

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2020

課題番号：15K20509

研究課題名(和文) 血管内皮増殖因子は末梢神経損傷後の神経再生に関与するか

研究課題名(英文) Involvement of vascular endothelial growth factor in regeneration of injured peripheral nerve.

研究代表者

金丸 博子(塚田博子)(KANEMARU, Hiroko)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30464019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、障害を受けた末梢神経の再生と血管新生との関係性を明らかにするため、マウスの下歯槽神経切断モデルを用いて、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)とその受容体(VEGF-R)の発現パターンを免疫組織学的に検討した。VEGFおよびVEGF-Rは下歯槽神経切断を契機に、再生軸索の伸長に先行して活性化することを明らかにした。また、VEGF中和抗体の投与によるVEGF-VEGFRシグナルの阻害は血管内皮細胞の遊走とその後続く軸索伸長を抑制した。以上の結果から、神経損傷後にはVEGF-VEGFRシグナルの即時応答がその後の神経再生に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経損傷後の知覚障害や疼痛には交感神経ブロックやレーザー照射など、血流増加を促すような治療法が従来から行われており、臨床的な治療効果をあげているものの、その詳細なメカニズムについてはわかっていない。本研究により軸索再生にはVEGF-VEGFRシグナルの活性化がその後の神経再生に重要であることが示され、これは上記の臨床的背景を裏付ける結果である。本研究結果は末梢神経再生の機序の解明につながるものであり、神経再生過程で生じる神経腫などの神経病変やそれに伴う難治性疼痛の治療法の開発へ貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the chronological changes in the expression pattern of VEGF-VEGFR signaling, and investigated the relationship between angiogenesis and early peripheral nerve regeneration after nerve transection in animal models. This study revealed that transection of inferior alveolar nerve (IAN) induced the expression of VEGF and VEGFR immediately after injury, prior to the commencement of nerve regeneration. A local administration of antibody to VEGF inhibited the expression of CD31 in the gap between proximal and distal stumps and the elongation of the nerve fibers from the proximal stump. These results suggest that immediate response of VEGF-VEGFR signaling to nerve injury plays a crucial role in local angiogenesis, resulting in a trigger for the regeneration of the nerve fibers in mouse IAN.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：下歯槽神経 末梢神経損傷 神経再生 VEGF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科治療や外科処置により下歯槽神経を損傷し、その後に慢性の難治性疼痛や知覚障害を生じる事例はしばしば認められる。こうした症例にはレーザー照射や星状神経節ブロックなどの血流を増加させるような治療法が従来から行われている。これらの治療法は臨床的な治療効果をあげているが、疼痛の軽減および神経再生・回復のメカニズムについては不明なままである。

血管内皮増殖因子 (VEGF: Vascular endothelial growth factor) は主に胎生期における脈管形成や血管新生に関与し、生体では腫瘍より過剰発現されて血管過剰造成を生じさせ、癌転移に関与している事で有名である。脳神経においては、挫傷した脳組織周辺ではこの VEGF 活性が亢進しており、これにより血流障害が改善し脳組織の修復起点に働いているという報告がある。一方で、血管形成の無い角膜のような組織でも末梢神経損傷時の VEGF 投与が神経修復を促進させることが報告されている。また、当講座では下歯槽神経損傷後の難治性疼痛を有する患者から、症状の原因となっていると考えられた神経腫を摘出し、電子顕微鏡で観察したところ、神経腫内に異常な血管増殖像がある事を明らかにした。以上の報告は、神経病変と血管には密接な関係がある事を示唆している。したがって、従来、臨床的に有効であった治療法のメカニズムは単純な血流増加によるものではなく、VEGF が神経軸索に直接作用している結果である可能性がある。本研究により VEGF と損傷末梢神経組織との関係性を明らかにすることは、末梢神経再生の機序を解明し、神経再生に付随して生じる知覚障害や難治性疼痛に対する治療法や予防法の確立へつながるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は下歯槽神経切断モデル動物を用いた基礎的分析により、損傷を受けた末梢神経再生と血管内皮増殖因子との関連性を明らかにすることである。そのため、まず神経切断後の神経および血管再生の過程を形態学的に評価し、神経再生過程における血管内皮増殖因子 VEGF およびその受容体である VEGFR の経時的発現や、VEGF の機能障害が神経再生に与える影響について組織学的に検討を行なった。

3. 研究の方法

(1) 下歯槽神経切断モデル動物

8-12 週齢の C57BL/6J マウスをセボフルランの吸入により麻酔導入し、抱水クロラルの腹腔内投与により深麻酔を維持した。マウスの頬部に皮膚切開を施し、下顎骨を切削して下歯槽神経を剖出した後に完全切断した。術 6 時間後、1、2、3、5、7 日で還流固定し、通方に従って凍結切片を作成した。

(2) 神経軸索再生過程における血管再生および VEGF シグナルの関連性についての検討

神経軸索と血管の経時的再生について、それぞれ PGP9.5 および CD31 の免疫染色を行い、組織学的に評価した。また、同時期における VEGF-A および VEGF-B の発現パターンについても免疫染色およびウェスタンブロットにより検討した。

(3) VEGF の機能障害による影響の検討

神経切断後の VEGF シグナルの活性時期に抗 VEGF 中和抗体を神経切断部に投与し、神経再生に対する影響を神経切断部の形態および DiI を用いて逆行性標識された三叉神経細胞数により評価した。

4. 研究成果

(1) 下歯槽神経切断後の神経軸索と血管の再生過程 (図 1)

下歯槽神経切断後 6 時間および 1、2、3、5、7 日目の神経軸索と血管の分布の様子を観察した。切断後 6 時間では明らかな構造上の変化は認めなかったが(a)、術後 1 日目になると切断の遠心側の PGP 陽性神経軸索が消失しており、ワーラー変性を生じた結果と考えられた(b)。切断後 2 日目になると、血管の分布を示す CD31 陽性細胞が切断端間の領域に強く認められるようになり(c)、切断後 3 日目には血管走行に伴走するように神経軸索が近心断端から伸長する様子が観察された(d)。神経軸索は 5~7 日目に切断間を超えて伸長し、これとともに CD 31 陽性細胞の発現は減弱するが、神経束内に存在することがわかった(e, f)。

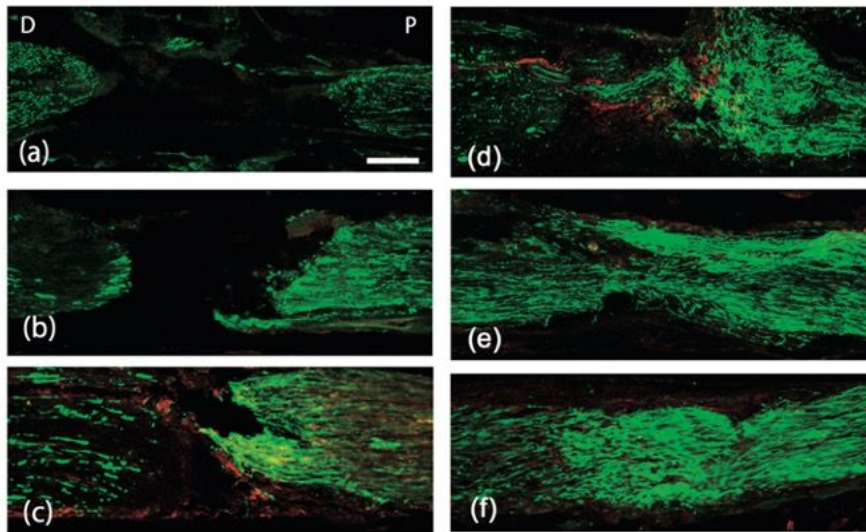


図1 (a) 6時間後 (b) POD1 (c) POD2 (d) POD3 (e) POD5 (f) POD7
PGP9.5 (緑) CD31 (赤) 二重染色 Scale bar=200 μm D:遠心 P: 近心

(2) VEGF-VEGFR シグナルの発現 (図 2)

正常神経軸索、下歯槽神経切断後 1、2、3、5、7 日目における VEGF-A および VEGF-B の受容体である VEGFR-1 および VEGFR-2 の経時的発現パターン(図 A)とその発現強度(図 B)を検討した。両受容体ともに正常神経軸索には発現を認めないが、神経切断後 2 日目に発現が上昇し、3 日目にピークを迎えた後、軸索の接続が完了すると考えられる 5、7 日目頃には減弱する様子が観察された。また VEGF の経時的発現パターンについてウエスタンブロットにより検出したところ、切断後 2 日目に増強し、やはり神経再生が完了すると考えられる 7 日目頃には減弱した(図 C)。

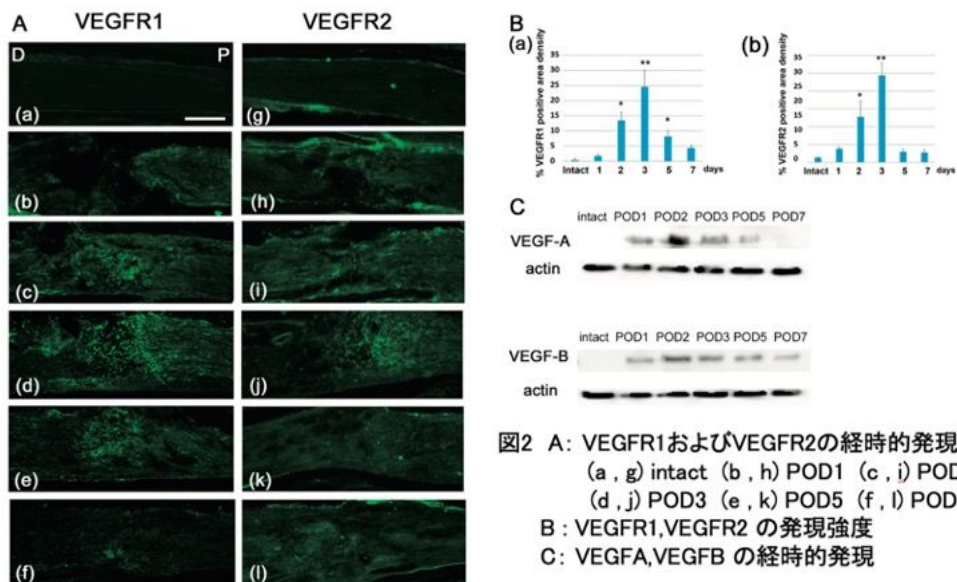


図2 A: VEGFR1およびVEGFR2の経時的発現
(a, g) intact (b, h) POD1 (c, i) POD2
(d, j) POD3 (e, k) POD5 (f, l) POD7
B: VEGFR1, VEGFR2 の発現強度
C: VEGFA, VEGFB の経時的発現

(3) 抗 VEGF 中和抗体投与の影響

上記の結果から、下歯槽神経切断後 7 日程で神経再生は完了し、VEGF-VEGFR シグナルは切断後 2~3 日をピークに活性化することが明らかとなった。この時期に神経切断部に抗 VEGF 中和抗体を局所投与して VEGF シグナル活性を抑制した。術後 7 日目における神経切断部の再生軸索を観察したところ、コントロール群(生理食塩水投与)では再生軸索が遠心方向へ伸長しているが、VEGF 中和抗体を投与すると再生軸索が伸長しない様子が観察された(図 3)。

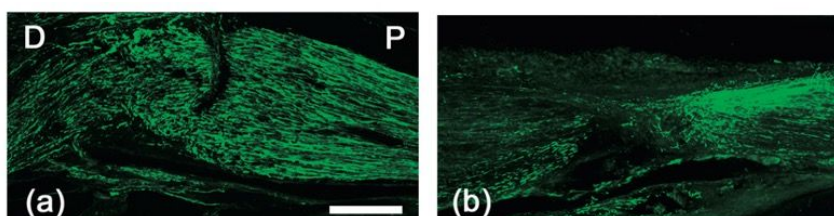


図3 (a)control (b)抗VEGF抗体投与 PGP9.5染色 D:遠心 P:近心 Scale bar=200 μm

また、抗 VEGF 中和抗体を投与すると、神経切断 3 日後における切断端間の血管新生は認められなかった(図 4)。

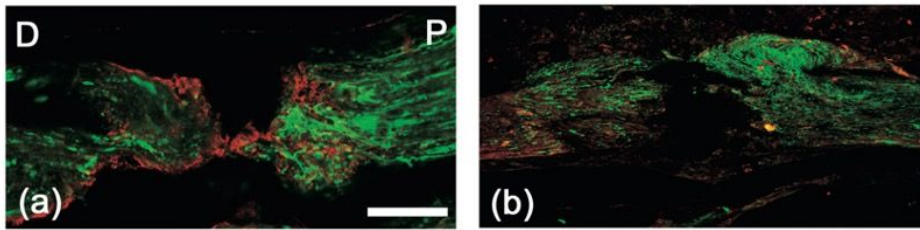


図4 (a)control (b)抗VEGF抗体投与 PGP9.5(緑)CD31(赤)二重染色
D:遠心 P:近心 Scale bar=200 μ m

さらに、DiI による逆行性標識により三叉神経節における DiI 陽性神経細胞数を比較したところ、VEGF 抗体投与群では DiI 陽性細胞が有意に減少しており、神経再生が阻害された様子が観察された(図 5)。

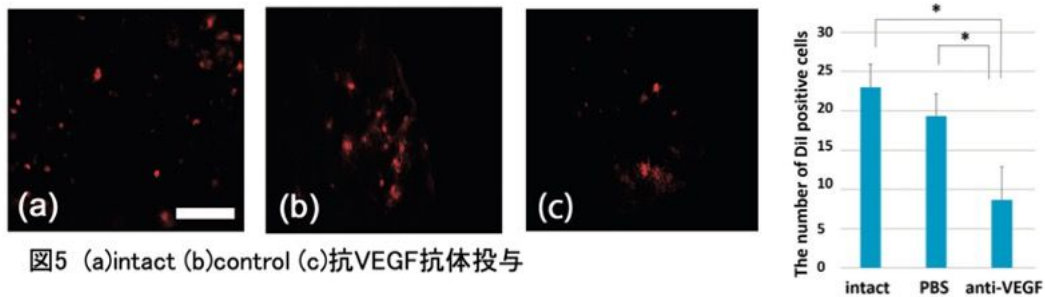


図5 (a)intact (b)control (c)抗VEGF抗体投与

以上の結果より、神経損傷後には VEGF-VEGFR シグナルの即時応答があり、シグナル活性がその後の神経再生に重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yohei NISHIDA, Yurie YAMADA, Hiroko KANEMARU, Atsushi OHAZAMA, Takeyasu MAEDA, Kenji SEO	4. 巻 39
2. 論文標題 Vascularization via activation of VEGF-VEGFR signaling is essential for peripheral nerve regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 287 - 294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.39.287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroko Kanemaru, Yurie Yamada, Atsushi ohazama, Takeyasu Maeda, Kenji seo	4. 巻 9
2. 論文標題 Semaphorin 3A Inhibits Nerve Regeneration During Early Stage after Inferior Alveolar Nerve Transection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37819-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroko Kanemaru, Yurie Yamada, Atsushi Ohazama, Takeyasu Maeda, Kenji Seo
2. 発表標題 Semaphorin 3A inhibits axon regeneration after trigeminal nerve transection
3. 学会等名 Annual meeting of the society for Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金丸博子, 山田友里恵, 大峽 淳, 前田健康, 瀬尾憲司
2. 発表標題 下歯槽神経再生過程への Semaphorin3A の関与について
3. 学会等名 平成29年度新潟歯学会第1回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金丸博子, 山田友里恵, 瀬尾憲司
2. 発表標題 下歯槽神経切断後の軸索再生へのセマフォリン3A の関与
3. 学会等名 第45回日本歯科麻酔学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関