

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09832

研究課題名(和文) 神経が顎顔面形成に与える影響を考える - 顔面半側萎縮症と顔面半側肥大症の病因解明 -

研究課題名(英文) Considering the effects of nerves on maxillofacial formation-elucidation of the etiology of hemifacial atrophy and hemifacial hypertrophy-

研究代表者

川邊 紀章 (Kawanabe, Noriaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00397879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、三叉神経および顔面神経が、成長期の顎顔面領域の形態形成に及ぼす影響を明らかにする実験を行なった。ラットの三叉神経および顔面神経の神経活動遮断実験や神経活動賦活化実験を行った結果、切歯の形成速度の低下や歯髄の石灰化、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の配列の乱れが認められた。また、Sonic hedgehog (Shh) 遺伝子欠損マウスとShh遺伝子発現マウスを解析した結果、長期の顎顔面領域の形態形成にShhの影響と思われる骨や歯の形態の変化が観察された。蛍光生体イメージングを用いた実験を行った結果、神経活動遮断・賦活化の有無による特徴的な幹細胞の動態は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の研究において、神経が上皮幹細胞や間葉系幹細胞を制御していることは報告されているが、実際のヒトの疾患モデルとして神経と幹細胞の役割を調べた研究はない。また、コンディショナルノックアウトマウス等を作成して神経やShhが顎顔面の形態形成におよぼす影響を詳細に検討した研究も行われていない。従って、本研究の学術的意義は高いと考えられる。また、顎顔面領域の形態異常は外表奇形の中でも最も割合が高く、著しい不正咬合を呈することから、歯科領域において重要な疾患の一つであるが、その発症機序はほとんど解明されておらず、有効な治療方法も開発されていないことから、本研究の社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted experiments to clarify the effects of the trigeminal nerve and facial nerve on the morphology of the maxillofacial region during growth. As a result of nerve activity blocking experiments and nerve activity activation experiments of the trigeminal nerve and facial nerve of rats, a decrease in the formation rate of cut teeth, calcification of the pulp, and disorder of the arrangement of ameloblasts and odontoblasts were observed. It was. In addition, as a result of analyzing Sonic hedgehog (Shh) gene-deficient mice and Shh gene-expressing mice, changes in bone and tooth morphology that are thought to be the effect of Shh on long-term maxillofacial morphogenesis were observed. As a result of conducting an experiment using fluorescence bioimaging, no characteristic stem cell dynamics were observed with or without nerve activity blocking / activation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：三叉神経 顔面神経 顎顔面形態形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域の形態異常は外表奇形の中でも最も割合が高く、著しい不正咬合を呈することから、歯科領域において重要な疾患の一つである。しかし、多くの疾患の発症機序はほとんど解明されておらず、有効な治療方法も開発されていない。

申請者らは、顎顔面領域の形態異常の発症機序を解明するための手がかりとして、顔面半側萎縮症 (hemifacial atrophy) と顔面半側肥大症 (hemifacial hypertrophy) に着目した。これらの疾患では、三叉神経や顔面神経の支配領域と一致した領域で成長期の形態形成異常が認められ、様々な神経疾患を併発するという共通した特徴を持つ。

また、近年のマウスを用いた研究結果より、神経血管束が上皮幹細胞や間葉系幹細胞を制御していることが示されている。特に、神経細胞から分泌される sonic hedgehog (Shh) が上皮幹細胞や間葉系幹細胞の恒常性の維持に重要であることが示されている。しかし、これらの研究はマウスの切歯や毛包など一部の器官の幹細胞について調べたものであり、ヒトの先天異常の発症機序の解明に必要な顎顔面全体の形態形成に対する研究は行われていない。

2. 研究の目的

以上のことから、申請者らは、顎顔面領域の成長期における正常な形態形成には、Shh を介した神経細胞による幹細胞の制御が重要な役割を担っており、この制御機構が崩れると顔面半側萎縮症や顔面半側肥大症など顎顔面領域の形態異常が起こるのではないかと、この学術的「問い」を立てるに至った。

したがって、本研究の目的はマウスの三叉神経および顔面神経が、Shh を介して成長期の顎顔面の形態形成に及ぼす影響を明らかにし、顔面半側萎縮症や顔面半側肥大症など顎顔面領域の形態異常の発症機序を解明することである。

