

図-1 卵巣摘出メス・ニホンザルへの 2%コレステロール食 投与後の 血中脂質の動態

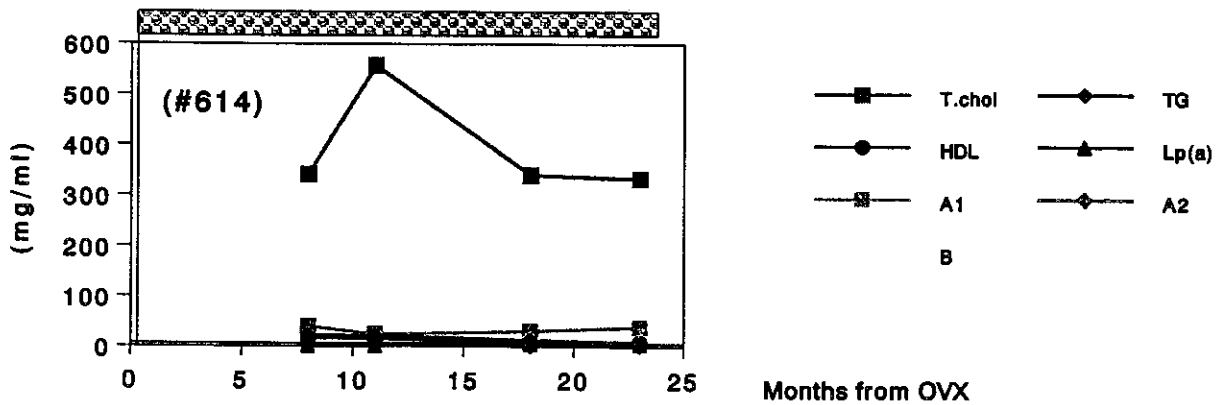
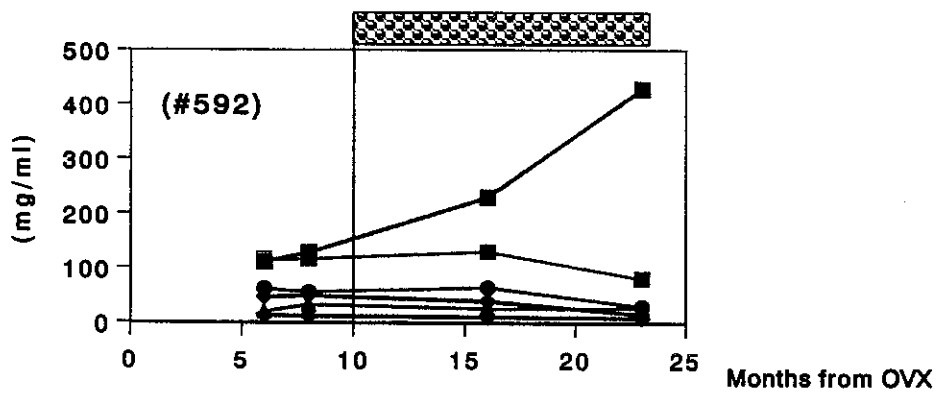
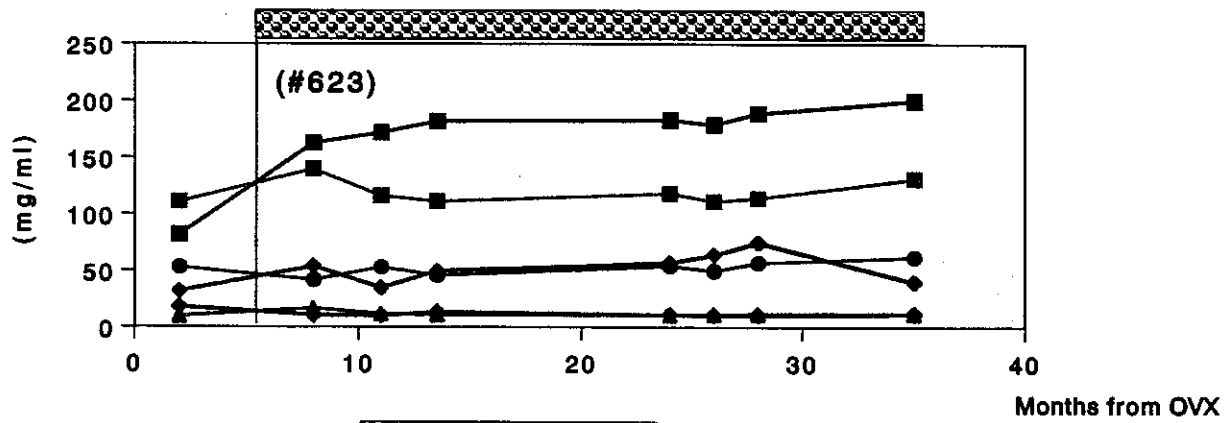
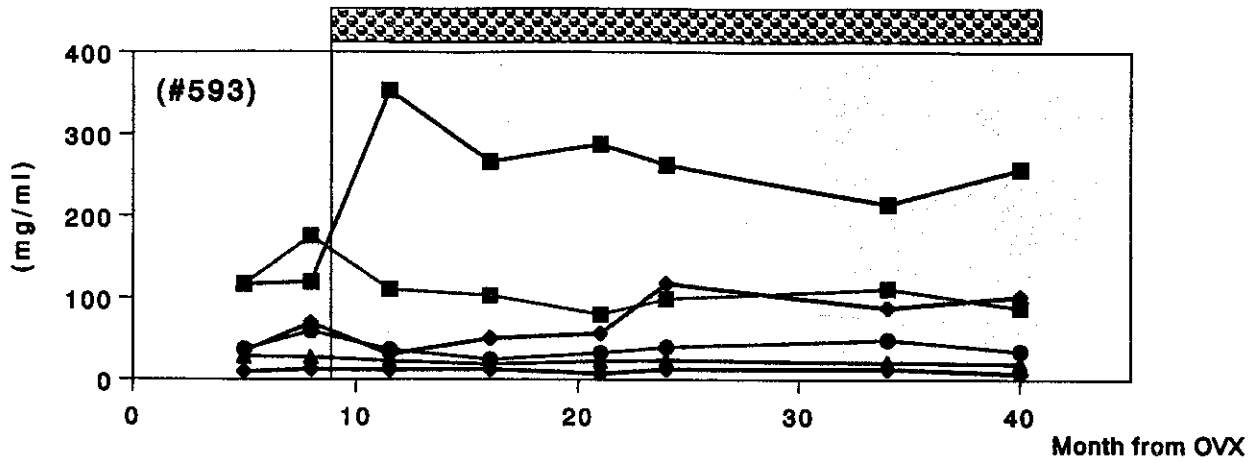


図-2 卵巣摘出メス・ニホンザルへの エストロゲン 投与後の 血中脂質の動態

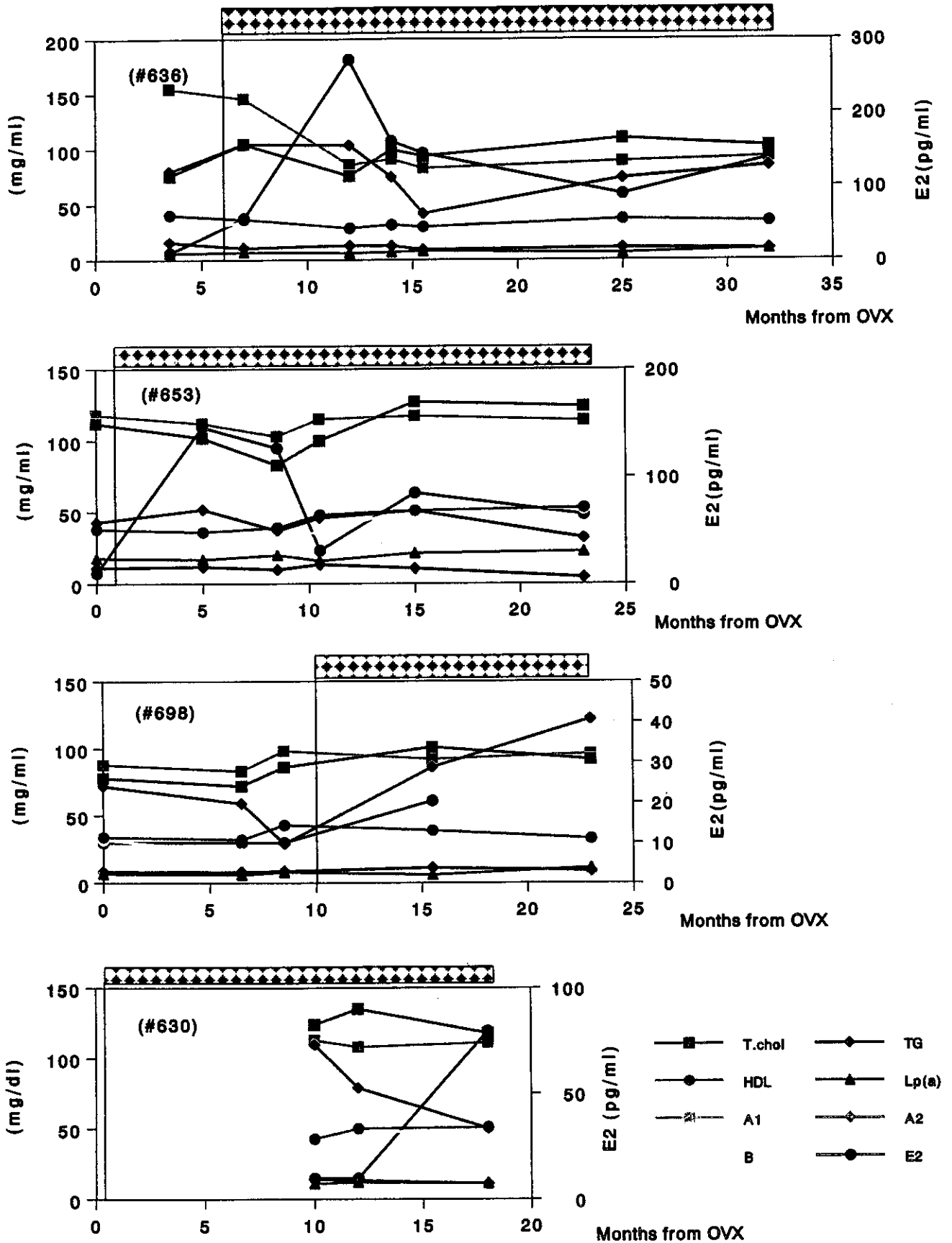
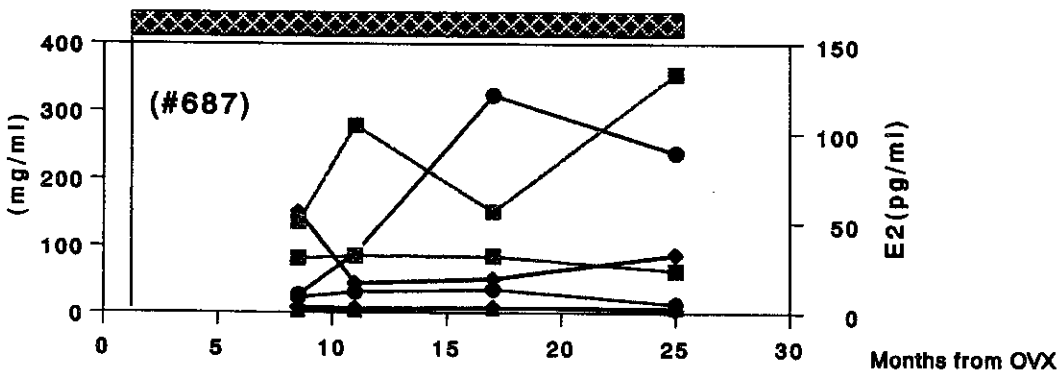
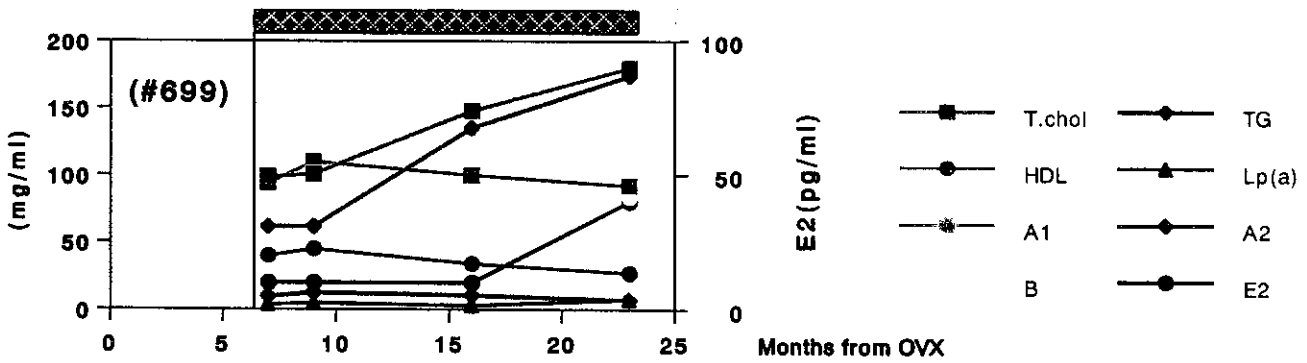
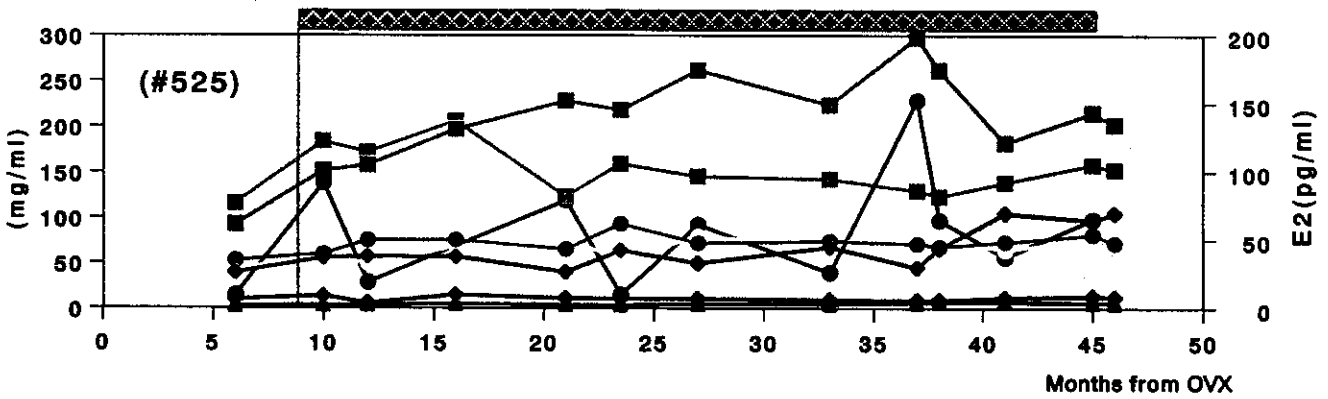
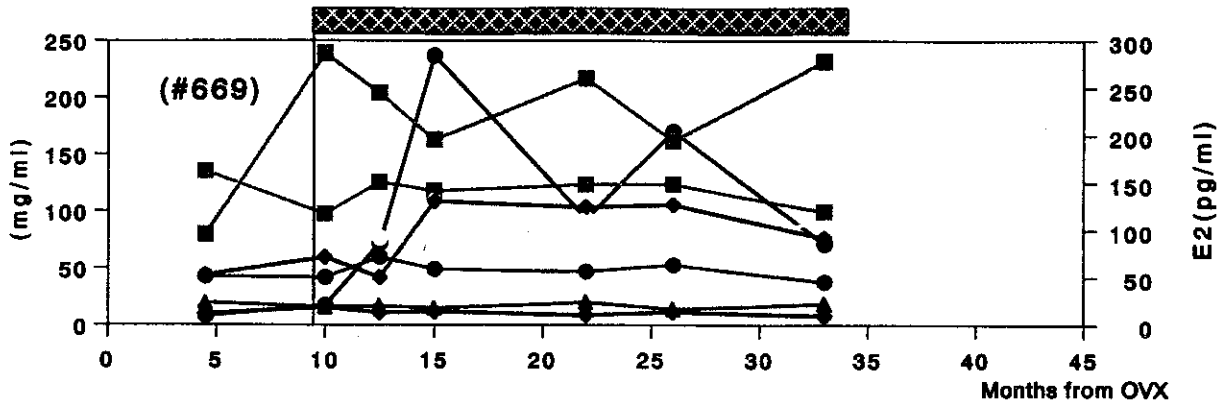
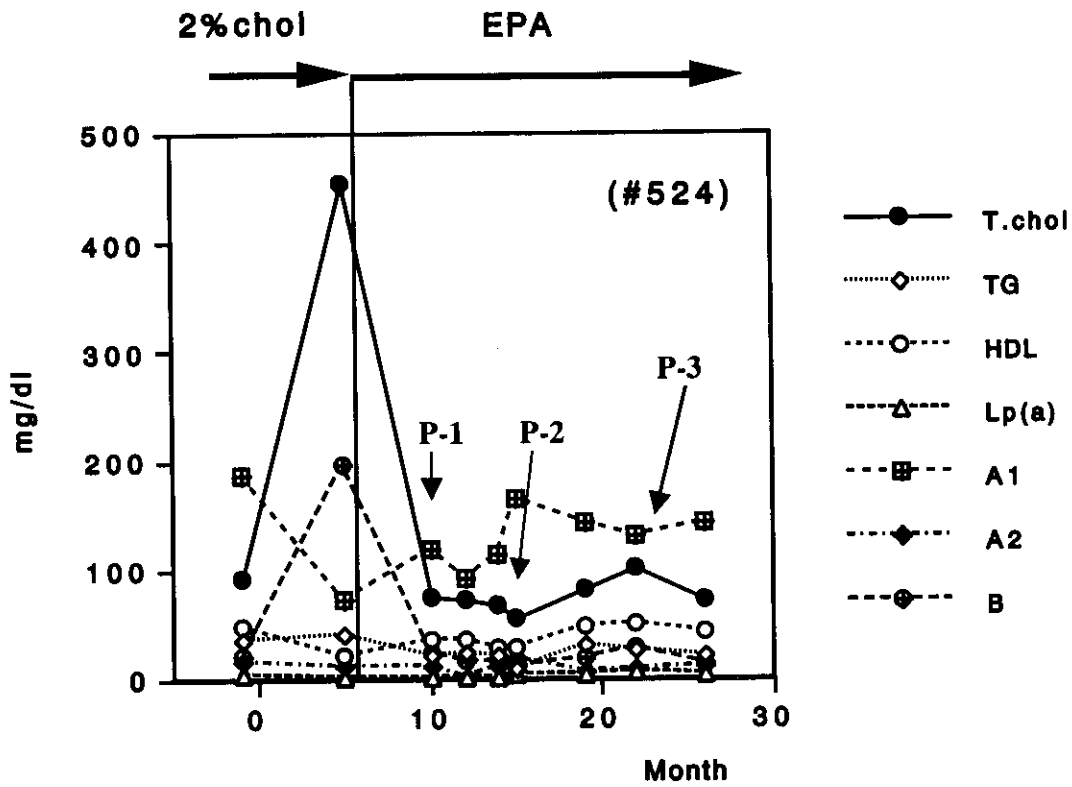


