

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20791488

研究課題名（和文）カプサイシンを利用した、骨欠損修復メカニズムにおける感覚神経の役割に関する研究

研究課題名（英文）Study of involvement of sensory neurons in bone defect repair in rats with capsaicin-induced sensory denervation

研究代表者

中村 恵 (NAKAMURA MEGUMI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：20431512

研究成果の概要（和文）：

ラットを用いて感覚神経の機能を抑制し、骨修復を検討した。ラット頭頂骨に規格化した骨欠損を作製し、Capsaicinを投与した実験群と投与しない対照群との間で、経時的な修復骨量をX線画像により、また骨形成と骨吸収の活動性をオステオカルシンとカテプシンKのmRNA発現により、それぞれ定量的に解析し比較検討した。本研究で、感覚神経が骨修復過程において、リモデリングの制御に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated bone repair in sensory-denervated rats. Nine-week-old male Wistar rats received subcutaneous injections of capsaicin to denervate sensory neurons. Rats treated with the same amount of vehicle served as controls. A standardized bone defect was created on the parietal bone. We measured the amount of repaired bone with quantitative radiographic analysis and the mRNA expressions of osteocalcin and cathepsin K with real-time PCR. The results suggested that capsaicin-induced sensory denervation affects the bone defect repair and remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,010,000	303,000	1,313,000
2010年度	1,200,000	260,000	1,460,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,110,000	833,000	3,943,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨、修復、感覚神経、カプサイシン、リモデリング、X線画像解析、real-time PCR、ラット

1. 研究開始当初の背景

骨は、一生を通して骨形成と骨吸収から成るリモデリング（改造）を繰り返す。骨修復においては、新生骨はリモデリングの結果として形成される。骨には感覚神経が豊富に分布し、感覚神経終末から放出される Substance P や calcitonin gene-related peptide (CGRP) は骨のリモデリングに関与することが報告されている。従来、ラットの実験的な骨折、骨欠損あるいは抜歯窩を利用した研究では、骨修復領域における Substance P や CGRP を含む神経線維の密な分布が報告され、皮膚においては感覚神経が創傷治癒に促進的な役割を演じることが示されている。本研究の開始当初では、感覚神経の骨修復における関与が想定されたが、その役割の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

トウガラシの主成分である Capsaicin を投与すると、知覚麻痺を起こすことから、ラットを利用した感覚神経遮断の実験系において Capsaicin が利用されている。本研究では、ラットに Capsaicin を投与して感覚神経の機能を抑制し、骨修復について検討することを目的とした。具体的には、ラット頭頂骨に規格化した骨欠損を作製し、Capsaicin を投与した実験群と投与しない対照群との間で、経時的な修復骨量を X 線画像により定量的に解析し、比較検討した。また、骨修復過程において、Capsaicin を投与した実験群と投与しない対照群との間で、骨芽細胞のマーカーであるオステオカルシンと破骨細胞のマーカーであるカテプシン K の mRNA の発現を real-time PCR 法を用いて定量的に解析し、比較検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物の取り扱いについては、東北大学における動物実験に関する指針に則った。生後 9 週齢 Wistar 系雄性ラット (体重 190–240 g) を用い、実験期間中はラット用固形飼料および水にて飼育した。

(2) Capsaicin 投与

Capsaicin (Sigma, St Louis, MO, USA) を tween80、エタノール、生理食塩水を 1:1:8 の割合で混合した溶媒に溶解し、投与用 Capsaicin 溶液 (10mg/ml) とした。生後 9 週齢雄性ラットをエーテル吸入麻酔後、ペントバルビタール (40mg/kg) を腹腔内に注射し、全身麻酔を施した。同時に、Capsaicin 投与

