

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893085

研究課題名(和文) 歯根膜神経再生時における血液神経関門の動態

研究課題名(英文) Reconfiguration of the neuron/blood barrier during regeneration of periodontal Ruffini-endings

研究代表者

原田 史子 (Harada, Fumiko)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教

研究者番号：00397150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経の軸索変性の急性期には、一時的に血液神経関門が開くことが知られているが、歯根膜ルフィニ神経における血液神経関門を介した分子の供給機構および調節機構については全く不明である。そこで歯根膜ルフィニ神経の再生過程において、血管内皮細胞の動態について検索した。下歯槽神経切断7日後、実験側の歯根膜切歯側領域に血管内皮細胞が伸長し、周囲に遊走シュワン細胞が観察された。14日後には対照群と同様の局在を示した。歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程において、神経切断後7日後の歯根膜に血管が一時的に出現し、この血管を足場にしてシュワン細胞が遊走し神経終末の再生に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is unclear how molecules are supplied and regulated through the nerve/blood barrier in periodontal Ruffini endings. The nerve/blood barrier is temporarily open in the acute period during axon degeneration. The present study investigated the reconfiguration of blood vessels in the regeneration of periodontal Ruffini endings.

At Day 7 after injury of the inferior alveolar nerve (IAN), blood vessels existed in the tooth-related part of the periodontal ligament with migrating Schwann cells. At Day 14 after injury to the IAN, the blood vessels and Schwann cells were localized, as were the control groups. These findings suggest that the blood vessels evident on Day 7 might be tracked by migrating Schwann cells, an important role for the regenerating of periodontal Ruffini endings.

研究分野：矯正

キーワード：歯学 血管 神経

### 1. 研究開始当初の背景

歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程において、終末シュワン細胞が重要な役割を果たすこと、各種神経栄養因子が時期依存的に働くことを明らかにしてきた。

末梢神経の再生において、神経損傷部にマクロファージが遊走し、増殖シュワン細胞がシュワン細胞索を作り神経再生の足場として、神経線維が伸長することが知られている。また遊走したマクロファージが直接血管を誘導し、この血管を足掛かりとしてシュワン細胞が遊走することが報告されている。

さらに、末梢神経の軸索変性の急性期には、一時的に血液神経関門が開くことが知られているが、歯根膜ルフィニ神経における、血液神経関門を介した分子の供給機構および調節機構については、全く不明であった。

### 2. 研究の目的

歯根膜ルフィニ神経の再生における血管内皮細胞および血管周皮細胞の動態について検索を行う。

### 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ラットを用いた。

(1) 下歯槽神経非切断群 (対照群) における機能血管の標識。

生後8週齢の成熟ラットに、機能血管を標識するトマトレクチン (Lycopersicon esculentum Lectin ; Vector 社) 1.25mg/kg, (1mg/ml) を静脈内投与し、5分後に灌流固定する。下顎骨を取り出し、EDTA脱灰し、凍結切片を作成した。凍結切片に対して、閉鎖端や新生端等の機能していない血管にも発現する内皮細胞のマーカである RECA-1、および周皮細胞のマーカとして  $\alpha$ -SMA および Desmin の免疫染色を行うことにより、機能している血管と機能していない毛細血管の有無およびその分布について検索を行った。血管の発芽発端に出現すると言われている tip cell の存在を、そのマーカである ninein 抗体を用いて検索し、血管増殖因子 VEGF の発現についても検索した。

さらに、抗 ASIC3 抗体および各種神経栄養因子抗 BDNF 抗体、GDNF 抗体およびその受容体である抗 TrkB 抗体、抗 Ret 抗体、神経線維のマーカとして PGP9.5 タンパク、シュワン細胞のマーカとして S-100 タンパクを用い、免疫染色および免疫蛍光多重染色を行い、光学顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡および蛍光顕微鏡にて観察した。

