

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 640 号		学位申請者	城光寺 豪
審査委員	主査	奥野 浩行	学位	博士 (医学)
	副査	岸田 昭世	副査	古川 龍彦
	副査	谷本 昭英	副査	田川 義晃

主査および副査の5名は、令和4年1月24日、学位申請者 城光寺 豪 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) 実際に OPLL の組織で骨化は起きているのか。骨化の部分についての検討は行っているのか。

(回答) HE 標本では骨化部には骨細胞があり、典型的な骨組織像が存在しています。今回は初期軟骨細胞分化に関与するという考えで軟骨様に変性している部位に着目して検討しております。

質問2) Immunoblotting で CDC5L 抗体は2本バンドがあるがどう考えているか。

(回答) 細胞質蛋白と核蛋白を分けた Immunoblotting では上のバンドが細胞質、下のバンドが核に存在し、CDC5L ノックダウンで下のバンドのみノックダウン効果があるので、上のバンドは非特異的バンドと考えます。

質問3) CDK1 やサイクリン B1 と CDC5L の関連を調べたか。

(回答) WEE1 は CDK1 をリン酸化する働きがあり、CDC5L のノックダウンで WEE1 の発現が上昇し、この時 CDK1 のリン酸化も増加することを Immunoblotting で確認しました。

質問4) AAV により CDC5L を overexpression した時に増殖を抑制し細胞死が起こるとしているが、なぜアポトーシスが起これば考えたのか。

(回答) WEE1 の inhibitor である MK1775 を用いた実験でアポトーシスが起これば、文献的な報告もあります。WEE1 の抑制と CDC5L 促進が同じ方向であると考え、TUNEL 解析を行い実際にアポトーシスが起こればという結果であった。

質問5) 下流のアポトーシスに至るような経路の変化はあるのか。

(回答) 今回 Akt 回路などの評価を Immunoblotting で行ったが、有意な結果は得られなかった。

質問6) 一般的に増殖と分化は同時には起こればならないのではと考えるが、そこはどのように考えているか。

(回答) 文献報告でも増殖が止まり分化が進むという報告が一般的である。今回、CDC5L ノックダウンでは細胞増殖を抑制し、軟骨細胞分化も抑制した。この機序を考察する際に CDC5L が pre-mRNA splicing に関与するという報告に着目し検討を行った。CDC5L が pre-mRNA splicing を正にも負にも巧妙に調整することで軟骨細胞の増殖と分化を同時に促進するのではと考えている。

質問7) CDC5L が splicing を抑制する遺伝子もあれば促進する遺伝子もあるが、これはどのように考えているか。

(回答) CDC5L をノックダウンしてマイクロアレイを施行した報告があり、その論文でも増加する遺伝子もあれば減少する遺伝子もある。CDC5L とともに働く co-factor の影響で抑制するものもあれば促進するものもあるのかもしれないと考えているが、詳細な検討までは行えていない。

質問8) OPLL で本当に内軟骨性骨化は起きているのか。

(回答) 過去の OPLL の組織学的検討の報告からも、変性靱帯内に軟骨細胞が存在すると報告されており、内軟骨性骨化が起これば部位はあると考えています。OPLL 組織でも内軟骨性骨化マーカーを系統的に評価しております。

質問9) OPLL とマウス軟骨細胞では組織学的構造がだいぶ違うが、同じように考えてよいのか。

(回答) マウス軟骨組織 (上腕骨) は典型的な軟骨評価モデルであり、実際に CDC5L は増殖軟骨細胞に発現していると考えます。OPLL 組織に関してはサンプル数を増やして病理学的評価を行い、OPLL 変性部位の評価を深めることが重要と考えます。

最終試験の結果の要旨

質問 10) マウス長管骨の CDC5L の発現を増減すると成長に影響は出るのか。

(回答) ex Vivo の実験 (マウス中足骨) で LV-ShCdc5l, AAV-CDC5L を使用した実験を行い、成長を抑制するという結果でした。

質問 11) OPLL モデルマウスはないのですか。後縦靭帯に軟骨に変性する細胞が最初から存在するのか。それとも骨髄などを介して生着するのか。

(回答) OPLL のみ発症するモデルマウスは存在しないが、異所性骨化モデルとして ttw マウスは存在し研究されている。OPLL サンプル自体は OPLL を発症した時点の一部分のみをみたサンプルであり、OPLL を発症する人の発症前のサンプルを得ることは難しく変性細胞の存在の証明は困難と考えるので、現段階ではどちらとも言えません。

質問 12) 今回の SNP はゲノムのどこの位置に存在しているか。CDC5L との距離・関係は。

(回答) SNP は第 6 染色体 6p21.1 に存在している。CDC5L と SNP の距離は離れておりプロモーター領域ではないが、蛋白の三次元構造上で近くに存在している可能性や連鎖不均衡の関係から発現を上昇させている可能性はあると考えております。

質問 13) アルシアンブルー染色を行っているが何をみた実験ですか。

(回答) 軟骨細胞の細胞外マトリクスであるプロテオグリカンの局在幅を可視化する実験です。

質問 14) レスキュー実験で siRNA はマウス配列で AAV はヒト配列であるが、発現に影響はないのか。

(回答) AAV で強制発現した CDC5L (ヒト配列) を siRNA (マウス配列) で抑制するかまでは検討できておりません。

質問 15) splicing の評価の実験でこの部位の exon, intron を選んだ理由は。

(回答) 数種類の部位の exon, intron でプライマーを作成して検討し、この部位を選択しました。

質問 16) OPLL の免疫組織化学染色で CDC5L 陽性細胞と SOX9 陽性細胞は同じ細胞ですか。

(回答) 二重蛍光免疫染色まではしておりませんが、実際に見ると同じ細胞です。

質問 17) AAV のプロモーターは何を使っているのか。

(回答) Takara Bio で購入しており CMV promoter です。

質問 18) Overexpression/レスキューの実験で、AAV の量を調節することで作用が変わってくるのか。

(回答) 検討は行えていない。AAV の濃度高い群、低い群、コントロール群での評価をする方法もあったのではと考える。

質問 19) eQTL 解析で CC の homozygotes がなぜ無かったのか。

(回答) n=60 の fibroblasts での解析であり、n が少なく CC が無かったのではないかと考えている。

質問 20) 構造上、転写因子として SNP が結合するモチーフはあるのか。

(回答) 今回の実験では構造的検討は行えておりません。

質問 21) supplemental figure B で CDC5L ノックダウンにより細胞成分分画で核内の割合が増えていないのはなぜか。

(回答) CDC5L ノックダウンにより mature でない産物が細胞質に移動できず核内に増え、核内の割合が増えるのではと検討したが有意差無しという結果でした。

質問 22) Prp19 のように他に CDC5L と複合体として働くものはあるのですか。

(回答) 論文報告として CTNBL1 などが報告されております。

質問 24) RNA splicing と軟骨疾患の関連の報告はありますか。

(回答) 調べた範囲内での文献報告はありません。

質問 25) 細胞周期 G1/S の部分への関与・活性化などはあるのですか。

(回答) 今回は FACS 解析で G2/M の解析は行いましたが、G1/S に関する評価は行えていません。

質問 26) Isoginkgetin での PCR で WEE1 の発現は変化があるのか。

(回答) Isoginkgetin 投与で WEE1 の発現は上昇しています。

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。