図-3 卵巣摘出メス・ニホンザルへの 2%コレステロール食 と エストロゲン 同時投与後の血中脂質の動態

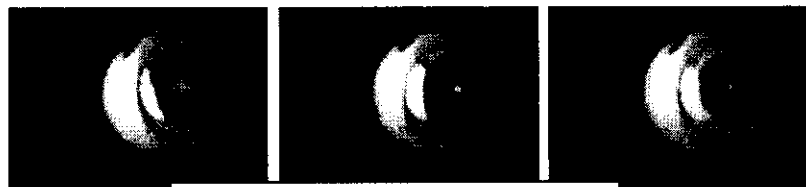


12-4

Effect of EPA after 2% cholesterol diet in male Japanese monkey



P-1 (after 5 months)



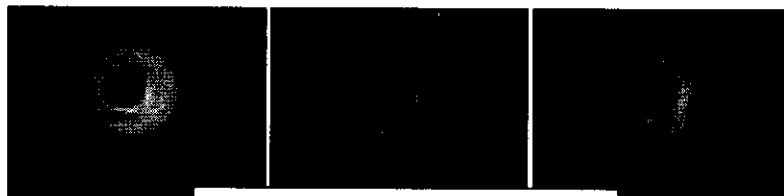
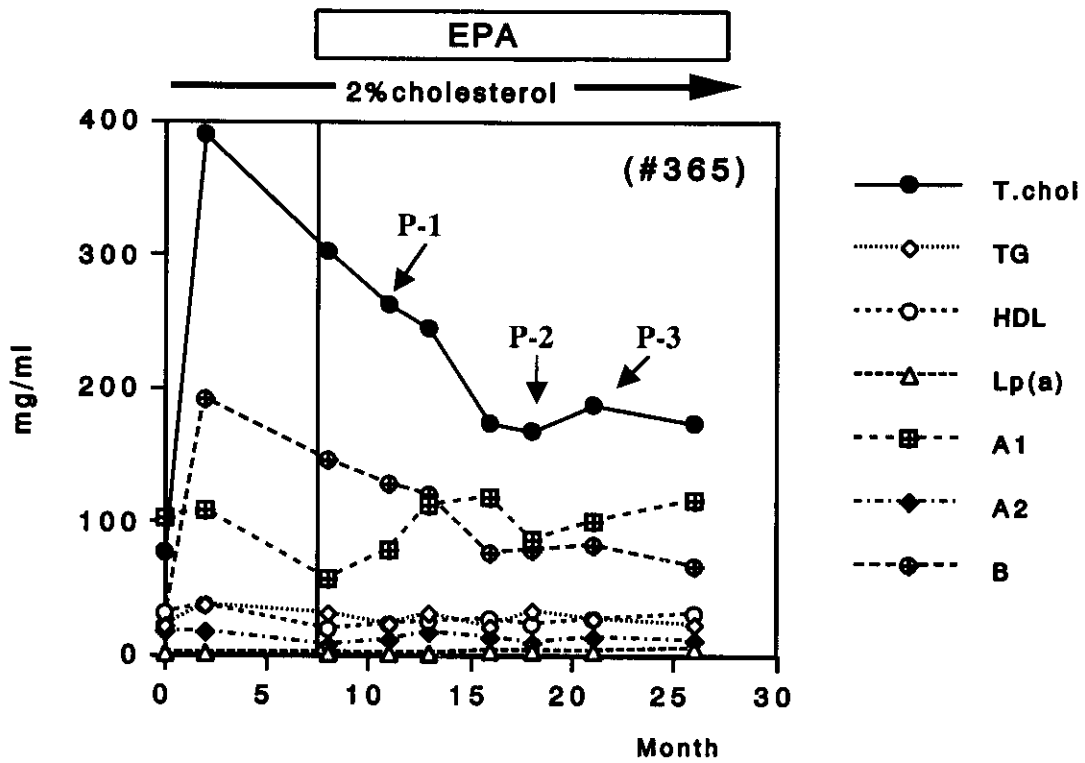
P-2 (after 11 months)



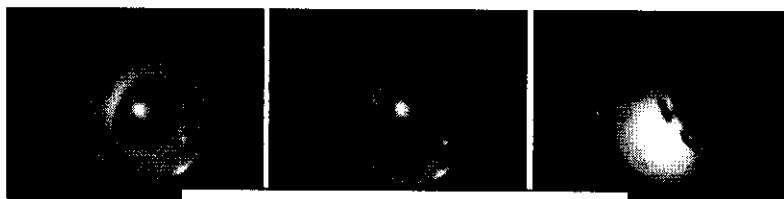
P-3 (after 17 months)

図-5

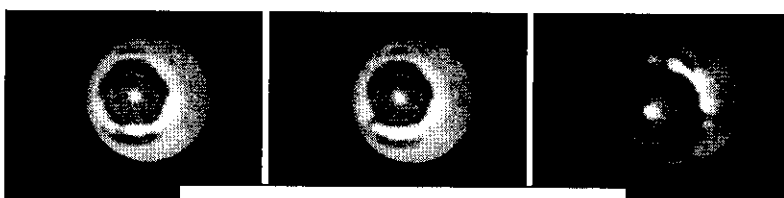
Effect of EPA after 2% cholesterol diet in male Japanese monkey



P-1 (after 3 months)



P-2 (after 10 months)



P-3 (after 13 months)

