

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390418

研究課題名(和文) 歯根膜ルフィニ神経終末の発生・再生に関わる新規イオンチャネルの役割

研究課題名(英文) Roles of new ion channel involved in the regeneration/development of the periodontal Ruffini endings

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) familyに着目して歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を検討した。下歯槽神経切断実験における歯根膜ルフィニ神経終末および三叉神経節におけるASIC3の発現パターンから、ASIC3は三叉神経節における神経再生中の神経活性の調節、すなわちneuron-glia interactionに関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study examined the regeneration process of the periodontal Ruffini ending, an essential mechanoreceptor, based on the changes in the expression pattern of acid-sensing ion channel-3 (ASIC3) at the periodontal ligament and trigeminal ganglion. The findings obtained from the nerve injury model (resection of the inferior alveolar nerve at one side) indicate that this molecule is not directly involved in the axonal regeneration of the periodontal Ruffini endings but rather in neuron-glia interactions such as control of neuronal activity in the trigeminal ganglion.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯学

キーワード：歯根膜 機械受容器 ルフィニ神経終末 ASIC3 イオンチャネル 再生

1. 研究開始当初の背景

これまで我々の研究グループは神経特異タンパクを用いた免疫組織化学的手法ならびに電子顕微鏡法により、歯根膜神経支配に関する形態学的な研究を行い、動物種および歯種による差はあるものの、歯根膜機械受容器として低閾値伸展受容器であるルフィニ神経終末が重要な知覚受容装置であることを示してきた。この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 terminal Schwann cell)が付随し、この細胞がルフィニ神経終末の発生・再生過程に重要な役割を果たしていることを示してきた。また、ルフィニ神経終末の微細構造学的特徴(図1c)、化学的消化法を用いたSEM鏡観察により、同神経終末の三次元立体構造を明らかにしてきた。さらに、科学研究費の補助を受け、歯根膜ルフィニ神経終末の発生、再生過程に brain derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-4/5 (NT-4/5)、glia cell-line derived neurotrophin (GDNF)が深く関与することを明らかにし、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。

皮膚機械受容器の研究では、Ca<sup>2+</sup>の機械受容器の興奮への関わりが示されているが、我々は平成20~22年度科学研究費の補助を受け、ラット切歯歯根膜ルフィニ神経終末におけるCa<sup>2+</sup>-ATPaseの特異的な局在とcaveolaとの関係から、Ca<sup>2+</sup>の流入がルフィニ神経終末の興奮に不可欠であることを明らかにした。また、上皮性ナトリウムチャンネル(epithelial sodium channel; ENaC)のisotypeであるENaCβが歯根膜ルフィニ神経終末に存在することも明らかにしている。しかしながら、これまで我々はNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaseおよび水チャンネルであるaquaporin-1が歯根膜ルフィニ神経終末に存在することを報告しているものの、歯根膜機械受容器を含め、機械受容に関わるイオンチャンネルに関する知見は非常に乏しい。

ENaC familyはDEG(degenerin)/ENaC遺伝子ファミリーに属する非電位依存性陽イオンチャンネルで、C. elegansの機械受容に関連するチャンネルと考えられている。近年、DEG/ENaC遺伝子ファミリーに属する酸感受性イオンチャンネルacid-sensing ion channel (ASIC)が酸感受性、機械刺激受容、侵害受容などに関与するチャンネルとして注目され、機械受容に関与するCa<sup>2+</sup>の透過性について神経生理学的、神経薬理学的興味が惹かれている。我々はASICのサブタイプの一つ(ASIC3)を用いた予備実験により、三叉神経の機械受容性中型ニューロンで支配される歯根膜ルフィニ神経終末の軸索にこのタンパクが発現していることを確認している。本研究計画はこれまでの研究成果を元に、新たにイオンチャンネルの解析という観点から

歯根膜ルフィニ神経終末の再生・発生過程を追求することを目的として企画・立案された。

2. 研究の目的

本研究では、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程における、機械受容に関わると考えられる新たなイオンチャンネルであるASIC familyの局在の変動をタンパク、遺伝子レベルで明らかにすることを目的とした。最終研究目的達成のために、(1)歯根膜ルフィニ神経終末におけるASIC family subtypeの存否と局在の同定、(2)下歯槽神経傷害後の再生過程におけるASIC family subtypeの局在および発現量の変動の追求を具体的研究目標とした。

