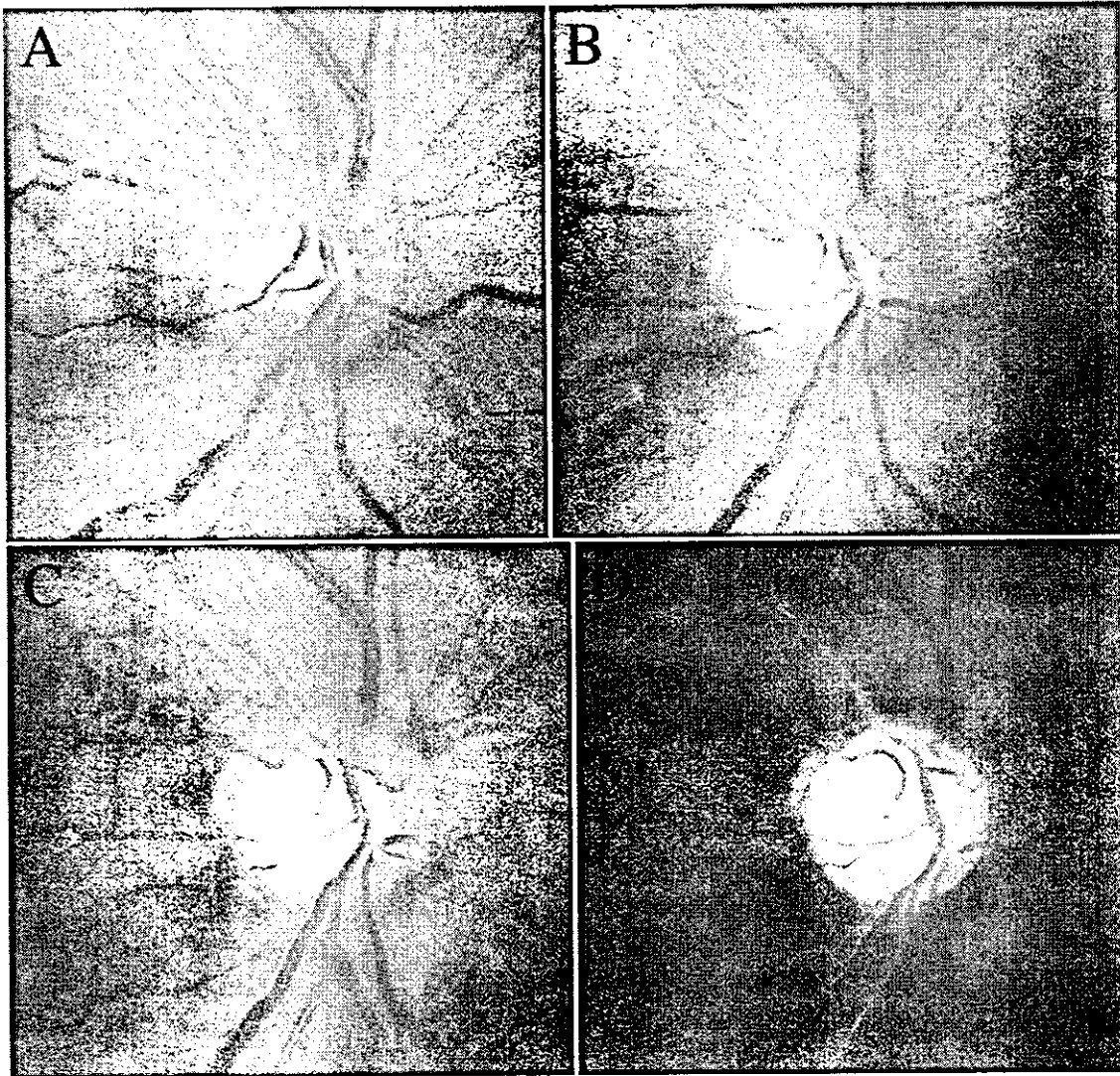


図 21 レーベル病患者の視神経乳頭所見の経過。

A: 1987 年 7 月 4 日急性期には線状出血がみられる。), B: 1987 年 7 月 20 日, C: 1987 年 10 月 19 日, D: 1989 年 7 月 25 日(2 年後の萎縮期には視神経乳頭陥凹がみられる)。

Fas(CD95) 依存性のアポトーシスが、レーベル病における細胞死の病態生理メカニズムに関与することが推定されているが<sup>28)</sup>、-670 A>G 多型と発症年齢や最終視力に関連はなかった。

EPHX1 は喫煙などによって生じたアルキル化剤である epoxide を代謝する酵素であり<sup>34)</sup>、酸化ストレスに対する防御作用を持ち、ニューロンを含め大抵の組織や細胞に存在する。エクソン 3 に Tyr113His 多型は、*in vitro* における酵素活性は野生型の活性を 100% とすると、約 40% 低下している<sup>35)</sup>。今回の我々の結果では、エクソン 3 の Tyr113His 多型において His/His 型の発症年齢は Tyr/Tyr 型および Tyr/His 型の発症年齢より有意に低かった ( $p=0.026$ )。His アリルの人では EPHX1 の酵素活性が低いため酸化ストレスに対する防御作用が Tyr アリルの人よりも弱く、レーベル病への進行を促進する可能性が示唆された。

また、TP53(Arg72Pro) 多型と EPHX1(Tyr113

His) 多型の組み合わせにおいて、TP53 Arg/Arg 型、かつ EPHX1 His/His 型の患者の発症年齢が、それ以外の型同士の患者の発症年齢よりも有意に低かったのは興味深い結果であり、これら 2 つの遺伝子多型が相加的に作用してレーベル病の発症年齢を修飾している可能性が示唆された。しかしながら、これらの多型が本当にレーベル病発症に関与するかは、11778 変異のキャリアと発症者との比較が必要であり、現段階ではキャリアの症例が少ないため不明であるが、今回の我々の結果から、酸化ストレスやアポトーシスがレーベル病の発症年齢に影響を及ぼしていることが推定された。

## 2. 開放隅角緑内障

緑内障は多因子疾患であるが、多因子疾患の疾患感受性遺伝子を同定する方法として、候補遺伝子多型をマーカーとして、多数症例を用いて case-control 関連研究を行った<sup>24)</sup>。対象は、POAG が 201 名(採血時の平均年齢 ± 標準偏差は 65.1 ± 12.0 歳)、正常眼圧緑内障(NTG)



表 3 Optineurin 412 G&gt;A(Thr 34 Thr)多型頻度

臨床型	n	アレル頻度(%)		P value	オッズ比
		G	A		
POAG	194	311(80.2)	77(19.8)	0.005	1.75(1.20-2.56)
NTG	217	358(82.5)	76(17.5)	0.043	1.50(1.03-2.19)
Control	218	382(87.6)	54(12.4)		

P value for  $\chi^2$  test.

が234名(同58.8±13.6歳)、正常人が236名(同70.6±10.9歳)の合計671名である。正常人は緑内障の発症の可能性を少なくするために意図的に高年齢とした。

1) 視神経乳頭の脆弱性とミトコンドリアDNA変異レーベル病の萎縮期では視神経乳頭の陥凹所見がこれまでに報告されてきた。図21は11778変異を持つレーベル病患者の2年間の経過における視神経乳頭写真である。萎縮期には緑内障様の視神経乳頭陥凹がみられた。我々はレーベル病患者とNTG患者において、視神経乳頭陥凹所見を他覚的に解析するために、Heidelberg Retinal Tomography(HRT)を用いて三次元的に解析した結果を2003年に報告<sup>36)</sup>した。その結果、HRTの9個のパラメータのうち7個において両者でほとんど差がみられなかったが、陥凹の深さに関するパラメータであるMean Cup DepthとMaximum Cup Depthにおいてのみ有意にNTG患者の方が有意に陥凹が強かった(両者とも $p<0.001$ )。また、緑内障判定プログラムでは(classification)73%が緑内障と判定された。このことから、ミトコンドリアDNA変異が視神経の脆弱性に関与する可能性があること<sup>25)</sup>、筋組織では加齢によりミトコンドリアDNA変異が蓄積すること<sup>37)</sup>、また常染色体優性遺伝視神経萎縮の原因遺伝子OPA1はミトコンドリア蛋白をコードし、その遺伝子多型と正常眼圧緑内障患者に有意に関連すると報告<sup>38)</sup>されており、ミトコンドリアDNA変異が緑内障の悪化因子であるという仮説を立てた。

今回、開放隅角緑内障187名、正常眼圧緑内障患者234名、正常人236名の合計657名を対象に、レーベル病に関連する6つのミトコンドリアDNA(G3460A(ND1), G11778A(ND4), T14484C(ND6), T9101C(AT-Pase 6)<sup>39)</sup>, G9804A(CO III)<sup>40)</sup>, T14498C(ND6)<sup>41)</sup>)変異の有無、およびヘテロプラスミーの定量をInvader法で行った<sup>4)</sup>。前者3つはレーベル病として一般的な変異であるが、後者3つは稀な変異である。その結果、7症例に3種類のミトコンドリアDNA変異(G11778A, T9101C, G9804A)と新たな2種類の変異(C9099A, T9101G)がみられた。これらの変異は正常人236名にはみられなかった。T9101C<sup>42)</sup>, G9804A<sup>43)</sup>の両変異は、レーベル病を発症するには比較的稀で、家族内発症が少ない変異であることから、変異としては強い障害をもたらすよりは、他の因子の影響を受けることでレーベ

