

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670854

研究課題名(和文)末梢神経損傷による骨破壊現象の物質基盤の解明

研究課題名(英文) Involvement of local BDNF after nerve injury in the bone sclerosis change.

研究代表者

瀬尾 憲司 (KENJI, SEO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40242440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子(BDNF)は損傷した神経の治癒を促進する効果を有するが、その一方で周囲の骨硬化をもたらす可能性があることが知られている。私たちは今までに末梢神経損傷が局所にBDNFの産生をもたらすことを報告してきた。そこで本研究では、局所のBDNFが骨形成に対しての影響を検討した。その結果、BDNFは前骨芽細胞株において、細胞増殖をさせずOsteocalcinとOsteopontinのmRNAの発現させた。この分化促進はtrkBを介していた。新生骨では破骨細胞、骨細胞や骨芽細胞が関与したりモデリングが進行していた。したがって下歯槽神経損傷は下顎骨内での骨硬化をもたらすことが認められた。

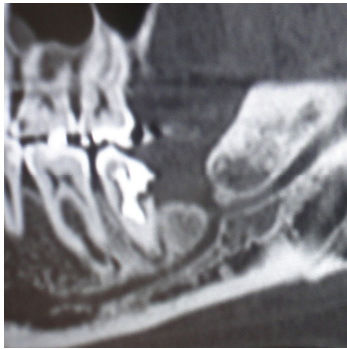
研究成果の概要(英文)：BDNF is known to promote the natural healing of injured nerves, but it also induces sclerotic changes in bone. We reported that peripheral nerve injury promotes the local production of BDNF. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of local BDNF on osteogenesis. Results: BDNF significantly activated the mRNA expression of osteopontin and osteocalcin in MC3T3-E1 cells without affecting cell proliferation. The promotion of the differentiation of MC3T3-E1 cells by BDNF was predicted to occur via the activation of Akt signaling through trkB. Osteopontin-positive new bone formation on the surface of preexisting bone was significantly accelerated in the BDNF-grafted groups, and active bone remodeling, involving osteoblasts, osteoclasts and osteocytes, continued after 28 days due to exogenous BDNF. Conclusion: Local BDNF produced by inferior alveolar nerve injury in the mandible can contribute to accelerating osteosclerotic changes in the alveolar bone.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：BONE BDNF OSTEOLAST OSTEOCLAST REMODELING NERVE INJURY TRIGEMINAL NERVE MANDIBLE

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 埋伏智歯の抜去やインプラント埋入術などの各種の口腔外科的処置はしばしば末梢神経を損傷する。損傷された下歯槽神経はその支配領域の感覚障害だけではなく、下顎骨内で神経腫を形成し、難治性慢性痛症を生じさせることがある。実際の臨床では神経損傷部においては明らかな骨破壊が生じていることを認めることが多く、下顎神経損傷では下顎管皮質骨を押し広げるように膨張し内腔が拡大、すなわち下顎管の拡大が生じていることが認められる。



一方、骨新生が生じて修復されるはずの抜歯窩などでは骨再生は生じていないなど、神経損傷は周囲骨組織への影響を与えていることが想像される。これらは末梢神経損傷によって放出された何らかの生体内物質が関与していることが考えられる。

- (2) 従来の研究結果では下歯槽神経損傷はその局所において神経栄養因子の一つである脳由来神経栄養因子(以下 BDNF)が算出され、局所に増加していた。この増加した BDNF は損傷した末梢神経に対しては軸索の伸長を促進させる作用を有し、神経腫の形成を促進することが判明した。一般的にも骨の細胞には BDNF が影響するといわれていることから、本研究ではこの神経損傷により局所に増加する BDNF の骨組織の形成またはリモデリングに及ぼす影響について検討することが必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

