

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 西田 洋平  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第466号  
学位授与の日付 令和2年3月23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 Vascularization via activation of VEGF-VEGFR signaling is essential for peripheral nerve regeneration

論文審査委員 主査 教授 瀬尾 憲司  
副査 教授 大峽 淳  
副査 教授 前田 健康

### 博士論文の要旨

**【緒言】** 歯科治療における偶発症として下歯槽神経の損傷がある。一般的に末梢神経は高い再生能があるとされているが、下歯槽神経の損傷症例ではしばしば感覚異常を伴う異常再生症例に遭遇する。しかし、その発症メカニズムは明らかにされておらず、その根本的治療法も確立されていない。したがって下歯槽神経損傷に対する根本的な治療法確立のためには、末梢神経再生メカニズムの分子レベルでの詳細な理解が不可欠である。

末梢神経損傷は、神経に並走する血管の損傷を伴う。この損傷血管の新生が神経再生に重要な役割を果たしていることが、近年の研究で明らかにされつつある。さらに臨床においては、神経損傷部位における血流が、感覚回復に寄与することが知られている。

VEGF-VEGFR シグナルは、血管内皮細胞の増殖を誘起するシグナルであり、発生期の脈管形成や、癌の血管新生に重要な役割を果たしている。しかしながら下歯槽神経再生における VEGF-VEGFR シグナルの機能はほとんど分かっていない。本研究は、下歯槽神経損傷モデルマウスを用いて、末梢神経再生における VEGF-VEGFR シグナルの機能を検索した。

**【方法】** 本実験には8~12週齢のC57BL6マウスを使用した。マウスの下歯槽神経をマイクロ剪刀で完全切断し、術後6時間、1日、2日、3日、5日、7日に灌流固定を行った。次いで通過切片を組織切片を作成し、免疫染色により各種分子の分布を観察した。同様のタイムコースで採取した損傷下歯槽神経からタンパク質を精製し、ウェスタンブロッティング法で各種分子の発現を確認した。さらに、神経損傷後に VEGF に対する中和抗体を投与し、VEGF-VEGFR シグナルの神経再生への影響を検索した。神経再生の評価には、免疫染色に加え DiI による逆行性神経標識を用いた。

**【結果】** 損傷後2日目に、神経両断端から損傷部へ向かって血管内皮細胞が侵入を開始した。再生軸索は血管内皮細胞に追従する様に損傷部へと伸長していた。3日目に損傷部へ侵入した血管内皮細胞は再接合し、それに続いて5日目には再生軸索が末梢断端へと到達した。VEGFR-1 は損傷前の正常神経では発現が認められなかった。損傷後は損傷神経の中断端で発現し、3日目で最も強い発現を認めたのちに、減衰した。

VEGFR-2 も時空間的に同様の発現様式であった。VEGF-A, B は共に、神経損傷後に発現し、損傷後2日目で最も強く発現していた。3日目で発現は減衰した。中和抗体により VEGF シグナルを阻害した損傷神経では、術後3日目の血管の再接合が認められず、それに続く軸索伸長は抑制されていた。再生神経細胞の数はコントロール群に比べて有意に少なかった。

**【考察】** 本研究より、VEGF シグナルが神経切断後に活性化し、活性のピークは損傷後2~3日であることが明らかとなった。VEGF-A, B 間および VEGFR-1, 2 間の発現パターンには、どちらも大きな違いは認められなかった。本研究で示した VEGF シグナルの活性が上昇する時期は、神経損傷後の血管新生が認められる時期と一致していた。

さらに、VEGF 中和抗体の投与により血管内皮細胞の再接合が阻害されたという本研究結果は、下歯槽神経損傷時の血管新生には VEGF シグナルが必須であることを示している。さらに、VEGF 中和抗体の投与は再生神経細胞の数を有意に減少させており、VEGF シグナルを介した血管新生が神経再生に重要であることを示唆している。一方で、VEGF-A, B が共に培養神経細胞に直接作用して、神経突起の成長を調節するという報告もある。VEGFR-1, 2 がともに損傷神経の近心断端で多く発現していたこと、VEGF の中和抗体の投与が再生軸索の伸長を抑制したという2つの結果を鑑みると、

VEGF シグナルは軸索伸長にも関与している可能性がある。

以上より、VEGF シグナルは下歯槽神経再生に必須であると結論づけられた。

#### 審査結果の要旨

歯科治療における偶発症として下歯槽神経の損傷がある。一般的に末梢神経は高い再生能があるとされているが、下歯槽神経の損傷症例ではしばしば感覚異常を伴う異常再生症例に遭遇する。しかし、その発症メカニズムは明らかになっておらず、その根本的治療法も確立されていない。したがって下歯槽神経損傷に対する根本的な治療法確立のためには、末梢神経再生メカニズムの分子レベルでの詳細な理解が不可欠である。末梢神経損傷は、神経に並走する血管の損傷を伴う。この損傷血管の新生が神経再生に重要な役割を果たしていることが、近年の研究で明らかになってきた。さらに臨床においては、神経損傷部位における血流が、感覚回復に寄与することが知られている。VEGF-VEGFR シグナルは、血管内皮細胞の増殖を誘起するシグナルであり、発生期の脈管形成や、癌の血管新生に重要な役割を果たしている。しかしながら下歯槽神経再生における VEGF-VEGFR シグナルの機能はほとんど分かっていない。

申請者は、下歯槽神経損傷モデルマウスを用いて、末梢神経再生における VEGF-VEGFR シグナルの機能を検討した。その結果、VEGF シグナルが神経切断後に活性化し、活性のピークは損傷後 2～3 日であることが明らかとなった。VEGF-A, B 間および VEGFR-1, 2 間の発現パターンには、どちらにも大きな違いは認められなかった。さらに VEGF シグナルの活性が上昇する時期は、神経損傷後の血管新生が認められる時期と一致していた。VEGF 中和抗体の投与により血管内皮細胞の再接合が阻害されたのは、下歯槽神経損傷時の血管新生には VEGF シグナルが必須であることを示している。さらに、VEGF 中和抗体の投与は再生神経細胞の数を有意に減少させており、VEGF シグナルを介した血管新生が神経再生に重要であることを示唆している。VEGFR-1, 2 がともに損傷神経の近心断端に多く発現していたこと、VEGF の中和抗体の投与が再生軸索の伸長を抑制したという 2 つの結果を鑑みると、VEGF シグナルは軸索伸長にも関与している可能性があることを明らかにした。

以上より、VEGF シグナルが末梢神経再生に必須であると結論づけた。

本研究では、VEGF シグナルが下歯槽神経損傷時の血管再生に必須であることを発見し、VEGF シグナルの抑制が下歯槽神経再生を阻害することを明らかにした。これらの結果は、下歯槽神経損傷後の知覚回復不良症例に対して、VEGF シグナルの賦活化が知覚回復治療に効果的に作用する可能性を示しており、下歯槽神経損傷治療における根本的新規治療法の開発のための基盤となりうる。したがってこの知見は、今後の歯科治療において発生した末梢神経損傷後の神経再生治療の開発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。