

Increased expression of vascular endothelial growth factor in placentas of p57kip2 null embryos

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松浦, 俊樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1252

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 399号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏 名	松 浦 俊 樹		
論文題目	Increased expression of vascular endothelial growth factor in placentas of p57 ^{kip2} null embryos (p57 ^{kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤における vascular endothelial growth factor の過剰発現)		

博士(医学) 松 浦 俊 樹

論文題目

Increased expression of vascular endothelial growth factor in placentas of p57^{kip2} null embryos

(p57^{kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤における vascular endothelial growth factor の過剰発現)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

絨毛細胞の異常増殖は、流産、早産、子宮内胎児発育不全、常位胎盤早期剥離および妊娠中毒症等の様々な妊娠合併症の原因として考えられているが、その機序は不明な点が多い。その理由は、絨毛細胞の異常増殖を生じる動物モデルが殆ど存在しないことにもある。p57^{kip2} はサイクリン依存性キナーゼインヒビター (CDKI) のひとつであり、父性刷り込み遺伝子である。本遺伝子には絨毛細胞の増殖に重要な役割が存在し、p57^{kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤は過形成をきたし、この妊娠マウスは妊娠中毒症様症状および早産を引き起こすことが最近明らかになった。p57^{kip2} とマウス胎盤における絨毛細胞増殖の機序は不明である。最近絨毛細胞の増殖には血管増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) および胎盤増殖因子 (placenta growth factor : PIGF) が関与していることが判明した。そこで p57^{kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤の絨毛細胞増殖機序を明らかにすべく p57^{kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤における VEGF と PIGF の発現について検討を行った。

〔材料ならびに方法〕

高橋らの作成した p57^{kip2} 遺伝子欠損マウスを実験に用いた。マウスは p57^{kip2} 遺伝子が雌性発現する刷り込み遺伝子であることから、p57^{kip2} 発現陽性ヘテロマウスの雌雄を交配させた。交配翌日を0.5日とし、17.5日目に母獣を頸椎脱臼にて屠殺した後、帝王切開法にて胎児及び胎盤を得た。胎盤の遺伝子型は胎児尾より抽出した DNA を PCR 法にて確認した。

免疫組織学的染色法は、胎盤を4%パラホルムアルデヒド固定後、パラフィン包埋した。脱パラフィン後、VEGF と PIGF 抗体を添加し ABC 法で行った。ウエスタンブロット法は、胎盤を超音波粉碎装置にて処理し、遠心分離してその上清を実験に使用した。抽出したタンパク質は、15%SDS-PAGE にて泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、VEGF と PIGF 抗体を反応させ ECL にて発光させた。RNA は、胎盤を RNA 抽出用試薬に浸し、ホモジェナイザーにて処理した後、クロロホルム、イソプロパノール、エタノールを用いて抽出した。Reverse-transcription (RT) 反応は、2 μ g の RNA を使用し、MMLV reverse transcriptase を使用した。定量的リアルタイム PCR 法は ABI PRISM 5700 (Applied Biosystems) を使用した。PCR 産物の特異性を確かめるための融解曲線解析は GAPDH をもとに施行した。RT-PCR は、上述した RT 反応より得た cDNA を使用した。PCR の増幅は30サイクルとした。得られた PCR 増幅産物は2%アガロースゲル電気泳動により分離し、DNA 増幅帯を確認した。内部標準遺伝子として GAPDH を使用した。

〔結果〕

VEGF 抗体による免疫組織学的染色法において、野生型マウス胎盤より p57^{kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤、

特に迷路層において VEGF の過剰発現がみられた。ウエスタンブロット法では、p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤は野生型マウス胎盤と比較して約9倍量の VEGF₁₆₄を確認した。定量的リアルタイム PCR 法により、p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤は野生型マウス胎盤と比較し、約2.5倍量の VEGF mRNA を確認した。RT-PCR 法において、野生型と比較して p57^{Kip2} 遺伝子欠損による胎盤由来の VEGF はスプライシングに大きな影響を受けていないことを確認した。PIGF は免疫組織学的染色法、ウエスタンブロット法および PCR 法いずれにおいても p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤と野生型マウス胎盤との間に有意な差を認めなかった。

