

学力確認の結果の要旨

報告番号	総論第 41 号	学位申請者	北菌 育美
審査委員	主査	岸田 昭世	学位
	副査	古川 龍彦	副査
	副査	大塚 隆生	副査
			博士 (医学)
			家入 里志
			岡本 康裕

主査および副査の5名は、令和3年6月28日、学位申請者 北菌 育美 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) Fig. 1C のプルキンエ細胞の由来はラット、ヒトどちらか。

(回答) ラットである。

質問2) Fig. 6B の figure legend は、AtRA 投与の有無で発現が変わらない、という意味になるように思われるが、言葉が不足していないか。

(回答) SH-SY5Y では PCP4/PEP19 過剰発現による Ascl1, NeuroD1 の mRNA 発現量には有意な変化が見られなかったことを示している。AtRA 投与では Ascl1, NeuroD1 いずれも mRNA 発現量は有意に減少していた。

質問3) M17 と SH-SY5Y にはどのような違いがあるか (細胞の分化度、PCP4/PEP19 の作用機序、SH-SY5Y では PCP4/PEP19 が核へ以降せず作用していないのか)。

(回答) どちらも未分化な神経芽腫培養細胞である。PCP4/PEP19 の作用機序および核への移行があるかどうかなどは未だ分かっていない。M17 では PCP4 発現がみられるのに対し、SH-SY5Y では発現がほとんどみられない。

質問4) M17, SH-SY5Y の2つの培養細胞で NeuroD1 発現量の違いはあるか。

(回答) RT-qPCR のデータにおいて、NeuroD1 の mRNA 量に明確な差はみられない。

質問5) PCP4/PEP19 の発現は神経細胞の分化誘導をしない、未分化なまま成熟させない、という理解でよいか。

(回答) PCP4/PEP19 knockdown (KD) で神経突起の延長が認められることから、そう考えられる。

質問6) M17 培養細胞は MYCN 変異と関連するか。

(回答) 関連は見出せなかった。

質問7) 臨床検体を用いた PCP4/PEP19 発現について、組織型との関連、核・細胞質の局在との関連はあるか。

(回答) 組織型による発現差、局在差は見出せなかった。発現がなかった症例は全て Neuroblastoma, poorly differentiated であった。症例数が少ないことから統計学的検討は行っていない。

質問8) 臨床検体を用いた検討について、PCP4/PEP19 発現の有無と予後との関連はあったか。

(回答) 症例数が少なく、統計学的な関連性は見出せなかったが、死亡症例 (4 症例) は、核の PCP4/PEP19 発現はない (2 症例) か、腫瘍細胞の 10% 以下 (1% : 1, 10% : 1) と少ないものが多い傾向は見られ、PCP4/PEP19 発現の少なさが、予後や治療反応性に関連している可能性は、否定できないと考えられる。

質問9) PCP4/PEP19 をターゲットとした治療方法として具体的にどのような方法があると考えているか。

(回答) PCP4/PEP19 の機能については不明な点が多く、具体的な方法は見出せていないが、レチノイン酸誘導体ベ

学力確認の結果の要旨

サノイドのような分化誘導療法の適用が考えられる。

質問 1 0) PCP4/PEP19 は神経突起の延長を抑制する作用以外に、神経芽腫培養細胞の遊走能と関係があるか。

(回答) 乳癌培養細胞では遊走能との関連があったが、神経芽腫細胞では遊走能との関係は検討していない。

質問 1 1) PCP4/PEP19 について、転写関連因子か、どのような蛋白質と結合しているか、ダイマー形成しているか。

(回答) PCP4/PEP19 は Calmodulin (CaM) 結合ドメイン (IQ モチーフ) があり、CaM とカルシウムの結合を調整し、CaM 結合タンパク質の機能制御を行っている。今回の研究では、転写制御について詳細な検討を行っていないため、CaM (カルシウム) シグナルによるものが、PCP4/PEP19 自体が転写因子として働くのか、詳細は不明である。PCP4/PEP19 は不定形タンパク質でありダイマーを形成する可能性は低い、詳細は不明である。

質問 1 2) PCP4/PEP19 と Ascl1 が相互抑制的であるという状況を想定しがたい。PCP4/PEP19 と Ascl1 で siRNA が共通して作用しているということはないか。

(回答) その可能性を否定はできないが、関連した実験はしておらず、不明である。

質問 1 3) Fig. 8 のシエーマについて、PCP4/PEP19 による転写活性調節は直接的か間接的か、どちらと考えているか。

(回答) 質問 1 1 の回答にもあるように、カルシウムシグナルを経由した間接的なものなのか、PCP4/PEP19 自体が転写因子として働くのか、詳細は今後の検討課題である。

質問 1 4) Fig. 4 で神経突起は伸びるが、突起の数や突起をもつ神経細胞の数が変わらないということはどのように説明するか。

(回答) Fig. 4 B では、PCP4/PEP19 ノックダウン群はコントロール群に比較し、AtRA 投与あり/なしに関わらず、神経突起が有意に長かった。一方、C, D の 1 細胞当たりの突起数、突起を有する細胞の割合は、PCP4/PEP19 ノックダウン群は有意な増加はなく、siRNA による PCP4/PEP19 ノックダウンで、細胞にもともと存在する突起の原基から突起を延長させる作用があると考えられるが、突起数を増やす作用は乏しいと考えた。

質問 1 5) PCP4/PEP19 knockout マウスは神経系に異常があると報告されているが、PCP4/PEP19 を治療のターゲットとした場合、神経障害を起こすことはあるか。出来上がった神経には悪影響を与えない、といった報告はあるか。

(回答) PCP4/PEP19 のレベルが低下すると、カルモジュリンを介した細胞内経路を制御する能力が低下し、神経死が起こりやすくなることが報告されている。成熟した神経細胞には影響しないという報告は見つけられない。

質問 1 6) Ascl1 とは何か。

(回答) Ascl1 (Achaete-scute homolog 1, MASH1) は塩基性 helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子である。神経細胞分化のマスター因子であり、Neural stem cell から intermediate progenitor cells への分化や neural stem cell の増殖・維持に関与していると報告されている。

質問 1 7) PCP4/PEP19 は神経細胞の成熟のどの段階から発現していると考えられるか。

(回答) 神経の発生段階で発現していると考えられるが、詳細な時期や発現パターンは未だ不明である。

質問 1 8) NeuroD1 は発現したら突起が伸びるのか、NeuroD1 が過剰発現したら突起が伸びるという報告があるか。

(回答) NeuroD1 は神経突起の伸長をもたらすという報告 (Kamath SG et al. Gene Expr. 2005;12(2):123-36.) があり、PCP4/PEP19 が NeuroD1 発現を介して神経突起の伸長を調節している可能性がある。

質問 1 9) Fig. 1 A は、TF-tagged PCP4 の分子量が 75k と大きい、これは、分子量の大きな trigger factor (TF) のタグ付き蛋白質を使用したためであり、PCP4/PEP19 の分子量は 7.6k であるということが良いか。

(回答) その通りである。

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。