

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月13日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659897

研究課題名（和文） ボツリヌス毒素を応用した神経再生療法の開発

研究課題名（英文） Development of neuro-regeneration with Botulinum toxin

研究代表者

松香 芳三 (MATSUKA YOSHIZO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90243477

研究成果の概要（和文）：ラット三叉神経節細胞を分離し、マトリゲル処理を行った 37°C CO<sub>2</sub> チャンバー内で培養した。また、海馬細胞は市販のものを使用した。経時的に、細胞形態の変化を観察・記録し、コントロール群と比較したところ、A 型ボツリヌス毒素添加群の方が細胞寿命が長期化することが観察された。また、細胞から発生する樹状突起長を計測すると、A 型ボツリヌス毒素添加群の方が長いことが理解できた。

研究成果の概要（英文）：Dissociated rat trigeminal ganglion somata were incubated with matrigel in 37°C CO<sub>2</sub> condition. Commercially available hippocampus neuron was used in this study. Neuronal change was observed and the neuron that incubated with type A Botulinum toxin was survived longer than control. Also, dendrite of the neuron with Botulinum toxin was longer than control neuron.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：ボツリヌス毒素、神経細胞、活性、長寿命化、トレハロース、海馬、三叉神経

## 1. 研究開始当初の背景

歯科補綴臨床は口腔機能を回復することが治療目標であり、そのために我々は日々の診療を行っている。口腔機能回復には形態的、機能的な再建・再生が必要であり、不幸にして下顎骨が離断された患者では骨組織再生とともに知覚・運動などの機能的な神経再生が求められる。形態的な骨組織再生は近年著しい進歩が認められる（細川 他 2009）が、機能的な神経再生に関しては、今後更なる発展が必要であり、大いに期待される分野であ

る。我々は三叉神経節細胞培養過程（Kitamura et al. Neuroscience 2009）において、毒素成分のみを精製した改良 A 型ボツリヌス毒素 (BoNT/A) を加えると、その寿命が延長されることを偶然発見した。そのため、本研究においては BoNT/A の神経細胞長寿命化の効果、神経切断モデルでの神経再生効果、パーキンソンモデルマウスへの脳内注射による病態進行抑制効果に関して検討する。

国内外において、BoNT を用いて三叉神経節

細胞を培養した報告はほとんど見られず、また、神経節細胞が活性化されることを報告したものは全く見られない。中枢神経再生においては iPS 細胞を利用する研究が進展しており、将来的には臨床応用が可能であると考えられる。しかしながら、現時点では iPS 細胞の臨床応用は腫瘍化の問題がクリアできていないと考えられている。

## 2. 研究の目的

歯科補綴臨床では形態的、機能的に口腔環境を再生することが求められている。骨再生など形態的な再生に関する研究はかなり進歩が見られているが、機能的な口腔環境の再生に関しては、進んでいるとは言い難い状況である。我々は神経細胞培養過程において、改良 A 型ボツリヌス毒素 (BoNT/A) が神経細胞を長寿命化することを発見したことから、BoNT/A に神経細胞を再生させる効果があるのではないかと考えている。本研究では BoNT/A の神経細胞長寿命化の効果に関して検討する。

## 3. 研究の方法

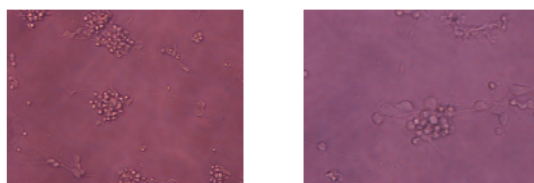
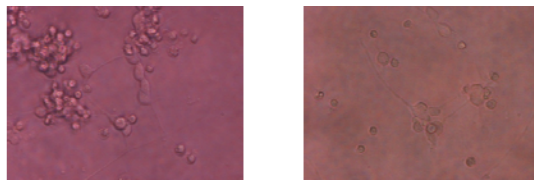
BoNT/A 培養による神経細胞の変化

三叉神経節細胞ならびに海馬細胞を培養する段階において BoNT/A を添加し、細胞寿命観察、樹状突起長計測を行い、コントロール細胞と比較することにより、細胞の変化を観察する。また、突起伸長促進因子や突起伸長阻害因子との比較も観察する。

## 4. 研究成果

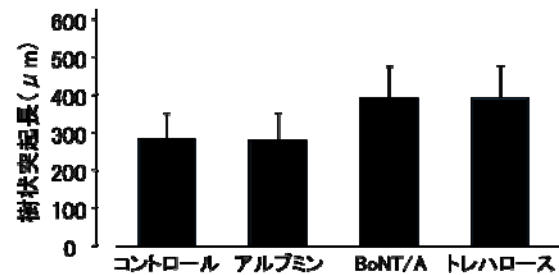
精製 A 型ボツリヌス毒素 (BoNT/A) 培養による神経細胞の変化

BoNT/A が神経細胞を長寿命化・活性化するのかを観察した。ペントバルビタール麻酔下でラットから三叉神経節を摘出し、コラゲナーゼとトリプシン処理を行い、細胞を分離した。分離された神経節細胞はマトリゲル処理を行った 37°C CO2 チャンバー内で培養した。



また、海馬細胞は市販のものを使用した。BoNT/A 培養群においては BoNT/A を 10MLD 添加した。その後、経時的に、細胞形態の変化を観察・記録し、コントロール群と比較したところ、細胞寿命が長期化することが観察された。また、細胞から発生する樹状突起長を計測すると、BoNT/A 添加群の方が長いことが理解できた。

ただし、トレハロース添加群でも樹状突起長がコントロールよりも長いという結果であったので、トレハロースが効果を示している可能性もあり、今後の検討課題である。



## 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 5 件)

- ① Akhter R, Morita M, Ekuni D, Hassan NM, Furuta M, Yamanaka R, Matsuka Y, Wilson D. Self-reported aural symptoms, headache and temporomandibular disorders in Japanese young adults. BMC Musculoskelet Disord, 査読有, 14:58-, 2013. DOI: 10.1186/1471-2474-14-58
- ② Matsuka Y, Yokoyama T, Yamamoto Y, Suzuki T, Nishikawa A, Ohyama T, Watanabe T, Kuboki T, Nagai A, Oguma K. Application of purified botulinum type A neurotoxin to treat experimental trigeminal neuropathy in rats and patients with urinary incontinence and prostatic hyperplasia. Journal of Toxicology, 査読有, Epub 2012 Jun 14. DOI: 10.1155/2012/648384 (on line journal)
- ③ Hara ES, Matsuka Y, Minakuchi H, Clark GT, Kuboki T. Occlusal Dysesthesia: a qualitative systematic review of the epidemiology, aetiology and management. Journal of Oral Rehabilitation, 査読有, 39:630-638, 2012.

DOI: 10.1111/j.1365-2842.2012.02300.x

- ④ Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Maruhama K, Yamamoto Y, Neubert JK, Noland TA, Watanabe K, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K. Intradermal injection of Botulinum toxin type A alleviates infraorbital nerve constriction-induced thermal hyperalgesia in an operant assay. Journal of Oral Rehabilitation, 査読有, 39: 63-72, 2012.

DOI: 10.1111/j.1365-2842.2011.02236.x

- ⑤ Svensson P, Baad-Hansen L, Pigg M, List T, Eliav E, Ettlin D, Michelotti A, Tsukiyama Y, Matsuka Y, Jääskeläinen SK, Essick G, Greenspan JD, Drangsholt M. Guidelines and recommendations for assessment of somatosensory function in orofacial pain conditions - a taskforce report. Journal of Oral Rehabilitation, 査読有, 38:366-394, 2011.

DOI: 10.1111/j.1365-2842.2010.02196.x

[学会発表] (計9件)

- ① 松香芳三、口腔顔面痛の疼痛伝達メカニズムと新規治療法の開発 知覚神経節細胞からの神経伝達物質の遊離、四国歯学会、2013. 3. 28、徳島大学 (徳島県)

- ② Maruhama K, Matsuka Y, Yamamoto Y, Terayama R, Komi K, Ono M, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Sugimoto T, Matsushita O, Kuboki T. Botulinum toxin endocytosis into trigeminal neurons alleviates neuropathic pain. International Association for Dental Research, 2013. 3. 22, Washington State Convention Center (Seattle, USA)

- ③ 松香芳三, 丸濱功太郎, 三宅 愛, 山本由弥子, 前川賢治, 古味桂子, 園山 亘, 小熊恵二, 窪木拓男. 神経障害性疼痛へのボツリヌス毒素の効果, 日本歯科医学会総会, 2012. 11. 11, インテックス大阪 (大阪府)

- ④ 丸濱功太郎, 松香芳三, 山本由弥子, 寺山隆司, 古味佳子, 大野充昭, 前川賢治, 上岡 寛, 山城 隆, 杉本朋貞, 松下治, 小熊恵二, 窪木拓男. 神経毒素成分を精製した A 型ボツリヌス毒素の三叉神経への取り込みと輸送. 日本口腔顔面痛学会, 2012. 11. 3, 慶応大学 (東京都)

- ⑤ Maruhama K, Kumada A, Matsuka Y,

Spigelman I, Neubert JK, Nolan TA, Yamamoto Y, Suzuki T, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K. Botulinum neurotoxin type A endocytosis into trigeminal neurons and its effect on neuropathic pain behavior. Society for Neuroscience, 2011. 11. 15, Washington DC Convention Center (Washington DC, USA)

- ⑥ Oguma K, Yamamoto Y, Suzuki T, Yokoyama T, Matsuka Y, Arimitsu H, Kuboki T. Medical application of clostridial toxins; 1) Clostridium botulinum neurotoxin. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011. 9. 9, Sapporo Convention Center (北海道)

- ⑦ Kumada A, Matsuka Y, Yamamoto Y, Suzuki T, Spigelman I, Neubert JK, Nolan TA, Watanabe K, Maruhama K, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K. Botulinum toxin type A neurotoxin endocytosis into trigeminal neuron and its effect onto neuropathic pain behavior. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011. 9. 9, Sapporo Convention Center (北海道)

- ⑧ 渡邊一博, 松香芳三, 丸濱功太郎, 熊田 愛, 前川賢治, 園山 亘, 窪木拓男. 知覚神経節へのボツリヌス毒素投与による神経障害性疼痛モデルラットの疼痛行動変化, 日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会, 2011. 9. 4, 岡山大学 (岡山県)

- ⑨ 熊田 愛, 松香芳三, 丸濱功太郎, 前川賢治, 窪木拓男. 三叉神経領域における神経障害性疼痛に対する改良 A 型ボツリヌス毒素の効果, 日本補綴歯科学会, 2011. 5. 20, 広島国際会議場 (広島県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松香 芳三 (MATSUKA YOSHIZO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 90243477

### (2) 研究分担者

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 00225195

松尾 龍二 (MATSUO RYUJI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：30157268

小熊 恵二 (OGUMA KEIJI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：00002262

山本 由弥子 (YAMAMOTO YUMIKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：20403496

熊田 愛 (KUMADA AI)  
岡山大学・岡山大学病院・医員  
研究者番号：40610895

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：