Osaka University Knowledge Archive

Title	Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens
Author(s)	西本, 壮吾
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45348
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	西本壮吾（にしもとそうご）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１８４５５　号
学位授与年月日	平成 16 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	Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens （マウス眼水晶体における DNA 分解の阻害は核白内障をもたらす）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　長田　重一 （副査） 教　授　辻本　賀英　　教　授　内山　安男

論　文　内　容　の　要　旨

【目　的】

個体を形成する大部分の細胞はその核内に DNA を持ち、細胞が複製し機能する上で重要な役割を担っている。発生における DNA 分解は、生体にとって不要な細胞を除去する際のプログラム細胞死とよばれる過程で行われるだけでなく、赤血球の分化過程、水晶体繊維細胞の分化過程においても行われる。これら赤血球や水晶体の繊維細胞にはミトコンドリアや小胞体などのオルガネラが存在しない。眼の水晶体では、その前面に存在する有核である一層の上皮細胞が赤道面で繊維細胞へと分化し、最終的に核やミトコンドリアなどの細胞内小器官を消失することが知られているが、核内の DNA 分解を含め、これらの消失に関する分子機構は全く不明である。今回、私達は水晶体の繊維細胞における DNA 分解の分子機構および生理作用を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

【方法ならびに成績】

水晶体繊維細胞の核内 DNA 分解に関与する DNA 分解酵素を同定するため、水晶体でどのような DNase が発現しているのか Real-time PCR 法を用いて検討を行った。その結果、アポトーシスに関与する CAD、DNase II などの DNase の発現は水晶体には全く検出されなかった。一方、DNase II に類似した DNase としてマウス肝臓から単離・同定されていた DLAD（DNase II-like Acid DNase あるいは DNase II β）と呼ばれる DNase は、マウスの水晶体および肝臓に発現が限局していた。もっとも強く発現していた水晶体では肝臓の約 10 倍の発現が認められた。また、DLAD 遺伝子はヒトにも保存されており、マウスと同様にヒト水晶体およびヒト水晶体上皮細胞株で発現していることが確認された。これらの結果から、DLAD 遺伝子が水晶体で重要な機能を担っていることが示唆された。そこで DLAD 遺伝子の生理的機能を明らかにするため Gene targeting 法を用いてノックアウトマウスを作製した。

DLAD 遺伝子を構成する 6 個のエクソンのうち、活性部位を持つエクソン 3 とエクソン 4 をネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲティングベクターを構築し、定法により DLAD 遺伝子欠損（DLAD−/−）マウスを作製した。産子はメンデルの法則に従い、外見上の異常は認められなかった。マウス水晶体抽出液を調製し、plasmid DNA を基質に DNase assay を行ったところ、野生型および DLAD+/−マウス水晶体からの抽出液は pH 5.9 で DNase 活性

を示すのに対し、DLAD−/−マウスの水晶体からの抽出液は同条件でほとんどDNase活性は認められなかった。

次に水晶体の組織学的解析を行うため、眼球の正中切片を作製し、核酸を特異的に染色する方法であるFeulgen染色、及びミトコンドリアATP synthaseとDAPIの二重染色によって解析を行った。水晶体外縁部の水晶体上皮細胞と分化途中にある一部の繊維細胞ではDLAD+/−マウス及びDLAD−/−マウスともにDNAとミトコンドリアの存在が確認できた。一方、DLAD+/−マウスの水晶体内部にはDNA及びミトコンドリアは存在しなかったが、DLAD−/−マウスの水晶体内部ではミトコンドリアが消失しているにもかかわらずDNAが残存していた。

さらにDLAD−/−マウス水晶体におけるDNA残存と他の細胞内小器官消失を確かめるため電子顕微鏡による解析を行ったところ、繊維細胞内には細胞内小器官は観察されず、分解されなかったDNAの凝集塊が存在していた。この周囲には核からほどけた紐状のDNAが確認できた。加えてDLAD−/−マウス水晶体を上皮細胞層、辺縁皮質、核部の3箇所に分離し、上皮細胞層と核部から染色体DNAを抽出し電気泳動を行ったところ、DLAD−/−マウス水晶体では上皮細胞層だけでなく核部にも断片化されていないDNAが存在した。

本来消失すべきDNAの蓄積が生体に与える影響を確かめるため、スリット斜光により水晶体断面を観察したところ、DLAD−/−マウス水晶体内部に白濁が認められ、ヒト核白内障患者にみられる所見を示した。さらに、網膜電位測定を行ったところ、DLAD−/−マウスは光に対する応答が著しく低下していた。

【総　括】

今回の研究成果により、DLAD−/−マウスでは水晶体繊維細胞のDNA分解が特異的に阻害されることがわかった。すなわちこの過程でのDNA分解はDLADが担っており、必須であることが明らかとなった。DNAが残存した水晶体は中心部が強く白濁し、網膜電位測定における光透過性は顕著に低下したことから、核白内障を発症していると結論した。このことは、核やオルガネラが除去されることが水晶体の光透過機能を保証するために必須であることを示している。DNAなどの細胞構成成分の除去不全により、ヒトでも白内障を引き起こす可能性が考えられる。DLAD遺伝子はマウスだけでなくヒトの水晶体にも発現しており、白内障が起こる新規のメカニズムが示唆されたことで、今後、抗白内障薬の開発につながることが期待される。

論文審査の結果の要旨

水晶体の繊維細胞におけるDNA分解を担うDNA分解酵素は、アポトーシスに関与するCAD、DNase IIではなく、DLAD（DNase II-like acid DNase）とよばれるDNaseであることを明らかにした。DLAD遺伝子欠損マウスの水晶体の組織学的解析では、水晶体繊維細胞で除去されるべきDNAが分解されず蓄積していた。さらに、DNAが残存した水晶体は白濁し、網膜電位測定の結果から光透過が妨げられており、白内障の所見を示すと結論できた。水晶体細胞の分化に伴うDNA分解はDLADが担っており、核DNAの除去が水晶体としての機能を果たすためには必須である。DLADはヒト水晶体にも発現しており、DNAなどの細胞構成成分の除去不全が白内障を引き起こす可能性があることを示唆している。

水晶体繊維細胞のDNAの分解に関わる酵素がDLADであることを初めて明らかにし、核やオルガネラがすみやかに除去されることが水晶体の機能を果たすために必須であることを示した本論文は学位の授与に値するものと考えられる。