

称号及び氏名	博士(獣医学) 近藤 友宏
学位授与の日付	平成22年3月31日
論文名	ddY系由来遺伝性白内障マウスに関する研究
論文審査委員	主査 岡田 利也 副査 松尾 三郎 副査 久保 喜平

## 論文要旨

### 緒論

白内障は水晶体混濁を特徴とし、病態の進行に伴って失明に陥る危険性を秘めた重大な眼疾患である。白内障発症の機序には様々な要因が複雑に関与しており、そのため多くの白内障モデルが開発され、その解析に用いられている。しかし、ヒトは実験動物とは異なり、遺伝的背景が不均一である。このことが複雑な病態を示す原因となり、白内障を含む多くの疾患の解析を困難なものとしている。それゆえ、遺伝的組成が明確で、ある程度ばらつきを持ったモデル動物の開発が必要と考えられる。

ddY系由来遺伝性白内障マウス(ddY系白内障マウス)はその由来が集団内に遺伝的組成のばらつきを有しているクローズドコロニーであることからヒトの白内障モデルとして有用であると考えられる。

本研究では、ddY系白内障マウスをヒトの白内障モデルとして確立することを目的とし、交雑実験および行動解析を行うことにより本白内障マウスの特性を調べた。次にddY系白内障マウスにおける水晶体の変化を調べた。さらに、日本産野生マウス(MSM系マウス)との交雑実験による遺伝解析によって本白内障原因遺伝子の位置決定ならびに候補遺伝子の探索を試みた。

### 第一章 ddY系由来遺伝性白内障マウスの特性

本白内障マウスは生後6~8週齢で肉眼的に水晶体の混濁が観察される。遺伝様式は常染色体劣性遺伝であり、その原因遺伝子は単一であることがわかっている。遺伝性疾患において原因遺伝子は同じであっても遺伝的背景によって、その発症時期、発症率が

影響を受ける場合がある。また、主要臓器に関する組織観察では白内障を発症する以外の異常は認められなかった。しかし、形態学的異常を伴わない場合でも、行動異常が認められることがある。さらに、白内障罹患による視覚障害が情動、記憶などに影響を及ぼすことも考えられる。そこで本章では遺伝的背景に変化を加えた場合の白内障発症に及ぼす影響を調べることもおよび白内障マウスの行動解析を行うことにより本白内障マウスの特性を明らかにすることを目的とした。

### 第一節 遺伝的背景に変化を加えた場合の遺伝様式

MSM 系マウスと ddY 系白内障マウスを用いた戻し交配世代 [ddY 系白内障マウス×(ddY 系白内障マウス×MSM 系マウス)] を作出した。発症率は 36.4%で、ddY 系正常マウスを用いた戻し交配世代 [ddY 系白内障マウス×(ddY 系白内障マウス×ddY 系正常マウス)] の発症率 59.9%との間で有意な差が認められた。発症時期については ddY 系正常マウスとの戻し交配世代では発症時期がほぼ 8 週齢までに限局されていた。それに対して、MSM 系マウスとの戻し交配世代では発症は 16 週齢まで確認でき、発症時期が遅くなる傾向が認められた。

これらのことから本白内障の症状を緩和、または抑制する遺伝子を MSM 系マウスが有していることが示唆された。

### 第二節 行動解析

ddY 系白内障マウスならびに ddY 系正常マウスを用い、各個体の情動の変化を観察するためにオープンフィールド検査、運動調整能力を観察するためにローターロッド検査、学習記憶能力を観察するためにモリス水迷路および八方向放射状迷路による検査を行った。

オープンフィールド検査初日において ddY 系白内障マウスの移動区画数ならびに立ち上がり数は ddY 系正常マウスに比べて有意に高い値を示したが、2 日目以降有意な差は認められなかった。ローターロッドによる運動調整能力検査ならびにモリス水迷路および八方向放射状迷路による学習記憶検査では ddY 系白内障マウスと ddY 系正常マウスとの間に有意な差は認められなかった。

以上のことから本白内障マウスは情動の高まりがおりやすい傾向にあるが、運動調整能力および学習記憶能力には障害がないことが明らかとなった。

## 第二章 水晶体の変化

白内障は水晶体の混濁により水晶体の透明度が低下し、視覚障害を生じる疾患である。水晶体は上皮細胞、水晶体線維が規則正しく配列された皮質領域および中心部の核領域からなり、様々な水晶体蛋白を含んでいる。そこで本章では水晶体の組織学的変化と水晶体構成蛋白の変化を調べた。

### 第一節 組織学的変化

ddY 系白内障マウスならびに ddY 系正常マウスを用い、生後 2, 3, 5 週齢および成熟個体の眼球を摘出し、組織切片を作製した。HE 染色を行うとともに、single-stranded

DNA(s-sDNA)免疫染色によりアポトーシス細胞の局在を調べた。HE 染色において、2 週齢では ddY 系白内障マウスと ddY 系正常マウスとの間に差は認められなかったが 5 週齢では皮質領域の水晶体線維の膨化や配列の乱れが観察された。成熟個体ではさらに水晶体上皮細胞の空胞化、核領域の水晶体後部への移動が認められた。一方、2~3 週齢の ddY 系白内障マウスでは ddY 系正常マウスに比べ、水晶体赤道部付近の上皮細胞で s-sDNA 陽性細胞の増加が認められた。

