

平成 20 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19791592
 研究課題名 (和文) 三叉神経節の cross-excitation による上下顎骨代謝調節機構の解明
 研究課題名 (英文) regulation mechanism of upper and lower alveolar bone metabolism via cross-excitation in trigeminal ganglion
 研究代表者
 郡司掛 香織 (GUNJIGAKE KAORI)
 九州歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：90448811

研究成果の概要：

体に傷を負ったとき、傷を負った神経の細胞は様々な物質を産生し、痛みを感じるが、傷を負った細胞に限らず、無傷の神経細胞にも様々な影響が及んでいる。この研究では、抜歯の影響がどのようにして無傷の神経細胞に及ぶかを調べ、その結果 satellite glial cell という神経細胞の周囲に存在する細胞を介して情報が伝達されていることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	270,000	2,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：三叉神経節、satellite cell、抜歯、骨代謝、SP、GFAP

1. 研究開始当初の背景

歯に矯正力が加わると痛みが生じ、歯槽骨では圧迫側で骨吸収、牽引側で骨形成が行われ、歯が移動する。矯正的歯牙移動は歯におけるメカニカルストレスにより説明されることが多いが、実際には歯根膜細胞や骨芽細胞が受けるメカニカルストレス以外に、神経が感受することによる神経性に骨代謝調節も考えられる。神経と骨代謝の関係については、以前の研究より神経ペプチドのレセプターが骨組織の細胞にもあり、神経ペプチドが骨芽細胞、破骨細胞の細胞状のレセプターを介して直接的に骨に作用することを明らかにしている。

骨代謝と神経ペプチドの関連を in vivo でも明らかにするため、研究代表者はラット白

歯抜歯後の創傷治癒における神経ペプチドの発現を調査した。その結果、神経障害などの末梢刺激により三叉神経節で産生された神経ペプチドが末梢へ逆行性に放出され、顎骨の骨代謝に影響していることが示された。更にこの研究では、上顎臼歯抜歯し下顎には何も処置を行わなかったにもかかわらず、三叉神経節下顎神経対応部にも上顎と連動した変化が認められたことから、非シナプス性の神経伝達 (cross-excitation) によって三叉神経節上顎神経対応部と下顎神経対応部が相互に影響を及ぼしあっていることを示唆する。しかし実際に影響を及ぼしあっているのか、何を介しているのか、それによって末梢組織にどのような影響があるのか等詳細は不明である。

2. 研究の目的

- (1) 障害を受けていないニューロンも神経ペプチドを発現するか？

末梢神経傷害後、障害を受けたニューロンのみでなく、障害を受けていない神経細胞も神経ペプチドを発現するか調べる。

- (2) Cross-excitation は起こっているのか？

末梢神経障害後、障害を受けていない神経細胞が神経ペプチドを発現するのは、cross-excitation によるものなのか調べるために、cross-excitation に関与していると報告されている ATP について、三叉神経節内の ATP レセプター発現を調べる。

- (3) ニューロン同士の伝達に satellite cell は関与しているのか？

末梢刺激によって傷害されたニューロンを取り囲む satellite cell のみでなく、そこから離れた satellite cell にも、ニューロンが傷害された情報が伝達されているか、satellite cell の活性化を調査する。

- (4) 傷害されていないニューロンが発現した神経ペプチドは、末梢組織に影響を及ぼしているのか？

障害を受けていないニューロンに神経ペプチドが発現していれば、その神経ペプチドは末梢組織に放出されて、骨代謝にも影響があるはずなので、三叉神経節における神経ペプチドの発現と骨代謝との関係を調べる。

3. 研究の方法

- (1) 三叉神経節の免疫組織化学染色

6週齢のオスのラットの上顎臼歯を麻酔下で抜歯し、抜歯後、3時間、1, 3, 7, 10, 14, 21日に安楽死させ、三叉神経節を採取した。後固定の後、急速に凍結させ、厚さ6 μ mの凍結切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。用いた抗体は以下の通り。

