

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791571

研究課題名 (和文) 水分子を指標にした歯の移動に伴う神経-グリア相互作用

研究課題名 (英文) Neural-glia interaction during the tooth movement mediated by the water-selective channel

研究代表者 原田 史子 (HARADA FUMIKO)

(新潟大学・医歯学系・特任助教)

研究者番号：00397150

研究成果の概要：

歯の移動の際の歯根膜ルフィニ神経終末およびその細胞体の存在する三叉神経節におけるアクアポリン (AQP) の局在の変化および他のアクアポリンのサブタイプの発現を明らかにすることを目的に、免疫組織化学的検討を行った。免疫染色により、AQP-1 の免疫反応が三叉神経節の一部の衛星細胞と中型の神経細胞に観察された。また、歯の移動刺激に対する三叉神経節と歯根膜におけるアクアポリン mRNA およびタンパク発現量の変動を検討した。さらに、歯の移動実験の比較実験として、より強い刺激である下歯槽神経切断実験モデルを用い、三叉神経節における AQP-1 mRNA の変動を検討した。歯の移動、神経傷害刺激に対して、AQP-1 のタンパクレベルおよび mRNA レベルの発現に著名な変動は観察されなかったことから、神経の再生過程に AQP-1 が関与する可能性は非常に低いことが考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：神経科学, 脳・神経, アクアポリン, 三叉神経節, 下歯槽神経切断,

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯根膜は豊富な知覚神経支配を受け、感覚装置として機能している。歯根膜の機械受容器として、ルフィニ神経終末が必須の神経終末であることが知られている。このルフィニ神経終末には皮膚機械受容器にみられるような特殊なグリア細胞である終末シュ

ワン細胞が付随している。末梢神経の発生、再生過程には終末シュワン細胞が深く関与することが知られており、これまでの我々の実験から、歯根膜神経の発生、再生過程において終末シュワン細胞が深く関わることを示してきた。

一方、電子顕微鏡的には歯根膜ルフィニ神経終末の軸索終末とシュワン鞘の間に多数

のタコ壺様構造(カベオレ caveole)が発達し、軸索終末とシュワン細胞間、すなわち神経-グリア細胞間に相互作用が存在することが想像されているが、その詳細は不明である。

(2) アクアポリン aquaporin (AQP)は水を特異的に通過させる水チャンネルの一つである。ほ乳類では、AQP0から12まで、13種類のアクアポリンが報告され、腎臓をはじめとするさまざまな組織で部位特異的な発現が報告され、その機能解析が進んでいる。中枢神経系でも一部のアクアポリンが神経細胞ならびにグリア細胞に細胞特異的に発現し、さまざまな機能を有していることが明らかになりつつあるが、末梢神経系でのアクアポリンの分布、機能に関する研究はほとんど行われていない。

歯の移動は歯根膜を含め周囲組織の活発な改造現象を伴い、その際、歯根膜ルフィニ神経終末の形態変化およびその回復が起こることが知られている。この過程を growth associated protein-43 (GAP-43) の免疫電顕法で観察すると、終末シュワン細胞にこのタンパクの局在がダイナミックに変化することが明らかになった(Kobayashi et al., J. Dent. Res., 1999)。しかしながら、この現象の報告当時、歯根膜ルフィニ神経終末における神経-グリア細胞間相互作用に関する情報は乏しかったため、単にこの局在の変化を機械的刺激によるものとして放置していた。

近年、神経節レベルで神経細胞-衛星細胞の相互作用の研究が進み、神経損傷によるグリア反応が注目され、各種疾患における AQP の役割が論じられているが、その詳細には不明な点が多い。また、AQP の末梢神経系における分布、反応に関する研究は乏しく、歯の移動の際の変化については全く知られていない。

2. 研究の目的

歯の移動の際の歯根膜ルフィニ神経終末およびその細胞体の存在する三叉神経節におけるアクアポリンの局在の変化および他のアクアポリン (AQP) サブタイプの発現を明らかにすることにある。歯の移動の際の AQP の局在の変化を他の疾患におけるものと比較し、歯根膜ルフィニ神経終末の AQP の機能的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜と三叉神経節 (TG) におけるアクアポリン (AQP) の mRNA 発現の確認および TG におけるタンパク発現量の検討：動物を深麻酔下で断頭し、三叉神経節を採取する。また、

