

氏名	まるやまゆうこ 丸山 裕子
学位	博士 (歯学)
学位記番号	新大院博 (歯) 第 60 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Neurotrophin-4/5-Depletion induces delay in maturation of the periodontal Ruffini endings in mice (Neurotrophin-4/5 遺伝子欠損マウスにおける歯根膜ルフィニ神経終末の成熟遅延について)
論文審査委員	主査 教授 前田 健康 副査 教授 網塚 憲生 教授 齋藤 功

博士論文の要旨

【緒言】

神経栄養因子は、中枢神経系・末梢神経系での神経の発生・生存・維持・そして再生に重要な役割を果たしている。neurotrophin-4/5 (NT-4/5) は brain-derived neurotrophic factor (BDNF) と共に高親和性神経栄養因子受容体 (Trk) の一員である TrkB を介して、神経栄養効果を惹起する。

近年、我々は BDNF ホモ型マウスを用いて、歯根膜の機械受容器であるルフィニ神経終末の生後の発生・成熟に BDNF が関与していること、さらに、下歯槽神経切断実験により歯根膜ルフィニ神経終末の再生遅延が起こることを報告した。しかしながら、これらの研究結果から BDNF に加え、歯根膜ルフィニ神経終末の発生・再生に他の神経栄養因子の関与が示唆された。

そこで、本研究は NT-4/5 ホモ型遺伝子欠損マウスの切歯歯根膜ルフィニ神経終末の発生過程を免疫組織化学的に、終末シュワン細胞の発生過程を組織化学的に検索した。また、三叉神経節における NT-4/5 の受容体すなわち p75-NGFR および TrkB のタンパクおよび遺伝子発現を検討した。

【材料と方法】

生後 1、2、3、8、12 週の NT-4/5 遺伝子欠損ホモ型マウスと、野生型マウスを 0.0125% グルタルアルデヒド含有 4% パラホルムアルデヒド液にて灌流固定し、切歯を含む上顎骨と三叉神経節を取り出し、一晚浸漬固定した。上顎骨は 10% EDTA にて脱灰後、35 μ m の歯矢状断凍結切片を作製した。上顎切歯凍結切片では、神経線維の特異的マーカータンパクである protein gene product 9.5 (PGP 9.5) に対する抗体を用いて免疫染色し、神経分布密度の経日的変化を定量化した。また、非特異的コリンエステラーゼの酵素組織化学染色を行った。さらに、TrkB、p75-NGFR に対する抗体を用いて免疫蛍光染色した。さらに、TrkB、p75-NGFR の抗体を用いて切歯歯根膜および三叉神経節の凍結切片を免疫染色した。さらに、三叉神経節における TrkB、p75-NGFR の遺伝子発現量の変化を Real time PCR 法にて行った。

【結果および考察】

1. 歯根膜ルフィニ神経終末における免疫組織化学と定量分析

生後1週で、野生型、NT-4/5ホモ型マウスともに樹枝状分岐を示すPGP9.5陽性神経線維が認められた。生後2週で両遺伝子型ともに太く平滑な外形の神経が増加し、神経密度の増加が認められたが、終末形態に明らかな違いは認められなかった。生後3週の野生型では、微小突起を有する外形不整な典型的なルフィニ神経終末が観察され始めたが、ホモ型でも神経終末は太くなり分岐を繰り返すものの、神経終末の外形は平滑であった。生後8週の野生型では典型的なルフィニ神経終末の割合が増加するが、ホモ型では微小突起を欠いていた。12週の野生型では、典型的なルフィニ神経終末が増加するのに対し、ホモ型では、典型的なルフィニ神経終末も認められたが、その大部分のものは外形が平滑な神経終末であった。歯根膜ルフィニ神経終末の神経分布密度の経日変化は、両遺伝子型ともに経日的に神経分布密度は増加し、生後8週でほぼプラトーに達した。また野生型と比較してホモ型の神経分布密度は生後8週まで有意に低く、さらにホモ型マウスでは生後2週と3週間、生後3週と8週間で有意差を認めた。

