

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 1523 号		学位申請者	佐々木 雄一
審査委員	主査	谷本 昭英	学位	博士 (医学)
	副査	井本 浩	副査	小賤 健一
	副査	西尾 善彦	副査	橋口 照人
<p>主査および副査の5名は、令和元年8月19日、学位申請者 佐々木 雄一 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のよう な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 血管老化と動脈硬化について論じているが、血管老化とは具体的にどういうことを示しているのか。 (回答) 血管の老化は、動脈壁厚、壁硬化、内皮機能の低下と考える。動脈硬化に先行して、血管老化が進展している報告がある。</p> <p>質問2) 内皮細胞以外に血管平滑筋細胞に関しても細胞老化を評価したのか。 (回答) 血管平滑筋細胞を用いた実験においても、エストロゲンの低下に伴い Sirt1 発現低下、細胞老化を認めた。</p> <p>質問3) 動物実験の Western blot は内皮だけではなく、血管壁全てのタンパクを検証しているのか。 (回答) 大動脈の crude homogenate であり、Western blot では内皮のみをみているものではないため、補助的に in vitro の実験で HUVEC での検証を行った。今後、内皮、平滑筋を分離し、詳細に検討する必要があると考ええる。</p> <p>質問4) 血管老化には内皮が中心的な役割を果たしているのか。 (回答) 内皮が障害を受けることで老化が進展し、局所の炎症性サイトカインや増殖因子の発現・活性化を介して、平滑筋細胞は内膜に遊走する機序を考えると、内皮が中心的な働きを果たしていると考えている。</p> <p>質問5) Oil Red O 染色、SA-β gal 染色の評価方法について、positive area は各々横断面、血管全体で評価したのか。 (回答) Oil Red O 染色はバルサルバ洞断面、SA-β gal 染色は染色された面積と大動脈の総面積との比で評価した。</p> <p>質問6) SERM がエストロゲン受容体に結合し、eNOS を活性化する分子機構についてはどうか。 (回答) エストロゲン受容体に結合し、PI3K/Akt シグナル伝達経路にて eNOS を活性化すると考える。</p> <p>質問7) eNOS により Sirt1 の発現が亢進するメカニズムはどのようになっているのか。 (回答) eNOS 活性化により産生が増加した NO が Sirt1 のプロモーターに作用することで Sirt1 発現が亢進する。</p> <p>質問8) SA-β gal 染色の原理はどのようであるのか。 (回答) 老化した細胞・組織では SA-β galactosidase が活性化しており、非蛍光基質である X-gal を加水分解することにより青色の蛍光を発する。</p> <p>質問9) 男性において男性ホルモンは、エストロゲンと同様に抗血管老化、抗動脈硬化に働く可能性はあるか。 (回答) 男性ではアンドロゲンがアロマターゼにより E2 に変換されるが、閉経後と男性の血中 E2 濃度は同程度である。加齢に伴いテストステロンが低下した男性へのテストステロン投与は動脈硬化進展を抑制した報告がある。</p> <p>質問10) 雄のマウスでも雌のマウスと同様の結果が得られる可能性はあるか。 (回答) 雄のマウスの血管でのエストロゲンレセプターの発現等に関する報告はなく、効果があるかは不明である。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 1) Sirt1 による予防効果は粥腫の形成を予防するのか、それとも粥腫の治療標的になるのか。  
 (回答) Sirt1 は血管老化の進展抑制、また炎症や接着因子の遺伝子を抑制する作用があるため粥腫形成の予防に働くと考えられる。Sirt1 の過剰発現は老化を進展させることから、適度な発現が粥腫形成予防に重要であると考えられる。

質問 1 2) Sirt1 発現を亢進させる薬剤を使用した実験を行ったか。

(回答) 本研究ではレスベラトロールを含め Sirt1 活性化作用のある薬剤を使用した実験は行っていない。

質問 1 3) ホルモン補充療法の心血管イベント抑制効果は、はエストロゲンの濃度の問題なのか、それとも他に因子があるのか。

(回答) 閉経後早期に HRT を開始すると動脈硬化の進展抑制効果があるという報告があり、治療を開始するタイミングが重要であると考えられる。

質問 1 4) NO とスーパーオキシドが反応して生じる peroxynite による酸化ストレスに関してはどのように考えるか。

(回答) Sirt1 には様々な作用があり、PGC-1 $\alpha$ 、オートファジーなどを介してミトコンドリア機能を維持し、SOD によってスーパーオキシドを消去している可能性が示唆される。また、NO を適度な濃度に維持することが重要であると考えられる。

質問 1 5) 血管平滑筋細胞の NO 感受性については検討したか。

(回答) 今回の研究では、NO 感受性までは検討できていない。

質問 1 6) eNOS KO マウスにはどのような表現型があるのか。

(回答) eNOS KO マウスの血管では、動脈硬化が進展している。

質問 1 7) Fig. 2E では卵巣摘除群 (OVX + Ctr) は、卵巣摘除後にエストラジオールを投与した群 (OVX + E2) と比較し、PAI-1 の発現が非常に高いがどのようなことが考えられるか。

(回答) PAI-1 は血管においては内皮に特異的であるため、PAI-1 発現の亢進はエストロゲン低下に起因した強い血管内皮機能障害に伴う変化である可能性が高いと考えられる。

質問 1 8) Sirt1 のプロモーター領域にエストロゲンの応答性領域が存在するのか。

(回答) 調べる限り報告はない。

質問 1 9) ApoE KO マウスの食餌は普通食を用いたのか。

(回答) 雌の ApoE KO マウスは動脈硬化が進展しやすいこと、Sirt1 はカロリー摂取量により影響を受けることから、食餌の影響を避けるために普通食を用いた。

質問 2 0) 大動脈全体の Oil Red O 染色と SA- $\beta$  gal 染色は、同じ検体で評価できないのか。

(回答) 同一検体の胸部～腹部大動脈に対して、それぞれの染色を行うことはできない。

質問 2 1) 大動脈の HE 染色の質的变化や炎症反応の変化を検証したのか。

(回答) 本研究では HE 染色での形態評価、炎症反応の評価は行っていない。今後の検討課題としたい。

質問 2 2) iNOS の発現は検証したのか。

(回答) iNOS の発現は検証していないが、L-NAME 投与と eNOS KO マウスは同様に血管老化・動脈硬化を進展させたことから iNOS の影響は小さいと考える。

質問 2 3) SERM の eNOS 活性化効果はエストロゲンと同様に non genomic action なのか。

(回答) non genomic action と考えている。

質問 2 4) SERD を用いたらどのような結果が予想されるか。

(回答) エストロゲンの non genomic action も抑制されることから、卵巣摘除と同様の結果が予想される。

質問 2 5) SERM と SERD では動脈硬化への影響に差はあると考えるか。

(回答) SERM の一つである Tamoxifen では心血管イベントや脳卒中を抑制したとの報告はあるが、SERD はエストロゲン受容体に拮抗するため動脈硬化進展抑制に対する効果はないと考える。

質問 2 6) 血管老化の定義はあるのか。

(回答) 血管老化に関する厳密な定義はない。細胞形態での評価等があるが、今回は SA- $\beta$  gal 染色で評価した。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。