これまでの研究において、神経が上皮幹細胞や間葉系幹細胞を制御していることは報告されているが、実際のヒトの疾患モデルとして神経と幹細胞の役割を調べた研究はない。また、コンディショナルノックアウトマウス等を作成して神経や Shh が顎顔面の形態形成に影響をおよぼす時間的・空間的特徴を詳細に検討した研究もこれまで行われていない。従って、これらの研究を行う本研究の独自性と創造性は高いと考えられる。

3. 研究の方法

実験 1 では、三叉神経および顔面神経が、成長期の顎顔面領域の形態形成にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。顔面半側萎縮症のモデルとして、三叉神経および顔面神経を切断する神経活動遮断実験を行う。また、顔面半側肥大症のモデルとして、三叉神経および顔面神経に電気刺激を加える神経活動賦活化実験を行う。マウスの下歯槽神経切断により切歯の変化が生じることはすでに報告されているため、本実験がうまくいかない可能性は低く、何らかの結果は得られると考えられる。

実験 2 では、神経に発現する Shh が、成長期の顎顔面領域の形態形成にどのような影響をおよぼすのかを明らかにする。Synapsin I プロモーター (神経細胞) と、nestin プロモーター (神経細胞) を用いて、tamoxifen 依存的に Cre-loxP システムを調整できる Shh 遺伝子欠損マウスと Shh 遺伝子発現マウスを作成する。Tamoxifen 投与開始を生後 1・2・4・8 週目で行い、それぞれの時期で Shh がどのような影響をおよぼすのか時間的特徴を明らかにする。本実験がうまくいかない場合は、実験 1 の神経活動遮断実験または神経活動賦活化実験で形態変化が生じた部位の三叉神経および顔面神経から RNA を抽出し、マイクロアレイを行って shh 以外に特異的に発現する RNA の網羅的解析を行う。

実験 3 では、蛍光生体イメージングを用いて、神経活動遮断・賦活化の有無による幹細胞の動態を明らかにする。幹細胞マーカーである Gli1 または Lrig1 プロモーターを用いて、tamoxifen 依存的に Cre-loxP システムを調整できる蛍光タンパク質 (tdTomato) 遺伝子発現マウスを作成する。三叉神経および顔面神経を切断する神経活動遮断実験と、電気刺激を加える神経活動賦活化実験を行い、蛍光生体イメージングシステムを用いて経時的な幹細胞数の変化を蛍光強度で観察する。本実験がうまくいかない場合は、申請者がすでに保有している Prx1-Cre または LepR-Cre マウスを用いて間葉系幹細胞特異的に蛍光タンパク質を発現させて、蛍光生体イメージングを行いやすくする。

4. 研究成果

実験 1 では、三叉神経および顔面神経が、成長期の顎顔面領域の形態形成にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするための実験を行なった。顔面半側萎縮症のモデルとして、三叉神経および顔面神経を切断する神経活動遮断実験を、顔面半側肥大症のモデルとして、三叉神経および顔面神経に電気刺激を加える神経活動賦活化実験を行った。その結果、ラットの三叉神経切断による神経活動遮断実験において、切歯の形成速度の低下や歯髄の石灰化、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の配列の乱れが認められた。このようにラットの三叉神経切断による神経活動遮断を行うことによって、ヒトの顔面半側萎縮症 (ロンベルグ症候群) で認められる臨床所見に類似した所見が認められた。

実験 2 では、神経に発現する Shh が、成長期の顎顔面領域の形態形成にどのような影響をおよぼすのかを明らかにするための実験を行った。そのために、Synapsin I プロモーター

(神経細胞)と、nestin プロモーター(神経細胞)を用いて、tamoxifen 依存的に Cre-loxP システムを調整できる Shh 遺伝子欠損マウスと Shh 遺伝子発現マウスを作成した。このマウスを用いて、Tamoxifen 投与を行うと、Shh の影響と思われる骨や歯の形態の変化が観察された。

実験 では、蛍光生体イメージングを用いて、神経活動遮断・賦活化の有無による幹細胞の動態を明らかにする実験を行った。こちらは、神経活動遮断・賦活化を行うことによって特徴的な幹細胞の動態は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植田 紘貴 (Ueda Hirotaka) (10583445)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	早野 暁 (Hayano Satoru) (20633712)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	岡村 裕彦 (Okamura Hirohiko) (20380024)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	宝田 剛志 (Takarada Takeshi) (30377428)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関