によって引き起こされる呼吸困難を抑制する目的で、アトロピン (0.2mg/kg) を腹腔内に注射した。アトロピン投与の 15 分後に実験群ではラットの背側脊柱上に Capsaicin 溶液を皮下投与した。Capsaicin 投与は 2 日間に渡り、1 日目の午前に 25mg/kg、午後 50mg/kg、2 日目の午前に 50mg/kg をそれぞれ投与した。対照群では同様の方法で溶媒のみを投与した。Capsaicin 投与の効果は eye-wiping test により確認した。

(3) 手術操作

Capsaicin 溶液または溶媒のみを投与し 1 週間飼育後、ラット頭頂骨に以下の操作で規格化骨欠損を作製した。エーテル吸入麻酔後、ペントバルビタール (40 mg/kg) を腹腔内に注射し全身麻酔を施した。両側側頭線に沿って約 15mm の皮膚切開を加え、皮膚のフラップを翻転した。同様の切開を骨膜に加え、骨膜のフラップを翻転し、頭頂骨を露出させた。右側頭頂骨に直径 3.8mm のトレフィンバーを用いて、生理食塩水注水下に、骨を貫通する規格化骨欠損を作製した。この際、背側矢状静脈洞と硬膜を傷つけないよう注意した。骨膜と皮膚のフラップを復位後縫合した。

(4) 組織切片の作成

術後、2 週、4 週、6 週後に、4%パラホルムアルデヒド—0.5%グルタルアルデヒドにて灌流固定を行った。頭頂骨を摘出し、同固定液で浸漬固定した (overnight, 4°C)。試料は 10%EDTA で脱灰 (4–6 週, 4°C) し、上昇アルコール系列で脱水後、パラフィン包埋した。前頭断方向に連続切片 (5 μm) を作製し、Hematoxylin-Eosin 染色を施した。

(5) X 線画像解析

術後、2 週、4 週、6 週でラットを各期間、対照群と実験群で各 6 匹、計 36 匹用いた。固定後摘出した頭頂骨を軟 X 線装置を用い規格化した条件 (20kV, 5mA, 1min) で撮影した。撮影された X 線フィルムを現像し、スキャナーで読み込んだ。規格化骨欠損内の X 線不透過性領域の面積を規格化骨欠損部に形成された修復骨量の値とし、Scion Image ver. 4.03 (Scion corp. Frederick, MD, USA) を用いて二次元的に計測した。

(6) RNA 抽出および逆転写反応

術後、1 週、2 週、3 週、4 週、6 週でラットを、対照群と実験群で各 6 匹、計 60 匹用いた。3.8mm の規格化骨欠損内に形成された新生骨を含めた組織を摘出後、速やかに破砕し、1ml の QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Hilden, Germany) の中に溶解してホモゲナイズした後、RNeasy Lipid Tissue Mini

Kit(QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。各時点で抽出した total RNA から、random primer (Invitrogen;Carlsbad, CA, USA)、逆転写酵素(Super Script II, Invitrogen, 200U/ μ g RNA)を用いて cDNA を合成した。

(7) real-time PCR

合成した cDNA は 100 倍希釈して real-time PCR に用いた。LightCycler 1.5(Roche, Mannheim, Germany)を用い、LightCycler software version 3.5 にてオステオカルシンとカテプシン K について分析を行った。PCR 反応は以下のプログラムにて行った。
 プログラム 1(変性);1 cycle:95°C 10min
 プログラム 2(増幅);40 cycle:95°C 10s, 62°C 10s, 72°C 6s

(8) 統計処理

統計学的解析には SPSS 16.0J for Windows (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いた。X 線画像解析の結果については、対照群と実験群のそれぞれに対して Kruskal Wallis 検定を施行し、有意水準は 5%未満 ($p < 0.05$) とした。Kruskal Wallis 検定にて群内に有意差が認められた場合は、さらに Mann-Whitney の U 検定を施行して Bonferroni 補正を行い、有意水準 1.6%未満 ($p < 0.016$) で検討した。また、各週における対照群と実験群との 2 群比較は Mann-Whitney の U 検定にて行い、有意水準 5%未満 ($p < 0.05$) で検討した。計測した修復骨量のばらつきを比較する目的で、各週における修復骨量の平均値と標準偏差 (SD) から変動係数を算出し、対照群と実験群とで比較検討した。Real-time PCR の結果については、各週における対照群と実験群との 2 群比較は Mann-Whitney の U 検定にて行い、有意水準 5%未満 ($p < 0.05$) で検討した。