- (1) 神経損傷による遊離された BDNF が骨組織に対する影響を検討するために、骨芽細胞への影響を検討する。これによって BDNF が有する骨リモデリングに必要な骨芽細胞と破骨細胞への効果を検討することができる。
- (2) 骨芽細胞と破骨細胞への影響が、BDNF の受容体を介して生じていることを確認する。

- (3) 生体内で BDNF が実際に骨組織のリモデリングに関与していることを形態学的に証明する。

以上の研究により、神経損傷により生じた局所の BDNF がその受容体を介した代謝系により骨のリモデリングが促進され、これが骨の形態を変化させることが証明可能となる。

## 3. 研究の方法

- (1) 骨芽細胞に対して BDNF が成熟骨芽細胞への分化への影響を調べた。実験には培養前骨芽細胞(MC3T3-E1)を用いた。50ng/ml、100ng/ml の BDNF を培養した MC3T3-E1 に加えて細胞増殖と走化試験を行った。対象には 40ng/ml、80ng/ml の NGF の添加を用いた。さらに骨芽細胞の分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼ、osteopontin または osteocalcin、cyclin D1 の遺伝子発現変化を RT-PCR 法で解析した。

- (2) 培養 MC3T3-E1 に対して BDNF を添加して、発現する TrkB の発現を免疫細胞学的に観察した。

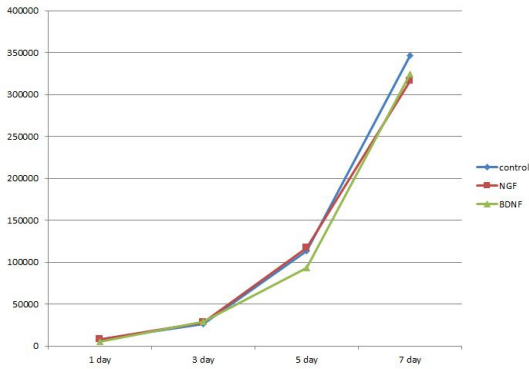
- (3) BDNF が MC3T3-E1 の細胞内シグナルのリン酸化を促進しているか否かについての検討をウエスタンブロット法で行った。

- (4) 末梢神経損傷にともなう BDNF 発現と骨新生への影響を確認するために、マウス下歯槽神経切断実験を行い、BDNF の局在を免疫組織化学的に検索した。

- (5) マウスの下顎骨皮質の表面にドリルで小孔を開けて、そこに BDNF を投与し閉鎖する。その後 1 週、2 週、4 週間後に還流固定を行い、HE 染色および AZAN 染色により骨の修復の様子を形態学的に観察した。さらに骨芽細胞及び破骨細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ、osteopontin、カテプシン K 抗体、TrkB 抗体を用いた免疫組織化学的検索を行い、新生骨の表面厚さ、骨芽細胞および破骨細胞数、TrkB 発現細胞数を計測し比較を行った。さらに BDNF を加えた骨の変化をマイクロCTで観察した。

