

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 695 号	学位申請者	園田 怜美
審査委員	主査	佐藤 友昭	学位
	副査	齋藤 充	副査
	副査	南 弘之	副査
			博士 (歯学)
			嶋 香織
			白方 良典

主査および副査の5名は、令和5年2月15日、学位申請者園田 怜美君に面接し、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) *APPNL-GF* ノックインマウスの抜歯時期を生後3か月に設定した理由は？また、*3xTg-AD* マウスで抜歯の影響を解析しなかったのはなぜか？

(回答) 抜歯が  $A\beta_{42}$  オリゴマーの発現に及ぼす影響に着目したためノックインマウスを用いた。抜歯のタイミングは抜歯による影響が出やすく、ヒトの軽度認知障害(MCI)の時期に相当すると考えられる3カ月齢に設定した。

質問2) 図3と図5ではそれぞれ4か月齢と3か月齢の *APPNL-GF* ノックインマウスを用いて三叉神経中脳路核(Vmes)を含む領域の細胞外の  $A\beta_{42}$  オリゴマーを計測しているが、両者の平均値が大きく異なっているのはなぜか？

(回答) 図3では  $640\mu\text{m}$  四方の広い範囲を解析しているのに対し、図5では特に Vmes 神経細胞の近傍における  $A\beta_{42}$  オリゴマーの発現を見たことから  $40\mu\text{m}$  四方を対象とした。図2の解析では  $A\beta_{42}$  オリゴマーを強く発現する老人斑が含まれているため、図5の結果よりも高値を示す傾向にあった。

質問3) Vmes 神経細胞内で形成された  $A\beta_{42}$  オリゴマーの細胞外拡散に影響する因子として、神経細胞の加齢と抜歯による神経変性にフォーカスを当てているが、今回のデータは加齢の方がより影響の大きい因子であることを示唆していると解釈していいのか？

(回答)  $A\beta_{42}$  オリゴマーの細胞内蓄積そのものが加齢によるものと考えているため、加齢がより大きいファクターだと考えている。

質問4) ヒトの死後脳において歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (P.g)の菌体を実質内で観察されたという報告があり、炎症が  $A\beta$  の蓄積に関係していることを示唆する論文もあるが、細菌感染による炎症は  $A\beta$  蓄積の原因ではなく修飾因子として捉えているのか？

(回答) P.g などの細菌感染による炎症と認知症の関係については数多くの報告があるが、部位特異性を示す脳の萎縮といったADの特徴を説明することは困難であることから、原因ではなくあくまで修飾因子と考えている。

質問5) *APPNL-GF* ノックインマウスで抜歯を行った2.5か月齢はヒトの年齢に換算すると何歳くらいになるのか？

(回答) 抜歯を行った時期は  $A\beta$  の蓄積は認めるが認知機能の低下は認めていない、ヒトのMCIを想定して行っているため、50~60代に相当すると考えられる。

質問6) 成熟後に新生は起こらない神経細胞では、オートファジーは老化に従いどのように変化していくのか？

(回答) オートファジー活性が低下し、変性タンパク質や異常なミトコンドリアの蓄積が起こることが知られている。異常なミトコンドリアから出される活性酸素種(ROS)の増加が細胞傷害を加速すると言われている。

質問7) 神経細胞周囲のグリア細胞や血管と、 $A\beta$  の分布の関係はどうなっていたか？

(回答)  $A\beta$  が強く発現している神経細胞周囲にグリア細胞様細胞の集積が認められた。また、血管に  $A\beta$  が蓄積していた。

質問8) オートファジーを抑制する経路としてPI3キナーゼ以外はないのか？

(回答) 促進に比べ抑制の経路はまだ解明が進んでいないが、PI3キナーゼより上流に今回使用した Rubicon があり、他にも Becl1 依存性オートファジーを阻害する Bcl2 があることが知られている。

質問9)  $A\beta$  の細胞毒性は具体的にどのようなものなのか？

## 最終試験の結果の要旨

(695)

(回答) ユビキチン依存性タンパク分解の抑制による神経細胞機能障害、シナプス機能障害、過リン酸化 Tau タンパクの増加、細胞内のイオンバランスの崩壊、ミトコンドリア傷害による ROS の産生増加などが知られている。

