

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390464

研究課題名（和文） 歯根膜機械受容器のカベオラの存在意義の解明

研究課題名（英文） Elucidation of functional significance of caveola in periodontal mechanoreceptor

研究代表者

前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40183941

研究成果の概要（和文）：歯根膜の機械受容器であるルフィニ神経終末にはその細胞膜にカベオラが発達している。本研究は歯根膜ルフィニ神経終末におけるカベオラの存在意義を検討した。免疫細胞化学により、ルフィニ神経終末のカベオラはカベオリン1で構成されており、このカベオリン1とCa<sup>2+</sup>-ATPaseの特徴的な局在パターン結果はカベオラが機械受容器の興奮時に軸索終末内に流入する細胞内Ca<sup>2+</sup>の急速な除去に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The Ruffini endings, a primary mechanoreceptor in the periodontal ligament, well-develop caveolae in their cell membrane. The present study examined the functional significance of caveolae in the periodontal Ruffini endings. The caveolae were consisted of caveolin-1 with diverse functions. A unique immuno-localization pattern of caveolin-1 and Ca<sup>2+</sup>-pump suggested caveolae is involved in the quick elimination of intracellular Ca<sup>2+</sup> which influx into the axon terminals in mechanotransduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯学

キーワード：カベオラ、カベオリン、機械受容、歯根膜ルフィニ神経終末、カルシウムイオン

## 1. 研究開始当初の背景

歯根膜は系統発生的に歯の支持・固定装置として進化してきた密性結合組織であるが、豊富な知覚神経支配を受けている。歯根膜の知覚受容装置として、侵害受容器である自由神経終末と機械受容器である特殊神経終末がある。我々は一連の形態学的研究により、低閾値伸展受容器であるルフィニ神経終末が歯根膜の特殊神経終末であることを示してきた。この歯根膜ルフィニ神経終末には

皮膚機械受容器の層板細胞や薄板細胞に相当する特殊なシュワン細胞（終末シュワン細胞）が付随し、また、軸索終末からは膠原線維の変形を受容する指状の突起が存在するとともに、軸索終末とシュワン鞘間にはタコ壺様構造を示すカベオラ (caveola) が発達している。このカベオラはエンドサイトーシス、トランスサイトーシスやシグナル伝達に関与していると考えられており、その主要な構成タンパクはカベオリン (caveolin) である。

これまでの歯根膜ルフィニ神経終末の発生・再生学的研究により示唆されている軸索-シュワン細胞間の相互作用から考えると、このカベオラ構造が歯根膜ルフィニ神経終末の発生・再生・維持、さらには機械受容機構に重要な役割を果たしていることが容易に想像できる。

一方、我々は歯根膜ルフィニ神経終末に低親和性 (p75-NGFR) ならびに高親和性神経栄養因子受容体 (TrkB) が発現していること、さらに TrkB のリガンドである脳神経由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン-4/5 (NT-4/5) が同神経終末の再生・発生過程に深く関与し、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) がルフィニ神経終末の成熟過程に関与していることを示し、時期特異的に神経栄養因子・同受容体システムが働くことで歯根膜ルフィニ神経終末の発生・再生過程がコントロールされていることを明らかにした。さらに水チャネルであるアクアポリン-1 もルフィニ神経終末に発現することを明らかにしている。

これらの所見はいずれも歯根膜ルフィニ神経終末の機能調節にカベオラを介するシグナル伝達機構の存在を深く示唆するものであるが、その存在意義に関する国内外の研究は全くなされていらない。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯根膜機械受容器であるルフィニ神経終末の軸索終末-終末シュワン細胞間に豊富に存在するカベオラに着目し、主として免疫化学的手法を用いて、正常ラット、マウスおよびカベオリンノックアウトマウスの解析を組み合わせることで、歯根膜ルフィニ神経終末におけるカベオラの存在意義を明らかにすることにある。

