

氏名(本籍)	張 輝(中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第405号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位論文題目	Peptidases play an important role in cataractogenesis: An immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats (ペプチダーゼは白内障形成に重要な役割を果たす: 朱宮白内障ラット眼球における免疫組織化学的検討)
	審査委員 主査 教授 今本 喜久子 副査 教授 服部 隆則 副査 教授 岡部 英俊

## 論文内容の要旨

### 【目的】

白内障の発症は、中年以後において種々の視覚障害を引き起こす。その原因として赤外線や紫外線、種々の酸化因子、遺伝因子や変性タンパク質に対する処理能力の低下などが考えられている。レンズの透明性を保つために重要な役割を担っている $\alpha$ -、 $\beta$ -、および $\gamma$ -crystallinは先天性白内障のマウスやラットにおいて分解されることが報告されており、またcalpainとproteasomeなどのエンドペプチダーゼが白内障形成時のレンズタンパク質分解に深く関与すると推定されている。

本研究では、4種類のエクソペプチダーゼであるdipeptidyl peptidase II (DPP II)、dipeptidyl peptidase III (DDP III)、puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase (AAP-S)、aminopeptidase N (AAP-N) および3種類のエンドペプチダーゼである $\mu$ -およびm-calpain、20S proteasomeに対する抗体を用いて、正常対照ラットと遺伝子白内障ラットの一つである朱宮ラットShumiya cataract rat (SCR) のレンズにおける種々のペプチダーゼの分布を免疫組織学的に検討することにより、加齢や白内障の形成に伴うこれらのペプチダーゼの病態生化学的意義やその生理学的役割を明らかにしようとした。

### 【方法】

本研究では、8、10、12、14週齢のSCRと同週齢のWistarラット(正常対照)各々10匹ずつを使用した。ラットを麻酔下で10mMリン酸緩衝液(PBS)と10%ホルマリンで灌流した後、眼球を摘出した。次いで眼球を10%ホルマリン液に20時間浸して固定した。眼球のパラフィン切片(4 $\mu$ m厚さ)を作成し、3%の過酸化水素で処理することにより、内因性ペルオキシダーゼの活性を阻害した。それらの切片をPBSで希釈した一次抗体(ポリクロナール抗体1:1,000~1:10,000;モノクロナール抗体1:10,000)と4℃で一晩反応させ、続いて、ビオチン化抗ウサギIgG、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと順次反応させた後、発色を0.03%の3,3'-ジアミノベンチジンと0.3%の過酸化水素を含むリン酸緩衝液中で行った。

### 【結果】

#### 1) エクソペプチダーゼの局在

4種類のエクソペプチダーゼのうち、DPP III、DPP IIおよびAAP-Sは、全ての週齢の対照ラットとSCRのレンズ上皮細胞に弱いが、同程度の反応性を示した。DPP III、DPP IIおよびAAP-Sは各週齢の対照ラットのレンズ線維に弱く染色されたが、これらのペプチダーゼの反応性は各週齢SCRのレンズ線維および核周辺部において増強していた。特に、12と14週齢のSCRにおいては混濁が生じたレンズの核周辺部にこれらのペプチダーゼの反応が著明に認められた。一方、各週齢における両ラットでは、膜結合型のAAP-Nがレンズの上皮細胞と線維にわずかに染色されたが、レンズの核周辺部には認められず、両レンズで差も認められなかった。

#### 2) エンドペプチダーゼの局在

各週齢における対照ラットとSCRにおいて、 $\mu$ -とm-calpainおよび20S proteasomeはレンズ線維に、対照ラットの場合は弱く、SCRの場合は中等度の反応性を示した。各週齢の対照ラットおよび8と10週齢のSCRにおいて、 $\mu$ -とm-calpainおよび20S proteasomeの反応性はレンズの核周辺部に強く認められた。

