

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

係について未だ十分な解明がなされていないのが現状である。

そこで本研究では、下肢筋と咀嚼筋における肥大機構の解明を目的として、以下の2つの実験を行った。すなわち、実験1では、足底筋を対象として機能的過負荷によるIGF-IおよびGrowth hormone receptor(以下、GH receptorとする)の発現量の変化について観察を行った。また、実験2では、咀嚼運動による咬筋の肥大に及ぼす筋分化制御因子の影響について検討を行った。

[方法]

1. 実験およびグルーピング

1) 実験1

実験にはWistar系雄性ラット34匹を用い、10週齢時に17匹に対し下垂体の摘出を行った。11週齢時にすべてのラットに対し、片側の足底筋の協働筋切除を腓腹筋とヒラメ筋を遠位から1/2切除することによって実施した。その5日後から、トレッドミルによる走行運動を行わせることによって機能的過負荷を与えた。なお、反対側の足底筋に対しては偽手術を施した。そして、機能的過負荷3日後と14日後に、下垂体摘出および非摘出ラットの機能的過負荷側および対照側の足底筋を摘出し、実験に供した。

2) 実験2

実験にはWistar系雄性ラット28匹を用い、すべてのラットを離乳直後の3週齢から粉末飼料にて飼育した。4週齢時に14匹に対し下垂体の摘出を行い、10週齢時に下垂体摘出および非摘出ラットそれぞれ7匹に対し、粉末飼料を固形飼料に変更して飼育した。すなわち、実験のグループは、実験期間を通して粉末飼料にて飼育した群、粉末飼料を固形飼料に変更して飼育した群、下垂体を摘出し粉末飼料にて飼育した群、下垂体を摘出し粉末飼料を固形飼料に変更して飼育した群の4群とした。そして、各群16週齢になった時点で咬筋浅層部を摘出し、実験に供した。

2. 下垂体摘出術

下垂体の摘出はKoyamaの方法に従い、外聴道法を用いて行った。すなわち、ラットの外聴道から鼓室の骨壁を貫通させるように注射針を挿入し、接続された注射筒の内筒を軽く引くことによって下垂体を摘出した。下垂体摘出の正否は、直接視覚的に確認した。

3. 筋線維横断面積の測定

筋を凍結固定した後、 -25°C のクリオスタットにて、厚さ $10\mu\text{m}$ の連続横断切片を作製した。その後Actomyosin ATPase染色、およびNADH-TR染色を施すことによって筋線維タイプを分類し、それらの筋線維横断面積を測

定した。

4. IGF-I mRNAとGH receptor mRNAの測定

実験1の協働筋切除3日後と14日後に、足底筋のIGF-I mRNAとGH receptor mRNAの測定を行った。RNAの抽出は、AGPC法を用いて行った。IGF-I mRNAとGH receptor mRNAの測定はRNase protection assayを用いて行った。 $40\mu\text{m}$ のRNAを ^{32}P でラベルされたIGF-IおよびGH receptorリボプローブとhybridさせ、その後RNase T_1 とRNase Aとに反応させた。この処置によって分解されなかったRNAをacrylamideゲルにて電気泳動し、オートラジオグラフィにて検出した。

5. 筋分化制御因子の測定

実験2の咬筋浅層部に対し、MyoD、Myf-6およびmyogeninの測定を行った。Laemmliの方法に従い、筋タンパク $12\mu\text{m}$ をSDS-PAGEに負荷し、タンパクの分離を行った。一次抗体として、それぞれMyoD、Myf-6およびmyogeninに対するポリクローナル抗体を用い、その後ビオチン標識二次抗体、およびペルオキシターゼ標識streptavidinと反応させ、diaminobenzidineによって検出した。

6. 統計処理

足底筋における各群間の差の検定は繰り返し測定のある一元配置の分散分析を、咬筋における各群間の差の検定は一元配置の分散分析を用い、さらにPost-hocテストを施すことによって多重比較を行った。

[結果と考察]

1. 実験1

1) 筋重量および筋線維横断面積について

下垂体の有無に関わらず、機能的過負荷によって足底筋の筋重量は有意に増加した($p < 0.05$)。筋線維横断面積の観察においても、下垂体の有無に関わらず機能的過負荷によって足底筋の遠位部、近位部ともに筋線維の肥大が観察され、遠位部ではすべてのタイプの筋線維が、近位部ではtype II B線維以外の筋線維が有意に肥大した($p < 0.05$)。これらの結果から、足底筋の筋肥大には下垂体の摘出が関係しないことが示唆された。

