

## 論文審査の要旨

報告番号	㊦・乙 第 2969 号	氏名	笹 清人
論文審査担当者	主査 教授 桑田 啓貴	副査 教授 美島 健二	副査 教授 高見 正道
(論文審査の要旨)			
<p>学位申請論文「Monocarboxylate transporter-1 promotes osteoblast differentiation via suppression of p53, a negative regulator of osteoblast differentiation」について、上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p>&lt;研究の概要&gt; モノカルボン酸トランスポーター(MCT-1)は細胞膜およびミトコンドリア内膜に存在し、乳酸やピルビン酸、ケトン体などのモノカルボン酸輸送担体として機能している。笹先生は本研究を通してマウス筋芽細胞株および初代培養骨芽細胞を用いて、MCT-1 が骨芽細胞分化に必要な分子であることを見出した。また MCT-1 はガン抑制遺伝子の一つ p53 を介して骨芽細胞の分化制御を行っていることも明らかにすることができた。これらの結果より、MCT-1 は骨芽細胞分化の制御に重要な分子であり、生体における骨代謝制御を標的とする重要な新規標的分子であることを示している。</p> <p>本論文審査における、副査の美島委員と高見委員よりの質問。</p> <p><b>美島委員からの質問とそれらに対する回答（抜粋）：</b></p> <p>質問 1. Mct1 ノックアウトマウスではどのようなことが分っているのか。</p> <p>(解答) Mct1 ノックアウトマウスは胚性致死を引き起こすことも報告されており、生存に重要なトランスポーターであることが示唆されている。Mct1<sup>+/-</sup>マウスは観察された表現型は軽度であり、顕著な形態学的または行動的变化はなく、組織学的解析でも肝、腎、心、脂肪などの組織において明らかな変化は観察されなかった。Mct1<sup>+/-</sup>マウスは高脂肪食を与えた場合の体重増加が抑制され、肝細胞での脂肪分化マーカー遺伝子の発現量が有意に減少した。</p> <p>質問 2. MCT1 は乳酸 transporter として細胞内 pH の変化を誘導しているが、細胞内 pH の変化と骨芽細胞分化の関連はわかっているか。</p> <p>(解答) 細胞内 pH の変化による骨芽細胞分化に及ぼす影響を直接解析した論文はない。しかし、初代培養骨芽細胞の培養系に乳酸塩を添加すると、骨芽細胞分化が促進するという報告がある。そのメカニズムとして、乳酸塩が低酸素誘導因子である HIF-1<math>\alpha</math> を活性化することで骨芽細胞分化を促進したと考えられるが、本研究において Mct1siRNA による HIF1-<math>\alpha</math> のタンパク発現量の有意な変化は認められなかった。</p>			

### 高見委員からの質問とそれらに対する回答（抜粋）：

質問 1. MCT ファミリーの役割を概説せよ。

（解答）MCT ファミリーは乳酸やピルビン酸、ケトン体などのモノカルボン酸を輸送する担体としてクローニングされ、原形質膜に存在している。現在までに 14 種類のサブタイプが同定されており、その中でも MCT1-4 は細胞内外の乳酸をプロトン依存的に輸送することが報告されている。その構造はグルコーストランスポーターなどと同じく 12 回膜貫通型タンパク質であり細胞内 C 末端および N 末端を細胞質内に有し、主に細胞内 pH の調節に関与していると考えられている。

質問 2. C2C12 細胞において MCT1 だけでなく、MCT4 の遺伝子発現も認められるがどのような影響が考えられるか。

（解答）MCT1 はプロトン依存的に細胞内外のモノカルボン酸の流入出に関与しているのに対し、MCT4 は解糖優位な細胞で多く発現していることから主に細胞内のモノカルボン酸を細胞外への流出する働きがあると考えられている。C2C12 細胞では *Mct1* および *Mct4* の両者の発現がみられたため、そのどちらも細胞内で生じた乳酸を細胞外に放出していると考えられる。しかしながら、*Mct1* の発現量に対して、*Mct4* の発現量が有意に少ないこと、また乳酸に対する MCT4 の  $K_m$  値は MCT1 の約 8 倍であることから C2C12 細胞における解糖由来の乳酸放出は MCT1 により大きく依存していると考えられる。以上のように、両副査からの質問に対する回答は満足のいくものであった。

### 主査 桑田委員の質問とそれらに対する回答（抜粋）：

1. MCT1 に関する Warburg 効果について、これまでに知られていることは何か。

Warburg 効果は癌細胞が有酸素下でミトコンドリア酸化的リン酸化よりも解糖系優位に働き ATP を産生する現象である。これにより解糖系バイプロダクトである核酸および NADPH を産生するので、乳酸細胞外排出と解糖系亢進に MCT1 は Warburg 効果促進に重要であることが知られている。

2. *Mct1* siRNA によるミトコンドリアの機能変化について考察せよ。

ミトコンドリア内膜の MCT1 は解糖系で生じたピルビン酸をミトコンドリア内に取り込む。*Mct1* siRNA によってミトコンドリア内膜に存在する MCT1 発現が抑制されると細胞の好気呼吸を阻害し、ミトコンドリア機能不全を誘導すると考えられる。

主査桑田委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認した上で、本論文の内容をより詳細に確認するために上記の質問をし、明確かつ適正な回答を得た。

以上の審査結果から、本論文「Monocarboxylate transporter-1 promotes osteoblast differentiation via suppression of p53, a negative regulator of osteoblast differentiation」を博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。