3. 研究の方法

実験を行う前に新潟大学動物実験委員会に動物実験申請書を提出し、同委員会からの承認後、動物実験を開始した。

(1) 歯根膜ルフィニ神経終末におけるASIC family subtypeの存否と局在の同定

実験動物として生後8週齢雄性ICRマウスを用いた。

① RT-PCR法による三叉神経節におけるASIC mRNAの同定: 深麻酔下で断頭し(n=4)、脳および三叉神経節からtotal RNAを抽出し、RT-PCR法により三叉神経節に存在するASICのサブタイプ(ASIC1~4)の発現を検索した。用いたプライマーの配列は以下のTable1の通りである。

Table 1. Sequence of primers for RT-PCR

Gene	Primer sequence	Size	Accession no.
ASIC1	forward: 5'-GCCTATGAGATCGCAGGG-3'	305 bp	XM_128133
	reverse: 5'-AAAGTCCTCAAACGTGCCTC-3'		
ASIC2	forward: 5'-GAAGAGGAAGGGAGCCATGAT-3'	275 bp	NM_007384
	reverse: 5'-GGCAGAAAGTTCGCAATGTGT-3'		
ASIC3	forward: 5'-CCACGCTCTGGACGCTGTG-3'	414bp	NM_173135
	reverse: 5'-TCTTCTGGACGAGTGTG-3'		
ASIC4	forward: 5'-GAATGTGCCGACACACT-3'	563 bp	BC046481
	reverse: 5'-GCAAGCAAAGTCTTCAAAGAGG-3'		

② 免疫組織学的解析: 灌流固定したマウス上顎切歯歯根膜および三叉神経節(n=5)の凍結切片およびパラフィン切片を作製し、ABC法を用いてASIC3の免疫染色を行った。また、神経線維のマーカーとして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、これらタンパクとASIC3との蛍光二重染色を行い、レーザー顕微鏡で観察した。さらに、三叉神経節ニューロンにおける細胞体の大きさとASIC3の関係を検討するため、NF-200とASIC3の蛍光二重染色を行った。

③ In situ hybridization法による三叉神経節ニューロンにおけるASIC3 mRNAの同定: 三叉神経節のパラフィン切片に対し、自作したcRNAプローブを用いて、in situ hybridization法を行った。

(2) 下歯槽神経傷害後の再生過程におけるASIC family subtypeの局在および発現量の変動の追求

実験動物として、雄性ウィスター系成熟ラットを用い、AtsumiらやHaradaらの方法に従い、下歯槽神経切断実験を行った。4%抱

水クロラルの腹腔内麻酔下で、咬筋を反転し下顎骨頬側面を露出させ、下顎管を覆う骨を歯科用エンジンに取り付けたラウンドバーで削除した。下歯槽神経を顕微鏡下で確認した後、外科用小はさみで切断した。片側のみ切断を行ったものを切断群とし、その反対側は切断を行わない sham 群、両側とも切断しないものを対照群とした。切断後 3 日、7 日、14 日、21 日、28 日に灌流固定 (各 n=5) し、切歯を含む下顎骨および三叉神経節を採取した。下顎骨は EDTA 脱灰後、凍結切片を作製し、以下に示す免疫組織化学的検討を行った。

① 対照群および再生過程の歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC3 の発現を検討するために、抗 ASIC3 抗体と神経のマーカとして抗 protein gene product (PGP) 9.5 抗体、またグリア細胞のマーカとして抗 S-100 protein 抗体を用いて免疫蛍光二重染色および免疫染色を施した。

② 対照群および下歯槽神経再生過程の三叉神経節における ASIC3 の発現、局在変化を明らかにするために、抗 ASIC3 および PGP9.5 抗体、無髄神経線維マーカとして抗 calcitonin gene-related peptide (CGRP) 抗体を用いた免疫蛍光二重染色を施した。

#### 4. 研究成果

(1) 歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC family subtype の存否と局在の同定