ル病を発症するものと考えられる。したがって、今回の結果は、ミトコンドリアDNA変異が直接緑内障を発症するというのではなく、ミトコンドリアDNA変異が緑内障性視神経障害に二次的に関与している可能性を考えている。症例数が少ないが、今後は緑内障の進行の危険因子の可能性として、緑内障の発症に強く関連する他のミトコンドリアDNA変異を解明する価値はあると思われる。

視神経線維は篩状板を境に視神経乳頭部では有髄から無髄へと変化するが、cytochrome-c oxidase活性は視神経乳頭部の無髄神経線維において高いことが報告<sup>25)44)</sup>されている。したがって、ミトコンドリアDNA変異が存在すると無髄神経線維部が強く障害されることが考えられる。ミトコンドリアDNA変異を持つ緑内障患者では、ミトコンドリアの賦活剤、CoQ10などの投与が治療に有効な可能性がある。

## 2) Optineurin と tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$

Optineurin 遺伝子の412G>A多型に関して、case-control 関連研究を行った結果、POAGおよびNTGの発症に強く関連していることが明らかになった(表3)。すなわち、Aを持つ人は緑内障を発症するリスクがあることを意味している(オッズ比はPOAGは1.75、NTGは1.50)。ただし、これ自体の多型が直接疾患の発症に関連するか、その生物学的な意味は不明である。おそらく、この多型と連鎖不平衡にある別の多型がoptineurinの活性変化に関連している可能性が高い。今後はその多型を明らかにする計画である。

OptineurinはTNF- $\alpha$ 誘導蛋白質であり、アポトーシスを阻害し、TNF- $\alpha$ シグナル回路を通じて視神経保護作用に関連することが提唱されている<sup>11)</sup>。我々は、TNF- $\alpha$ 遺伝子プロモータの-308G>A多型<sup>45)</sup>、-857C>T多型<sup>46)</sup>に注目した。TNF活性はTalleleの方が高いことが報告<sup>47)</sup>されている。-308G>A多型および-857C>T多型に関してcase-control 関連研究を行ったが、POAG、NTGともに関連はなかった。しかしながら、-857C>T多型に関して、POAGにおいてoptineurin 遺伝子の412G>A単独の場合のオッズ比1.76に比べ、-857C>T多型と組み合わせた場合にはオッズ比はさらに高くなり2.86となった(図22)。すなわち、TNF- $\alpha$ 遺伝子プロモータの-857Tアレルとoptineurin 遺伝子の412Aアレルの両者を持つと緑内



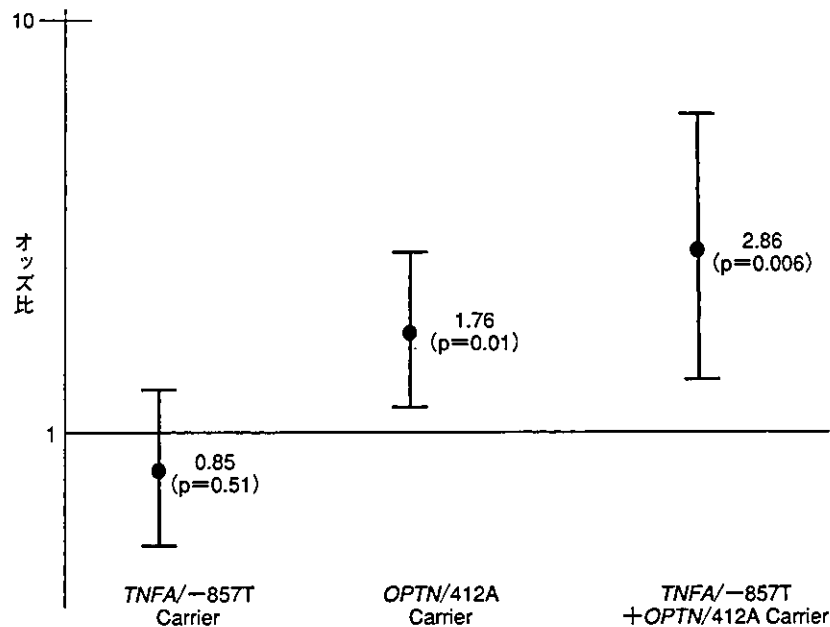


図 22 開放隅角緑内障発症の遺伝子多型オッズ比。

OPTN/412A carrier のオッズ比は 1.76 であるが、同時に TNFA/-857T carrier でもあれば、オッズ比は 2.86 と高くなる。

障発症の危険度が増すことを表している。臨床型では、TNF- $\alpha$  遺伝子プロモータの-857 T を持つ患者のうち、optineurin 遺伝子の 412 A を持つ患者(modified Aulhon-Greve classification による視野障害の平均値±標準偏差は  $3.2 \pm 1.3$ )は持たない患者( $2.7 \pm 1.3$ )に比べ、視野がより進行していた( $p=0.024$ , Mann-Whitney U test)。

この結果は、optineurin と TNF- $\alpha$  が互いに直接影響して緑内障を発症、悪化させるということを示しているのではなく、危険因子のマーカーとしてこの遺伝子型を有すると、より危険度が増すという意味である。Optineurin と TNF- $\alpha$  が互いに生物学的な相互作用があることは証明されているが、これらの多型が持つ蛋白質の生物学的な相互作用は証明されていない。今後それが証明されれば、緑内障の発症機序が解明されると考えられる。

### 3) 全身疾患は緑内障の危険因子に成り得るか

眼圧が緑内障性視神経障害に対して、最も危険な因子であることはこれまでに多くの報告<sup>48)</sup>がなされてきた。しかしながら、正常眼圧緑内障や開放隅角緑内障患者の末期においては、眼圧が低めにコントロールされていても視野欠損が進行する。したがって、緑内障は眼圧だけでなく、非眼圧性の因子による視神経障害も考えられてきた<sup>49)</sup>。これまでの疫学的研究により、高血圧、夜間低血圧、糖尿病、喫煙等が緑内障発症と関連するとの報告もあり、全身性の血管病態が緑内障発症に関与する可能性がある(図 23)<sup>50)51)</sup>。

我々は、全身疾患に関連することが予測される緑内障

の疾患感受性遺伝子の検出を行った。この緑内障感受性遺伝子を明らかにする新しい方法論として、候補遺伝子解析法とゲノムワイドな検索により解析する 2 つのアプローチがある。

緑内障感受性遺伝子同定するに当たり、候補遺伝子法を用いて 38 遺伝子 52 多型を case-control 関連解析で検討した。その内訳は、血管作動性物質関連(ATG, REN, ACE, CYM, CYP11B1, HMOX1, END1, NOS3), 動脈硬化関連(APOE, MTHFR), 酸化ストレス関連(SOD2, NQO1, p22phox, PON1, PON2), サイトカイン関連(TNFA, TNFR2, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ 1), アポトーシス関連(TP53, CD95), 接着分子関連(SELE), 外来物質代謝酵素関連(EPHX1, GSTM1, GSTT1, GSTP1), 線溶系関連(PAI-1), 細胞外マトリックス関連(MMP2, MMP9), 加齢関係(WRN), 受容体関連(AT1, AT2, ENDRA, ENDRB, TNFRSF1A, TNFRSF1B, HTR2C, CNR1), そしてその他にストレス蛋白 HSP 70, 網膜特異的アミノキシダーゼ RAO を検討した。これらの中で緑内障と関連した遺伝子多型は、AT2, PON1, GSTT1, NOS3, EDN1 であった。

個人個人でその危険因子となる緑内障感受性遺伝子多型が異なることがわかり、今後は緑内障感受性遺伝子多型を数多く明らかにすることで、緑内障の発症機序が明らかになることが考えられる。

