

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791972

研究課題名(和文) 骨の代謝 免疫機能に関わる頭頸部神経支配の解析

研究課題名(英文) Craniocervical bone innervations in relation to bone metabolism and immune system

研究代表者

井村 幸介 (Imura, Kosuke)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：10415086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：最近、骨代謝と免疫系の相互依存が提唱されている。一方、骨代謝に神経が関与することが考えられており、我々はカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)やグルタミン酸トランスポーターに着目し、骨髄内や骨膜に各々を発現する末梢神経を観察した。このうち、CGRP陽性神経終末については、CGRP受容体を発現するといわれる破骨細胞や免疫担当細胞等に働きかける可能性があることが分かった。さらに、骨神経系の回路を解析するためのモデル動物として、魚類の咽頭顎骨に分布する末梢神経について調べ、咽頭顎骨内に神経が存在することを観察し、骨-末梢から中枢神経までを追跡しうる利点が魚類にあることを示した。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have discussed that harmonization between bone metabolism and immune system. While, bone innervation has been discussed about contribution to bone metabolism. I have investigated the innervations of craniocervical bones, in the bone marrow and periosteum, by means of immunohistochemistry for detection of calcitonin gene related peptide (CGRP) and vesicular glutamate transporter expressions. In these, CGRP positive nerve terminals may interact with CGRP receptor expressed osteoclast and/or immunocompetent cells. And also, I have analyzed teleost pharyngeal jaw bone innervation (Pji) as a model animal for revealing bone-innervating neural pathway. Existence of the Pji was demonstrated clearly. Traceable peripheral nerves from bone-periphery to brain in an individual was an advantage for analyzing the neural system.

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：末梢神経 骨 骨髄 骨代謝 CGRP

## 1. 研究開始当初の背景

近年、神経細胞同士が情報を伝達させるためにグルタミン酸が使われる、いわゆる神経伝達物質としての生理作用以外に、骨への刺激（機械的な刺激を与える、荷重を加える）によるグルタミン酸分泌が骨代謝（成長）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を介した情報伝達）が注目されており、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（Takahara と Yoneda, J Pharmacol Sci, 2008, Mason, Eur Cell Mater, 2004）。

代表者が行った、神経細胞を区別するためのマーカー（PGP9.5 抗体；抗神経特異的のユビキチン抗体）を用いた免疫組織化学実験で、マウス下顎頭骨膜において神経終末様構造（synaptic button like structure）が観察され、また頭蓋骨骨膜において神経線維様構造にグルタミン酸トランスポーター（VGluT：グルタミン酸の運び屋）の発現が一部確認された（Imuraら未発表）。この結果は、頭頸部の骨膜において、三叉神経由来と推定されるグルタミン酸末梢分泌性の神経終末が存在することを示唆している。

これらに加えて研究代表者は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）陽性の神経線維が、同頭頸部骨の骨膜、さらに骨髄にも存在することを一部確認している。CGRP 陽性神経線維が、骨端成長板領域の破骨細胞の周囲を限局的に取り囲み、神経由来の CGRP が破骨細胞に強く影響していることが示唆されており、骨吸収との関連が存在する（Haraら, Bone, 1996）。

最近、骨代謝と免疫系の相互依存が提唱されており、骨構成細胞と免疫担当細胞が骨髄という同一環境で、骨代謝や造血機能等を相互依存的に協調制御していることが分かってきた（骨免疫学；Takayanagi, Exp Med, 2009）。このことから CGRP に関して、単純に骨吸収と関連するだけでなく、破骨細胞と

T 細胞の間に相互作用が存在することや（Takayanagi, Exp Med, 2009）骨髄内カルシウムイオン濃度が造血幹細胞の機能に影響を及ぼすことに（Katayama, Exp Med, 2009）CGRP を含有する神経終末と破骨細胞系が介すると思われる。すなわち、神経性の制御を伴う骨組織の多様なカルシウム代謝に関連することが予想される。

さらに骨髄に存在する CGRP 陽性の神経線維が、免疫担当細胞と直接的に、深く関係している可能性もある。CGRP を受け取るための受容体が、骨髄由来樹状細胞に発現しており、抗原提示やサイトカイン産生に関与していることが知られている（TsujiKawa and Yamamoto, Exp Med, 2008）。また T 細胞にも CGRP 受容体が発現しており、免疫担当細胞との関係が深い（Andrewら, Immunology, 2005）。

## 2. 研究の目的

末梢神経性グルタミン酸分泌の骨代謝との関連を明らかにしつつ、CGRP 陽性神経についても神経終末とその起始神経細胞を明らかにして、グルタミン酸系と比較し骨代謝免疫機能への関わりに着目する。