RT-PCR 法で ASIC family の遺伝子発現を検討したところ、下記の図 1 で示すように、脳では ASIC1、2、3 および 4 の mRNA が確認されたが、三叉神経節では ASIC1 (305bp)、2 (275bp)、3 (414bp) の明瞭なバンドが検出されたが、ASIC 4 のバンドは検出されなかった。

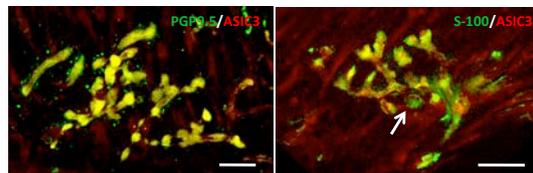


【図 1 RT-PCR 法による脳(1, 4, 7, 10)、三叉神経節(2, 5, 8, 11)における ASIC1, 2, 3, 4mRNA の発現。(3, 6, 9, 12 はネガティブコントロール)】

マウス上顎切歯歯根膜における ASIC3 の免疫染色では、ASIC3 陽性の太い神経束は歯根膜に入るとすぐに、激しく分枝していた。この ASIC3 陽性神経は、歯根膜の歯槽骨側領域に局限し、太い軸索が複雑に分枝した樹枝状の形態を示しており、過去に我々が報告した歯根膜ルフィニ神経終末と同様の分布と特徴的形態を示した。しかしながら、侵害受容性の細い自由神経終末および、細胞成分には ASIC3 陽性反応は認められなかった。

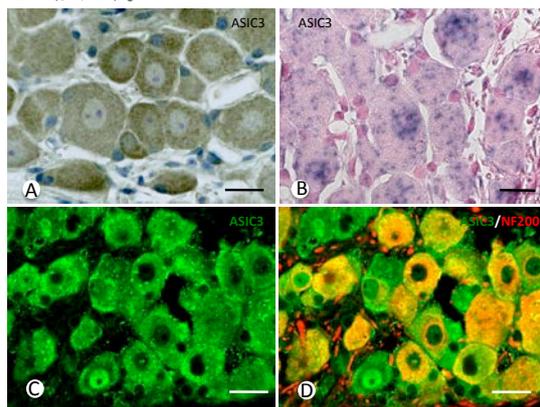
ASIC3 と PGP9.5 の蛍光二重染色では、樹枝

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。また、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 (図 2)。



【図 2 歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC3 の発現。左：PGP9.5 抗体との免疫二重染色像、右：S-100 タンパク抗体との免疫二重染色像】

三叉神経節では、さまざまな大きさのニューロンが ASIC3 陽性を示した。免疫強度は一樣でなく、小型から中型のニューロンが大型のニューロンより強陽性であった。NF-200 陽性ニューロンはすべて ASIC3 陽性であった。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ニューロンが ASIC3 mRNA のシグナルを有していた (図 3)。



【図 3 三叉神経節における ASIC3 タンパク (A, C, D) と mRNA (B) の発現。D は NF200 十の二重免疫染色像】

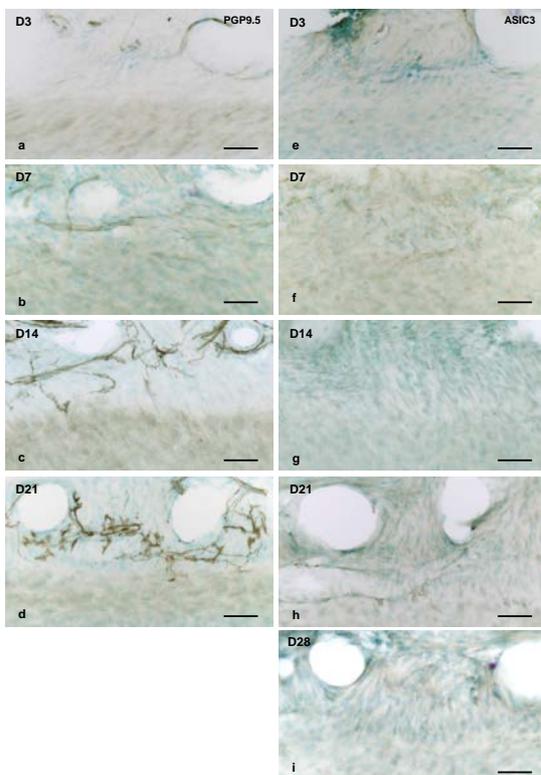
以上の結果から、三叉神経節由来の歯根膜ルフィニ神経終末は ASIC3 を発現し、このタンパクが歯根膜機械受容に関与するイオンチャネルの一つであることが示された。

