

氏名(本籍)	関根康生(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第894号
学位授与年月日	平成5年4月30日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	SODとGSTを指標としたヒト水晶体における scavenger system に関する研究
主査	筑波大学教授 医学博士 小山哲夫
副査	国立環境研究所地域環境研究部 大気影響評価研究チーム 総合研究官 (筑波大学併任教授)薬学博士 嵯峨井 勝
副査	筑波大学教授 医学博士 濱口秀夫
副査	筑波大学教授 医学博士 林英生
副査	筑波大学教授 医学博士 山下亀次郎

## 論文の要旨

### 〈研究の目的〉

白内障は水晶体が混濁を起こし、そのため視力低下を起こす疾患であり眼科診療における主要な疾患の一つである。水晶体崩壊現象に対する防御機構に関して、代表的なものとして、芳香族化合物水酸化酵素系と水酸化された基質を glutathione-s-transferase(GST)によりメルカプツール酸として代謝する酵素群が知られている。GST 親電子的な異物を水晶体外に排出する機構の最初に働く酵素であり、水晶体の異物処理機構で極めて重要な酵素の一つである。また近年、近紫外線などによる活性酸素の発生が白内障の成因に関与している可能性が指摘されている。superoxide dismutase(SOD)は活性酸素( $O_2^-$ )のスカベンジャーとして広く体内に分布している。本研究はまず SOD と GST の水晶体内における局在について検討した。次にヒト水晶体内の GST アイソザイムの検索を行い、GST1の遺伝的多型の頻度を白内障患者血液を用いた DNA 解析にて調べ、白内障発生との関連について遺伝疫学的検索を行った。

### 〈対象と方法〉

1. ヒト水晶体における SOD および GST 活性の局在：対象試料は非糖尿病白内障水晶体20例、透明水晶体11例を用いた。水晶体を中心部と周辺部の2ブロックにわけ、homogenizeした後、遠心し、上清を試料とした。SOD 活性は Oyanagi 法(xanitraxanthine oxidase によって発生した  $O_2^-$  の起こす反応に対する SOD の阻害作用)により測定した。

2. ヒト水晶体における GST 活性の局在：対象試料は非糖尿病老人性白内障患者水晶体20例と摘出眼球により得られた透明水晶体11例を用いた。1と同様の方法で得られた試料を Habig らの方法により、1-chloro-2, 4-dinitrobenzene を基質として GST の活性値を測定した。

3. ヒト水晶体における GST アイソザイム検索：対象試料は白内障手術時に摘出した水晶体に15例、対照として透明水晶体 8 例を用いた。GST アイソザイム検索としては GST アイソザイム 1, 2, 3 に対する抗体を作成し、1と同様の方法で得られた試料について、ロケット免疫電気泳動法ならびに Western blotting にて、GST アイソザイムの分布を検討した。

4. 老人性白内障患者に於ける GST1遺伝子の PCR 法を用いた解析：対象は老人性白内障にて手術適応になった96名および無作為抽出者55名の血液 5 ml よりエタノール沈澱法にて DNA を抽出した。抽出した DNA から PCR により、GST1( $\mu$ )の cDNA のうち Exon 3-5 を増幅した。PCR により増幅したものを ethidium bromide を含む agarose gel にて電気泳動を行い、GST1の遺伝的多型について検討した。

#### 〈結果〉

1. ヒト水晶体における SOD 活性の局在：(1)非糖尿病ヒト白内障水晶体20例、透明水晶体11例の両方において、周辺部( $0.40 \pm 0.3U/mg$  蛋白)の方が中心部( $0.21 \pm 0.11U/mg$  蛋白)より SOD 活性が高い傾向にあった。(2)水晶体中心部の SOD 活性は透明水晶体では白内障水晶体よりも有意に( $P < 0.01$ )高く、また水晶体周辺部の SOD 活性も透明水晶体では白内障におけるよりも有意に( $P < 0.05$ )高かった。

2. ヒト水晶体における GST 活性の局在：(1)透明水晶体 8 例において周辺部( $19.73 \pm 6.57U/mg$  蛋白)の方が中心部( $8.54 \pm 4.03U/mg$  蛋白)より GST 活性が高かった。(2)周辺部 GST 活性を老人性白内障水晶体( $11.09 \pm 5.23U/mg$  蛋白)と透明水晶体( $19.73 \pm 6.57U/mg$  蛋白)とで比較したところ、透明水晶体のほうが高い傾向にあった。

3. ヒト水晶体における GST アイソザイム検索：(1)ヒト水晶体では GST1アイソザイムが検出され、遺伝的多型を示していた。(2)ヒト水晶体では GST3アイソザイムが全ての水晶体において検出された。(3)白内障水晶体においても透明水晶体においても GST2は全く検出されなかった。

4. 老人性白内障患者に於ける GST1遺伝子の PCR 法を用いた解析：白内障手術患者では GST1欠損者は78.2%に認められ、一方健常者では52.7%であり、白内障患者は健常者に比して有意に GST1遺伝子欠損者が多かった( $p < 0.002$ , 相対危険率=3.20)。

#### 〈考察および結論〉

水晶体崩壊現象に対する防御機構の大きな構成要素である scavenger system における代謝系酵素の一つである GST と SOD とについて、水晶体における酵素活性の局在について検討した。白内障水晶体においては SOD 活性に代表される活性酵素に対する防御機構が透明水晶体より低い水準にあり、また周辺部の GST 活性は透明水晶体に比して低いことから、白内障眼では水晶体周辺部のほうが中心部より GST 活性低下が著しい事が判明した。このことは、老人性白内障の初発が周辺部から始まることを裏付けるものであり、老人性白内障の発生機序を検索する場合、活性酵素などの外的要因に加え、水晶体細胞の内的因子、すなわち GST などの酵素の重要性を示唆している。そこで臓器局在

性の相違と遺伝的多型性が知られている GST について、水晶体 GST アイソザイムの検索とその遺伝子解析を施行し、白内障手術患者では正常者に比して有意に GST1 遺伝子欠損者が多いことが判明し、遺伝的形質も白内障発症因子であることが明らかにされた。

## 審 査 の 要 旨

老人性白内障の原因としては未だその詳細は不明な点が多い。本研究は活性酵素( $O_2^-$ )のスカベンジャーである SOD について、また異物処理系の重要な酵素である GST について、それらの活性の水晶体内局在を検討した数少ない貴重な研究である。白内障眼で SOD や GST などの酵素活性は水晶体周辺部での活性低下が強いことを明らかにし、白内障発生初発が周辺部から始まる現象を明らかにした点は評価できる。このことは、老人性白内障の発生機序を検索する場合、活性酵素などの外的要因に加えて、水晶体細胞自体が持つ GST などの内的因子の検索もまた重要であることを示した。さらに水晶体細胞に内在する危険因子の検索の一環として、ヒト水晶体 GST アイソザイムの検索とその遺伝子解析を行い、白内障手術患者では健常者に比して有意に GST1 遺伝子欠損者が多いことを明らかにした。白内障発生の危険因子の一つが遺伝子レベルで解明できたことは高く評価出来る。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。