

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 661 号	学位申請者	平 沙祐里	
審査委員	主査	中田 匡宣	学位	博士(歯学)
	副査	杉村 光隆	副査	齋藤 充
	副査	西谷 佳浩	副査	前田 綾

主査および副査の5名は、令和4年3月16日、学位申請者 平 沙祐里 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) LPSを入れてからオキシトシンやバソプレッシンを投与するデザインにしなかったのはなぜか。

(回答) 今回はまず、オキシトシンが神経系に対しどのような影響を与えているのかを明らかにするためにLPS処理の前にオキシトシンを投与し、KCC2発現の回復を確認後、その下流の分子メカニズムを検証することとした。今後、LPSを添加後にオキシトシンを投与し、治療薬候補としてのオキシトシンの実用性を検証する予定である。

質問2) LPS投与後5日目に解析した理由は何か。

(回答) PC-12細胞では分化後5日目にGABAスイッチが起こる指標であるKCC2の発現の増加とNKCC1の発現の減少が十分に見られたため、5日目に解析した。

質問3) LPSとオキシトシンを一緒に添加しているがオキシトシン単独で入れた場合はどうなるのか。

(回答) オキシトシンはLPS処理によるTLR4からGSK3βに至るシグナル経路を抑制することで、KCC2の発現抑制を阻害している。そのため、オキシトシン単独で投与してもKCC2の発現は有意に変化しないと思われる。

質問4) LPSがIL-1βの発現を増加させる他の経路の影響についてどう考えているか。

(回答) 他の経路からIL-1βの発現が増加している可能性もあるが、TLR4、IL-1βの遺伝子発現をノックダウンすると、LPSを処理してもKCC2の発現は減少しなかったため、少なくともLPSによるKCC2発現制御に関しては、TLR4を介したIL-1βの発現亢進が主要な経路であると考えている。

質問5) 大腸菌由来のLPSではKCC2の発現を抑制しないのはなぜか。また、それは口腔内細菌と大腸菌のどのような違いによるものと考えているか。

(回答) 大腸菌のLPSでもIL-1βの発現が誘導されることは確認しているが、大腸菌のLPSは、IL-1βのデコイ受容体であるIL-1R2とアンタゴニストIL-1RAの発現もそれ以上に増加することを確認している。従って、大腸菌のLPSの投与ではIL-1βのシグナルが伝わらないことで、MECP2の核への移行が起きずKCC2発現抑制が起きないと考えられる。口腔内細菌と大腸菌では、リポドAの構造が異なるという報告があり、今回示した結果の違いを誘引した可能性がある。

質問6) 口腔内細菌の中で、なぜ*P.gingivalis* (*P.g.*) に絞り込んだのか。

(回答) *P.g.*は歯周病を惹起する最も代表的な菌であり、重症な歯周病患者の歯肉縁下ブラークから検出される頻度が高い菌種のひとつでもあること、さらに、糖尿病やアルツハイマー病などの全身疾患にも関与することが報告されていることから、本研究では口腔細菌の中で特に*P.g.*に絞り込み解析を行った。

質問7) どの様なストレスを与えても、今回示しているようにIL-1βを介したKCC2の抑制が起こるのか。

(回答) 少なくとも、グラム陰性細菌の感染による炎症性ストレスにおいては、LPSがTLR4を受容体とし、GSK3βとIL-1βを介したMECP2の遺伝子発現抑制といった経路でKCC2の発現抑制が生じると考えられる。どのようなストレスによってもIL-1βを介したKCC2抑制が起きるかについては、現時点では不明であるが、マウスに母子分離ストレスを与えると海馬でのKCC2の発現が減少すること、初代培養細胞やPC-12細胞においてIL-1βを惹起することが報告されている過酸化水素処理によってKCC2の減少が見られることなどから、様々なストレス負荷によりIL-1βが産生され、その結果KCC2発現減少を引き起こしている可能性は高いと考えている。

質問8) 初代培養細胞とPC-12の両方でLPS処理によりKCC2の発現量が低下したことを確認しているが、それ以降の実験ではPC-12細胞のみを使用している。同様の実験を初代培養細胞で行った場合、同じ結果が出るのか。

(回答) 今回示していないが、初代培養細胞においても、LPS処理でMECP2の核への移行を観察している。従って、初代培養細胞であっても大筋で同様のメカニズムが働いていると考えている。

## 最終試験の結果の要旨

質問 9) 初代培養細胞とは何の細胞のことか。

(回答) ラット出生仔から大脳皮質を切り出し、酵素処理後 DNA 合成阻害剤である Ara-C を加えアストロサイトの増加を抑えることで、ニューロンの割合を高めた培養細胞である。