一次抗体

- ウサギ抗 Substance P (SP) 抗体 (神経ペプチド)
- モルモット抗 P2X₃ 抗体 (ATP レセプター)
- ウサギ抗 ATF3 抗体 (障害を受けたニューロンのマーカー)
- ウサギ抗 PGP-9.5 抗体 (ニューロンのマーカー)
- ウサギ抗 glutamine synthetase (GS) 抗体 (グリア細胞のマーカー)
- マウス抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (活性化した

satellite cell のマーカー)

二次抗体

- Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体
- Alexa Fluor 568 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体
- Alexa Fluor 568 ヤギ抗モルモット IgG 抗体
- FITC 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体

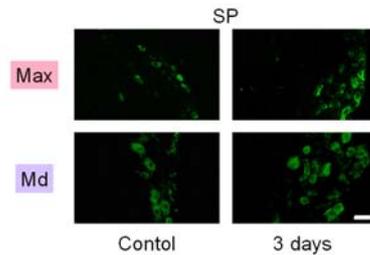
SP、P2X₃、GFAP 免疫陽性細胞の数をカウントし、全ニューロンに対する陽性細胞の割合を算出した。また、免疫陽性の細胞ごとの面積を計測し、ニューロンの大きさの分布を調べた。

- (2) 下顎骨の骨形成量測定

6週齢のオスのラットに、上顎臼歯抜歯と下歯槽神経切断を両方、もしくはどちらかのみ処置を行った。骨のラベリングのため、カルセインとアリザリンコンプレクソンを術前日、術後6日、20日に皮下注射し、生体染色した。術後21日に安楽死させ、下顎骨を採取して、7 μ m厚さの非脱灰切片を作製した。蛍光顕微鏡で観察した組織像をコンピューターに取り込み、新生骨の形成量を計測した。

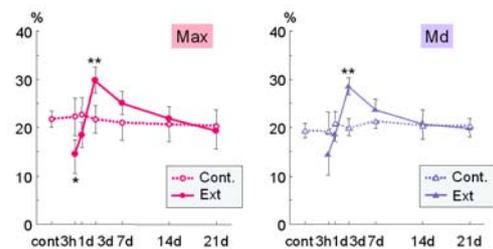
4. 研究成果

- (1) 上顎臼歯抜歯後、障害を受けていない三叉神経節下顎神経対応部ニューロンの神経ペプチド(SP)発現数も増加した。



Immunohistochemical images for SP-IR neurons
— = 50 μ m

三叉神経節上下顎神経対応部に小型 SP 陽性ニューロンが観察された。

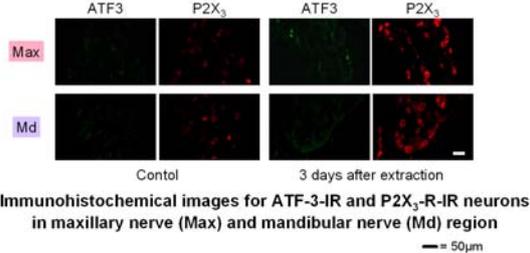


The proportion of SP-IR neurons per PGP-9.5-IR neuron
* P<0.05, ** P<0.01 vs. cont.

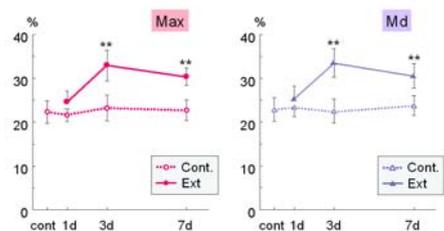
上顎第一臼歯抜歯後、三叉神経節上顎神経対応部の SP 陽性ニューロン数は、始め減少し、3日後には有意に増加した。

下顎には何も処置を行っていないにもかかわらず、三叉神経節上下顎神経対応部ニューロンの SP 陽性ニューロン数の変化は極めて類似していた。

- (2) 上顎臼歯抜歯後、障害を受けていない三叉神経節下顎神経対応部ニューロンにおいて、cross-excitation に関与していると言われていた ATP のレセプター P2X₃ の発現数も SP の発現と同様に増加した。



上顎第一臼歯抜歯後、上顎ニューロンは ATF3 陽性で障害を受けていたが、下顎ニューロンは陰性であった。しかし、P2X₃ 陽性ニューロンは上下顎ニューロン両方で発現が変化した。



The proportion of P2X₃-R-IR neurons per PGP-9.5-IR neuron
** P<0.01 vs. cont.