### 3) $\alpha$ B-Crystallinの局在

$\alpha$ B-Crystallinは各週齢における対照ラットのレンズ上皮細胞および線維に強く発現していた。10週齢までのSCRで、このタンパク質はレンズ線維に強く検出されたが、12と14週の齢SCRでは $\alpha$ B-crystallinの反応性が明らかに減少していた。各週齢の対照ラットでは、 $\alpha$ B-crystallinの弱い染色はレンズの核周辺部において規則的な線状配列として認められたのに対し、12と14週齢のSCRにおいては規則的な線状配列が崩れ、尚かつ非常に弱く染色されていた。

#### 【考察】

白内障の発症は遺伝的要因の他に、酸化や糖化、デアミドーションまたは老化によるレンズタンパク質の修飾およびペプチダーゼの活性化による分解によるものと考えられている。ペプチダーゼの一つであるm-calpainによる $\alpha$ -crystallin (AとB) および $\beta$ B1-crystallinの分解に見られるような生化学的因子が白内障の発症に関係することも推定されている。本実験の結果では、対照ラットのレンズ線維において、 $\alpha$ B-crystallinは多量に発現していた。レンズの核周辺部ではその発現量は少ないが、規則的な線状配列を示していた。一方、12、14週齢のSCRのレンズ線維では、その反応性が減弱しており、また核周辺部では、このタンパク質は不規則的な局在を示した。これらの結果は、このタンパク質がレンズ上皮や線維、核周辺部の透過性に関わるタンパク質として重要な役割を果していることが示唆される。また、12と14週齢のSCRレンズでは、レンズ線維は不規則な波状走行を呈することや、核周辺部自体の顆粒状または塊状の変性、崩壊が特徴的所見として認められた。これらの白内障によく見られる組織学的変化の顕著な部位、特に核周辺部ではAAP-Nを除く6種類のペプチダーゼが強く発現していることが認められた。ペプチダーゼの発現増加や活性化が生じた結果、レンズ線維や核周辺部の構成主成分の一つである $\alpha$ B-crystallinが分解されていることを示唆している。本実験結果を総合して考えると、SCRのレンズにおいて、 $\alpha$ B-crystallinおよび他のcrystallinが、 $\text{Ca}^{2+}$ により活性化された $\mu$ -とm-calpainによってまず分解された後、そのフラグメントがさらにDPP IIやDPP IIIおよびAAP-Sによって分解されることが考えられる。以上より、これらのペプチダーゼが白内障の形成に強く関与することが示唆された。

#### 【結論】

正常対照ラットと比較してSCRのレンズにおいて、6種類のペプチダーゼの発現増加および $\alpha$ B-crystallinの分解が強く認められ、白内障形成に種々のペプチダーゼが深く関与していることを見だし、白内障形成機序に関わる仮説を提示した。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、正常ラットと遺伝性白内障ラット (SCR) において、4種のエクソペプチダーゼ (DPP II、DPP III、AAP-S、AAP-N) および3種のエンドペプチダーゼ ( $\mu$ -およびm-calpain、20S proteasome) の抗体を用いて、それらの分布と役割を免疫組織化学的に比較検討した。

これらのペプチダーゼは正常眼球組織 (角膜、虹彩、レンズおよび網膜) に広く存在することが判明した。一方、白内障ラットのレンズにおいて、正常ラットより強く発現しており、特に12と14週齢の白内障レンズでは、レンズの核周囲部において著明に増強していることが認められた。また、12と14週齢の白内障レンズにおいてはレンズタンパク質の主成分である $\alpha$ B-crystallinは量的に明らかに減少していた。酵素の活性化や発現量の増加により $\alpha$ B-crystallinが分解されたためと考えられ、レンズの構造崩壊に伴って不規則な局在を示すことが判明した。

本研究は、これらのペプチダーゼが白内障の形成に強く関与することを示したもので、博士 (医学) を授与するに値する。

なお、本学位授与申請者は、平成14年2月19日に実施された論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。