

京都大学	博士（医学）	氏名	上條 博史
論文題目	Impaired vascular remodeling in the yolk sac of embryos deficient in ROCK-I and ROCK-II. (ROCK-I/II 遺伝子欠損マウス卵黄囊における血管形成不全について)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>低分子 G タンパク質 Rho は不活性型である GDP 型と活性型である GTP 型があり、外部の刺激を受け下流標的分子に伝える分子スイッチとして働き、細胞骨格の制御に関与する。Rho の標的分子 ROCK (Rho-associated kinase) は、哺乳類細胞において、ROCK-I, ROCK-II の 2 つのアイソフォームが存在し、両者の相同性はアミノ酸配列全体で 65%、特にキナーゼドメインでは 92% である。ROCK は直接的にミオシン軽鎖(MLC)をリン酸化することで、または間接的にミオシンフォスファターゼ(MYPT)をリン酸化することで細胞骨格の制御に関与していることが <i>in vitro</i> において明らかになっていた。また ROCK のキナーゼ活性を阻害する Y-27632 により、肝癌のモデルラットにおいて癌の浸潤が抑制されること、高血圧モデルラットにおいて降圧作用がみられることから <i>in vivo</i> における ROCK の機能についても明らかになっていた。しかし ROCK-I, ROCK-II それぞれの機能的な違いはほとんど分かっていなかった。ROCK-I, ROCK-II の単独遺伝子欠損マウスの解析により、どちらの遺伝子欠損マウスにおいても胎生期で閉眼異常や膈ヘルニアの表現型を示し致死となることが確認された。さらに ROCK-I/ROCK-II ダブルヘテロ(DHT)マウスにおいても閉眼異常や膈ヘルニアの表現型が認められることから、発生期において 2 つのアイソフォームが協調的に働いていることが示唆された。そこで、ROCK の発生期における機能を解析する為、DHT マウス同士を交配し、ROCK-I ROCK-II のダブルノックアウト(DKO)マウスの作出を試みた。その結果、ROCK DKO マウスは E3.5-9.5 で致死となること、さらに、ROCK-I^{+/+}ROCK-II^{+/+} および ROCK-I^{+/+} ROCK-II^{+/+} の個体は E9.5-12.5 で致死となることが示された。また、E9.5 にいて ROCK-I^{+/+} ROCK-II^{+/+} および ROCK-I^{+/+} ROCK-II^{+/+} の個体の体節数は 10-14 と同時期の正常個体の体節数 18-25 と比較して有意に少なく、これらの個体の発生が遅延していることが明らかとなった。E9.5 の正常個体の卵黄囊では大小の階層状の血管系が形成されるが、ROCK-I^{+/+} ROCK-II^{+/+} および ROCK-I^{+/+} ROCK-II^{+/+} の個体では、原始血管叢と呼ばれる血管のリモデリングが生じる前の未熟な血管系であった。血管の断面において、血管系の成熟、未成熟に関わらず、管腔内に血球細胞が確認されたことから、ROCK は血球細胞分化には影響しないことが示唆された。さらに発生期における ROCK の時期特異性を確認する為、野生型マウスの全胚培養に</p>			

Y-27632 を添加した結果、今回確認された発育遅延、および血管系のリモデリングの障害は E8.5-9.5 の間に ROCK のキナーゼ活性が阻害されることによって生じることが明らかとなった。さらに卵黄囊における MYPT および MLC のリン酸化の程度が正常個体に比較して減少していることも確認した。これらの結果より、血管のリモデリングには E8.5-9.5 の ROCK のキナーゼ活性が重要であるという ROCK の新たな機能が明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

Rho の標的分子 ROCK は、ROCK-I, ROCK-II の 2 つのアイソフォームが存在し、その分子全体のドメイン構造は非常に高く保存されている。ROCK-I, ROCK-II それぞれの単独欠損マウスが生下時眼瞼閉鎖不全や膈ヘルニアを来し、ROCK-I, ROCK-II ダブルヘテロマウスにおいても類似の表現型を示すことから、両者は発生期に重複した機能をもつことが示唆されたが、2 つの ROCK が欠損した場合の個体の表現型は不明であった。

申請者は、発生期の ROCK の機能を解明するため ROCK-I, ROCK-II 二重欠損マウスを作出し、これらが胎生期 3.5 日齢(E 3.5)から E 9.5 までの間に致死となること、ROCK-I^{+/+} ROCK-II^{-/-} および ROCK-I^{-/-} ROCK-II^{+/+} の個体が E 9.5 から E12.5 までに致死となることを見出した。表現型を解析した結果、これらの個体では卵黄囊上の血管のリモデリングが障害されることを明らかにした。さらに ROCK の阻害薬 Y-27632 を E 7.5 相当の時期より個体を体外で培養する全胚培養の系に添加すると、*in utero* で確認されたのと同様の表現型を示すことから、これらの障害はこの時期の ROCK のキナーゼ活性の阻害によることを明らかにした。

以上の研究は、発生初期の血管形成に重要な分子機構の解明に貢献、寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 27 年 1 月 23 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。