

論文内容の要旨

氏名	あしえながるもはまっどきいど Ashenagar Mohammad Said		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	医第1037号		
学位授与の日付	平成22年6月15日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	Gene expression in the adrenal glands of three spontaneously hypertensive rat substrains (高血圧自然発症ラット (SHR) 3垂系の副腎における遺伝子発現解析)		
論文審査委員 (主査)	教授	東野英明	
(副主査)	教授	西尾和人	
(副主査)	教授	宮崎俊一	

【研究の目的】		
高血圧発症に関わる遺伝子検索は、その原因と対策に必要な喫緊の重要な課題である。そこで、ヒトの高血圧症の一モデル動物と考えられる高血圧自然発症ラット (SHR) 3垂系の副腎を用いて、DNA アレイ法により網羅的発現遺伝子検索をした。		
【方法】		
正常血圧ラットとして雄性的 WKY/Izm を、高血圧ラットとして雄性的 SHR/Kpo, SHRSP/Kpo, M-SHRSP/Kpo の6週齢 (未昇圧期) と9週齢 (昇圧期) の各3尾を選び、副腎を摘出してホモジナイズし RNA 分画を得た。RNA より cDNA に変換した後蛍光色素で標識し、アジレント社製ラット全遺伝子 DNA アレイ (44K) と反応させて結合した cDNA 量をスキャナーで読みとって遺伝子発現量を測定した。各群間の発現量を WKY サンプル平均値と比較してその大小の差異を、SHR 群の WKY 群に対する差として捉え、有意差のある遺伝子を特定した。		
【結果】		
WKY に比べて6週齢または9週齢の何れかと SHR, SHRSP, M-SHRSP の何れかで4倍以上発現が大きかった共通の遺伝子数は87で、1/4以下であったのは128遺伝子であった。その中で血圧調節と関連するのではと考えられたのは、増加遺伝子としては <i>sparc/osteonectin (Spock2)</i> , <i>kynureninase (Kynu)</i> , <i>regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2)</i> , <i>gap junction protein a1 (Gjal)</i> , 減少遺伝子としては <i>urotensin 2 (Uts2)</i> , <i>cytoplasmic epoxide hydrolase 2 (Ephx2)</i> , <i>apelin (Apln)</i> , <i>insulin-like growth factor 1 receptor (Igf1r)</i> , <i>angiotensin II receptor-associated protein (Agtrap)</i> であった。		
【考察】		
上記9遺伝子の内、SHRの高血圧発症と関連性があると報告されていたのは、 <i>kynureninase (Kynu)</i> と <i>cytoplasmic epoxide hydrolase 2 (Ephx2)</i> であったので、他の7遺伝子は高血圧発症と何らかの関連性を持つ新しく判明した遺伝子であろうと考えた。		
【結論】		
正常血圧のWKYに比べて、WKYから高血圧を指標にして選択交配されて作成された3垂系のSHRの副腎では、共通して <i>Spock2</i> , <i>Kynu</i> , <i>Rgs2</i> , <i>Gjal</i> , <i>Uts2</i> , <i>Ephx2</i> , <i>Apln</i> , <i>Igf1r</i> , <i>Agtrap</i> の9遺伝子に有意な発現の増減があることが明らかとなった。何らかの点で高血圧発症・維持と関連していると考えられた。		
博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2010年2月 日 公表予定	出版物名
	公 表 内 容	Molecular Medicine Reports 第3巻 第2号
	全 文 と 要 約	2010年2月1日 発行予定

論文審査結果の要旨

高血圧症は脳卒中や虚血性心筋障害や腎不全の発症に直接的に関わっていることから、その解決策として高血圧症発症に関わる遺伝子検索は、その原因解明と治療対策に必要な喫緊の重要な課題である。これまで多くの研究成果がもたらされているものの未だ真の遺伝子は発見されていない。そこで、ヒトの高血圧症に最も近いと考えられるモデル動物である高血圧自然発症ラット (SHR) の 3 亜系 (SHR、SHRSP、M-SHRSP) の副腎を用いて、全 DNA アレイ検索法により正常血圧のWKYラットの比較から網羅的 mRNA 発現遺伝子検索を行った。

【方法】正常血圧ラットとして雄性的 WKY/Izm を、高血圧自然発症ラットとして雄性的 SHR/Kpo、SHRSP/Kpo、M-SHRSP/Kpo の 6 週齢 (未昇圧期) と 9 週齢 (昇圧期) の各 3 尾を選び、午前中にペントバルビタール麻酔下に屠殺して副腎を摘出し、液体窒素で急速凍結した。その保存副腎サンプルにガラスビーズを加えて振倒機でホモジナイズし、RNA 分画を抽出した。その精製 RNA より蛍光標識 cyanine-3-dCTP を添加して cDNA に変換した後、アジレント社製ラット全遺伝子 DNA アレイ (44K) と反応させ、結合した cDNA 量をアレイスキャナーで読み取って遺伝子発現量を測定した。各群間の発現量を WKY サンプル平均値と比較してその大小の差異を、SHR 群の WKY 群に対する差として捉え、有意差のある遺伝子を特定した。

