

機関番号 : 32667

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21791800

研究課題名 (和文) 顎顔面領域の骨代謝機能に関わるグルタミン酸作動性三叉神経回路の解析

研究課題名 (英文) Glutamatergic trigeminal circuits in relation to craniofacial bone metabolism

研究代表者

井村 幸介 (IMURA KOSUKE)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号 : 10415086

研究成果の概要(和文):骨代謝に神経が関与することが明らかになりつつある。しかしながら、骨代謝関連神経回路の解剖学的な枠組みについては不明な点が多い。代表者は、その神経回路を明らかにする糸口として、グルタミン酸が末梢神経(三叉神経)から放出される可能性があることに着目し、顎顔面領域の骨内の分布を調べた。骨表面(骨膜)に、グルタミン酸を放出する可能性がある末梢神経の分布を確認した。骨代謝を担う細胞である骨芽細胞や破骨細胞には、グルタミン酸受容体が存在し、神経由来のグルタミン酸がこれらに働きかける可能性があるかもしれない。現在、どの神経細胞群が骨代謝に関連するのか、それを同定する実験を継続している。

研究成果の概要(英文): Some studies have discussed that the nervous system contributes to bone metabolism. However, the neuroanatomical basis for bone metabolism is not clear especially in craniofacial bones. I have investigated the innervations of craniofacial bones by means of immunohistochemistry. Distribution patterns of the peripheral nerve were detected using antibody against vesicular glutamate transporter (VGluT). The VGluT positive nerve (VGluT+) releases glutamate as neurotransmitter. I found the VGluT+ terminals in the periosteum. The osteoclast and osteoblast contribute to bone metabolism and express glutamate receptors. The VGluT+ terminals may effect to the bone metabolism as an extrinsic neural source of glutamate. I have been continuing to identify parent neurons of the VGluT+.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：口腔解剖学（含組織学・発生学）

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では、骨代謝に重要であるグルタミン酸が三叉神経末梢分泌性であることを確かめ、グルタミン酸受容体の分布を骨組織で解析し、末梢神経性グルタミン酸分泌の生理的な意義を明らかにすることを長期の目標におく。代表者はすでに、骨代謝に関連があると思われる神経終末を骨膜において観察しており（未発表、平成19-20年度科研費研究課題）、今回は広範な顎顔面領域の骨に分布する神経終末と骨代謝との関連性に注目する。その理由は、以下の研究報告をもとにしている。

三叉神経系は、顎顔面領域の体性感覚と固有感覚を中枢側に伝達する重要な役割を担う。その際に、興奮性伝達物質としてグルタミン酸が、末梢側から中枢側のシナプス後膜に分泌されることで感覚情報が伝達される。ところが驚くことに、感覚を受容する三叉神経末梢側においても、興奮性伝達物質であるグルタミン酸が分泌されることを示唆している報告がある。その報告によると、咬筋の筋紡錘や口蓋の機械刺激受容器に分布する感覚受容神経終末において、グルタミン酸を分泌するために不可欠なトランスポーター（Vesicular glutamate transporters: VGluTs）が発現しており、末梢側においても分泌が生じることを証明している（Li ら, J Comp Neurol, 2003; Wu ら, Brain Res, 2004; Nunzi ら, J Neurocytol, 2004）。また、三叉神経節細胞（ラット）の80%以上は、グルタミン酸トランスポーター陽性であり、同様に三叉神経中脳路核においてもグルタミン酸トランスポーター陽性細胞が存在すること

から、三叉神経系の感覚神経終末で広くグルタミン酸の分泌が生じている可能性がある（Li ら, J Comp Neurol, 2003; Pang ら, J Comp Neurol, 2006）。しかしながら、末梢側におけるグルタミン酸分泌の機能的な意義は今のところ不明である。近年、グルタミン酸の神経伝達物質としての生理作用以外に、tissue engineering の研究分野で、骨への機械刺激によるグルタミン酸分泌が骨代謝に重要であるという研究（骨芽細胞、破骨細胞のグルタミン酸シグナル伝達）が注目されており、臨床応用としてグルタミン酸分泌を制御することで骨形成を促進させるということも試みられている（Mason, Eur Cell Mater, 2004）。

顎関節内においてグルタミン酸受容体の存在が示唆され、咀嚼運動との関連が神経生理学的手法によって報告されている（Be ら, J Neurosci, 1998）。即ち、咀嚼運動によって生じる固有感覚情報の中枢への伝達が、三叉神経末梢側におけるグルタミン酸分泌に影響を及ぼす可能性が高い。分泌されたグルタミン酸が顎関節内のグルタミン酸受容体に働きかけ、この回路をとおして精密な咀嚼運動に寄与すると思われる。また、四肢骨に対する機械的な刺激が破骨細胞のグルタミン酸受容体の発現を促し、グルタミン酸の分泌と骨代謝に関連があるという報告がある（Szczesniak ら, Bone, 2005）。

