

最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第 23 号	学位申請者	嶋田 博文
審査委員	主査	谷本 昭英	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	古川 龍彦	副査 堀内 正久
	副査	石塚 賢治	副査 岸田 昭世

主査および副査の5名は、平成28年5月23日、学位申請者 嶋田 博文 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) C/EBP β は実際に何の基質になるのか。

(回答) p38の基質になる。

質問2) p38阻害剤のリン酸化阻害によってルシフェラーゼ活性が減少するか。今回の実験でその点を確認したか。

(回答) 先行研究(J. Biol. Chem. 2010 Tsuchimochi K, et.al.)にて、ATDC5細胞を用いたCol10a1 promoterのレポーターアッセイを施行し、p38の脱リン酸化酵素を加えるとCol10a1遺伝子の転写活性が抑制したことを報告している。今回は確かめていない。

質問3) Fig.3で関節中心部(TA)と関節辺縁部(TP)の違いは何か。

(回答) OAにおける内軟骨性骨化は、通常関節中心部よりも関節辺縁部で生じる。関節辺縁部は滑膜や靭帯に接して血管の侵入が可能である一方、関節中央部では血管侵入がない無血管部位であるため、骨化することなく軟骨の変性・破壊のみだけで終わってしまう。そのために、TAとTPに分け検討した。

質問4) OAでは軟骨は増殖刺激を受けるか、それとも細胞死となるか。

(回答) どちらもありえる。OA軟骨では、正常軟骨よりもアポトーシスを起こしている軟骨細胞が有意に増加しており、軟骨細胞数の減少が病態の進行に関連している。一方関節辺縁部では、OAになるとCol2a1やアグリカンを発現する静止軟骨細胞の分化が異常亢進し、成熟・肥大化しCol10a1を発現、軟骨基質も石灰化を伴い、内軟骨性骨化が進行する。その結果、骨棘が形成される。

質問5) 関節軟骨細胞は老化でどのように変化するとされているか。また、この老化促進マウス(SAM)ではどうだったか。

(回答) 軟骨細胞の老化に関して、複製老化に必要なテロメアが短縮していると報告されている。さらにストレス性細胞老化に関しては、軟骨細胞の基質産生の低下、液性因子の反応性の低下、細胞死の誘導、という報告もある。SAMは今回の研究では著明なOA変化は認めなかった。

質問6) コントロールにICRMを使用した理由は何か。

(回答) もともと先行研究において、この2系統を使用していたことによる。本来ならば、ご指摘の通りSAM Resistant(SAMR)を使うのがいいと考えている。

質問7) SAM Prone 1の老化の原因遺伝子は何か。

(回答) 老化症状に遺伝的背景が関与していることは確かであり、老化促進の機構解明のための研究が多方面から精力的に行われている。しかしまだ十分には解明されていない。

質問8) Fig.3の解析で有意差がないのは何故か。また統計処理はt検定か。Fig.5の統計処理はしたか。

(回答) Fig.3は有意差を認め、記号(*)の付け忘れである。統計処理はt検定である。Fig.5の統計処理はしていない。

最終試験の結果の要旨

質問 9) SAM は老化モデルであって OA モデルではないが、OA であればどのような軟骨状態となるか。

(回答) 軟骨基質の変性、軟骨周囲の炎症、毛羽立ち、骨棘形成、軟骨下骨の増生を認める状態となる。

質問 10) Fig.2 でトルイジンブルーの異染性の低下と β -galactosidase はどちらが先行しているか。

(回答) 時間を追って詳しく染色していないが、荷重ストレスなどから考えると、トルイジンブルーの異染性の低下が先行していると考えられる。

質問 11) GADD45 β の核への移行だが、どのようなメカニズムで移行するのか。

(回答) 今のところ、わかっていない。

質問 12) Senescence-associated secretory phenotype で老化に陥った細胞は豊富にサイトカインを出していると言われていたが、サイトカインの分泌について検討したか。

(回答) 今回はそのような実験は行っていない。しかし、軟骨細胞は老化とともに成長因子やサイトカインに対する反応が変化する。報告によると、高齢者の軟骨細胞は IL-1 を多く産生し、この刺激により若年者の軟骨細胞と比べ多くの MMP を産生している。

質問 13) Fig.2 でトルイジンブルーの異染性というのは青さの違いか。マウスの系も違うのもっと若いマウスとの違いを示すべきと考える。

(回答) 異染性とは細胞や組織を染色した際、染色された組織や細胞が色素本来の色とは異なる色に染まる現象を指す。関節軟骨は軟骨細胞とプロテオグリカン(PG)などの酸性粘液多糖類から成るが、酸性粘液多糖類が塩基性タール色素であるトルイジンブルーに反応し赤紫色に染色される。よって青さの違いではなく、加齢が進行するとトルイジンブルーに反応する PG の分解が進行するので軟骨基質の染色性が徐々に落ちる違いが生じる。若いマウスも Fig に出すべきであった。

質問 14) Fig.4 の E と J で核の中の抜けている部分は核か、それとも他の部位か。

(回答) Fig.4 は HE 染色施行し、核と細胞質との違いを比較検討して、核と判断した。

質問 15) 早期 OA と加齢軟骨はどのような関係か。

(回答) 加齢軟骨は早期 OA に至る一つの機序であると考えられる。

質問 16) Fig.2 の異染性を示さなくなることは何を意味するか。またトルイジンブルー染色の pH はいくらか。

(回答) 加齢が進行するとトルイジンブルーに反応する PG の分解が進行するので染色性が落ちる。異染性を示さなくなることは PG やコンドロイチン硫酸などの軟骨基質の減少を示し、加齢変化が進行していると考えられる。TB 染色液の pH は 7 で行った。

質問 17) Fig.5 の ATDC はどういう origin の細胞か。

(回答) ATDC5 はマウス teratocarcinoma 細胞 AT805 由来の亜株で、軟骨細胞や色素細胞への分化能を有している。本細胞株は理研から購入した。

質問 18) p21 の promoter assay でもとになる luciferase vector はどこのメーカーの何を使用したか。

(回答) Promega 社の pGL3 を使用した。

質問 19) Normalize はどのようにしたか。

(回答) Normalize は pRL-TK Renilla を用いた。

質問 20) P21 の 2.5kb の promoter にはどんな major motif が入っているか。

(回答) CAAT ボックスや TATA ボックス、C/EBP 結合領域が入っている。

質問 21) C/EBP β と GADD45 β の expression vector の promoter は何か。

(回答) C/EBP β と GADD45 β の expression vector の promoter は CMV 由来である。

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。