

ふりがな	いがらし やすし
氏名	五十嵐 靖
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第80号
学位授与の日付	平成18年9月21日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
博士論文名	Involvement of GDNF and its receptors in the maturation of the periodontal Ruffini endings (GDNF および同受容体の歯根膜ルフィニ神経終末の成熟過程への関与)
論文審査委員	主査 教授 前田 健康 副査 教授 野田 忠 教授 齋藤 功

#### 博士論文の要旨

##### 【背景と目的】

グリア細胞株由来神経栄養因子(glia cell line-derived neurotrophic factor; GDNF)は神経の生存, 成長に関与する神経栄養因子の一つである. GDNF はその特異的受容体である GFR $\alpha$  と結合し, この GDNF-GFR $\alpha$  複合体がチロシンキナーゼドメインをもつ RET とさらに結合することによって, 神経栄養効果を発揮する.

歯根膜の必須の機械受容器であるルフィニ神経終末の形態学的特徴は複雑に分枝した軸索終末と特殊なシュワン細胞である終末シュワン細胞が付随することである. この歯根膜ルフィニ神経終末は生後発育過程で時期特異的な形態を示すことが知られている. 特に, 咬合が開始され, 終末シュワン細胞が軸索終末と接触すると, ミトコンドリアを豊富に含んだ軸索終末が膨大化し, 微少な原形質突起を有するようになるという. また, 最近の Shi らの研究では, 咬合関係を除去すると, ルフィニ神経終末の軸索終末は縮小し, また咬合関係を付与すると軸索終末の形態が回復することが明らかにされている. これらの所見は, 歯根膜ルフィニ神経終末の成熟に, 咬合力や萌出力といった機能的刺激が不可欠であることを示している. 近年, 我々の研究グループは, 若いラット切歯歯根膜ルフィニ神経終末に GDNF, GFR $\alpha$ 1, RET が発現していることを RT-PCR 法および免疫細胞化学的手法にて明らかにした. 三叉神経の発生過程では NGF 依存性から GDNF 依存性に変化することが知られ, また GDNF が神経繊維の成熟過程に関与するという過去の報告から, GDNF が歯根膜ルフィニ神経終末の成熟過程に関与するのではないかと考えた.

本研究の目的は, 二重蛍光染色法を用いて, 歯根膜ルフィニ神経終末の発生過程における GDNF および同受容体の発現過程を明らかにすることである. さらに, GDNF のシグナル伝達に RET が重要な役割を果たしていることが示唆されているので, 三叉神経節における RET 陽性ニューロンの生後発育過程を免疫染色法ならびに画像解析法を用いて明らかにすることを試みた.

##### 【材料と方法】

材料として, 生後3日, 1, 2, 3, 4, 8, 12週齢のウィスター系ラットを用いた.

節から凍結切片を作製し、免疫染色に供した。神経線維のマーカーとして protein gene product 9.5 (PGP9.5)抗体を用い、GDNF, GFR $\alpha$ 1, RET 抗体との二重蛍光染色を行った。また三叉神経節切片を RET 抗体で染色した後、陽性細胞の面積を測定した。

生後3週の歯根膜には細い神経線維がすでに進入していたが、GDNF, GFR $\alpha$ 1, RET 陽性反応は認められなかった。生後1週になると、歯根膜神経は樹枝状の終末形態を示すようになったが、軸索終末はGDNF, RET 陰性であった。その周囲のシュワン細胞はGFR $\alpha$ 1 陽性を示したが、終末シュワン細胞にはいずれの免疫反応も観察されなかった。軸索終末の一部は生後2週でRET 陽性を示すようになり、太くなった軸索終末の近傍にはGDNF 陽性の終末シュワン細胞が出現した。生後3週以降、GDNF 陽性の終末シュワン細胞の数は増加した。三叉神経節におけるRET 陽性ニューロンの平均面積は週齢と共に増加し、また、500 $\mu$ m<sup>2</sup>以上を示すニューロンの割合が生後1週から2週にかけて急激に増加した。中型から大型のニューロンが機械受容を担うと考えられており、この時期は歯根膜ルフィニ神経終末が急激に増加する時期と一致していた。