以上のことから、肉眼的発症時期である 6 週齢よりも前に水晶体線維の変化が認められることおよび HE 染色で変化が認められるよりも前に水晶体上皮細胞のアポトーシスが増加していることがわかった。

## 第二節 水晶体構成蛋白の変化

ddY 系白内障マウスおよび ddY 系正常マウスの成熟個体における水晶体から蛋白を抽出し、SDS-PAGE での泳動を行った。28KDa 付近に本白内障マウスで著しく減少しているバンドが認められた。そのバンドから蛋白を抽出し、同定した結果、 $\beta$ B1-crystallin であることが明らかになった。

また 2 週齢、4 週齢の ddY 系白内障マウスおよび ddY 系正常マウスの眼球から蛋白を抽出し、Western blot を行い、 $\alpha$ B-crystallin の発現を調べた。2 週齢、4 週齢ともに ddY 系白内障マウスでは  $\alpha$ B-crystallin の発現は ddY 系正常マウスより少ない傾向にあった。

以上のことから ddY 系白内障マウスの水晶体において  $\beta$ B1-crystallin および  $\alpha$ B-crystallin が減少していることがわかった。

## 第三章 白内障関連遺伝子の探索

本白内障の原因遺伝子は第 2 染色体上のマイクロサテライトマーカー D2Jpk4 から D2Nds1 に至る領域に存在することがわかっている。さらに、第一章の結果から、MSM 系マウスに本白内障の修飾遺伝子が存在する可能性が高い。そこで本章ではより詳しい遺伝地図の作製および修飾遺伝子へのアプローチとして連鎖解析を試みた。

### 第一節 原因遺伝子のファインマッピング

連鎖解析を行うために、MSM 系マウスと ddY 系白内障マウスとの戻し交配世代を作製した。D2Jpk4~D2Nds1 間に存在すると報告されているマイクロサテライトマーカーについて 2 系統間での多型の有無を調べ、多型が確認できた 14 個のマーカーを用いて、戻し交配世代の発症個体 135 例のゲノム DNA を用いて連鎖解析を行った。その後、戻し交配世代の発症個体を新たに作製し、2 段階において例数を増やした。最終的に全 332 例の戻し交配世代の発症個体を用いて、D2Mit84~D2Mit368 の 10 個のマーカーについて連鎖解析を行った。その結果、原因遺伝子が D2Mit515 および D2Mit467 から D2Mit320 および D2Mit368 の間、3.91cM の領域に位置していることが明らかになった。さらに原因遺伝子が存在する領域の遺伝子のイントロン領域を用いたプライマーの設計を検討した。作製したプライマーのうち、Ptgs 1、Mrrf 及 Morn 5 遺伝子のイントロン領域で設計したプライマーで多型が検出された。これらのプライマーを用いて前述の戻し交配世代の発症個体 332 例で連鎖解析を行った。その結果、本白内障原因遺伝子は Morn 5~

Mrrf 間の 1.21cM に存在することが明らかとなった。

## 第二節 修飾遺伝子の探索

各染色体 2~4 個のマイクロサテライトマーカーを選出し、戻し交配世代の非発症個体のうち原因遺伝子の遺伝子型が白内障ホモである可能性が非常に高い個体（前述のマーカー、Morn 5、Mrrf の遺伝子型が共に白内障ホモである個体）19 例を用いてスクリーニングを行った。その結果、第 1 染色体上のマーカーD1Mit10 および第 9 染色体上のマーカーD9Mit19 で ddY 系白内障マウス/ddY 系白内障マウスホモ型と ddY 系白内障マウス/MSM 系マウスのヘテロ型との分離比がそれぞれ 4:15、5:14 となり分離比 1:1 との間に有意な差が認められた。このことから本白内障を修飾する遺伝子が第 1 および第 9 染色体上に存在することが示唆された。

### まとめ

- 1.本白内障発症に影響を及ぼす修飾遺伝子が MSM 系マウスに存在しており、修飾遺伝子が第 1 および第 9 染色体上に存在することが示唆された。
- 2.本白内障マウスは情動の高まりがおこりやすい傾向にあるが、運動調整能力および学習記憶能力には障害がないことがわかった。
- 3.本白内障は肉眼的発症時期である 6 週齢以前に組織学的変化が認められること、およびその変化が認められるよりも前に水晶体上皮細胞のアポトーシスが増加することがわかった。
- 4.本白内障マウスの水晶体において $\beta$ B1-crystallin と $\alpha$ B-crystallin が減少することがわかった。さらに $\alpha$ B-crystallin の減少が水晶体上皮のアポトーシス増加に関与していることが考えられた。
- 5.本白内障原因遺伝子は第 2 染色体上の遺伝子、Mrrf と Morn5 の間 1.21cM の領域に存在することが明らかになった。

