

氏名	ホルヘ ニコラス ペレイラ シノブチチ		
授与した学位	博	士	
専攻分野の名称	歯	学	
学位授与の番号	博 甲 第	2312	号
学位授与の日付	平成14年3月25日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)		
学位論文題名	下顎枝骨折治癒過程における BDNF と Trk-B mRNA 発現と CGRP 免疫反応陽性神経の分布		
論文審査委員	教授 杉本 朋貞 教授 滝川 正春 教授 山本 照子		

学位論文内容の要旨

【緒言】

神経栄養因子は、中枢及び末梢神経の生存・維持に働くと考えられているが、近年、非神経系の細胞の増殖、分化等を促進することが報告され、その多機能性が注目されている。骨折は、癒痕を形成するのではなく、新たな骨を造ることによって治癒するため、骨折治癒過程は、骨再生の過程と捉えることができる。その過程は、様々な間葉系の細胞が関与する複雑な形態形成の場であり、軟骨及び骨形成、骨のリモデリングが生じている。骨組織は豊富な神経支配を有し、これまで、これらの神経線維が骨代謝や骨折治癒に密接に関与することが示唆されており、神経栄養因子が骨の再生の場で何らかの役割を担う可能性が考えられる。本研究では、ラットの下顎枝骨折モデルを用いて、骨折治癒過程の内軟骨性骨化において、神経栄養因子の一つである、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)及びその高親和性レセプター Trk-B の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法及び免疫組織化学的手法を用いて調べ、更に、CGRP の免疫染色により、骨折修復部位周辺の CGRP 免疫反応陽性神経の分布と、その骨折修復との関わりについても検討した。

【材料と方法】

1. 下顎骨骨折モデルの作成

6週齢 Wistar 系ラット 25 匹を全身麻酔下で、右側下顎枝後縁から下顎切痕にかけて骨折させ、骨片を元の位置に戻し、皮膚を縫合した。対照ラットには右側下顎枝に sham 手術を行った。

2. 組織学的観察

骨折後 3、5、7、14、28 日後に灌流固定後、下顎骨を摘出した。パラホルムアルデヒドで固定し、エチレンジアミン四酢酸にて脱灰後、厚さ 7 μ m のパラフィン切片を連続切片にて作成し、トルイジンブルー染色を行った。

3. プロープ作製及び、*in situ* hybridization 法

マウス BDNF 及び I 型、II 型、X 型コラーゲン cDNA より作成した Digoxigenin-11-UTP 標識された RNA プロープを用い、厚さ 7 μ m の連続切片にて、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

4. 免疫組織化学的観察

BDNF については、厚さ 7 μ m の連続切片を使用し、一次抗体としてウサギ抗マウス BDNF ポリクローナル抗体を反応させ、CGRP に関しては、厚さ 30 μ m の連続切片を作成してウサギ抗マウス CGRP ポリクローナル抗体を反応させた。その後、二次抗体としてビオチン化抗ウサギ IgG を反応させ、3,3'ジアミノベンジジンを基質として発色させた。

【結果】

骨折後 3 日あるいは 5 日では、BDNF と Trk-B mRNA は未熟な間葉系組織において発現を認めず、I 型、II 型、X 型コラーゲン mRNA も同様であった。

骨折後 7 日では、間葉系細胞が増殖、分化して軟骨組織を形成していた。軟骨周囲の紡錘形あるいは丸い細胞に I 型コラーゲン mRNA の発現が認められ、それらの細胞は BDNF と Trk-B mRNA も発現していた。II 型コラーゲンを発現する増殖、成熟、肥大軟骨細胞に BDNF と Trk-B mRNA の強いシグナルを観察し、X 型コラーゲンを発現する最終分化したと思われる肥大軟骨細胞にもその発現を認めた。

骨折後 14 日には骨への置換が始まり、活発なリモデリングが認められた。骨折部周辺の成熟、肥大軟骨細胞に、BDNF と Trk-B mRNA の強い発現を認めた。さらに、内軟骨性骨化部の軟骨から骨への移行部で、X 型コラーゲン mRNA を発現する肥大軟骨細胞にも BDNF と Trk-B mRNA 発現を認めた。一方、新生骨部では、I 型コラーゲン mRNA を発現する新生骨芽細胞や幼若骨細胞に BDNF と Trk-B mRNA の発現を認めた。また、骨折治癒部の軟骨部分には CGRP 陽性反応を認めなかったが、新生骨部に侵入してきたと思われる血管周囲には多くの CGRP 免疫反応陽性の神経線維を認めた。

骨折後 28 日には、軟骨組織はすべて骨組織に置換されており、幼若新生骨のリモデリングが行われ、骨の形態修復がほぼ終了していた。BDNF 及び Trk-B、I 型コラーゲン mRNA が新生骨芽細胞や幼若骨細胞に発現しており、II 型、あるいは X 型コラーゲン mRNA は、いずれの細胞にも発現していなかった。

【考察】

下顎枝骨折モデルの内軟骨性骨化による治癒過程で、活発に軟骨の形成が行われており、増殖、成熟、肥大軟骨細胞に BDNF と Trk-B mRNA の発現を認めたことから、内軟骨性骨化に BDNF が関与する可能性が示唆された。また、軟骨部分には CGRP 免疫反応は認められなかったことから、軟骨細胞における BDNF のオートクライン作用が示唆された。一方、軟骨から骨へ置換された新生骨部の血管周囲には神経の侵入が確認され、BDNF がパラクラインに神経にも作用する可能性が示唆された。また、軟骨-骨移行部の肥大軟骨細胞、新生骨部の新生骨芽細胞や幼若骨細胞にも BDNF 及び Trk-B mRNA が発現していたことから、BDNF は、軟骨が骨へ置換される際の軟骨組織の吸収や骨のリモデリングの開始等に関与する可能性が示唆された。

【結論】

ラット下顎枝骨折モデルにおいて、骨折部の内軟骨性骨化による治癒過程に出現する増殖、成熟、肥大軟骨細胞及び、骨芽細胞、幼若骨細胞に BDNF とそのレセプターである Trk-B が共に発現していた。BDNF は Trk-B を介してオートクライン、あるいはパラクラインに作用して、骨折治癒過程における内軟骨性骨化の調節機構になんらかの役割を果たすことが示唆された。

論文審査結果の要旨

骨折の治癒過程では、内軟骨性骨化と膜性骨化が起こり、これらが結合して骨癒合が完成するが、その過程は種々の成長因子やホルモン等により調節されると考えられている。骨には豊富な神経支配があり、これらの神経線維が骨代謝や骨折治癒の過程に密接に関与することが様々な報告から示唆されており、神経栄養因子が骨再生の場で何らかの役割を担う可能性が考えられる。

本研究では、ラット下顎枝骨折モデルを用いて、内軟骨性骨化の様々な段階において、神経栄養因子の一つである BDNF とその高親和性レセプター Trk-B の発現を調べ、同時に CGRP 免疫染色を行い骨折修復部位周辺の感覚神経の分布についても調べることにより、骨折治癒過程における BDNF と Trk-B の関与について検討した。

その結果、増殖、成熟、肥大軟骨細胞及び骨芽細胞、幼若骨細胞に BDNF、Trk-B が共に発現することが明らかになった。また、軟骨部に CGRP 免疫反応は認められなかったが、軟骨から骨へ置換された新生骨部において、侵入してきたと思われる血管周囲に多くの CGRP 免疫反応陽性神経線維を認めた。以上のことより、軟骨細胞及び骨芽細胞、幼若骨細胞が産生する BDNF は、Trk-B を介してオートクライン、あるいはパラクラインに作用して、骨折治癒過程における内軟骨性骨化の調節機構に何らかの役割を果たすことが示唆された。

本研究は、BDNF が骨折治癒過程に関わる様々な増殖因子の一つとして、内軟骨性骨化に関与することを初めて明らかにしたものであり、よって、本申請論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと認めた。