

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 VALVERDE GUEVARA YESSENIA MARIA
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第284号
学位授与の日付 平成25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 **Effect of a local application of an antibody to BDNF on neuroma formation after transection of the inferior alveolar nerve in the rat**
(下歯槽神経切断部に局所投与したBDNF抗体の神経腫形成に対する影響)

論文審査委員 主査 教授 齋藤 功
副査 教授 瀬尾憲司
副査 教授 山村健介

博士論文の要旨

(背景と目的)

抜歯などの口腔外科的治療では下歯槽神経に損傷を引き起こすことがあり、感覚低下または難治性慢性疼痛を誘発することがある。また、神経損傷部には神経腫の形成が認められることもあるが、その発生メカニズムや病態への関与については明らかではない。神経栄養因子にはニューロン軸索突起の伸長を促進させる役割があり、代表的な因子として神経栄養因子(NGF)と脳由来神経栄養因子(BDNF)がある。NGFは末梢神経損傷による露出した近位の軸索突起を標的細胞へ誘導させる効果があり神経再生に関与する。BDNFは神経細胞を増殖・刺激作用が認められているが、その機能にはまだ明らかでない点が多い。また、BDNFを末梢神経損傷部へ投与することによる神経腫の形成促進が報告され、慢性疼痛への関与を示唆している。

そこで本研究では末梢神経損傷後の神経腫形成におけるBDNFの関与を解明するために、BDNF抗体の局所投与による中和効果をもたらす神経腫形成への影響を検討した。

(方法)

本研究は新潟大学動物実験委員会(新大研第42号)により承認された。雄性成熟SD系ラットを用いて、抱水クロラルの腹腔内注射の後、左側の下顎骨皮質を削除した後、下歯槽神経を一部露出した。ラットを以下の3群に分けて比較した。切断部分に1 μ gの抗BDNF抗体を注射した群、生理食塩水を投与した群、また切断せずに閉じた群(naive)の3群とした。手術から3週間後、深麻酔下で還流固定し、神経露出部周囲組織を一塊で摘出し、以下の形態学的検討を行った。

- ① 神経切断後の神経腫形成の検討：手術から2週間後に下顎骨を摘出し、AZAN染色と神経のマーカーであるPGP-9.5で免疫染色し、神経腫の形成過程を観察した。
- ② 神経軸索再生に関する検討：Fluorogoldを手術2週間後にオトガイ部の皮膚表面から深さ5mmに10 μ lを注射した。注射1日後、三叉神経節を摘出し凍結標本を作製し蛍光下で観察した。
- ③ In situ hybridization：神経切断部及び周囲組織を一塊で摘出し、In situ hybridization法によりBDNFとTrkBのmRNAの分布を検討した。

(結果)

下歯槽神経の切断部は、生理食塩水投与群では手術2週間では結合組織に包まれて膨化していた。その内部には多くの神経組織が縦横に広がり、神経組織の間隙にはコラーゲン

線維が多く含まれていることから神経腫が形成されていることが確認された。BDNF 抗体投与群では生理食塩水投与群で認められた膨大は認められず、ほぼ Naive 群と同様な外形をしていた。BDNF 抗体投与群切断部の内部には少量のコラーゲン線維が含まれていたが、ほとんどの神経線維は神経の長軸方向に走行していた。

生理食塩水投与群の三叉神経節では Fluorogold に標識された細胞が減少していた。一方、BDNF 抗体投与群では多くの細胞が標識されており、同群の標識された細胞の神経節中に占める割合は Naive 群よりは有意に少なかったが、生理食塩水投与群よりは有意に多かった (one-way ANOVA, $p < 0.05$)。

神経切断部において Naive 群では BDNF と TrkB の mRNA は神経周膜内にも非常に少量が発現していた。BDNF mRNA は神経切断により生理食塩水投与群では神経周膜に発現しており、これらは BDNF 抗体投与群での発現は少なかった。TrkB mRNA は生理食塩水投与群では神経線維内にその発現が認められ、特に切断部近傍に発現していた。しかし、これらの発現は BDNF 抗体投与群では少なかった。

(考察)

本研究は、神経切断時に投与した BDNF 抗体は神経断端からの神経突起の過剰な伸長を抑え、さらに結合組織増成を抑制することにより、神経腫発生を抑制した可能性を示した。また、BDNF 抗体の投与は神経軸索の再生を促進し、抑制しないことも示した。末梢神経の切断は BDNF を誘導して損傷局所に貯留させ、局所に投与した BDNF 抗体はそれによる炎症を抑えた可能性もある。

さらに TrkB mRNA は神経線維ではなく神経周膜中の結合組織に存在していたことから、神経損傷により線維芽細胞が BDNF を産生し、オートクラインまたはパラクライン様式で TrkB に結合し、結合組織を増成することで神経腫が形成されたものと推察される。

審査結果の要旨

第三大臼歯の抜去、デンタルインプラントの施術あるいは顎矯正手術の施行後に神経腫の形成や感覚低下または難治性慢性疼痛を誘発することがある。また、神経損傷部には神経腫の形成が認められることもある。こういった現象に関する症例報告はこれまでも認めるが、神経腫の発生メカニズムや病態への関与については明らかではなかった。一方、神経栄養因子 (NGF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) といった神経栄養因子には、ニューロン軸索突起の伸長を促進させる役割があり、特に、BDNF は神経細胞を増殖・刺激作用があるとされ、末梢神経損傷部へ投与することによる神経腫の形成促進作用も報告され、慢性疼痛への関与が示唆されてきた。

本研究では、末梢神経損傷後の神経腫形成における BDNF の関与を解明するために、BDNF 抗体の局所投与による中和効果がもたらす神経腫形成への影響を検討した。

実験動物として雄性成熟 SD 系ラットを用い、抱水クロラルの腹腔内注射の後、左側の下顎骨皮質を削除した後、下歯槽神経を一部露出した。施術ラットは以下の 3 群に分けて比較、検討した。すなわち、切断部分に $1 \mu\text{g}$ の抗 BDNF 抗体を注射した群、生理食塩水を投与した群、切断せずに閉じた群 (naive) の 3 群とした。手術から 3 週間後、深麻酔下で還流固定し、神経露出部周囲組織を一塊で摘出し、以下のとおり形態学的検討を行った。

- A) 神経切断後の神経腫形成について検討：手術から 2 週間後に下顎骨を摘出し、AZAN 染色と神経のマーカーである PGP-9.5 で免疫染色し、神経腫の形成過程を観察。
- B) 神経軸索再生に関する検討：Fluorogold を手術 2 週間後にオトガイ部の皮膚表面から深さ 5mm に $10 \mu\text{l}$ を注射した。注射 1 日後、三叉神経節を摘出し凍結標本を作製し蛍光下で観察。
- C) In situ hybridization : 神経切断部及び周囲組織を一塊で摘出し、In situ hybridization 法により BDNF と TrkB の mRNA の分布を検討。

その結果、下歯槽神経の切断部は、生理食塩水投与群では手術 2 週間では結合組織に包まれて膨化し、内部には多くの神経組織が縦横に広がり、間隙にはコラーゲン線維が多く含まれていることから神経腫の形成が確認された。これに対し、BDNF 抗体投与群では生

理食塩水投与群で認められた膨大は観察されず、Naive 群とほぼ同様な外形を呈していた。また、BDNF 抗体投与群切断部内部には少量のコラーゲン線維が含まれていたが、ほとんどの神経線維は神経の長軸方向に走行していた。

生理食塩水投与群の三叉神経節では Fluorogold に標識された細胞が減少していたが、BDNF 抗体投与群では多くの細胞が標識され、標識された細胞の神経節中に占める割合は Naive 群よりは有意に少なかったものの、生理食塩水投与群よりは有意に多かった。

神経切断部において Naive 群では BDNF と TrkB の mRNA は神経周膜内にも非常に少量が発現していた。生理食塩水投与群では、神経切断により BDNF mRNA は神経周膜に発現していたが、BDNF 抗体投与群での発現は少なかった。一方、TrkB mRNA は生理食塩水投与群では神経線維内にその発現が認められ、特に切断部近傍に発現していたが、これらの発現は BDNF 抗体投与群では少なかった。

以上の結果から、本研究は、神経切断時に投与した BDNF 抗体が神経断端からの神経突起の過剰な伸長を抑え、さらに結合組織増成を抑制することにより神経腫発生を抑制した可能性を示した点、また、末梢神経の切断は BDNF を誘導して損傷局所に貯留させるが、BDNF 抗体の局所投与はそれによる炎症を抑えた可能性を示唆した点、さらに、TrkB mRNA は神経線維ではなく神経周膜中の結合組織に存在し、神経損傷により線維芽細胞が BDNF を産生してオートクラインまたはパラクライン様式で TrkB に結合することで結合組織が増生し神経腫を形成するとのメカニズムを提示した点に学位論文としての価値を認める。