### 4) ゲノムワイドな方法による緑内障感受性遺伝子の同定

これまでに述べてきたことは、候補となる感受性遺伝

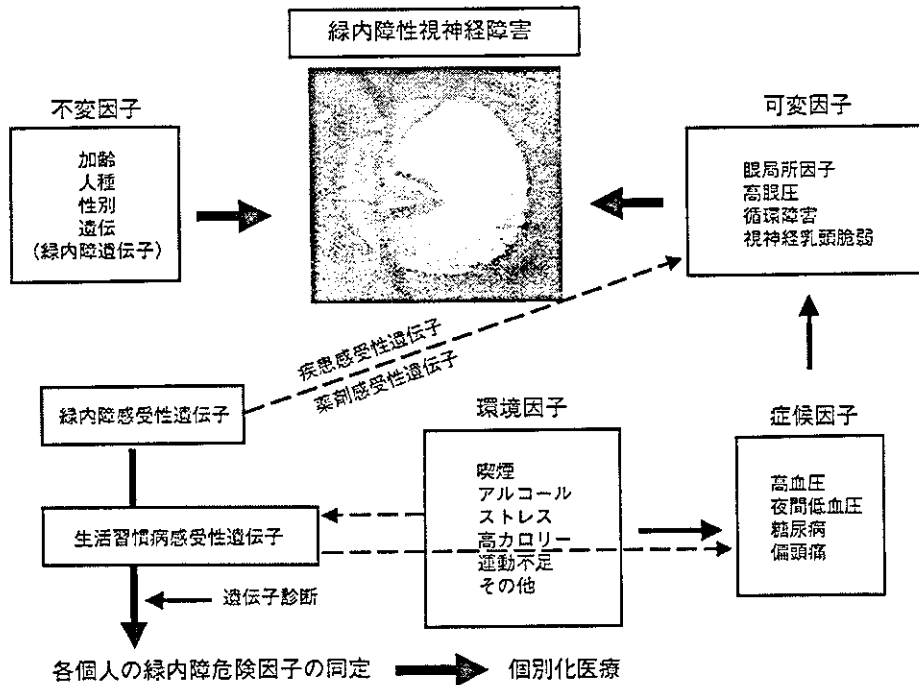


図 23 緑内障発症に関する種々の危険因子(仮説)。

不変因子(遺伝的要因)と可変因子(環境要因)の関与が考えられる。遺伝的要因には、緑内障感受性遺伝子と生活習慣病感受性遺伝子が考えられる。これらの因子は個人により異なるので、それを明らかにすれば治療に関して個別化医療へ応用が可能である。

子多型の同定であったが、今後は未知の新規な感受性遺伝子も同定してゆく必要がある。これまで外国では、ゲノムワイドな方法による緑内障感受性遺伝子の染色体上のマッピングに関する報告<sup>52)~54)</sup>がされている。我々は現在企業と共同で、日本人緑内障患者における感受性遺伝子を解明するプロジェクトを進めている。

### V アンギオテンシンII受容体ブロッカーの緑内障治療薬(代替医薬品)としての応用

レニン・アンギオテンシン系は強力な血管収縮作用により血圧を上昇させるが、眼局所(網膜、毛様体)にもレニン・アンギオテンシン系が存在し<sup>55)56)57)</sup>、房水動態に関与すると考えられている。実際にACE阻害剤<sup>58)</sup>やアンギオテンシンII受容体ブロッカー<sup>59)</sup>の投与により眼圧が下降することが報告されており、これを支持している。眼圧下降の機序として、動物実験からはuveal flowの増大が考えられている<sup>60)</sup>。

今回我々は、正常人38人においてアンギオテンシンII受容体ブロッカーであるカンデサルタン12mgを内服させ1時間毎に6時間までと24時間後にそれぞれ、眼圧、血圧(拡張期および収縮期)、脈拍数を検査した。男性21名、女性17名であった。眼圧下降効果と3種類のAT1受容体多型(1166A>C, -521C>T, -713T>G)との関連を検討した。実験に当たり、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得た後、被検者からイン

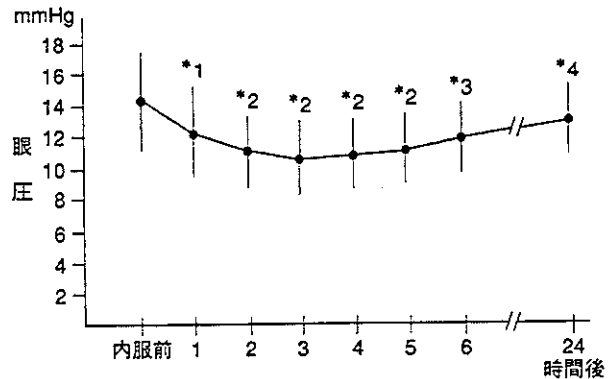


図 24 アンギオテンシンII受容体ブロッカー(カンデサルタン)内服による眼圧下降効果。

24時間にわたり内服前と有意に眼圧が下降している。One-factor ANOVA検定で $p < 0.001$ 。内服前眼圧 $14.3 \pm 3.3$ (平均値 $\pm$ 標準偏差)mmHg, 内服1時間後眼圧 $12.2 \pm 3.0$  mmHg(\*1:  $p = 0.0004$ , Fisher PLSD検定), 内服2時間後眼圧 $11.1 \pm 2.5$  mmHg(\*2:  $p < 0.0001$ ), 内服3時間後眼圧 $10.6 \pm 2.4$  mmHg(\*2:  $p < 0.0001$ ), 内服4時間後眼圧 $10.9 \pm 2.3$  mmHg(\*2:  $p < 0.0001$ ), 内服5時間後眼圧 $11.1 \pm 2.2$  mmHg(\*2:  $p < 0.0001$ ), 内服6時間後眼圧 $11.9 \pm 2.2$  mmHg(\*3:  $p = 0.0001$ ), 内服24時間後眼圧 $12.9 \pm 2.2$  mmHg(\*4:  $p = 0.03$ )。

フォームド・コンセントを得た後、検査および採血を行った。

結果を図24に示す。One-factor ANOVA検定にて、

p<0.001 で、多群間で統計学的に有意差がみられた。Fisher protected least significant difference (Fisher PLSD) 検定で、すべての時間において内服前より有意に眼圧は低下していた (p<0.01)。眼圧下降は内服後 3 時間で最大となり、24 時間下降効果は維持された。血圧 (拡張期および収縮期) や脈拍数に有意の変化はみられなかった。図 25 は 38 名の個々の眼圧変化を示した図であるが、AT1 遺伝子多型と眼圧効果には関連はなかった。各個々により薬剤効果に差があることがわかる。

アンジオテンシン II 受容体ブロッカーは高血圧でない人にはそれほど血圧下降を来さないことが報告されている。したがって、ダイアモックス®が何らかの理由で内服できず、高血圧を合併していない緑内障患者では使用できる可能性がある。現在点眼薬 (オルメサルタンメドキシソミル) の開発も行われている (フェーズ 2)。今回の

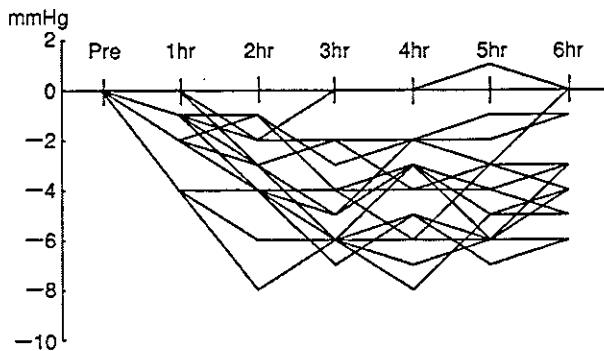


図 25 アンジオテンシン II 受容体ブロッカー (カンデサルタン) 内服による眼圧下降幅。38 名の個々の眼圧下降幅を示す。

結果は、緑内障患者で高血圧治療薬としてアンジオテンシン II 受容体ブロッカーを内服している患者の眼圧は、実際の眼圧よりも数 mmHg ほど低いことを念頭に入れておく必要があることを示唆している。問診の時にアンジオテンシン転換酵素 (ACE) 阻害剤やアンジオテンシン II 受容体ブロッカーの内服の有無を知っておく必要がある。

### VI 遺伝子変異検出パネルの作成

将来の遺伝子診療や個別化医療に備え、Invader 法を用いた緑内障遺伝子のミオシリン変異診断パネルのプロトタイプを作成した (<http://biotech.nikkeibp.co.jp/news/detail.jsp?newsid=SPC2003063023256>)。現在解析できる変異は Ile360Asn, Ala363Thr, Gly367Arg, Pro370Leu および Thr448Pro である。

今後は、緑内障発症または進行に関するリスク診断を行う感受性遺伝子多型検出パネルの作成を目指している。例えば、ある人が危険因子を持っているとして、数が多ければそれだけ発症や進行のリスクが高くなることが考えられる。図 26 は予想図であるが、持っている数によりその危険度は異なるため、将来的には多数症例を検討することにより、リスクの高い範囲を決定できると考えられる。しかしながら、緑内障発症や進行の危険度は危険因子の数だけの問題ではなく、その質 (または種類) にもよるので、危険因子の質にもリスク度の順番を決定して行くことが重要と考える。

