

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 山崎 麻衣子  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第442号  
学位授与の日付 令和元年9月20日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 オトガイ神経損傷後の三叉神経節における BDNF 産生について

論文審査委員 主査 教授 山村 健介  
副査 教授 瀬尾 憲司  
副査 教授 井上 誠

### 博士論文の要旨

#### 【緒言】

末梢神経は中枢神経と比べて神経損傷後の再生能が高いことが知られているが、その再生過程は明らかでないことが多い。神経栄養因子の1つである脳由来神経栄養因子 (BDNF) は神経細胞の生存や軸索突起を伸長させる効果を有している。また、感覚の回復に影響することがこれまでの研究で解明されている。末梢神経損傷によるワーラー変性が損傷後数日で開始することから、神経損傷直後の BDNF の動態はその後の神経再生に大きく影響をあたえるものと考えられる。

そこで本研究ではオトガイ神経切断による BDNF mRNA 発現の経時的変化、三叉神経節における BDNF 産生の組織学的分布、BDNF mRNA 発現のメカニズムについて検討を行った。

#### 【方法】

実験には、7~8週齢の雌性 C57BL/6J マウスを用いた。

1) 三叉神経節における BDNF mRNA 発現量の経時的変化: 片側オトガイ神経切断1、3、6、12、24時間後に両側の三叉神経節を摘出し、RNA を抽出、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)を行った。RT-PCR 後のサンプルの電気泳動を行い、バンドのデジタル画像を撮影、デジタル画像解析ソフト Image J を用いて各バンドの面積を測定し、BDNF mRNA の定量を行った。結果は平均値±標準偏差で表した。比較対照には、無処置のマウスの三叉神経節 BDNF mRNA 量を用い、切断側および非切断側の各時間における BDNF mRNA 量と比較した。

2) 神経切断24時間後の三叉神経節における BDNF 産生: セボフルラン麻酔下で4% Fluoro-Gold 3 $\mu$ l をオトガイ神経の終末相当部に皮下投与し、その48時間後に片側オトガイ神経を切断した。切断24時間後に深麻酔下で灌流固定を行い、両側の三叉神経節を摘出、切片を作製し、免疫組織学的に検討を行った。

3) BDNF mRNA 発現の伝達経路の検討: 脳定位固定装置にマウスを固定後、頭皮切開し頭蓋骨を露出、bregma より側方1mmの周囲に小孔を開け、脳表面より下方に2mmを目標投与部位とし、手動的に一酸化窒素合成酵素阻害剤 (L-NAME) 100mM の投与を行った。その1時間後に片側のオトガイ神経を切断、切断から3時間後に両側の三叉神経節を摘出した。なおL-NAME は予め1%エバンスブルーで着色し、三叉神経節の摘出を行う際に、延髄からc1、2領域のクモ膜下に広がっていることを確認した。その後は実験1と同様の方法で、BDNF mRNA 発現量を定量、結果は平均値±標準偏差で表し、投与群と非投与群とを比較した。

#### 【結果】

1) 切断側および非切断側において、オトガイ神経切断1時間後より増加し、切断24時間後に最大量を示した。1時間後よりすべての時間において有意に上昇が認められた(Dunnett's multiple comparison test,  $p < 0.05$ )。

2) 両側の三叉神経節において、神経切断により BDNF 産生は増加した。しかし BDNF が産生された細胞と Fluoro-Gold で染色された細胞とは必ずしも一致していなかった。

3) 切断側および非切断側において L-NAME の投与は BDNF mRNA の発現を有意に減少させた(Welch' s t-test,  $p < 0.05$ )。

#### 【考察】

本研究ではオトガイ神経切断により、1) BDNF mRNA が両側の三叉神経節で1時間後より増加を開始し、その後も増加を続けたこと、2) BDNF の産生は両側で生じたが、神経損傷を加えた第3枝細胞体以外でも産生したこと、3) BDNF mRNA 発現は L-NAME の投与により抑制されたことを示すことができた。

これまでも、末梢神経切断により両側の神経節で BDNF の産生が増加したとする報告はあるが、その機序は不明とされている。神経切断がニューロンを刺激して、その神経節内の細胞体で BDNF mRNA の産生を開始させたとする、切断されていない分枝の神経細胞体や反対側神経節での BDNF 産生の増加については説明がつかない。片側後肢血流遮断により生じる応答増強は脊髄に存在する一酸化窒素 (NO) が関与するとの報告から、本研究においても両側神経節における BDNF mRNA の発現に NO が関与している可能性があると考え、脳室内に L-NAME を投与したところ、両側三叉神経節の BDNF mRNA の発現を抑制した。このことから、神経損傷後の両側神経節における BDNF の産生の活性化には、中枢神経系において NO を介した伝達が生じた可能性が示唆された。

#### 【結論】

末梢神経の切断は神経切断後1時間以内に BDNF mRNA を両側の神経節で開始するが、その機序には中枢神経系において NO を介した伝達が生じた可能性がある。

#### 審査結果の要旨

下顎局所麻酔、顎骨腫瘍や嚢胞の摘出、デンタルインプラントの埋入や顎矯正手術など様々な歯科治療の偶発症としてオトガイ神経損傷がしばしば遭遇する。オトガイ神経の損傷により下口唇や口角部の麻痺、前歯部口腔粘膜や歯肉の麻痺が生じるが、末梢神経は中枢神経と比較すると神経損傷後の再生能が高く、損傷の程度が軽ければ時間経過と共に正常レベルにまで感覚が回復することがある。一方で、神経損傷の程度によっては、麻痺が残ったり、しびれ感などの異常感覚や難治性の慢性疼痛が引き起こされることが知られている。神経損傷後の再生のメカニズムについては不明な点が多く、これらを解明することが末梢神経損傷後の有効な治療法の確立に繋がると考えられる。

申請者は、神経細胞の生存や軸索突起の伸長を促進するニューロトロフィン的一种で、神経細胞の生存や軸索再生の促進因子である神経栄養因子 (BDNF) に着目し、神経損傷直後の BDNF の発現様式とそのメカニズムについて明らかにすることを目的に本研究を行った。

実験には7~8週齢の雄性的 C57BL/6J マウスを用い、深麻酔下にて片側のオトガイ神経を切断した。神経切断1、3、6、12、24時間後に両側の三叉神経節を摘出し、RNA を抽出、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を用いて BDNF mRNA 発現量を調べることで、オトガイ神経切断後の BDNF mRNA 発現量経時的変化を解析した。

その結果、オトガイ神経切断側および非切断側の両側で神経切断1時間後より BDNF mRNA 発現量が増加し、切断24時間後に最大となることが明らかになった。しかし、切断24時間後の三叉神経節の組織学的な検索により、BDNF 発現は Fluoro-Gold で同定したオトガイ神経の全てに認められるわけではないことも明らかになった。

切断したオトガイ神経に軸索を持つ神経細胞体の全てに BDNF が発現するわけではなく、被切断側にも BDNF が発現するという結果から、申請者は BDNF 発現のメカニズムとして神経軸索損傷という末梢生の要因以外に中枢神経系が関与し、その経路に一酸化窒素 (NO) が関与しているという仮説を立て、脳室内への NOS 合成阻害剤である L-NAME の投与が神経切断3時間後の三叉神経節細胞での BDNF の発現に及ぼす効果を検証した。その結果、L-NAME 脳室内投与により神経切断側、および非切断側の両側で神経節細胞での BDNF の発現が抑制されることを明らかにした。

以上の結果から、申請者はオトガイ神経切断後初期の三叉神経節細胞における BDNF の発現は、中枢神経系の活動によってもたらされ、その情報伝達の一部には NO が用いられると結論づけた。

本研究は末梢神経切断直後に切断によって生じた情報が中枢神経で処理され、両側の三叉神経節での BDNF 発現を促進すること、その過程で NO が重要な役割を担うことを明らかにした。この知見は、今後の歯科治療において神経損傷後の予後判定や異常感覚・慢性疼痛に対する診断・治療に寄与することが期待される。よって学位論文として十分な価値を認める。