4. 研究成果

(1) X 線画像解析

X 線画像解析による修復骨量の定量解析で、Kruskal Wallis 検定の結果、対照群、実験群ともに有意差が認められたため (対照群: $p < 0.001$ 、実験群: $p = 0.03$)、Mann-Whitney の U 検定にて多重比較を施行して Bonferroni 補正を行った。対照群では、術後 2 週と 4 週との間、2 週と 6 週との間において修復骨量に有意差が認められ (2 週と 4 週: $p = 0.002$ 、2 週と 6 週: $p = 0.002$)、術後 4 週と 6 週の間には有意差は認められなかった ($p = 0.26$)。実験群では、術後 2 週と 6 週の間に有意差が認められ ($p = 0.009$)、2 週と 4 週の間、4 週と 6 週の間には統計学的に有意な差は認められなかった (2 週と 4 週: $p = 0.394$ 、4 週

と 6 週: $p = 0.169$)。

術後各週における対照群と実験群の修復骨量を 2 群比較で、Mann-Whitney の U 検定にて、どの週においても 2 群の修復骨量に有意差は認められなかった (2 週: $p = 0.818$ 、4 週: $p = 0.589$ 、6 週: $p = 0.894$)。なお、術後各週における修復骨量の変動係数を図 1 に示した。変動係数は、どの週においても対照群より実験群が大きかった。これは、実験群における骨修復量のばらつきが対照群に比べて大きいことを示す。また、実験群では、X 線画像において、既存骨が吸収された部分と考えられる透過像が、術後 4 週と 6 週で見られた (図 2a) が、対照群では、既存の骨に透過像は見られなかった (図 2b)。

図 1

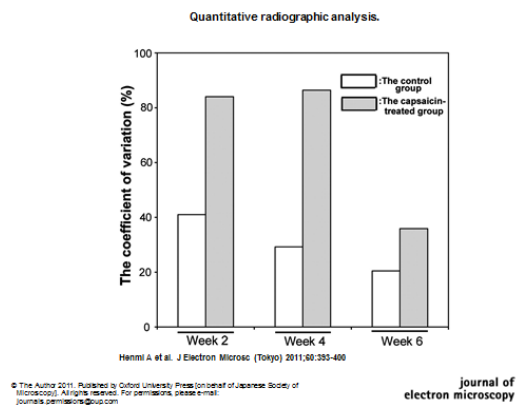
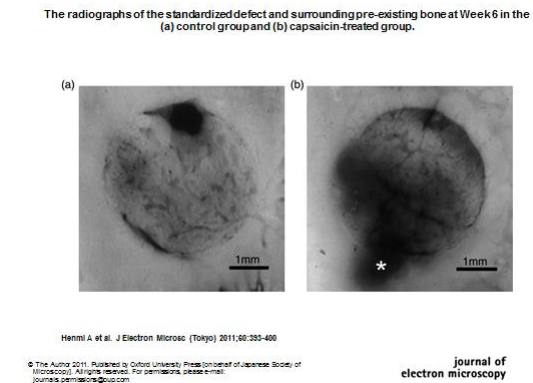