### VII 遺伝子診断の今後の展望

図 27 は第 107 回日本眼科学会総会の特別講演で塚原

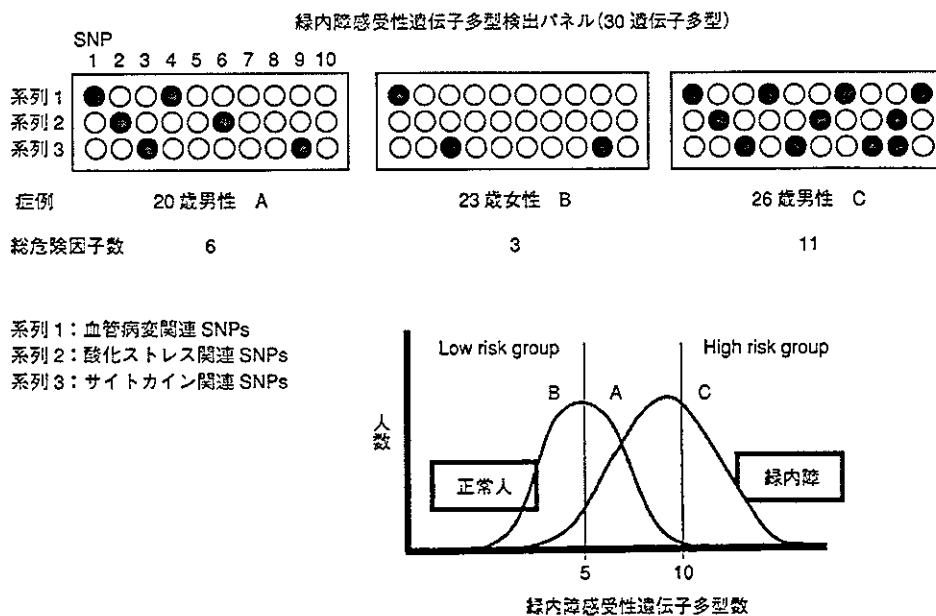


図 26 緑内障感受性遺伝子多型検出パネルと緑内障発症リスクの予想。診断パネルにより危険因子数を検出し (上段)、それに基づき危険度を推定する (下段)。

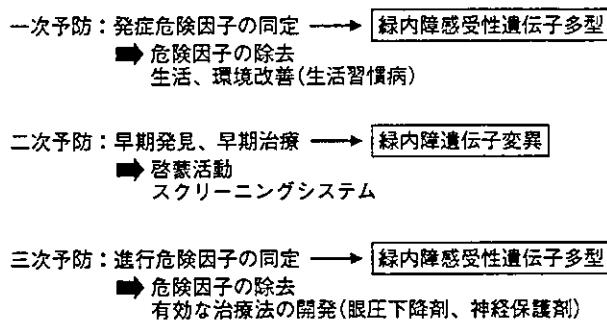


図 27 緑内障による失明予防戦略。

塚原重雄：21世紀の緑内障診療の現状と未来。日眼会誌 107：745，2003より改変した。各個人における危険因子としての遺伝子多型を明らかにすることで、個別化医療への道が開ける。

重雄名誉教授が述べられている「21世紀の緑内障診療の現状と未来」を参考にゲノム医療における緑内障による失明予防戦略を作成したものである。

一次予防として、緑内障の発症に関連する危険因子が同定できれば、その因子を除去することにより発症を抑えるか、発症を遅くすることが可能となる。最近、スタチン(HMG-CoA還元酵素阻害剤)や他のコレステロールを下げる内服薬を長期に使用することにより緑内障発症の危険を下げる事が報告<sup>61)</sup>された。特に、コレステロールが高い人ではより有効であった。スタチンはコレステロールを低下させるだけでなく、血管保護作用(血管内皮のNO合成酵素の発現増加やAT1受容体作用の抑制)が報告されている。各個人における危険因子を診断することができれば、それに応じた治療が行われる(個別化医療)。二次予防としては、早期発見、早期治療であるが、緑内障の患者はその20%が医療機関を受診しているに過ぎないことから、積極的な啓蒙活動を行うことが重要と思われる。家族歴は高い危険因子なので、家系内に緑内障を発症している人は、緑内障遺伝子診断を行うことで、発症前にその確定診断を受けることができ、早期治療が可能となる。

三次予防としては、緑内障を発症した患者の進行を遅らせることであるが、各個人において、進行の危険因子がわかれば、それに応じた治療が行われる。例えば、エンドセリンは緑内障との関連が示唆されているが、エンドセリン関連の感受性遺伝子多型が悪化に関連するとなれば、その危険因子を持った患者はエンドセリンを抑える薬剤の投与が有効である可能性がある<sup>62)63)</sup>。

21世紀のゲノム医療の時代における遺伝子診断の意義は、多因子疾患におけるリスク診断である。緑内障感受性遺伝子多型の検索は、各個人のゲノムの多様性、すなわち緑内障になりやすい体質の差や進行しやすい体質の差を検出することになり、その情報は個別化医療にむけて発症の危険性や予防、予後予測、および将来的には薬剤などの治療法の選択および新しい治療薬の開発につ

ながることが期待される。また、今回、アンギオテンシンII受容体ブロッカーによる眼圧下降効果に関連する遺伝子多型は発見できなかったが、レニン・アンギオテンシン系多型と関連する緑内障患者はアンギオテンシンII受容体ブロッカーが有効である可能性がある。したがって、今後は既存の内服薬でもスタチンやアンギオテンシンII受容体ブロッカーのように、緑内障予防や治療に関連する内服薬を個別化医療の中で緑内障治療薬として使用できる可能性が考えられる。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会をいただきました日本眼科学会評議員各位、座長の労をお取りいただき研究の方向につきご助言を賜りました東京大学新家 眞教授に心から感謝申し上げます。

また、本研究は多くの学内外の先生方にご協力を賜りました。ここに心より感謝し御礼を申し上げます。

本研究は、文部科学省科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費補助金、未来開拓学術研究推進事業委託研究などの研究助成を受けた。

## 文 献

- 1) 多因子—遺伝要因の解明と現状—。医学のあゆみ 202(10)：474—888, 2002.
- 2) Lyamichev V, Mast AL, Hall JG, Prudent JR, Kaiser MW, Takova T, et al: Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol* 17: 292—296, 1999.
- 3) Olivier M, Chuang LM, Chang MS, Chen YT, Pei D, Ranade K, et al: High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms using new biplex invader technology. *Nucleic Acids Res* 30: e 53, 2002.
- 4) Mashima Y, Nagano M, Funayama T, Zhang Q, Egashira T, Kudoh J, et al: Rapid quantification of the heteroplasmy of mutant mitochondrial DNAs in Leber's hereditary optic neuropathy using the Invader technology. *Clin Biochem* 37: 268—276, 2004.
- 5) Smith KH, Johns DR, Heher KL, Miller NR: Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 111: 1486—1490, 1993.
- 6) Mashima Y, Saga N, Hiida Y, Oguchi Y, Wakakura M, Kudoh J, et al: Quantitative determination of heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy by single-strand conformation polymorphism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1714—1720, 1995.
- 7) Xiao W, Oefner PJ: Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mut* 17: 439—474, 2001.
- 8) Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, et al: Optimal temperature selection for mutation detection by denatur-

- ing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* 45 : 1133—1140, 1999.
- 9) **Bunn CF, Lintott CJ, Scott RS, George PM** : Comparison of SSCP and DHPLC for the detection of LDLR mutations in a New Zealand cohort. *Hum Mutat* 19 : 311, 2002. Online Citation : Human Mutation, Mutation in Brief # 492(2002).
  - 10) **Stone EM, Fingert JH, Alward WL, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SL, et al** : Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275 : 668—670, 1997.
  - 11) **Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, et al** : Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 295 : 1077—1079, 2002.
  - 12) **Ishikawa K, Funayama T, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, et al** : A novel *MYOC* gene mutation, Phe369Leu in Japanese patients with primary open-angle glaucoma detected by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Glaucoma* 13 : 466—471, 2004.
  - 13) **Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, et al** : Variants in Optineurin gene and their association with tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms in Japanese patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 in press.
  - 14) **Munier FL, Korzatska E, Djemai A, Paslier DL, Zografos L, Pescia G, et al** : Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nature Genet* 15 : 247—251, 1997.
  - 15) **真島行彦, 山田昌和, 小口芳久** : *TGFBI* 変異に関連する常染色体優性遺伝性角膜ジストロフィ. *日眼会誌* 105 : 659—672, 2001.
  - 16) **Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, et al** : Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242 : 1427—1430, 1998.
  - 17) **Mashima Y, Yamada K, Wakakura M, Kigawa K, Kudoh J, Shimizu N, et al** : Spectrum of pathologic mitochondrial DNA mutation and clinical features in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. *Curr Eye Res* 16 : 403—408, 1998.
  - 18) **山田恵子, 真島行彦, 絆田芳樹, 小口芳久** : 慶應義塾大学病院におけるレーベル遺伝性視神経症の遺伝子診断の現状. *日眼会誌* 105 : 608—613, 2001.
  - 19) **Mashima Y, Saga M, Hiida Y, Imamura Y, Kudoh J, Shimizu N** : Novel mutation in RP2 gene in two brothers with X-linked retinitis pigmentosa and mtDNA mutation of Leber hereditary optic neuropathy who showed marked differences in clinical severity. *Am J Ophthalmol* 130 : 357—359, 2000.
  - 20) **Newman NJ** : Hereditary optic neuropathies. In : Miller NR, et al (Eds) : Walsh and Hoyt's clinical neuro-ophthalmology. Vol. I. 5<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 741—773, 1998.
  - 21) **Günduz K, Özdemir O** : Bilateral retrobulbar neuritis following unilateral herpes zoster ophthalmicus. *Ophthalmologica* 208 : 61—64, 1994.
  - 22) **Deane JS, Bibby K** : Bilateral optic neuritis following herpes zoster ophthalmicus. *Arch Ophthalmol* 113 : 972—973, 1995.
  - 23) **根岸一乃, 石田 晋, 安藤靖恭, 鈴木参郎助, 神園純一** : 眼部帯状疱疹後に発症した両眼性視神経ぶどう膜炎の 1 例. *あたらしい眼科* 9 : 457—461, 1992.
  - 24) **Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, et al** : Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 347 : 1916—1923, 2002.
  - 25) **Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA** : Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res* 23 : 53—89, 2004.
  - 26) **Qi X, Lewin AS, Hauswirth WW, Guy J** : Optic neuropathy induced by reductions in mitochondrial superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 1088—1096, 2003.
  - 27) **Yen MY, Kao SH, Wang AG, Wei YH** : Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA in Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 ; 45 : 1688—1691.
  - 28) **Danielson SR, Wong A, Carelli V, Martinuzzi A, Schapira AH, Cortopassi GA** : Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-Induced apoptosis. *J Biol Chem* 277 : 5810—5815, 2002.
  - 29) **Ghelli A, Zanna C, Porcelli AM, Schapira AH, Martinuzzi A, Carelli V, et al** : Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in trans-mitochondrial cells incubated with galactose medium. *J Biol Chem* 278 : 4145—4150, 2003.
  - 30) **Brown MD, Trounce IA, Jun AS, Allen JC, Wallace DC** : Functional analysis of lymphoblast