【結果】WKY と比べて SHR、SHRSP、M-SHRSP で 4 倍以上発現が大きかった遺伝子数は 6 週齢でそれぞれ 4、59、112 遺伝子、9

週齢で 84、71、146 遺伝子であり 1/4 以下の発現量であったのは 6 週齢で 4407、149、74 遺伝子、9 週齢で 42、256、19 遺伝子であった。そして、6 週齢または 9 週齢の何れかと SHR、SHRSP、M-SHRSP の何れかで 4 倍以上発現が大であった共通の遺伝指数は 87 で、1/4 以下であったのは 128 遺伝子であった。高発現した 87 遺伝子は、全ての群で高値であった U1 (4 遺伝子)、6 週齢の SHR のみ高発現で無かった U2 (24 遺伝子)、6 週齢の SHR と SHRSP のみ高発現で無かった U3 (33 遺伝子)、9 週齢でのみ SHR、SHRSP、M-SHRSP で高発現であった U4 (10 遺伝子)、9 週齢の SHRSP と M-SHRSP でのみ高発現であった U5 (16 遺伝子) の 5 グループに分かれた。また、低発現した 128 遺伝子は、全ての群で高値であった D1 (98 遺伝子)、6 週齢の SHR のみ低発現で無かった D2 (9 遺伝子)、6 週齢の SHR と SHRSP のみ低発現で無かった D3 (1 遺伝子)、9 週齢でのみ SHR、SHRSP、M-SHRSP で低発現であった D4 (18 遺伝子)、9 週齢の SHRSP と M-SHRSP でのみで低発現であった D5 (2 遺伝子) の 5 グループに分かれた。その中で 6 週齢と 9 週齢で共に発現変化があり、血圧調節と強く関連すると考えられた遺伝子は、増加遺伝子としては *sparc/osteonectin (Spock2)*、*kynureninase (Kynu)*、*regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2)*、*gap junction protein $\alpha 1$ (Gja1)* の 4 遺伝子、減少遺伝子としては *urotensin 2 (Uts2)*、*cytoplasmic epoxide hydrolase 2 (Ephx2)*、*apelin (Apln)*、*insulin-like growth factor 1 receptor (Igf1r)*、*angiotensin II receptor-associated protein (Agtrap)* の 5 遺伝子であった。

【考察】上記 9 遺伝子の内、SHR の高血圧発症と関連性があると既に報告されていたのは、SHR 延髄吻側腹外側部で高値のためにキヌレニン低下を起こして高血圧が発症すると報告されている kynureninase (*Kynu*)と、SHR の心不全と関係するとして報告がある cytoplasmic epoxide hydrolase 2 (*Ephx2*) 遺伝子であった。したがって、他の 7 遺伝子 (*sparc/osteonectin (Spock2)*, *regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2)*, *gap junction protein α 1 (Gjal)*, *urotensin 2 (Uts2)*, *apelin (Apln)*, *insulin-like growth factor 1 receptor (Igflr)*, *angiotensin II receptor-associated protein (Agtrap)*) は高血圧発症と何らかの関連性を持つと考えられる全く新しく判明した遺伝子であった。

【結論】正常血圧の WKY と比べて、WKY から高血圧を指標にして選択交配されて作成された 3 亜系の SHR (SHR、SHRSP、M-SHRSP の順に高血圧症が重症化) の副腎では、共通して *Spock2*、*Kynu*、*Rgs2*、*Gjal*、*Uts2*、*Ephx2*、*Apln*、*Igflr*、*Agtrap* の 9 遺伝子に有意な発現の増減があることが明らかとなった。未だ完全解明とは言えないが、何らかの点で強く高血圧発症と関連していると考えられる高血圧関連遺伝子を特定して明らかにすることができた。本研究成果は、ヒトの多数が罹患し、その多くが熟年期や老年期に続発症で死亡する高血圧症の原因遺伝子を解明しようとした結果で、今後の循環器疾患基礎研究への道標と、根本的循環器疾患臨床治療に夢を抱かせる成果で、医学博士の学位を得る資格があると認める。

氏名	石田 知可子 <small>いし た ちかこ</small>
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医第 1039 号
学位授与の日付	平成 22 年 12 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Enhancement of fibrinolytic activity in vascular endothelial cells by heterologous expression of Adenine Nucleotide Translocase-1 (アデニオンヌクレオチド輸送体-1 の異所性発現による血管内皮細胞で線溶活性の亢進)
論文審査委員 (主査)	教授 松尾 理
(副主査)	教授 宮崎 俊一
(副主査)	教授 西尾 和人