

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15748

研究課題名(和文) GDNFを用いた下歯槽神経損傷後の感覚麻痺に対する積極的新規治療法の開発

研究課題名(英文) Functional recovery of injured inferior alveolar nerve using peripheral glial cell line-derived neurotrophic factor

研究代表者

篠田 雅路 (SHINODA, Masamichi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：20362238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：下歯槽神経切断モデルラットを用いて下歯槽神経支配領域への機械刺激に対する逃避反射閾値(MWRT)を経時的に解析し、感覚機能回復に対するglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の役割を検討した。下歯槽神経切断後、GDNFの持続投与により、感覚機能回復が有意に促進された。さらに、GDNFとGFRalpha1中和抗体の同時持続投与により、下歯槽神経切断後のMWRTの回復が阻害された。よって、下歯槽神経損傷後の下歯槽神経支配領域の感覚機能回復に対して切断部組織へのGDNF投与は促進的に作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the involvement of peripheral glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) application in the functional recovery of facial mechanical nociception following inferior alveolar nerve transection (IANX). GDNF was expressed in infiltrating inflammatory cells such as macrophages and neutrophils, and GDNF expression was enhanced in the IAN injured region. Continuous GDNF administration to the injury site enhanced axonal regeneration of IAN and recovery of nociceptive mechanical sensitivity of the facial skin. GDNF neutralization using a neutralizing antibody at the injury site inhibited the recovery of nociceptive mechanical sensitivity of the facial skin after IANX. GDNF signaling at the IANX site accelerates the functional recovery of mechanical nociception of the facial skin following IANX. Therefore, GDNF application at the IANX site may be an attractive therapeutic target for the functional disturbance of pain sensation of the facial skin following IANX.

研究分野：口腔生理学

キーワード：神経再生 GDNF 下歯槽神経損傷

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域の外科的治療が原因で下歯槽神経が損傷を受け、これによって引き起こされる下歯槽神経支配領域の感覚麻痺は、高頻度に起こる偶発症の一つである。いったん感覚麻痺が発症すると、回復までに年単位で時間がかかり、回復しない症例もあるといわれている。現在、このような感覚麻痺に対してビタミン製剤や ATP 製剤などを用いた対症療法が行われる。これらの治療は、損傷再生機構が明らかにされていないために Evidence Based Medicine (EBM) に基づいた原因療法であるとは言えない。末梢神経系に存在するシュワン細胞は神経損傷の刺激で増殖・活性化し、さまざまな神経栄養因子を分泌するとともに、ラミニンやコラーゲンからなる基底膜を作って軸索の足場を形成することで、再生軸索の伸長を助けることが明らかにされている(Int Rev Neurobiol. 2013;108:257-75)。神経栄養因子の一つである glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) は、末梢神経損傷後に損傷部のシュワン細胞において発現が増加すること、GDNF の末梢神経損傷部への投与によって損傷末梢神経の形態学的な再生が促進されることがわかっている (Glia. 2013;61(7): 1029-40, Muscle Nerve. 2012;46(1):122-4)。さらにわれわれの予備実験において、下歯槽神経切断 12 時間後から切断部の GDNF mRNA 発現が有意に増加することが判明している。以上の結果から、下歯槽神経切断部において GDNF タンパク量が増加し、損傷下歯槽神経の形態学的な再生が促進されることは間違いない。しかし、再生した神経が損傷前と同様な機能を有するかどうかについては不明である。このように GDNF をターゲットにした新たな治療法の開発には GDNF が関与する神経再生メカニズムを解明する必要がある。

2. 研究の目的

ラットの下歯槽神経を切断した下歯槽神経切断モデルを作製し、下歯槽神経支配領域の感覚変化を経時的に解析し、同時に下歯槽神経切断部の GDNF 定量および GDNF 受容体である GFR α 1 陽性細胞の同定を行う。さらに各種 GDNF の持続投与による損傷下歯槽神経の興奮性と形態学的変化の相関を経時的に解析し、下歯槽神経損傷後の神経再生における GDNF の機能的役割の解明および最適な投与方法の確立を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

実験には 6~7 週齢、雄性の Sprague Dawley ラットを用いた。ブトルファノール酒石酸塩、メドミジンおよびミタゾラムを混合した麻酔薬で深く麻酔し、左頬部皮膚と咬筋に切開を加え、低速のラウンドバーを用いて下顎骨表面を切削して IAN を露出させた。実体顕微鏡下でオトガイ孔から遠位 5 mm の部分で

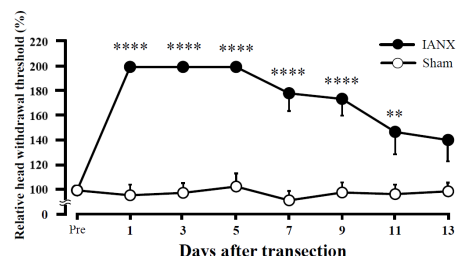
左 IAN 切除 (IANX) を行い、損傷 IAN を下顎管に戻した後、皮膚・筋肉切開部位を 5-0 絹糸で縫合した。