- and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J Biol Chem* 275 : 39831—39836, 2000.
- 31) Carelli V, Ros-Cisneros FN, Sadun AA : Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction : Genetic and acquired optic neuropathies. *Neurochem Int* 40 : 573—584, 2002.
  - 32) Bonafe M, Salvioli S, Barbi C, Mishto M, Trappassi C, Gemelli C, et al : p 53 codon 72 genotype affects apoptosis by cytosine arabinoside in blood leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 299 : 539—541, 2002.
  - 33) Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, et al : The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33 : 357—365, 2003.
  - 34) Skoda RC, Damierre A, McBride OW, Gonzalez FJ, Meyer UA : Human microsomal xenobiotic epoxide hydrolase. Complementary DNA sequence, complementary DNA-directed expression in COS-1 cells, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 263 : 1549—1554, 1988.
  - 35) Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ : Human microsomal epoxide hydrolase : Genetic polymorphism and functional expression *in vitro* of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 3 : 421—428, 1994.
  - 36) Mashima Y, Kimura I, Yamamoto Y, Ohde H, Ohtake Y, Tanino T, et al : Optic disc excavation in an atrophic stage of Leber's hereditary optic neuropathy : Differentiation from normal-tension glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241 : 75—80, 2003.
  - 37) Brierley EJ, Johnson MA, Lightowers RN, James OF, Turnbull DM : Role of mitochondrial DNA mutations in human aging : Dmplications for the central nervous system and muscle. *Ann Neurol* 43 : 217—223, 1998.
  - 38) Aung T, Ockala L, Ebenezer ND, et al : A major marker for normal tension glaucoma : Association with polymorphisms in the OPA1 gene. *Hum Genet* 110 : 52—56, 2002.
  - 39) Lamminen T, Majander A, Juvonen V, Wikstrom M, Aula P, Nikoskelainen E, et al : A mitochondrial mutation at nt 9101 in the ATP synthase 6 gene associated with deficient oxidative phosphorylation in a family with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 56 : 1238—1240, 1995.
  - 40) Johns DR, Neufeld MJ : Cytochrome c oxidase mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 196 : 810—815, 1993.
  - 41) Wissinger B, Besch D, Baumann B, Fauser S, Christ-Adler M, Jurklies B, et al : Mutation analysis of the ND6 gene in patients with Lebers hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 234 : 511—515, 1997.
  - 42) Majander A, Lamminen T, Juvonen V, Aula P, Nikoskelainen E, Savontaus ML, et al : Mutations in subunit 6 of the F1F0-ATP synthase cause two entirely different diseases. *FEBS Lett* 412 : 351—354, 1997.
  - 43) Wakakura M, Hayashi E, Toyo-oka Y, Yamabe H, Wada C, Ohtani H, et al : Bilateral optic neuropathy with mitochondrial DNA 9804 mutation detected by non-isotopic single-strand conformational polymorphism. *Neuro-ophthalmol* 19 : 7—12, 1998.
  - 44) Bristow EA, Griffiths PG, Andrews RM, Johnson MA, Turnbull DM : The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch Ophthalmol* 120 : 791—796, 2002.
  - 45) Lin HJ, Tsai FJ, Chen WC, Shi YR, Hsu Y, Tsai SW : Association of tumour necrosis factor alpha-308 gene polymorphism with primary open-angle glaucoma in Chinese. *Eye* 17 : 31—34, 2003.
  - 46) Kato T, Honda M, Kuwata S, Juji T, Kunugi H, Nanko S, et al : Novel polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor alpha gene : No association with narcolepsy. *Am J Med Genet* 88 : 301—304, 1999.
  - 47) Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, et al : Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor(TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 51 : 605—612, 1998.
  - 48) Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M : Early Manifest Glaucoma Trial Group. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression : Results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 120 : 1268—1279, 2002.
  - 49) Tezel G, Siegmund KD, Trinkaus K, Wax MB, Kass MA, Kolker AE : Clinical factors associated with progression of glaucomatous optic disc damage in treated patients. *Arch Ophthalmol*

- 119 : 813—818, 2001.
- 50) **Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, Morbio R, Varotto A** : Vascular risk factors for primary open angle glaucoma : The Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology* 107 : 1287—1293, 2000.
- 51) **Drance S, Anderson DR, Schulzer M** : Risk factor for progression of visual field abnormalities in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2001 ; 131 : 699—708.
- 52) **Wiggs JL, Allingham RR, Hossain A, Kern J, Auguste J, DelBono EA, et al** : Genome-wide scan for adult onset primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet* 9 : 1109—1117, 2000.
- 53) **Nemesure B, Jiao X, He Q, Leske MC, Wu SY, Hennis A, et al** : Barbados Family Study Group. A genome-wide scan for primary open-angle glaucoma (POAG) : The Barbados Family Study of Open-Angle Glaucoma. *Hum Genet* 112 : 600—609, 2003.
- 54) **Wiggs JL, Lynch S, Ynagi G, Maselli M, Auguste J, Del Bono EA, et al** : A genomewide scan identifies novel early-onset primary open-angle glaucoma loci on 9q22 and 20p12. *Am J Hum Genet* 74 : 1314—1320, 2004.
- 55) **Wagner J, Jan Danser AH, Derkx FH, de Jong TV, Paul M, Mullins JJ, et al** : Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye : Evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br J Ophthalmol* 80 : 159—163, 1996.
- 56) **Cullinane AB, Leung PS, Ortego J, Coca-Prados M, Harvey BJ** : Renin-angiotensin system expression and secretory function in cultured human ciliary body non-pigmented epithelium. *Br J Ophthalmol* 86 : 676—683, 2002.
- 57) **Wheeler-Schilling TH, Kohler K, Sautter M, Guenther E** : Angiotensin II receptor subtype gene expression and cellular localization in the retina and non-neuronal ocular tissues of the rat. *Eur J Neurosci* 11 : 3384—3394, 1999.
- 58) **Constad WH, Fiore P, Samson C, Cinotti AA** : Use of an angiotensin converting enzyme inhibitor in ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 105 : 674—677, 1988.
- 59) **Costagliola C, Verolino M, De Rosa ML, Iaccarino G, Ciancaglini M, Mastropasqua L** : Effect of oral losartan potassium administration on intraocular pressure in normotensive and glaucomatous human subjects. *Exp Eye Res* 71 : 167—171, 2000.
- 60) **Inoue T, Yokoyama T, Mori Y, Sasaki Y, Hosokawa T, Yanagisawa H, et al** : The effect of topical CS-088, an angiotensin AT1 receptor antagonist, on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in rabbits. *Curr Eye Res* 23 : 133—138, 2001.
- 61) **McGwin G Jr, McNeal S, Owsley C, Girkin C, Epstein D, Lee PP** : Statins and other cholesterol-lowering medications and the presence of glaucoma. *Arch Ophthalmol* 122 : 822—826, 2004.
- 62) **Yu DY, Su EN, Cringle SJ, Schoch C, Percicot CP, Lambrou GN** : Comparison of the vasoactive effects of the docosanoid unoprostone and selected prostanoids on isolated perfused retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1499—1504, 2001.
- 63) **Polska E, Doelemeyer A, Luksch A, Ehrlich P, Kaehler N, Percicot CL, et al** : Partial antagonism of endothelin 1-induced vasoconstriction in the human choroid by topical unoprostone isopropyl. *Arch Ophthalmol* 120 : 348—352, 2002.