〔考察〕

マウスの胎盤は、迷路層、海綿層、巨細胞層及びグリコーゲン層等に区別されるが、p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤の迷路層での異常増殖は VEGF の過剰発現に起因することが免疫組織学的染色法およびウエスタンブロット法により示唆された。マウス胎盤では、VEGF はスプライシングを受けることにより VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₄、VEGF₁₈₈ の VEGF が産生されるが、p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤においては VEGF₁₆₄ の役割が絨毛細胞の増殖と密接に関係することが明らかになった。定量的リアルタイム PCR 法からも VEGF の過剰発現は p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤から発現する VEGF mRNA が起因していることが判明した。さらに、RT-PCR 法により p57^{Kip2} は、p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤より発現する VEGF においてスプライシングに明らかな影響は与えないことを解明した。一方、PIGF は p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤の過形成に関与が少ないことが予想された。

〔結論〕

良好な子宮内環境を維持するためには、正常な機能を有する胎盤の存在が必須である。一方、絨毛細胞の異常増殖は、妊娠に合併する様々な疾患を誘発する。今回の解析により、p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤における絨毛細胞の異常増殖に VEGF が関与することを見出した。胎盤の増殖機構において p57^{Kip2} 遺伝子によって調節された VEGF が関連することを初めて見出した。

論文審査の結果の要旨

高等動物において細胞周期の制御メカニズムは発生から成熟に至るまで緻密に制御されている。細胞周期の異常は生物に重篤な障害をもたらす、致死性である場合も多いが、組織の異常や癌の原因ともなる。サイクリン依存性キナーゼ(CDK)は細胞周期のエンジンと呼ばれ、細胞周期進行の中心的役割を担っている。その阻害タンパク質(CDKインヒビター)はCDKの活性を負に制御する細胞周期のブレーキとして重要な役割を担っている。p57^{Kip2} はCDKインヒビターであるが、その生理機能に未知の部分が多い。申請者らのグループは最近 p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウスにおいて胎盤の過形成、妊娠中毒症様症状および早産がみられることを報告している(参考論文 2, Kanayama *et al.* 2003)。本研究では胎盤の絨毛細胞の増殖メカニズムを明らかにすることを一つの目的として、胎盤の絨毛細胞の増殖に VEGF (vascular endothelial growth factor) が関与していることに注目し、p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウスにおける VEGF の発現について解析した。申請者はこの一連の研究により以下の結果を得ている。

- 1) マウス胎盤組織の免疫組織学的染色による解析から、p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べて VEGF の過剰発現が主に迷路層に見られた。

- 2) ウェスタンブロット法による解析でも同様の傾向がみられ、p57^{kip2} 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べて約 9 倍の VEGF の過剰発現が見られた。
- 3) VEGF は複数のスプライシングバリエント (120, 164, 188) があり、その中で VEGF₁₆₄ タンパク質のみ発現亢進がみられた。
- 4) 定量的 PCR 法による VEGF mRNA の解析では、p57^{kip2} 遺伝子欠損マウスは約 2.5 倍 VEGF mRNA が増加していた。
- 5) p57^{kip2} 遺伝子欠損による VEGF のスプライシング自身への直接の影響はないことが確認された。
- 6) 絨毛細胞の増殖に関わるもう一つの成長因子である胎盤増殖因子 (placenta growth factor : PIGF) の発現は p57^{kip2} 遺伝子欠損により変動しなかった。

以上の様に申請者は、p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤において VEGF が過剰発現していることを見だし、それにより p57^{Kip2} 遺伝子欠損マウス胎盤における VEGF の過剰発現が絨毛細胞の増殖亢進を引き起こし、胎盤過形成の原因となっていることが強く示唆された。本研究は p57^{Kip2} 遺伝子の新たな機能を示唆するものであり、審査委員会ではこれらの研究成果を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑応答を行った。

- 1) p57^{kip2} の機能について
- 2) p57^{kip2} の発現部位および発現細胞について
- 3) VEGF の発現部位および発現細胞について
- 4) p57^{kip2} 遺伝子欠損マウスの胎盤の CDK 活性について
- 5) VEGF 遺伝子欠損マウスの表現型について
- 6) 胞状奇態において VEGF は高発現しているか
- 7) Beckwith Wiedemann Syndrome の症状と p57^{kip2} の関係について
- 8) 胎盤の過形成は VEGF 発現亢進だけで説明できるか
- 9) VEGF 遺伝子の発現メカニズムは
- 10) p57^{kip2} の mRNA の亢進が少ないのにタンパクレベルの亢進が大きい理由は
- 11) 妊娠中毒症において VEGF 遺伝子の発現は亢進しているか
- 12) TGF-beta と p57^{kip2}、VEGF および胎盤の過形成の関係について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 北 川 雅 敏

副查 簡 井 祥 博 副查 本 郷 輝 明、