(2) 歯根膜神経の再生時における血管内皮細胞および血管周皮細胞の変化と各神経栄養因子の発現様式について検討。

下歯槽神経傷害による歯根膜神経の再生時の血管内皮細胞および周皮細胞の動態について検討した。

下歯槽神経の損傷には、我々が報告した下歯槽神経切断実験モデル (Harada et al., Arch. Histol. Cytol., 2003.) を用い、下歯槽神経切断の7日後および14日後に(1)で示した方法で機能血管を標識し、歯根膜神経中の機能血管の動態を多重免疫染色にて検索した。特に、神経再生過程で一過性に出現する内皮細胞様細胞の特性を検索し、その動態について追跡する。各種内皮細胞のマーカである CD31 および RECA-1、および周皮細胞のマーカとして  $\alpha$ -SMA、Desmin を用い、神経線維のマーカとして PGP9.5 タンパク、シュワン細胞のマーカとして S-100 タンパクを用いた免疫染色および免疫多重染色を行った。

(3) 三叉神経節に対する免疫細胞化学 in situ hybridization。

三叉神経節においても(1)と同様の多重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡または蛍光顕微鏡にて観察した。

(4) 下歯槽神経傷害による三叉神経節における機能血管の検討。

三叉神経節における、血管の変化と神経およびグリア細胞について検討した。この際、切断端に逆行性トレーサーDiIを置き、下歯槽神経が投射するニューロンの位置を標識した。さらに(1)で示した方法で機能血管の標識を行い、神経切断後の各抗体の蛍光二重染色を行った。

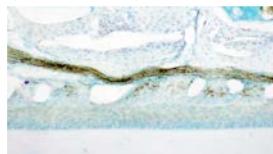
### 4. 研究成果

(1) 下歯槽神経の非切断側 (対照群) の生後8週齢のラット歯根膜において、血管と歯根膜ルフィニ神経終末は歯根膜の歯槽骨側領域 (ARP : Alveolar-related part) に局在した。

非切断側 (対照群) の歯根膜像 :  
抗 RECA 1 抗体による免疫染色

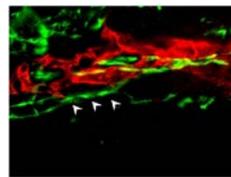
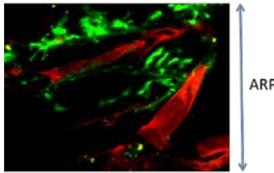


抗 PGP9.5 抗体による免疫染色



RECA1 免疫陽性の血管内皮細胞は、PGP9.5 陽性の歯根膜ルフィニ神経終末と同様に歯根膜の ARP に限局する。

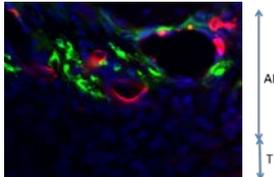
抗 RECA 抗体 (赤) と抗 PGP9.5 抗体 (緑) の  
 蛍光二重免疫染色



血管(赤)  
 シュワン細胞(緑)が連  
 なったシュワン細胞索  
 (矢尻)

血管周囲に遊走シュワン細胞が連なったシ  
 ュワン細胞索が見られる。

抗 RECA1 (赤) と抗 S100 タンパク (緑) 抗体  
 の蛍光二重免疫染色 ; DAPI (青)。

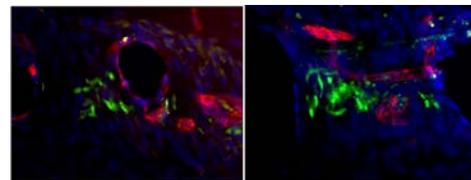


下歯槽神経切断 14 日後には、再生の過程に  
 ある PGP9.5 陽性のルフィニ神経終末は、樹  
 枝状に分岐し歯根膜の ARP に存在した。RECA1  
 陽性の血管内皮細胞と S100 タンパク陽性の  
 楕円形の終末シュワン細胞もともに ARP に認  
 められた。