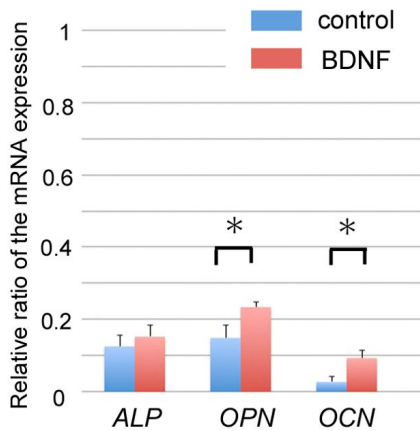
## 4. 研究の成果

- (1) 前骨芽細胞の培養液に BDNF または NGF を加えたが、ともに細胞増殖には影響しなかった。

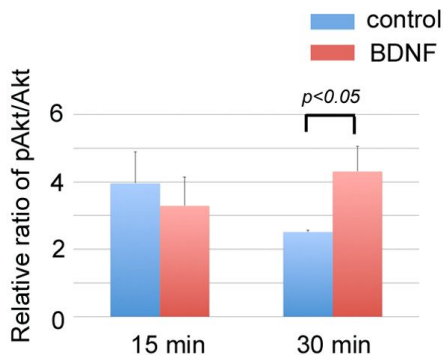


(2) NGF では走化性が認められたが、BDNF では変化を認めなかった。

(3) 細胞分化が促進される可能性について生化学的に検討した結果、オステオポンチン、オステオカルシンなどの mRNA レベルには有意な増加が認められた。



(4) BDNF は前骨芽細胞においてセリン/スレオニンキナーゼ (Akt) のリン酸化を促進させることが判明した。



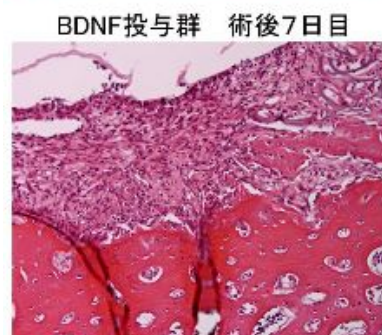
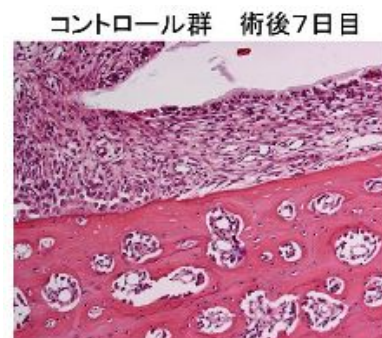
(5) 免疫細胞化学的検討では、BDNF の添加は前骨芽細胞の TrkB の発現を上昇させた。またオステオポンチンの沈着亢進が観察された。

(6) マウス下歯槽神経切断実験では、14 日後に切断後の神経再生部が BDNF 陽性を示し、周囲の新生骨は BDNF 強陽性を呈していた。

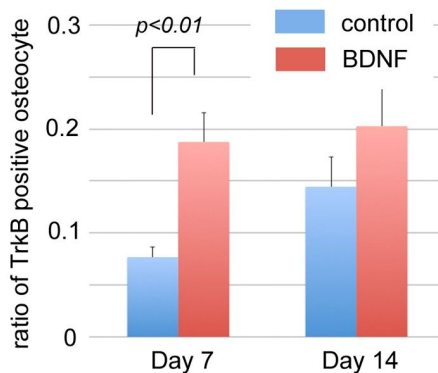
(7) マイクロCTで下顎管部分を切断後 28 日で観察したところ、BDNF を投与した群では骨新生による骨形態には明らかな変化が生じていることが認められた。



(8) 下顎骨表面に開けた小孔に投与した BDNF は骨新生を促進し、免疫組織学的観察により術後 28 日に ALP 陽性の活動性の骨芽細胞が BDNF 投与群で多数認められた。またオステオポンチン陽性の新生骨の有意な骨の添加が確認された。これらの骨造成は骨小腔内および骨髓腔側でも生じていることが観察された。



また、BDNF 投与群では TrkB を発現している骨細胞および骨芽細胞が有意に多く確認された。



結論：末梢神経損傷は損傷部の局所に BDNF が産生されることが確かめられた。一方、骨欠損部に投与された BDNF は、骨芽細胞に作用して、その分化を促進し骨の新生を促進する効果を有していた。この BDNF の効果は trkB を介して、代謝が生ずることによって生じている変化であると言える。以上をまとめると、下歯槽神経切断後の下顎管皮質の顎骨内骨変化は神経損傷による BDNF を介した反応である可能性がある。

以上の研究成果について、現在論文投稿中である。

#### 5. 主な発表論文等 該当事項なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
該当事項なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

瀬尾 憲司 (SEO Kenji)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：40242440

##### (2) 研究分担者

前田 健康 (MAEDA Takeyasu)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：40183941

依田 浩子 (IDA Hiroko)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：60293213

藤原 直士 (FUJIWARA Naoshi)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：70181419