質問 1 0) MCI から正常に戻ることはあるのか？

(回答) MCI の定義が非常に幅広く、MCI の初期の場合はアリセプト® というアセチルコリンエステラーゼ阻害薬を用いて脳内のアセチルコリン濃度を改善することで MCI の改善を認める場合もあり、保険適応されている。

質問 1 1) ルフィニ様終末は歯根膜のどの位置に存在しているのか。今後の歯周病モデルではどの程度骨吸収を起こす予定か？

(回答) 歯頸側よりも根尖側に多く存在しているとされており、我々自身でもマウスの歯周組織を染色して確認する予定である。今後歯周病モデルを作製し実験を行う場合は、予めルフィニ様終末にダメージが及んでいることを確認する。

質問 1 2) 臨床では残存歯が少ない患者や家族から、残存歯を抜去して総義歯にしたい、との要望がしばしば寄せられる。本研究から患者にどのように説明した方がいいか？

(回答) まだ動物レベルでもデータが少ないので、臨床に応用するのは難しい。今後、抜歯による影響が何年後に起こるのか、という部分まで明確になってくれば臨床診断の助けになる可能性はある。

質問 1 3) 雌性動物を使用しているのはなぜか？

(回答) 認知症は女性で発症率が高いことや、3xTg-AD マウスの雄性動物では表現型が再現されていない可能性が報告されていること等から、認知症研究においては雌性動物を使用することが多く、我々もそれに倣った。

質問 1 4) 図 2G において、3xTg-AD マウスにおけるオートファジー関連の膜様構造 3 種の割合が 2, 3, 4 か月齢の 3 時点では有意な差がないことが示されていたが、それらの総数はどうなっていたか？

(回答) 加齢とともにやや膜様構造の総数が減少傾向にはあったが、有意差は出ていない。8 か月齢まではオートファジーは維持されていると推測される。

質問 1 5) 蛍光染色で複数のサンプルの撮影条件をそろえるのは困難だが、どのように設定したのか。また、図 3 の弱拡像は焦点深度を変えると画像が大きく変わるが、何を基準に撮影を行ったのか？

(回答) Gain は条件を統一した。その他の条件に関しては、光学顕微鏡像を参考に極力主観的な判断にならないように留意したが、染色に個体差などもあり条件の統一はできていない。弱拡像は対象であった Vmes 神経細胞面積が最大になっている深度で撮影を行っている。

質問 1 6) A $\beta$ <sub>42</sub> オリゴマー形成後に消去できる機構があるのか？

(回答) 細胞外の異物を除去する機構としてグリア細胞が考えられている。実際に神経変性が生じている細胞の周囲にグリア細胞の集積を認めるものも存在した。また、最近の AD 治療薬が A $\beta$ <sub>42</sub> オリゴマー除去能を有している。

質問 1 7) AD 患者死後脳の染色はどうなっているか？

(回答) マウスと異なり、固定を即座に行えないため神経細胞が分かりにくい。抗体などを再検討している。

質問 1 8) AD モデルマウス(3xTg-AD マウス; App<sup>ML-GF</sup>ノックインマウス)は野生型と比べて老化が著しいのか？

(回答) 老化マウスではなく、運動機能や生殖機能は 2 年程度まで維持されているのは実際に確認している。

質問 1 9) 抜歯後の食餌はどうしているのか？

(回答) 抜歯は上顎右側臼歯部のため、左側で食事自体は可能。パウダー状とペレット状を与えており、抜歯後一時的に体重は減少するが、1 週間程度で体重が戻ることを確認している。

質問 2 0) 今回の研究を臨床にどのように発展させていくのか？

(回答) 抜歯後の神経変性の時間軸などが解明できれば、抜歯の際に判断基準の一つになることを期待している。現状では、歯科受診への動機づけに応用できればと考えている。

質問 2 1) トランスジェニックマウスとノックインマウスで認知機能にどの程度差があるのか？

(回答) 行動実験の種類によって結果の幅があるがノックインマウスが早く認知機能の低下を認めるとされている。

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。