

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25年 6月14日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21792091

研究課題名（和文） 三叉神経節のサテライト細胞を介した骨代謝調節機構の解明

研究課題名（英文） Regulation mechanism of bone metabolism via satellite glial cells in trigeminal ganglion

研究代表者

郡司掛 香織 (GUNJIGAKE KAORI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90448811

研究成果の概要（和文）：体に傷を負ったとき、傷を負った神経の細胞は様々な物質を産生し、痛みを感じるが、傷を負った細胞に限らず、無傷の神経細胞にも様々な影響が及んでいる。この研究では、抜歯により、神経細胞周囲のサテライト細胞を介して、傷を負った細胞から無傷の細胞へ情報が伝達され、その情報伝達には ATP が関与し、ATP は VNUT から放出されているという可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：When the body is injured, we feel the pain by injured neurons to produce a variety of molecule. At this time, various effects reach not only injured cells, but also intact cells. In this study, we indicated that the interaction between injured neurons and naïve neurons through the satellite glial cells surrounding neurons after tooth extraction. In this process, we found the possibility that ATP which is released by VNUT is involved in the communication.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 0 | 0 | 0 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学、三叉神経節、サテライト細胞

1. 研究開始当初の背景

歯に矯正力が伝わると痛みが生じ、歯槽骨では圧迫側に骨吸収、牽引側で骨形成が行われ、歯が移動する。矯正的歯の移動は歯に加わるメカニカルストレスによって説明されることが多いが、実際には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、神経が感受することによる神経性の骨代謝も考えられる。神経と骨代謝の関係について、

我々のグループは *in vitro* で、神経ペプチド Substance P が骨芽細胞、破骨細胞上のレセプターを介して直接的に骨のリモデリングを亢進することを明らかにしている。また培養歯根膜細胞に関しても、Substance P の刺激が骨形成因子・骨吸収因子に影響を与えることを明らかにしている。

骨代謝と神経ペプチドの関連を *in vivo* でも明らかにするため、研究代表者はラット臼歯抜歯後の創傷治癒における神経ペプチド

の発現を調査した。その結果、抜歯後に三叉神経節ニューロンにおいて、神経ペプチド Substance P やそのレセプターNK1-R の発現が障害を与えたニューロンのみでなく、障害を与えていない細胞でも増加し、抜歯窩の骨修復と関連していることを示した。これは何らかの経路を介した神経伝達によって、三叉神経節内のニューロン間で情報伝達が行われていることを示唆する。

末梢性グリア細胞の1つであるサテライト細胞はニューロンの周囲を薄く鞘状に取り囲み、ニューロン間を隔たてている細胞である。この細胞について近年研究が急速に進み、ニューロンの微少環境のコントロールや、シナプス伝達の調整などの役割を持つことがわかっている。このことから、ニューロン間の情報伝達がサテライト細胞を介して行われているのではないかと考えられるが、これを明らかにした研究はなく、どの物質がサテライト細胞間の情報伝達に関係しているかも不明である。

2. 研究の目的

この研究では以下の項目について検討を行うことを目的とした。

- (1) 末梢神経刺激によりサテライト細胞を介した情報伝達は行われているか？
- (2) サテライト細胞間の情報伝達は、何によって行われているか？
- (3) 弱い末梢刺激でもサテライト細胞間の情報伝達は起こるか？

3. 研究の方法

(1) 動物と抜歯、矯正的歯の移動

6週齢のオスのラットの上顎臼歯を麻酔下で抜歯、または waldo 法で矯正移動し、その後、経時的に安楽死させ、三叉神経節を採取した。後固定の後、急速に凍結させ、厚さ 6 μ m の凍結切片を作製した。

(2) 三叉神経節細胞の培養

生後7日齢のラットの三叉神経節を麻酔下で切離し、コラゲナーゼ、パパイインで分離した。その後 10%FBS を含むニューロンメディウムとグリア細胞メディウムで培養した。

(3) RT-PCR 法

三叉神経節細胞、および培養ニューロンとサテライト細胞について、VNUT (小胞型ヌクレオチドトランスポーター) 発現を RT-PCR 分析を行った。

(4) in situ hybridization 法

VNUT mRNA の発現を確認するために、in situ hybridization 法を行った。

(5) 三叉神経節カニューレシオン

6週齢のオスのラットの上顎臼歯を waldo 法を用いて矯正的歯の移動を行い、同時に頭頂部より三叉神経節までカニューレを挿入し、オスモティックポンプを用いて GAP 結合阻害薬であるカルベノキソロンを投与した。

(6) 免疫組織化学染色

用いた抗体は以下の通り。

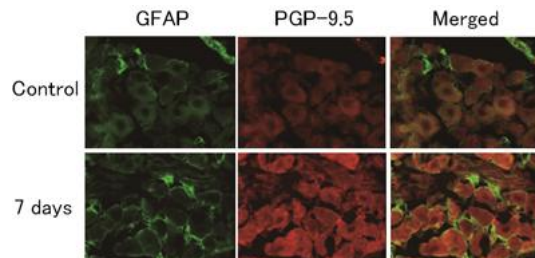
- モルモット抗 P2X₃ 抗体 (ATP レセプター)
- ウサギ抗 ATF3 抗体 (障害を受けたニューロンのマーカー)
- ウサギ抗 PGP-9.5 抗体 (ニューロンのマーカー)
- マウス抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (活性化した satellite cell のマーカー)
- ウサギ抗 VNUT 抗体 (小胞型ヌクレオチドトランスポーター)
- ヒツジ抗 NGF 抗体

