

論文審査の要旨

報告番号	甲・乙 第 3074 号	氏 名	吉田 優子
論文審査担当者	主査 教授 美島 健二 副査 教授 桑田 啓貴 副査 教授 山本 松男		
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文「Cdc42 has important roles in postnatal angiogenesis and vasculature tissue formation」について、上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p>Rho ファミリータンパク質に属する Cdc42 遺伝子を血管内皮細胞で欠損させたマウスは、胎生初期で致死となる。そこで、出生後、血管内皮細胞で Cdc42 遺伝子を欠損させるコンディショナルノックアウトマウスを作製し、生体における Cdc42 遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。Cdc42 flox マウスと、タモキシフェン投与により VE-カドヘリンプロモーター制御下で血管内皮細胞特異的に組み替え酵素 Cre を発現する Cad-CreERT マウスを交配し、Cre-loxP システムにより、時期特異的に血管内皮細胞で Cdc42 遺伝子を欠損させるマウス (Cdc42^{f1/f1};Cad-CreERT:Cdc42cK0) を作製した。タモキシフェンは、生後 0 日齢から 1 日齢のマウス腹腔内に 100 μg/匹で投与した。Cre の発現様式は、GFP レポーターマウスと血管内皮細胞のマーカー遺伝子である CD31 の免疫染色を用いて確認した。生後、血管内皮細胞特異的に Cdc42 遺伝子を欠損させた Cdc42cK0 マウスは、生後 8 日齢から 10 日齢で致死となった。Cdc42cK0 マウスの組織解析から、小脳や腎臓の髄質における鬱血や、腎尿細管構造の破壊、肝臓における多核巨細胞や洞様毛細血管の消失が認められた。各臓器における異常をより詳細に検討するため電子顕微鏡による組織解析を行ったところ、Cdc42cK0 マウスは、血管内皮細胞の一部が基底膜より剥離し、多数の死滅した血管内皮細胞が観察された。そして、心臓において、死滅した血管内皮細胞を貪食するマクロファージも認められた。これらの結果より、血管内皮細胞における Cdc42 は、出生後の血管形成および血管を介した組織形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。</p> <p>本論文の審査において、副査の桑田委員および山本委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p>桑田委員の質問とそれらに対する回答：</p> <p>1. Tamoxifen の投与時期を、出生時より遅らせた場合どうなるか。</p> <p>(Cdc42cK0 マウスの遺伝子欠損時期をアダルト期にする目的で、生後 3 週齢、生後 4 週齢および生後 5 週齢の Cdc42cK0 マウスに、100 μg/g の Tamoxifen を 5 日間連続で投与する実験を行った。Tamoxifen 投与により血管内皮細胞特異的に Cre が発現したことを確認するため、Tamoxifen 投与終了後 3 日目に Cre の発現確認を行ったところ、Cre の発現が確認できなかった。この理由として、本研究で利用した Cdc42cK0 (VE-Cad CreER) マウスは、新生児期と比較してアダルト期になると Tamoxifen への反応性が低下することが可能性として挙げられる。先行論文においても、本研究で用いた Tamoxifen 誘導型血管内皮細胞特異的な遺伝子欠損マウスのアダルト期の遺伝子欠損についての報告がないことから、今後、詳細な Tamoxifen 投与プロトコルの作製が必要となる。)</p>			

2. Cdc42cK0 マウスにおいて鬱血が生じる理由は何か。

(血管内皮細胞は、一酸化炭素やエンドセリンなど数多くの血管作動性物質を放出し、血管透過性や凝固・線溶系の調節、血管壁への炎症細胞や白血球の接着などに関与する。本研究で用いた Cdc42cK0 マウスは、Cdc42 遺伝子の欠損により小脳や肝臓、腎臓において血管内皮細胞の形態異常および消失が認められた。このため、Cdc42cK0 マウスの血管では血管内皮の機能が失われ、血管内腔へ白血球などの血球が異常付着し、各臓器において鬱血を呈したのではないかと考えられる。)

山本委員の質問とそれらに対する回答：

1. Cdc42cK0 マウスは、血管以外に異常をきたした組織はあるか。

(Cdc42cK0 マウスは、コントロールマウスと比較し、体長が小さく骨形成に異常をきたしていることが明らかになった。Cdc42cK0 マウスはコントロールマウスと比較して、大腿骨長が短く、成長板における軟骨細胞の柱状配列の乱れ、肥大軟骨細胞の形態異常および細胞周囲の過剰に石灰化した軟骨基質が認められました。また類骨幅の増加などから、石灰化に異常をきたしている可能性も考えられた。骨内部には多数の血管が存在しており、血管における Cdc42 遺伝子欠損が骨の形成にも影響を及ぼしたと考えられる。)

2. スタチン内服患者において、血管内皮機能の障害などの副作用は認められるのか。また、そのメカニズムは何か。

(スタチンは、低分子量 G タンパク質の活性抑制や P13K-Akt 経路の活性化により細胞内シグナルに直接作用し、多彩な細胞機能を修飾することにより血管内皮機能の改善や血管形成促進作用を有することが明らかにされている。また、スタチンは、血管内皮細胞のカドヘリンに媒介される内皮細胞接着によるタイトジャンクションにも作用し、血管透過性を低下させることから、血管内皮機能を上昇させることがわかる。よって、スタチン内服患者において、血管内皮機能の障害などの副作用は報告されていないと考えられる。)

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査 美島委員の質問とそれらに対する回答：

1. 血管内皮特異的発現系に用いられるプロモーターは、他にどのようなものがあるか。

(血管内皮特異的なプロモーターとして、本研究で用いた VE-Cad の他に、Tie2 や Flk1 (VEGF2) などが挙げられる。内皮細胞に存在する Tie2 と呼ばれるレセプター型チロシンキナーゼが活性化されると、内皮細胞間結合が強固になり、血管構造の安定化に関わる。また、Flk1 は、KDR (ヒト内皮細胞から単離された成長因子受容体チロシンキナーゼ) のホモログであり、VEGF (血管内皮増殖因子) と高親和性をもち血管新生に関与する。)

主査の美島委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士 (歯学) の学位授与に値するものと判断した。

(主査が記載)