#### 【結果と考察】

これまでの研究により、歯根膜ルフィニ神経終末の発生過程では、TrkB-BDNF/NT-4/5 シグナル経路が関与することが示唆されてきた。本研究によりGDNF と同受容体の発現パターン時期が歯根膜ルフィニ神経終末の成熟時期と一致しており、GDNF がこの機械受容体の成熟、維持過程に重要な役割を果たしていることが考えられた。本研究とこれまでの我々の研究グループの研究結果を考え合わせると、歯根膜ルフィニ神経終末の発生過程には複数の神経栄養因子が関与しており、BDNF が発生開始期に、NT-4/5 が発生初期に、GDNF が成熟期に重要であることが考えられた。

#### 審査結果の要旨

歯根膜の必須の機械受容器であるルフィニ神経終末の形態学的特徴は複雑に分枝した軸索終末と特殊なシュワン細胞である終末シュワン細胞が付随する。この歯根膜ルフィニ神経終末は生後発育過程で時期特異的な形態を示すことが知られ、発生学的研究、実験的研究により、歯根膜ルフィニ神経終末の成熟に、咬合力や萌出力といった機能的刺激が不可欠であることを示唆されている。しかしながら、その詳細は不明である。

グリア細胞株由来神経栄養因子(glia cell line-derived neurotrophic factor; GDNF)は比較的新しい神経栄養因子の一つで、その特異的受容体であるGFR $\alpha$ と結合し、GDNF-GFR $\alpha$ 複合体がチロシンキナーゼドメインをもつRETと結合することにより、神経栄養効果を発揮することが明らかにされている。

最近、若いラット切歯歯根膜ルフィニ神経終末にGDNF, GFR $\alpha$ 1, RETが発現していることがRT-PCR法および免疫細胞化学的手法にて明らかされている。三叉神経の発生過程ではNGF依存性からGDNF依存性に変化することが知られ、またGDNFが神経繊維の成熟過程に関与するという過去の報告から、申請者はGDNFが歯根膜ルフィニ神経終末の成熟過程に関与するのではないかという仮説を立てている。

本論文は、二重蛍光染色法を用いて、歯根膜ルフィニ神経終末の発生過程におけるGDNFおよび同受容体の発現過程を明らかにすることを目的としている。

材料として、生後3日、1, 2, 3, 4, 8, 12週齢のウイスター系ラットの上顎切歯と三叉神経節から凍結切片を作製し、免疫染色に供している。神経線維のマーカーとしてprotein gene product 9.5 (PGP9.5)抗体を用い、GDNF, GFR $\alpha$ 1, RET抗体との二重蛍光染色を行った。また三叉神経節切片をRET抗体で染色した後、陽性細胞の面積を測定した。

すようになったが、軸索終末は GDNF, RET 陰性であった。その周囲のシュワン細胞は GFR $\alpha$ 1 陽性を示したが、終末シュワン細胞にはいずれの免疫反応も観察されなかった。軸索終末の一部は生後 2 週で RET 陽性を示すようになり、太くなった軸索終末の近傍には GDNF 陽性の終末シュワン細胞が出現した。生後 3 週以降、GDNF 陽性の終末シュワン細胞の数は増加した。三叉神経節における RET 陽性ニューロンの平均面積は週齢と共に増加し、また、 $500\mu\text{m}^2$  以上を示すニューロンの割合が生後 1 週から 2 週にかけて急激に増加した。中型から大型のニューロンが機械受容を担うと考えられており、この時期は歯根膜ルフィニ神経終末が急激に増加する時期と一致していた。

これまで、歯根膜ルフィニ神経終末の発生過程では、TrkB-BDNF/NT-4/5 シグナル経路が関与することが示唆されてきた。本研究結果により、GDNF と同受容体の発現パターン時期が歯根膜ルフィニ神経終末の成熟時期と一致しており、GDNF がこの機械受容器の成熟、維持過程に重要な役割を果たしていることと考察している。本研究とこれまでの我々の研究グループの研究結果を考え合わせると、歯根膜ルフィニ神経終末の発生過程には複数の神経栄養因子が関与しており、BDNF が発生開始期に、NT-4/5 が発生初期に、GDNF が成熟期に重要であることが結論している。

以上のように、本研究は歯根膜ルフィニ神経終末の成熟過程に、GDNF が強く関与していることを明らかにしており、この点に本論文の学位論文としての価値を認める。