

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19592124  
研究課題名 (和文) 三叉神経節を介した上下顎骨の協調的骨代謝調節機構の解明  
研究課題名 (英文) A study on the cooperative regulation of bone metabolism between upper and lower jaw through the trigeminal ganglion

研究代表者  
後藤 哲哉 ( GOTO TETSUYA )  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：70253458

研究成果の概要 (和文)：本研究では、三叉神経節を介する上・下顎骨の協調的な骨代謝調節機構を明らかにするために、培養骨芽細胞とラット上顎臼歯矯正力付与モデルを使用して実験を行った。その結果、三叉神経節では衛星細胞を介して周囲の神経細胞に影響を及ぼすシステムが存在し、これによって、上下顎領域の神経細胞が周囲の衛星細胞の活性化を介して協調的に substance P や neurokinin B などの神経ペプチドを出して、骨代謝を調節していることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：For studying the cooperative regulation of bone metabolism between upper and lower jaw through the trigeminal ganglion, we examined the regulation system by using the cultured osteoblasts and the orthodontic tooth movement model for the rat upper molar. Our results demonstrated that the neurons for mandibular and maxilla secrete the neuropeptides, such as substance P and neurokinin B, to regulate their bone metabolism through the activation of satellite cells around the neurons.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：神経ペプチド、知覚神経、三叉神経節、骨芽細胞、破骨細胞、顎骨

## 1. 研究開始当初の背景

上・下顎顎骨は協調的に成長し、歯牙を喪失すると歯槽骨は吸収されてしまう。また、軟食を食べていると硬い食物を食べている場合と比べると顎骨の成長が悪い事はよく言われていることである。今までこれらの事象は歯牙に加わるメカニカルストレスによるものと説明されてきたが、歯根膜細胞や骨芽細胞が受けるメカニカルストレス以外に、実際には神経が感受することによる神経性の骨代謝調節が考えられる。神経と骨代謝の関係についてはほとんど分かっていなかったが、近年、我々をはじめいくつかのグループによって神経ペプチドのレセプターが骨組織の細胞にもあり、神経ペプチドが骨芽細胞、破骨細胞の細胞上のレセプターを介して、直接的に骨に作用することが明らかとなった。骨代謝および神経ペプチドに関する研究はそれぞれかなり研究が進んでいるが、骨代謝と神経ペプチドの関連を研究したものはまだ非常に少ない。近年（2005年）に米国のKarsentyらによってレプチンが視床下部および交感神経系を介して骨形成、骨吸収に関与していることがNature誌に発表されて話題になったが、われわれはそれよりはるか以前の1998年から神経と骨代謝について発表し続けてきた。神経による骨代謝の調節はまだ解明されておらず、知覚神経系、特に痛みに関する神経ペプチド、substance P (SP)、についてはわれわれが研究をリードしてきた。我々の研究により、(1)破骨細胞および骨芽細胞にSP receptorであるNK1-receptorが存在すること、(2) SPはNK1-receptorを介して破骨細胞の形成ならびに骨吸収を促進するこ

と、(3) SPは滑膜線維芽細胞の増殖を促進し、RANKLの発現を上昇させることによって破骨細胞形成を促進することなどが明らかとなった。

我々はさらに研究を進め、上・下顎では三叉神経節由来の神経ペプチドが顎骨の骨代謝に影響していることが明らかとなった。さらに、上顎神経と下顎神経は三叉神経節においてcross-excitationと呼ばれるATPを介した非シナプス性の神経伝達によって相互に影響を及ぼしていることを見いだした。われわれは、今のところラット上顎臼歯の抜歯後に生じる下顎臼歯の挺出モデルを使ってそのような現象を見いだしたが、三叉神経節においてどのようにcross-excitationを生じているのか、またin vitroにおける神経ペプチドが骨代謝に影響する分子メカニズムについては解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、