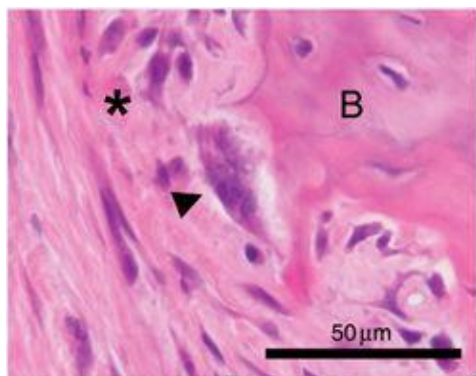
図 2



(2) 既存骨吸収部における組織像

既存骨の透過像に相当する部分の組織像の観察では、既存骨吸収部の骨表面に認められる骨吸収窩に多核細胞が認められた (図 3)

図 3



(3) オステオカルシンとカテプシン K の mRNA 発現

術後各週における対照群と実験群のオステオカルシンの mRNA 発現を 2 群比較した結果、Mann-Whitney の U 検定にて、どの週においても 2 群の mRNA 発現に有意差は認められなかった (1 週 : $p=0.699$ 、2 週 : $p=0.699$ 、3 週 : $p=0.699$ 、4 週 : $p=0.699$ 、6 週 : $p=0.485$)。また、術後各週における対照群と実験群のカテプシン K の mRNA 発現を 2 群比較した結果、Mann-Whitney の U 検定にて、どの週においても 2 群の mRNA 発現に有意差は認められなかった (1 週 : $p=0.310$ 、2 週 : $p=0.937$ 、3 週 : $p=0.485$ 、4 週 : $p=0.394$ 、6 週 : $p=0.589$)。

(4) 考察・結論

感覚神経を遮断する方法として感覚神経切断が直接的な方法であるが、技術的に困難であり、実験動物への負担も大きい。そこで本研究では、感覚神経の機能を抑制するために Capsaicin を用いた。本研究では、三叉神経支配を受ける頭頂骨に規格化した骨欠損を作製し、その修復骨量を検討した。Eye wiping test は全身の痛覚を調べる指標として用いられるが、特に三叉神経領域の痛覚を調べるのに適しているとの報告があることから、本研究では Capsaicin の効果を判定する目的で Eye wiping test を用いた。

本研究において、頭頂部に作製した規格化骨欠損の修復骨量を X 線画像解析により計測し、対照群と実験群とで比較検討したところ、修復骨量に有意差は認められなかった。しかしながら、実験群の変動係数は対照群のものと比較して著しく大きく、どの週数においても約 1.7 倍以上の値を示した (図 1)。これは、Capsaicin の投与により、修復骨量の個体差が大きくなることを意味している。このことから、感覚神経が機能しなくなることで、修復における骨形成と骨吸収の正常なバランスが維持できなくなる可能性が考えられ

る。組織損傷時に感覚神経から局所に放出される SP や calcitonin gene-related peptide (CGRP) などの神経伝達物質が、骨芽細胞や破骨細胞に作用して骨形成や骨吸収に関与するとの報告がある。また、骨芽細胞や破骨細胞には SP や CGRP の受容体が存在することも報告されている。SP は骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収を促進するという報告がある一方、SP が骨芽細胞の分化や骨形成を抑制するという報告がある。また、CGRP は骨形成を促進し、骨吸収を抑制することが報告されている。以上の報告と本研究の結果を併せて考えると、感覚神経は SP や CGRP などの神経伝達物質を介し、直接的にまたは間接的に骨芽細胞や破骨細胞に作用し、骨形成と骨吸収のバランスを制御していることが示唆された。

本研究では、骨芽細胞のマーカーであるオステオカルシンと破骨細胞のマーカーであるカテプシン K の mRNA 発現を定量したが、実験群とコントロール群では有意差を認めなかった。これは、規格化骨欠損部に分泌される主な骨基質タンパクと骨分解酵素はカプサイシン投与の影響を受けないことを示す。しかし、X 線画像解析ではカプサイシン投与群で骨形成量の個体差が大きくなることが示された。我々は、この結果の理由のひとつとして感覚神経が破骨細胞の局在へ影響を与えている可能性を考えた。既存骨吸収部に相当する骨表面の吸収窩に認められた多核細胞は破骨細胞と考えられる。これはカプサイシン投与により感覚神経の機能を抑制することで、不規則な骨吸収が行われることを示す。既存骨の吸収は正常な骨欠損修復には見られない現象である。感覚神経の機能を抑制することで正常な治癒が妨げられる可能性が考えられる。

