

平成 22 年 4 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791333
 研究課題名（和文） 口腔内感覚受容器における小胞性アミノ酸輸送体の局在とその機能
 研究課題名（英文） Localization of vesicular amino acid transporters in oral sensory receptors
 研究代表者
 本間 志保（HONMA SHIHO）
 大阪大学・大学院歯学研究科・講師
 研究者番号：40372627

研究成果の概要（和文）：

小胞性グルタミン酸輸送体(VGLUT)は、興奮性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輸送する働きを持つが、近年シナプスの存在しない部位においても VGLUT の存在が明らかとなりその機能に関して注目が集まっている。本研究では口腔内感覚受容器ならびにそれらの支配ニューロンの細胞体における VGLUT の局在を明らかにした。歯髄・歯肉の自由神経終末、歯根膜ルフィニ神経終末・咬筋筋紡錘・口蓋粘膜内のメルケル終末様構造を示す機械受容器においても VGLUT の存在が確認できた。それらの神経終末にはシナプスを形成しないが、シナプス小胞以外の小胞が多く存在することから、小胞の開口分泌やリサイクリングに VGLUT が関与している可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：

Vesicular glutamate transporter play a role of transport glutamate into the synaptic vesicles. Recently vesicular glutamate transporter were observed in the organ which does not have synaptic vesicles. However, the function of the vesicular glutamate transporter in such organ is still unclear. In this study immunoreactivity of vesicular glutamate transporters was observed in mechanoreceptors in oral region. This suggests that vesicular glutamate transporters are involved in the perception of mechanical stimulation in oral region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：三叉神経、VGLUT、免疫組織化学

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一次求心線維によって支配されている。その感覚の種類は、歯髄においては痛覚、歯根膜においては痛覚と触圧覚、口腔粘膜においてはそれに加えて温冷覚などの感覚がある。なかでも歯根膜における触圧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。口腔諸器官の固有感覚を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。これまでに歯根膜ルフィニ神経終末の特性については詳細な検討がなされており、受容器の軸索性分にカルシウム結合タンパク質を含むことや、小型のシナプス小胞様の構造が認められることが明らかとなっている。

末梢感覚受容器が感覚刺激を受けると、その刺激を電気信号に変換し上位中枢へと伝達するが、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関わっている。それらのイオンチャネルは細胞骨格などと連結、架橋しており、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言われている。機械受容器であるルフィニ神経終末では機械刺激により軸索終末へカルシウムの流入が起こり、刺激が中枢へ伝えられる。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整に関わっているとも考えられている。一方、口腔周囲に存在するもう一つの機械受容器である咀嚼筋の筋紡錘に関しては報告がほとんどない。四肢の筋においては屈筋・伸筋ともに筋紡錘の存在が認められるのに対し、顎顔面領域では筋紡錘は閉口筋にのみ存在し、拮抗筋である開口筋における筋紡錘の存在は確認されていない。さらに、四肢の筋の筋紡錘は脊髄後根神経節ニューロンにより支配されているが、咀嚼筋筋紡錘は脳内に位置する三叉神経中脳路核ニューロンにより支配されている。後根神経節ニューロンはその細胞体にシナプス接合を認めないのに対し、三叉神経中脳路核ニューロンは上位中枢からのシナプス入力を受けている点でも大きな相違がある。

近年、小胞性グルタミン酸輸送体 (VGLUT) が四肢の筋紡錘に存在することが明らかとなった。筋紡錘は歯根膜機械受容器と同様の固有感覚をつかさどる機械受容器である。VGLUT には VGLUT1, 2, 3 の3つのサブタイプが同定されており、これらの主な働きは中枢神経系における神経伝達物質であるグルタ

ミン酸をシナプス小胞内に運ぶことである。末梢感覚受容器である筋紡錘にはシナプスは存在しないにもかかわらず、VGLUT が筋紡錘で認められたということは VGLUT がシナプス伝達に関わる働き以外にも異なる作用を持っている可能性が示唆されるものであり、その機能に関して注目が集まっている。

2. 研究の目的

口腔内および口腔周囲の末梢感覚受容器が受け取る感覚情報は、食物の摂取や咀嚼といった生命維持の運動と連携する極めて重要な感覚である。これらの感覚情報は三叉神経一次求心線維により上位脳へと伝達され処理される。その感覚情報は三叉神経運動ニューロンへ伝達され末梢の効果器へと伝えられることによって摂食のための顎運動が行われる。同様な感覚と運動の一連のメカニズムの中でも、脊髄神経によって伝えられる四肢感覚と骨格筋との関係と、脳神経である三叉神経系では異なる点が多い。四肢の感覚や運動に関する研究はこれまでに多くなされているが、三叉神経に支配される顎顔面領域における研究では未だ不明な点が多い。本研究では三叉神経系における VGLUT の局在を免疫組織学的手法にて明らかにし、感覚受容器と VGLUT の関連性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

実験動物として成獣 SD システムラットを用いた。動物を 4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定後、脳幹、三叉神経節、口腔粘膜、顎骨を摘出した。後固定後、サンプルは 20% sucrose/PBS 溶液に浸漬、顎骨は 7.5%EDTA 液にて脱灰した後、20% sucrose/PBS 溶液に浸漬し、凍結切片を作成した。VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 に対する免疫染色を ABC 法あるいは蛍光抗体法にて行い、光学顕微鏡、または蛍光顕微鏡にて観察した。