川本法を用いて、上・下顎骨の未固定未脱灰切片を作成し、レーザーマイクロダイセクション装置を用いて歯根膜組織を採取する。採取した試料より、total RNA を回収し、AQP0~12 のプローブを用い、RT-PCR 法を行う。これは確認実験である。また、Western blot 法により、TG におけるアクアポリンタンパク発現量を明らかにする。

(2) 歯根膜組織、三叉神経節に対する免疫細胞化学：RT-PCR 法で得られた結果を元に抗体を選択し、免疫染色を行う。さらに歯根膜では神経線維との共存関係、シュワン細胞との共存関係を検索するために、アクアポリンと PGP9.5 または S-100 タンパクとの蛍光二重染色を行い、共晶点レーザー顕微鏡または蛍光顕微鏡にて観察する。

また、三叉神経節においても同様の二重染色を行う。神経細胞体が免疫陽性を示した場合、陽性細胞の表面積を NIH image を用いて画像・統計処理を行い、細胞の大きさを同定し、sizedistribution パターンを求める。

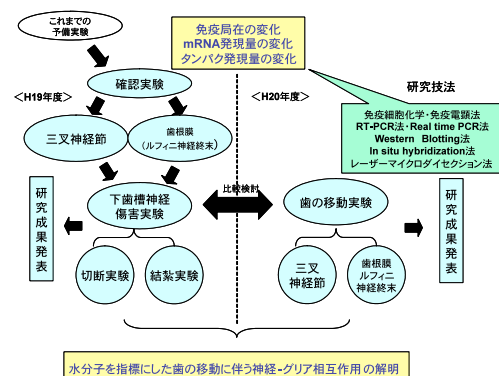
(3) 歯の移動実験のデータ収集の前に比較実験として、歯の移動刺激よりも強い下歯槽神経切断実験を行うことにより、予備データを収集する。これにより、刺激強度と AQP 発現の関係も明らかにする。

下歯槽神経傷害による三叉神経節におけるアクアポリン陽性免疫反応の局在の検討：

下歯槽神経切断実験では、Atumi らの報告に従った、ラット下歯槽神経切断モデルを用いる。三叉神経節におけるアクアポリン陽性の免疫反応の局在の変化を歯の移動実験モデルと比較することにより、障害の程度とアクアポリン陽性反応の局在および細胞径の変化を明らかにし、歯の移動実験に対する基礎的データを収集する。

(4) 下歯槽神経傷害による三叉神経節および歯根膜神経におけるアクアポリン mRNA, タンパク発現量の変化の検討：

(3) の下歯槽神経切断実験モデルを用いて、三叉神経節を採取し、Real time PCR 法、Western blot 法により、経日的なアクアポリン mRNA, タンパク発現量の変化を明らかにする。



(5)歯の移動の際の三叉神経節におけるアクアポリン免疫反応、mRNA 量、タンパク発現量の変化の検討：

歯の移動実験を行い、経日的に試料を採取する。歯の移動は上顎第一、第二臼歯間にラバ一片をはさむ、いわゆる Waldo 法を用いる。

(6)歯の移動実験を行い、三叉神経節および歯根膜ルフィニ神経終末におけるアクアポリンの免疫反応局在の変化について、免疫細胞化学を用いて検討する： 歯の移動実験を行い、経日的に試料を採取し、神経線維のマーカーとして protein gene product 9.5 (PGP9.5)、シュワン細胞のマーカーとして S-100 タンパクを用い、アクアポリンとの二重染色を行う。特にシュワン細胞における変化に注目する。

(7)歯の移動の際の歯根膜ルフィニ神経終末におけるアクアポリン mRNA 量の変動の検討：

歯の移動実験を行い、経日的に試料を採取し、未固定未脱灰切片を作成し、採取した試料から total RNA を抽出し、Real time PCR 装置にてアクアポリン mRNA 発現量の変化を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 正常動物の三叉神経節から total RNA を抽出し、RT-PCR 法を行った結果、AQP-1 mRNA が検出された。(確認実験)