## 審査結果の要旨

白内障は水晶体混濁を特徴とし、病態の進行に伴って失明に陥る危険性を秘めた重大な眼疾患である。白内障発症の機序には様々な要因が複雑に関与しており、そのため多くの白内障モデルが開発されている。しかし、ヒトは実験動物とは異なり、遺伝的背景が不均一である。このことが白内障を含む多くの遺伝性疾患の解析を困難なものとしている。それゆえ、遺伝的組成が明確で、ある程度ばらつきを持ったモデル動物の開発が必要である。ddY 系由来遺伝性白内障マウス (ddY 系白内障マウス) はその由来が集団内に遺伝的組成のばらつきを有しているクローズドコロニーであり、ヒトの白内障モデルとして有用であると考えられる。ddY 系白内障マウスは生後 6~8 週齢で肉眼的に水晶体の混濁が観察され、遺伝様式は常染色体劣性遺伝である。その原因遺伝子は単一

で第2染色体上のマイクロサテライトマーカーD2Jpk4からD2Nds1に至る25.93 cMの領域に存在することがわかっている。本研究では、ddY系白内障マウスをヒトの白内障モデルとして確立することを目的とした。

第一章では交雑実験および行動解析を行うことによりddY系白内障マウスの遺伝的ならびに行動学的特性を調べた。MSM系マウスとddY系白内障マウスを用いた戻し交配世代[ddY系白内障マウス×(ddY系白内障マウス×MSM系マウス)]の白内障発症率は36.4%で、ddY系正常マウスを用いた戻し交配世代[ddY系白内障マウス×(ddY系白内障マウス×ddY系正常マウス)]の発症率59.9%との間で有意な差が認められた。発症時期についてはddY系正常マウスとの戻し交配世代では発症時期がほぼ8週齢までに限局されていたのに対して、MSM系マウスとの戻し交配世代では発症は16週齢まで確認でき、発症時期が遅くなる傾向が認められた。行動解析において、オープンフィールド検査初日ではddY系白内障マウスの移動区画数ならびに立ち上がり数はddY系正常マウスに比べて有意に高い値を示したが、2日目以降有意な差は認められなかった。ローターロッドによる運動調整能力検査ならびにモーリス水迷路および八方向放射状迷路による学習記憶検査ではddY系白内障マウスとddY系正常マウスとの間に有意な差は認められなかった。これらのことから本白内障の症状を緩和、または抑制する遺伝子をMSM系マウスが有していること、本白内障マウスは情動の高まりがおりやすい傾向にあるが、運動調整能力および学習記憶能力には障害がないことが明らかとなった。

第二章ではddY系白内障マウスの水晶体の組織学的変化と水晶体構成蛋白の変化を調べた。HE染色において5週齢で皮質領域の水晶体線維の膨化や配列の乱れが観察された。成熟個体ではさらに水晶体上皮細胞の空胞化、核領域の水晶体後部への移動が認められた。白内障発症前(2~3週齢)のddY系白内障マウスではddY系正常マウスに比べ、水晶体赤道部付近の上皮細胞でsingle-stranded DNA陽性細胞の増加が認められ、アポトーシスの増加がみられた。ddY系白内障マウス成熟個体の水晶体において、分子量28KDa付近の蛋白が減少しており、同定の結果、βB1-crystallinであることがわかった。2週齢、4週齢のddY系白内障マウスの水晶体においてαB-crystallinの発現はddY系正常マウスに比べて有意に減少していた。以上のことから、ddY系白内障マウスにおいて肉眼的発症時期よりも前に水晶体線維の変化が認められること、その変化が認められるよりも前に水晶体上皮細胞のアポトーシスが増加していることおよび水晶体におけるβB1-crystallinおよびαB-crystallinが減少していることがわかった。

第三章では白内障原因遺伝子のさらなる絞り込みおよび修飾遺伝子へのアプローチとして連鎖解析を行った。MSM系マウスとddY系白内障マウスとの戻し交配世代の発症個体332例の解析の結果、本白内障原因遺伝子はMorn 5~Mrrf間の1.21cMに存在することが明らかとなった。さらに、各染色体2~4個のマイクロサテライトマーカーを選出し、戻し交配世代の非発症個体のうち原因遺伝子の遺伝子型が白内障ホモである可能性が非常に高い個体(前述のマーカー、Morn 5、Mrrfの遺伝子型が共に白内障ホモである個体)19例を用いてスクリーニングを行った。その結果、第1染色体上のマーカーD1Mit10および第9染色体上のマーカーD9Mit19でddY系白内障マウス/ddY系白内障マウスホモ型とddY系白内障マウス/MSM系マウスのヘテロ型との分離比がそれぞれ4:15、5:14となり理論上の分離比1:1との間に有意な差が認められた。このことか

ら本白内障発症を修飾する遺伝子が MSM 系マウスの第 1 および第 9 染色体上に存在することが示唆された。

以上、本研究は ddY 系白内障マウスをヒトの疾患モデルとして確立するべくその遺伝的特性、行動学的特性、形態学的特性、原因遺伝子の存在する領域および修飾遺伝子の存在を明らかにした。これらの成果は、実験動物学、医学ならびに獣医学の発展に貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。