三叉神経節ニューロン陽性細胞については各サブタイプの免疫陽性細胞体の断面積の計測を行った。

顎骨から切り出した歯根膜に関しては、免疫反応を施した後、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作成した。さらに酢酸ウラン溶液とクエン酸鉛溶液にて電子染色を行ったのち、電子顕微鏡にて微細構造の観察を行った。

また、抱水クロラル麻酔下で咬筋神経を剖出、絹糸にて結紮した後動物を覚醒させ、一日後に灌流固定を行った。咬筋神経を結紮部位より中枢側、末梢側にそれぞれ約 5 mm の長さで摘出し、後固定後 20% sucrose/PBS 溶

液に浸漬し、神経線維の長軸方向に凍結切片を作成した。神経結紮した軸索における免疫組織化学を行うことにより、中枢の細胞体から末梢の神経終末へ VGLUT が輸送されているかどうかを確認した。

4. 研究成果

(1) 三叉神経ニューロンにおける VGLUT サブタイプの存在の確認

三叉神経中脳路核ニューロンでは、ほぼ全ての細胞において VGLUT1 陽性反応が認められたが、VGLUT2, VGLUT3 の陽性反応は認められなかった。

三叉神経節ニューロンにおいては VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 全てのサブタイプの免疫反応が確認された。さらに三叉神経節ニューロンにおける各サブタイプの免疫陽性細胞の細胞体断面積を測定、比較したところ、VGLUT1 と VGLUT3 では大型から中型のニューロンが多く認められた。一方 VGLUT2 は中型から小型の細胞に多く認められた。

これらの結果から一次求心性ニューロンでも感覚の種類によって VGLUT 局在の異なる可能性が示唆された。

(2) 咬筋神経結紮実験による VGLUT の軸索輸送に関する結果

結紮部位の中枢側には VGLUT 全てのサブタイプの蓄積が認められた。咬筋神経は咬筋の固有感覚（筋紡錘）と運動を司る神経でありその支配ニューロンは中脳路核と運動核にある。三叉神経運動核ではニューロンの細胞体に VGLUT3 のみ陽性であった。

神経結紮部位で認められた VGLUT はそれぞれ細胞体からの軸索輸送で運ばれていると考えられる。しかしながら、中枢レベルでは三叉神経中脳路核と三叉神経運動核において3つ全てのサブタイプが検出されてはいない。VGLUT2 は免疫反応で検出できないレベルではあるものの運動核ニューロンまたは中脳路核ニューロン由来であると考えられる。このことより免疫組織化学的手法では検出できなかったサブタイプも細胞体には存在している可能性があり、今後分子生物学的手法を用いての詳細な検索が必要であることが分かった。

(3) 末梢感覚受容器におけるグルタミン酸輸送体の局在

末梢感覚受容器では、まず切歯歯根膜機械受容器であるルフィニ神経終末に VGLUT1 陽性反応が認められた。ルフィニ神経終末は軸索終末とそれを取り囲むシュワン鞘から構成されているが光学顕微鏡ではシュワン鞘と軸索終末との区別をつけることは困難であるため、さらに電子顕微鏡による微細構造の観察を行った。その結果 VGLUT1 は軸索終

末にのみ陽性反応が認められシュワン鞘は陰性であった。軸索終末内には小胞様構造が認められ、それらの小胞の膜に強い免疫反応が認められた。このことから、VGLUT1 はルフィニ神経終末の軸索終末内にある小胞膜においてグルタミン酸輸送などの作用をもつことが考えられるが、ルフィニ神経終末におけるグルタミン酸の存在はまだ明らかとなっていない。仮に小胞内にグルタミン酸が存在すると考えると、ルフィニ神経終末の感覚受容機構にグルタミン酸ならびに VGLUT が関与しているということも考えられる。この感覚受容機構を明らかにするためには、さらなる研究が必要であり、今後の課題と考えている。

また口蓋粘膜における機械受容器と考えられているメルケル様終末においても VGLUT1 が観察された。さらに、咬筋の筋紡錘にも VGLUT1 陽性反応が認められた。

これら末梢感覚受容器における VGLUT の局在を明らかにしたことにより、口腔感覚において機械受容器の感覚受容に VGLUT1 が深く関与していることが示唆された。特に歯根膜ルフィニ神経終末における VGLUT の局在は、感覚受容機構やあるいは軸索終末に含まれる小胞の exocytosis や recycling に VGLUT が関与している可能性が考えられる。その詳細な機能と VGLUT との関連性を明らかにすることは今後の研究課題である。

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1件)

Shiho Honma, Kunitaka Taki, Shi Lei, Hitoshi Niwa, Satoshi Wakisaka. Immunohistochemical localization of SNARE proteins in dental pulp and periodontal ligament of the rat incisor. The Anatomical Record. 査読有、(in press, published online in early view) 2010.

〔学会発表〕(計2件)

①本間志保、脇坂 聡、三叉神経運動核における小胞性グルタミン酸輸送体の局在、第51回歯科基礎医学会、2009年9月11日、朱鷺メッセ(新潟県)

②本間志保、加藤亜季子、脇坂 聡、ラット三叉神経節および口腔内感覚受容器における小胞性グルタミン酸輸送体の分布局在、第114回日本解剖学会全国学術集会、2009年3月28日、岡山理科大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 志保 (HONMA SHIHO)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：40372627