



Expression of JCAD and EGFR in Perineurial Cell-Cell Junctions of Human Inferior Alveolar Nerve

平岡, 佑二郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2023-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8724号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485908>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Expression of JCAD and EGFR in Perineurial Cell-Cell Junctions
of Human Inferior Alveolar Nerve

ヒト下歯槽神経の神経周膜細胞間接着複合体における JCAD と EGFR の発現

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
口腔外科学
(指導教員：明石 昌也 教授)

平岡 佑二郎

【緒言】 口腔外科領域では智歯抜歯や顎矯正手術などの手術で、まれではあるが術後に神経系合併症が生じる。症状は様々であるが顔面皮膚の知覚鈍麻を生じることが多く治療に難渋することも少なくない。顎骨壊死に伴う神経障害性疼痛は激しい痛みを生じ長期間にわたり患者の QOL に影響を及ぼす。現在、末梢神経の損傷に対する治療はビタミン製剤の投与や種々の神経ブロック等が行われるが、より効果的な治療法の開発が望まれる。末梢神経障害の治療においては、損傷した部位への薬剤の運搬、神経周囲の環境の調整が必要であり、それらを調整する一つとして Blood-nerve-barrier(BNB)の存在が指摘されている。BNB は神経内微小血管と神経周膜により構成されており、神経線維束内の内圧の調節や線維束内外の分子の移動を調整し、恒常性の維持に働く。神経周膜は 3 つの層に分けられ内層は細胞間接着が密で、中および外層は神経周膜と神経上膜の移行部である。内層の細胞間接着は Claudin や ZO-1 により構成されており、神経損傷や再生等の病態生理学的状況により透過性を調節するとされるが、その機能に関する理解はいまだ不十分である。

過去に神経周膜に Epidermal growth factor receptor(EGFR)が発現していると報告されており、近年有意差はなかったものの EGFR 阻害薬が神経障害性疼痛を大幅に軽減するという報告もある。Junctional cadherin 5 associated(JCAD, previously known as KIAA1462)は内皮細胞の細胞間接着を構成する分子として知られ、心血管疾患との関連が報告されてきたが、これまで神経周膜における JCAD の発現や機能については報告されていない。本研究では、培養ヒト神経周膜細胞およびヒト下歯槽神経・神経周膜における EGFR と JCAD の発現を確認、EGFR 阻害薬(AG1478)の培養細胞に対する効果を細胞形態および細胞接着に注目し検討し、EGFR および JCAD の神経周膜における機能について考察した。

【対象と方法】 2015 年から 2022 年に神戸大学医学部附属病院で下顎骨区域切除を実施した 14 症例を無作為に抽出し、病理学的に下歯槽神経に腫瘍の浸潤を認める症例は除外した。年齢、性別、原疾患、併存疾患、放射線治療・化学療法の有無、術前の神経症状の有無について調査した。切除顎骨検体をホルマリン固定後にパラフィン包埋し切片を作成、HE 染色を行い神経線維束の数、直径、面積を ImageJ により計測した。ヒト神経周膜細胞(HPNCs, 1710)を Poly-L-Lysin コーティングを行った培養皿上で培養し、初代培養から 2~10 継代の細胞を使用した。AG1478 は 2、5、10 μ M の濃度で添加し 24 時間培養後に固定、観察した。免疫染色は Claudin-1 抗体、EGFR 抗体、JCAD 抗体を用い DAB 染色で発現の強度を評価した。EGFR 阻害薬添加による培養細胞の変化に関する評価では、細胞数をランダムに撮影した 5 画像($\times 20$ 倍)について DAPI 陽性細胞数をカウントし、細胞形態の変化はランダムに撮影した $\times 40$ 倍の 5 画像から細胞 5 つについて概形を手動でトレースし計測した。細胞の短長径比を cell-elongation degree と定義し測定した。JCAD-positive cell-cell contacts は細胞の概形の全長と JCAD 陽性の細胞間接着部位の比を計測し