本論文で記載した遺伝子異常に関する検査(レーベル病におけるミトコンドリア DNA G 3460 A 変異, G 11778 A 変異, T 14484 C 変異の有無とヘテロプラスミー定量検査および開放隅角緑内障におけるミオシリン遺伝子 Ile 360 Asn 変異, Ala 363 Thr 変異, Gly 367 Arg 変異, Pro 370 Leu 変異, Thr 448 Pro 変異)は下記の検査受託会社で提供されている。読者の便宜のために参考までに記載する(株式会社ビー・エム・エル(<http://uwb01.bml.co.jp/test/index.html>)). ただし、著者はこの会社と営利的あるいはそれに類似した関係はない。



### Comment : 大庭 紀雄

第 108 回日本眼科学会宿題報告「眼科検査診断法：個別化医療の時代にむけての遺伝子診断」は、検査や診断の領域にも新しい時代がやってきたことを感じさせる。今や、evidence-based medicine に準じて医療を標準化し critical pathway を活用して効果的に提供する時代であるが、同じ外因に曝されて発症しても病状は個体ごとにさまざまであるし、同じライフスタイルで過ごしても生活習慣病を患う個体もあれば患わない個体もある、同じ疾病を患っても薬物に反応する個体もあれば反応しない個体もある、同じ疾病の有病率が人種や民族によって著しく異なる、といったことは日常茶飲事に経験することである。患者ごとにきめ細かに対応しようという個別化医療は、いわば ready-made から order-made へのパラダイムの変革である。こうした tailored-medicine を進めるために欠かせないのが集団や個人の遺伝情報である。分子生物学の黎明から半世紀、臨床に應用されて成功を取めたのは、Nathans の先天性覚異常(1986 年)、Wallace のレーベル遺伝性視神経症(1988 年)、Dryja の網膜色素変性(1990 年)の三つを先駆けとする単一遺伝子病原因遺伝子の発見であった。メンデル遺伝病の全貌が明らかにされて遺伝子診断学が完成するのも遠くはないであろう。一方、新課題の個別化医療の標的は多因子性遺伝病 polygenic disease (multifactorial disease) あるいは生活習慣病というカテゴリーの common disease である。対象を例示すれば、アトピー性眼症、翼状片、加齢白内障、各種緑内障、高血圧、糖尿病、加齢黄斑変性、網膜剝離と重要疾患が目白押しである。こうした広義の生活習慣病は a priori に、多数の遺伝要因と多数の環境要因とが複雑に絡み合って成立すると想定されるのだが、ヒト白血球抗原 (HLA) との関連性が確認されているベーチェット病や原田病を例外として、実体的知識はほとんどない。遺伝要因を把握するための方略として今のところ有力視されているのは、箇々の疾患で関連すると考えられる候補遺伝子の多型 (polymorphism) と罹病性 (disease susceptibility) との関係性 (association) を把握することである。この報告では、原発開放隅角緑内障 201 例・正常眼圧緑内障 234 例・健常コントロール 236 例という多数を試料として候補遺伝子 38 種類の多型頻度を調査している。個別化医療は今のところスローガンや掛け声が先行し、実践を促すにはデータ不足ではあるが、精力的に取り組まれているから今後迅速に進むのではないだろうか。そして、数千も数万もの遺伝子多型を簡単に調べる分析技術、疾病との関連性を検定するための統計分析技術が開発されるであろう。その日に備えて、患者と健常対照の良質の試料をできるだけ多く集めて保存しておくことが大切だと思う。

# Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head

Minoru Obazawa,<sup>1,2</sup> Yukibiko Mashima,<sup>2</sup> Naoko Sanuki,<sup>1</sup> Setsuko Noda,<sup>3</sup> Jun Kudoh,<sup>4</sup> Nobuyoshi Shimizu,<sup>4</sup> Yoshibisa Oguchi,<sup>2</sup> Yasubiko Tanaka,<sup>1</sup> and Takeshi Iwata<sup>1</sup>

**PURPOSE.** To determine the cDNA sequences and analyze the expression of porcine optineurin and myocilin in trabecular meshwork cells (TMCs) and astrocytes from the optic nerve head under normal and experimental conditions.

**METHODS.** Both porcine optineurin and myocilin were cloned to determine the cDNA sequences. Porcine TMCs and astrocytes were isolated and treated with dexamethasone (500 nM) for 2 weeks, incubated under hypoxic conditions (7% O<sub>2</sub>) for 72 hours, or exposed to 33 mm Hg hydrostatic pressure for 72 hours. A 10% mechanical stretch for 24 hours was also performed on TMCs. The expression level of the optineurin and myocilin transcripts was analyzed by real-time quantitative PCR.

**RESULTS.** The sequences of porcine optineurin and myocilin cDNA were determined, and the expression of both genes was confirmed in both TMCs and astrocytes. Amino acid sequences of porcine optineurin and myocilin were homologous to those of humans by 84% and 82%, respectively, and shared protein motifs and modification sites. The expression of myocilin mRNA by TMCs and astrocytes was increased by 8.0- and 5.5-fold, respectively, after exposure to dexamethasone. In contrast, the expression of optineurin was suppressed to 68% in TMCs and 48% in astrocytes after exposure to dexamethasone. A significant reduction of myocilin expression was observed after 72 hours of incubation under hypoxic conditions in both types of cells, whereas optineurin was not affected. Hydrostatic pressure for 72 hours and mechanical stretching for 24 hours had minimal effects on gene expression of both optineurin and myocilin.

**CONCLUSIONS.** The high homology of porcine optineurin and myocilin to the comparable human genes indicates that pigs can be used to study changes in gene expression in hyperten-

sive eyes. The alterations in expression of myocilin but not of optineurin under stress suggest that different mechanisms in the phenotype of glaucoma associated with the two genes are involved in development of glaucoma. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2652-2659) DOI:10.1167/iovs.03-0572

Characteristic degeneration and excavation of the optic nerve head are found in glaucomatous eyes. These changes are considered to be due to ocular hypertension with the intraocular pressure (IOP) continuously more than 21 mm Hg. In contrast, there are patients with normal ocular tension who show glaucomatous changes in the optic nerve head. These patients, in whom there is no evidence of an elevation of IOP at any time, are said to have normal-tension glaucoma (NTG).

Currently three genes—myocilin (*MYOC*),<sup>1,2</sup> cytochrome P4501B1 (*CYP1B1*),<sup>3,4</sup> and optineurin (*OPTN*)<sup>5</sup>—are associated with glaucoma. Optineurin is the most recent gene to be identified and is responsible for 16.7% of families with hereditary NTG.<sup>5</sup> It has been identified and studied by different groups under various names: NRP, NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO)-related protein<sup>6</sup>; FIP-2, adenovirus E3-14-kDa interacting protein 2<sup>7</sup>; Huntingtin interacting protein L (HYPL)<sup>8</sup>; and transcription factor IIIA interacting protein (TFIIIA-INTP).<sup>9</sup> Optineurin is homologous to NEMO, a structural and regulatory subunit of the high molecular weight kinase complex (IKK) that is responsible for the phosphorylation of NF- $\kappa$ B inhibitors.<sup>6</sup>

Some of the functions of optineurin are known. They include inhibition of the tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  pathway,<sup>7</sup> interaction with transcription factor IIIA,<sup>9</sup> and mediation of the interaction of Huntingtin and Rab8 for regulation of membrane trafficking and cellular morphogenesis.<sup>8</sup> Optineurin is induced by TNF- $\alpha$  and binds to an inhibitor of TNF- $\alpha$  and the E3-14.7-kDa protein.<sup>7</sup>

The optineurin protein contains two leucine zippers (LZs); an N-terminal LZ responsible for the association with Rab8, and a C-terminal LZ required for Huntingtin. The gene is mapped to 10p14 and contains 16 exons encoding a 66-kDa protein. It contains two putative bZIP transcription factor motifs, a C2H2 type zinc finger, and two LZ domains.

Recently, Vittitow and Borrás<sup>10</sup> reported that elevated IOP, and exposure to TNF- $\alpha$  and dexamethasone (DEX) led to an upregulation of optineurin expression in an organ culture system. However, it is still unclear how mutations of the optineurin gene lead to glaucoma.

Another gene associated with glaucoma is myocilin, which is found in 36% of juvenile-onset POAG and 4% of adult-onset POAG.<sup>11-15</sup> Myocilin is a 57-kDa protein that contains motifs homologous to the olfactomedin domain where nearly all mutations in patients with POAG have been identified.<sup>1,11-15</sup>

Pigs and miniature pigs are readily available and have been used for a wide variety of medical studies, including tissue transplantation.<sup>16,17</sup> Because their eyes are similar in size and

From the <sup>1</sup>National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan; the Departments of <sup>2</sup>Ophthalmology and <sup>4</sup>Molecular Biology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan; and the <sup>3</sup>Department of Nursing, School of Health Science, Tokai University, Isehara, Kanagawa, Japan.

Supported by Research on Eye and Ear Sciences from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan; a grant for Scientific Research and Exploratory Research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan; and funding from the Research for the Future Program from the Japan Society for the Promotion of Science.

Submitted for publication June 7, 2003; revised December 1, 2003; accepted December 8, 2003.

Disclosure: M. Obazawa, None; Y. Mashima, None; N. Sanuki, None; S. Noda, None; J. Kudoh, None; N. Shimizu, None; Y. Oguchi, None; Y. Tanaka, None; T. Iwata, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Takeshi Iwata, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, 2-5-1, Higashi-gaoka, Meguro, Tokyo 152-8902, Japan; iwata Takeshi@kankakuki.go.jp.

anatomy to human eyes,<sup>18</sup> pigs have often been used to study the aqueous outflow system and the regulation of IOP.

