

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏 名 (本籍) 森 愛 美 (東京都)
博士の専攻分野 博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号 甲 第 413 号
学位授与年月日 平成 26 年 3 月 14 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Role of Occlusion in Masseter Muscle Acetylcholine Receptor Clustering
(咬筋のアセチルコリン受容体クラスター形成における咬合の役割)
Journal of Dental Research、第 92 巻 4 号 352 項~357 項掲載 平成 25 年 4 月 1 日発行
論文審査委員 主査 教授 大井田新一郎
副査 教授 山根 明 副査 教授 朝田芳信

内 容 の 要 旨

【序論】

mitf 遺伝子に突然変異をもつ小眼球症マウス(*mi/mi*)は、破骨細胞の異常により歯槽骨が吸収されないため、全ての歯が萌出できず、咬合することができない。このマウスを歯の萌出不全モデルとして用いることで、成長発育過程における咬合様式の違いが咀嚼筋の発達に及ぼす影響を調べることができる。

ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)クラスター形成は、神経筋接合部のシナプス形成において運動神経から骨格筋への神経シグナルの効率的な伝達のための重要な出来事である。神経筋接合部における nAChR クラスター形成は、神経と筋繊維が結合する以前に開始される。シナプス形成に伴い、レセプターの密度とクラスターの体積は増加し続け、それぞれの後シナプス領域はいくつかの前シナプス末端より神経支配される。約 2 週齢で、これらの末端のほとんどが除去され、単一の神経末端がそれぞれの神経筋接合部に残る。2 週齢を経過した後、連続したプレツェル様の形態の nAChR クラスターが形成され、正常な発達過程の間にクラスターは断片化し、断片数と体積は増加していく。

マウスにおいて吸綴から咀嚼への摂食様式の変化は歯の萌出とともに起こり、2~3 週齢で咬合が開始される。咬合とは上顎と下顎の歯が接触するときに出現する筋、関節、そして結合組織のような口腔顔面における全ての活動、および末梢、中枢系神経系の全ての活動と定義される。咬合の開始は咀嚼筋に多様な変化を引き起こす。例えば、骨格筋繊維の急速な成長や nAChR の転換と除去の進行などである。しかしながら、咬合が咀嚼筋の性質におけるこのような変化にどの程度寄与しているかは知られていない。

本研究の目的は、小眼球症マウスを用いて、咬筋の神経筋接合部での nAChR クラスター形成における咬合の役割を明らかにすることである。

【材料と方法】

ヘテロ(*mi/+*)マウスを繁殖させ、得られた野生型(*+/+*)マウスと *mi/mi* マウスを実験に用いた。*+/+*、*mi/mi* は共に生後 3 週齢まで母乳で飼育し、その後離乳させた。離乳後 *mi/mi* には粉末飼料を与え、*+/+* は 2 グループに分け、一方は粉末飼料を与え、もう一方は固型飼料を与えた。生後 1、4、12 週齢目にそれぞれ 6 匹ずつを安楽死させ、咬筋と腓腹筋を摘出し、直ちに凍結した。筋のほぼ中央付近の厚さ 25 μ m の凍結切片を作製し、 α -bungarotoxin により nAChR クラスターの染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元的に解析し、クラスターの形態の観察や、クラスターを構成する断片数およびクラスターの体積を計測した。腓腹筋は、*mitf* 遺伝子の変異自体が筋の nAChR クラスターへ及ぼす影響を調べるために用いた。

【結果】

咬筋のアセチルコリン受容体クラスターの形態については、1 週齢では *+/+* と *mi/mi* との間で著しい違いは観察されなかった。4、12 週齢においては、固型飼料又は粉末飼料を与えた *+/+* の間では顕著な形態の違いは観察されなかったが、*+/+* の 2 群と比較して *mi/mi* の方が断片化されたクラスターが多く観察された。腓腹筋においては、どの週齢においても全ての群の間で顕著なクラスターの形態の差は観察されなかった。

1 週齢の咬筋では、1 つのクラスターに含まれる断片数の平均値は *+/+* と *mi/mi* でそれぞれ 1.01 と 1.04 だった。1 つの nAChR クラスターに含まれる断片数の最大値は *+/+* と *mi/mi* でそれぞれ 2 と 3 だった。断片数の平均値は次第に増加し、4 週齢では *mi/mi* は 1.53 と、固型飼料又は粉末飼料を与えた *+/+* の 1.17 および 1.25 よりも統計学的に有意に大きな値だった ($p < 0.01$)。断片数の最大値は *mi/mi* では 8 で、固型飼料又は粉末飼料を与えた *+/+* の 4 よりも大きな値だった。12 週齢では 1 つの nAChR クラスターに含まれる断片数は固型飼料で 1.47、粉末飼料で 1.76 で、*+/+* よりも、*mi/mi* が 2.61 と有意に大きな値だった ($p < 0.01$)。断片数の最大値は固型飼料又は粉末飼料を与えた *+/+* の 2 群では共に 5 だったが、*mi/mi* では 12 であった。

腓腹筋においては、1 週齢では 1 つの nAChR クラスターに含まれる断片数の平均値は *+/+* と *mi/mi* でそれぞれ 1.06 と 1.05 だった。1 つの nAChR クラスターの断片数の最大値は *+/+* と *mi/mi* とも 2 だった。断片数の平均値や最大値は、その後、全ての群で増加したが、4、12 週齢共に全ての群の間で有意な差は見られなかった。

nAChR クラスターの体積については、1 週齢の咬筋において *+/+* と *mi/mi* の間で有意な差はなかった。その後体積は次第に増加したが、*mi/mi* の増加の割合は粉末飼料又は固型飼料を与えた *+/+* よりも少なかった。4 週齢においては、*mi/mi* の nAChR クラスターの体積は固型飼料又は粉末飼料を与えた 2 群の *+/+* よりも約 40% 少なく ($p < 0.01$)、12 週齢では約 50% 少なかった ($p < 0.01$)。腓腹筋においては、どの週齢においても、群間で有意な差は見られなかった。

【考察】

本研究では、*+/+* で咬合出現後の 4 週齢と 12 週齢において、固型飼料又は粉末飼料を与えた *+/+* と比較して *mi/mi* の咬筋の nAChR クラスターの過度の断片化と体積の減少が観察された。一方、*mitf* 遺伝子の変異自体が筋の nAChR クラスターへ及ぼす影響を調べるために用いた腓腹筋では、*mi/mi* と *+/+* の間でそのような有意差は観察されなかった。正常な成長過程の間、連続したプレッツェルの形をした nAChR クラスターの断片数と体積は次第に増加する。また、老化の

過程では、神経筋接合部における nAChR クラスターの断片数は増加し続け、一方 nAChR クラスターの体積は減少する。カロリー制限と運動はそのような老化による変化の進行を遅らせることが知られている。我々の結果は *mi/mi* の咬筋の神経筋接合部において nAChR クラスターの形成異常が発生していることを示している。そして、それは咬合が咬筋の神経筋接合部における正常な nAChR クラスター形成に必須であることを示唆している。

【結論】

咬合様式の違いは咬筋の神経筋接合部における nAChR クラスター形成に影響を与える。