

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592762

研究課題名(和文) 生後発育における三叉神経領域の小胞性アミノ酸輸送体の動態の解明

研究課題名(英文) Distribution of vesicular aminoacid transporters during postnatal development in the trigeminal neurons

研究代表者

本間 志保 (HONMA, Shiho)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40372627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では小胞性アミノ酸輸送体及びシナプス関連タンパクに注目し、中枢及び末梢神経系における発現を検索した。口腔感覚領域では歯根膜機械受容器(ルフィニ神経終末)、歯髄(自由神経終末)、口蓋粘膜の機械受容器(メルケル終末)に興奮性神経伝達物質が認められた。中枢の三叉神経核では感覚核である三叉神経中脳路核、三叉神経運動核ともに興奮性神経伝達物質と、抑制性神経伝達物質が認められた。生後発育では、興奮性シナプスの存在を示唆する物質に関する免疫染色を生後一日から、顎運動が吸啜から咀嚼へ以降する生後21日までの脳においての観察を行った。感覚核と運動核ではその出現時期やタンパクの発現の強さに違いが認められた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on vesicular amino-acid transporters and synapse-related proteins (NR2A, NR2B and PSD95) in the brainstem and the peripheral nervous system. Though a synapse was not present, localization of vesicular amino-acid transporters, especially VGLUTs were found in periodontal Ruffini endings, Merkel cells in the oral mucosa, and free nerve endings in dental pulp. In the mesencephalic trigeminal nucleus and trigeminal motor nucleus, VGLUT and VGAD were observed. During the postnatal development, associated with a change of the jaw movement, the expression pattern of synapse-related proteins were observed between the mesencephalic trigeminal nucleus and the trigeminal motor nucleus.

研究分野：神経解剖学

 キーワード：小胞性アミノ酸輸送体 シナプス関連タンパク メルケル細胞 ルフィニ神経終末 三叉神経中脳路核
三叉神経運動核

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域に存在する感覚受容器は口腔内外の様々な感覚を中枢へと伝達する三叉神経感覚ニューロンによって支配されている。感覚の種類としては歯髄での痛覚、歯根膜においては痛覚と触圧覚、さらに口腔粘膜や口腔周囲の皮膚では温冷覚などの感覚もある。歯根膜での触圧覚や咀嚼筋における伸展の感覚は固有感覚ともよばれ、それをつかさどる受容器は機械受容器とよばれる。口腔諸器官に關与する機械受容器として代表的なものには閉口筋に存在する筋紡錘と、歯根膜に存在する歯根膜ルフィニ神経終末がある。我々はこれまでに歯根膜ルフィニ神経終末について詳細に検討し、その組織化学的特性を明らかにしてきた。

歯根膜ルフィニ神経終末は軸索終末とそれを覆う特殊なシュワン細胞からなり、軸索成分には何種類かのカルシウム結合タンパクを含むことが明らかとなっている¹⁾。末梢感覚受容器が感覚刺激を受けるとその刺激は電気信号に変換され、上位中枢へと伝達されるが、機械受容器の信号変換にはいくつかのイオンチャネルが關与している。それらのイオンチャネルは細胞骨格などと連結しており、機械刺激の引っ張りによってチャネル分子を変形させてチャネルが開口するといわれている。歯根膜ルフィニ神経終末に存在するカルシウム結合タンパクは軸索終末でのカルシウム濃度調節に関わっていると考えられているが、実際の機能については未だ不明な点が多い。さらに軸索終末内には小型のシナプス小胞様の構造物が観察されている。

近年我々はシナプス小胞からの伝達物質の放出に關与する SNARE タンパクである SNAP-25 や syntaxin が歯根膜ルフィニ神経終末に存在することを報告した(業績3)。また軸索終末内の小胞の膜上には小胞性グルタミン酸輸送体(VGluT)が存在することを

電子顕微鏡レベルで明らかにした。これらのことは歯根膜ルフィニ神経終末の軸索終末に存在する小胞内にはグルタミン酸が蓄積され、これが放出されている可能性を示唆するものである。グルタミン酸は興奮性の神経伝達物質として広く知られているが、それが末梢の感覚受容器に存在するという報告はこれまでにない。本研究でさらにグルタミン酸受容体の存在を明らかにすることができれば、歯根膜ルフィニ神経終末における感覚受容機構の解明の一端を担うことができる。VGluT には現在のところ3つのサブタイプ(VGluT1, VGluT2, VGluT3)が同定されており、これらの主な働きは神経伝達物質のひとつであるグルタミン酸をシナプス小胞へ取り込むことである。しかし、口腔周囲のもうひとつの末梢の機械受容器である筋紡錘にはシナプスが存在せず、内部に小胞様構造も認められないにも関わらずVGluT1が認められたという報告がある。このことはVGluTが小胞への取り込み以外の作用に關連している可能性を示唆している。VGluT1はグルタミン酸をシナプス小胞内へ取り込む以外にも無機リン酸輸送活性を持つという性質もあり、グルタミン酸輸送としての一面だけではVGluTの生物学的意義は解明できない。

さらに神経伝達物質ではグルタミン酸以外にもGABAやグリシンといったアミノ酸もあるが、これらの小胞性輸送体(VGAT)は膵臓での糖代謝に關与しているという報告⁴⁾や、VGAT欠損マウスで口蓋裂が発生するという報告⁵⁾もあり、これらの神経伝達物質は中枢神経系でのシナプス伝達以外にもいくつかの作用があることが考えられる。特にVGAT遺伝子欠損により顔面領域の発生に障害を及ぼすという先の報告から考えると、発生段階での小胞性アミノ酸輸送体の作用というものは従来考えられてきたアミノ酸のシナプス小胞への輸送以外の生物学的意義を持ち合わせている可能性が十分に考え

られる。

以上の学術的背景より、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究において三叉神経系の機械受容器である歯根膜ルフィニ神経終末や口腔粘膜における機械受容器（メルケル細胞）および痛覚受容器である歯髄、またそれらの支配ニューロンである三叉神経中脳路核ニューロンや三叉神経節ニューロンにおける小胞性アミノ酸輸送体ならびにシナプス関連タンパクとの関係について以下のことを明らかにすることが本研究の目的である。

まず機械受容器に注目し、歯根膜ルフィニ神経終末におけるVGluTの局在をふまえて、グルタミン酸受容体の局在とVGluTとの関連を電子顕微鏡レベルにおいて明らかにすることでVGluTがグルタミン酸とともに作用しているかどうかを確認する。同様に機械受容器でのVGATとGABA受容体の局在およびそれらの関連性を調べる。同じく機械受容器である口腔粘膜上皮のメルケル細胞についても同様に検索を行う。

発生、発育段階における小胞性アミノ酸輸送体の局在や脳内シナプスとの関連を確認するため、生後発育の必要な段階に応じてVGluT、VGAT、NR2A、NR2B、PSD95などの発現について、免疫組織学的手法を用いて検索する。

各種タンパクでの感覚種類による発現の差異、特に侵害受容器との差異を三叉神経感覚ニューロンにおいて明らかにし、機能との関連の解明を試みる。また、感覚受容器の発生・発育とシナプス発現の関連性を明らかにし、感覚受容機構の確立におけるそれらの役割を解明する。

3. 研究の方法

本研究において三叉神経支配領域の感覚

受容器、とくに歯根膜ルフィニ神経終末、口腔粘膜の機械受容器、歯髄内の侵害受容器における小胞性アミノ酸輸送体とアミノ酸受容体の発現を検索する。また口腔周囲の感覚受容器の発生・発育は口腔機能の獲得と大きく関与し、それらは脳内の神経回路の変化、すなわちシナプスの可塑性に大きく関与すると考えられるため、歯の萌出や食性の変化に伴う発育段階を順に追って脳内におけるシナプス関連タンパクの変化を調べ、感覚受容機構の獲得と小胞性アミノ酸輸送体、シナプス関連タンパクとの関連についての検討を行う。

3. 研究成果

本研究では興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の輸送体（VGLUT）と、抑制性神経伝達物質であるGABAの輸送体（VGAT）に注目し、脳内および末梢神経系における発現の検索を行った。またこれらのタンパクはシナプスとも関連するため、生後発育におけるシナプスの可塑性を調べるために興奮性神経伝達物質の受容体であるNR2A, NR2BならびにPSD95といったシナプス関連タンパクの発現を三叉神経運動核、三叉神経中脳路核において生後1日（吸啜期）から生後21日（吸啜から咀嚼への移行期）にかけて免疫組織学的に検索した。口腔感覚領域では歯根膜機械受容器（ルフィニ神経終末）、歯髄（自由神経終末）、口蓋粘膜の機械受容器（メルケル終末）にVGLUTが認められた。中枢の三叉神経核では感覚核である三叉神経中脳路核、三叉神経運動核ともにVGLUT, VGATが認められた。生後発育に関する研究では、興奮性シナプスの存在を示唆する物質であるNR2A, B、さらにはシナプス後膜の肥厚に関する物質PSD95の免疫染色を生後一日から、顎運動が吸啜から咀嚼へ以降する生後21日までの脳内での観察を行った。三叉神経中脳路核では生後すぐから21日まで持続的に弱い反応を認めたが、運動核では生後3~5日から

発現し次第に反応が増強した。これらのことから、小胞性アミノ酸輸送体はシナプスのある場所のみならず、シナプスのない場所にも存在すること、そしてその機能としては情報伝達だけでなく、感覚受容器の維持、メンテナンスに参与する可能性があることが示唆された。また、感覚情報が入力されることにより中枢神経系では神経回路形成が生後においても続いており、特に口腔領域では摂食運動の変化（吸啜運動から咀嚼運動への移行）に伴って、シナプス構築の変化が生じていること、すなわちシナプス可塑性を実証できたと考えている。

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)

Lectin histochemistry of palatine glands in the developing rat. Hakami Z, Kitaura H, Honma S, Wakisaka S, Takano-Yamamoto T. Acta Histochem. 査読有、2014、116:596-605.

doi:10.1016/j.acthis.2013.11.002.

歯根膜感覚の形態学、本間志保、歯界月報、査読無、2013、738:67-71.

〔学会発表〕(計 6件)

Kohki Kadono, Akiyo Kawano, Hitoshi Niwa, Shiho Honma, Satoshi Wakisaka. Ultrastructure of injured trigeminal ganglion neurons; the comparison between crush injury and loose ligation. XXIII International Symposium on Morphological Sciences, 2013年9月10日~13日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

永谷俊介、伊藤 章、角野公紀、本間志保、脇坂 聡、古郷幹彦、ラット咬筋神経損傷時の三叉神経運動核におけるミク

ログリアの動態、第25回日本口腔科学会近畿地方部会、2013年12月7日、大阪歯科大学(大阪府樟葉)

本間志保、角野公紀、脇坂 聡、ラット口蓋粘膜におけるSNARE関連タンパクの局在、第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年3月27日~29日、自治医科大学キャンパス(栃木県下野市)

永谷俊介、伊藤 章、角野公紀、本間志保、脇坂 聡、古郷幹彦、ラット咬筋神経損傷での三叉神経運動核におけるミクログリアの動態、第68回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2014年5月7日~9日、京王プラザ代テル(東京都西新宿)

田中 輝、石濱孝二、脇坂 聡、本間志保、古郷幹彦、新生児ラットの口腔顎顔面領域の運動ニューロンにおけるPSD95タンパク質発現、第37回日本神経科学大会、2014年9月11日~9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

角野公紀、本間志保、脇坂 聡、オトガイ神経損傷に伴う三叉神経節における非神経細胞の動態、第56回歯科基礎医学学会学術大会・総会、2014年9月25日~27日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 志保(HONMA Shiho)
研究者番号:40372627

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

角野 公紀(KADONO Kohki)
脇坂 聡(WAKISAKA Satoshi)