



Title	An Essential Role of DNases for Definitive Erythropoiesis and Apoptosis
Author(s)	川根, 公樹
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43929">https://hdl.handle.net/11094/43929</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	川根公樹
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第17604号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	An Essential Role of DNases for Definitive Erythropoiesis and Apoptosis (赤血球造血及びアポトーシスにおけるDNaseの役割)
論文審査委員	(主査) 教授 長田 重一 (副査) 教授 金倉 譲 教授 辻本 賀英

## 論文内容の要旨

## &lt;目的&gt;

染色体DNAの断片化はアポトーシスの特徴の1つであり、ほとんどのアポトーシスで観察される。しかし、この過程は細胞死に必須ではなく、その生体内での意義は不明である。我々の研究室ではアポトーシス時のDNAの断片化をになうDNaseとして、Caspase-activated DNase(CAD)を同定、単離した。そして、生体内ではアポトーシス細胞内で機能するCADのみならず、アポトーシス細胞を食食した食食細胞内の酸性DNaseによってもDNA分解がおきることが判明した。この酸性DNaseの候補として、リソソームに存在するDNaseIIが考えられる。そこで、本研究では、CAD、DNaseII遺伝子を欠損したマウスを作製することにより、アポトーシス時のDNA分解において、アポトーシス細胞内でのCADと食食細胞内でのDNaseIIが協調的に機能するという仮説を検証し、さらに、このDNA分解の生理的意義を解明することを目的とした。

## &lt;方法並びに成績&gt;

CAD、DNaseIIそれぞれの欠損マウスを作成した。CAD欠損マウスは正常に発生し、異常な所見は認められなかった。一方、DNaseII欠損マウスは重篤な貧血所見を示し、胎生致死であった。造血幹細胞を含む胎仔肝臓細胞を、放射線照射した野生型マウスに移植したところ、DNaseII欠損マウスからの幹細胞でも正常な赤血球が生成された。以上の結果より、DNaseII欠損マウスにおける赤血球造血異常は、赤血球系以外の細胞が原因であると結論した。そこで、胎仔肝臓を組織化学的に解析したところ、DNAを蓄積して肥大化したマクロファージが多数観察された。これらのマクロファージのまわりには種々の分化段階の赤血球系細胞が存在し、このマクロファージは造血島(blood island)のセントラルマクロファージであると結論した。造血島のマクロファージはその周囲を取り囲む赤血球前駆細胞に作用し、その増殖、分化を誘導すると考えられている。DNaseII欠損マウスで、造血島のマクロファージ内に未分解のDNAが見出されたことは、このマクロファージは赤血球前駆細胞から脱核した核を食食し、そのDNAをDNaseIIの働きによって分解することを示している。DNaseIIが欠損するとDNAがリソソームに蓄積されてマクロファージの機能に異常が生じ、正常な造血が妨げられると考えられる。

次いで、野生型、DNase II 欠損マウスの胎仔胸腺よりマクロファージを調製し、この細胞にアポトーシスをおこした野生型あるいは CAD 欠損胸腺細胞を食食させた。その結果、CAD 欠損アポトーシス細胞を DNase II 欠損マクロファージに食食させた時には、未分解の DNA がマクロファージの内部に観察された。この結果は、アポトーシス時の DNA 断片化は死細胞内の CAD とマクロファージ内の DNase II によって担われているという我々の仮説を証明している。一方、胎生 17.5 日目の胸腺細胞の数は DNase II 欠損マウスでは野生型の 29%、CAD/DNase II 欠損マウスでは 12% にまで減少していた。細胞表面マーカーについての FACS 解析から、DNase II 欠損マウス、CAD/DNase II 欠損マウスでは、胸腺細胞の増殖、分化がプロ T 細胞ステージで抑制されていることが示された。また、この胸腺には DNA を蓄積したマクロファージが観察された。そして、電子顕微鏡による解析から、これらの DNA はマクロファージのリソソームに蓄積しており、その DNA の形状は、CAD/DNase II 欠損マウスではインタクトな纖維状であるのに対し、DNase II 欠損マウスでは、より断片化された粒子状であることが示された。以上の結果は、生体内においても CAD、DNase II がアポトーシス細胞の DNA 分解に協調的に作用していることを示している。ところで、タイプ I インターフェロン (IFN) は T 細胞の発生をプロ T 細胞ステージで抑制することが知られている。そこで、胸腺での各種 IFN 遺伝子 (IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ ) の発現をリアルタイム PCR によって検討した。その結果、IFN $\beta$  遺伝子が、DNase II 欠損マウスでは野生型の 5 倍以上、CAD/DNase II では 80 倍以上に高発現していた。この発現上昇はそれぞれの欠損マウスでの胸腺の表現型と相関しており、胸腺細胞の発生不全の原因と考えられる。

#### <総括>

赤血球分化過程で脱核された DNA の分解は、赤血球前駆細胞由来の核をとりこんだ食食細胞内の DNase II によって、また、アポトーシス時の DNA 分解はアポトーシス細胞の CAD 及び、食食細胞内の DNase II によって担われていることが明らかになった。いずれの場合においても、分解されるべき DNA の分解がおこらず食食細胞内に蓄積すると、赤血球や T リンパ球の増殖、分化が妨げられることが示された。本研究は、赤血球の発生過程におけるマクロファージの役割を指摘し、かつ、これまで不明であったアポトーシス時の DNA 分解の生理作用を明らかにした。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス遺伝学を用いて、今まで未解明であったアポトーシス細胞の DNA 分解の分子機構並びに生理作用を明らかにした。また、赤血球造血における DNase II の役割を示し、造血へのマクロファージの関与も指摘した。DNA 分解酵素が個体の発生に必須な役割を果たしていることを示した初めての報告であり、学術的な意義も高く、学位の授与に値すると考えられる。