代表者は、頭頸部の骨領域（頭蓋骨、顎骨、椎骨等）に分布する神経終末を広く検索し、さらにその起始神経細胞に注目する。

神経由来のグルタミン酸や CGRP が骨代謝と免疫系に作用を及ぼす可能性が示唆されているなか、外因性の要素として骨を支配する神経のうち、どの神経細胞が骨代謝-免疫系に関わっていくのか入出力を含め同定する。末梢神経終末におけるグルタミン酸分泌という、これまで未知であった神経作用を頭頸部領域の骨代謝と関連付けてこれらの細胞を同定し、さらに免疫担当細胞にも影響を及ぼす可能性のある CGRP 陽性の末梢神経系との分布を比較することで、骨の代謝-免疫系にどのように影響を及ぼすのか、骨免疫

学との新しい接点である神経情報処理機構の知見を得る。

### 3. 研究の方法

本研究では、骨組織（骨髄内等；材料は主としてラットおよびマウス）に存在する神経終末を解析の対象とするため、常法通りにEDTAによる脱灰処置後に凍結切片を作成する方法に加えて、硬組織の非脱灰試料を薄切して粘着フィルム上に切片（厚さ5-20 $\mu$ m）を連続切片として回収する方法を一部導入した（抗原の変性を最小限にとどめて、脱灰による抗原抗体反応への影響を無くし、硬組織でも連続切片が得られることに利点がある）。

硬組織内の神経終末を可視化するために、CGRP、VGlut、とPGP9.5に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行なった。また、CGRP陽性の神経終末が血管に分布しているかどうかを確認するために、血管内皮細胞をCD31抗体で可視化して、ペルオキシダーゼ免疫二重染色を行なった。二重染色の後、描画装置付き光学顕微鏡でトレース観察した。これに加えて、ラット三叉神経節において末梢神経の起始細胞を検討するために、CGRPとVGlut1抗体を用いて蛍光免疫二重染色を行なった。

また、骨組織に分布する末梢神経の神経節細胞間・上位中枢連絡を調べるために、モデル動物としてCyprinidとCichlid魚類（*Carassius auratus*, *Oreochromis niloticus*）も解析対象として導入を試みた。げっ歯類では、骨-末梢-中枢神経の全体像を1個体で総括することは、情報量の多さから困難が予想され、一方魚類では、骨を支配する神経系の全体像を1個体で把握することが可能と思われる（例として味覚系があげられる；Iekiら, J Comp Neurol, 2013）。実験手技の応用と結果をげっ歯類に導入し、比較することを想定して、食性変化による顎骨組織の可塑的变化が生じる事と（Wittenら, Biol Rev, 2009）魚類硬組織の発達に末梢

神経が寄与する可能性があるとの考えから（TuiskuとHildebrand, Dev Biol Rev, 1994）神経が咽頭顎骨内に存在するのかどうか、PGP9.5に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行なって観察した。さらに、咽頭顎骨に分布する、当該の末梢神経束の由来（中枢神経とのつながり）を調べるために、カルボシアニン系色素（DiI）を神経束に注入し蛍光実体顕微鏡下で標識された神経束の走行を観察した。

### 4. 研究成果

頭頸部領域の骨髄内を中心に、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、CGRP陽性神経線維が観察され、骨膜から髄腔にいたる走行および終末像が確認された（頭蓋骨と椎骨）。そこで、これらの神経束が、血管上に分布するものと、そうでないものが存在することがPreliminaryに予想されていたので（09`-10`年、科研費研究課題）特に髄腔内に終わるCGRP陽性神経線維を中心に、血管内皮細胞をCD31抗体で可視化しCGRP抗体との免疫二重染色標本を光顕下でトレース観察した。

その結果、骨髄腔内のCD31で可視化された血管壁に伴走し、そこから枝分かれ神経終末として終わるCGRP陽性神経が確認された。しかしながら、今回のペルオキシダーゼ免疫二重染色法では、骨髄内の非特異的なバックグラウンドが高く、一部の試料においては、正確な観察が困難な状態であり染色法の改善が必要になった。このことにより、研究代表者のこれまでの知見をさらに詳細に検討するまでにはいたらなかった（分枝からの神経終末部の分布パターンの調査や骨髄内の分岐状態の検討等）。また、これまでVGlut1陽性神経が骨膜に存在することが観察できていたが、VGlut1陽性神経線維の骨髄内分布を追跡することは困難であったので、今回は粘着フィルムによる切片回収法を導入した（抗原変性を

最小限にとどめ脱灰による抗原抗体反応への影響を無くし、硬組織でも連続切片が得られることに利点がある。その結果、回収した切片の像は良好であったが、回収後に行なう固定条件が、VGlut1陽性神経線維を明瞭に可視化するまでに条件設定が定まらず、今後の解決すべき課題となった。