Offley らは成獣ラットへのカプサイシン投与により骨密度と骨の強度の減少が引き起こされると報告している。この結果は、感覚神経が骨の石灰化に影響を与えている可能性を示している。本研究では、規格化骨欠損内の X 線不透過性領域の面積を骨修復量としており、X 線不透過性領域は石灰化領域を反映しているため、石灰化が不十分な領域は修復骨とみなされていない。このことから、カプサイシン投与群では石灰化が障害されている可能性も否定できない。TNAP、NPP1、DMP1、オステオポンチン、骨シアロタンパクなどの酵素や細胞外基質タンパクは骨の石灰化に関与すると考えられている。感覚神経の除神経を行った動物と感覚神経が正常な動物との間で、骨修復時のこれらの mRNA やタンパク質の発現を比較することで、感覚神経と骨の石灰化の関連を探究することができるかもしれない。

本研究は、感覚神経が骨修復において、骨

形成と骨吸収から成るリモデリングの制御に関与していることを示唆したものであり、骨修復研究における新たな知見を提供するものである。

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3件)

(1) Sasano Y, Nakamura M, Okata H, Henmi A, Mikami Y (2012) Remodeling of extracellular matrices initiates and advances calcification during development and healing of bones and teeth. Journal of Oral Biosciences 54:25-29 (査読有り)

(2) Henmi A, Nakamura M, Echigo S, Sasano Y (2011) Involvement of sensory neuron in bone defect repair in rats. J Electron Microsc 60(6):393-400 (査読有り)

(3) Andou K, Nakamura M, Ina Y, Sasaki K, Sasano Y (2011) Root and periodontal tissue development after allogenic tooth transplantation between rat littermates. Oral Diseases 17:379-386 (査読有り)

[学会発表] (計6件)

(1) Effects of capsaicin treatment on nociception and structure of trigeminal nerve fibers in adult rats (Henmi A, Nakamura M, Echigo S, Sasano Y) The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, March 8, 2011, Sendai, Japan

(2) Root elongation and periodontal tissue formation in tooth germs allogeneically transplanted between rat littermates (Andou K, Nakamura M, Ina Y, Sasaki K, Sasano Y) The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, March 8, 2011, Sendai, Japan

(3) カプサイシンを利用した骨修復における感覚神経の役割の検討。(加藤晶子、中村 恵、越後成志、笹野泰之) 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010年3月28日、盛岡市

(4) マイクロCTを利用した同腹他個体ラット間移植における歯根伸長の検討。(安藤浩二、中村 恵、笹野泰之) 第55回東北・北

海道連合支部学術集会、2009年9月26日、仙台市

(5) カプサイシンの全身投与が知覚および三叉神経線維の形態に及ぼす影響。(加藤晶子、中村 恵、越後成志、笹野泰之) 第51回歯科基礎医学会学術大会 2009年9月9日、10日、新潟市

(6) 同腹他個体ラット間の根未完成歯移植における歯根伸長と歯周組織形成に関する検討。(安藤浩二、中村 恵、伊奈慶典、佐々木啓一、笹野泰之) 第51回歯科基礎医学会学術大会 2009年9月11日、新潟市

[図書] (計1件)

(1) Henmi A, Nakamura M, Echigo S, Sasano Y (2012) Effects of capsaicin treatment on nociception and structure of trigeminal nerve fibers in adult rats. In: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N (eds) Interface Oral Health Science 2011, Springer, Tokyo, pp.140-142

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 恵 (NAKAMURA MEGUMI)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 20431512