

可能性がある。しかしこれらの疾患に大きく関わる咀嚼運動の調節機構およびGABA (A) 受容体との関わりについては未だ不明な点が多い。

そこで本研究は三叉神経中脳路核ニューロンにおけるGABA (A) 受容体の活性化に依存して生じる急性の内在化現象について、主にポリクロナール抗体を用いた免疫組織化学的方法を用いて、実証することを目的におこなった。

本研究において申請者は以下の結果を得た。

1. ジアゼパムの腹腔内投与30分後には、三叉神経中脳路核細胞においてGABA (A) 受容体の存在を検出する蛍光強度が減弱した。この所見はGABA (A) 受容体の内在化により受容体タンパク質が分解された結果、GABA (A) 受容体の数が減少したことを示唆している。
2. ムシモールの腹腔内投与30分後には、三叉神経中脳路核細胞においてGABA (A) 受容体の存在を検出する蛍光強度が減弱した。この所見はGABA (A) 受容体の内在化により受容体タンパク質が分解された結果、GABA (A) 受容体の数が減少したことを示唆し

ている。

3. ジアゼパム投与6時間後のラットの三叉神経中脳路核細胞の蛍光強度についてはコントロール群と有意差がなかった。このことから、アゴニスト投与30分後に認められたGABA (A) 受容体数の減少は細胞障害性のものではなく可逆性の現象であることが示された。
4. 実験群ラットの三叉神経中脳路核細胞におけるGABA (A) 受容体は投与薬剤の影響を受けていることが示された。また、これらの結果とGABA (A) 受容体のサブユニットの構成要素について検討したところ、分子生物学的解析の結果とも適合した。

これらの結果から、三叉神経中脳路核細胞におけるGABA (A) 受容体はアゴニストの作用によりその数を減少させ、受容体数の減少については受容体の内在化機構が大きく関わっていると推測された。

本研究から得られた結果は歯科医学特に咀嚼運動調節機構の解明において進歩発展に寄与するところは大であり、よって審査の結果、本論文は博士(歯学)の学位授与に値するものと考えられる。

氏名・(本籍)	内 田 暢 彦 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	乙 第60号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当 (論文博士)
学位論文題目	有郭乳頭味蕾におけるBDNF (脳由来神経栄養因子) とtrkBの発現
論文審査委員	主 査 教 授 金 澤 正 昭 副 査 教 授 矢 嶋 俊 彦 副 査 教 授 武 田 正 子

論 文 内 容 の 要 旨

[緒 言]

マウスを用いた実験により、舌咽神経を切断すると舌有郭乳頭の味蕾がアポトーシスによる細胞死により次第に数を減らし、手術後10日目頃までに完全に消失してしまうことが報告されている。すなわち味蕾の支配神経は、味蕾細胞のアポトーシスを抑制する因子、言いかえると

生存維持作用を持つ因子を放出するのではないかと思われる。また、味蕾の発生過程や神経切断後の再生過程においては、上皮内に神経が侵入した後に味蕾が形成されることから、味蕾の発生、分化、成長には神経から放出される栄養因子が必要不可欠であると考えられる。

味蕾細胞は神経細胞に似た明るい大きな細胞で神経とシナプス接合を行い、ニューロンと近縁の細胞である。

神経細胞では、増殖、分化の調節、生存、さらに機能維持などの神経栄養作用を持つ増殖因子がいくつか報告されている。その中のNGFファミリーに属するものにNGF (nerve growth factor, 神経成長因子)の他にBDNF (brain-derived neurotrophic factor, 脳由来神経栄養因子)NT 3, NT 4 / 5があり、それらのそれぞれの高親和性レセプターとしてtrkA, trkB, trkCが知られている。そこでこの研究は、BDNFとそのレセプターであるtrkBについて、正常および舌咽神経切断後の味蕾の変性、再生過程における発現、さらに発生過程の有郭乳頭味蕾における発現を免疫組織化学的方法により調べた。また併せて、有郭乳頭の溝に導管が開口する純漿液性の唾液を分泌するエブネル腺についても調べた。

