

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第370号		学位申請者	今村 勝行
審査委員	主査	原 博 満	学 位	博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	古川 龍彦	副査	堀内 正久
	副査	武田 泰生	副査	橋口 照人

主査および副査の5名は、平成28年3月14日、学位申請者 今村 勝行 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) Hivp3 の足場蛋白としての働きは何があるか。

回答) 骨格系細胞のシグナルにおいては TRAF6 と結合し RANK signaling を調節すること、また C-JUN と結合し AP-1 を活性化して破骨細胞分化を調節することが知られている。その他にも様々な signaling において足場蛋白として機能することが報告されている。

質問 2) Hivp3 は核内で働くのか。

回答) 核内だけでなく細胞質内でも働く。

質問 3) BMP-2 の下流因子は骨芽細胞にどのように働くか。

回答) BMP-2 は骨芽細胞分化においては一定して正の方向に導く。

質問 4) Alg2 は Runx2 を糖化するのか。

回答) その点については不明である。

質問 5) Alg2 が Runx2 の転写を抑制し癌化促進や逆に発癌抑制するという報告はあるか。

回答) Alg2 はユビキタスに発現するが発癌に関与するという報告はない。

質問 6) ST-2 に BMP2 を添加し Alg2 をノックダウンすると Ddit3 の発現が亢進しているのはどう考えるか。

回答) 生理的な ER ストレスが Alg2 ノックダウンで誘導されたと考えている。

質問 7) ST-2 において Alg2 をノックダウンして BMP2 を添加し Ddit3 の発現をみた実験について、生理的な範囲内での発現なのか。

回答) メッセンジャーRNA が発現しておりアポトーシスは誘導されておらず生理的な範囲内での ER ストレスであると考えている。

質問 8) ATDC5 に BMP 2 を添加した群では Hivp3 をノックダウンしても非添加群と異なり Ddit3 の発現が亢進しないのはなぜか。

回答) 現時点では不明である。

質問 9) N 型と O 型の糖鎖の違いはなにか。

回答) 一般的には N 型糖鎖には Asn の側鎖の中のアミド窒素原子に高分子の糖鎖が結合し、O 型糖鎖は Ser あるいは Thr 側鎖の酸素原子に低分子の糖鎖が結合する。

質問 10) Tissue distribution における相対評価の分母は何なのか、対照となる遺伝子は何だったのか。

回答) 発現量が最も低い組織の発現量を 1 として評価した。Hppt1 を対照遺伝子とした。

質問 11) 使用細胞の分化度が異なるというのは何を基準としたのか。

回答) これまでの報告によって判断している。

質問 12) 発現量の+ ~++の尺度は何なのか、ウェスタンプロットにおける蛋白量を確認したのか。

回答) 蛋白量は確認していない。トランスフェクトするプラスミドの量を示した。

質問 13) アルシアンブルー染色で spot が中心に寄っているのはなぜか。

回答) 遠心をかけて細胞密度を高くして染色性が高まるように中心に細胞を集めた。

質問 14) 軟骨細胞の実験において ER ストレスが変動しているが、実際の糖鎖の異常な蛋白を観察しているのか。

回答) 本研究では観察していない。

質問 15) 添加する BMP-2 の濃度の基準はどのようにして決定したのか。

回答) 100ng/ml~300ng/ml の濃度が分化誘導に使用されている。

質問 16) BMP-2 の下流遺伝子の Id1 は p53 を抑制するが、実験での実際の細胞増殖に関してはどのような印象をもったか。

回答) BMP-2 は細胞増殖も促進しているという印象をもったが、それが p53 の抑制によるものかどうかは不明である。

質問 17) ST-2 において HIVEP3 を過剰発現させた実験で Runx2 発現が低下しているのはなぜか。

回答) Runx2 の自己誘導能によるものと考えている。

最終試験の結果の要旨

質問 18) 研究課程のどの時点で *Alg2* 変異を有する症例の存在を知ったのか。

回答) *Hivep3* ノックダウンによるマイクロアレイ解析の結果で *Alg2* をターゲットにするという方針が決まった時、すなわち研究の早期の段階である。

質問 19) 今回の研究結果と *Alg2* 変異を有する症例の phenotype を照らし合わせてどのように考えたか。

回答) *Alg2* の発現は tissue distribution においてユビキタスに発現しており、多臓器で多彩な症状を示す *Alg2* 変異を有する症例の特徴に矛盾しないと考えた。しかしながら *Alg2* 変異を有する症例では骨病変が観察されていないが、本症例は乳幼児であり、今後、骨にも phenotype がでてくるのではないかと推測している。

