

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第510号	学位申請者	鈴木 甫
審査委員	主査	佐藤友昭	学位
	副査	齋藤 亮	副査
	副査	杉浦 剛	副査
			博士 (歯学)
			宮脇 正一
			松尾 美樹

主査および副査の5名は、令和元年6月21日、学位申請者 鈴木 甫 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) *H. pylori* 感染と体重や食欲、心理的状態の関連を報告した研究で、菌株を同定しているものはあったか？

(回答) 菌株を同定している論文は渉猟できなかった。

質問2) *H. pylori* 除菌療法により、胃癌や胃潰瘍の発症率だけでなく、食欲不振や不安を生じる割合も低下すると予想されるが、そのような報告はあるのか？

回答) 除菌により、体重が増加したという報告はあるが、不安については報告がない。

質問3) *H. pylori* の感染による胃酸分泌能の低下が摂食抑制を招いていることも考えられるが、臨床的にはその作用と VacA による作用のどちらがより強く摂食抑制を引き起こしていると思うか？

回答) 厳密に比較した研究が存在しておらず不明である。いずれの作用も感染からの経過時間に依存して強さが変化することが予想されるため、タイミングによって胃酸分泌能抑制による影響の方が大きい、或いは、逆に VacA の影響が大きいということはあるかも知れない。

質問4) 分泌型の毒素だけでなく菌体そのものの成分が行動異常の原因となっている可能性はあるか？

(回答) 可能性としては否定できない。さらなる研究が望まれる。

質問5) 使用した *H. pylori* の菌株はどのようなものか？それはヒトに感染するのか？

(回答) ATCC49503/43504 で、ヒトに感染する標準株として広く研究に利用されている。

質問6) 使用した VacA は強毒性なのか？

(回答) 本菌株から産生される VacA は、*slml* 型の構造多型を示し、胃癌発症のリスクを増大させることが報告されている強毒性のものである。

質問7) 病原性が低い VacA でも同様の作用を及ぼすのか？また CagA にも同様の作用はあるのか？

(回答) 本研究では、*slml* 型の VacA でのみ検討を行ったので、低毒性の VacA で同様の作用を生じるかは判らない。CagA について摂食抑制作用や不安惹起作用は報告されておらず、我々が行った予備実験でも CagA 投与後に摂食抑制は認められなかった。

質問8) 視床下部で VacA を検出した報告はあるのか？

(回答) 視床下部において VacA 検出したのは本研究が初めてである。

質問9) VacA は視床下部室傍核ニューロンの細胞内に取り込まれるのか？

(回答) 古典的に知られている receptor-type protein tyrosine phosphatase (RPTP)  $\alpha/\beta$  を介する空胞形成の過程では VacA が細胞内に取り込まれる。しかし、本研究で明らかになった LRP1 を介する経路における VacA タンパクの振る舞いは不明である。免疫組織化学的に VacA が神経細胞の近傍に存在することは確認したが、細胞内に取り込まれた像は見付けられなかった。

質問10) スナネズミ (Mongolian gerbil) を使用した理由は？

(回答) スナネズミは *H. pylori* 誘発性の胃炎や胃癌などの多くの病態がヒトと類似しており、ヒト *H. pylori* 感染症の病態を再現する効率的な齧歯類モデルとして、多くの研究で使用されてきた経緯がある。

## 最終試験の結果の要旨

質問 11) VacA が食欲抑制を引き起こす機序に ghrelin が関与していないことを示すには、ghrelin ノックアウトマウスと野生型マウスの摂食量を比較する必要があると思うが？

(回答) Ghrelin ノックアウトマウスの単位時間あたりの摂食量は、野生型と差がないことを確認している。

質問 12) VacA の効果が純粋に食欲不振作用であるかどうかを確認するために、摂食量に加えて、エネルギー消費量の変化の指標となる体温などのデータもみるべきではないか？

回答) エネルギー消費に関する計測は行っていない。今後検討していきたい。

質問 13) 亜慢性投与では受容体の脱感作が起きているのか？体重が対照に追いつくのはなぜか？

(回答) 脱感作が起きている可能性は否定できない。それ以外にも、希釈された常温の溶液中で VacA が失活した、何らかの代償機構が働いた、徐放性カプセルからの放出量が一定でなく実験開始後早期に VacA が枯渇した、などの複数の可能性が考えられることから、今後さらなる検証が必要である。

質問 14) CRF 受容体阻害薬の投与実験で、摂食量や不安様行動を比較した時点がそれぞれの実験で異なるのはなぜか？

(回答) いずれの実験においても、単位時間あたりの摂食量や不安様行動のパラメータを継続的に測定しており、対照群と VacA 単独投与群の間の累積値の差が最も大きい時点のデータを提示している。

質問 15) 対照群と antisauvagine 単独投与群間の差は、CRF2 受容体に作用する内因性物質の阻害によるものか？

(回答) そのように考えられる。

質問 16) RT-PCR でみた mRNA の発現レベルの変化は、脳内の神経ペプチドの濃度を反映したものなのか？

(回答) 投与 4 時間後に採取したサンプルで計測し結果を比較しているが、タンパク量は計測しておらず不明である。

質問 17) 室傍核単離ニューロンを採取したラットの週齢は？また、同ニューロンへの VacA 投与により細胞内カルシウム濃度が上昇するメカニズムは？

(回答) 使用したラットは 8 週齢である。VacA が LRP1 を介して細胞内情報伝達系を活性化させることで細胞膜が脱分極し、生じた活動電位によって電位依存性カルシウムチャネルが開口しカルシウムが流入した可能性を考えている。

質問 18) 古典的に知られている VacA の受容分子である RPTP $\alpha/\beta$  と、LRP1 との間には何らかの関連性はあるのか？また、LRP1 に注目した理由は何か？

(回答) RPTP $\alpha/\beta$  と LRP1 の関連性について記述した文献は渉猟出来なかった。LRP1 のノックアウトマウスには摂食行動や体重の異常が認められるとの報告があったことから、LRP1 に注目して実験を行った。

質問 19) LRP1 を介した細胞活性化作用であることを確認するために、抗 LRP1 抗体を用いた実験は行ったのか？

(回答) 行っていない。今後の検証が必要である。

質問 20) LRP1 下流の情報伝達系として PLC-PKC 経路があることは報告されているか？

(回答) そのような報告は渉猟できなかった。

質問 21) 血液脳関門(BBB)の細胞に VacA の受容体は発現しているのか？

(回答) BBB の血管内皮細胞に LRP1 が発現している。実際に tissue-plasminogen activator (t-PA) は LRP1 に結合して、BBB の透過性を亢進させることが報告されており、VacA も同様の作用を引き起こしていることが示唆される。

質問 22) 歯科との関連や今後の展望について教えてほしい。

回答) 歯周病患者の歯垢や唾液中では高頻度に *H. pylori* が検出される。*H. pylori* 感染者について、歯周治療をしなかった患者群よりも、歯周治療をした患者群の方が除菌治療の成功率が高く、*H. pylori* 治療における歯科処置の重要性が注目されている。また、VacA は菌体から離れた箇所作用する“remote effect”を有することから、口腔機能や口腔環境に対する未知の作用があるかも知れない。

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。