

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名 井表 千馨
学 位 博 士 (歯学)
学 位 記 番 号 新大院博 (歯) 第 298 号
学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 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 Alterations in the expression pattern of the acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) during the regeneration of periodontal Ruffini endings
(歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程における ASIC3 発現様式の変化)

論文審査委員 主査 教授 齋藤 功
副査 教授 山村健介
副査 教授 瀬尾憲司

博士論文の要旨

【目 的】

Acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) は、ENaC/DEG 遺伝子スーパーファミリーに属する非電位依存性陽イオンチャネルで、機械刺激受容に必要であると考えられている。最近の我々の研究において、ASIC3 が歯根膜の機械受容器である歯根膜ルフィニ神経終末および三叉神経節の中型の細胞に発現することを報告し、機械受容器の新たなマーカーとなり得ることを示した。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 ASIC3 の役割については全く不明である。そこで本研究では、その役割を解明するため、歯根膜ルフィニ神経終末および三叉神経節における、神経傷害後の ASIC3 の局在変化について免疫組織化学的に検討した。

【方 法】

本研究計画は新潟大学動物実験委員会（新大研第 47-4 号）により承認されている。雄性ウィスター系成熟ラットを用い、下歯槽神経切断実験を行った。片側のみ切断を行ったものを切断群とし、その反対側は切断を行わない sham 群、両側とも切断しないものを対照群とした。切断後 3 日、7 日、14 日、21 日、28 日に灌流固定（各 n=5）、切歯を含む下顎骨および三叉神経節を採取、下顎骨は脱灰の後、凍結切片を作製し、以下に示す免疫組織化学的検討を行った。

- ① 対照群および再生過程の歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC3 の発現：抗 ASIC3 抗体と神経のマーカーとして抗 protein gene product (PGP) 9.5 抗体、またグリア細胞のマーカーとして抗 S-100 protein 抗体を用いた免疫蛍光二重染色および免疫染色
- ② 対照群および下歯槽神経再生過程の三叉神経節における ASIC3 の発現、局在変化：抗 ASIC3 および PGP9.5 抗体、無髄神経線維マーカーとして抗 calcitonin gene-related peptide (CGRP) 抗体を用いた免疫蛍光二重染色

【結 果】

対照群の切歯歯根膜において、ASIC3 は PGP9.5 免疫陽性の樹枝状に分岐した歯根膜ルフィニ神経終末の軸索およびルフィニ神経終末に付随する S100 免疫陽性の終末シュワン細胞に共発現を呈した。

下歯槽神経切断 3 日後、切歯歯根膜の PGP9.5 免疫陽性神経は完全に消失した。7 日後には歯根膜神経の再生が始まり、数珠状の PGP9.5 陽性の神経線維がわずかに認められた。14 日後には PGP9.5 陽性神経は樹枝状の分岐を開始し、21 日後には典型的なルフィニ神経終末の構造を呈するようになった。切断後 28 日目には歯根膜ルフィニ神経終末は形態学的に再生を完了した。一方、歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC3 の免疫反応は、神経切断からルフィニ神経終末の再生が完了する 28 日後まで、全く認められなかった。

対照群の三叉神経節において、ASIC3 は PGP9.5 免疫陽性の神経細胞に発現し、さらに衛星細胞の細胞質にも弱い ASIC3 免疫陽性反応が認められた。また、ASIC3 陽性神経細胞には、侵害受容神経のマーカーである CGRP に免疫陰性であるものもあったが、わずかながら CGRP 陽性神経細胞も存在していた。

下歯槽神経切断後の再生期間を通して、非切断側の三叉神経節における衛星細胞に ASIC3 発現様式の変化は生じなかった。歯根膜神経が消失した神経切断 3 日後、切断側三叉神経節の神経細胞体と衛星細胞に ASIC3 免疫陽性反応が認められたが、非切断側と顕著な差異はなかった。神経線維が再生を開始した 7 日後、切断側の衛星細胞に明瞭な輪状の ASIC3 の発現を認め、14 日後になると、衛星細胞の ASIC3 陽性反応はさらに増強した。切断後 21 日から ASIC3 陽性反応は次第に弱くなり、切断後 28 日には対照群と同程度となった。切断側と非切断側の神経細胞における ASIC3 の発現様式の相違は、認められなかった。

【考 察】

本研究では、下歯槽神経傷害後の歯根膜神経再生過程において、三叉神経節および歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC3 の経時的な発現について、初めて報告した。下歯槽神経切断後、歯根膜神経における ASIC3 の発現は消失し、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を通して ASIC3 免疫反応が認められなかったことから、ASIC3 はルフィニ神経終末の再生過程において、軸索終末の形態回復には直接的な関与をしない可能性が示唆された。一方、三叉神経節において、歯根膜ルフィニ神経終末が活発に再生する時期に、神経細胞体を取り囲む衛星細胞に一過性の ASIC3 強陽性反応が観察されたことから、ASIC3 は三叉神経節における neuron-glia interaction に関与し、神経再生中の神経活性の調節に関わる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

低閾値タイプ II 型遅順応性伸展受容器である歯根膜ルフィニ神経終末は、歯根膜機械受容器として必須で、その構造、発生・再生過程については多くの報告がなされ、形態学的あるいは分子生物学的研究はかなりの進展を見せている。ENaC/DEG (degenerin) 遺伝子スーパーファミリーに属する、酸感受性イオンチャネル acid sensing ion channel (ASIC) のサブタイプの一つである ASIC3 は、中枢および末梢神経系に広く分布し、酸の感受、侵害受容、機械受容に関与することが知られ、歯根膜の機械受容器である歯根膜ルフィニ神経終末および三叉神経節の中型細胞にも発現することが報告されている。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 ASIC3 の役割については全く不明であった。

このような背景から、本研究では下歯槽神経切断後の歯根膜ルフィニ神経終末再生過程における ASIC3 の局在変化について免疫組織化学的に検索した。

実験動物として生後 8 週齢雄性ウィスター系ラット 30 匹を用い、下歯槽神経切断後、3 日、7 日、14 日、21 日、28 日に灌流固定（各群とも n=5）、切歯を含む下顎骨および三叉神経節を採取、下顎骨脱灰後、凍結切片を作製し以下の 2 点について免疫組織化学的検討を行った。片側のみ切

断を行ったものを切断群とし、その反対側は切断を行わない sham 群、両側とも切断しないものを対照群 (n=5) とした。

1. 対照群および再生過程の歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC3 の発現
抗 ASIC3 抗体と神経のマーカー：抗 protein gene product (PGP) 9.5 抗体
グリア細胞のマーカー：抗 S-100 protein 抗体、それぞれを用いた免疫蛍光二重染色および免疫染色
2. 対照群および下歯槽神経再生過程の三叉神経節における ASIC3 の発現、局在変化
抗 ASIC3 および PGP9.5 抗体、無髄神経線維マーカーとして抗 calcitonin gene-related peptide (CGRP) 抗体を用いた免疫蛍光二重染色

下歯槽神経切断後の歯根膜ルフィニ神経終末の形態学的再生過程は、PGP9.5 免疫陽性神経の動態観察から、切断 3 日後に PGP9.5 免疫陽性神経の完全消失、7 日後に再生開始、14 日後に樹枝状分岐が開始、21 日目に典型的ルフィニ神経終末の構造を呈した後、28 日目に形態学的に再生が完了した。一方、歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC3 の免疫反応は、神経切断からルフィニ神経終末の再生が完了する 28 日後まで全く認められなかった。

三叉神経節における免疫反応所見では、歯根膜神経が消失した神経切断 3 日後、切断側三叉神経節の神経細胞体と衛星細胞に ASIC3 免疫陽性反応が認められたが非切断側での所見と顕著な差異はなく、神経線維が再生を開始した 7 日後に切断側の衛星細胞に明瞭な輪状の ASIC3 の発現を認め、14 日後には衛星細胞の ASIC3 陽性反応がさらに増強した。ASIC3 陽性反応は、切断後 21 日以降次第に弱くなり、切断後 28 日には対照群と同程度となった。切断側と非切断側の神経細胞における ASIC3 の発現様式に差異はなかった。

以上のことより、下歯槽神経傷害後の歯根膜神経再生過程において三叉神経節および歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC3 の経時的な発現について初めて報告し、下歯槽神経切断後、ASIC3 はルフィニ神経終末の再生過程において軸索終末の形態回復には直接的な関与をしない可能性を示すとともに、三叉神経節においては、ASIC3 が三叉神経節における neuron-glia interaction に関与し、神経再生中の神経活性の調節に関わる可能性を示唆した点に学位論文としての価値を認める。