

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06387

研究課題名(和文) ストレスは脳の外側手綱核ニューロンを介して咀嚼に影響を与える

研究課題名(英文) Direct projection from the lateral habenula to the trigeminal mesencephalic nucleus in rats

研究代表者

大原 春香 (Ohara, Haruka)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40754726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスが咀嚼機能にどのように影響するのかを明らかにするため、負の情動(例えば、期待はずれ時の感情)に関与することが知られている外側手綱核(LHb)から閉口運動を司る三叉神経中脳路核(Vmes)ニューロンへの投射様態を解明し、Vmesニューロンが伝達する咀嚼筋筋紡錘や歯根膜の感覚が惹起または修飾している咀嚼運動が、情動関連領域として注目され、負の情動に関わるLHbからの直接制御を受けていることが明らかになった。また、この投射経路を介して、ストレス負荷で惹起される「負の情動」によって賦活される様態が明らかとなり、ストレスが自律神経系を介して咀嚼に影響を与えている脳神経機構の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：Trigeminal mesencephalic nucleus (Vmes) neurons are primary afferents conveying deep sensation from the masticatory muscle spindles or the periodontal mechanoreceptors, and are crucial for controlling jaw movements. Their cell bodies exist in the brain and receive descending commands from a variety of cortical and subcortical structures involved in limbic (emotional) systems. However, it remains unclear how the lateral habenula (LHb), a center of negative emotions (e.g., pain, stress and anxiety), can influence the control of jaw movements. The present study for the first time demonstrated the direct projection from the LHb to the Vmes and the detailed projection patterns, suggesting that jaw movements are modulated by negative emotions that are signaled by LHb neurons.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：神経科学

1. 研究開始当初の背景

私達は多くの精神的および身体的ストレスの中で生活している。ストレスは自律神経系に大きく影響し、そのバランスを乱し「うつ」の発症にも関わっている。患者さんは何らかの主訴(病態)を持ち、それに起因するストレスによって自律神経系のバランスが変調している可能性が高い。近年、咀嚼(ブラキシズムも)がストレスの緩和に役立つことが注目されている(Kaneko et al., 2004, Stomatologie)。この効果は、扁桃体や視床下部のニューロンの異常活性の抑制など、自律神経調節能の改善で起きていた(Sasaguri et al., 2005, Neurosci Lett)。

しかし逆に、ストレスに関与する自律神経機構が、咀嚼機能にどのように影響を与えているのかは、未だ良くわかっていない。ストレスが咀嚼機能に影響を与えるのであれば、歯科医師は、患者さんの咀嚼機能にどのような影響が出ているのかを知った上で治療しなければならない。この影響の解明をめざした研究が、私達を含む世界中で競われている。

ストレスが咀嚼筋筋活動を上昇させると報告されていた(Ruf et al., 1997, Acta Odontol Scand)ので、私が所属する歯科矯正科も、基礎系研究室(口腔解剖学第二教室)との共同研究を開始した。閉口筋と歯根膜の感覚を三叉神経運動核に伝達し、閉口に働く三叉神経中脳路核ニューロンに着目した。このニューロンは、末梢神経でありながら全身で唯一その細胞体が脳内に存在するので、他の脳部位からの入力によってニューロン活動が調節されている。この三叉神経中脳路核ニューロンが、ストレスに関わる自律神経領域からどのような入力を受けるのかの解明に着手し、大脳前頭前野からの直接投射を既に解明している(Iida et al., 2010, Neuroscience)。

この研究成果を受け、私は学位研究として、ストレスに応答する皮質下の自律神経領域も三叉神経中脳路核ニューロンに投射するとのストラテジーを立てた。「負の情動(例えば、期待はずれ時の感情)」に関与し、電気刺激で縫線核からのセロトニン放出を抑制し、「うつ」の発症に関わる外側手綱核(Matsumoto and Hikosaka, 2007, Nature; 2009 Nat Neurosci; Li et al., 2011, Nature)に着目した。この外側手綱核から三叉神経中脳路核への直接投射を世界で初めて発見した。

2. 研究の目的

本申請研究では、私の学位研究の成果を進展させ、外側手綱核から三叉神経中脳路核への投射が、どのようなストレスの負荷時にどのように働いているのかを解明することをめざした。

