

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 582 号	学位申請者	高 裕子	
審査委員	主査	中村 典史	学位	博士 (歯学)
	副査	橋口 照人	副査	齋藤 充
	副査	犬童 寛子	副査	星加 知宏
<p>主査および副査の5名は、令和2年12月25日、学位申請者 高 裕子君に面接し、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) がん細胞を使用した実験なので、タイトルに in cancer cells という記載がある方が良いと考えるが、そうしなかった理由はあるか。</p> <p>(回答) ミトコンドリア機能障害、<math>H_2O_2</math>、アクアポリン (AQP) というキーワードとミトコンドリア機能低下によるフェロトーシス誘導を強調することを優先した。また申請者らは神経細胞等、がん細胞に限らずミトコンドリア機能低下がフェロトーシス誘導する可能性を考えている。しかしながら指摘の通り、がん細胞をタイトルに記載するとよりの確であったと考える。</p> <p>質問2) <math>p^0</math> 細胞はどのように作製するのか。</p> <p>(回答) 核 DNA 合成は阻害されないが、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 合成は阻害される比較的低濃度 (50 ng/ml) のエチジウムブロマイド処理を1ヶ月以上行うことにより mtDNA のみが欠失した <math>p^0</math> 細胞が作製できる。</p> <p>質問3) ミトコンドリアを移植した細胞 (Mito 細胞) の培養にはビルビン酸とウリジンを追加しているのか。</p> <p>(回答) <math>p^0</math> 細胞では mtDNA が欠失しており、ビルビン酸、ウリジンが必要であるが、正常細胞のミトコンドリアが移植された Mito 細胞を培養するためにはビルビン酸とウリジンは不要であるため、添加していない。</p> <p>質問4) 鉄キレート薬を3種類使用しているが、どのような理由で選択したのか。</p> <p>(回答) デフェロキサミンは長らく臨床で用いられているため最初に検討した。デフェロキサミンは、半減期が5-10分と短いこと、注射で投与する必要があること、血液中の鉄とは反応するものの、細胞内の鉄と反応しないことの報告があるため、経口投与が可能で、半減期が10-20時間程度と比較的長いデフェロシロクスについても検討した。また、フェナントロリンは、前2者とは異なり、脂溶性で膜透過性が高いことから効果を比較検討した。</p> <p>質問5) 3種類の鉄キレート薬による処理のタイミングはどうなっているか。また、培養上清の鉄の濃度は測ったのか。</p> <p>(回答) 鉄キレート薬 20 <math>\mu M</math> で30分処理した後に <math>H_2O_2</math> 処理を1時間行った。細胞生存率は、<math>H_2O_2</math> 処理後48時間後に測定した。鉄キレート薬で処理した時の培養上清の鉄の濃度は今回測定していないが、予備実験として、文献を基に鉄キレート薬濃度を数種類 (10-100 <math>\mu M</math>) 準備して、<math>H_2O_2</math> 処理後の細胞生存率を検討し、そこから20 <math>\mu M</math> での処理を決定した。</p> <p>質問6) <math>p^0</math> 細胞で細胞質およびミトコンドリア内の <math>Fe^{2+}</math> の濃度が高い理由をどう考えるか。</p> <p>(回答) データは示していないが、<math>p^0</math> 細胞でフェリチンの発現が抑制されていることが判っており、そのために細胞質の <math>Fe^{2+}</math> 濃度が上昇していると推察される。また、ミトコンドリア機能障害によりヘム及び鉄-硫黄クラスターが影響を受け、十分な鉄を保持することが出来ず、ミトコンドリア内の <math>Fe^{2+}</math> 濃度が上昇したと考えている。</p> <p>質問7) フェロトーシスを生じた細胞はどのような形態的変化を示すのか。</p> <p>(回答) 細胞体積の減少やミトコンドリア膜密度の増加などが報告されているが、正常細胞との違いはわずかとされている。申請者らの観察でも明確な変化は認められなかった。</p> <p>質問8) <math>p^0</math> 細胞において Caspase 8, 9 の発現が下がっていることをどう考えるか。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

(回答) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理により細胞障害が惹起されたため、細胞損傷を修復するための遺伝子の発現が亢進するとともに、Caspase 遺伝子発現が低下したのではないかと考えている。

質問 9) p<sup>0</sup> 細胞において Nrf2-Keap1 システムが亢進せず Nrf2 の遺伝子発現が下がっているが、正常細胞で実験を行った場合は異なる結果が得られるのではないかと、p<sup>0</sup> 細胞で発現が下がっているのはがん細胞を用いているからではないのか。

(回答) 一般的には、細胞の酸化ストレス応答として Nrf2-Keap1 システムを介した GPx4 発現亢進が起きることが報告されているが、p<sup>0</sup> 細胞においてはそれが起きないため、酸化脂質の除去システムが働いていないと考えた。指摘の通り正常細胞で検討を行うと、発現が上昇するのではないかと予想する。

質問 10) p<sup>0</sup> 細胞に正常細胞由来のミトコンドリアが移植されているが、どの程度の量を入れれば機能が正常化するのか。

(回答) 本研究では、WI-38 ヒト線維芽細胞から 3×10<sup>7</sup> 個の細胞を回収し、そこからミトコンドリアを単離した。そして、5 μg/ml の単離ミトコンドリア存在下で p<sup>0</sup> 細胞を培養した。機能が正常化するために必要な移植量については判っていないが、mtDNA コピー数を調べた結果、HeLa の Mito 細胞では親株の 1/10、SAS の Mito 細胞では 1/5 程度であった。樹立した Mito 細胞は増殖が非常に遅いため、この mtDNA 量では、ミトコンドリア機能の正常化に至っていないと考えられる。

質問 11) SAS の免疫染色の結果において、Mito 細胞の PHB2 発現が親株より多いことはどう考えるか。

(回答) 正常細胞のミトコンドリアを移植した Mito 細胞では、ミトコンドリア機能が SAS の親株よりも改善され、PHB2 の発現が高まったのではないかと考えられる。

質問 12) PHB2 は常染色体にコードされているが、なぜ p<sup>0</sup> 細胞で発現に変化が起きるのか。

(回答) 詳細なメカニズムは不明であるが、mtDNA が核 DNA の遺伝子発現に影響を与えることが知られている。本研究で使用した p<sup>0</sup> 細胞とは異なるが、骨肉腫由来の細胞株 I43B とその p<sup>0</sup> 細胞での遺伝子発現を DNA アレイと定量 PCR で解析した結果、ミトコンドリア関連遺伝子のみならず分子シャペロンをはじめとした多くの核コード遺伝子発現に影響を受けることが報告されている。ミトコンドリアが障害を受けることにより何らかのシグナルが核に伝わって遺伝子転写調節が行われていると考えられ、PHB2 の遺伝子発現もその影響を受けたと推察される。

質問 13) AQP 発現量を亢進する薬物としてバソプレシン (AVP) が挙げられているが、その理由は何か。

(回答) 抗利尿ホルモンである AVP は、血漿浸透圧の上昇や、血液量の減少によって脳下垂体後葉からの分泌が促進される。AVP は腎集合管上皮細胞の細胞膜にある V<sub>2</sub> 受容体に結合する。V<sub>2</sub> 受容体は、アデニル酸シクラーゼ-cAMP 系を介し AQP2 を管腔側細胞膜へ移動させることが知られている。そのため、AQP の他のサブタイプに対しても発現を亢進する作用があるのではないかと考えた。

質問 14) アポトーシスという概念は基本的に、核を有する細胞で検討されてきたが、無核である血小板や赤血球においてフェロトーシスをはじめとした細胞死を取り扱った先行研究はあったか。

(回答) がん細胞を含む有核細胞に関する文献を渉猟しており、血小板や赤血球の細胞死については調査しなかった。今後検討したい。

質問 15) 今回の研究で最も新規性の高い知見は何か。

(回答) p<sup>0</sup> 細胞において、ミトコンドリア内の PHB2 減少によるミトコンドリア機能低下が AQP 発現を促進し、それによってフェロトーシスが誘導されることであると考えている。

質問 16) 保存科の教員として本研究内容を、今後どのように活かしていこうと考えているのか。

(回答) 大学院で学んだ分子生物学実験の考え方や知識、技術を活かし、今後は歯科保存学領域での各種ストレスに関する細胞応答を解析し、そこから得られた知見を診断法・治療法の開発へ繋げられるようにしたい。

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(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。