



Enlargement of the globe with ocular malformations in the c-myc transgenic mice

石橋, 一樹

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1957

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001957>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	いし ばし かず き 石 橋 一 樹	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1200号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成11年3月31日	
学位論文題目	Enlargement of the Globe with Ocular Malformations in the C-myc Transgenic Mice （形成異常を伴う眼球拡大を認めた c-myc トランスジェニックマウス）	
審査委員	主査 教授 山 本 節 教授 松 尾 雅 文	教授 前 田 盛

論文内容の要旨

緒言

近年、遺伝子工学の進歩とともに遺伝子導入マウス（トランスジェニックマウス）や標的組換えマウス（ノックアウトマウス）の作成が活発に行われるようになった。これらのうち一部のマウスは疾患モデルとして考えられ、その疾患の原因解明、治療の進歩に有効と期待されている。今回我々は増殖に関与する転写遺伝子で、癌遺伝子でもある c-myc 遺伝子の生態での働きを解明するため、インターフェロン α/β の存在下において誘導されるマウス Mx 遺伝子のプロモーターの支配下にマウス c-myc 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（Mx-c-myc マウス）を作成した。

方法

1) トランスジェニックマウスの作成

Mx プロモーターの下流にエクソン2とエクソン3を含んだマウス c-myc 遺伝子を組み込んでトランスジーンを作成した。このトランスジーンを C5 BL/6 CrSlc マウスより取り出された有精卵に遺伝子導入し、ICR マウスの卵管にかえした。生まれてきた仔マウスは、その尾より得られた DNA をサザンブロット法にて解析し、トランスジーンの組み込みの有無を確認された。

2) c-myc 遺伝子の発現の解析

c-myc 遺伝子は reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) とサザンブロット法を用いて解析した。この際、内因性とトランスジーン由来の c-myc 遺伝子の発現を区別するためにそれぞれに異なった配列のプライマーを設定し、PCR を行った。

3) 組織学的解析

組織はホルマリン固定後、パラフィン固埋し、ミクロトームにて組織片に作成した。組織片は H-E 染色後、光学顕微鏡にて観察した。

結果

作成した Mx-c-myc マウスは全身的に異常はきたさないものの、進行性の角膜混濁を伴う眼球拡大を呈した。生後6週目の時点では、片眼性、両眼性を含め約30%の固体に明らかな眼球拡大が認め

られた。これらの拡大した眼球は組織学的に、異常を進展した虹彩を伴う隅角閉塞、小水晶体、角膜上皮異常、神経節細胞数の減少を主とした網膜内装の萎縮、眼球拡大に伴う強膜の進展を呈した。

胎生期より生後1週目の Mx-c-myc マウスの眼球を組織学的に検討した。胎生期14.5日まではトランスジェニックマウスとコントロールマウスの眼球には違いは認められなかった。胎生期15.5日になると、トランスジェニックマウスでは眼杯の形態異常が認められた。組織学的には、虹彩、網様体の原基の異常な進展と小水晶体が認められた。生後1週目でトランスジェニックマウスでは隅角閉塞が認められた。これに対してコントロールマウスでは全例に開放した隅角が認められた。この時期の水晶体を摘出しその直径を測定したところ、トランスジェニックマウスでは ($1.39 \pm 0.07\text{mm}$)、コントロールマウスでは ($1.65 \pm 0.06\text{mm}$) とトランスジェニックマウスに小水晶体が伴うことが確認された。

Mx-c-myc マウスの眼球での内因性の c-myc 遺伝子とトランスジーン由来の c-myc 遺伝子の発現をそれぞれ reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) とサザンブロット法を用いて検出した。トランスジーン由来の c-myc 遺伝子は角膜、虹彩、水晶体、網膜で検出された。

考案

今回我々が、報告した Mx-c-myc マウスは角膜浮腫を伴う眼球の拡大を示した。この phenotype は先天性緑内障に伴う牛眼に類似している。組織学的解析で明らかにされた虹彩の伸展を伴う隅角閉塞は眼球の房水流出の障害による眼圧上昇の直接的な原因として考えられる。また、マウスで認められた内層を主とした網膜萎縮像は高眼圧の持続による網膜萎縮像に類似しており、角膜上皮障害像と共に眼圧上昇による二次的な変化であると考えられる。しかしながら、今回の報告ではマウス眼球の眼圧測定は困難であり、実際に眼圧の上昇を証明することはできなかった。先天性緑内障モデルは他の種では数例報告されているものの、マウスでの報告例は未だ無く、解明すべき点を残しているものの、このトランスジェニックマウスが初めての先天性緑内障モデルマウスになる可能性が示唆される。

