

ふりがな	じゃばーる しゃひくる
氏名	Jabbar Shahiqul
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第81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	The involvement of neurotrophin 4/5 in the regeneration of periodontal Ruffini endings at the early stage (Neurotrophin4/5は歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程の初期に関与する)
論文審査委員	主査 教授 前田 健康 副査 教授 齋藤 功 教授 大島 勇人

#### 博士論文の要旨

##### 【目的】

歯根膜の機械受容器であるルフィニ神経終末は高い神経可塑性を有し、下歯槽神経切断実験では、神経切断後約1か月で再生する。近年、我々は、歯根膜ルフィニ神経終末の生後発達や再生過程に高親和性神経栄養因子受容体である TrkB のリガンドである brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin 4/5 (NT4/5) が関与していることを報告した。これら2種の神経栄養因子は歯根膜ルフィニ神経終末の発生、再生過程において、異なる時期に作用していることが想像される。しかしながら、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程における NT4/5 の作用はまったく不明である。

そこで本研究は、下歯槽神経切断モデルを用いて、NT4/5 遺伝子欠損マウスの歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を免疫細胞化学的に検討した。さらに、持続的 recombinant NT4/5 投与がルフィニ神経終末の再生過程に及ぼす影響を検討した。

##### 【材料と方法】

1) 下歯槽神経切断モデル：実験動物として生後12週の成熟 NT4/5 遺伝子欠損ホモ型マウス(-/-)、対照群として野生型マウス(+/+)を用いた。実験群は、下歯槽神経を頰側より露出しハサミで切断し、その断端を下顎管に戻した。術後3、7、10、14、21、28日(各n=6)に灌流固定を行った。皮膚の切開のみの群を sham 群(n=6)、非外科的処置群を正常群(n=6)とした。

2) 回復実験：NT4/5 欠損マウス(①下歯槽神経切断群、②下歯槽神経非切断群)の背面皮下に recombinant NT4/5 osmotic pump (n=6)、sterilized physiological osmotic pump (vehicle) (n=6)を埋入した。埋入後7、14日に灌流固定を行った(各n=3)。

1)、2)は EDTA 脱灰後、下顎切歯矢状凍結切片を作製し、ABC 法にて免疫染色を行った。なお神経線維のマーカーとして protein gene product 9.5 (PGP 9.5) 抗体を用いた。

神経密度は、画像解析装置を用い歯根膜単位面積当りの PGP 9.5 免疫陽性部位の面積率(%)により算出した。同一術後経過日数におけるホモ型と野生型間の検定には

unpaired Student's t-test を、また各系統における術後経過日数間の検定には one-way ANOVA and Scheffe's post-hoc test を用いた ( $p < 0.05$ )。

#### 【結果および考察】

sham 群の解析により、NT4/5 欠損マウスの歯根膜における神経密度は、野生型マウスに比べ約 16% の低形成を示した。

実験群では野生型とホモ型マウスの歯根膜ルフィニ神経終末は、下歯槽神経切断 3 日後にほぼ消失したが、弱い PGP 9.5 免疫陽性神経線維が残存した。神経切断後 7 日から 10 日に、両群ともに PGP 9.5 免疫陽性神経線維が再生し始め、神経線維は細く数珠状を呈したが、野生型では神経終末に分岐構造が観察された。ホモ型の神経密度は、野生型に比べ有意に低い値を示した。神経切断後 14 日の野生型マウスでは、神経密度は増加し、典型的なルフィニ神経終末構造が出現した。即ち、太く樹枝状に分岐し、膨隆した終末構造を持つ PGP9.5 免疫陽性神経が認められた。一方、ホモ型では PGP 9.5 免疫陽性神経の経日的な増加を認めたが、神経密度は野生型に比べ有意に低く、神経線維は依然として分岐に乏しく数珠状を呈した。

神経切断後 21 日から 28 日の野生型マウスの歯根膜では、ルフィニ神経終末は表面に微小突起を認め形態学的に再生を完了した。神経密度はさらに増加し sham 群との間に有意差を認めなかった。一方、ホモ型においても、神経密度は増加し、太く分岐したルフィニ神経終末が出現したが、表面の平滑な細い PGP9.5 陽性の神経線維が混在していた。

NT4/5 欠損マウスでは、野生型マウスと比較した神経密度の減少率は、下歯槽神経切断後 3 日で最大となり、次いで 7 日後、その後はほぼ同レベルに保たれた。

持続的 recombinant NT4/5 投与実験では、下歯槽神経切断後 7 日、14 日後の神経密度は vehicle 群に比べそれぞれ上昇したが、7 日と 14 日後の上昇率に有意差はなかった。また、下歯槽神経傷害を行わなかった群の歯根膜ルフィニ神経の密度も上昇した。しかしながら、野生型のルフィニ神経終末に見られる多数の微小突起の発達は見られなかった。

本研究の結果から、NT4/5 は下歯槽神経切断後、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程の初期過程において重要な役割を果たすことが示唆された。歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程には複数の神経栄養因子が時期依存的に関与していることが伺えた。

#### 審査結果の要旨

歯根膜機械受容器であるルフィニ神経終末は高い神経可塑性を有することが明らかにされている。下歯槽神経切断実験では、神経切断後約 1 か月で形態学的に再生することが示されている。歯根膜ルフィニ神経終末には高親和性神経栄養因子受容体である TrkB が強く発現することから、この終末の発生、再生には TrkB のリガンドである brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 4/5 (NT4/5) が関与していることが想像される。しかしながら、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程における NT4/5 の作用はまったく不明である。

そこで本研究は、下歯槽神経切断モデルを用いて、NT4/5 遺伝子欠損マウスの歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を免疫細胞化学的に検討し、さらに、持続的 recombinant NT4/5 投与がルフィニ神経終末の再生過程に及ぼす影響を検討している。実験動物として生後 12 週の成熟 NT4/5 遺伝子欠損ホモ型マウス(-/-), 対照群として野生型マウス (+/+) を用い、Atsumi らの方法により下歯槽神経を切断し、経日的に試料の採取した。さらに、背面皮下に recombinant NT4/5 osmotic pump を埋入し、術後 7,

14日に試料を採取している。神経線維の同定には PGP 9.5 抗体を用いている。神経密度は、画像解析装置を用い歯根膜単位面積当りの PGP 9.5 免疫陽性部位の面積率 (%) により算出し、統計学的検定に供している。

実験群では野生型とホモ型マウスの歯根膜ルフィニ神経終末は、下歯槽神経切断 3 日後にほぼ消失したが、弱い PGP 9.5 免疫陽性神経線維が残存した。神経切断後 7 日から 10 日に、両群ともに PGP 9.5 免疫陽性神経線維が再生し始め、神経線維は細く数珠状を呈したが、野生型では神経終末に分岐構造が観察された。ホモ型の神経密度は、野生型に比べ有意に低い値を示した。神経切断後 14 日の野生型マウスでは、神経密度は増加し、典型的なルフィニ神経終末構造が出現した。即ち、太く樹枝状に分岐し、膨隆した終末構造を持つ PGP9.5 免疫陽性神経が認められた。一方、ホモ型では PGP 9.5 免疫陽性神経の経日的な増加を認めたが、神経密度は野生型に比べ有意に低く、神経線維は依然として分岐に乏しく数珠状を呈した。

神経切断後 21 日から 28 日の野生型マウスの歯根膜では、ルフィニ神経終末は表面に微小突起を認め形態学的に再生を完了した。神経密度はさらに増加し sham 群との間に有意差を認めなかった。一方、ホモ型においても、神経密度は増加し、太く分岐したルフィニ神経終末が出現したが、表面の平滑な細い PGP9.5 陽性の神経線維が混在していた。

NT4/5 欠損マウスでは、野生型マウスと比較した神経密度の減少率は、下歯槽神経切断後 3 日で最大となり、次いで 7 日後、その後はほぼ同レベルに保たれた。

持続的 recombinant NT4/5 投与実験では、下歯槽神経切断後 7 日、14 日後の神経密度は vehicle 群に比べそれぞれ上昇したが、7 日と 14 日後の上昇率に有意差はなかった。また、下歯槽神経傷害を行わなかった群の歯根膜ルフィニ神経の密度も上昇した。しかしながら、野生型のルフィニ神経終末に見られる多数の微小突起の発達は見られなかった。

以上のように、本研究は歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程に関与し、特に再生過程の早期に NT-4/5 が強く関与していることを明らかにしており、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程に複数の神経栄養因子が時期依存的に関与している可能性を示した点に本論文の学位論文としての価値を認める。