The purpose of this study was to clone both the porcine optineurin and myocilin genes to determine their cDNA sequences, and then to use the sequences to determine the transcriptional response of isolated porcine trabecular meshwork cells (TMCs) and astrocytes from the optic nerve head after exposure to dexamethasone (DEX), increased hydrostatic pressure, hypoxia, and mechanical stretching.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Cultures

Pig eyes were obtained within 3 hours of death from a local abattoir. The eyes were disinfected in 0.2% povidone iodine for 10 minutes followed by soaking in 70% alcohol for 30 seconds. The eyes were washed several times in phosphate-buffered saline (PBS) and cut into halves along the equator.

After the lens and iris were removed from the anterior half, the trabecular tissue was trimmed from the cornea at the Schwalbe's line and then from the sclera, as described.<sup>19,20</sup> The optic nerve head was separated from the sclera and surrounding tissues. The prelaminar region was dissected from the optic nerve head and cut into three or four pieces.<sup>21,22</sup> The trabecular and prelaminar tissues were placed separately in 35-mm plastic Petri dishes in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen-Gibco, Grand Island, NY) with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 1% antibiotic-antimycotic (Invitrogen-Gibco).

The tissues were incubated for 1 to 2 weeks at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub> and 95% air until cells migrated from the tissue onto the surface of the culture dish. Cells were isolated, and fourth-passage cells were obtained for experimental use. The cells that migrated from the optic nerve head were confirmed to be astrocytes by immunostaining with anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP), a protein marker for astrocytes (Sigma-Aldrich).

### Cloning of Porcine Optineurin cDNA

mRNA was isolated from cultured TMCs using mRNA isolation kits (MicroPoly(A)Pure; Ambion, St. Austin, TX). Primers (sense primer, 5'-ATGTCCTCAACCTCTGAGCT-3', antisense primer 5'-TGTCTCTGGCTCCTCTTTGAAA-3') were designed to include the conserved sequences for human, mouse (Discovery System; Celera, Gaithersburg, MD), and rat to amplify the open reading frame of porcine optineurin mRNA using a commercial system (Superscript One-Step RT-PCR System; Invitrogen-Gibco), according to the manufacturer's protocol.

The PCR products were cloned into a TA cloning vector (pDrive; Qiagen, Valencia, CA) using a PCR Cloning Kit (Qiagen), and the inserts were sequenced using a fluorescent dideoxynucleotide automated sequencer (CEQ2000XL DNA Analysis System; Beckman-Coulter, Fullerton, CA). The missing 3' and 5' ends of the cDNAs were amplified using the 3' and 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) method (Marathon cDNA Amplification Kit; BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA). The full-length cDNA sequence of porcine optineurin can be obtained from GenBank under accession number AF513722 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>; provided in the public domain by the National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

### Cloning of Porcine Myocilin cDNA

The same mRNA used for optineurin cDNA cloning was used for myocilin cDNA amplification. The sense primer, 5'-ATGCCAGCTS(G/C)TCCAGCTGCT-3', and antisense primer, 5'-GACCATGTTGAAGTTGTC-3', were designed to include the conserved sequence of human, mouse, rat, and bovine myocilin and to amplify the open reading frame of porcine myocilin mRNA, using the RT-PCR system (Superscript One-Step RT-PCR System; Invitrogen-Gibco). The PCR

products were cloned into a TA cloning vector (TA Cloning Kit; Invitrogen, San Diego, CA), and the inserts were sequenced. The missing 3' and 5' ends of the cDNA were amplified using the RACE method (Marathon cDNA Amplification Kit; BD Biosciences-Clontech). The full-length cDNA sequence of porcine myocilin can be obtained from GenBank under accession number AF350447.

### Sequence Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin

Amino acid sequences of both optineurin and myocilin were analyzed for domain structure and potential protein modification sites. The PROSITE scanning tool<sup>23</sup> (<http://www.nhri.org.tw/prosite/>; provided in the public domain by the Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland) was used to scan the optineurin protein sequence for the occurrence of patterns and profiles stored in the PROSITE database. Potential glycosylation and phosphorylation sites were predicted by the program developed by Hansen et al.,<sup>24</sup> and Blom et al.,<sup>25</sup> respectively. Sequence homology was determined by a sequence-analysis program (Omega 2.0; Accelrys, San Diego, CA).

### Stress Experiments for Optineurin and Myocilin

All stress experiments were performed using fourth-passage TMCs and astrocytes from three different porcine eyes. For the DEX treatment, DEX stock solution (50 mM DEX/dimethyl sulfoxide) was added to cultured TMCs and astrocytes at a final concentration of 500 nM. The culture medium was replaced every 3 days and maintained for 2 weeks. For control, cultured cells were treated with dimethyl sulfoxide alone.

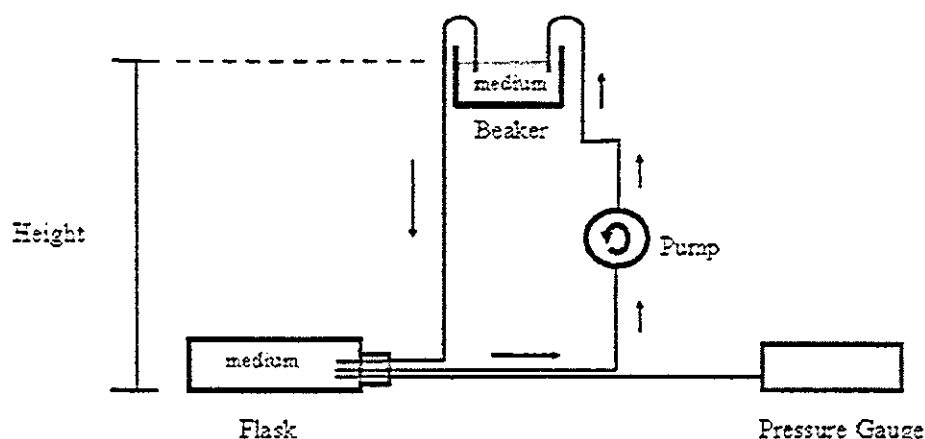
To examine the effect of hypoxia, both types of cultured cells were incubated in 7.0% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, in a multiple gas incubator (model 9200; Wakenyaku, Kyoto, Japan) for 12, 24, 48, or 72 hours. Control cells were incubated for the same times in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air in a standard CO<sub>2</sub> incubator.

To examine the effects of hydrostatic pressure, we exposed both types of cultured cells to a hydrostatic pressure of 33 mm Hg above atmospheric pressure for 12, 24, 48, or 72 hours in a CO<sub>2</sub> incubator, using the system illustrated in Figure 1. The culture flasks were filled with the medium and capped with a silicon stopper to prevent leakage. The height of the reservoir containing the medium was adjusted to control the pressure in the flask. For gas exchange, the medium was circulated with a peristaltic pump (Eyela, Tokyo, Japan), and the pressure was monitored with a pressure gauge (model PG-208; Copal Electronics, Tokyo, Japan). Control cells were exposed to hydrostatic pressure of 3 mm Hg above atmospheric pressure for 12, 24, 48, and 72 hours.

To examine the effects of mechanical stretching, cultured porcine TMCs were transferred onto a 10-cm<sup>2</sup> collagen-coated silicon chamber (S.Tec, Osaka, Japan). The silicon chamber had a 100- $\mu$ m-thick transparent bottom, and the side walls were 1.5-mm thick to prevent narrowing at the bottom center. The silicon chamber was then attached to a stretching apparatus for a 10% linear stretch for 24 hours in a standard CO<sub>2</sub> incubator. Control cells were plated onto a collagen-coated silicon chamber without the stretching for the same amount of time.

### Optineurin and Myocilin Transcript Analysis

Total RNA was isolated from cultured cells exposed to stimuli or stresses (RNAzol B; Tel-Test, Friendswood, TX). The total RNA was reverse transcribed (Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR; Invitrogen-Gibco) according to the manufacturer's protocol. Real-time quantitative PCR was performed to determine the optineurin, myocilin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcript with a sequence-detection system (GeneAmp 5700; Applied Biosystems, Inc. [ABI], Foster City, CA). PCR reactions were performed in 50  $\mu$ L of reaction mixture containing 25  $\mu$ L master PCR mix (SYBR Green PCR Master Mix; ABI), 5 pM primer pairs, and 1  $\mu$ L cDNA samples. To measure myocilin transcript, 4  $\mu$ L cDNA samples was used because of lower expression. The 18S ribosomal RNA gene was used as



**FIGURE 1.** System used for hydrostatic pressure experiments. The culture flask was filled with medium and capped with a silicon stopper. The height of the reservoir with the medium was adjusted to maintain the pressure in the flask. For gas exchange, the medium was circulated by a peristaltic pump, and the pressure was monitored with the pressure gauge. For control, cultured cells were exposed to a hydrostatic pressure of 3 mm Hg above atmospheric pressure for 72 hours.

an internal control. All the primers used in these reactions were designed on computer (Primer Express software; ABI). For myocilin cDNA amplification, sense primer 5'-GGTCATTCCGGCAGTGAA-GAA-3' and antisense primer 5'-ACGCCGTACTTGCCAGTGATT-3' were used.