(2) 下歯槽神経傷害後の再生過程における ASIC family subtype の局在および発現量の変動の追求

対照群の切歯歯根膜において、ASIC3 は PGP9.5 免疫陽性の樹枝状に分岐した歯根膜ルフィニ神経終末の軸索およびルフィニ神経終末に付随する S100 免疫陽性の終末シュワン細胞に共発現を呈した。

下歯槽神経切断 3 日後、切歯歯根膜の PGP9.5 免疫陽性神経は完全に消失した。7 日後には歯根膜神経の再生が始まり、数珠状の PGP9.5

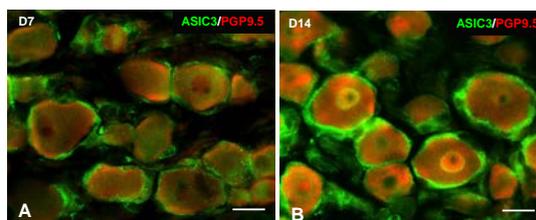
陽性の神経線維がわずかに認められた。14日後には PGP9.5 陽性神経は樹枝状の分岐を開始し、21日後には典型的なルフィニ神経終末の構造を呈するようになった。切断後 28 日目には歯根膜ルフィニ神経終末は形態学的に再生を完了した。一方、歯根膜ルフィニ神経終末における ASIC3 の免疫反応は、神経切断からルフィニ神経終末の再生の完了する 28 日後まで、全く認められなかった (図 4)。



【図 4 下歯槽神経切断後の歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程。PGP9.5 (protein gene product 9.5) または ASIC3 免疫染色】

对照群の三叉神経節において、ASIC3 は PGP9.5 免疫陽性の神経細胞に発現し、さらに衛星細胞の細胞質にも弱い ASIC3 免疫陽性反応が認められた。また、ASIC3 陽性神経細胞には、侵害受容神経のマーカーである CGRP に免疫陰性であるものもあったが、わずかながら CGRP 陽性神経細胞も存在していた。

下歯槽神経切断後の再生期間を通して、非切断側の三叉神経節における衛星細胞に ASIC3 発現様式の変化は生じなかった。歯根膜神経が消失した神経切断 3 日後、切断側三叉神経節の神経細胞体と衛星細胞に ASIC3 免疫陽性反応が認められ、非切断側と顕著な差異はなかった。神経線維が再生を開始した 7 日後、切断側の衛星細胞に明瞭な輪状の ASIC3 の発現を認め、14 日後になると、衛星細胞の ASIC3 陽性反応はさらに増強した。切断後 21 日から ASIC3 陽性反応は次第に弱くなり、切断後 28 日には对照群と同程度となった。切断側と非切断側の神経細胞における ASIC3 の発現様式の相違は、認められなかった。



【図 5 下歯槽神経切断群の三叉神経節における ASIC3 (緑) と PGP9.5 (赤) の免疫二重蛍光染色像】

この切断実験では歯根膜神経における ASIC3 の発現は消失し、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を通して ASIC3 免疫反応が認められなかったことから、ASIC3 はルフィニ神経終末の再生過程において、軸索終末の形態回復には直接的な関与をしない可能性が示唆された。一方、三叉神経節において、歯根膜ルフィニ神経終末が活発に再生する時期に、神経細胞体を取り囲む衛星細胞に一過性の ASIC3 強陽性反応が観察された。

以上のことから、ASIC3 は歯根膜ルフィニ神経終末の軸索の直接的な再生過程に関わると考えるより、三叉神経節において neuron-glia interaction として、再生中の歯根膜ルフィニ神経終末の活性の調節に関わると考えるべきである。

## 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 T. Yoshii, F. Harada, I Saito, K. Nozawa-Inoue, Y. Kawano, T. Maeda: Immunoexpression of aquaporin-1 in the rat periodontal ligament during experimental tooth movement. *Biomedical Research* 33(4): 225-233, 2012 (査読あり).  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/33/4/33\\_225/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/33/4/33_225/_article)