## 3. 研究の方法

これまで我々はラットおよびマウス切歯舌側歯根膜には多数のルフィニ神経終末が存在していることを明らかにしており、またその微細構造学的データも十分保有しているので、実験動物として、これまで研究対象としてきたラットおよびマウス切歯を用いた。なお、動物実験に先立ち、新潟大学動物実験委員会に実験申請を行い、動物の取り扱いには新潟大学動物実験規則に従った。カベオリンノックアウトマウスの実験は新潟大学遺伝子組み換え実験委員会の承認を得て、遺伝子組み換え実験安全管理規則に従って行った。

### (1) 三叉神経節におけるカベオリンファミリーのスクリーニング

一般に歯根膜は三叉神経節と三叉神経中脳路核からの二重神経支配を受けているこ

とが知られているが、ラットのような齧歯類切歯歯根膜は三叉神経節からのみ支配を受けているので、カベオラの主要構成タンパクである2種のカベオリン (caveolin-1, -3) の三叉神経節における発現を、Western blotting 法を用いて検索した。試料は深麻酔下で採取した新鮮三叉神経節を RIPA バッファでホモジナイズし、冷却遠心し、調整した。用いた抗体は anti-cav-1 抗体 (1:500, BD Transduction Lab., San Diego, CA, USA)、anti-cav-3 抗体 1:2500、BD Transduction Lab.) であり、caveolin-1 および caveolin-3 のコントロール組織として、それぞれ、精巢上体および骨格筋を用いた。

### (2) カベオリンの免疫細胞化学

8週齢の雄性ウイスター系ラットを4%パラホルムアルデヒド-0.0125%グルタルアルデヒドで還流固定、EDTA脱灰後、歯根膜組織凍結切片を作成した。三叉神経節の試料は脱灰操作を行わず、クリオスタット切片を作成した。

#### ① caveolin-1, -3 の免疫染色

凍結切片を anti-cav-1 (1:500) 抗体、anti-cav-3 抗体 (1:1000) で染色した。発色はABC法によりDABにて行った。

#### ② Ca<sup>2+</sup>-ATPase の免疫染色

凍結切片を anti-PMCA 抗体 (1:10000, Affinity BioReagents Inc., Golden, CO, USA) にて行った。用いた anti-PMCA 抗体は高親和性 Ca<sup>2+</sup>-ATPase を認識する。

#### ③ caveolin の微細局在の同定

①、②で免疫染色した一部の切片を樹脂包埋し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した (pre-embedding 法)。

#### ④ 二重染色法

Cy3 で標識した caveolin-1 抗体で染色した切片で、終末シュワン細胞のマーカー酵素である非特異的コリンエステラーゼの組織化学を適用し、caveolin-1 と終末シュワン細胞の関係を追求した。また、神経線維マーカーおよびシュワン細胞マーカーである PGP 9.5 および S-100 タンパクに対する抗体を用い、PMCA 発現部位との関係を二重蛍光染色法で観察した。

### (3) カベオリンノックアウトマウスの解析

#### ① カベオリンノックアウトマウスの genotyping

カベオリンノックアウトマウスを Jackson Laboratory より購入 (*Cav1<sup>tm1ls</sup>/J*) し、実験に供する前に下記のプローブを用いて genotyping を行った。

○IMR1972 : GTG TAT GAC GCG CAC ACC AAG

○IMR1973 : CTA GTG AGA CGT GCT ACT TCC

○IMR1974 : CTT GAG TTC TGT TAG CCC AG

genotyping により phenotype を確認後、②

～③に供した。

② 成熟ノックアウトマウス歯根膜における神経特異タンパク protein gene product 9.5 (PGP 9.5)抗体による免疫染色

ABC法を用いて、PGP9.5抗体により歯根膜神経の同定を行った。

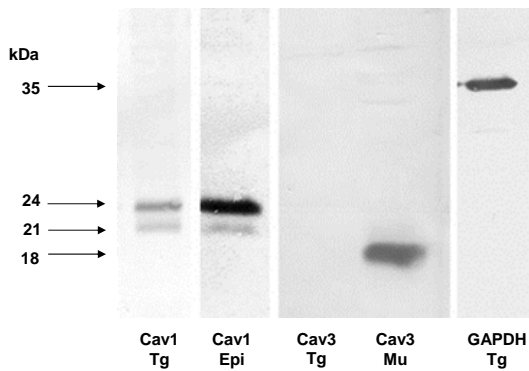
③ 再生過程における神経線維の動態

下顎孔付近で下歯槽神経を切断後、PGP9.5抗体により歯根膜神経の同定を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 三叉神経節におけるカベオリンファミリーのスクリーニング

