

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792064

研究課題名(和文) 歯根膜神経終末における新規イオンチャネルの解析

研究課題名(英文) Detection of new ion channel in the nerve terminals of the periodontal ligament

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(和文)：

酸感受性イオンチャネル acid sensing ion channel (ASIC) は、特に、酸の感受、侵害受容、機械受容に関与する非電位依存性陽イオンチャネルである。本研究では、マウスの上顎切歯歯根膜および歯根膜神経を支配する三叉神経節における ASIC3 の発現について、免疫組織化学的手法を用い、タンパクレベルならびに遺伝子レベルで検索した。ASIC3 は、歯根膜ルフィニ神経終末において、機械受容に関与する分子として機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) has been reported to participate in acid sensing, mechanosensation, and nociception. The present study examined the expression of ASIC3 in the lingual periodontal ligament of mouse incisors by immunohistochemistry. Furthermore, the expression of ASIC3 in the trigeminal ganglion—which innervates the periodontal ligament—was investigated at protein and mRNA levels. These findings suggest that ASIC3 functions as a molecule for mechanosensation in the periodontal Ruffini endings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯学、神経科学、イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

ENaC family は ENaC/DEG (degenerin) 遺伝子ファミリーに属する非電位依存性陽イオンチャネルで、線虫の機械受容に関連するチャネルと考えられている。近年、ENaC 同様、ENaC/DEG 遺伝子ファミリーに属する酸感

受性イオンチャネル acid-sensing ion channel (ASIC) が脊髄神経節のニューロンに発現し、酸感受性、機械刺激受容、侵害受容などに関与するチャネルとして注目されてきた。

一方、歯根膜は緻密な結合組織であり、咀

嚙の制御を行う機械受容器が豊富に存在することが知られており、ルフィニ神経終末が必須の機械受容器であることが報告されている。最近の我々の研究では、ENaCのサブタイプの一つ、ENaC β が歯根膜ルフィニ神経終末および終末シュワン細胞に存在することが明らかになった。

しかしながら、歯根膜神経終末におけるASICの存否、局在、役割については全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、歯根膜神経終末におけるASICの存否ならびに局在をタンパクならびに遺伝子レベルで明らかにすることを第1義の研究目的とする。

また、歯根膜知覚神経終末は三叉神経節由来であることから、三叉神経節におけるASICの発現を明らかにし、ASIC陽性ニューロンの大きさの分布について検討することにより、ASICの機能を考察することとした。

3. 研究の方法

実験動物として、これまでの我々の研究により研究データが蓄積されているマウスを用いた。

- 歯根膜神経を支配する三叉神経節におけるASIC3の発現の検索
 - タンパクレベル；
 - ①免疫組織化学的手法
 - ②定量的分析
 - 遺伝子レベル；
 - ①RT-PCR法
 - ②in situ hybridization法
- マウスの上顎切歯歯根膜におけるASIC3の発現の検討
 - ①免疫細胞化学
 - ②免疫組織化学的手法

4. 研究成果

RT-PCR法により、三叉神経節ではASIC1, 2, 3 mRNAが検出されたが、ASIC4mRNAのシグナルは観察されなかった(図1)。

この結果とこれまでの論文から、本研究ではASIC3をターゲットとして研究を進めることとした。

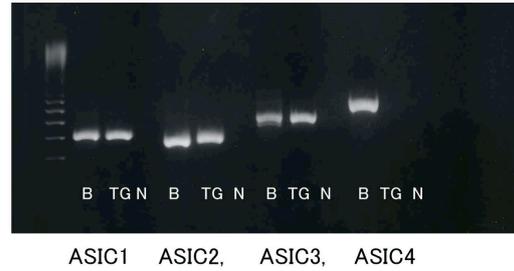


図1：三叉神経節におけるRT-PCR

B:脳, TG:三叉神経節 N:ネガティブコントロール。脳では、ASIC1からASIC4の明瞭なバンドが検出されたが、三叉神経節においては、ASIC1, 2, 3 mRNAが検出されたが、ASIC4mRNAのシグナルは観察されなかった。

マウス上顎切歯舌側歯根膜におけるASIC3の免疫染色では、太い軸索が複雑に分枝した樹枝状の歯根膜ルフィニ神経終末の特徴的形態を示した。一方、侵害受容性の自由神経終末として知られる細い神経線維には、ASIC3陽性反応は認められなかった(図2)。

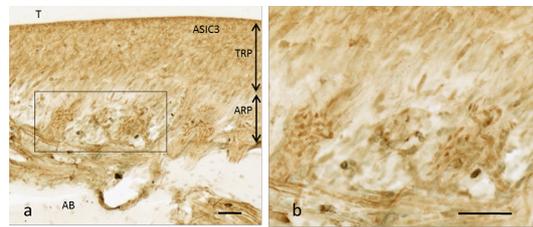


図2：歯根膜における、ASIC3免疫染色像
歯根膜の歯槽骨側領域(ARP)に限局して存在するルフィニ神経終末に、ASIC3陽性反応が認められた。

免疫蛍光染色では、ASIC3の免疫陽性反応が軸索神経に認められ、太い軸索が複雑に分枝した樹枝状の歯根膜ルフィニ神経終末の特徴的形態を示した(図3, (a, d))。