② H.M. Zakir, R.M. Mostafaezur, A. Suzuki, S. Hitomi, T. Maeda, K. Seo, Y. Yamada, K. Yamamura, S. Lev, A.M. Binshtok, K. Iwata, J. Kitagawa: e injury provides an essential delivery tool for neuropathic pain attenuation. *PLoS One*, 7(9):e44023, 2012 (査読あり).  
Doi: 10.1371/journal.pone.0044023

〔学会発表〕 (計 8 件)

① 井表千馨、原田史子、斎藤功、前田健康: ラット切歯歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程における ASIC3 の役割. 平成 25 年度新潟歯学会第 2 回例会、2013. 11. 19, 新潟.

② K. Seo, H. Yoshikawa, Y.M. Valverde

Guevara, T. Maeda, M. Kurose, K. Yamamura: Contribution of BDNF to nerve regeneration and neuroma formation after nerve injury. 8<sup>th</sup> Congress of the European Federation of IASP, 2013. 10.9-12, Florence, Italy.

③ Y. M. Valverde Guevara, H. Yoshikawa, I. Saito, T. Maeda, K. Seo: Possible role of BDNF on nerve regeneration following transection of inferior alveolar nerve. 平成 25 年度新潟歯学会総会、2013. 4. 20, 新潟.

④ T. Maeda: Ruffini ending as a primary mechanoreceptor in periodontal ligament; Its morphology, histochemical features and neuroplasticity-. KPPKIG 2013 (招待講演), 2013. 2. 28-3. 2, Jakarta, Indonesia.

⑤ Y. M. Valverde Guevara, H. Yoshikawa, K. Seo, T. Maeda, I. Saito: Effects of antibody to BDNF on nerve regeneration following transection of inferior alveolar nerve. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012. 10. 13-17, New Orleans, USA.

⑥ 吉居朋子、斎藤功、前田健康、原田史子、河野芳朗: 実験的歯の移動時におけるラット臼歯歯根膜のアクアポリン-1 免疫発現. 第 71 回日本矯正歯科学会、2012. 9. 26-9. 28、盛岡.

⑦ T. Maeda: Dental Innervation. Congreso Magno De Egresados De Vuelta A Casa (招待講演). 2011. 9. 16, Torreon, Mexico.

⑧ T. Maeda et al.: Mechanoreceptive Ruffini endings innervating by ASIC3-positive trigeminal ganglion neurons. 8th International Brain Research Organization World Congress of Neuroscience, 2011. 7. 17. Florence, Italy.

[図書] (計 4 件)

① 前田健康: 第 6 章 歯周組織の神経支配 (口腔組織発生学第 2 版)、医歯薬出版、2015 印刷中.

② 前田健康: 口腔の構造と機能 (口腔科学)、p. 8-22、朝倉書店、2013.

③ 前田健康: 歯の構造と機能 (口腔科学)、朝倉書店、p. 23-31、2013.

④ 前田健康: 歯根膜の感覚機能 (歯と歯列を守る歯根膜活用術)、p. 88-91、医歯薬出版、2011.

## 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: 4 0 1 8 3 9 4 1

### (2) 研究分担者

泉 健次 (IZUMI Kenji)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 8 0 2 4 2 4 3 6

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: 9 0 3 0 3 1 3 0

河野 芳朗 (KAWANO Yoshiro)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 6 0 3 0 3 1 2 9

### (3) 研究協力者

大峡 淳 (OHZAMA Atsushi)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号: 4 0 2 6 6 1 6 9

鈴木 晶子 (SUZUKI Akiko)  
新潟大学・医歯学系・特任助教 (現テキサスヘルスサイエンスセンター大学ヒュー斯顿校ポスドク)

原田 史子 (HARADA Fumiko)  
新潟大学・医歯学系・科研費雇用研究員

吉居 朋子 (YOSHII Tomoko)  
新潟大学大学院医歯学総合研究科・大学院生 (現研究員)

井表 千馨 (IHYO Chika)  
新潟大学大学院医歯学総合研究科・大学院生 (現教務補佐員)