た。各実験は4回独立して実施、統計には R software を使用、Tukey の多重比較検定を行い p 値は 0.05 以下を有意とした。

【結果】ヒト下歯槽神経 14 例における JCAD と EGFR の発現を調べた所、下歯槽神経断面の中央値は 2.52mm^2 ($1.79\text{-}4.39\text{mm}^2$)、神経線維束数の中央値は 12(3-23)、Claudin-1 の発現強度は全ての患者で中等度から強で、EGFR の発現は様々であった。JCAD の発現は微小血管において全例で中等度以上であったが、神経周膜では EGFR 同様に様々であった。蛍光二重免疫組織化学染色では Claudin-1 と EGFR、Claudin-1 と JCAD が部分的に共発現することが観察された。神経周膜培養細胞でも接着間接着部位に点状の JCAD 陽性部位を認め、ウエスタンブロッティングでも JCAD と EGFR の発現を確認した。神経周膜培養細胞は通常の培養下では線維芽細胞様の紡錘形であったが、AG1478 添加により上皮細胞様の敷石状形態に変化した。細胞数および細胞の面積には変化を認めなかったが、cell-elongation degree は濃度依存的に低下した。またコントロール群では JCAD の点状の接着斑が見られたが、AG1478 添加群では長い帯状の接着斑が観察された。細胞外周の全長に対する JCAD 陽性接着領域が占める割合を計測したところコントロールでは 12.9%であったのに対し、AG1478- $10\ \mu\text{M}$ 群では 29.2%と増加していた。

【考察】神経周膜は神経のバリア機構において重要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細は知られていない。JCAD は血管内皮細胞の細胞間接着構成因子であり神経内微小血管に強く発現しており、ヒト下顎骨の下歯槽神経周膜にも発現していた。培養ヒト神経周膜細胞においても JCAD と EGFR の発現を確認し、EGFR 阻害薬により細胞形態および細胞間接着に変化が生じることを示した。JCAD の血管内皮細胞における機能は徐々に解明されつつあるが、神経周膜における機能は不明である。神経内微小血管は血液と直接連絡しており、BNB を構成すると考えられている。また神経周膜は、神経上膜から間質液の受動的拡散を制限している。本研究で JCAD 神経内微小血管における発現がほとんどの症例において神経周膜よりも高いことが明らかになり、このような神経内微小血管と神経周膜における JCAD の発現の違いは、それぞれの組織における JCAD の機能の違いを反映していると考えられる。In vitro では EGFR 阻害により神経周膜細胞の形態変化が観察され JCAD 陽性細胞間接着領域が増加した。これらの効果が神経内微小血管および神経周膜により構成される BNB の調整に働き、血性成分の排除やマクロファージや免疫細胞の浸潤が調節されることにより神経障害性疼痛の緩和に働いている可能性がある。

本研究では、ヒト下歯槽神経・神経周膜において JCAD および EGFR が発現しており、JCAD は神経内微小血管において強い発現を認めることが示された。培養ヒト神経周膜細胞においても JCAD の発現を確認し、加えて EGFR 阻害薬の添加により細胞形態が変化し JCAD 陽性細胞間接着が増加することが示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3313 号	氏 名	平岡 佑二郎
論文題目 Title of Dissertation	Expression of JCAD and EGFR in Perineurial Cell-Cell Junctions of Human Inferior Alveolar Nerve ヒト下歯槽神経の神経周膜細胞間接着複合体における JCAD と EGFR の発現		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner	寺島 浩人	
	副 査 Vice-examiner	溝淵 知司	
	副 査 Vice-examiner	松本 理器	

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【緒言】口腔外科領域では智歯抜歯や顎矯正手術などの手術で術後に神経系合併症が生じる。症状は様々であるが顔面皮膚の知覚鈍麻を生じることが多く治療に難渋することも少なくない。顎骨壊死に伴う神経障害性疼痛は激しい痛みを生じ長期間にわたり患者の QOL に影響を及ぼし、より効果的な治療法の開発が望まれる。末梢神経障害の治療には、損傷した部位への薬剤の運搬、神経周囲の環境の調整が必要であり、それらを調整する一つとして Blood-nerve-barrier(BNB)の存在が指摘されている。BNB は神経内微小血管と神経周膜により構成されており、神経線維束内の内圧の調節や線維束内外の分子の移動を調整し、恒常性の維持に働く。神経周膜の細胞間接着は Claudin や ZO-1 により構成されており、神経損傷や再生等の病態生理学的状況により透過性を調節するとされるが、その機能に関する理解はいまだ不十分である。

過去に神経周膜に Epidermal growth factor receptor(EGFR)が発現していると報告されており、近年 EGFR 阻害薬が神経障害性疼痛を軽減するという報告もある。Junctional cadherin 5 associated(JCAD, previously known as KIAA1462)は内皮細胞の細胞間接着構成分子だが神経周膜における JCAD の発現や機能については報告されていない。本研究では、培養ヒト神経周膜細胞およびヒト下歯槽神経の神経周膜における EGFR と JCAD の発現を確認、EGFR 阻害薬(AG1478)の培養細胞に対する効果を細胞形態および細胞接着に注目し検討し、EGFR および JCAD の神経周膜における機能について考察した。

【対象と方法】2015 年から 2022 年に神戸大学医学部附属病院で下顎骨区域切除を実施した症例を無作為に抽出し、病理学的に下歯槽神経に腫瘍の浸潤を認める症例は除外した。年齢、性別、原疾患、併存疾患、放射線治療・化学療法の有無、術前の神経症状の有無について調査した。切除顎骨検体に HE 染色を行い神経線維束の数、直径、面積を ImageJ により計測した。ヒト神経周膜細胞(HPNCs, 1710)は初代培養から 2~10 継代の細胞を使用した。AG1478 は 2、5、10 μ M 添加し 24 時間培養後に固定、観察した。免疫染色は Claudin-1 抗体、EGFR 抗体、JCAD 抗体を用い DAB 染色で発現の強度を評価した。AG1478 添加による培養細胞の変化に関する評価では、細胞数をランダムに撮影した 5 画像($\times 20$ 倍)について DAPI 陽性細胞数をカウントし、細胞形態の変化はランダムに撮影した $\times 40$ 倍の 5 画像から細胞 5 つについて概形をトレースし計測した。細胞の短長径比を cell-elongation degree と定義し測定した。JCAD-positive cell-cell contacts は細胞の概形の全長と JCAD 陽性の細胞間接着部位の比を計測した。各実験は 4 回独立して実施、統計には R software を使用、Tukey の多重比較検定を行い p 値は 0.05 以下を有意とした。

【結果】症例は 14 例で下歯槽神経断面の中央値は 2.52mm^2 ($1.79\text{-}4.39\text{mm}^2$)、神経線維束数の中央値は 12(3-23)、Claudin-1 の発現強度は全ての患者において中等度以上で、EGFR の発現は様々であった。JCAD の発現は微小血管において全例で発現していたが、神経周膜では EGFR 同様に様々であった。蛍光二重免疫組織化学染色では Claudin-1 と EGFR、Claudin-1 と JCAD が部分的に共発現することが観察された。神経周膜培養細胞でも接着間接着部位に点状の JCAD 陽性部位を認め、ウエスタンブロッティングでも JCAD と EGFR の発現を確認した。神経周膜培養細胞は通常の培養下では線維芽細胞様の紡錘形であったが、AG1478 添加により上皮細胞様の敷石状形態に変化した。細胞数および細胞の面積には変化を認めなかったが、cell-elongation degree は濃度依存的に低下した。またコントロール群では JCAD の点状の接着斑が見られたが、AG1478 添加群では長い帯状の接着が観察された。JCAD 陽性接着領域の割合はコントロールでは 12.9%であったのに対し、AG1478- $10\ \mu\text{M}$ 群では 29.2%と増加していた。

【考察】神経周膜は神経のバリア機構において重要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細は知られていない。JCAD は血管内皮細胞の細胞間接着構成因子であり神経内微小血管に強く発現しており、ヒト下歯槽神経の神経周膜にも発現していた。培養ヒト神経周膜細胞でも JCAD と EGFR の発現を確認し、EGFR 阻害薬により細胞形態および細胞間接着に変化が生じることを示した。JCAD の血管内皮細胞における機能は徐々に解明されつつあるが、神経周膜における機能は不明である。本研究で JCAD 神経内微小血管における発現がほとんどの症例において神経周膜よりも高いことが明らかになり、神経内微小血管と神経周膜における JCAD の発現の違いは、それぞれの組織における JCAD の機能の違いを反映していると考えられる。In vitro では EGFR 阻害により神経周膜細胞の形態変化が観察され JCAD 陽性細胞間接着領域が増加した。これらの効果が神経内微小血管および神経周膜により構成される BNB の調整に働き、血性成分の排除やマクロファージや免疫細胞の浸潤が調節されることにより神経障害性疼痛の緩和に働いている可能性がある。本研究では、ヒト下歯槽神経の神経周膜において JCAD および EGFR が発現しており、JCAD は神経内微小血管において強い発現を認めることが示された。培養ヒト神経周膜細胞においても JCAD の発現を確認し、加えて EGFR 阻害薬の添加により細胞形態が変化し JCAD 陽性細胞間接着が増加することが示された。

本研究はヒト下歯槽神経の神経周膜および培養ヒト神経周膜細胞について、その EGFR および JCAD の発現を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった EGFR 阻害薬の神経周膜細胞におよぼす影響について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。