骨の修復や成長にとって重要な骨膜には、多くの感覚神経や血管が分布し、大腿骨や頸骨に分布している神経終末において、グルタミン酸の分泌を示唆する報告がある（Mason ら, Bone, 1997; Serr ら, Bone, 1999）。ま

た破骨細胞や骨芽細胞にグルタミン酸受容体が存在しており、骨代謝においてグルタミン酸が重要な役割を担うことが考えられている (Skerry と Genever, *TRENDS Pharmacol Sci*, 2001; Moriyama と Yamamoto, *J Biochem*, 2004)。さらに、臨床的所見や *in vitro* の実験系においても骨に分布する末梢神経の存在が骨の発達や修復に重要であると報告されている (Serr ら, *Bone*, 1999)。

神経系のグルタミン酸の分泌様式として、分泌される部位から標的レセプターまでの距離が遠い、extra(para)-synaptic transmission と呼ばれる情報伝達形式 (Li ら, *J Comp Neurol*, 2000) が存在し、局所的分泌に限らない。近位および遠位の標的細胞にも情報伝達を行い、骨組織の広範な領域に影響を及ぼすことが考えられる。また Serr ら (*Bone*, 1999) は、神経終末の分布は骨膜に限らず、栄養血管に沿って神経線維が伴行し、グルタミン酸陽性の神経終末が骨髄に分布していることを報告している。

これまで報告されている、骨組織グルタミン酸含有神経に関する二つの研究では、グルタミン酸そのものを検出し、その分泌の可能性を論じている (Mason ら, *Bone*, 1997; Serr ら, *Bone*, 1999)。しかしながら、これらの報告ではグルタミン酸分泌の可能性を示唆することに留まり、結果としては直接的な証明にはならない。本研究課題は、グルタミン酸トランスポーターに着眼しており、局在そのものが、グルタミン酸分泌という生理機能を包含する点で重要なアプローチとなる。

## 2. 研究の目的

視床下部-交感神経系が骨代謝に強い関わりがあることが研究されている (Elefteriou, *Arch Biochem Biophys*, 2008)。この系では、エネルギー代謝、性腺機能、血圧の調節などの幅広い生理作用を有するレプチンという

分泌蛋白を介して、視床下部系に働きかけて骨代謝調節が行われるが、その神経回路基盤の詳細は不明である。

本研究課題では、これに対して咀嚼という明白な生理機能と関連の深い三叉神経系と骨代謝調節を結び付け、その形態学的な神経回路基盤を明らかにすることを最終目的とした。即ち、三叉神経節あるいは三叉神経中脳路核のどこの細胞群が、骨代謝において、どのように寄与するのか、トランスポーターと受容体のサブタイプの分布をもとにした機能意義を包含した神経回路の知見を得て、より詳細な機能解析へと研究継続する。また、破骨細胞に直接作用して骨吸収に関連を持つ、カルシトニン遺伝子関連ペプチドの局在も同三叉神経系において調べ、グルタミン酸トランスポーターの分布と比較検討し、骨代謝機能に関連した神経回路を明らかにする糸口とする。

## 3. 研究の方法

三叉神経末梢枝の分布状態を把握するために、神経細胞のマーカーである neuron specific gene product 9.5 (PGP9.5) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。非脱灰処理の組織において、末梢側の神経線維を可視化するための実験条件を決めた。発色は、通常の DAB 法とニッケルによるシグナル増強法を用いた。

また、グルタミン酸トランスポーター (VGluT-1) および破骨細胞に直接作用して骨吸収に関連を持つ、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) に対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行い、同様に骨組織の末梢神経分布を観察した。さらに骨髄に分布する神経末梢枝については、血管平滑筋作動性の可能性を調べるため血管内皮マーカーである CD31 に対する抗体を用いて、二重免疫

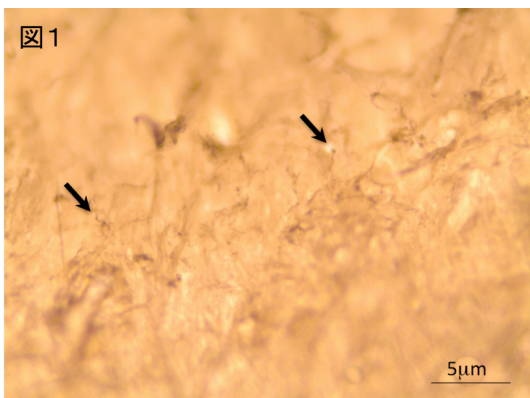
組織化学染色を行った。

さらに、これらの神経線維を正確に追跡するために、一部の標本において連続切片を用いた 2 次元再構築 (nerve fiber reconstruction)を試みた。