P2X₃ 陽性ニューロンはコントロールと比較して抜歯 3, 7 日後に有意に増加した。これは上下顎ニューロン両方で観察された。

- (3) 上顎臼歯抜歯後、障害を受けていない三叉神経節下顎神経対応部 satellite cell は、障害を受けた部位と同様に活性化される

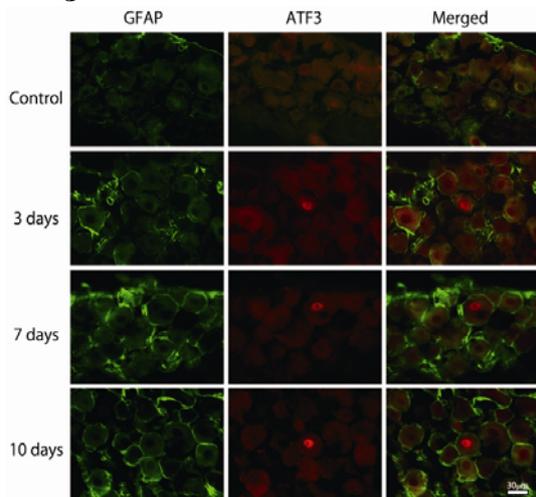


Figure Immunohistochemical images for GFAP-IR SGCs and ATF3-IR neurons in maxillary nerve region

抜歯後、上顎ニューロンは傷害されており、そのニューロンを取り囲む satellite cell は活性化していた。時間依存的に活性化した satellite cell 数は増加した。

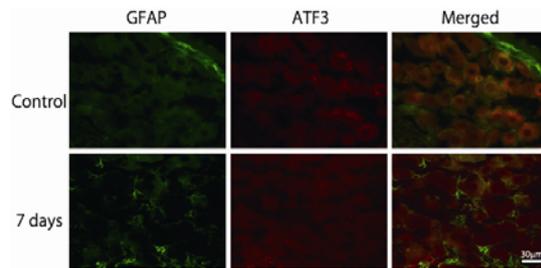


Figure Immunohistochemical images for GFAP-IR and ATF3-IR SGCs in mandibular nerve region

抜歯後、下顎ニューロンは傷害されていなかったが、GFAP 陽性 satellite cell 数はコントロールと比較して増加した。

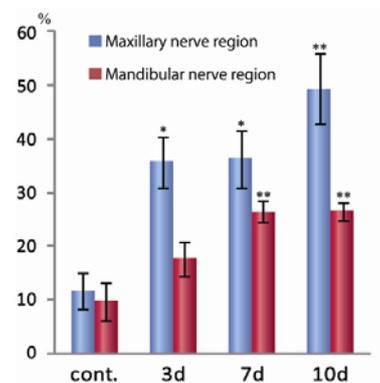
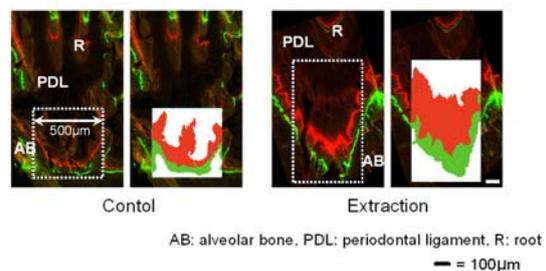
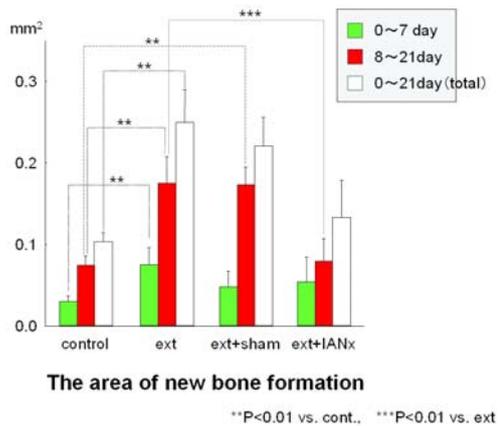


