







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 題・論	第 570 号	氏名	麻生 泰弘
審査委員会委員	主査氏名	岩田 哲子	
	副査氏名	松浦 寛子	
	副査氏名	井原 健二	
論文題目 Induction of genes expressed in endothelial cells of the corpus callosum in the chronic cerebral hypoperfusion model rat (慢性脳低灌流モデルラットの脳梁における内皮細胞の遺伝子発現の誘導)			
論文掲載雑誌名 Pathobiology			
論文要旨 皮質下血管性認知症患者の認知機能に関連する大脳白質病変の形成の成因を明らかにするため、慢性脳低灌流モデル動物を用いて、病理組織学的変化が乏しい早期の大脳白質における遺伝子発現を網羅的に解析することにより、大脳白質病変の形成に関与する遺伝子を検討した。 Wister ラットの両側総頸動脈を結紮して慢性脳低灌流モデルラットとし、コントロール群には sham 手術を行った。両群に対して、術前、術後 1, 7, 28 日目の脳血流を経頭蓋的に測定し、各時点で脳を摘出し、組織学的に解析した。術後 7 日目に摘出した脳の脳梁から total RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行った。慢性脳低灌流モデルラットで有意に発現が変化した遺伝子について、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 法を行い、術後 1, 7, 28 日目の脳梁での発現を経時的に解析した。有意に発現が変化した遺伝子について、Western blotting 法、免疫組織化学、免疫蛍光法を用いて蛋白質の発現を調べた。 脳血流の低下が安定し脳梁の組織学的変化が見られ始める術後 7 日目に着目して、qRT-PCR で 16 遺伝子の発現を解析したところ、慢性脳低灌流モデルラットでは Ptpnb, Kcnj8, Crispld2, Bcl6b, Gja5 が術後 7 日目までに変化していたが、術後 28 日目ではコントロールと差がなかった。一方、Vwf と Trappc6a の発現は術後 7 日目までは両群で差が無く、28 日目では慢性脳低灌流モデルラットで増加していた。免疫組織化学では、GJA5 と vWF は内皮細胞に、KCNJ8 は内皮細胞とアストロサイトに、CRISPLD2 は神経細胞とアストロサイトに、TRAPPC6A は神経細胞に発現を認め、慢性脳低灌流モデルラットとコントロールの間で局在に差を認めなかった。 慢性脳低灌流モデルラットの脳梁では、内皮細胞やアストロサイト、神経細胞などの神経血管ユニットに関連する遺伝子の発現が変化していた。これらの結果は、大脳白質病変の形成に神経血管ユニットの機能不全が重要な役割を果たしていることを示唆する。 本研究は、大脳白質病変の形成に関与する遺伝子を明らかにしようとした価値ある研究である。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 課・論	第570号	氏名	麻生泰弘
審査委員会委員	主査氏名	岸田哲子	
	副査氏名	松浦 恵子	
	副査氏名	井原健二	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Table 1において、数値の意味するところは何か。相対的な発現量ならば、何と比べた数字か。スタンダードとした健常ラットの海馬由来cDNAサンプルとの比較ではないのか。 2. 高品質RNAを担保するためにどんな方法を用いたのか。RNAaseを用いたのなら、どのステップで用いたのか。用いていないならば、degradationのない高純度RNAであることをどのように確認したのか。 3. 慢性脳低灌流モデルの28日までの初期病変が慢性的変化を起こすという前提で実験を行ったのか。 4. 脳梁組織を用いたのはなぜか。 5. 網羅的遺伝子解析でupを1.2以上、downを0.83以下と決めた理由は何か。 6. Intensityの生データはどの程度であったか、個体差はどうだったか。 7. RT-PCRは1検体あたり何個行ったか。 8. 7日目のmicroarrayデータを元にして特定の遺伝子を抽出して検討を行っているが、網羅的な解析手法を用いるならば、pathway解析など遺伝子群の発現パターンを経時的に解析するような手法を用いた方が、病態の変化を理解する上で良いように思うがどうか。 9. 網羅的遺伝子解析とRT-PCRとの違いをどう説明するか。 10. Sup Table 2のfold changeは、downにおいては1以下ではないのか。 11. RNAのbioanalyzerによるRINの値は虚血による違いがあったか。 12. Fig 1 c, dのHEでの変化がわかりにくい。アストロサイトの活性化とはどれを指すのか。 13. タンパクレベルで差なしという理由は何か。Posttranscriptionalなどではなく、単に変化が乏しいだけではないのか。 14. これらの遺伝子が機能的に変化していることを示す証拠はあるのか。 15. 今回の実験が虚血によって起こる1箇月以内の比較的急性の遺伝子変化を捉えているのに対し、ヒトの老年期に起こる大脳白質変化は数十年単位の慢性的変化である。今回のラットの実験結果をヒトの老年期の慢性疾患に当てはめて薬剤探索するという今後の方向性には無理がある。むしろ脳虚血による急性脳損傷について、組織学的変化が起こる前に何らかの方法で早期に察知し治療に結びつけるという臨床展開の方が理解しやすい。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。