また、VGluT-1 および CGRP の三叉神経節細胞における分布についても、免疫組織化学染色により観察した。

#### 4. 研究成果

顎顔面部において (マウスおよびラット)、VGluT-1 および CGRP 陽性神経線維の分布を詳細に調べるために、免疫組織化学法による染色を行った結果 (非脱灰組織を中心に)、ラット頭蓋冠の骨膜において VGluT-1 陽性の神経終末が観察された (図 1 の矢印は VGluT-1 陽性神経終末を示す、骨膜剥離試料)。

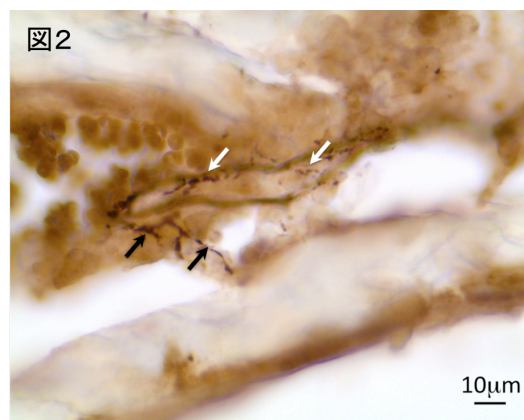


VGluT-1 陽性神経終末は、骨膜剥離試料を用いた標本では、骨膜の平面上にその分布を観察できたものの、骨そのものを含む標本では、陽性神経線維が栄養孔を通り骨髄に達するような、神経線維の全体像を追跡することは困難であった。この課題を解決するためには、トレーサー標識した神経線維上に VGluT-1 陽性神経終末を確認する必要があったが、本研究期間において、その段階までに到達しておらず、今後の継続すべき実験項目となった。

CGRP 陽性神経終末は、骨膜や骨髄を含めて広く分布していることが観察された (図 2 の矢印はマウス骨髄内 CGRP 陽性神経終末を示

す)。

加えて、骨膜に存在する陽性神経線維が栄養孔を通り骨髄に至り、図 2 に示すような神経終末構造を確認した。



また、骨髄に分布する CGRP 陽性神経線維について、CD31 との二重染色実験から血管平滑筋作動性ではないと思われる神経終末が確認された。これらの神経線維は、血管に伴走した後に終末側枝を出し骨髄に終わる。

これらの結果より、少なくとも骨膜において VGluT-1 陽性神経終末が存在し、グルタミン酸受容体を発現する破骨細胞や骨芽細胞に (Skerry と Genever, *TRENDS Pharmacol Sci*, 2001; Moriyama と Yamamoto, *J Biochem*, 2004)、末梢神経からのグルタミン酸が働きかけ、骨代謝に神経性由来の因子が関与する可能性を示唆している。

また、CGRP 陽性神経終末が骨に広く分布することが確認された。特に、骨髄内に終わる神経終末は、破骨細胞に大きな影響を与えることが可能であることが考えられる (CGRP が破骨細胞に直接作用して骨吸収に関連する)。

三叉神経節細胞において、CGRP および VGluT-1 陽性細胞を確認しているので、前述の通り、トレーサー実験によって起始細胞を同定し、VGluT のサブタイプを含めてどの細胞が骨領域のどこを支配しているのか、現在その実験項目を継続しているところである。

今後、骨膜および骨髄と領域別にそれぞれ、

CGRP と VGlut 陽性神経終末分布を再検討し、これらのデータを回路の解析にフィードバックさせる。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 井村 幸介、佐藤 巖：“マウス頭頸部領域の骨における骨代謝関連神経支配について” 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. (2011 年 3 月 30 日). パシフィコ横浜 (東日本震災の影響のため誌上発表となった)

2. 井村 幸介、佐藤 巖：“マウス顎顔面領域の骨における神経分布について” 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会. (2010 年 3 月 27 日). 岩手県民会館 (岩手県)

3. 井村 幸介、佐藤 巖：“骨代謝機能に関連する顎顔面領域の骨組織における神経分布” 第 9 回水生動物の行動と神経系シンポジウム. (2010 年 1 月 24 日). 名古屋大学 (愛知県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井村 幸介 (IMURA KOSUKE)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：10415086

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：