2. 歯根膜ルフィニ神経終末・三叉神経節におけるp75-NGFR、TrkBの発現様式

NT-4/5の受容体であるp75-NGFR、TrkB発現を検討した結果、両受容体ともにルフィニ神経終末・三叉神経節において野生型、ホモ型間に免疫染色結果に相違はなく、三叉神経節における陽性細胞の大きさの分布にも相違は認めなかった。

3. 三叉神経節におけるTrkB、p75-NGFRの定量的real time PCR

定量的real time PCRにて、三叉神経節におけるTrkB mRNA、p75-NGFR mRNAの発現に有意差は認めなかった。

4. 終末シュワン細胞の動態

NT-4/5遺伝子欠損における終末シュワン細胞への影響を、非特異的コリンエステラーゼ酵素組織化学を用いて検討した結果、両遺伝子型ともに酵素染色パターンおよび細胞形に相違はなく、歯根膜単位面積に対する陽性細胞数の経時変化にも相違は認められなかった。

以上のことより、NT-4/5遺伝子欠損マウスでは、歯根膜ルフィニ神経終末の形成・成熟遅延が生じるものの、TrkB、p75-NGFRのタンパクおよび遺伝子レベルでの変化および終末シュワン細胞の動態に変化は認められないことが明らかとなった。NT-4/5は歯根膜ルフィニ神経終末の発育早期に関与して、NT-4/5やBDNFのようなさまざまな神経栄養因子が時期依存的に歯根膜ルフィニ神経終末の発生や成熟過程に関与していることが示唆された。

審査結果の要旨

歯根膜の機械受容器として働くルフィニ神経終末は高い神経可塑性を持つことが示されており、また成長・発育に関するさまざまなタンパクが発生過程のみならず、成熟歯根膜ルフィニ神経終末に発現していることが報告されている。歯根膜ルフィニ神経終末には低親和性神経栄養因子(p75-NGFR)と高親和性神経栄養因子の一つであるTrkBが発現している。申請者の研究グループは先にTrkBのリガンドである脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)の遺伝子欠損マウスを用いて、歯根膜ルフィニ神経終末の発生、再生過程にBDNFが強関与していることを明らかにしている。しかしながら、これらの研究結果からBDNFに加え、歯根膜ルフィニ神経終末の発生・再生に他の神経栄養因子の関与が示唆されている。

本研究はBDNFとともにTrkBに結合するneurotrophin-4/5 (NT-4/5)遺伝子欠損マウス

スを用いて、野生型マウスと比較し、NT-4/5 の歯根膜ルフィニ神経終末の発生過程における役割を明らかにしようとしている。

神経特異タンパクの一つである **protein gene product 9.5** の免疫染色と定量解析法を用いて、野生型では、成長・発育後、典型的なルフィニ神経終末が増加するのに対し、ホモ型では、生後 12 週で典型的なルフィニ神経終末も認められたが、その大部分のものは外形が平滑な神経終末であったこと、また、分布密度の経日変化は、両遺伝子型ともに経日的に神経分布密度は増加し、生後 8 週でほぼプラトーに達した。また野生型と比較してホモ型の神経分布密度は生後 8 週まで有意に低く、さらにホモ型マウスでは生後 2 週と 3 週間、生後 3 週と 8 週間で有意差があることを明らかにしている。また、**TrkB** および **p75-NGFR** のタンパク発現は野生型、ホモ型マウス歯根膜で相違がみられず、三叉神経節でもこれら受容体の **mRNA** 発現に相違がみられなかったこと、さらに、歯根膜ルフィニ神経終末に付随し、発生過程に重要な役割を果たす終末シュワン細胞の発生。成長過程にも異常が認められないことを明らかにしている。

以上のように、NT-4/5 遺伝子欠損マウスでは、歯根膜ルフィニ神経終末の形成・成熟遅延が生じるものの、**TrkB**、**p75-NGFR** のタンパクおよび遺伝子レベルでの変化および終末シュワン細胞の動態に変化は認められないことを初めて明らかにし、NT-4/5 は歯根膜ルフィニ神経終末の発育早期に関与して、NT-4/5 や **BDNF** のようなさまざまな神経栄養因子が時期依存的に歯根膜ルフィニ神経終末の発生や成熟過程に関与していることを解明した点に学位論文としての価値を認める。