




学位論文審査の結果の要旨

|   |         |       |   |
|---|---------|-------|---|
| 審査区分<br>①・論   | 第 596 号 | 氏名    | 手島理絵  |
| 審査委員会委員   | 主査氏名    | 松浦 恵子 |  |
|   | 副査氏名    | 馱阿 勉  |  |
|   | 副査氏名    | 木村 俊秀 |  |
| <p>論文題目<br/> <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> infection causes DNA double-strand breaks in host cells<br/>         (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> の感染は、宿主細胞において DNA 二本鎖切断を引き起こす。)</p> <p>論文掲載雑誌名<br/>         Genes to cells</p> <p>論文要旨</p> <p>炎症性疾患である歯周病は、歯周病原菌の感染によって引き起こされ、慢性的な歯周病は、口腔癌のリスクを増加させる。他の消化器癌と同様に、口腔癌も複数のゲノム不安定性を必要とする。しかし、ゲノム不安定性の蓄積に関連する危険因子はほとんど理解されていない。今回、特定の歯周病原菌がゲノムの不安定性のリスクを増加させる可能性があるかと仮説を立て、宿主細胞において DNA 二本鎖切断 (DSB) を誘導する能力に基づいて、いくつかの歯周病原体をスクリーニングした。筆者らは、<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4 感染が宿主細胞において DSB を誘導することを見出した。</p> <p><i>A. actinomycetemcomitans</i> を舌癌細胞株に感染させると、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) で切断した DNA が認められ、菌の感染により DSB が起きていることがわかった。Z-VAD-FMK の存在下でも <i>A. actinomycetemcomitans</i> による感染によって誘導された DSB が観察され、DSB はアポトーシスとは独立して起こったことが示唆された。次に、<math>\gamma</math>-H2AX 染色でも DSB が起きていることが確かめられた。この DSB は、IL-8 産生や NF-<math>\kappa</math>B の活性化とは相関が見られなかったことから、炎症とも関係しないことがわかった。<i>A. actinomycetemcomitans</i> は、cytolethal distending toxin (CDT) を産生することが知られている。そこで菌とその培養液を用いて分泌された CDT が DSB を起こすかどうか調べたところ、菌は DSB を起こしたが上清では少なかった。細胞周期を止めると DSB が起きなくなることから、CDT は、DNA 一本鎖切断 (SSB) を起こし、DNA 複製フォークの形成時に DSB を引き起こすこと、CDT が上清中には少ないため培養上清では DSB が少なかったことが示唆された。</p> <p>以上の結果より、<i>A. actinomycetemcomitans</i> が、CDT を介して宿主細胞におけるゲノム不安定性のリスクを増加させ、発癌のリスクを増加させる可能性があることを示した。</p> |         |       |   |

最終試験  
の結果の要旨  
学力の確認

|  |       |       |      |
|--|-------|-------|------|
| 審査区分<br>課・論  | 第596号 | 氏名    | 手島理絵 |
| 審査委員会委員  | 主査氏名  | 松浦 恵子 |      |
|  | 副査氏名  | 馬阿 勉  |      |
|  | 副査氏名  | 木村 俊秀 |      |
| <p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 口腔内癌の中で、舌癌、歯肉癌などは原因が同じなのか違うのか、ゲノム変化はどうか。</li> <li>2. 歯肉癌における<i>A. actinomycetemcomitans</i>感染率はどれくらいか。</li> <li>3. 用いた3種類のバクテリアで発がん性などの特性に差異があれば説明せよ。</li> <li>4. 「口腔内の発がんは慢性炎症の維持だけでなく、ゲノム不安定性の蓄積が必要」という文章の根拠は何か。</li> <li>5. SAS細胞とHela細胞が使用されている。どちらも癌細胞株だが、妥当か。</li> <li>6. 用いたバクテリアからCDTが分泌されるメカニズムは何か。</li> <li>7. CDTが細胞に取り込まれ、機能を果たすメカニズムを説明せよ。</li> <li>8. バクテリア上清の調製法を説明せよ。</li> <li>9. 今回用いたMOIと培養時間の設定根拠は何か。</li> <li>10. CDTがSSBを起こす反応に部位特異性があるのか。</li> <li>11. Fig. 1eにおいて、添加したDNA量が異なるにも関わらずintact DNAの量は同じである。これは、EtBr上でFig. 1bのような定量を行うことができないと解釈できる。この解釈に関して論じよ。</li> <li>12. アポトーシスの場合、パルスフィールド電気泳動ではどのように見えるのか、アポトーシスが起きていないことがバンドによってわかっている、アポトーシス阻害剤を用いて確かめたのか。</li> <li>13. Fig. 2bとFig. 4bは同じ実験であるが、値が異なっている。2つの実験で条件が異なるのであれば、その差異を説明せよ。</li> <li>14. Fig. 3のNF-<math>\kappa</math>Bという文字がすべて抜けているので訂正すべきである。NF-<math>\kappa</math>Bの活性化を知るためには、赤と緑の蛍光色素のマージの図が必要ではないか。</li> <li>15. Fig. 4aで上清の分のDAPIは6つの細胞のみ染まっているように見えるが、<math>\gamma</math>-H2AX positive cellの割合は100パーセントではないのか。</li> <li>16. Fig. 4dにおいて、チミジンがバクテリアに及ぼす影響を無視できる根拠を説明せよ。</li> <li>17. CDTのDSBには細胞特異性がみられない。一方で、口腔ガンには細胞特異性がみられる。この差異を説明せよ。</li> <li>18. CDTはどのように細胞、細胞の核に到達するのか。防御する機構はないのか。</li> <li>19. <i>A. actinomycetemcomitans</i>によるDSBを、組織切片上で検討することは可能か。方法論としてどのようなことが考えられるか。</li> <li>20. 本研究で、CDTがDSBを引き起こしているということが結論であるなら、論文のSummaryには、そのことを述べるべきではないか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p> |       |       |      |

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。