[材料と方法]

成熟ddYマウスの無処置群と神経切断群とを用いた。神経切断は、前頸部の皮膚を切開して顎二腹筋後腹と茎突舌骨筋を外側へ除け、その下の舌咽神経を切断し、断端はそのままにした。手術後2日、5日、3週、4週のマウスを実験に用いた。また、胎生16, 17, 18日および生後0日の無処置マウスも用いた。有郭乳頭を含む組織を切り出し、ザンボン液で3時間固定後、10%, 15%, 20%の各濃度の蔗糖を含む加食塩リン酸緩衝液に浸漬後、Freon22のspray freezerにより凍結させcryostatにより薄切した。一次抗体として、抗BDNF抗体と抗trkB抗体(両者ともポリクローナル抗体)を用いた。一次抗体の反応後、Envision+プリマー試薬/HRPを反応させDABにより発色させ鏡検した。一部はFITC標識抗ウサギIgGを反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

[結 果]

無処置マウスでは、BDNFは細長い味蕾細胞の大部分に発現し、細胞質全体が染まったが、反応の程度は弱かった。trkBは大部分の味蕾細胞の細胞膜に強く反応し、さらに味蕾のある上皮下の結合組織の神経線維も陽性であった。舌咽神経切断後2日の味蕾は、わずかに数が減少しているが、BDNF, trkbの反応も無処置と比べ殆ど変化が認められなかった。切断後5日になると味蕾および神経線維は著しく減少し、わずかに残存する味蕾細胞にBDNF, trkBが発現した。切断後3週目では多数の神経線維が再生しており、わずかが味蕾も再生、出現し、BDNFおよびtrkBの発現が認められた。切断後4週目では味蕾の数は、無処置と同じぐらいまで回復し、両抗体の反応も認められた。また無処置および神経切断マウスにおいて、エブネル腺の終末部の細胞がBDNFに陽性を示し、終末部周囲の神経線維がtrkB陽性を示した。エブ

ネル腺の後外側に位置する粘液腺は導管が溝に開口せず舌背粘膜に直接開口するが、この腺はBDNFは陰性であった。胎生末期のまだ溝が形成されておらず、味蕾も認められない胎生16, 17, 18日の有郭乳頭では、trkBが乳頭の結合組織から背面上皮に侵入し、さらにその周囲の上皮細胞が陽性を呈したが、BDNFは陰性であった。生後0日では、背面上皮に味蕾の形成が認められ、この味蕾はtrkBとBDNFが陽性であった。

[考 察]

BDNFは感覚、大脳基底核、中脳などのニューロンに神経栄養効果を持ち、trkBも広範囲のニューロンにmRNAの発現が報告されている。BDNFのnull-mutated miceでは味蕾の存在する有郭、葉状、茸状の各乳頭の低形成、味蕾の著明な減少、残存する味蕾に由来する神経の減少が報告されている。このことから、味蕾と乳頭の正常の発達のためにはBDNF依存性の味覚神経の支配が必要と考えられている。また、BDNFmRNAはラットで妊娠末期の有郭乳頭背側上皮に出現し、次いで溝を形成する上皮索の細胞に出現部位が移動し、生後3日以降に味蕾が出来ると味蕾に出現すると報告されている。この味蕾の発生よりも以前に出現する上皮のBDNFの役割は、標的由来の誘因化学物質として神経を上皮内に誘導するのではないかと推測されている。しかし今回の実験では、味蕾の発生以前の胎生16-18日には有郭乳頭背側上皮細胞にtrkBの発現は認められたが、BDNFは発現しなかった。これは上皮におけるBDNFの含有量が少ないためかもしれない。また、上皮細胞に発現したtrkBは神経誘導の役割を果たすことが考えられるが、この時期すでに分化した未熟な味蕾細胞が存在してtrkBを発現した可能性も否定出来ない。味蕾細胞にBDNFmRNAが存在し、また抗BDNF抗体によりBDNF蛋白が検出されたことから、味蕾細胞のBDNFは神経線維由来ではなく、自身で合成していることになる。さらに神経切断後も数日の間、残存する味蕾細胞はBDNFを持っていたが、自身のアポトーシスを防ぐことは出来なかった。また、再生過程において味蕾細胞の出現と同時にBDNFとtrkBが発現した。これらのことから、BDNFはtrkBとともに神経線維との接触維持などの役割を果たすものと推測される。またBDNFはエブネル腺終末部にも存在していたが、有郭乳頭の溝には開口しない粘液腺には存在しなかったことから、エブネル腺のBDNFは味蕾に対して何らかの作用を持つのではないかと推測される。