- (1) 神経ペプチドが骨代謝に影響を及ぼす分子メカニズムについて、それぞれの神経ペプチドについて明らかにすること、
  - (2) 三叉神経節においてcross-excitationを生じるメカニズムについて神経細胞と衛星細胞について明らかにすること、
- である。

## 3. 研究の方法

- (1) 神経ペプチドの骨代謝に及ぼす分子メカニズムの解明。

ラット頭頂骨をコラゲナーゼを含む酵素液で骨芽細胞を分離培養するか、ラット脛骨骨髓細胞を用いて骨芽細胞として用いた。培養はアスコルビン酸および $\beta$ グリセロリン

酸および 10% の血清を含む溶液にて培養した。3 週間の培養期間のうち第 1 週を培養初期、第 2 週目を培養中期、第 3 週を培養後期としてそれぞれの時期にいろいろな濃度の神経ペプチドを加え、骨形成を von Kossa 染色で調べるとともに、RT-PCR 法により骨関連遺伝子の発現について調べた。神経ペプチドとしては substance P (SP) ならびに neurokinin A (NKA), neurokinin B (NKB) を用いた。

(2) 三叉神経節神経細胞と衛星細胞について。

ラット上顎臼歯の間に矯正用ゴムを挿入し、3、5、7 日後に灌流固定を行い、三叉神経節を取り出した。一部の試料に対しては比較として抜歯を行った。三叉神経節の凍結切片を作成し、神経細胞のマーカーである PGP9.5 に対する抗体、衛星細胞のマーカーである glutamine synthetase (GS) に対する抗体、活性化した衛星細胞のマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する抗体、さらに傷害を受けた神経細胞のマーカーである ATF3 に対する抗体を用い、免疫蛍光染色によってその発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 神経ペプチドの骨代謝に及ぼす分子メカニズム

RT-PCR 法により培養骨芽細胞には SP, NKA, NKB のそれぞれのレセプターである neurokinin-1 receptor (NK1-R), NK2-R, NK3-R が認められた。特に、NK1-R については培養初期の骨芽細胞には発現がほとんど認められず、培養後期の骨芽細胞に強い NK1-R の発現が認められた。

骨形成に関しては SP, NKA が  $10^{-9}$  M の比較的高い濃度で骨形成の増加が認められたのに対し、NKB は生理的濃度に近い  $10^{-11}$  M の低い濃度で骨形成の促進が認められた (図 1)。

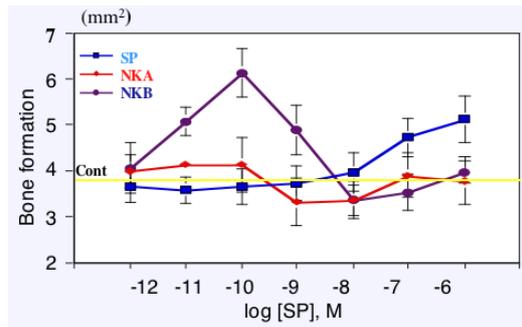


図 1 SP, NKA, NKB の各種濃度による骨形成量の変化

(2) 三叉神経節神経細胞と衛星細胞について

以前の我々の研究でラットの上顎臼歯を抜歯すると、三叉神経節においては傷害を受けた上顎神経領域の神経細胞のみならず下顎神経領域の神経細胞にも神経ペプチドの産生の増加が認められた。そこで、本実験はその相互作用に衛星細胞が関与するかどうかを調べた。

抜歯もしくは矯正力によって経時的に三叉神経の上顎神経領域の神経細胞には ATF3 陽性神経が増加したが、その傷害を受けた神経細胞周囲の衛星細胞も同様な経過で GFAP 陽性を示した (図 2)。また、三叉神経内でも下顎神経領域の神経は傷害を受けていないので、ATF3 陽性神経細胞は出現しなかったが、GFAP 陽性衛星細胞は上顎神経領域と同じように増加した。

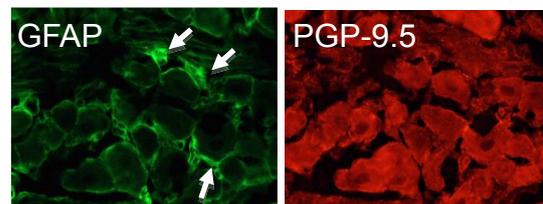


図 2 上顎神経傷害後 3 日目に見られた神経細胞周囲の衛星細胞の活性化 (矢印は活性化した衛星細胞; GFAP 陽性細胞を示す)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Gunjigage K.K., Goto T., Nakao K, Kobayashi S., and Yamaguchi K: Activation of Satellite Glial Cells in Rat Trigeminal Ganglion After Upper Molar Extraction. Acta Histochem Cytochem (査読あり) 12; 143-149, 2009.

② Goto T., Nakao K, Gunjigake KK, Kido MA, Kobayashi S., Tanaka T: Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptor. Neuropeptides (査読あり) 41 (1): 25-31, 2007.

[学会発表] (計 10 件)

①市木貴子、後藤哲哉、森川和政、郡司掛香織、中尾加代子、小林 繁; Neurokinin B とラット破骨細胞の関連について。第 69 回九州歯科学会、平成 21 年 5 月 30、31 日、北九州市。

②郡司掛香織、後藤哲哉、中尾加代子、蔵田清香、木尾哲朗、小林 繁、山口和憲; 矯正の歯の移動はラット三叉神経節衛星細胞を活性化する。第 68 回日本矯正歯科学会、平成 21 年 11 月 16~18 日、福岡市。

③Gunjigake KK, Goto T., Nakao K, Ishibe T, Kobayashi S., Yamaguchi K: Expression of GFAP in satellite glial cells after tooth extraction. 86th IADR, July 2-5, 2008, Toronto, Canada.

④Gunjigake KK, Goto T., Nakao K, Ishibe T, Kobayashi S., Yamaguchi K: Nociceptive stimulation induces satellite glial cell activation. 56th JADR, November 29, 30, 2008, Nagoya.

⑤ Goto T.: Neural Regulation of Bone Metabolism, Sensory Neuropeptides Modulate Bone Remodeling. 56th JADR, November 29, 30, Nagoya.

⑥後藤哲哉; 組織細胞化学からみた硬組織研究の新展開、神経系による骨代謝の調節; 第 49 回日本組織細胞化学会総会、平成 20 年 10 月 5 日、長崎市。

⑦ 後藤哲哉、市木貴子、郡司掛香織、中尾加世子、小林 繁; ラット初代培養系骨芽細胞の骨形成に対するタキキニンの作用について。第 50 回歯科基礎医学会総会、平成 20 年 9 月 23-25 日、有明、東京。

⑧市木貴子、森川和政、中尾加世子、郡司掛香織、小林 繁、後藤哲哉; ラット破骨細胞におけるニューロキニンレセプターの発現について。第 68 回九州歯科学会、平成 20 年 5 月 31、6 月 1 日、北九州市。

⑨郡司掛香織、後藤哲哉、中尾加世子、木尾哲朗、小林 繁、山口和憲; 抜歯後のラット三叉神経節衛星細胞における GFAP の発現。第 67 回日本矯正歯科学会、平成 20 年 9 月 16 日、千葉市。

⑩後藤哲哉、中尾加代子、郡司掛香織、小林 繁; ラット初代培養骨芽細胞に対する neurokinin B の作用について。第 49 回歯科基礎医学会総会、8 月 29~31 日、札幌市。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 哲哉 (GOTO TETSUYA)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 70253458

### (2) 研究分担者

小林 繁 (KOBAYASHI SHIGERU)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 10118078

### (3) 連携研究者

牧 憲司 (MAKI KENSHI)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 60209400