

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 707 号	学位申請者	楠元 淳也
審査委員	主査	田松 裕一	学位 博士 (歯学)
	副査	齋藤 充	副査 佐藤 友昭
	副査	西谷 佳浩	副査 南 弘之

主査および副査の5名は、令和5年6月5日、学位申請者 楠元 淳也 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) 下顎切歯にレジンを築盛したとき、白歯はどのような状態になっているのか。そして、経時的にレジンや咬合状態はどのように変化していくのか。また、不正咬合群のマウスは粉末食を丸呑みしているのか。

(回答) 築盛から数日間は白歯が離開していたが、その後は下顎が側方に偏位した状態で咬合接触するようになった。マウスの切歯は実験期間中も伸び続けた。また、レジンはほとんど摩耗しなかったため、結果として下顎切歯は長くなり、不正咬合はより顕著になった。不正咬合群の摂食行動を観察したところ、粉末食を口の中に含んだ後に咀嚼様運動を行って嚥下していた。

質問2) レジンの咬合挙上量は過去の報告より大きいと思うが、実験上問題は起こらなかったのか。

(回答) 本研究では切歯の早期接触により下顎が側方誘導された状態で咬合接触しており、実験上問題無かったと考えている。

質問3) 不正咬合モデルは数多くあるが、下顎切歯へのレジン築盛によるものを採用したのは何故か。

(回答) 白歯部咬合挙上や白歯抜歯を行うモデルが報告されているが、前者は手技が煩雑であり、後者は外科的侵襲が大きいという欠点があり、本法を採用することとした。

質問4) 成長期のヒトにおける歯の萌出交換期は一時的な不正咬合だと考えられるが、本研究との関連はあるのか。

(回答) 本研究のモデルは下顎が側方に誘導された白歯部交叉咬合を模しており、萌出交換期とは直接関連はしないが、本研究でみられたものと同様の現象が萌出交換期に一時的でより穏やかに現れる可能性は考えられる。

質問5) マウスは粉末餌をこぼすので、摂餌量を正確に計測するのは困難ではなかったか。

(回答) 食べこぼしが生じにくいマイクロフィーダーという給餌器を用いた。更に、床敷を排除して食べこぼしの粉末餌を回収しその重量も合算した。

質問6) 血液検査でアルブミンなどのタンパク濃度は見ていないのか。

(回答) 図示していないが、血中アルブミン濃度は測定しており、群間に有意差は認められなかった。

質問7) 認知機能と認識機能という語はどのように使い分けているのか。また、思春期の認識機能の低下というのはヒトにおいてはどのように検査するのか。

(回答) 認知機能には、知覚・判断・想像・推論・決定・記憶・言語理解といったさまざまな要素が含まれる。中でも、物体の形や色を正しく認識すること、作業記憶を正しく保つことを認識機能と定義している。ヒトにおける認識機能の検査には、例えば、人物の顔の画像を呈示した直後にまた顔の画像を呈示し、先に見せた画像の人物と同一か否かを答えさせる方法や、風景の画像を呈示した後に数か所変更した画像を呈示して、異なる箇所を指摘させるといった方法がある。

質問8) NOR 試験における馴化フェーズと試験フェーズの間隔を10分に設定したのは何故か。12時間後や24時間後にはなかったのか。また、今回行動実験をNOR試験のみとした理由は何か。

(回答) 物体の形や色に対する短期記憶に関わる認識機能の評価を目的としたため、NOR試験のみを実施し、先行研究にならない馴化と試験の間隔を10分とした。12時間後や24時間後の設定では行わなかった。

質問9) 視床下部を解析対象とした理由は何か。海馬はなぜ対象としなかったのか。また、海馬にはどのような変化があると考えているのか。

(回答) 不正咬合により海馬の機能が低下するという報告は数多くあるが、不正咬合による認識機能低下と視床下部摂食調節ペプチドの発現変化との関連を解析した研究は無く、新規性があると判断した。海馬にはアグーチ関連ペプチド (AgRP) がアンタゴニストとして作用するメラノコルチン4型受容体 (MC4R) の発現が確認されていることから、視床下部 AgRP 含有神経が海馬へ投射し影響を与えている可能性は十分にあると考えられる。

## 最終試験の結果の要旨

(707)

質問 10) 今回解析対象としたペプチドはホルモンなのか。

(回答) AgRP は MC4R に対する内因性アンタゴニストで、MC4R の作用である摂食抑制を阻害して摂食を促進させる。一般的にはホルモンとして記述されていないが、末梢臓器に働いてエネルギー消費を抑制することも知られている重要な分泌ペプチドである。

質問 11) 歯根膜からの異常な感覚入力とは具体的にはどういことが想定されるのか。

(回答) 正常な咬合に比して、咬合接触面積が減少し歯根膜への感覚刺激が低下した状態であると考えられる。

質問 12) 脳室内投与はどこにどのように行ったのか。また、カニューレや下顎切歯のレジンの脱落は生じなかったのか。

(回答) 抗 AgRP 抗体 1.0  $\mu$ g を 2.0  $\mu$ l の生理食塩水に溶解し、ガイドカニューレ、インジェクションカニューレ、ハミルトンシリンジを用いて側脳室に投与した。一匹あたり 20 分から 30 分程度時間をかけて、脳圧が亢進しないよう注意した。また、ガイドカニューレが脱落しないよう、接着性レジジンや即時重合レジジンで固定を行い、脱落の対策を行った。下顎切歯のレジジン脱落の対策としては、より強固に築盛するために、リン酸エッチング、および、プライミング、ボンディングを行った。下顎切歯のレジジンが脱落したマウスが 3 匹、カニューレが脱落したマウスが 2 匹存在し、それらは解析から除外した。

質問 13) 摂食調節因子の mRNA やタンパクの発現解析は 30 日目より前に行っていないのか。

(回答) 行っていない。

質問 14) 図示されている視床下部前額断薄切標本の顕微鏡像では、弓状核の大きさが群間で異なって見えるが、どのように切片作製を行ったのか。また、DAPI で核染された弓状核細胞の総数に群間で差はあったのか。

(回答) c-Fos 陽性細胞のカウントを行った切片は 1 個体あたり左右各 3 枚、計 6 枚である。ブレグマから -1.46 mm ~ -1.58 mm の範囲で採取している。弓状核細胞の総数には群間で有意な差は無かった。

質問 15) 物体位置認識試験 (OLT) で位置をずらした物体がケージの左側に設置されているにもかかわらず、不正咬合群のマウスが左側よりも長く右側の物体を探索しているのはなぜか。また、粉末食群のスコアが固形食群と比較して有意に低いのは、粉末食によって咀嚼が減ったことが原因と考えているか。

(回答) 今回使用したマウスが右側に好みを示したからであると考えられる。また、粉末食給餌による咀嚼減少が海馬の神経成長促進因子である BDNF 発現低下を引き起こすことにより物体位置認識機能が低下することが報告されており、本研究の粉末食群でも同じ現象が起こっていると考えられる。

質問 16) 対照である固形食群に比して、抗体投与した不正咬合群で NOR 試験のスコアが高いのはなぜか。

(回答) 抗 AgRP 抗体によって、不正咬合を原因として増加した AgRP のみならず、生理的に発現している AgRP の作用までキャンセルされているためと考えられ、AgRP と認識機能の相関を支持する結果である。

質問 17) 今回実施したものと同じ介入を高年齢動物モデルで行った場合、どのような結果になると考えているか。

(回答) 不正咬合により AgRP の発現が増加したのは、AgRP 発現を促す摂食増進因子グレリンの発現が増加したためと考えられる。高齢者ではグレリンに対する抵抗性が生じ AgRP 産生が低下するという報告があるため、高齢モデルを使用した場合は、今回みられたような AgRP の発現増加は生じない可能性が高いと考えられる。

質問 18) 不正咬合群で、下顎切歯へのレジジン築盛により本来の食べ方が出来てないことや、頭部へのカニューレ留置によるストレスが認識機能低下の原因と考えられるのではないか。

(回答) レジン築盛やカニューレ留置のストレスはあったと考えられるが、過去に、14 日間の介入で不正咬合モデルで CRF や AVP 発現が増加する一方、28 日間の介入で不正咬合モデルでコルチコステロン発現は変化しないという報告がある。また、慢性のホモタイプストレスでは、CRF 発現は変化しないという報告がある。本研究では CRF 発現が変化しないことから、下顎切歯へのレジジン築盛や、頭部へのカニューレ留置はホモタイプストレスであると考えられる。

質問 19) AgRP は受容体を介して認識機能に作用していると考えているのか。また、受容体の伝達をキャンセルし同様の結果が得られることを確認していないのか。

(回答) AgRP が内因性アンタゴニストとして作用する受容体である MC4R を介して認識機能が低下していると考えている。また、抗 MC4R 抗体を投与してのデータの採取は行っていない。

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。