2) IGF-I mRNAとGH receptor mRNAについて

機能的過負荷3日後の足底筋のIGF-I mRNAは、下垂体摘出の有無に関わらず発現量が増加する傾向が認められ、且つ、近位部よりも遠位部において顕著であった。一方、GH receptor mRNAは、下垂体摘出の有無に関わらず、機能的過負荷3日後、14日後のいずれにおいても、機能的過負荷によってその発現量が低下する傾向が認められた。これらの結果から、機能的過負荷による筋肥大

は成長ホルモンには依存しない局所的なIGF-Iによって調節されている可能性が示唆された。

2. 実験 2

1) 筋線維横断面積について

下垂体を摘出した群の咬筋筋線維横断面積は、非摘出のそれに比して、有意に低値を示した($p < 0.05$)。また、下垂体の有無に関わらず、粉末飼料を固形飼料に変更して飼育した群における咬筋筋線維横断面積は、粉末飼料にて飼育した群と比較して有意な増加が認められた($p < 0.05$)。これらの結果から、咀嚼運動による咬筋の肥大が下肢筋と同様に成長ホルモンとは無関係な機構によって調節されていることが示唆された。

2) 筋分化制御因子について

下垂体の摘出によって、Myf-6およびmyogeninの変化

は認められなかったものの、MyoDの有意な低下が認められた($p < 0.05$)。なお、飼料形態の変更によるMyoD、Myf-6、およびmyogeninの変化は認められなかった。これらの結果から、筋分化制御因子のMyoDが下垂体摘出による咬筋の発育阻害に関係していることが示唆された。

以上の本研究の結果から、全身運動および咀嚼運動に重要な働きをする足底筋および咬筋の機能的過負荷に伴う肥大は、成長ホルモンとは無関係な機構によって調節されており、その肥大機構として成長ホルモンには依存しない局所的なIGF-Iが重要な役割を果たしていること、および筋分化制御因子の一つであるMyoDが下垂体摘出による咬筋の発育阻害に関連していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

近年、国民の健康に対する関心は非常に高く、咬合・咀嚼と全身の機能や健康との関連が注目されている。機能的咀嚼系における筋の役割は非常に大きく、その発育や劣化の機構の解明は歯科医学・健康科学的見地から重要な課題である。

申請者は、咀嚼筋である咬筋と下肢筋である足底筋を用いて、ラット骨格筋の肥大のメカニズムに関する研究を行った。すなわち、足底筋の肥大に及ぼすIGF-IおよびGH receptor mRNAの影響を検討するために、下垂体を摘出せずに機能的過負荷を与えた脚とその対照脚、下垂体の摘出後に機能的過負荷を与えた脚とその対照脚を設定した。そして、下垂体の有無に関わらず、1) 機能的過負荷によって筋重量は有意に増加し、遠位部ではすべてのタイプの筋線維が、近位部ではtype II B線維以外の筋線維が有意に肥大すること、2) 機能的過負荷によってGH receptor mRNAの発現量が低下し、IGF-I mRNAのそれは増加傾向にあり、特に遠位部において顕著であることを確認した。さらに、咬筋の肥大に及ぼす筋分化制御因子(MyoD, Myf-6, myogenin)の影響を検討するために、下垂体を摘出せずに実験期間を通して

粉末飼料で飼育した群、および固形飼料に変更して飼育した群、下垂体の摘出後に粉末飼料で飼育した群、および固定飼料に変更して飼育した群の4群を設定した。そして、1) 下垂体の有無に関わらず、固形飼料群の咬筋の筋線維横断面積は、粉末飼料群に比して、有意に高値を示すこと、2) 下垂体の摘出によって、Myf-6およびmyogeninの変化は認められないが、MyoDは有意に低下すること、飼育飼料形態の変更による筋分化制御因子の変化は認められないことを確認した。

以上の結果から、骨格筋の機能的過負荷に伴う肥大は、成長ホルモンとは無関係な局所的なIGF-Iが重要な役割を果たしていること、加えて、MyoDが下垂体摘出による咬筋の発育阻害に関連していることを示唆した。

本研究は周到な研究計画と高度な実験技術とによって遂行され、また、得られた結果は歯科医学のみならず、健康科学ならびに関連諸学科の進歩と発展に寄与するところが大きいと判断される。また、提出された本論文は多くの文献を参考に、方法、結果についての充分かつ妥当な考察が加えられており、審査の結果、学位授与に値すると判定した。