(2) 歯根膜と三叉神経節における免疫染色を行った。(確認実験)

①歯根膜では、微小突起を含む樹枝状のルフィニ神経終末に AQP1 の強い免疫陽性反応を認めた。また、シュワン細胞の細胞膜に AQP-1 の免疫反応が発現した。シュワン細胞の核では免疫陽性反応は認められなかった。

②歯根膜では AQP-4 の発現は認められなかった。

③三叉神経節では AQP-1 の免疫反応は一部の衛星細胞と中型の神経細胞に発現していた。

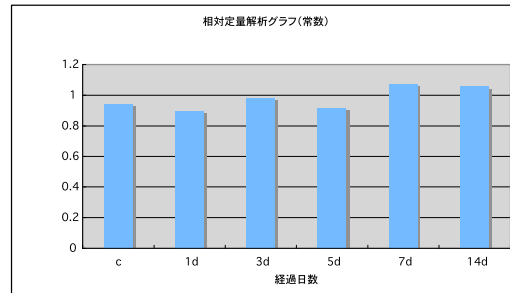
④三叉神経節では AQP-4 の免疫陽性反応も見られたが、神経細胞にはみられず、衛星細胞に限局していた。

(3)下歯槽神経傷害時、三叉神経節および歯根膜ルフィニ神経終末において、免疫反応の局在に変動は観察されなかった。

(4)下歯槽神経切断モデルを用い、下歯槽神経傷害 1, 3, 5, 7, 14 日後の三叉神経節の AQP-1 mRNA の比較検討を行った。

歯槽神経損傷後 1, 3, 5, 7, 14 日の三叉神経節を採取し、Total RNA から cDNA を作成し、AQP-1 mRNA の変動を SYBER Green I を用いた real time PCR 法を用いて検討した。なお、GAPDH をコントロールとした。下歯槽神経切断刺激では、AQP-1 mRNA の有意な変動は観察されなかった。

AQP-1 mRNA 相対定量解析のグラフを示す。



(5)(6) 歯の移動実験を行い、経日的に試料を採取し、免疫細胞化学的手法を用いて、三叉神経節および歯根膜ルフィニ神経終末における AQP-1 の免疫反応局在の変化について検討を行った。

歯の移動時の歯根膜ルフィニ神経終末において、AQP-1 の免疫反応の局在に変化は見られなかった。

(7)歯の移動時における AQP-1 mRNA の変動を Real time PCR 法にて検討したが、経日的な AQP-1 mRNA の有意な変動は認められなかった。

歯の移動、神経損傷刺激に対して、AQP-1 のタンパクレベルおよび mRNA レベルの発現に著名な変動は観察されなかったことから、神経の再生過程に AQP-1 が関与する可能性は非常に低いことが考えられた。

三叉神経節には AQP-1 に加え、AQP-4 mRNA, タンパクが衛星細胞に検出されていることから、グリア-ニューロン間の相互作用の解明には AQP-4 について同様の検討を行う必要があると考えられた。

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 1 件)

1. 著者名 :

Jabbar S, Harada F, Aita M, Ohishi M, Saito I, Kawano Y, Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Maeda T.

論文表題 :

Involvement of neurotrophin-4/5 in regeneration of the periodontal Ruffini endings at the early stage

雑誌 : J. Comp. Neurol.

査読の有無 : 有り

巻 : 501

発行年 : 2007

最初と最後の頁 : 400-412

[学会発表] (計 2 件)

1. 発表者名 : Oishi M, Harada F, Wakisaka S, Maeda T.

発表表題 :

Involvement of GDNF in the periodontal Ruffini endings during regeneration

学会等名 : the Society for Neuroscience's 38th annual meeting

発表年月日 : 2008. 11. 16

発表場所 : WASHINGTON, DC

2. 発表者名 : Harada F, Ohishi M, Maeda M, et al.

発表表題 :

Expression of aquaporin-1 in the mechanoreceptors in the periodontal ligament.

学会等名 : 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience

発表年月日 : 2007. 11. 3-7

発表場所 : San Diego, California

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 史子 (HARADA FUMIKO)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号 : 00397150

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :