

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 年～2008 年
 課題番号：19791497
 研究課題名 (和文) 下歯槽神経障害に対するリコンビナント神経栄養因子の再生促進効果
 研究課題名 (英文) Accelerating effect by administration of recombinant neurotrophic factor on nerve regeneration following the inferior alveolar nerve
 研究代表者
 安島 久雄 (AJIMA HISAO)
 新潟大学・医歯学総合病院・助教
 研究者番号：80377150

研究成果の概要：本研究では、マウス下歯槽神経の切断術後、持続的にリコンビナント神経栄養因子を投与し、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を検索し、リコンビナント神経栄養因子投与のより効果的な作用時期、投与時期を明らかにすることを最終目的としている。trkB のリガンドである BDNF と NT-4/5 の役割について、BDNF-KO マウス (ヘテロ型)、NT-4/5-KO マウス (ホモ型) に対して、下歯槽神経切断実験を行い、BDNF は神経再生過程の全般にわたり、また NT-4/5 は神経再生過程の初期に関与することが想像された。一方、ラット下歯槽神経切断実験では、GDNF が歯根膜ルフィニ神経終末の成熟過程に関与していることが示唆され、歯根膜神経の再生過程には複数の神経栄養因子が時期依存的に関与していることが考えられた。また、NT-4/5-KO マウス (ホモ型) に対する浸透圧ポンプを利用した持続的リコンビナント NT4/5 投与実験により、持続的リコンビナント神経栄養因子の投与は歯根膜神経の再生を促進することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：神経成長因子、下歯槽神経切断、レスキュー実験、ルフィニ神経終末、歯根膜

1. 研究開始当初の背景

下歯槽神経は下顎孔から下顎管に入り下顎の歯および歯周組織を支配する知覚神経である。この解剖学的特徴から、顎変形症手術や智歯の難抜歯といった口腔外科手術の際、下歯槽神経はしばしば損傷を受け、知覚麻痺や知覚過敏といった偶発症を起こしやすい。これらに対する効果的な治療法も確立されていないこともあり、神経症状の回復には長期間要することは周知の事実である。

末梢神経は中枢神経に比べ、再生することが可能である。神経線維の再生過程ではさまざまな神経栄養因子 neurotrophin と同受容体 neurotrophin receptor が関与していることが明らかにされている。神経栄養因子は神経の発生、再生、維持、生存に必須の因子であり、これらは特異的な神経栄養因子受容体に結合することで、その生物学的効果を発揮する。

これまで、我々の研究グループはげっ歯類切歯歯根膜を対象として、下歯槽神経傷害後に起こる歯根膜神経の再生過程を、免疫組織化学的手法および画像解析法を用いて明らかにしてきた。げっ歯類切歯歯根膜には特徴的な形態を示す低域値遅順応性伸展受容器であるルフィニ神経終末が豊富に存在する。我々の研究グループはこの歯根膜ルフィニ神経終末が成体でも、低親和性神経栄養因子受容体 (p75-NGFR) と高親和性神経栄養因子受容体 (TrkB) を発現していることから、歯根膜ルフィニ神経終末は他の関節の機械受容器より早く再生が進行する想像されている。

高親和性神経栄養因子受容体である TrkB のリガンドが脳神経由来神経栄養因子 (brain derived-neurotrophic factor; BDNF) と neurotrophin-4/5 (NT-4/5) であることから、我々はこれら遺伝子改変マウスを用いて、下歯槽神経切断後における

歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を経日的に検索し、これら二種類の神経栄養因子が歯根膜神経の再生過程に深く関与していることを示唆した。一方、最近、我々の研究グループの Aita はグリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF) が歯根膜ルフィニ神経終末の成熟過程に重要な役割を果たしている可能性を示した。これらの所見は下歯槽神経傷害時に時期特異的に異なった神経栄養因子が関与し、これらの因子を時期特異的に作用させれば、より効果的な神経再生を引き起こすことができる可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究では、マウスに下歯槽神経の切断術を行い、背部皮下にミニ浸透圧ポンプを埋入し、持続的にリコンビナント神経栄養因子を投与し、免疫細胞化学的ならびに画像処理法を用いた統計処理法を用いて歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を検索する。このことにより、リコンビナント神経栄養因子投与のより効果的な作用時期、投与時期を明らかにすることができる。また、BDNF や NT-4/5 などの神経栄養因子が歯根膜組織で産生されていると考えられるので、下歯槽神経切断後における歯根膜組織をレーザーマイクロダイセクション法により採取し、歯根膜組織における BDNF や NT-4/5 のタンパク発現量を定量化し、「下歯槽神経傷害時に時期特異的に異なった神経栄養因子が関与する」というこれまでの我々の仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) 下歯槽神経切断モデルの作成

8%抱水クロラール腹腔内麻酔下で、手術用顕微鏡を用いて各動物の片側の下歯槽神経を切断する (Exp群)。切断方法は Atsumi et al. (Brain Res., 1999)

に準じた。反対側は下歯槽神経を露出後、切断せず、Sham群とし、無処置群はcontrol群とした。

(2) 歯根膜ルフィニ神経終末の免疫組織化学的同定

経日的に4%パラホルム固定液で還流固定を施し、下顎骨を取り出した。下顎骨は10%EDTA溶液で脱灰し、氷晶防止処置後、凍結切片を作成し、神経特異タンパクの一つであるprotein gene product 9.5 (PGP 9.5)またはグリアタンパクであるS-100タンパクの免疫染色を施した。なお、神経線維の分布密度の計測はNIH Imageを用いて行った。

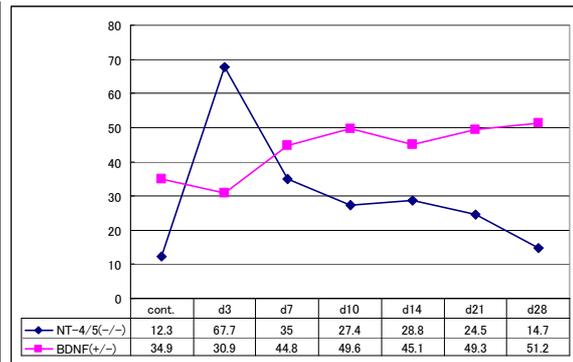
(3) ミニ浸透圧ポンプの埋入動物に対する免疫染色、画像解析

動物の背部皮下にリコンビナントNT-4/5 (Pepro Tech EC, London, UK)、滅菌生理食塩水を満たしたミニ浸透圧ポンプ (DURECT corp.社製Micro-osmotic pump model 1002)を埋入した。このポンプの流量は1時間当たり0.5 μ lである。

経日的に凍結切片を作成し、PGP 9.5の免疫染色を施し、NIH imageにて神経分布密度を計測した。

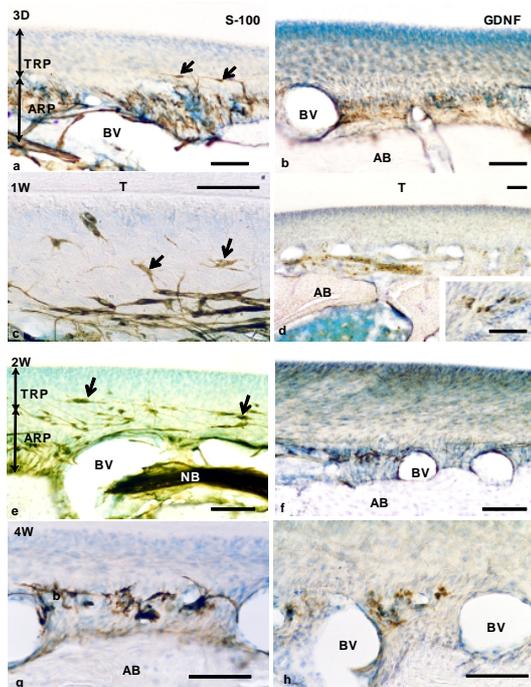
4. 研究成果

(1) BDNF-KO マウス (ヘテロ型)、NT-4/5-KO マウス (ホモ型) の下歯槽神経を切断し、神経線維の特異的マーカーである protein gene product9.5 (PGP9.5) の抗体による免疫染色を行い、歯根膜神経の再生過程の定量化を画像解析法により求めたところ、BDNF は神経再生過程の全般にわたり、また NT- 4/5 は神経再生過程の初期に関与することが想像された。一方、GDNF が歯根膜神経終末の成熟過程に関与していることが報告されていることから、歯根膜神経の再生過程には複数の神経栄養因子が時期依存的に関与していることが考えられた。



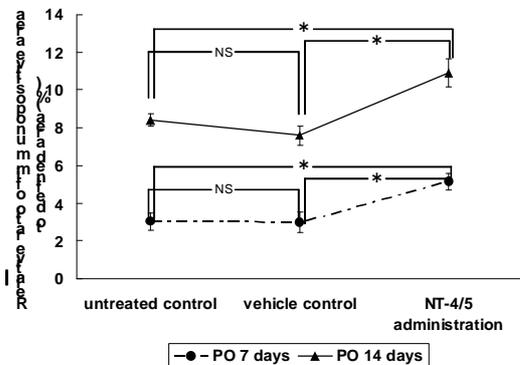
【BDNF、NT-4/5 遺伝子改変マウスにおける歯根膜神経分布密度減少率の経日的変化】

(2) Atsumi らの方法に従い、ラット下歯槽神経を切断し、下顎切歯歯根膜におけるGDNF の発現変化を免疫組織化学で染色したところ、切断後3日~1週には歯根膜ルフィニ神経終末に付随する終末シュワン細胞は消失し、正常時には存在しない歯牙寄りの歯根膜(tooth-related part; TRP)にシュワン細胞が遊走した。この細胞は紡錘形を示し、またGDNFは陰性であった。切断後2週でこのGDNF陽性細胞の数はピークに達したが、以後、TRPから消失した。一方、この時期、歯根膜ルフィニ神経終末は再生が進むとともに、GDNF陽性の終末シュワン細胞が出現した。



【下歯槽神経切断によるシュワン細胞の変化】

(3) NT-4/5-KO マウス (ホモ型) に対する浸透圧ポンプを利用した持続的リコンビナント NT4/5 投与実験では、下歯槽神経切断後 7 日、14 日後の神経密度は vehicle 群に比べそれぞれ上昇したが、7 日と 14 日後の上昇率に有意差はなかった。また、下歯槽神経傷害を行わなかった群の歯根膜神経の密度も上昇した。このことから、持続的リコンビナント神経栄養因子の投与は歯根膜神経の再生を促進することが明らかとなった。



【リコンビナント NT-4/5 投与による神経分布密度の変化】

これらのことは GDNF が歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程の成熟期に関与することを示している。前年度の研究成果と考えあわせると、BDNF は歯根膜ルフィニ神経終末の再生のトリガーとなり、再生期間中にわたって作用し、NT-4/5 は再生の初期、GDNF は再生の成熟期に作用していることが伺え、歯根膜ルフィニ神経終末の再生には多様な神経栄養因子が時期依存的に作用していることが考えられた。

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〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安島 久雄 (AJIMA HISAO)
新潟大学 医歯学病院・助教
研究者番号: 80377150

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし