

最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第 667 号		学位申請者	八尋 雄平
審 査 委 員	主 査	古川 龍彦	学 位	博士 (医学)
	副 査	谷本 昭英	副 査	橋口 照人
	副 査	宮田 篤郎	副 査	柴田 昌宏

主査および副査の5名は、令和3年3月22日、学位申請者 八尋雄平君に面接し、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) 成獣は8週齢までしか報告していないが、それ以降はどのような変化をたどるのか。

(回答) 自然発症骨粗鬆症への影響を観察するために12ヶ月齢まで観察した。しかしKOで骨量減少の傾向はあったが、個体差が大きく有意差はなかった。

質問2) 先行論文での表現型の違いはどうして起こったのか。

(回答) KOの際にどのexonを欠損させるかによって表現型が異なると考えるが、詳細は不明である。

質問3) 出生時の骨格標本について評価しているが、その他の臓器については表現型における違いはあったのか。

(回答) 骨格標本作成の時点で内臓は除去しているため骨格についてのみ評価した。しかし我々のKOマウスは成獣まで成長し、生殖能力も保たれているため、その他の臓器にcriticalな異常はないものとする。

質問4) Runx2、Atoh8は細胞内のどこで作用しているのか。

(回答) 両者とも転写因子であるため核内で作用していると考えられるが、内因性のAtoh8を検出できる抗体がないためAtoh8の細胞内局在は確認できなかった。

質問5) BMPの種類とその受容体について述べよ。

(回答) 哺乳類のBMP受容体としてALK-1 (ACVRL1), ALK-2 (ACVR1), ALK-3 (BMPR-1A)とALK-6 (BMPR-II)の4種類のI型受容体と、BMPR-II、ActR-IIとActR-II Bの3種類のII型受容体が存在。ALK-3/6のリガンドとしてBMP-2とBMP-4が、ALK-2のリガンドとしてBMP-6とBMP-7が、BMP-9はALK-1に結合し、下流のSmad1/5にシグナル伝達を行う。

質問6) マイクロアレイはBMP-2での刺激を行い、以降の実験はBMP-6を使用していたのはなぜか。

(回答) BMP-2が代表的な骨芽細胞分化誘導能のあるBMPでありスクリーニングには用いた。本研究はadultの骨リモデリングに関する研究であり、このフェーズにおいては破骨細胞がBMP-6を分泌して骨芽細胞分化と骨形成を促進すること、またmesenchymal stem cell (MSC)に対してBMP-6は骨形成誘導能が強いことが報告されているので、BMP-6を用いた。BMP-6でもAtoh8が直接標的遺伝子であることを、Smad1抗体を用いたChIPやルシフェラーゼアッセイで確認した。

質問7) primary osteoblastの分離はどのようにして行ったのか。

(回答) 出生後4日のマウス頭蓋骨から頭蓋冠のみを採取し、0.1% collagenase+0.2% dispase+ α -MEM培地に頭蓋冠を入れshakeして上澄みを採取して、これを複数回繰り返してprimary osteoblastを単離した。

質問8) Runx2、Atoh8との結合を評価するために細胞株としてCOS7を使用した理由は何か。

(回答) まずプラスミド導入効率が良いこと、そして細胞を純粋な*in vitro*系として捉えており、tagでIPとblotを行ったので、内因性にRunx2を発現していない*in vitro*実験に広く一般に使われるアフリカミドリザル腎臓から単

最終試験の結果の要旨

離された細胞株である COS-7 が適していると考えた。

質問 9) BMP の直接標的遺伝子を検索するためのマイクロアレイで刺激後 48 時間後に行った理由はなにか。

(回答) 幼弱な骨芽細胞に対する BMP の役割が不明で、これを解明するのが本研究の主旨である。幼弱 (成熟していないが骨芽細胞には commit している状態) な骨芽細胞分化を誘導できる 48 時間というフェーズを選択した。

質問 10) ほかの論文では Atoh8 はどのような働きをしていると報告されているのか。

(回答) 胎生期の体幹筋肉に発現しており、筋分化に影響しているのではないかと報告されている。また骨格関連としては、軟骨に特異的にノックアウトすると軟骨の増殖低下と若干の骨成長遅延が報告されている。

質問 11) 今回の KO マウスでは軟骨で差を認めたのか。

(回答) KO マウスの骨格が少し小さいことから、報告のある軟骨障害があるのではないかと考えられる。

質問 12) 胎仔の肉眼の所見はなかったか。

(回答) 肉眼的に差があるのは KO での鎖骨遠位の骨形成遅延である。頭蓋骨の泉門の開大も観られたが、骨格標本の不安定性もあり定量的に示すのが困難で、論文に掲載しなかった。これは Runx2 ヘテロ KO マウスの表現型に似ており、Atoh8 KO は Runx2 過剰発現状態を mimic していると考えられるため、発生期において Runx2 の軽度の機能障害が生じている可能性も考えられる。その他の骨格にははっきりとした違いはなかった。

質問 13) Runx2 が過剰になるとどうなるのか。

(回答) Runx2 は骨形成を促進させるが、骨芽細胞とその後の骨細胞は Rankl の発現を通して破骨細胞分化を促進する。Runx2 のトランスジェニックマウスでは、骨形成より骨吸収の方が進行するため骨量は減少し、病的骨折を来することが報告されている。我々の Atoh8KO マウスと Runx2 トランスジェニックマウスは骨量減少という表現型が似ており、*in vitro* の結果と併せると、Atoh8 KO は Runx2 過剰発現状態を mimic していると考えられる。

質問 14) HUVEC 細胞での ChIP の結果を載せているが、血管内皮細胞での Atoh8 の役割はどうなっているのか。

(回答) 共同研究を行った東京大学分子病理学分野では、Atoh8 KO マウスでの肺高血圧症について研究し、肺動脈圧上昇と右心室肥大を来す。Atoh8 は低酸素反応を減弱させ肺動脈性高血圧症の発症を予防することが報告されている。

質問 15) 破骨細胞分化の評価として破骨細胞数を計測しているが、妥当な評価なのか。

(回答) TRAP 陽性の 3 核以上を有する多核細胞を破骨細胞と定義し、*in vitro* 分化誘導実験ではその数を計測するのが一般的である。同時に Ctsk や Trap などのマーカーの RT-qPCR も行なっており妥当と考える。

質問 16) 骨分化について評価するのであれば骨特異的に KO した方がよいのではないか。

(回答) global KO を使用したが、理想的には骨特異的な Col1a1 や Osx のプロモーターによって drive される Cre による conditional KO を使用の方が望ましい。しかし、筋肉から出る骨芽細胞分化制御能が報告されている myokine の RT-qPCR もしたが、KO で差はなく、他の臓器にも目立った障害はないことから、骨への間接的な影響は大きくはないと考えている。

質問 17) primary osteoblast の mock だと KO の方が Rankl/Opg 比が高いが、BMP 刺激群では逆なのはなぜか。

(回答) mock は幼弱骨芽細胞状態だが、BMP 刺激群は強力に成熟して骨細胞まで分化がしたことが考えられる。

質問 18) Atoh8 蛋白の確認の際に MG132 を使用しているのはなぜか。

(回答) 内因性の Atoh8 蛋白はを検出可能な抗体が無いということと、ユビキチン・プロテアソーム系分解による半減期 30 分という high-turnover が起こっていると考えられる。過剰発現させ、かつプロテアソーム阻害剤 MG132 を加え、ようやく Runx2 との結合が確認できた。

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。