抗体のデータシートに記載されているように、三叉神経節および精巣上体の試料からcaveolin-1のバンドが21kDaと24kDa付近に認められた(図1)。しかしながら、骨格筋の試料ではcaveolin-3のバンドは18kDa付近に認められたが、三叉神経節の試料では認



められなかった(図1)。

図1 三叉神経節(Tg)、精巣上体(Epi)、骨格筋(Mu)のwestern blotting結果

(2) カベオリンの免疫細胞化学的所見

① 光線顕微鏡所見

ラット切歯歯根膜に強いcaveolin-1の免疫反応が観察された(図2a)。しかし、caveolin-3の免疫反応は観察されなかった(図2e)。歯根膜線維芽細胞、血管内皮細胞に加え、無数のcaveolin-1陽性反応が歯槽骨寄りの歯根膜に認められ、これらは樹枝状の分岐を示す太い構造物として観察された。さらに、これら構造物近傍には円形を呈する細胞が位置しており、存在部位および形態から判断して、これらは歯根膜ルフィニ神経終末であり、円形細胞は終末シュワン細胞と考えられた(図2b)。

caveolin-1(図2c)と非特異的コリンエステラーゼ染色(図2d)の二重染色では、終末シュワン細胞の細胞質に共存が認められた。また、図2c、dを比較して理解できるように、終末シュワン細胞から伸び出るシュワン鞘もcaveolin-1陽性を示した。

三叉神経節ニューロンは免疫反応陰性であったが、衛星細胞が陽性反応を示した。

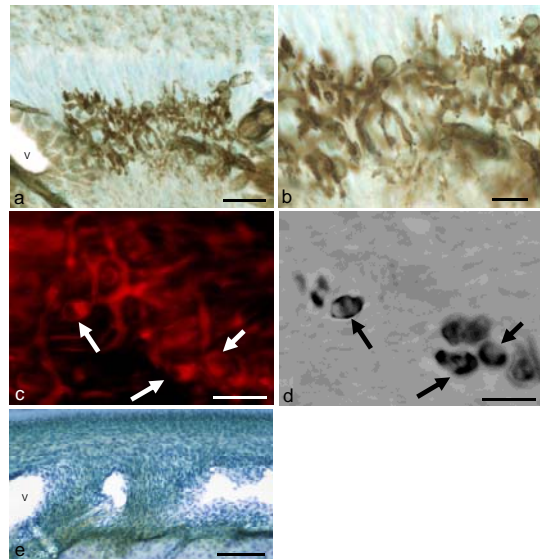


図2 歯根膜におけるcaveolin-1(a-c)、非特異的コリンエステラーゼ(d)、caveolin-3(e)の染色像。(c)、(d)は同一切片。

② 透過型電子顕微鏡所見

Pre-embedding法による免疫電顕法ではcaveolin-1の免疫反応がシュワン細胞および終末シュワン細胞の細胞膜に存在した(図3a)。高拡大で終末シュワン細胞体の細胞膜を観察すると(図3b)、caveolin-1の免疫反応はカベオラに局在した。軸索終末周囲のシュワン細胞のカベオラにもcaveolin-1の免疫反応はカベオラに局在した(図3c)。軸索終末の細胞膜にもカベオラが存在するが、この部位は免疫反応を欠いていた。