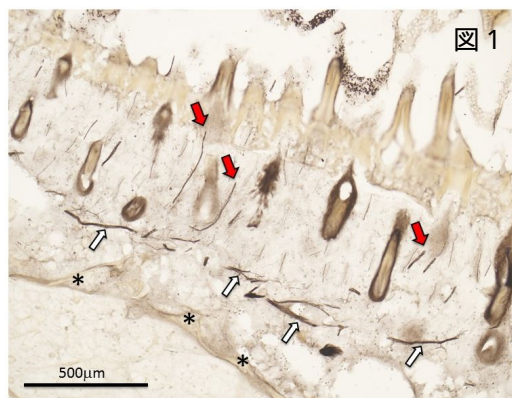
少なくとも骨髄内に終わる CGRP 陽性神経終末は、破骨細胞に大きな影響を与えることが考えられるばかりでなく、上述の通り免疫系を担う骨髄内の細胞にも影響を及ぼす可能性があることが今回の結果から確かめられた。他に血管壁に伴走していた神経は血管平滑筋に分布するものと考えられる。

さらに三叉神経節において、CGRP と VGlut1 抗体を用いた蛍光免疫二重染色の結果、詳細な検討が必要なものの少なくとも、各々 CGRP と VGlut1 の単独陽性細胞が分布しているのが観察されたので、骨膜や骨髄に分布する末梢神経終末と起始細胞との対応関係を調べるうえで重要な基礎データとなった。なお CGRP と VGlut1 陽性細胞の三叉神経節内の構成については、今後さらに定量的な解析を継続していきたい。

さらに、骨組織に分布する末梢神経の上位中枢連絡等を調べる目的で（骨に分布している末梢神経がどの脳領域から由来するのか）モデル動物として骨部末梢から中枢神経までの全体像を1個体内で同時に、把握することが可能と思われる魚類を用いた実験においては、両種ともに咽頭顎骨内に PGP9.5 陽性神経束が進入し、髄腔内に神経終末として終わるものと神経束から枝分かれして、背側に走行して咽頭歯の歯髄内に分布するものが観察された（図1）。

図1：*O. niloticus* 咽頭顎骨。赤白の矢印は骨内の PGP9.5 陽性神経を示す。

\*：咽頭顎骨の底部を示す。



これらの神経束の由来を調べるために、パラホルムアルデヒドで固定後に Dil を注入した結果、迷走葉（延髄の一部）から出る迷走神経のうち、後部の迷走神経束の一部がラベルされ咽頭顎骨に分布すると推察される像が蛍光実体顕微鏡下において観察された（図2）。

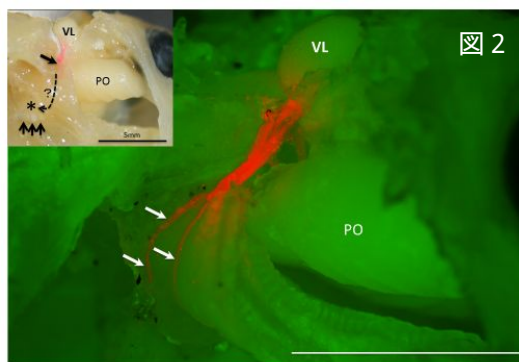


図2：*C. auratus* の頭部。矢印は咽頭顎骨に向かって走行する神経束（赤色）。インセット内の「\*」は、咽頭顎骨のおおよその位置を示し、「？」は蛍光像の矢印が示す赤色の神経束が走行する領域に相当する（Bar:5mm）。PO:口蓋器、VL:迷走葉

現在、これらのサンプルにおいて、Dil でラベルされた神経線維が咽頭顎骨内と迷走葉内にどのように分布しているのかを調べるためのアプローチを検討中である。これにより、咽頭顎骨内に分布する神経の機能区分（感覚神経・自律神経）や中枢内連絡が明らかになり、げっ歯類との相同関係を考察することが期待される。

以上のことから、骨に分布する神経系に関して、中枢までの回路を解析する場合、魚類を有効なモデル動物の一つとして検討することができると考えられる。今後、結果の差異をげっ歯類と比較解剖学的に検討して、骨（代謝 免疫系）に寄与する神経系をより詳細に明らかにしたい。

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)

井村 幸介、吉本 正美、山本 直之、佐藤 巖：“下咽頭顎骨(Lower Pharyngeal Jaw)内の神経分布について”第119回日本解剖学会総会・全国学術集会。(2014年3月28日).自治医科大学(栃木県)

井村 幸介、吉本 正美、山本 直之：“骨を支配する末梢：咽頭顎骨(Lower Pharyngeal Jaw)内の神経分布についてObservation of nerve distributions in the pharyngeal jaw”第10回水生動物の行動と神経系シンポジウム。(2013年11月30日).鹿児島大学(鹿児島県)

井村 幸介、吉本 正美、山本 直之：“咽頭顎骨(Pharyngeal jaw)における神経分布について”第116回日本解剖学会総会・全国学術集会。(2013年3月29日).サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県)

〔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・講師  
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：