P2X₃、GFAP、NGF 免疫陽性ニューロンおよび、陽性サテライト細胞に囲まれたニューロンの数をカウントし、全ニューロンに対する割合を算出した。

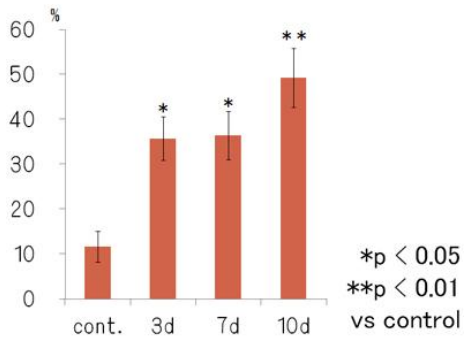
4. 研究成果

- (1) 抜歯による末梢神経刺激の結果、障害を受けたニューロンだけでなく、障害を受けていないニューロン周囲のサテライト細胞も活性化した。

- ① 抜歯により GFAP-IR SGCs が増加した。GFAP 陽性ニューロンは、抜歯による障害を受けた ATF3 陽性ニューロンの周囲だけでなく、ATF3 陰性の障害を受けていないニューロン周囲にも認められた。

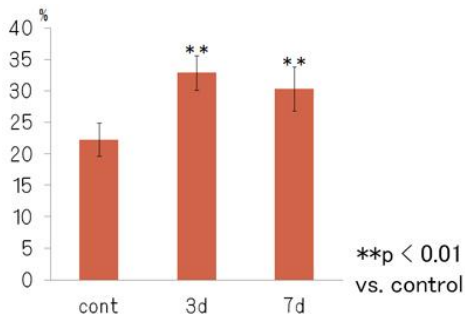
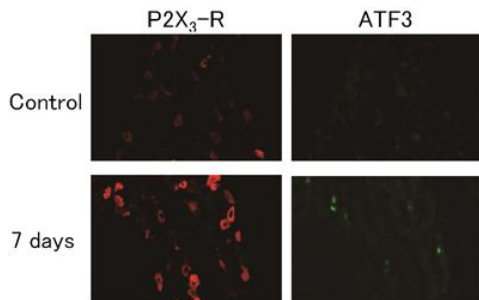


② 抜歯後 GFAP 陽性サテライト細胞に囲まれたニューロンの数の割合は経時的に増加した。

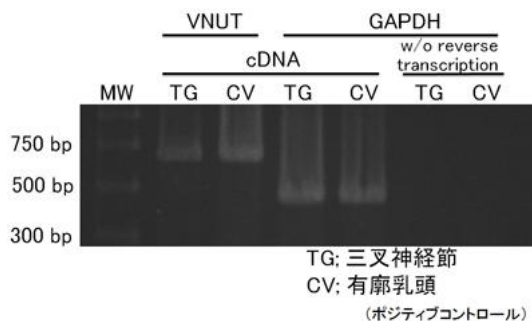


(2) サテライト細胞間の情報伝達にはヌクレオチドが関与していることが示唆された。

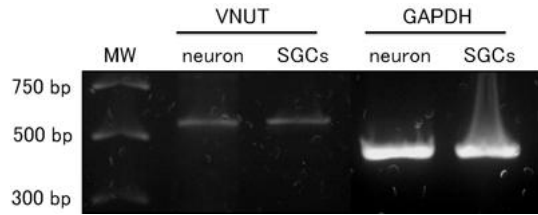
① 抜歯後、疼痛感覚に関与する ATP 受容体である P2X₃ レセプターを発現するニューロンが増加した。P2X₃ レセプターの発現は、ATF3 陽性のニューロンだけでなく、陰性のニューロンでも認められた。



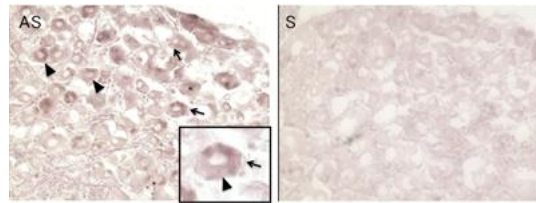
② 三叉神経節ニューロン細胞で VNUT mRNA は発現していた



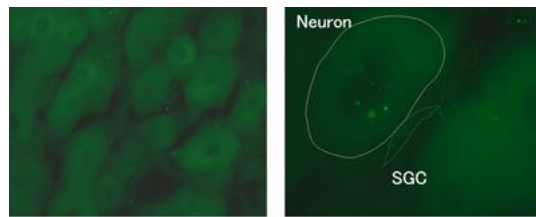
③ 培養三叉神経節では、ニューロンにもサテライト細胞にも VNUT mRNA の発現が認められた。