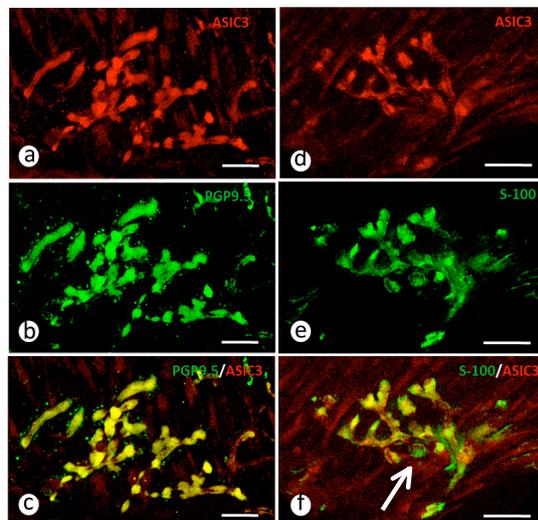
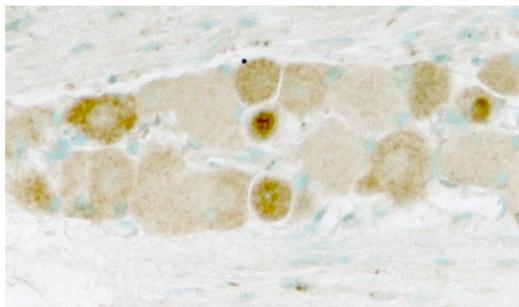


図3：免疫蛍光染色像

ASIC3 と PGP9.5 の二重染色像 (c) では、樹枝状に分岐し膨隆した軸索終末に ASIC3 と PGP9.5 の陽性反応が共存した。しかしながら、PGP9.5 に対する免疫染色で緑色の点状に染め出された軸索終末周囲の軸索の微小突起は ASIC3 陰性であった。微小突起は、歯根膜のコラーゲン繊維の変形を感知する重要な部位であることから、微小突起と機械受容との関わりについて、さらなる検討の必要があると考えられた。

一方、s-100 タンパク (e) による、免疫染色像では、ルフィニ神経終末と終末シュワン細胞の核を除く細胞質に、陽性反応が見られた。ASIC3 抗体 (d) と s-100 プロテイン (e) の蛍光二重染色像 (f) においては、S-100 タンパクの免疫染色で染め出される終末シュワン細胞には ASIC3 陽性反応は認められなかった (f に矢印で示す)。

さらに、歯根膜神経を支配する三叉神経節において ASIC3 の局在を観察すると、さまざまな大きさのニューロンが ASIC3 陽性反応を示したが、小型から中型のニューロンが強陽性を示し (g)、特異的な cRNA プローベを用いた *in situ* hybridization 法においても、三叉神経節の神経細胞に ASIC3 の mRNA シグナルが確認された (h)。



三叉神経節における定量的分析では、ASIC3 陽性ニューロンの 38% が、機械的受容を伝達する中型のニューロンに分類された。

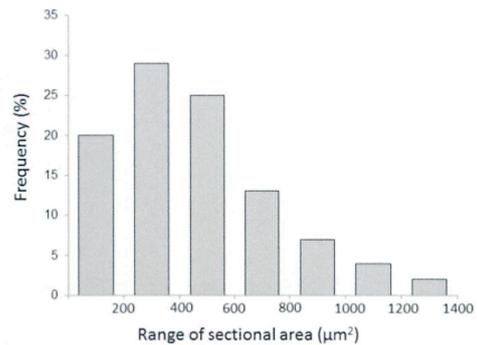


図 4 : 三叉神経節における ASIC3 陽性細胞の大きさによる分布。400-800 μm^2 の中型の細胞が全体の 37% (228/600) であった。

以上の結果から、本研究において、歯根膜のルフィニ神経における ASIC3 の発現と局在が初めて確認された。

また、ASIC3 は、歯根膜ルフィニ神経終末において、機械受容に関与する分子として機能することが示唆された。

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)

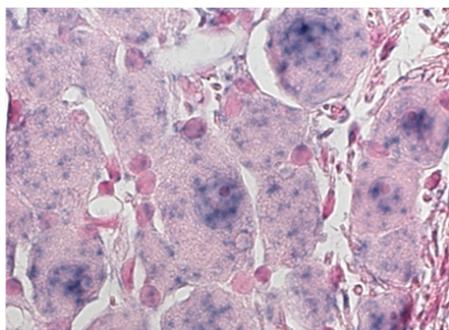
① Rahman F, Harada F, Saito I, Suzuki A, Kawano Y, Izumi K, Nozawa-Inoue K, Maeda T. Detection of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in periodontal Ruffini endings of mouse incisors. *Neurosci Lett*. 査読有, 2011, 488 (2):173-177.

〔学会発表〕 (計 2 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 & Exhibition of the International Association for Dental research, July 14-17, 2010, Barcelona.

② Ohishi M, Harada F, Maeda T. Multiple neurotrophins involve regeneration of the periodontal Ruffini endings after transection of rat inferior alveolar nerve. Society for Neuroscience 40th annual meeting, Nov 13-17, 2010, San Diego.

(g) 三叉神経節における ASIC3 免疫染色像。小型から中型の大きさのニューロンが強陽性反応を示した。



(h) 三叉神経節における、*in situ* hybridization 法でも同様の局在が見られ、ASIC3 mRNA の青色のシグナルが広く分布した。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○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：

〔その他〕

ホームページ等

なし

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：