

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19791354
研究課題名（和文） 骨代謝機能に関わるグルタミン酸を分泌する顎関節の三叉神経終末の解析

研究課題名（英文） Analysis of trigeminal glutamatergic terminations in TMJ in relation to bone metabolism

研究代表者
井村 幸介（IMURA KOSUKE）
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号：10415086

研究成果の概要：マウス顎関節部において、神経マーカーである PGP9.5 に対する抗体を用い、下顎頭基部の骨膜相当部位に、PGP9.5 陽性の神経終末様構造を確認した。終末様構造の観察は、骨膜部位への遠心性線維の存在の可能性を強く示唆すると考えられた。また、終末様構造にグルタミン酸トランスポーターの局在が示唆されたが、二重染色による局在性を確認するため、組織切片作成時の工夫が必要であり、今後の検討課題となった。

交付額

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総 計	1,300,000	150,000	1,450,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学
キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

三叉神経系は、顎顔面領域の体性感覚と固有感覚を中枢側に伝達する重要な役割を担う。その際に、興奮性伝達物質としてグルタミン酸が、末梢側から中枢側のシナプス後膜に分泌されることで感覚情報が伝達される。ところが驚くことに、感覚を受容する三叉神経末梢側においても、興奮性伝達物質で

あるグルタミン酸が分泌されることを示唆している報告がある。その報告によると、咬筋の筋紡錘や口蓋の機械刺激受容器に分布する感覚受容神経終末において、グルタミン酸を分泌するために不可欠なトランスポーター（Vesicular glutamate transporters: VGluTs）が発現しており、末梢側においても分泌が生じることを証明している（Li ら, J

Comp Neurol, 2003; Wu ら, Brain Res, 2004; Nunzi ら, J Neurocytol, 2004)。また、三叉神経節細胞（ラット）の 80%以上は、グルタミン酸トランスポーター陽性であり、同様に三叉神経中脳路核においてもグルタミン酸トランスポーター陽性細胞が存在することから、三叉神経系の感覚神経終末で広くグルタミン酸の分泌が生じている可能性がある（Li ら, J Comp Neurol, 2003; Pang ら, J Comp Neurol, 2006）。しかしながら、末梢側におけるグルタミン酸分泌の機能的な意義は今のところ不明である。近年、グルタミン酸の神経伝達物質としての生理作用以外に、tissue engineering の研究分野で、骨への機械刺激によるグルタミン酸分泌が骨代謝に重要であるという研究（骨芽細胞、破骨細胞のグルタミン酸シグナル伝達）が注目されており、臨床応用としてグルタミン酸分泌を制御することで骨形成を促進させるということも試みられている（Mason, Eur Cell Mater, 2004）。本研究課題では、骨代謝に重要であるグルタミン酸が三叉神経末梢分泌性であることを確かめ、グルタミン酸受容体の分布を骨組織で解析し、末梢神経性グルタミン酸分泌の生理的な意義を明らかにする。本研究では顎関節において、骨に分布する三叉神経感覚終末と骨代謝（下顎頭）との関連性に注目する。その理由は、以下の研究報告をもとにしている。

顎関節内においてグルタミン酸受容体の存在が示唆され、咀嚼運動との関連が神経生理学的手法によって報告されている（Be ら, J Neurosci, 1998）。即ち、咀嚼運動によって生じる固有感覚情報の中樞への伝達が、三叉神経末梢側におけるグルタミン酸分泌に影響を及ぼす可能性が高い。分泌されたグルタミン酸が顎関節内のグルタミン酸受容体に働きかけ、この回路をとおして精密な咀嚼

運動に寄与すると思われる。また、四肢骨に対する機械的な刺激が破骨細胞のグルタミン酸受容体の発現を促し、グルタミン酸の分泌と骨代謝に関連があるという報告がある（Szczesniak ら, Bone, 2005）。

骨の修復や成長にとって重要な骨膜には、多くの感覚神経や血管が分布し、大腿骨や頸骨に分布している神経終末において、グルタミン酸の分泌を示唆する報告がある（Mason ら, Bone, 1997; Serr ら, Bone, 1999）。また破骨細胞や骨芽細胞にグルタミン酸受容体が存在しており、骨代謝においてグルタミン酸が重要な役割を担うことが考えられている（Skerry と Genever, TRENDS Pharmacol Sci, 2001; Moriyama と Yamamoto, J Biochem, 2004）。さらに、臨床的所見や *in vitro* の実験系においても骨に分布する末梢神経の存在が骨の発達や修復に重要であると報告されている（Serr ら, Bone, 1999）。