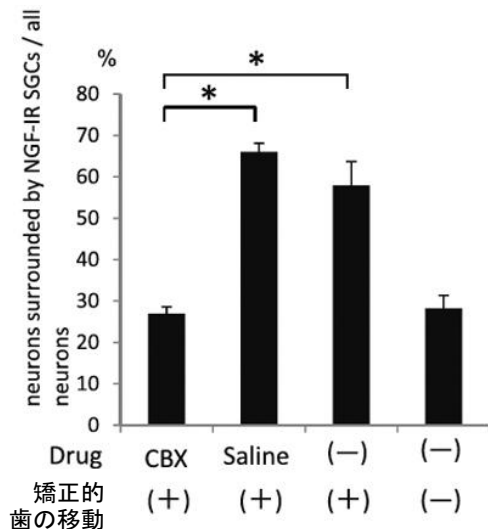
④ In situ hybridization 法と蛍光免疫染色法を用いた結果でも、三叉神経節ニューロンとサテライト細胞両方に VNUT mRNA およびタンパクが発現していた。



AS: Anti sense probe, S: Sense probe
Arrowhead: neuron, Arrow: SGC



(3) 弱い末梢刺激（矯正的歯の移動）を行った後、サテライト細胞における NGF 発現が増加し、これはカルベノキソロン (CBX; ギャップ結合阻害薬) の三叉神経節投与によって有意に減少したことから、サテライト細胞とニューロン間のコミュニケーションにはギャップ結合も関与していることが示された。



- (4) 以上の所見から、末梢神経障害によってニューロンへ刺激が伝達され、その周囲のサテライト細胞が活性化してATPが開口放出される、またはギャップ結合を介してATPが輸送されることによって、障害を受けたニューロンから、障害を受けていないニューロンを取り囲むサテライト細胞へ情報が伝達されることが示唆された。

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2件)

- (1) Kurata S, Goto T, Gunjigake KK, Kataoka K, Kuroishi NK, Ono K, Toyono T, Kobayashi S, Yamaguchi K: Nerve growth factor involves mutual interaction between neurons and satellite glial cells in the rat trigeminal ganglion. *Acta Histochemica et Cytochemica* 46: 65-73, 2013、査読有り doi: 10.1267/ahc.13003
- (2) Gunjigake KK, Goto T, Nakao K, Kobayashi S, Yamaguchi K. Activation of satellite glial cells in rat trigeminal ganglion after upper molar extraction. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 42:143-9, 2009、査読有り doi: 10.1267/ahc.09017

[学会発表] (計13件)

- (1) T. GOTO: Identification of the Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) in Trigeminal Ganglion, 91st General Session of the International Association for Dental Research. 2013年3月20-23日 Seattle, WASH, USA
- (2) S. KURATA: NGF involves in interaction between neurons and satellite glial cells. The 60th Annual Meeting go Japanese Association for Dental Research, 2012年12月14~15日、新潟県新潟市
- (3) 郡司掛香織: 三叉神経節におけるVNUT発現について、日本解剖学会第68回九州支部学術集会、2012年10月13日、福岡県久留米市
- (4) 郡司掛香織: 三叉神経節におけるVNUTの発現、第71回日本矯正歯科学会学術大会、2012年9月26日~28日、岩手県盛岡市
- (5) 後藤哲哉: 三叉神経節における小胞型ヌ

クレオチドトランスポーター(VNUT)の発現について、第54回歯科基礎医学学会学術大会、9月14-16日、盛岡

- (6) K. GUNJIGAKE: Nociceptive Stimulation Induces Satellite Glial Cell Activation via VNUT、14th International Congress Histochemistry and Cytochemistry、2012年8月26日~29日、京都府京都市
- (7) 福田文: 破骨細胞形成におけるHemokinin-1の役割、第117回日本解剖学会総会、3月26-28日、山梨
- (8) 郡司掛香織: マウス三叉神経節細胞におけるVNUTの発現、第7回九州矯正歯科学会学術大会、2012年2月4日~5日、大分県別府市
- (9) 蔵田清香: 実験的歯の移動後のラット三叉神経節におけるニューロンと衛星細胞の相互関係について、第70回日本矯正歯科学会大会、2011年10月17-20日、愛知県名古屋市
- (10) 郡司掛香織: Expression of VNUT in mouse trigeminal ganglion cells, JADR 59th annual Meeting, 2011年10月8-9日、広島
- (11) 蔵田清香: ラット三叉神経節におけるニューロンと衛星細胞の侵害受容刺激による反応、第53回歯科基礎医学学会学術大会、2011年9月30日-10月2日、岐阜
- (12) 蔵田清香: 侵害受容刺激後のラット三叉神経節におけるニューロンと衛星細胞の相互関係について、九州歯科学会総会、2011年5月28-29日、福岡県北九州市
- (13) 郡司掛香織: 矯正的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大会、2009年11月16~18日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郡司掛 香織 (GUNJIGAKE KAORI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 90448811