For amplification of optineurin cDNA, sense primer 5'-GACCCA-CAACAGGCTTCITCA-3' and antisense primer 5'-TCTGCCATTTCAGCTTTCC-3' were used. For GAPDH cDNA amplification, sense primer 5'-TCATCAGGAATGCCTCCTGTAC-3' and antisense primer 5'-ATGGCATGGACTGTGGTCATG-3' were used. For 18S rRNA, sense primer 5'-GATCGAAGACGATCAGATACC-3' and antisense primer 5'-CCAGACAAATCACTCCACC-3' were used.

To confirm the specificity of PCR reaction, each PCR product was analyzed by agarose gel and subjected to a dissociation curve analysis, according to the manufacturer's instructions.

## RESULTS

### Cloning of Porcine Optineurin cDNA

The nucleotides and deduced amino acid sequences of porcine optineurin are shown in Figure 2A. A comparison of the predicted amino acid sequences of pig, human, mouse, and rat optineurin is shown in Figure 2B. The porcine optineurin is composed of 574 amino acids, and the homology of porcine optineurin to mouse, rat, and human was 71%, 72%, and 84%, respectively. Two LZ motifs, reported in the human optineurin, were also present in porcine optineurin at residues 143-164 and 437-458 (Fig. 2A, dashed underscore). A glutamic acid-rich region at residues 221-376 (Fig. 2A, solid underscore) and two potential O-glycosylation sites (Fig. 2A, circles) were found. Phosphorylation sites of 20 serine residues, 11 threonine residues, and 1 tyrosine residue were predicted (Fig. 2A, bold italic).

### Cloning of the Porcine Myocilin cDNA

The nucleotides and deduced amino acid sequences of porcine myocilin are shown in Figure 3A. A comparison of the predicted amino acid sequences of pig, bovine, mouse, rat, monkey, and human myocilin is shown in Figure 3B. The porcine myocilin is composed of 489 amino acids, which is 14 amino acids shorter at the N terminus and lacks one more amino acid at codon 182 than the human myocilin has. The homology of porcine myocilin to mouse, rat, bovine, monkey, and human was 80%, 79%, 84%, 82%, and 82%, respectively. Porcine myocilin is the smallest myocilin described, and also contained a LZ motif at residues 103-152 (Fig. 3A, dashed underscore). Two predicted N-glycosylation sites and seven O-glycosylation sites were found (Fig. 3A, squares and circles, respectively). Phos-

phorylation sites of 31 serine residues, 8 threonine residues, and 5 tyrosine residue were predicted (Fig. 3A, bold italic). C-terminal olfactomedin-like domain was more conserved in all species than the N-terminal myosin-like domain.

### DEX Treatment

After a 2-week exposure to 500 nM DEX, the expression of optineurin by TMCs and astrocytes was significantly decreased (to 67% and 48%, respectively), compared with that of untreated TMCs and astrocytes (Figs. 4A-C). The expression of porcine myocilin exposed to DEX increased by  $8.02 \pm 1.26$ -fold (mean  $\pm$  SD) and  $5.57 \pm 1.05$ -fold in cultured TMCs and astrocytes, respectively. The expression of GAPDH was not altered in both types of cells by exposure to DEX.

### Incubation in Hypoxic Conditions

In hypoxic conditions, porcine optineurin was relatively stable at all times points, whereas the expression of porcine myocilin decreased significantly (Figs. 4D-F). The expression of myocilin by astrocytes decreased by an average of 44% after 12 hours and declined to 4% after 72 hours of hypoxia compared with the control. For TMCs, a significant decrease in myocilin expression to 11% was observed after 72 hours compared with that of the control. We did not observe any cell death of both types of cells histologically at all time points (Fig. 5).

### Incubation under Hydrostatic Pressure and with Mechanical Stretching

After 72 hours under hydrostatic pressure or 24 hours of mechanical stretching, optineurin and myocilin expression was unchanged in both TMCs and astrocytes.

## DISCUSSION

Our results demonstrated that both optineurin and myocilin were expressed in porcine TMCs and astrocytes, and their amino acid sequences were homologous to human sequences by 84% and 82%, respectively. The protein motifs and protein modification sites were also shared with humans.

The response of optineurin and myocilin to DEX was different. Optineurin expression was decreased, whereas that of myocilin was increased. The increased expression of myocilin by TMCs confirmed earlier observations,<sup>26-29</sup> but we also detected an increase in astrocytes. Astrocytes are the major glial cells populating the optic nerve head and are probably responsible for the remodeling of the optic nerve head in glaucomatous eyes. Astrocytes are known to function as cellular support

## Porcine Optineurin

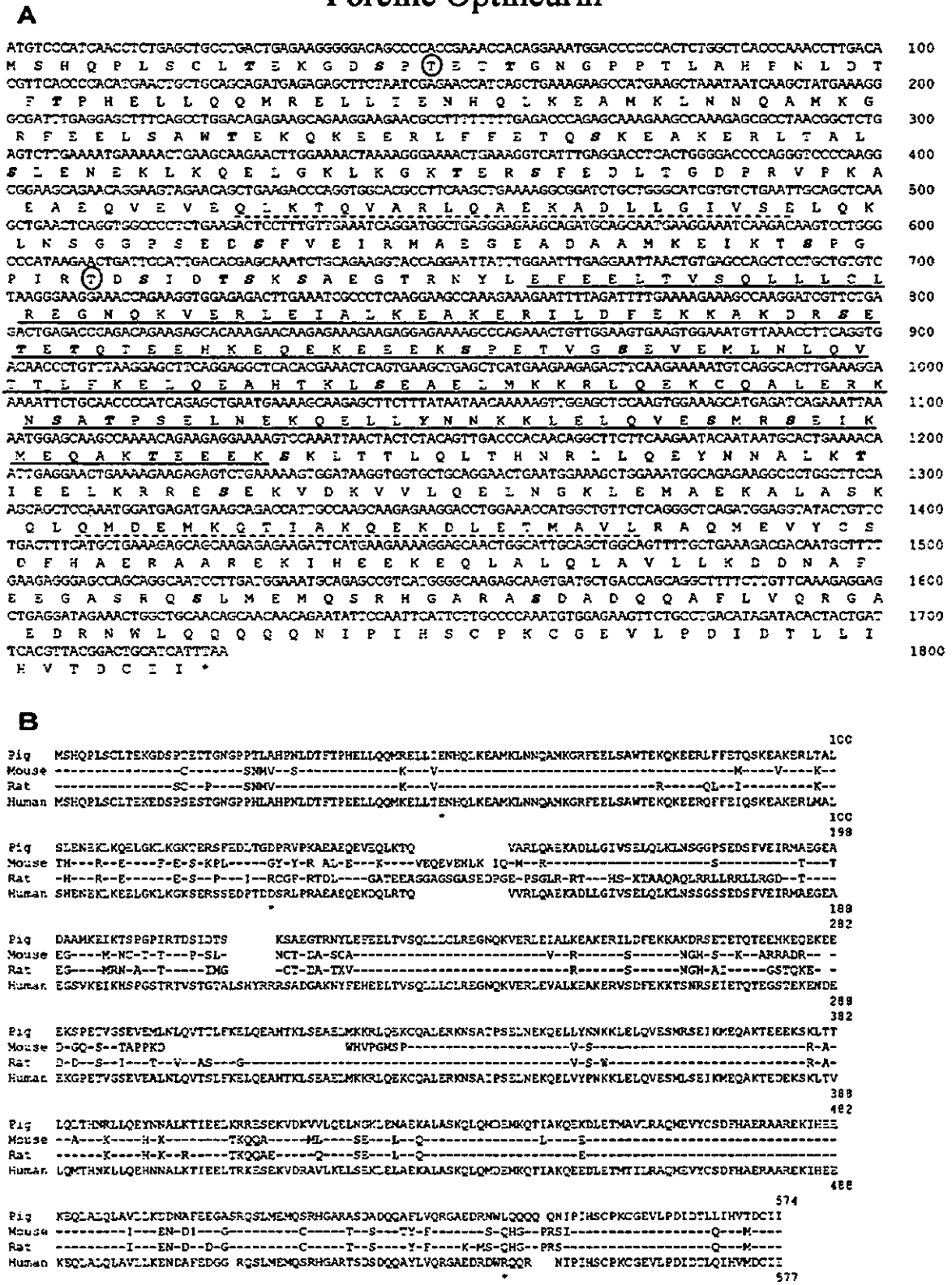


FIGURE 2. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of porcine optineurin and comparison of porcine optineurin amino acid sequences with those of other species. The coding region is defined by the positions of the initiation codon (ATG) and stop codon (TAA). (A) The porcine optineurin protein is composed of 574 amino acids. *Dashed underline*: LZ motifs; *solid underline*: glutamic acid-rich region; *circles*: O-glycosylation sites. (B) Only the amino acids that differ from porcine or human optineurin sequences are shown for mouse and rat. *Hyphens*: the same amino acid residues as human optineurin; *spaces*: the absence of amino acids corresponding to the same location in human optineurin; *asterisks*: positions of amino acids associated with glaucoma.