図-6

卵巣摘出メス・ニホンザルの無処置およびエストロゲン投与個体の血中総コレステロール値とPGDS 値の動態

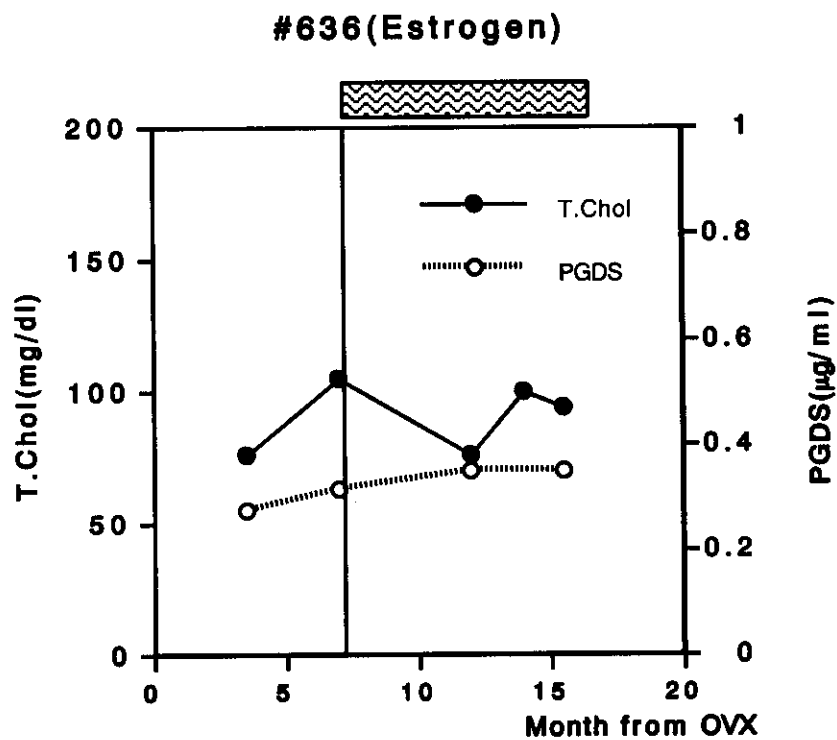
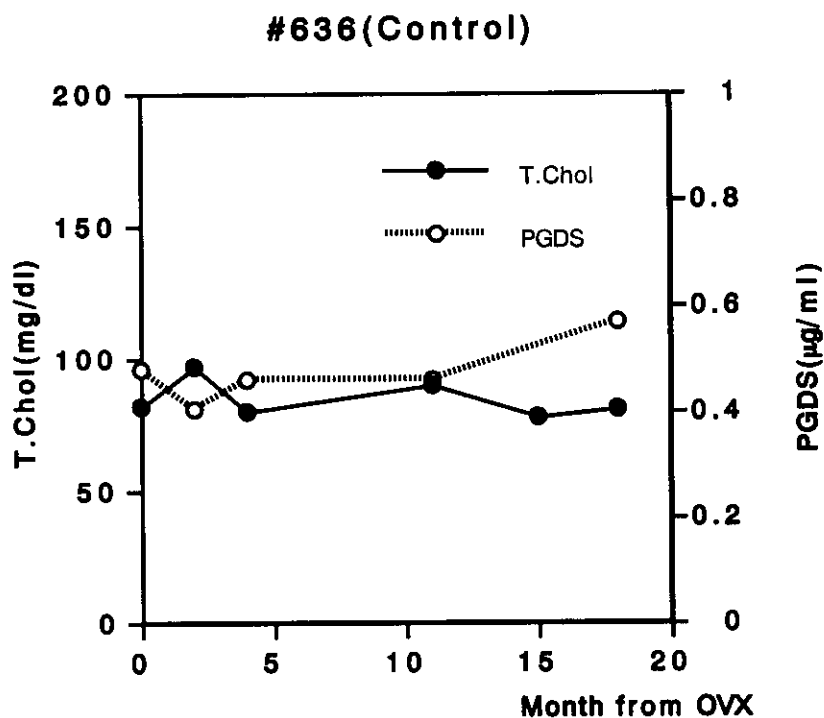
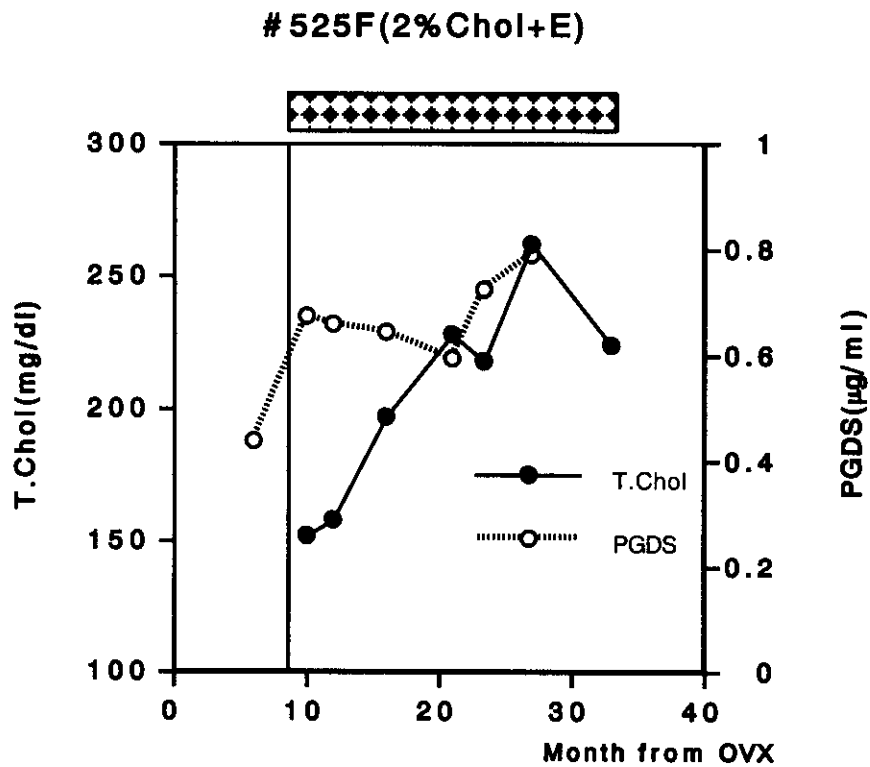
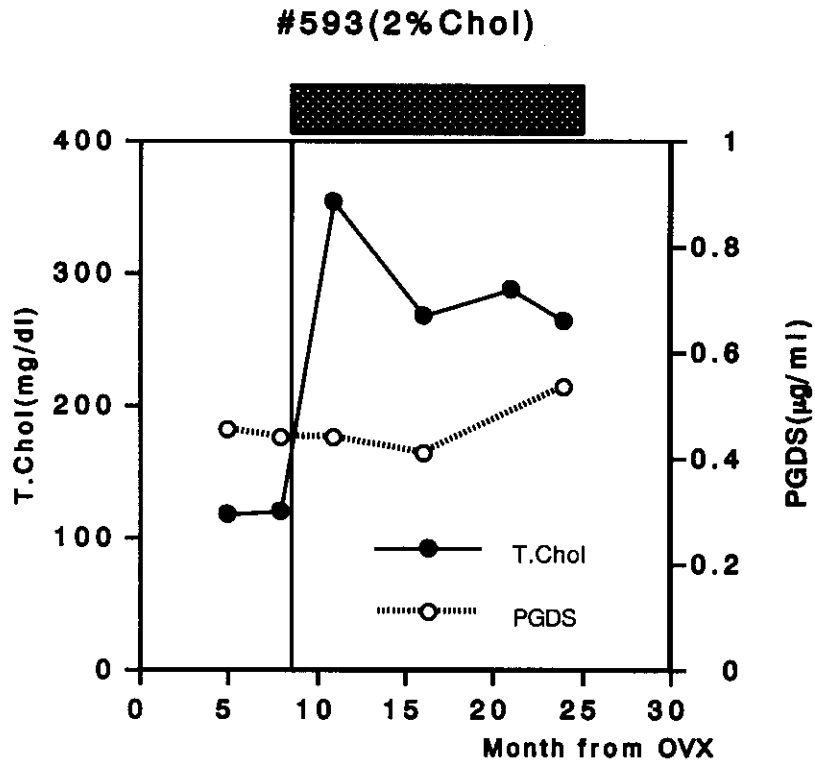


図-7

卵巣摘出メス・ニホンザルへの2%コレステロール食
およびコレステロール食とエストロゲン同時投与後の
血中総コレステロール値とPGDS 値の動態



厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

網膜変性症モデルに関する研究

分担研究者 鈴木 通弘 社団法人 予防衛生協会
協力研究者 柏木 賢治 山梨医科大学
阿部 圭哲 山梨医科大学
齋藤 克也 山梨医科大学

研究要旨 本研究では、サル類の眼科領域疾患モデル開発のための基礎研究として、（1）育成カニクイザルにおいて慢性腎性網膜症が認められた症例について、その病変の発生前から発生後にわたる普通眼底像の変化と、発生後のフルオレセイン蛍光眼底造影像(FAG)、インドシアニングリーン蛍光眼底造影像(ICG)、網膜活動電位(ERG)等の検討と（2）カニクイザルの眼を用いた緑内障治療薬の作用機序解明に関する研究を取り上げた。その結果、（1）普通眼底撮影では、左右眼底全体に綿花様白斑、眼底出血、中心窩の周りに放射状に硬性白斑、網膜動脈の狭細化が観察された。FAGでは、綿花様白斑部位に一致して蛍光色素の漏出、眼底出血部位に一致して低蛍光が観察された。ICGでは、FAGで観察された蛍光色素の漏出部位の一部に一致して色素漏出が観察された。ERGでは錐体系および杆体系反応ともに正常範囲内であった。今回の研究により、本症例はヒトの慢性腎性網膜症の診断や治療に対する貴重な動物モデルとなり得ることが明かとなった。また、（2）緑内障治療薬のプロスタグランジンF2アルファ関連製剤である、イソプロピルウノプロストンとラタノプロストの眼内薬物動態を従来より研究しており、今回その一部がさらに明らかになった。さらに、上記のプロスタグランジン点眼薬の重要な副作用である虹彩などへの色素沈着の機序も解明した。

分担研究者 鈴木 通弘 A.研究目的
社団法人 予防衛生協会 超高齢化社会を迎え、加齢に伴う眼疾患の重要性が増しつつある。特に緑内障、白内障、網膜変性症のような晩発性の疾患に

関しては、現在まで良い動物モデルの開発がなされていない。こうした眼科領域疾患の原因究明、診断、治療あるいは予防には、ヒトに類似した疾患モデルが必要である。特に、網膜黄斑変性のように、ゲツ菌類では見られない、霊長類特有の疾患はヒトに最も近縁なサル類を使用しなければ解明できず、こうした疾患モデルの開発研究が切望されている。

本年度の研究では、サル類の眼科領域疾患モデル開発のための基礎研究として、(1) カニクイザルにおいて観察された慢性腎性網膜症例に関する基礎的研究を取り上げた。すなわち、カニクイザルにおいて観察された慢性腎性網膜症例について臨床経過を明らかにすること、また、(2) プロスタグランدينF2アルファ関連の緑内障治療薬である、イソプロピルウノプロストンとラタノプロストの眼圧下降機序を明らかにし、主要な副作用である虹彩色素沈着の原因を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 動物：症例は育成雄カニクイザルである。

臨床経過：体重はほぼ正常範囲内の増加を示し、4歳5ヵ月齢では3.30Kgとなった。血液生化学検査において、血清中のBUN値は1歳4ヵ月齢 21.0mg/dl、2歳4ヵ月齢 34.7mg/dl、3歳2ヵ月齢 58.2mg/dl、3歳7ヵ月齢 60.9mg/dl、3歳8ヵ月齢 59.0mg/dlと、3歳2ヵ月齢以降に著しく高値を示した。3歳8ヵ月齢に実施した尿検査では、高蛋白尿(100mg/dl)、高ブドウ糖尿(1000mg/dl)、および尿沈渣に上皮細胞が多数認められた。眼底所見より腎性高血圧症を疑い、塩酸ケタミンおよび硫酸アトロピン投与下でオシロメトリック法による

非観血的血圧測定を4歳10ヵ月齢に行ったところ、収縮期血圧162mm/Hg、拡張期血圧100mm/Hgと高値の成績が得られた。なお、この年齢の平均は収縮期血圧105mm/Hg、拡張期血圧57mm/Hgの成績が得られた。

眼底撮影：眼底観察および撮影の20分ほど前にトロピカミド・塩酸フェニレフリン(ミドリリンP、参天製薬製)を動物の両眼に1~2滴滴下した。散瞳後に、塩酸ケタミン(ケタラール50、三共製)を10mg/kg投与して全身麻酔し、携帯用眼底カメラ(RC-監、興和製)により眼底の観察・記録を行った。フィルムは国産カラーフィルム(Fujichrome ASA100、富士フィルム製)を用いた。撮影は1歳4ヵ月齢、2歳4ヵ月齢、3歳2ヵ月齢、3歳7ヵ月齢、3歳8ヵ月齢、3歳9ヵ月齢、3歳10ヵ月齢、4歳5ヵ月齢時に実施した。

FAG：撮影には眼底撮影と同じく携帯用眼底カメラ(RC-監、興和製)を使用した。フィルムは国産カラーフィルム(Fujichrome ASA100、富士フィルム製)を用い、2倍増感現像を施した。フィルターには、励起用として透過光線波長460~530nm、濾過用に同じく波長540~640nmの多層膜干渉フィルター(Z6, Z7, Spectrotech Co.)を用いた。また、蛍光造影剤としては10% Sodium fluorescein液(フルオレスチン、小林製薬工業製)を0.4ml/kgB.W.宛、3秒で後肢の伏在静脈内に投与した。撮影は3歳8ヵ月齢、3歳9ヵ月齢、3歳10ヵ月齢、4歳5ヵ月齢時に実施した。

ICG：前記と同様の散瞳・麻酔処置を施した。高感度CCDカメラを装着させた眼底カメラ(CF-60UVi、キャノン製)により行った。観察はモニターテレビ、記録はビデオテープにて行った。ビデオテープから

写真への現像はビデオプリンター(ソニー製)を用いた。フィルターは、励起用として透過光線波長720~820nm、濾過用に同じく820~870nmのフィルターを使用した。また、造影剤としては、インドシアニンググリーン(ジアグノグリーン、第一製薬製)を1mg/kgB.W.宛、3秒で後肢の伏在静脈内に投与した。撮影は3歳8ヵ月齢、3歳9ヵ月齢、3歳10ヵ月齢、4歳5ヵ月齢時に実施した。

ERG測定方法：測定の20分ほど前にトロピカミド・塩酸フェニレフリン(ミドリnP、参天製薬製)を動物の両眼に1~2滴滴下した。散瞳後に、塩酸ケタミン(ケタラール50、三共製)とキシラジン(セラクター2%注射液、バイエル製)の2:1混合液を体重1Kg当たり0.3ml筋肉内投与した。ERGの光刺激は全視野刺激装置Ganzfeld刺激装置を使用した。ERG波形の記録は20分間の暗順応後、Scotopic ERG、Single flash ERG、OP-ERG、30 Hz flicker ERGの順で行った。測定は3歳9ヵ月齢時に実施した。

(2) 実験1：イソプロピルウノプロストンのカニクイザル生体眼とカニクイザル眼から培養された毛様体筋における細胞外基質分解酵素(MMP)活性への影響の確認と細胞外基質の変化を検討した。カニクイザル眼にイソプロピルウノプロストン一日一回点眼し、2週間後、眼球を摘出、毛様体部を採取し、同部の細胞外基質、MMP等の変化を検討した。さらに、カニクイザル眼から毛様体筋を分離培養し、イソプロピルウノプロストンの眼内主用代謝体を負荷した際の、細胞外基質の変化や細胞外基質分解酵素の変化を検討した。(すべての実験はヘルシンキ条約に乗っ取り動物愛護の精神の元で行われた)

実験2：カニクイザルの培養虹彩メラノ

サイトと皮膚のメラノサイトを用い、イソプロピルウノプロストンやラタノプロストンの眼内主要代謝体を負荷した際、メラノサイト中のメラニン量やその組成、また、メラニン産生の重要な酵素であるチロシナーゼの活性を検討した。

C.研究成果

(1) 普通眼底所見：2歳4ヵ月齢時の眼底像は正常であった。3歳2ヵ月齢において左右眼底、特に右側眼底に綿花様白斑が多数観察された。3歳7ヵ月齢、3歳8ヵ月齢では左右眼底全体に綿花様白斑、眼底出血、中心窩の周りに放射状に硬性白斑、網膜動脈の狭細化が観察された。4歳5ヵ月齢では綿花様白斑の占める割合がさらに眼底全体に増加した。

なお、本症例の両親および43頭の異母兄弟姉妹の普通眼底所見は正常であった。

FAG所見：3歳8ヵ月齢から4歳5ヵ月齢に実施したFAGにおいて綿花様白斑部位に一致して蛍光色素の漏出、眼底出血部位に一致して低蛍光が観察された。

ICG所見：ICGにおいては、FAGで観察された蛍光色素の漏出部位の一部に一致して色素漏出が観察された。

ERG所見：錘体系および杆体系反応ともに正常範囲内であった。

(2) 実験1：イソプロピルウノプロストンのカニクイザル生体眼とカニクイザル眼から培養された毛様体筋における細胞外基質分解酵素(MMP)活性への影響

1) イソプロピルウノプロストンカニクイザルの生体眼でも、培養毛様体筋細胞でも、主要な細胞外基質分解酵素であるmatrix metalloprotenase-2の活性が上昇していることが確認された。

2) 主要な細胞外気質であるコラーゲンタイ

PI, IIIなどの組成の変化が培養細胞において確認された。

実験2：イソプロピルウノプロストンやラタノプロストによるメラノサイト中のメラニン量やその組成、また、メラニン産生の重要な酵素であるチロシナーゼの活性の検討

1) イソプロピルウノプロストンの眼内主要代謝体はメラニン量を増加させると共に、メラニン産生における重要酵素であるチロシナーゼ活性も増加させた。

1) ラタノプロストとイソプロピルウノプロストンの眼内主要代謝体はどちらも、メラノサイトのチロシナーゼ活性を上昇させることが確認された。

D. 考 察

(1) 本症例は、血液生化学検査において、血清中のBUN値が、3歳2ヵ月齢以降に著しく高値を示し、尿検査では、高蛋白尿、高ブドウ糖尿、および尿沈渣に上皮細胞が多数認められ、オシロメトリック法による非観血的な血圧測定では、収縮期血圧 158-164mm/Hg、拡張期血圧 96-102mm/Hgと高値の成績を示した。さらに、左右眼底全体に綿花様白斑、眼底出血、中心窩の周りに放射状の硬性白斑、網膜動脈の狭細化が観察されるものであった。すなわち、2歳4ヵ月齢では観察されなかった綿花様白斑、網膜動脈の狭細化等の異常眼底所見が3歳2ヵ月齢において認められ、以後の年齢において眼底出血、中心窩の周りに放射状の硬性白斑等が観察されていった。その病変は、ヒトの腎性網膜症における所見と類似していた。また、カニクイザルを用いた実験的高血圧においてみられた眼底所見とも類似していた。3歳8ヵ月齢から4歳5ヵ月齢時に行ったFAGにより、綿花様白斑部位に一致

して蛍光色素の漏出、眼底出血部位に一致して低蛍光が観察された。この所見もヒトにおける腎性網膜症所見およびカニクイザルでの実験的高血圧における眼底所見と類似していた。また、同時期に実施されたICGでは、FAGで観察された蛍光色素の漏出部位の一部に一致して色素漏出が観察されており、脈絡膜血管においても新生血管よりの出血があることが確認できた。一方、ERGはほぼ正常範囲の反応を示した。

今回得られた成績から、本症例はヒトの慢性腎性網膜症の診断や治療に対する貴重な動物モデルとなり得ることが判った。

(2) 実験1：イソプロピルウノプロストンのカニクイザル眼における細胞外基質分解酵素(MMP)活性への影響と細胞外基質の変化

今回の研究の結果、毛様体筋の細胞外基質に変化をもたらす事が生体、培養の両面から判明した。毛様体は房水の排出路の一つである、葡萄膜強膜路に深く関与する部分で、同部の細胞外基質が変化することは、イソプロピルウノプロストンによる眼圧下降は同部の変化による可能性があるものと考えられる。

実験2：イソプロピルウノプロストンやラタノプロストによるメラノサイト中のメラニン量やその組成、また、メラニン産生の重要な酵素であるチロシナーゼの活性の検討

プロスタグランジン点眼薬による色素沈着の機序に関しては不明な点が多かったが、今回の結果から、チロシナーゼ活性が上昇し、メラニン産生能が上昇すること、またメラニンの総量の変化よりも、有色性の強い、ユーメラニンが特に上昇することが明らかになった。

E. 結論

(1) 育成カニクイザルにおいて慢性腎性網膜症が認められた症例について、その病変の発生前から発生後にわたる普通眼底像の変化と、発生後のフルオレセイン蛍光眼底造影像(FAG)、インドシアニングリーン蛍光眼底造影像(ICG)、網膜活動電位(ERG)等の検討を行った。その結果、1) 普通眼底撮影では、左右眼底全体に綿花様白斑、眼底出血、中心窩の周りに放射状に硬性白斑、網膜動脈の狭細化が観察された。

2) FAGでは、綿花様白斑部位に一致して蛍光色素の漏出、眼底出血部位に一致して低蛍光が観察された。3) ICGでは、FAGで観察された蛍光色素の漏出部位の一部に一致して色素漏出が観察された。4) ERGでは錐体系および杆体系反応ともに正常範囲内であった。今回の研究により、本症例はヒトの慢性腎性網膜症の診断や治療に対する貴重な動物モデルとなり得ることが明らかとなった。

(2) イソプロピルウノプロストンとラタノプロストは同一系統薬であるが、臨床的には薬理効果が異なり薬理作用が違う可能性が考えられている。今回の結果からどちらの薬物も細胞外基質代謝に影響を与える点では同じ機序によると考えられるが、今後は臨床における2剤の薬理効果の違いを薬理作用の点から検討する必要がある。プロスタグランدين薬による虹彩色素沈着は現在最も注目されている問題でラタノプロストによる研究は行われてきていたが、イソプロピルウノプロストンによる研究はほとんど行われていない。今回イソプロピルウノプロストンの作用機序が明らかにされたことはこの点からも重要である。またラタノプロストとイソプロピルウノプロストンの2者を比較した研究もこれまでなく、今後重要な研究結果であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Yuichiro TAKADA, Takaaki OHHASHI, Michihiro SUZUKI, Kennji KITAHARA and Makio KOBAYASHI
Immunohistochemical Detection of Retinal Cones in Monkey Retina: Light and Electron Microscopic Study
Jpn. J Ophthalmol. 44 503-510, 2000

2. 学会発表

② 鈴木通弘

サル類にみられる(最近の)眼底疾病
第20回 比較眼科学会年次大会
(2000年7月) 鹿児島

G. 知的所有権の獲得

なし

カニクイザル網膜黄斑変性の遺伝学的解析

分担研究者 国枝哲夫（岡山大学大学院自然科学研究科）

研究要旨

本研究では、カニクイザル染色体の連鎖地図を構築することにより、種々の形質の遺伝学的解析を行うためのシステムを確立し、カニクイザルに発生する網膜黄斑変成の原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。本年度はヒトの特定の染色体に位置づけられているマイクロサテライト遺伝子座と対応するマイクロサテライトDNAを用いてカニクイザルの遺伝学的連鎖地図を構築し、ヒトとカニクイザルの染色体の対応を明らかとすること、これらの用いた連鎖解析により、網膜黄斑変性の原因遺伝子の染色体上の位置を明らかとすることを試みた。その結果、カニクイザルの網膜黄斑変成の原因遺伝子は第1染色体上に存在することが示唆された。

A, 研究目的

カニクイザル染色体の連鎖地図を構築することにより、種々の形質の遺伝学的解析を行うためのシステムを確立し、カニクイザルに発生する網膜黄斑変成の原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。本研究の特色は上記研究目的のため、ヒトにおいて蓄積されている遺伝学的情報を、ヒトと近縁種であるカニクイザルの遺伝学的な解析に応用することである。具体的には上記目的のため、ヒトの特定の染色体に位置づけられているマイクロサテライト遺伝子座と対応するマイクロサテライトDNAを用いてカニクイザルの遺伝学的連鎖地図を構築し、ヒトとカニクイザルの染色体の対応を明らかとすること、これらの用いた連鎖解析により、網膜黄斑変性の原因遺伝子の染色体上の位置を明らかとすることを試みた。

国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターにて維持されているカニクイザルに出現した遺伝性の網膜黄斑変性はヒ

トの網膜黄斑変性の病態を解析する上で重要なモデル動物として期待されている。すでにヒトにおいては、遺伝性の網膜黄斑変性である Stargardt's 病, Best's 病, North Carolina 黄斑変性, Butterfly-shaped 色素変性等の疾患の原因遺伝子が明らかとなっているが、カニクイザルの黄斑変性の原因遺伝子を明らかとすることにより、本疾患をヒトの疾患の有用なモデル動物とすることが可能と考えられる。また、マカカ属サルの染色体とヒト染色体を比較したとき、多くの染色体については1対1の対応関係があるが一部に例外も認められ、たとえばヒトの第2染色体はカニクイザルでは二つの染色体に分断されていることが推測されている。これらのヒトとカニクイザルで一致しない染色体において、カニクイザルとヒトの染色体の正確な対応関係を明らかとすることは、カニクイザル染色体の遺伝学的な連鎖地図を構築する上で重要であるだけでなく、霊長類の染色体の進化

的な変化について考察する上でも重要な知見を与えるものと思われる。すでに、そこで本年度は、カニクイザルの網膜黄斑変成の原因遺伝子の染色体上の位置を調べるとともに、ヒトの第2染色体を対象とし、カニクイザルとヒトの染色体の正確な対応関係を明らかとすることを試みた。

B、研究方法

それぞれ単一の雄に由来する網膜黄斑変性の3家系70個体について、血液より常法によりDNAを抽出し、ヒト第1, 2, 3, 4, 5, 6, 7染色体の領域上のマイクロサテライト遺伝子座用のプライマーをアイソトープラベルし、PCR法による増幅を行った。PCR反応は1.5mM MgCl₂の反応液中にてアニーリング55℃1分、伸長反応72℃2分、変性92℃15秒の条件にて行った。PCR産物を5%変性ポリアクリルアミドゲルにて1500V、4時間電気泳動の後、X線フィルムに露光し、得られたバンドについて各個体のタイピングを行った。得られた結果について、父親から子供への対立遺伝子の伝達様式に基づいて連鎖解析を行い、各マーカー同士の連鎖を求めるとともに、網膜黄斑変性の発生との連鎖を求めた。

C、研究結果

ヒト第2染色体上の83のマイクロサテライトマーカーについて、カニクイザルにおいても対応するマイクロサテライトDNAが存在し、多型性を示すか否かを検討した結果、28の断片にて個体間

の多型性が認められた。これらのうち、本研究に用いた家系の父親においてヘテロ接合の状態であり、連鎖解析に有効であることが推測された。第2染色体上の14遺伝子座について、各個体のタイピングを行い各遺伝子座の間の組換え率をもとめ、カニクイザル対応する染色体の連鎖地図を確立した。その結果、ヒト第2染色体に対応する多数のマーカーを用いたにも関わらず、カニクイザルの連鎖地図は2つの連鎖グループに分割され、この2つの間には連鎖が認められなかった。したがって、ヒト第2染色体に対応するカニクイザル染色体は2つに分断されていることが示唆された。連鎖地図上での各遺伝子座は配置はD2S149-D2S1329-D2S387-D2S391 および D2S150-D2S114-D2S122-D2S1399-D2S156-D2S382-D2S425-D2S433-D2S43-4D2S133の順であった。隣接する各2遺伝子座間の距離は5.9から23.5cMの範囲であった。また、網膜黄斑変性の家系の中で疾患の発生とこれらカニクイザル第2染色体上のマーカーとの間には有為な連鎖は認められなかった。

さらにヒト第1, 3, 4, 5, 6, 7染色体上のそれぞれ39, 10, 8, 9, 10, 83のマイクロサテライトマーカーについて、同様に検討した結果、それぞれ17, 7, 7, 5, 9, 28のプライマーにおいて個体間の多型性が認められ、本研究に用いた家系の連鎖解析に有効であることが推測された。15, 2, 3, 3, 6, 14遺伝子座について、網膜黄斑変性の家系の連鎖解析を行った。その結果、第3染色体から第7染色体上

のマーカについてはいずれも網膜黄斑変性の発生との有意な連鎖は認められなかったが、第1染色体上のマーカである D1S2715 で28個体中非組換え個体が22個体、組換え個体が6個体となり、網膜黄斑変性の発生との連鎖が認められ、遺伝子座間の連鎖の尤度を示す LOD SCORE が 2.1 であった。同様にその近傍の D1S2714 においても、連鎖が認められ LOD SCORE が 1.9 となった。LOD SCORE の値が低い場合必ずしも断定はできないが、この結果から、カニクイザルの網膜黄斑変性の原因遺伝子は、第1染色体上中央部に存在するマイクロサテライトマーカである D1S2715 および D1S2714 の近傍に存在している可能性が示唆された。