質問 10) 歯周病菌が胎児に与える影響について調べようとするのであれば、妊娠ラットに歯周病菌そのものあるいは歯周病菌由来の LPS を血中に投与し、そのラットから生まれた新生仔から分離したニューロンをサンプルとする実験を思い付くが、そういうことは試したのか。もし試したのであれば、どのような結果になったのか。

(回答) 妊娠ラットに歯周病菌や LPS を投与し新生仔からサンプルを得る方法だと、本研究に含まれる全ての実験を行うために十分な量のニューロンを得ることが困難であったため、今回は行っておらず、神経前駆モデル細胞として頻用され、解析に十分な量を得ることが出来、操作が比較的容易である PC-12 細胞を用いて LPS 投与によるシグナル伝達経路を中心に検証した。今後、妊娠ラットに LPS を投与し PC-12 で得られたものと同様の結果が得られるか検討したい。

質問 11) PC-12 をディッシュ上で培養したときに厚みは測定したか。

(回答) 顕微鏡での観察から通常の培養細胞と同程度の 10-20  $\mu\text{m}$  程度と考えている。正確な厚みは測定していない。

質問 12) KCC2 の発現シグナルを評価する画像は、細胞の厚み方向に異なる高さで撮影した複数の共焦点画像をスタッキングしたものか、特定の高さの共焦点画像 1 枚にしたものなのか、或いは共焦点画像ではないのか。

(回答) 共焦点ではない蛍光顕微鏡を用いて得られた画像である。細胞の上面から底面まで蛍光像を観察し、最も蛍光強度が高く、焦点が合った画像を選択している。

質問 13) ディッシュ毎の蛍光シグナルの処理の、キャリブレーションはどうしたか。

(回答) シグナルから、ディッシュのバックグラウンドの輝度を引いている。レーザー出力は自動調整でありその値を毎回記録していないが、統計解析を行ったサンプル群は、全て同じ日に測定している。

質問 14) MECP2 や REST の核内への移行を、免疫染色のシグナルの nucleus/cytoplasm 比で評価しているが、ノーマライゼーション前の比の平均値はそれぞれどの程度なのか。

(回答) control 群では MECP2 の nucleus/cytoplasm 比は 2.1 であった。一方、LPS 処理群では 3 に上昇した。REST について、control 群では同比が 1.3 であったのに対し、LPS 処理群では 3.1 であった。

質問 15) DiBAC<sub>4</sub>(3)の実験では、LPS 処理群が非処理群に比べ蛍光強度が低くなっている理由について、細胞内クロロライドイオン濃度の違いを反映していると考察しているが、発光元の説明書には、DiBAC<sub>4</sub>(3)のシグナル強度は膜電位が脱分極するに従って高くなると説明されている。従って、LPS 処理群は非処理群に比べ単に静止膜電位がより過分極側にあるということであり、クロロライドイオンの細胞内濃度は直接関係無いのではないか。

(回答) 指摘通り、LPS 処理群は非処理群に比べ静止膜電位が過分極側にあると考えられる。この過分極状態となる要因は、KCC2 と NKCC1 の発現量から、LPS 処理群では細胞内クロロライドイオン濃度が増加しているためと考えた。実際、カルシウムイメージングの結果より、GABA<sub>A</sub> 受容体アゴニストである  $\mu\text{M}$  シモールを添加すると、LPS 処理群ではクロロライドイオンが細胞外に排出され、細胞膜は脱分極するという結果が得られている。今後クロロライドイオン濃度を直接測定できる蛍光色素 MQAE を用いた実験を行い、細胞内クロロライドイオン動態について検討したい。

質問 16) 蛍光顕微鏡像を用いた統計処理について、n は細胞数、ディッシュ数、画像の数の何れかを表しているのか。

(回答) n は輝度を測定した細胞の数を表している。

質問 17) オキシトシンは TLR4 から GSK3 $\beta$  に至るシグナル経路を抑制すると表現しているが、具体的には GSK3 $\beta$  をリン酸化することで不活性化させる p70S6 キナーゼの活性を上昇させる、という理解で間違いはないか。

(回答) 現在のところ、オキシトシンが p70S6 キナーゼの活性を上昇させ、GSK3 $\beta$  の Ser9 をリン酸化することでそのシグナルを抑制すると考えている。

質問 18) オキシトシンは愛情ホルモンといわれているが、ハグ等の行動により臨床的に結果が出る可能性はあるのか。

(回答) 先行研究において、母子分離ストレスを負荷したマウスは KCC2 の発現が低下し発達障害様の行動異常を示した。オキシトシンにより KCC2 の発現が回復するという今回の結果を踏まえると、これは、母子分離によりオキシトシンの量が十分ではないために KCC2 が減少し、行動異常が出た可能性がある。反対に、安らぎや愛情を感じる行動によってオキシトシンが十分に分泌されると、KCC2 の発現減少が抑制されると考えられることから、ハグ等の行動により臨床的に結果が出る可能性は十分にあると考えている。

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。