対称群の歯根膜において、ルフィニ神経終末  
 に付随する抗 S100 抗体陽性の終末シュワン  
 細胞も楕円形を示し ARP に局在する。

下歯槽神経切断 14 日後 (左) と非切断側 (対  
 照群) の歯根膜像 (右) : 抗 PGP9.5 抗体 (緑)  
 と抗 RECA1 抗体 (赤) の二重免疫染色

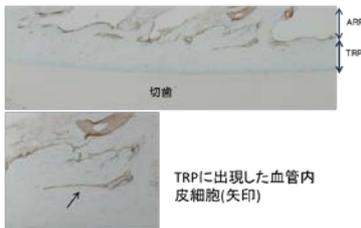
(2) 実験群では、下歯槽神経切断 7 日後の  
 歯根膜において、歯根膜ルフィニ神経終末は  
 消失し、わずかに数珠状の抗 PGP 抗体の神経  
 線維の再生が見られた。RECA1 陽性の血管内  
 皮細胞は、切歯側の歯根膜領域 (TRP :  
 tooth-related part) にも観察された。S100  
 陽性の終末シュワン細胞は、紡錘形を示し  
 TRP に遊走した。



抗 PGP9.5 抗体 (緑) 抗 RECA1 抗体 (赤)

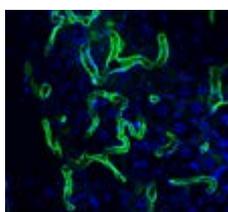
RECA1 陽性の血管内皮細胞は、対照群と同様  
 に ARP に局限して分布する。

下歯槽神経切断 7 日後の歯根膜像 :  
 抗 RECA1 の免疫染色



RECA1 陽性の血管内皮細胞は ARP の血管周囲  
 だけでなく TRP にも存在する。

(3) 対照群三叉神経節において、トマトレ  
 クチンの静脈内注射により三叉神経節の機  
 能血管が標識された。

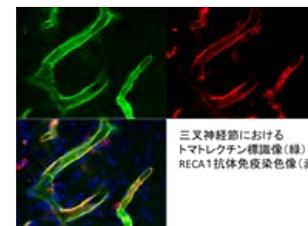
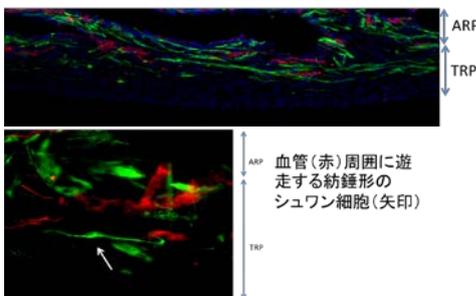


トマトレクチン (緑)  
 DAPI (青)

RECA1 陽性の血管内皮細胞はトマトレクチン  
 標識と一致した。

トマトレクチン標識を行った三叉神経節に  
 おける抗 RECA1 抗体の蛍光免疫染色

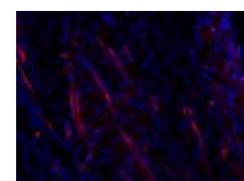
抗 RECA1 (赤) と抗 S100 (緑) の蛍光二重免  
 疫染色



三叉神経節における  
 トマトレクチン標識像 (緑)  
 RECA1 抗体免疫染色像 (赤)

TRP に出現した抗 RECA1 陽性の血管内皮細胞  
 の周囲には、TRP に遊走した抗 S100 陽性のシ  
 ュワン細胞が見られる。

(4) 下歯槽神経切断 7 日後、14 日後の三叉  
 神経節において、対照群と比較して明らかな  
 血管の分布の差は見られなかった。



神経切断7日後の  
 三叉神経節  
 RECA1 (赤)  
 DAPI (青)

以上のことから、下歯槽神経切断から7日後の歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程において、神経終末の再生に先行して、歯根膜の切歯側へ一過性に血管が誘導されることが示唆された。また、この血管を足掛かりとしてシュワン細胞が遊走しシュワン細胞索が形成され、ルフィニ神経終末の再生の足場を作る可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：00397150

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし