

## 学位研究紹介

## VEGF-VEGFR シグナル伝達の活性化による血管新生は末梢神経再生に必須である Vascularization via activation of VEGF-VEGFR signaling is essential for peripheral nerve regeneration

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯科麻酔学分野

西田 洋平

Division of Dental Anesthesiology, Graduate School of Medicine  
and Dental Sciences, Niigata University

Yohei Nishida

### 【緒言】

末梢神経は高い再生能を有するものの、歯科治療における下歯槽神経損傷では、感覚低下や痛覚過敏などの異常神経再生がしばしば認められる。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。そのため、末梢神経の分子レベルでの再生メカニズムの把握が必須となる。

末梢神経損傷の臨床において、神経損傷部位における微小血管循環の再確立は感覚消失の回復の予後を決定する重要な因子としてよく知られている。これは神経再生における VEGF-VEGFR シグナル伝達経路の関与を示唆しているが、末梢神経損傷後の VEGF や VEGFR の発現パターンや神経損傷後早期の変化に関する事象は明らかにされていない。そこで、下歯槽神経再生における VEGF-VEGFR シグナルの機能を、下歯槽神経切断モデルマウスを用いて検討した。

### 【方法】

本実験には 8～12 週齢の C57BL6 マウスを使用した。まずマウスの下歯槽神経を切断し、術後 6 時間、1 日、2 日、3 日、5 日、7 日に屠殺後、切片を作成し、組織学的観察ならびに免疫染色による各種分子の検索、神経切断部のウエスタンブロッティングにより切断部における VEGF-A, B の検索を行った。また、VEGF-A に対する中和抗体による神経再生への影響を検索した。切断神経の再生の確認には DiI のオトガイ孔への投与による DiI 標識技術を併用した。

### 【結果】

血管新生に関与するタンパク質である VEGF と結合して作用を示す VEGFR-1,2 は神経切断後 2, 3 日で血管新生と一致するように切断部に発現し、神経再生につれて発現は減少していき徐々に発現しなくなった (図 1,

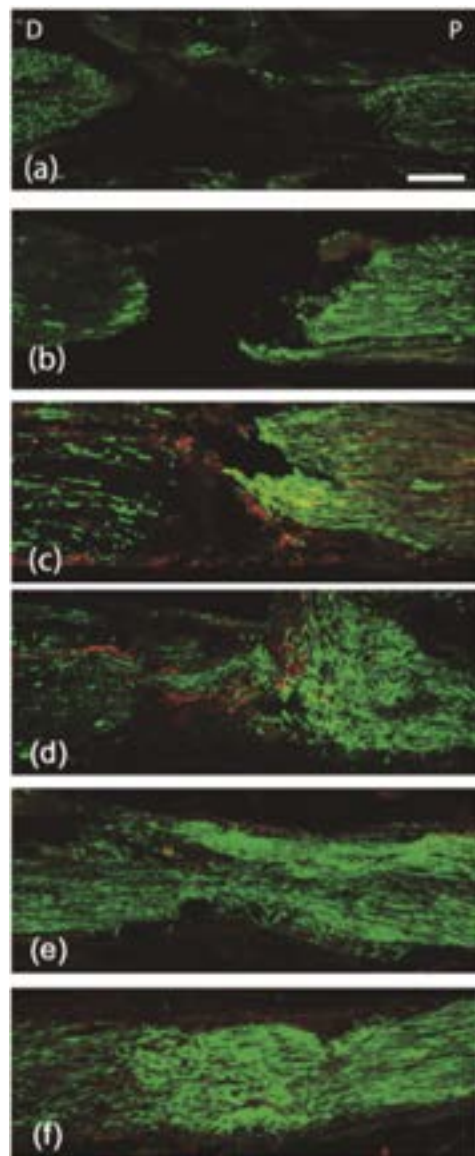


図 1 マウス下歯槽神経における血管と神経線維の分布の経時的変化。

術後(a) 6 時間, (b) 1 日目, (c) 2 日間, (d) 3 日間, (e) 5 日目, (f) 7 日目のマウス下歯槽神経における血管と神経線維の分布の経時変化を示す蛍光二重免疫染色

近位 (P) と遠位 (D) スケールバー: 200 $\mu$ m

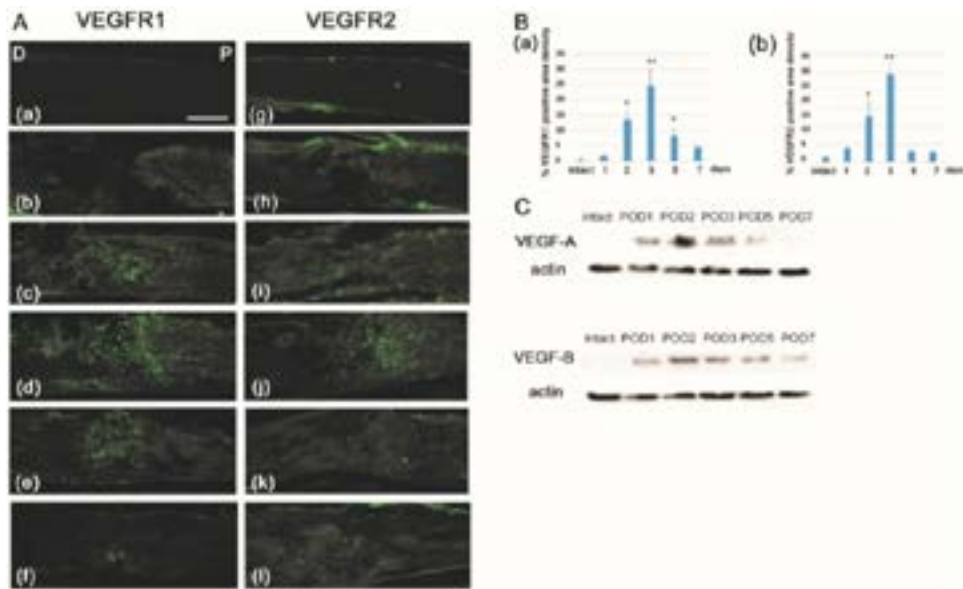


図2

- A: 非手術マウス(a, g), 術後1日目(b, h), 2日目(c, i), 3日目(d, j), 5日目(e, k), 7日目(f, l)における VEGFR1 (a-f) および VEGFR2 (g-l) の発現パターンの経時変化を示す免疫染色。スケールバー:  $200\mu\text{m}$
- B: VEGFR1 (a) および VEGFR2 (b) の免疫陽性領域の密度。
- C: 下歯槽神経の再生中の VEGF-A および VEGF-B のウエスタンブロッティング。

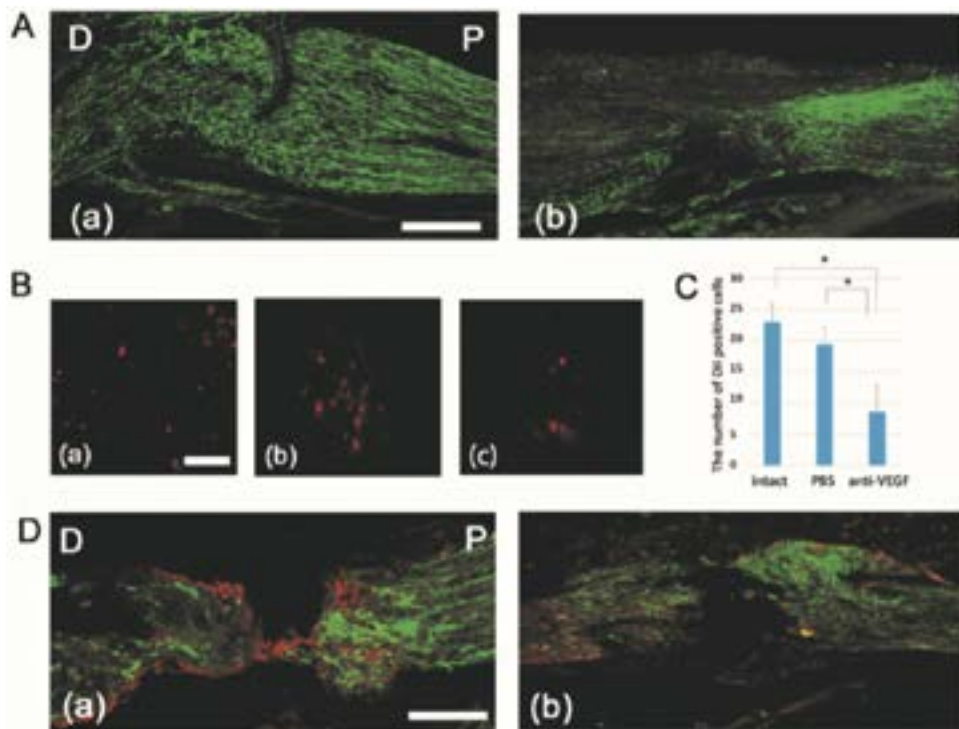


図3

- 下歯槽神経切断部位への VEGF に対する中和抗体の局所投与の効果。
- A: 非手術の免疫蛍光画像(a)および術後7日目の VEGF に対する中和抗体投与(b)。スケールバー:  $200\mu\text{m}$
- B: 非手術の三叉神経節における DiI 標識(a), 媒体対照(b), 術後7日目の VEGF-A に対する抗体による処理(c)スケールバー:  $100\mu\text{m}$
- C: DiI 標識三叉神経節ニューロンの数の定量分析。(ANOVA,  $P < 0.05$ )。
- D: 術後3日目の vehicle 投与(a), 中和抗体投与(b)の免疫染色。スケールバー:  $200\mu\text{m}$

図2A)。ウエスタンブロッティングでは VEGF-A, B は術後1～5日まで発現が認められ、術後2日目において最も強く、3日目から減少し始め7日目では検出できなくなった(図2C)。VEGF-A に対する中和抗体の投与は神経再生の見られた7日目において神経再生を阻害し、三叉神経節における DiI 陽性細胞数の減少が認められた(図3)。このことから神経再生が VEGF-VEGFR シグナルにおける血管新生の抑制により障害されたことが確認された。

### 【考 察】

VEGFR-1 および VEGFR-2 に結合する VEGF-A は培養 DRG ニューロンにおいて神経線維の成長を促進するのに役立つ。対照的に VEGF-B は VEGFR-1, NP-1 と結合して神経保護において重要な役割を果たすことが知られている。また、神経再生を介し、末梢神経系の感覚および治癒反応を回復させることも報告されている。これまでに *in vivo* での損傷後の末梢神経再生過程における VEGF-A, B の関与を検討している報告はあるが、

それらは神経切断後の長い観察期間を含んだものであり、神経損傷後の早期の変化について記述した報告はなかった。本研究では神経切断後の血管の発現に続いて VEGF-A, VEGF-B およびその受容体が神経再生する前の神経切断後2日目という早期の段階で出現することを確認できた。これは wallerian 変性過程における神経損傷に対する初期反応のタイミングと一致する。この時期、シュワン細胞はマクロファージを誘導し、そのマクロファージにより残存した神経が貪食される。したがって、損傷した神経におけるこれらの受容体の発現が軸索伸長、神経保護、血管新生の促進に必要であり、神経再生を開始するための適切な時期と一致していると考えられる。

結論としてこの研究は神経損傷の直後に VEGF-A および VEGF-B の発現を誘導され、続いて VEGFR-1 および VEGFR-2 の発現が誘導されたことを明らかにした。VEGF-VEGFR シグナルの阻害は神経の再生を抑制した。したがって、神経損傷における VEGF-VEGFR シグナル伝達の反応は局所血管新生において重要な役割を果たし、末梢神経再生の引き金となると結論付けられる。