

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第 25 号	学位申請者	桜 博則
審査委員	主査	原 博満 学位	博士(医学)歯学・学術
	副査	堀内 正久 副査	岸田 昭世
	副査	武田 泰生 副査	古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成27年12月15日、学位申請者 桜 博則 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。

質問1) PP2A の阻害剤であるオカダ酸を使用したか。

(回答) 本研究では PP2A がセラミドにより活性化される事が広く分かっていたので、オカダ酸による確認は不要と判断した。

質問2) どういう経緯で Smpd3 に着目したか。

(回答) 先行文献で、Smpd3 の chemically-induced loss-of-function mutation mice と Smpd3 KO マウスに肥大軟骨層増大という事象が共通していたことより Smpd3 の軟骨分化に対する影響に着目した。

質問3) BMP 自体の regulation はどの程度解明されているのか。

(回答) 軟骨細胞自身が autocrine/paracrine 的に BMP を産生していると考えられている。

質問4) 実験に細胞膜透過性セラミドを使用したのはなぜか。

(回答) 細胞内の nSMase2 が細胞膜内側のスフィンゴミエリンからセラミドを合成し、このセラミドがシグナルを伝達していく過程を再現するために細胞膜透過性のセラミドを使用した。

質問5) Akt pathway の阻害剤である LY294002、MK2206 などの構造と阻害機構はどうなっているか。

(回答) 今回は各阻害剤の構造の検討はおこなっていないが、阻害機構は下記のごとくである。

LY294002 は競合性阻害剤であり、PI3K の ATP 結合部位に作用する。

MK2206 は非競合性阻害剤であり、Akt の Ser47 のリン酸化を阻害する。

Rapamycin は非競合性阻害剤であり、複合体として存在する mTOR の複合体形成を阻害する。

質問6) Fig.2 の Cにおいて ATDC5 では BMP-2 处理で Runx2 の発現は上昇するが、Fig.2 の F では初代軟骨細胞に BMP-2 を添加しても Runx2 が増加していない。初代軟骨細胞の段階まで軟骨細胞として分化した細胞に Runx2 は発現するのか。

(回答) 分化度の低い軟骨前駆細胞株である ATDC5 に比べ、既に関節軟骨に分化し成熟途上にある初代軟骨細胞では Runx2 の誘導が始まっている、ATDC5 ほど強く BMP の効果が誘導されなかったと考えている。

質問7) 内軟骨性骨化の過程で成熟した軟骨は骨化するのか。

(回答) 軟骨細胞は直接骨芽細胞に分化せず、肥大した軟骨がアポトーシスに至り、その空間に骨芽細胞が侵入して骨化が始まる。

## 最終試験の結果の要旨

質問 8) Fig1 D~H のグラフの小さな文字は何を意味しているのか。

(回答)  $\Delta Ct$  value である。

質問 9) fro/fro mouse の骨以外の phenotype はどのようなものがあるのか。

(回答) 特に記載がないので不明である。

質問 10) Fig2 C で siRunx2 を行っても mock に比べ BMP-2 を添加した群が Runx2 の発現が大きいのはなぜか。

(回答) ノックダウンはノックアウトではなく発現は残るので、BMP-2 刺激の影響が残ると解釈している。

質問 11) どの因子をターゲットにして OA の治療に役立てるのか。例えば Akt の阻害薬を治療として関節内に注入する事などが考えられるのか。

(回答) 例えばセラミドは既に皮膚科や美容関係で人体に用いられているが、その細胞膜透過性誘導体は関節内投与により OA の進行を止められる可能性はあると考える。

質問 12) Smpd3 は骨化しないように軟骨分化を抑制していると考えて良いのか。

(回答) 成長軟骨においては過不足なく骨化が起こるよう軟骨の分化成熟を適度に調節しているものと考えている。

質問 13) 内軟骨性骨化において肥大した軟骨がアポトーシスをおこしたあとは何が起こるのか。

(回答) 軟骨基質の分解や血管の侵入が起こり、骨芽細胞が誘導され、骨基質を產生し骨に置き換わっていく。

質問 14) Smpd3 は軟骨分化成熟において全ての段階で抑制的に働くのか。

(回答) 後期の分化成熟期に働くものと考えている。

質問 15) nSMase は全身に発現しており、例えばこの sSMase2-ceramide 経路で OA の治療を行おうとしてもセラミドを投与すればよいなどという単純なものではないと思われるが、今後どう添加していくつもりか。in vivo で使っていくのか、in vitro で使っていくのか。

(回答) ceramide は多様な生理活性を持っており何らかの修飾が必要と考えられるが、いずれにしてもヒアルロン酸がそうであるように、セラミドも関節内投与という限局したデリバリー法であれば全身的な影響は考えにくいと思われる。

質問 16) Has は軟骨細胞に特異的なものか。

(回答) Has1,2,3 のうち 1、2 は比較的高分子の HA を、3 は比較的低分子の HA を产生する。関節軟骨の HA 产生は Has2 が主で、Has3 が产生する低分子の HA は炎症に関わっている。

質問 17) Runx2 の KO マウスの phenotype はどのようにあるか。

(回答) 膜性骨化と内軟骨性骨化の両者が抑制され骨ができず、軟骨細胞の成熟障害もみられ、軟骨への血管侵入も全く起こらない。外観上は dwarfism と下肢の短縮を認める。

質問 18) Fig.6 のデータで GW 添加による軟骨細胞の成熟の促進はセラミドを加えても完全にキャンセルされていない。このことから、セラミドを介さない Smpd3 の作用があるのではないか。

(回答) 現時点では不明である。

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同等あるいはそれ以上の学力・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。