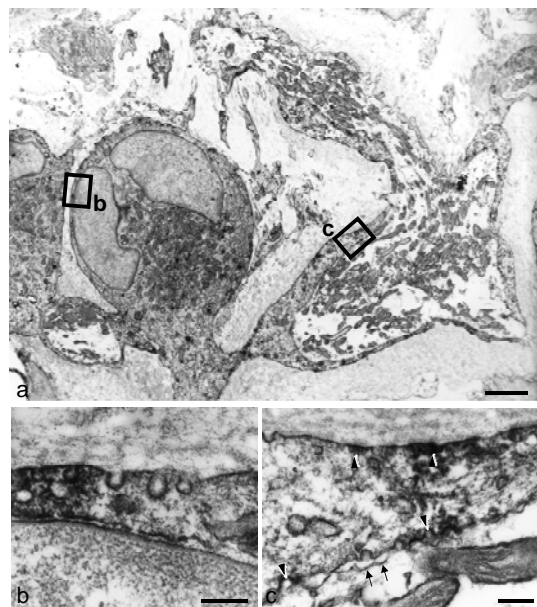


図3 歯根膜ルフィニ神経終末におけるcaveolin-1免疫電顕像

### (3) $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の免疫細胞化学的所見

#### ① 光線顕微鏡所見

歯根膜ルフィニ神経終末は強い PMCA 免疫反応陽性を示した。PMCA と PGP 9.5 の二重染色ではルフィニ神経終末の軸索に共存し、PMCA と S-100 タンパクの二重染色では PMCA の免疫反応は終末シュワン細胞には観察されなかった (図 4a-c)。一方、三叉神経節では PMCA の免疫反応はニューロン周囲に観察され (図 4d)、プラスチック切片の観察により、その存在部位は中型から大型のニューロンの細胞膜であった (図 4e, f)。しかしながら、ニューロン周囲の衛星細胞は免疫反応陰性であった。

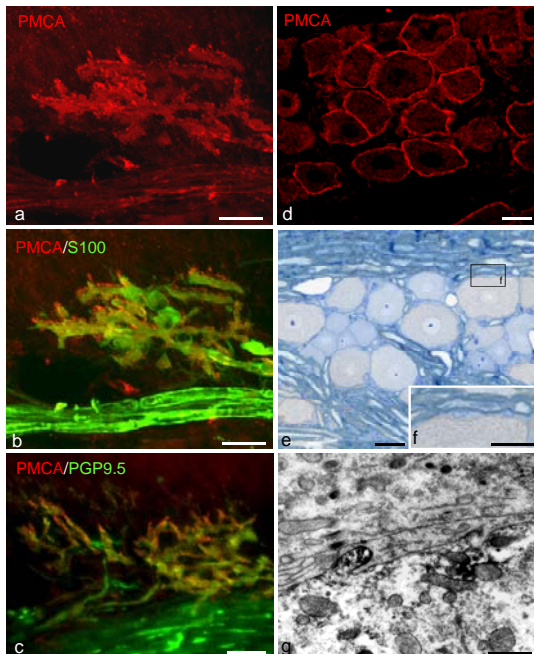


図 4 歯根膜 (a-c) と三叉神経節 (d-g) における PMCA 免疫反応。(b) は S-100 タンパク、(c) は PGP9.5 との二重染色。(g) は三叉神経節における免疫電顕像。

#### ② 透過型電子顕微鏡所見

免疫電顕法により、PMCA の免疫反応はルフィニ神経終末の軸索の細胞膜に局在したが、これを被うシュワン細胞には免疫反応は認められなかった (図 5a, b)。またカベオラがよく発達するシュワン鞘にも認められなかった (図 5c)。

三叉神経節ではニューロンの細胞膜に PMCA の免疫反応が局在することが確認された (図 4g)。

#### (4) カベオリンノックアウトマウスの観察

カベオリンノックアウトマウスでは片側の下歯槽神経を切断し、反側側を正常群として、歯根膜ルフィニ神経終末の形成・再生状態を PGP9.5 の免疫組織化学で検討した。カベオリン遺伝子の欠損により、ルフィニ神経

終末の形成状態が変化すると予想したが、PGP9.5 の免疫組織化学による観察では形態学的に著名な変化は認められなかった。

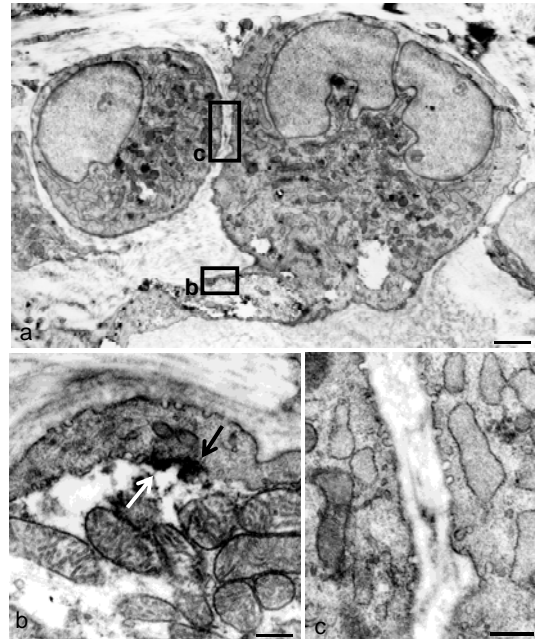


図 5 PMCA の歯根膜における免疫電顕法。

本研究により、歯根膜ルフィニ神経終末の終末シュワン細胞に発達するカベオラはカベオリン主要タンパクである caveolin-1 で構成されるが、軸索終末のカベオラは caveolin-1 免疫反応を欠いていたことが明らかとなった。また、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を認識する PMCA の免疫反応は終末シュワン細胞の細胞体および細胞質突起 (シュワン鞘) には認められず、軸索終末のカベオラに認められた。以上の結果から、機械受容の際、 $\text{Ca}^{2+}$  が軸索終末内に流入することから、カベオラはシグナル情報伝達に関与する機能も持ち合わせているが、カベオリンノックアウトマウスの観察では歯根膜ルフィニ神経終末の形態は、野生型マウスと相違が認められなかったことから、また、歯根膜ルフィニ神経終末の場合、カベオラの第一義的な機能として、軸索の興奮時に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  の急速な除去に関与することが考えられた。歯根膜ルフィニ神経終末はカベオラがよく発達するが、カベオリンノックアウトマウスは胎生致死に至らず、生後正常に発育することから、カベオリン遺伝子の欠損は他のシグナル情報伝達に関与する遺伝子によって代償されていることが考えられた。歯根膜ルフィニ神経終末のシグナル情報伝達機構の解明には、形態学的追求に加え、カベオリンのアゴニスト、アンタゴニストを用いた薬理学、生理学的実験が必要と考えられた。

#### 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 7 件)

- ① Rahman F, Harada F, Saito I, Suzuki A, Kawano Y, Izumi K, Nozawa-Inoue K, Maeda T: Detection of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in periodontal Ruffini endings of mouse incisors. *Neurosci Lett.* 2011;488(2):173-177.
- ② Iizuka N, Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Nandasena BG, Okiji T, Maeda T: Differential cell-specific location of Cav-1 and Ca(2+)-ATPase in terminal Schwann cells and mechanoreceptive Ruffini endings in the periodontal ligament of the rat incisor. *J. Anat.* 2009;214(2):267-274.
- ③ Ohishi M, Harada F, Rahman F, Saito I, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Maeda T: GDNF expression in terminal schwann cells associated with the periodontal ruffini endings of the rat incisors during nerve regeneration. *Anat Rec.* 2009;292(8):1185-1191.

[学会発表] (計 17 件)

- ① Rahman F, Harada F, Kawano Y, Ohishi M, Nozawa-Inoue K, Saito I, Maeda T: Acid-sensing ion channel 3 expression in the periodontal Ruffini endings. 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, Barcelona, Spain, 2010. 7. 14-17.
- ② Suzuki A, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Ajima H, Maeda T: Immunolocalization of caveolin-1 and Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the periodontal Ruffini endings. 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC, 2008. 11. 15-19.

[図書] (計 1 件)

- ① 前田健康: 歯根膜の感覚機能. 歯界展望別冊 歯と歯列を守るための歯根膜活用術, 88-91 頁, 医歯薬出版, 東京, 2011.

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/anatomy2/anatomy2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 40183941

(2) 研究分担者

泉 健次 (IZUMI KENJI)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号: 80242436  
井上 佳世子 (野澤 佳世子)  
(INOUE KAYOKO (NOZAWA KAYOKO))  
新潟大学・医歯学系・特任准教授  
研究者番号: 90303130  
河野 芳朗 (KAWANO YOSHIRO)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 60303129  
鈴木 晶子 (SUZUKI AKIKO)  
新潟大学・医歯学系・特任助教  
研究者番号: 70509538

(3) 連携研究者

なし