D、考察

本研究ではヒト第2染色体上のマイクロサテライト遺伝子座用のプライマーを用いることにより、カニクイザルの遺伝学的連鎖地図を構築した。その結果、カニクイザルにおいてはヒトの第2染色体に対応する領域が2つに分割されていることが確認された。これまでに、カニクイザルの近縁種であるニホンザルではヒト第2染色体に対応する領域は第9および第15染色体に分割されていることが報告されている。したがって、カニクイザルでもヒト第2染色体のかなりの部分に対応する領域が第9および第15染色体に分断されていること、さらにその境界はヒト染色体上で D2S5931 と D2S450 の間に存在することが明らかとなった。以上の結果、本研究においてヒト第2染

色体とカニクイザルの第9および第15染色体との正確な対応関係が明らかとされ、これらの知見は霊長類の染色体の進化的な変化について考察する上で重要であると考えられた。

本研究の結果、カニクイザルの網膜黄斑変成の原因遺伝子は第1染色体上に存在することが示唆された。ヒトの第1染色体にはカニクイザルの疾患と類似した病態を示すヒトの遺伝性の網膜黄斑変成である Stargardt 病1型の原因遺伝子である STGD1 遺伝子が存在することが知られているが、今回、原因遺伝子と連鎖が見られた領域は、STGD1 遺伝子が存在する領域とは異なっていた。しかし、この領域には、ヒトの網膜色素変性18型の原因遺伝子である RP18 遺伝子が存在していた。網膜色素変性18型は網膜黄斑変成とは網膜に現れる表現型は必ずしも一致しない。しかし、両疾患はともに常染色体優性の遺伝様式をとり、網膜の変成を主な症状とする遺伝性の眼疾患であることから、カニクイザルの網膜黄斑変成と RP18 遺伝子との関連が考えられた。今後、より近接するマーカを用いた解析により、網膜黄斑変成の原因遺伝子の染色体上の位置を正確に特定することで、本疾患と RP18 遺伝子との関連を検討するとともに、当該領域に存在する候補遺伝子の特定し、解析を行う必要があるものと考えられた。

F、研究成果

1. Localization of the locus responsible for Chediak-Higashi syndrome in cattle to bovine chromosome 28.

- Kunieda, T., Ide, H., Nakagiri, M., Yoneda, K., Konfortov, B., and Ogawa, H. 2000. *Anim. Genet* 31, 87-90.
2. The down-regulated in adenoma (*Dra*) gene encoding intestine-specific anion transporter maps to mouse chromosome 12. Kunieda, T., Takahashi, K., Tsuji, T., Schweinfest, C.W. and Katoh, H. 2000. *Exp. Anim.* 49, 67-68.
 3. Homozygosity mapping of the locus responsible for renal tubular dysplasia of cattle on bovine chromosome 1. Ohba, Y., Kitagawa, H., Kitoh, K., Asahina, S., Nishimori, K., Kazuhiro, K., Kunieda, T., Sasaki, Y. 2000. *Mamm. Genome* 11, 316-319.
 4. Approximation for variance of inbreeding coefficient due to multiple paths of a pedigree. Oikawa, T., Kunieda, T., Sato, T. 2000. *Anim. Sci. J.* 71, 348-352.
 5. A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. Ohba, Y., Kitagawa, H., Kitoh, K., Sasaki, Y., Takami, M., Shinkai, Y., and Kunieda, T. 2000. *Genomics* 68, 229-236.
 6. Cloning of the Promoter Region and Expression Analysis of Mouse Insulin Receptor-related Receptor (*Irr*) Gene. 2001. Tsuji, T., Sato, K., Kunieda, T., *Anim. Sci. J.* in press.
 7. The insulin receptor-related receptor (*Insrr*) gene maps to mouse chromosome 3. 2001. Tsuji, T., Kato, H., Kunieda, T., *Exp. Anim.* in press.
 8. 和牛遺伝性疾患の分子遺伝学的解析 国枝哲夫 2000. *J. Anim. Genet.* 28, 39-44.

老齡カニクイザルをモデルとした老化と免疫機能の変化に関する研究

分担研究者 寺尾恵治（国立感染研・筑波霊長類センター）

これまでに正常カニクイザルでは胸腺退縮が完了する前後に、末梢血中に CD4 と CD8 の両抗原を同時に発現している CD4⁺/CD8⁺ T 細胞（DP 細胞）が増加することを明らかにし、これら末梢 DP 細胞の表現型および T 細胞レセプターのレパトアが胸腺 DP 細胞と異なることから、加齢に伴って出現する胸腺外分化 T 細胞である可能性を考え解析を進めてきた。今年度は DP 細胞の由来（細胞系列）を明らかにする目的で、老齡カニクイザル末梢血から単離精製した CD4 陽性 T 細胞（CD4sp）および CD8 陽性 T 細胞（CD8sp）と DP 細胞の T 細胞レセプター V β ファミリー遺伝子の塩基配列を比較した。さらに、細胞レベルでの老化を解析する方法としてテロメアの長さをフローサイトメトリーで解析する技術（Flow FISH）を確立し、末梢血 T 細胞のテロメア長の加齢に伴う変化を調査し、以下の成績を得た。

1) SSCP 法で検出される DP 細胞の T 細胞レセプター V β ファミリーに特異的なバンドの塩基配列を CD4sp 細胞のそれと比較した結果、両者の塩基配列が完全に一致したことから DP 細胞と CD4sp とが同一の細胞系列に属する T 細胞であると判断した。

2) 蛍光色素で標識した Peptide Nucleic Acid（PNA）プローブでハイブリダイズさせたリンパ球をフローサイトメトリーで解析することにより、テロメアの Hexameric DNA の繰り返し構造の長さを蛍光強度で測定できる Flow FISH 法を開発した。

3) Flow FISH 法で測定したテロメア長は Southern blotting で測定したそれと高い相関（ $R=0.923$ 、 $P<0.001$ ）を示すとともに、加齢に伴って有意（ $R=-0.52$ 、 $P<0.001$ ）に短縮した。両者の回帰式からカニクイザル末梢リンパ球のテロメア長は一年あたり平均 63bp 短縮することが明らかになった。

キーワード：カニクイザル、T リンパ球、T 細胞レセプター、DP 細胞、テロメア長

A. 研究目的

これまでに、老齡カニクイザルでは種々の免疫機能に変化が生じており、特に T 細胞の量的、質的变化が著しいことから、ヒトと同様にカニクイザルでも老化にともない T 細胞の表現型と機能に著しい変化が生じていることを明らかにしてきた。さらに、カニクイザルではヒトおよびマウスと異なり、加齢にともない末梢リンパ球中に胸腺細胞と同様 CD4 と CD8 の両者を発現している

細胞（DP）が比較的高率に検出されることから、末梢 DP 細胞が胸腺外分化 T 細胞である可能性を考慮した解析も行ってきた。

ヒトでは胸腺退縮後の末梢 T 細胞の起源について、胸腺外 T 細胞分化機構の存在が推測されているが、未だに確定的な知見は得られていない。老化に伴う免疫機能の変化の要因を解析するためには胸腺退縮後に末梢に出現する胸腺外分化 T 細胞の由来及び機能を明らかにする必要がある。これまでに老齡カニクイザルの末梢血中に出現する DP T 細胞は自己 B 細胞の IgG 合成を介助するヘルパー機能と細胞障害活性の両機能を併

せ持つきわめてユニークな細胞であることを明らかにしている。今年度は、カニクイザルで胸腺外分化 T 細胞の可能性を持つ末梢 DP 細胞の由来（細胞系列）を明らかにする目的で、T 細胞レセプターの塩基配列を CD4 陽性 T 細胞（CD4sp）と CD8 陽性 T 細胞（CD8sp）と比較するとともに、細胞レベルでの寿命を解析する技術としてフローサイトメトリーを用いたテロメア長測定法を開発し、さらに末梢リンパ球のテロメア長の加齢変化を調査した。

B. 材料および方法

筑波霊長類センターで繁殖育成された 0 歳から 34 歳の正常カニクイザル末梢血からリンパ球を分離し、抗 CD4 抗体（Leu3a）と抗 CD8 抗体（Leu2a）を用いた 2 色法フローサイトメトリー（FACS）により CD4sp 細胞、CD8sp 細胞、DP 細胞を単離精製した。単離した細胞の純度は 95% 以上であり、トリパンブルー染色での生存率は 95% 以上であった。

T 細胞レセプターの塩基配列の比較：アカゲザルの TCR V β の 1 から 24 の各ファミリーの塩基配列を基に、増幅用のプライマーを作成した。1 \sim 1.5 \times 10⁶ の 3 種類の単離 T 細胞から抽出した mRNA から RT-PCR によりそれぞれの TCR V β ファミリー遺伝子を増幅した。この PCR 産物を denaturing solution で希釈し、94C で 3 分間処理した。処理後直ちに 4% polyacrylamide ゲルで泳動展開し、分離した DNA を nylon 膜上に移した。ビオチン化した C β 特異的プローブでハイブリダイズした後に、バンドを染色し X 線フィルムに感光させた。同一位置に検出されたバンドをゲルごと切り出し、95C、20 分の加熱で DNA を抽出した後、再度 PCR による増幅を行って塩基配列決定の材料とした。

Flow FISH によるテロメア長測定法：

カニクイザルの末梢リンパ球を 80C で加温し

DNA を解離させた後に、FITC で標識したテロメア特異的 PNA プローブとハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせた細胞を FACS で解析し、FITC プローブの蛍光強度を測定した。

Southern Blotting によるテロメア長解析：

22 頭のカニクイザルから分離した末梢リンパ球を定法により処理し、核 DNA を抽出した。抽出 DNA を pulse-field 電気泳動したのち、ナイロン膜に移動させ、ビオチン標識テロメアプローブでハイブリダイズさせた。ハイブリダイズした膜から定法に従って DNA を可視化した。

C. 結果

1) T 細胞レセプターの塩基配列の比較：

図 1A は T 細胞レセプターの V β ファミリーレパトアを SSCP で解析した結果の一部を示す。図中の (*) で示すバンド（V β 2 の 1 ヲ所、V β 16 の 2 ヲ所）は、CD4sp 細胞と DP 細胞とで同一の位置に検出されたバンドである。このように、DP 細胞と同一の泳動パターンを示すバンドは CD4sp 細胞には見いだされたが、CD8sp 細胞のバンドでは一致するものがなかった。そこで、DP 細胞と CD4sp 細胞とで同一の位置に検出されるバンドを切り出し、DNA を再抽出して増幅したサンプルを用いて V β 領域と CDR3 領域の塩基配列を決定した。図 1B は V β 2 ファミリーで同一の位置に検出されたバンドの塩基配列を示す。図に示すように、CD4sp 細胞と DP 細胞のそれぞれから抽出したバンドの塩基配列はすべて一致した。このことから、CD4sp T 細胞と DP T 細胞とが同一の T 細胞レセプターを有する共通祖先細胞から分化した同じ細胞系列に属する T 細胞であることが明らかとなった。

2) Flow FISH によるテロメア長測定：

図 2 に異なった年齢のカニクイザルから分離した末梢リンパ球のテロメア長を Flow FISH で解析した結果を示す。図 2A に示すようにハイブ

リサイズさせたリンパ球はスキャターゲートで確認でき、図 2B に示すように蛍光強度は若齢 (M3 ; 5 歳) で高く、老齢 (M2 ; 20 歳) で低いことから、老化に伴い末梢リンパ球のテロメア長が短縮することがわかる。

3) Flow FISH 法と Southern blotting 法とで測定されたテロメア長の相関:

図 3A に年齢の異なる 22 頭のカニクイザルから分離した末梢リンパ球について、Flow FISH 法と Southern blotting 法でテロメア長を測定し、両者の相関を調べた結果を示す。横軸は FACS で検出されたテロメア特異的蛍光プローブの蛍光強度、縦軸が Southern blotting で検出されたテロメア断片長である。図に示すように両者の間にはきわめて高い相関 ($R=0.923$, $P<0.001$) が認められ、蛍光強度を回帰式で補正することによりテロメア長を塩基数 (bp) で表現することが可能となった。

4) 加齢に伴うカニクイザル末梢リンパ球のテロメア長の変化:

図 3B は 0 歳から 34 歳の 55 頭の正常カニクイザル末梢リンパ球について Flow FISH によりテロメア長を調査した結果を示す。図に示すように、末梢リンパ球のテロメア長と年齢とは有意な逆相関 ($R=-0.52$, $P<0.001$) が認められ、カニクイザルリンパ球のテロメア長が加齢に伴い短縮することが明らかになった。また、図 3A の結果と合わせて計算すると、カニクイザル末梢リンパ球では 1 年あたり 62.7bp の塩基数でテロメアの短縮が生じていることが判明した。

D. 考察

T 細胞は胸腺内で選択、分化、成熟した後末梢中に流出する。一方、胸腺は思春期に最大重量を示した後すみやかに退縮し、ヒトでは 40 歳前後で胸腺の実質細胞が消失するとされている。高齢者の免疫機能の変化を評価するためには、胸腺退

縮後の T 細胞の起源と機能の解析が重要となる。胸腺退縮後の T 細胞の起源に関しては「胸腺外 T 細胞分化機構」が推測されているが、ヒトではこれまで胸腺外分化 T 細胞の存在について確証は得られていない。これまでの研究で、正常カニクイザルでは末梢中に CD4 と CD8 を共発現している DP 細胞が、胸腺退縮が完了すると考えられる 10 歳前後で急激に増加することから、カニクイザルの末梢 DP T 細胞がヒトで未だ明らかにされていない胸腺外分化 T 細胞である可能性が示唆されている。これらの末梢 DP T 細胞は B 細胞の IgG 合成を介助するヘルパー機能と細胞障害活性の両機能を併せ持つきわめて特異的な T 細胞であることが明らかになっており、DP 細胞が CD4sp または CD8sp T 細胞のいずれの細胞系列に属する細胞であるかに興味を持たれていた。今回の結果から、少なくとも DP 細胞が使用している T 細胞レセプターの一部は CD4sp T 細胞と同一の泳動パターンを示し、さらにその塩基配列も全く同一であったことから、両者が同一の祖先細胞から分化した T 細胞であると結論できる。

一方で、同一の祖先細胞から分化した T 細胞でありながら、両者の機能は著しく異なっていた。CD4sp はヒト及びマウスと同様に IgG 合成をヘルプする機能が主であり、細胞障害活性はほとんど示さない。これに対して DP 細胞は CD8sp 細胞と同程度の細胞障害活性を示すとともに、中程度のヘルパー機能も有している。CD4sp と DP 細胞の分化機構については、T 細胞の胸腺外分化機構と絡めて今後詳細に解析する必要がある。

最近細胞レベルでの老化指標として繰り返し配列を持つテロメアの長さが注目されている。細胞分裂の度にテロメアの繰り返し配列の一端が除かれ、分裂回数 (細胞寿命) と関連してテロメア長が短縮することが知られている。今回 Flow FISH という新しい方法でカニクイザル末梢リンパ球のテロメア長を比較的簡単に測定できる方

法を開発した。これにより比較的多数のサンプルを同時に解析することが可能になるとともに、Southern blotting での解析結果との相関から蛍光強度からテロメア長 (bp) を推測することが可能となった。今回得られた細胞分裂に伴うカニクイザルのテロメア長短縮スピードは一年あたり平均で 63bp でありこの値はヒトの 59bp とほぼ同様な値であった。Flow FISH による末梢リンパ球のテロメア長測定法はテロメア長の加齢変化の解析のみならず、リンパ球の分化過程を追跡する方法としても重要であり、今後は末梢 DP 細胞の分化過程を表面抗原の違いとテロメア長の双方から同時に解析することができる。

E. 結論

カニクイザルの末梢 DP 細胞の由来を明らかにする目的で、CD4sp 細胞、CD8sp 細胞、DP 細胞のそれぞれの T 細胞が使用している T 細胞レセプターを比較し、CD4sp と DP 細胞の一部が同一の TCR V β を使用していること、さらに両者の塩基配列が一致したことから、DP 細胞と CD4sp 細胞が同一の細胞系列に属する T 細胞であることが判明した。

Flow FISH を用いて末梢リンパ球のテロメア長を推測する技術を開発した。これにより比較的多数のサンプルでテロメア長が測定可能となった。末梢リンパ球のテロメア長は加齢に伴って短縮し、Southern blotting の結果からカニクイザルではヒトとほぼ同様に一年あたり平均で 63bp の割合でテロメアが短縮することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

WAKAO,K., MATSUZAKI,I., TERAO,K., INOUE-MURAYAMA,M., SHIMOJO, N. and MURAYAMA,Y. (2000) Involvement of granzyme

B expression in the enhancement of natural killer activity by β -endorphin. BRAIN, BEHAVIOR, AND IMMUNITY, 14: 27-40

YOSHINO,N., AMI,Y., TERAO,K., TASHIRO, F. and HONDA,M. (2000) Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys using anti-human crossreactive antibodies. EXPERIMENTAL ANIMALS, 49: 97-110

MURAYAMA,Y. TERAO,K. and INOUE-MURAYAMA,M. (2000) Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas. HUMAN IMMUNOLOGY, 61: 474-485.

NAM, KH., ILLES,Z., TERAO,K., YOSHIKAWA,Y. and YAMAMURA, T. (2000) Characterization of expanded T cell clones in healthy macaque: ontogeny, distribution and stability. DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, 24: 703-715

NAM, KH., AKARI,H., SHIBATA,H., TERAO,K. and YOSHIKAWA,Y. (2000) Unique peripheral blood extrathymic CD4+ CD8+ T cells in cynomolgus monkeys. INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, 12: 1095-1103.

SUZUKI, J., GOTOH,S., MIWA,N., TERAO,K. and NAKAYAMA,H. (2000) Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) in an infant rhesus macaque (*Macaca mulatta*). JOURNAL OF MEDICAL PRIMATOLOGY, 29: 88-94.

肥田宗友、鈴木 譲、菅野純夫、橋本雄之、寺尾恵治、早坂郁夫、平井百樹 (2000)、霊長類の完全長 cDNA ライブラリーの作成と解析、霊長類研究、16:95-110

KASAI,F., TAKAHASHI,E., KOYAMA,K., TERAO,K., SUTO,Y., TOKUNAGA,K., NAKAMURA,Y. and HIRAI,M. (2000) Comparative FISH mapping of the ancestral fusion point of human