質問 20) *Runx2* 以外にもユビキチン化や核移行阻害など複数のメカニズムで発現が制御されている蛋白は他にもあるか。

回答) その点については今回調べていない。

質問 21) ST-2 における *Alg2* のノックダウン実験において *Runx2* の転写活性を抑制する co-repressor *Hey1* の発現が亢進、少なくとも減少しておらず、co-activator である *Hes1* も不変であったが、これはどのように解釈されるのか。

回答) 期待とは逆の現象がおこっているが、*Alg2* のノックダウンでは全体として *Runx2* の転写活性が低下するのは明らかであり一現象にすぎないと考えている。

質問 22) *Hivep3* による生理的 ER ストレスが軟骨細胞分化を促進する理由について再度説明してください。

回答) ATDC5 において軟骨細胞特異的 ER ストレスの経路である BbF2H7-Sec23a pathway において BMP 添加、非添加両方の系において *Bbf2h7* の発現がノックダウンで低下、過剰発現で亢進し、下流の *Sec23a* も *Hivep3* ノックダウンで発現が低下したため、*Hivep3* は軟骨細胞分化過程の ER ストレスを増強し分化を促進すると考えた。

質問 23) *Hivep1*・2・3 間で骨芽細胞分化に与える影響には相互作用はないと述べているがその根拠は何か。

回答) *siHivep3* では骨芽細胞分化が亢進し、ALP 活性や mRNA レベルが亢進するのに対し、*siHivep1* と *siHivep2* では骨芽細胞分化に抑制的に働き、早期分化過程において *Hivep3* とは相反する機能を持つことは示せたが、ダブルノックダウンやトリプルノックダウンにても相加的な効果はなく協調効果はないと考えた。

質問 24) *Hivep* family に相同性はないのか。

回答) *Hivep* family は 3 つの isoform をもち、3 つとも C2H2 型 zinc-finger 配列がペアをなす ZAS ドメインといわれるドメインを N 末と C 末の 2 か所にもつという特徴を持っている。

質問 25) *Runx1* と *Runx3* についての検討は行っているか。

回答) 行っていない。

質問 26) *Alg2* は *Runx2* と単なる蛋白同士の結合であって *Alg2* のもつ酵素活性は関与していないのか。

回答) 酵素活性は関与していないと考えている。

質問 27) 糖化の活性が骨化を調節する点は明確にいわれていることか。

回答) 糖鎖と骨化の関係を報告したのは我々が初めてである。

質問 28) *Alg2* は *Runx2* を糖化していないのか。

回答) 糖化していないと考えている。

質問 29) *Alg2* と *Hivep3* はパラレルに発現しているか。

回答) *Alg2* はユビキタスに発現しているが、*Hivep3* は間葉系細胞に多く発現している。

質問 30) *Hivep3* は分化のどの過程でどの程度 *Runx2* を制御しているのか。

回答) 現時点では不明である。

質問 31) *Hivep2/3* ノックアウトマウスの phenotype と今回の in vitro での *Hivep2/3* のノックダウンで得られた結果が合わないのはどう考えるか。

回答) in vivo での現象であって、骨芽細胞の細胞株の実験だけでは説明がつかないと考える。

質問 32) 本研究を始めるきっかけとなった *Runx2* のトランスジェニックマウスの phenotype と *Hivep3* のノックアウトマウスの phenotype の違いを今回の結果を踏まえてどのように説明するか。

回答) *Hivep3* ノックアウトマウスでおきた骨量が著明に増加する phenotype は *Runx2* 蛋白の蓄積によるものだけではなく、その後に報告された破骨細胞分化や Wnt signal への関与など、一つの理由だけではなくあらゆる要素から起こった phenotype と考える。

質問 33) 今回の研究のどのデータで *Hivep3* のノックアウトマウスでおきた現象が説明できるようになったのか。

回答) 我々は *Hivep3* の下流にある *Alg2* が *Runx2* の転写活性を抑制することを見出したが、それだけでは全てを説明できないと考える。

質問 34) 軟骨細胞分化の後期で *Hivep3* は *Runx2* を調節しているか。

回答) *Hivep3* の軟骨細胞におけるメカニズムは全く不明である。

質問 35) 糖鎖が大量に結合した方が ER ストレスが働くのか、それともその逆か。

回答) 適切に糖鎖が結合するのが最も良いと考えるが、現時点では明確にはされていない。

質問 36) *Bbf2h7* は軟骨細胞での蛋白合成が盛んになったり不良たんぱく質が蓄積したときに発現が増加する蛋白であり、骨芽細胞では発現していない蛋白と考えるとよいか。

回答) *Bbf2h7* は軟骨細胞・脾臓・肺・精巣・神経細胞で発現し、骨芽細胞では発現していないと報告されている。

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。