IANX あるいは Sham 処置後の侵害受容感覚の変化を確認するために、イソフルラン吸入によって後肢屈曲反射が観察できる一定の麻酔深度に保ち、左顔面皮膚に対する機械的刺激によって誘発される頭部引っ込め反射閾値 (MHWT) を測定した。

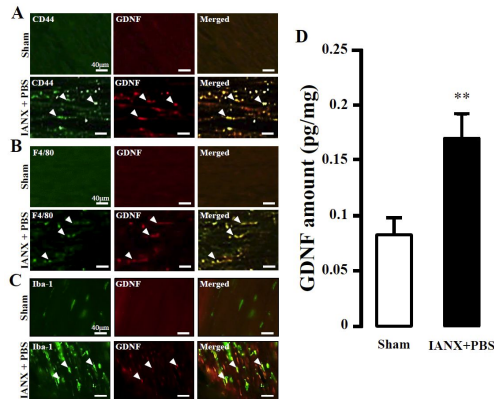
IANX 後 5 日目に、ELISA キットを用いて IANX 部位の GDNF 量を測定するとともに、損傷 IAN を含む下顎骨を取出して脱灰後、切片標本作製し、免疫組織学的解析を行った。つぎに、生理活性物質の持続放出を行うゼラチンベースのハイドロゲルである MedGel とフィブリンゲルに 20 μ l の GDNF を混和して IANX 部位へ填入した IANX+GDNF 群と、同基剤に 20 μ l の 0.01M phosphorylated buffered saline (PBS) を混和して填入した IANX+PBS 群を作製した。IANX 後 5 日目に、ラットをペントバルビタールナトリウムにて深く麻酔し、生理食塩水で経心的灌流後、4% パラホルムアルデヒドにて固定した。さらに、損傷 IAN の組織学的回復を検証するため、生理食塩水に溶解した 2.5 μ l FluoroGold (FG) を 2% イソフルランによる浅麻酔下で、30 ゲージの注射針を用いて顔面皮膚に注入した。FG 投与 3 日後 (IANX 後 8 日目) に 0.1M PBS で希釈した 4% パラホルムアルデヒド固定液で経心的灌流を行い、三叉神経節 (TG) を取出して切片標本作製した。FG で標識された TG 細胞の細胞面積を計測し、細胞面積 200 μ m² ごとに TG 細胞数をカウントし、ヒストグラムを作成した。GDNF 局所投与が侵害受容感覚機能回復に及ぼす影響を確認するため、IANX+GDNF 群及び IANX+GDNF 群へ GDNF family receptor alpha 1 (GFR α -1) 中和抗体 (GFR α 1 Nab) を IANX 直後から 13 日目まで毎日 IANX 部位へ投与した IANX+GDNF+GFR α 1 Nab 群における MHWT の測定を行った。また、IANX 後 8 日目に、GFR α -1 を発現する Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), TRP vanilloid 1 (TRPV1) または Tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel (Nav1.8) 陽性 TG 細胞数を免疫組織化学的に解析した。

4. 研究成果

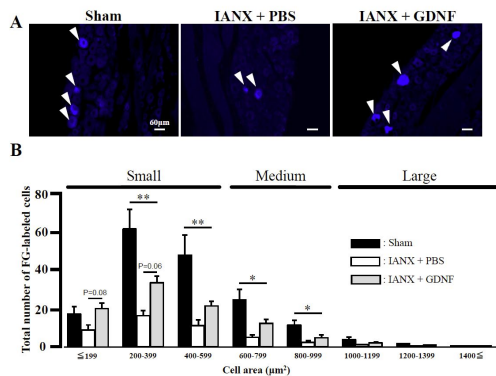
(1) IANX により MHWT は Sham 群に比較して 1 日目から 11 日目まで有意に高い値を示したが、この MHWT の有意な上昇は 13 日目に消失した。



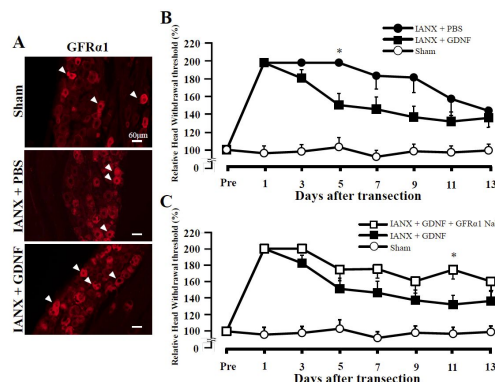
(2) IANX 後 5 日目に IANX 部位への炎症性細胞浸潤を検索した結果、IANX + PBS 群では GDNF を発現するリンパ球、好中球およびマクロファージの浸潤が観察されたが、Sham 群では認められなかった。また、IANX+PBS 群における IANX 部位の GDNF 量は、Sham 群と比較し有意な増加を認めた。



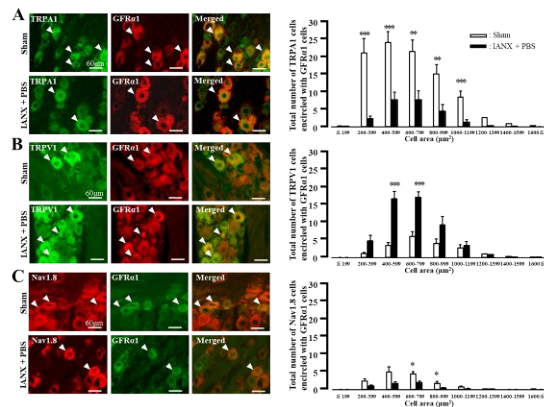
(3) IANX 後 5 日目に、IANX 部位への GDNF 投与により、FG 標識にされた小型 (細胞径: $\leq 199 \mu\text{m}^2$, $200\text{--}399 \mu\text{m}^2$) TG 細胞の有意な増加を認めた。



(4) GDNF レセプターである $\text{GFR}\alpha\text{-1}$ が TG 細胞にて発現していることを免疫組織化学的に確認した。GDNF 投与により MHWT の有意な回復が促進され、さらに GDNF 投与による MHWT の回復促進は切除部位への $\text{GFR}\alpha\text{1}$ Nab 投与により有意に抑制された。



(5) IANX 後 8 日目に、 $\text{GFR}\alpha\text{1}$ 陽性の TRPA1 および Nav1.8 陽性細胞数は有意に減少し、TRPV1 陽性細胞数の有意な増加を認めた。このことから GDNF が侵害刺激を受容するイオンチャネルの発現調節に関与していることが示された。



以上の実験結果は、IANX 部位に浸潤したマクロファージおよび好中球から放出された GDNF が損傷感覚神経終末に発現する $\text{GFR}\alpha\text{1}$ と結合することにより、侵害受容性の無髄および細い有髄神経の再生が促進されることを示している。すなわち IANX 部位の GDNF シグナル伝達の亢進が軸索形成を加速して侵害受容性神経の再生を促すことにより、IAN 損傷後の機械的侵害受容の機能的回復をもたらしている可能性がある。さらに本研究結果では、GDNF 付加 MedGel を用いた IANX 部位への GDNF の持続的投与は、IANX 後の顔面皮膚の機械的侵害受容の機能的回復に有効であることを確認した。したがって、生理活性物質の持続放出が可能なゼラチンベースのハイドロゲルである MedGel による GDNF 投与は、IANX 後の顔面皮膚における正常な痛覚受容機能回復を促進するための治療の選択肢となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Watanabe M, Shinoda M, Batbold D, Sugano N, Sato S, Iwata K. (2018) Peripheral glial cell line-derived neurotrophic factor facilitates the functional recovery of mechanical nociception following inferior alveolar nerve transection in rats. J Oral Facial Pain Headache. 査読有 in press. <https://jop.quintessenz.de/index.php?doc=home>
2. Sato M, Motoyoshi M, Shinoda M, Iwata K, Shimizu N. (2016) Low-intensity pulsed ultrasound accelerates nerve regeneration following inferior alveolar nerve transection in rats. Eur J Oral Sci. 査読有

124(3):246-50. doi: 10.1111/eos.12271.

〔学会発表〕(計 5件)

1. Shinoda M, Watanabe M, Iwata K. (2018年)
Effect of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Application on the Functional Recovery of Mechanical Nociception following Inferior Alveolar Nerve Transection in Rats. American Pain Society Scientific Summit 2018
2. 鳥海 拓, 渡辺雅弘, 篠田雅路, 菅野直之, 岩田幸一, 磯川桂太郎, 本田雅規 (2017年) フット下歯槽神経切除モデルにおけるiPS細胞由来神経堤細胞の移植効果 第59回歯科基礎医学会学術大会
3. 渡辺雅弘, 篠田雅路, 岩田幸一, 菅野直之, 佐藤秀一 (2017年) 下歯槽神経切除後の顔面皮膚感覚機能回復に対するGDNFの有用性 第22回日本口腔顔面痛学会学術大会
4. 渡辺雅弘, 篠田雅路, 菅野直之, 佐藤秀一, 岩田幸一 (2016年) 下歯槽神経切除後の顔面皮膚感覚機能回復に対するGDNFの有用性。第58回歯科基礎医学会学術大会
5. 本田雅規, 鳥海拓, 岡篤志, 篠田雅路, 岩田幸一, 磯川桂太郎 (2015年) 下歯槽神経切除モデルにおける細胞移植の効果 第57回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1. 日本大学研究者情報システム
<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/82/0008141/profile.html>

2. 日本大学歯学部生理学講座ホームページ
<https://dery18014.wixsite.com/physiology>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 雅路 (SHINODA, Masamichi)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：20362238

(2) 研究分担者

片桐 綾乃 (KATAGIRI, Ayano)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号：40731899

岩田 幸一 (IWATA, Koichi)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：60160115

久保 亜抄子 (KUBO, Asako)
日本大学・歯学部・ポストドクトラルフェロー
研究者番号：70733202

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()