[結 論]

- (1) 正常の味蕾細胞はBDNFおよびtrkBを持っていた。

味覚神経切断後の減少しつつある味蕾細胞、および再生する味蕾細胞にもBDNFとtrkBは存在した。

- (2) 胎生末期16-18日の有郭乳頭は溝が未形成で、味蕾もまだ認められないが、背面上皮にtrkB陽性神経が侵

入しており、その周囲の上皮細胞の一部がtrkB陽性であった。

- (3) 有郭乳頭の溝に導管が開口するエブネル腺の終末部の細胞はBDNFを含有していた。

学位論文審査の要旨

この論文は、マウスの有郭乳頭味蕾について、正常ならびに舌咽神経切断後のBDNFとそのレセプターtrkBの発現を免疫組織化学的方法により調べた。さらに小唾液腺のエブネル腺と発生過程の有郭乳頭についてもBDNFとtrkBの発現を調べ、次の3点を明らかにした。

- (1) 正常の味蕾の細胞は、胞体にBDNFを、細胞膜にtrkBを持っていた。有郭乳頭に侵入する神経線維もtrkBを持っていた。舌咽神経切断後、味蕾は減少していったが、残存する味蕾細胞にBDNFおよびtrkBは発現した。trkB陽性の神経の再生とともに味蕾も再生してきたが、同時に味蕾細胞にはBDNFとtrkBも発現してきた。

これらのことから、味蕾細胞が持つBDNFは、自身のアポトーシスを防ぐことは出来ないが、神経繊維と

の適切な接触維持を行う役割を担うものと推測される。

- (2) 胎生末期16-18日マウスの溝が未形成の有郭乳頭の背面上皮にtrkB陽性の神経線維が侵入し、その周囲にtrkB陽性の細胞が見られたが、これは味蕾形成の準備段階にある細胞と思われる。
- (3) 乳頭溝に導管が開口するエブネル腺の終末部の細胞にBDNFが発現したが、これは腺細胞自身の生存維持の役割の他に、味蕾細胞に対しても栄養作用を及ぼすことが考えられる。

このような結果から、この研究は、味蕾細胞の増殖、栄養因子の解明の一助となる成果をあげており、学位論文に値するものと考えられる。

氏名・(本籍)	山口 明彦 (埼玉県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙 第61号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当(論文博士)
学位論文題目	下肢筋と咀嚼筋の肥大のメカニズムに関する研究
論文審査委員	主査 教授 平井 敏博 副査 教授 矢嶋 俊彦 副査 教授 姜 英男

論文内容の要旨

[目的]

近年、運動による筋肥大は成長ホルモンの有無に関わらず生じることが明らかにされ、骨格筋の成長因子の一つとして、インスリン様成長因子-I (Insulin-like growth factor I, 以下、IGF-Iとする) が注目されて

いる。

Hsuらは正常なマウスと発育異常マウスにIGF-Iを投与した場合の筋分化制御因子の発現量の変化を測定し、IGF-Iの投与が両方のマウスの筋分化制御因子の発現量を増加させることを報告した。しかしながら、運動による筋肥大とIGF-I,あるいは筋分化制御因子との関