

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 5月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791763

研究課題名（和文）三叉神経感覚ニューロンにおける小胞性アミノ酸輸送体の局在とその意義

研究課題名（英文）Localization of vesicular amino acid transporters in trigeminal sensory neurons.

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）：

三叉神経における小胞性アミノ酸輸送体のうち、特に興奮性神経伝達物質である小胞性グルタミン酸輸送体(VGluT)について検索した。VGluT1,2,3すべてのサブタイプの遺伝子発現が三叉神経一次感覚ニューロンの細胞体に認められた。末梢ではVGluT1は口腔周囲の機械受容器に認められ、電子顕微鏡観察によっても、シナプスの存在しない感覚受容器の中の小胞様構造にVGluT1の強い発現が認められた。

研究成果の概要（英文）：We observed mRNA and protein expression of the vesicular glutamate transporters (VGluTs) in trigeminal mesencephalic nucleus and trigeminal ganglion. In the peripheral nervous system, The mechanoreceptors in the orofacial region express VGluT1 subtype. Using electron microscopic analysis, vesicular like structure in mechanoreceptors represented VGluT1 expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
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：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学

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性ニューロンによって支配されている。この神経線維の細胞体は中枢神経系である三叉神経中脳路核と末梢神経系である三叉神経節に分かれて存在する。脊髄神経系では一次求心性ニューロンは末梢神経系である脊髄後根神経節にのみ認められ、中枢神経系には存在しない。三叉神経中脳路核

ニューロンは特に口腔内外の固有感覚をつかさどる機械受容器である閉口筋筋紡錘と歯根膜ルフィニ神経終末を支配するものであり一次求心性ニューロンの細胞体が脳内にあるという点で三叉神経系に特徴的な構造である。一方、三叉神経節は顔面、口腔内外の触覚、温冷覚、痛覚といった一般体性感覚をひろく受容するニューロンの細胞体の集まりであり脊髄の後根神経節と類似した形態学的特徴をもつ。

近年、脳内において小胞性アミノ酸輸送体の一つである小胞性グルタミン酸輸送体 (VGluTs) の局在が明らかになりつつある。VGluT とは興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸をシナプス小胞内へ輸送するという働きをもつもので、現在のところ VGluT1、VGluT2、VGluT3 の3つのサブタイプが発見されており、それらのサブタイプの違いによる脳内での局在が報告されている。また、VGluT は本来シナプス部位に多く局在するものであるが、シナプスの存在しない四肢の筋紡錘においても VGluT1 の局在が明らかとなっている。筋紡錘における VGluT1 の機能的意義は明らかとはなっていないが、VGluT1 はグルタミン酸をシナプス小胞内へ取り込む以外にも無機リン酸輸送活性を持つという性質もあり、グルタミン酸輸送体としての一面だけでは VGluT1 の生物学的意義は解明できない。VGluT には

我々はこれまでに、筋紡錘と同じく機械受容器である歯根膜ルフィニ神経終末においても VGluT1 の局在を光学顕微鏡レベルで確認しているがその働きも不明である。

以上の学術的背景より、本研究課題において VGluTs が三叉神経ニューロン、特に感覚ニューロンにおける局在をさらに詳細に検討し、口腔感覚受容機構における VGluTs の関連性についてさらなる理解を深めるため本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は三叉神経感覚ニューロンにおける小胞性アミノ酸輸送体の局在を詳細に検討することである。具体的にはまず、顎反射や咀嚼運動を行ううえで重要な感覚受容を行う機械的受容器に着目し、閉口筋筋紡錘や歯根膜機械受容器における小胞性アミノ酸輸送体の局在を電子顕微鏡レベルにおいて明らかとする。

また三叉神経感覚ニューロンの細胞体における小胞性アミノ酸輸送体の局在を調べ、感覚受容器との関連についても検討を加える。

3. 研究の方法

動物はラットを用いる。脳と三叉神経節を摘出し、免疫組織化学的手法を用いて、三叉神経節ニューロンならびに三叉神経中脳路核ニューロンにおける小胞性アミノ酸輸送体の局在を明らかとする。さらにレーザーマイクロダイセクション法を用いて、三叉神経感覚ニューロンの細胞体より mRNA を抽出し、RT-PCR 法により遺伝子レベルでも確認を行う。

