

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 648 号	学位申請者	成 昌 奂
審査委員	主 査	西村 正宏	学 位
	副 査	於保 孝彦	副 査
	副 査	笹平 智則	副 査
<p>主査および副査の5名は、令和3年5月18日、学位申請者 成 昌奂君に面接し、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) BMP9により誘導されるHes1は骨分化においてどのような働きをしているのか？ (回答) 本研究では、Hes1のsiRNAによるノックダウンにより後期分化マーカーであるOCNの発現が増加したことから、Hes1のBMP9による初期反応は骨分化に抑制的な働きを示している可能性が示唆される。</p> <p>質問2) 今回の成果を元に、今後の骨再生療法にどのように応用できるか？ (回答) 本研究では、BMP9が他のBMPよりNotchエフェクター分子であるHes1を有意に誘導することから、BMP9によるHes1の機能的役割をさらに解明することで、より有効な骨再生療法の開発に繋がると考えられる。</p> <p>質問3) BMP9の癌細胞における働きに関して何か報告があるか？ (回答) BMP9がPI3K/AKT経路を介して骨肉腫のアポトーシスを誘導することが報告されている反面(Zilan L et al. 2013)、膵臓がんにおいてはBMP9が血管新生を促すことが報告されており(Marie O et al. 2018)、未だ癌の進行に関する働きは完全に解明されていない。</p> <p>質問4) 未分化幹細胞においてBMP9は骨芽細胞以外にどのような細胞に分化を誘導するか？ (回答) BMP9は神経・脂肪・軟骨の分化、糖代謝の調節など多彩な作用を有するが、間葉系幹細胞を骨芽細胞様に分化する能力がBMPファミリーの中で最も優れていると報告されている。</p> <p>質問5) Notchシグナルは隣接細胞間の相互作用によって伝達されるシグナル伝達経路として知られているが、今回の実験では細胞はどのような状態で行ったか？ (回答) Primary osteoblastおよびMC3T3-E1細胞がプレートにコンフルエントに達してから実験を行っているため、BMP9によるNotchシグナルの活性化も考えられる。</p> <p>質問6) 今回の論文ではBMP9により誘導されるHes1はNotch経路を介さないとの結論だが、他のNotchエフェクター分子はどのような報告があるか？ (回答) BMP9がNotchエフェクター分子の一つであるHey1を誘導するが、Smad経路以外にもMAPKの影響も受けることがわかっている。(Kusuyama J et al. 2019)</p> <p>質問7) Hes1のOscillationは、Negative auto feedbackとプロテアソームによる分解で起こると考えていいか？ (回答) 本研究では、プロテアソーム阻害剤としてMG132を用いているが、Hes1タンパク以外のタンパクも分解されなくなるため、Hes1のOscillationが完全に二つの方法で行われているとは言いきれない。</p> <p>質問8) Hesファミリーには1から7まで存在するが、Hes1以外にBMP9による影響を受ける因子はあるか？ (回答) Hes6がHes1の働きを抑制することが報告されており(Jiwon L et al. 2015)、骨芽細胞においてBMP9刺激によりHes6の発現が誘導されていることを確認している。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問9) 今回のような細胞内シグナル研究は、今後臨床にどのように応用すれば良いか？

(回答) BMP9 のシグナル伝達経路の解明および Hes1 の機能的役割を解明することで、BMP9 の生理学的活性をより活かすことができ、成長因子を用いた有効な骨再生療法に繋がる可能性がある。

質問10) 今回は骨芽細胞を用いているが、より未分化な状態で Hes1 の役割を調べる必要性はないか？

(回答) 現在、より未分化細胞であるマウス骨髄間質細胞 (ST2 細胞) を用いて Hes1 の役割を調べている。

質問11) Smad タンパクが GC-rich な領域に結合しやすい理由は何か？

(回答) SMAD の MH1 ドメインは、GGCG, GGCC などの 4 塩基を直接の水素結合で認識し、塩基配列特異的に DNA に結合すると報告されている (Martin-Malpartida et al., 2017)。

質問12) Fig5 で、Hes1 の KD により OCN の発現が上昇することは、骨分化を促進することとして考えていいか？

(回答) 骨分化に関わる転写因子や初期の骨分化マーカーなどさらなる検討を行ったうえで、Hes1 の骨分化に対する機能的意義を定義する必要がある。

質問13) Fig5 で、Hes1 をノックダウンすることで OCN の発現が上がる理由はなぜか？

(回答) Hes1 が OCN の転写調節領域に結合しその発現を抑制することが報告されている。(Ying Z et al. 2009)

質問14) Fig1E で MG132 単独使用においても Hes1 のタンパクの発現が見られるが、刺激がない状態でも Hes1 の発現が誘導されるのはなぜか？

(回答) Hes1 オシレーションは細胞の多様な分化応答性に寄与することから、刺激がない状態でも Hes1 タンパクは発現されると考えられる。

質問15) Fig1C と比較し Fig1B の Hes1 の mRNA 発現レベルが異なるのはなぜか？

(回答) Fig1C は MC3T3-E1 細胞で、Fig1B は Primary osteoblast であり、細胞種によって BMP9 刺激による Hes1 の発現レベルが異なると考えられる。

質問16) Fig1C で周期的な発現パターンが認められるが、この発現は Primary 細胞でも起こるのか？

(回答) Primary osteoblast を用いて BMP9 刺激による Hes1 のオシレーションを確認してはいないが、MC3T3-E1 細胞のように刺激後 1 時間後に有意に発現し、その後 2 時間おきの発現パターンが現れると考えられる。

質問17) BMP9 刺激による Hes1 の発現を調べる際に、1 時間おきに回収し解析を行う理由は何か？

(回答) 胚性幹細胞において Hes1 の発現が 3~5 時間周期で振動しており、分化誘導時に Hes1 の発現が高いと中胚葉系に、低いと神経系に分化しやすかったことが報告されており (Kobayashi T et al. 2009)、本研究においても 1 時間おきに解析を行うことにした。

質問18) Fig1C のような周期的パターンが BMP9 以外に BMP2 でも起こる可能性はあるか？

(回答) 本研究では、BMP2 を用いて Hes1 の周期的パターンを確かめてはいるが、BMP による Hes1 の発現が Smad 経路を介することから、BMP2 も BMP9 同様に Hes1 の周期的パターンが見られると考えられる。

質問19) 今回の実験では主に t 検定を行っているが、数回の実験だけで t 検定を行うことに妥当性はあるか？

(回答) 本研究において、t 検定のようなパラメトリック検定よりは Mann-Whitney の U 検定のようなノンパラメトリック検定を行った方がより適すと考えられ、今後検討したい。

質問20) Fig1F, Fig4C では 3 つ以上の実験系があるにも関わらず、Student t-test を行った理由はあるか？

(回答) Fig1F や Fig4C のような 3 群以上の平均値の有意差を調べる場合は ANOVA を用いた方がより適したと考えられ、今後検討したい。

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。