Figure The ratio of neurons that surrounded by GFAP-IR SGCs in TG
* P<0.05, ** P<0.01 vs. control

- (4) 下歯槽神経切断によって、抜歯した対合歯の挺出量は減少した。



上顎臼歯抜歯後、その対合歯である下顎臼歯は挺出移動し、コントロールと比較して有意に骨形成量が多かった。抜歯による対合歯周囲の骨形成量は下歯槽神経切断によって有意に減少した。



(5)

以上の結果から、末梢神経傷害によって傷害を受けたニューロンに影響があるだけでなく、satellite cell を介してその影響が離れた部位のニューロンにも伝達され、結果的に神経が障害を受けた部位から離れた部位の骨代謝にも影響を及ぼすことが示唆された。これは、上下顎骨の骨代謝調節機構を考察する新しい視点であり、対合歯が喪失した歯がなぜ挺出移動するのか、上下顎骨の成長バランスがどのようにとられているのかなど、臨床的に一般的だが未だ解明されていない現象を説明するブレイクスルーとなるだろう。今後は satellite cell を介した神経節内の伝達について、更に詳細な検討を行う予定である。

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 2 件)

- ① Nakao K., Goto T., Gunjigake K., Konoo T., Kobayashi S., Yamaguchi K. Neuropeptides modulate RANKL and OPG expression in human periodontal ligament cells. Orthodontic Waves 66 : 33-40. (2007) 査読あり
- ② Goto T, Nakao K, Gunjigake KK, Kido MA, Kobayashi S, Tanaka T. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. Neuropeptides 41: 25-31. (2007) 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

- ① K. Gunjigake, T. Goto, K. Nakao, T. Ishibe, S. Kobayashi, K. Yamaguchi Nociceptive stimulation induces

satellite glial cell activation
第 56 回 国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会

2008. 11. 29-30 名古屋

- ② 市木貴子、後藤哲哉、森川和政、中尾加代子、郡司掛香織、小林繁

知覚神経ペプチド・タキキニンとラット破骨細胞の関連について

第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会
2008. 9. 23-25 東京

- ③ 後藤哲哉、市木貴子、郡司掛香織、中尾加代子、小林繁

ラット初代培養骨芽細胞の骨形成に対するタキキニンの作用について

第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会
2008. 9. 23-25 東京

- ④ 郡司掛香織、後藤哲哉、中尾加代子、木尾哲朗、小林繁、山口和憲

抜歯後のラット三叉神経節衛星細胞における GFAP の発現

第 67 回日本矯正歯科学会大会
2008. 9. 16-18 千葉市

- ⑤ K. K. GUNJIGAKE, T. GOTO, K. NAKAO, T. ISHIBE, S. KOBAYASHI, and K. YAMAGUCHI

Expression of GFAP in satellite glial cells after tooth extraction

86 th General Session & Exhibition of the IADR

2008. 7. 2-5 Toronto, ON, Canada

- ⑥ 市木貴子、森川和政、中尾加代子、郡司掛香織、小林繁、後藤哲哉

ラット破骨細胞におけるニューロキニンレセプターの発現について

第 68 回九州歯科学会総会
2008. 5. 31-6. 1 北九州

- ⑦ 中尾加代子、後藤哲哉、郡司掛香織、木尾哲朗、小林繁、山口和憲

ヒト歯根膜細胞に対する圧迫側刺激における神経ペプチドの影響について

第 66 回日本矯正歯科学会大会
2007. 9. 19-21 大阪

- ⑧ 中尾加代子、後藤哲哉、郡司掛香織、木尾哲朗、小林繁、山口和憲

圧迫下ヒト歯根膜細胞における RANKL と OPG の発現に対する神経ペプチドの影響について

第 67 回九州歯科学会総会
2007. 5. 19-20 北九州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郡司掛 香織 (GUNJIGAKE KAORI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90448811