神経系のグルタミン酸の分泌様式として、分泌される部位から標的レセプターまでの距離が遠い、extra(para)-synaptic transmission と呼ばれる情報伝達形式（Li ら, J Comp Neurol, 2000）が存在し、局所的分泌に限らない。近位および遠位の標的細胞にも情報伝達を行い、骨組織の広範な領域に影響を及ぼすことが考えられる。また Serr ら（Bone, 1999）は、神経終末の分布は骨膜に限らず、栄養血管に沿って神経線維が伴行し、グルタミン酸陽性の神経終末が骨髄に分布していることを報告している。

2. 研究の目的

本研究では、顎関節領域に着目し、神経終末の分布を形態学的に解析して、咀嚼運動に応じた生理的な応答により、三叉神経由来の神経終末からグルタミン酸が分泌され、骨代謝に影響を及ぼす可能性があることを形態学的に明らかにする。

最終目標として、グルタミン酸トランスポーターに着目し、骨代謝に関連した神経回路を明らかにする。細胞群(parent cells)の骨組織に対する、局所対応性投射(topographic projection)を明らかにする。いくつか存在するグルタミン酸トランスポーターのサブタイプごとに神経終末を同定し、機能的に異なるグルタミン酸受容体サブタイプの発現パターンをもとにして、骨組織における細胞群を同定する。即ち、三叉神経節あるいは三叉神経中脳路核のどこの細胞群が、顎関節領域の骨代謝において、どのように寄与するのか、トランスポーターと受容体のサブタイプの分布をもとにした機能意義を包含した神経回路の知見を得て、より詳細な機能解析へと研究継続する。

3. 研究の方法

顎関節領域の三叉神経末梢枝の分布状態を把握するために、神経細胞のマーカーである **neuron specific gene product 9.5 (PGP9.5)** に対する抗体を用いて免疫染色を行った。脱灰処理を行った組織において、末梢側の神経線維を可視化するための実験条件を決めた。発色は、通常の DAB 法とニッケルによるシグナル増強法を用いた。さらに、神経線維を正確に追跡するために、一部の標本において連続切片を用いた二次元再構築を試みた。

また、DiI という蛍光物質を用いて（脂質膜上に拡散して神経組織を染色することが可能なトレーサー物質）、標識実験（Heredia ら, J Neurosci Methods, 1991）も行った。パラホルム固定後の頭頸部に DiI を注入して神経終末部を観察した。

最終的には、グルタミン酸トランスポーターについて免疫染色を行う。グルタミン酸トランスポーターに対する抗体と PGP9.5 に対

する抗体を組み合わせ用いて、二重染色を行う。

4. 研究成果

マウス顎関節部において、神経線維の分布を詳細に調べるために、神経マーカーである PGP9.5 に対する抗体を用いて、免疫組織化学法による染色を行った（骨組織を含むため脱灰処理を施した）。その結果、顎関節円板基部および周辺結合組織において、PGP9.5 陽性の神経束の存在、下顎頭基部の骨膜相当部位に、PGP9.5 陽性の神経終末様構造が確認された。

また、一部の PGP9.5 陽性の神経線維について、連続切片による再構築を行った結果、周辺結合組織の神経線維が骨膜相当部位に、側副枝を送る可能性を示した。

DiI による標識実験では、注入部の拡散が原因で、顎関節周囲に存在する神経終末のクリアな標識像は観察できなかった。

これらの結果のなかで、特に、PGP9.5 陽性終末様構造の観察は骨膜部位への遠心性線維の存在の可能性を強く示唆している。また、側副枝が存在する可能性は、今後、詳細な神経支配様式を調べるうえで、重要な手がかりとなる。

脱灰処理後の試料においても、神経組織のマーカーである PGP9.5 を用いて、神経組織をラベルすることが可能であったものの、PGP9.5 でラベルした神経線維に、グルタミン酸トランスポーターの分布を二重染色する目的があるため、グルタミン酸トランスポーターの明確な陽性像を得るための組織切片作成時の工夫(脱灰処理の影響の軽減)が必要となった。

顎関節円板基部において、PGP9.5 陽性の神経終末様構造を検討する場合、骨組織を含めた切片を作成しなければならず脱灰処

理が必須となる。一方で、骨組織の成長および代謝に重要である骨膜において、PGP9.5 陽性終末様構造が存在する結果を得ていたので、骨膜における神経終末様構造に着目した。神経終末を含めて骨膜のみを取り出し、グルタミン酸トランスポーターの明確な陽性像を得るための検討を行った。その結果、グルタミン酸トランスポーター免疫組織化学染色に使用できる可能性を得たので、現在、グルタミン酸トランスポーターと PGP9.5 陽性終末様構造における二重染色を検討中である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井村 幸介 (IMURA KOSUKE)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：10415086