前眼部の形成には神経堤由来の間葉系細胞が重要であることが知られているが、隅角形成については未だ不明な点が残されている。Mx-c-myc マウスは、隅角形成を解明するためにも非常に興味あるモデルと考える。

mx-c-myc マウスに認められる眼球形成異常の原因としては以下の2説が考えられる。第1の節は導入されたトランスジーン由来の c-myc 遺伝子を原因とする節である。c-myc 遺伝子は細胞増殖期に発現し、細胞の分化に伴い発現が低下することが知られている。これらのことより過剰発現した c-myc 遺伝子が隅角の分化に障害を引き起こした可能性が考えられる。第2の説としては導入されたトランスジーンにより眼球形成に関与する遺伝子にミューテーション引き起こされたとする考えである。以上の2節のうち我々は前者を支持している。

Mx-c-myc マウスは胎生期より小水晶体が認められる。水晶体での c-myc 遺伝子の発現は以前より知られており、水晶体に c-myc を発現させた他のトランスジェニックマウスでも小水晶体が認められる。ゆえに Mx-c-myc マウスの呈する小水晶体も c-myc 遺伝子の過剰発現が原因と考えられる。

以上、我々は眼球拡大を呈するトランスジェニックマウスについて報告した。Mx-c-myc マウスは前眼部形成や牛眼についての解析に興味深いモデルであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

[審査の要旨]

遺伝子導入マウスや標的組み換えマウスの一部は疾患モデルとして考えられ、その疾患の原因解明、治療の進歩に有効であると期待されている。本研究者は増殖に関与する転写因子で、癌遺伝子でもある *c-myc* 遺伝子を遺伝子導入し、*Mx-c-myc* マウスを作成した。このマウスの眼球は角膜浮腫を伴う眼球増大を呈した。本研究者は組織学的検討によりこのマウスの眼球異常が前眼部形成異常に基づくことを明らかにした。

[方法]

Mx プロモーターの下流にエクソン 2 とエクソン 3 を含んだマウス *c-myc* 遺伝子を組み込んでトランスジーンを作成した。このトランスジーンを C57BL/6 CrSlc マウスより取り出された有精卵に遺伝子導入し、ICR マウスの卵管にかえした。生まれてきた仔マウスは、その尾より得られた DNA をサザンブロット法にて解析し、トランスジーンの組み込みの有無を確認した。眼球組織は H-E 染色後、光学顕微鏡にて観察した。異なったプライマーを設定し、眼球組織に発現する内因性と導入遺伝子由来の *c-myc* 遺伝子の発現を reverse transcriptase-polymerase chain reaction とサザンブロット法を用いて解析した。

[結果]

Mx-C-myc マウスは全身的に異常はきたさないものの、進行性の角膜混濁を伴う眼球拡大を呈した。これらの拡大した眼球は組織学的に、異常伸展した虹彩を伴う隅角閉塞、小水晶体、角膜上皮異常、神経節細胞数の減少を主とした網膜内層の萎縮、眼球拡大に伴う強膜の伸展を呈した。胎生期 14.5 日まではトランスジェニックマウスとコントロールマウスには違いが認められなかったが、胎生期 15.5 日になると、トランスジェニックマウスでは虹彩、毛様体の原基の異常な伸展と小水晶体が認められた。生後 1 週目でトランスジェニックマウスでは隅角閉塞が見られた。*Mx-C-myc* マウスの眼球では導入遺伝子由来の *c-myc* 遺伝子は角膜、虹彩、水晶体、網膜で検出された。

[結論]

先天性緑内障モデルは他の主では数例が報告されているものの、マウスでの報告例は未だ無い。本研究は *Mx-c-myc* マウスに認められた眼球拡大の原因として、隅角形成異常による高眼圧の持続が考えられた。これらより *Mx-c-myc* マウスは最初の先天性緑内障モデルマウスになる可能性が示唆された。また、*Mx-c-myc* マウスは、隅角形成を解明するためにも非常に興味あるモデルと考えられた。このように本研究は眼科的に重要なトランスジェニックマウスを作成、解析したものとして価値ある研究と認める。よって、本研究者は博士（医学）として学位を得る資格があると認める。