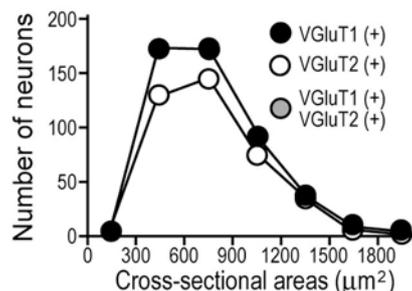
また咬筋、下顎骨を摘出し下顎骨は脱灰した後凍結切片にて、免疫組織化学的手法を用いて筋紡錘機械受容器ならびに歯根膜機械受容器における小胞性アミノ酸輸送体の局

在を明らかとする。さらに電子顕微鏡観察も加えて行い微細構造的に小胞性アミノ酸輸送体の局在を観察する。

4. 研究成果

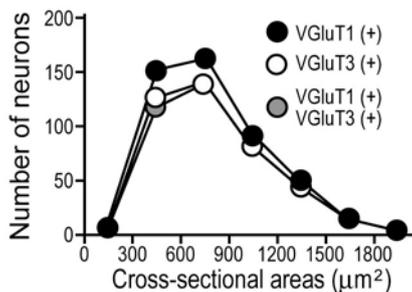
三叉神経節ニューロンにおいてはタンパクレベル、遺伝子レベルともに小胞性グルタミン酸輸送体 VGluT のすべてのサブタイプが観察された。細胞体のサイズとそのタンパク発現の関連を検討するために、蛍光二重染色を施した切片において、細胞体サイズ計測を行った。

VGluT1 と VGluT2 の二重染色の計測結果を下に示す。



黒丸が VGluT1 陽性細胞、白丸が VGluT2 陽性細胞、グレーが VGluT1、VGluT2 ともに陽性であった細胞を示す。縦軸が神経細胞の数で、横軸が核を含む断面での細胞体の断面積を示す。VGluT1、VGluT2 ともに中型から大型のニューロン、特に中型ニューロンに多く認められた。二つのサブタイプによる差異は認められなかった。

次に VGluT1 と VGluT3 の二重染色の計測結果を示す。

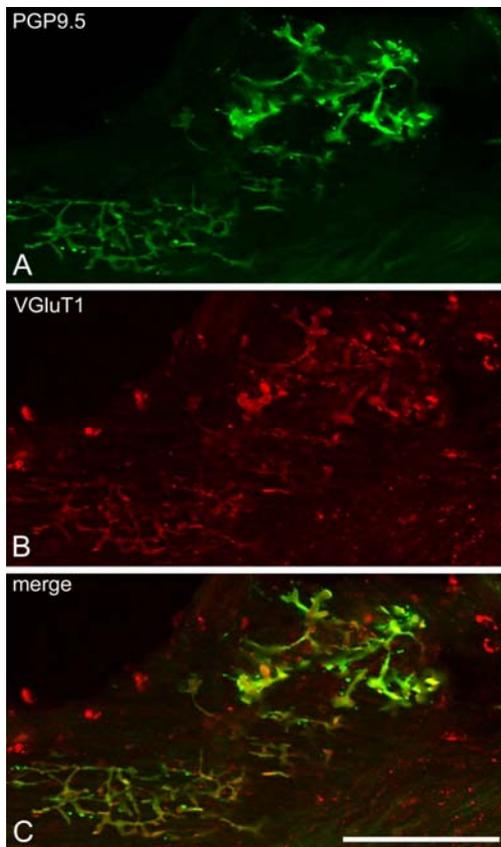


黒丸が VGluT1 陽性細胞、白丸が VGluT3 陽性細胞、グレーが VGluT1、VGluT3 ともに陽性であった細胞を示す。これも上図と同様の結果が得られており、二つのサブタイプによる差異は認められなかった。

このことは VGluTs の 3 つすべてのサブタイプが三叉神経節ニューロンの感覚受容、伝達、特に機械受容器を支配するニューロン (中型ニューロン) に必要であることを示唆している。

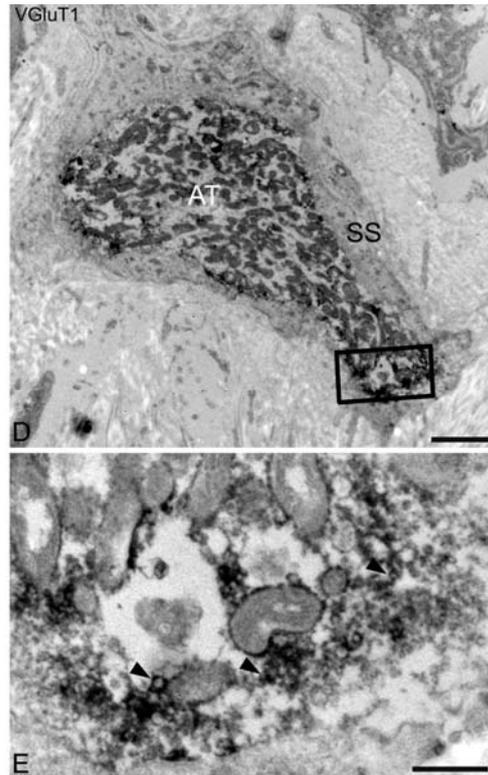
三叉神経中脳路核ニューロンにおいては

免疫組織学的手法によって VGluT1 陽性細胞のみがみとめられたが、VGluT2、VGluT3 陽性反応は認められなかった。そこでレーザーマイクロダイセクション法により細胞体のみを切り出して RT-PCR 法を行ったところ、遺伝子レベルでは VGluT 1、VGluT 2、VGluT 3 のすべてのサブタイプの発現が確認された。このことより、三叉神経中脳路核ニューロンにおいては VGluT 2、VGluT 3 は免疫組織化学的手法では検出できない程度の微弱なシグナルであることが考えられる。三叉神経中脳路核ニューロンが支配する固有感覚である歯根膜機械受容器、咬筋筋紡錘における VGluT の発現は、細胞体と同様に、VGluT 1 のみが明らかな陽性反応を示した。次に歯根膜機械受容器における VGluT 1 免疫染色像を示す。



神経要素である PGP9.5 との二重染色を施すことにより、陽性反応が歯根膜機械受容器の神経線維であることが確認できる。図からも明らかであるように VGluT 1 は歯根膜機械受容器に存在する。ここはシナプスの存在しない部位である。そこで、さらに微細構造を観察するために免疫電顕法を行って VGluT 1 陽性反応がどのように電子顕微鏡によって観察されるかを見た。

VGluT 1 陽性歯根膜ルフィニ神経終末の電子顕微鏡像を次に示す。



AT が軸索終末、SS がシュワン鞘。パネル D の四角の中の拡大像をパネル E に示す。矢頭で指し示す部位では小胞様構造物の膜に強く免疫反応が認められる。

この結果より歯根膜機械受容器にはシナプスは存在しないものの、シナプス小胞様の構造物が認められた。さらにその膜上には VGluT 1 の陽性反応が強く認められたことより、歯根膜機械受容器において小胞性グルタミン酸輸送体は小胞膜に存在することが電子顕微鏡学的に観察された。小胞の内容物については確認できていないが、一時求心線維は興奮性伝達物質としてグルタミン酸を含むことが広く知られていることより、末梢の感覚受容器にもグルタミン酸の存在の可能性があることは否定できない。もしグルタミン酸が存在するとすれば、神経の興奮のみならず、末梢感覚受容機構にもグルタミン酸が深く関与していることも考えられる。

今後は小胞内容物の同定、他の感覚受容器における小胞性アミノ酸輸送体の存在の有無についての検討を進めていく予定である。

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2件)

- ① Honma S, Kato A, Shi L, Yatani H, Wakisaka S. Vesicular glutamate transporter immunoreactivity in the periodontal ligament of the rat incisor. The Anatomical Record、査読有、295巻、(2012)、160-166.
- ② 本間志保、脇坂聡、歯根膜感覚受容の形態学的神経基盤—歯根膜ルフィニ神経終末研究のトピックス、脳2 1、査読無、14巻、(2011)、380-384.

[学会発表] (計2件)

- ① 本間志保、角野公紀、脇坂聡、ラット三叉神経節および臼歯歯髄における SNARE 蛋白質の局在、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012 年 3 月 27 日、山梨大学 (甲府)
- ② 本間志保、三木依子、脇坂聡、ラット歯根膜機械受容器におけるイノシトール三リン酸受容体の局在、第 52 回歯科基礎医学会学術集会、2010 年 9 月 21 日、タワーホール船堀 (東京)

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