また、ストレスなどの負の刺激が扁桃体からのドーパミン放出を促すことが知られている(Inglish et al., 1999, J Neurochem)。扁桃

体から三叉神経中脳路核ニューロンへの直接投射は報告されている(Shirasu et al., 2011, Brain Res)。そこで、本研究の第二の目的として、外側手綱核からの投射の機能を、扁桃体からの投射と比較する。

<研究期間内に明らかにすること>

実験 : 三叉神経中脳路核に投射し、拘束ストレス負荷時に働く脳内ニューロンの解明。
実験 : 三叉神経中脳路核に投射し、口腔内の痛み刺激時に働く脳内ニューロンの解明。

解析 : 実験 と で得られる脳切片を観察・解析し、該当する外側手綱核ニューロンを探索。実験群を sham ope 群と比較する。
解析 : 扁桃核はストレスに関与することが良く知られている。よって、解析 で得られる外側手綱核ニューロンとの比較のため、実験 と に該当する扁桃核ニューロンを探索する。実験群を sham ope 群と比較する。
結果の統括: 解析 と の結果を比較検討し、ストレスや痛みの負荷時に、摂食運動が外側手綱核ニューロンによってどのように制御されているのかを解明する。

3. 研究の方法

ラットを用い、咀嚼運動の発現に関わる三叉神経中脳路核に直接投射する外側手綱核または扁桃核のニューロンが、ストレス負荷時にどのように賦活(または抑制)されるのかを調べ、外側手綱核-三叉神経中脳路核路の咀嚼運動における役割を、以下の計画で明らかにした。

実験 : 三叉神経中脳路核に投射し、拘束ストレス負荷時に働く脳内ニューロンの解明

(1) 左側の咬筋神経を剖出して刺激電極を装着後、動物を脳定位固定装置に装着した。研究室の先行研究の結果(Iida et al. 2012, Neuroscience)を参考にして、逆行性トレーサーである Fluorogold (FG)を充填したガラス管微小電極を、左側脳の橋部に刺入した。咬筋神経を電気刺激して誘発される順行性のスパイクを記録し、三叉神経中脳路核を同定した。三叉神経中脳路核内に、電気泳動にてFGを微量注入した。(2) 注入の7日後に、2時間30分間、拘束ストレスを動物に与える(動物を迎臥位にし、四肢が動かない様にヒモを用いて床面に固定した)。(3) ペントバルビタール(100 mg/kg)の腹腔内投与による深麻酔下で、動物をホルマリン溶液にて灌流固定し、脳を摘出した。脳の切片を作成した。活性化されたニューロンの指標となるc-Fos タンパクが発現したニューロン内の核の標識には、c-Fos 抗体を用い、ABA 法にて呈色した。逆行性輸送によってFGを取り込んだ細胞質の標識には、FG 抗体を用い、ABC 法にて呈色した。

実験 のコントロールとして、sham ope 群動物を作成した。上記の手順の(2)において、

注入の7日後に、2時間30分間、動物を cage 内で自由にしておいた。

実験：三叉神経中脳路核に注射し、口腔内の痛み刺激時に働く脳内ニューロンの解明

実験の(2)で、ペントバルビタール(55 mg/kg)の腹腔内投与による麻酔下で、左側舌体部を30秒に1回(5秒間)の割合で2時間、有鉤ピンセットで軽くつまんだ。その後、30分間放置した。実験の(3)を行った。

実験のコントロールとして、sham ope 群動物を作成した。上記の手順の(2)において、注入の7日後に、ペントバルビタール(55 mg/kg)の腹腔内投与で麻酔をし、そのまま2時間30分間放置した。

実験より得られたデータから、細胞質がFG標識された三叉神経中脳路核に注射するニューロン、核がc-Fos標識された拘束ストレスで活性化されたニューロン、FG/c-Fos double labeled neuronの3種のニューロンの数と分布を、脳全体、特に外側手綱核及び扁桃核内で調べ、顕微鏡下で camera lucida を用いて描画した(解析)。実験群の結果を、sham ope 群の結果と比較した。

4. 研究成果

ストレスが咀嚼機能にどのように影響するのかを明らかにするため、負の情動(例えば、期待はずれ時の感情)に関与することが知られている外側手綱核が閉口運動を司る三叉神経中脳路核ニューロンに、どのような状態で注射するのかをより詳細に解明した。

(1)外側手綱核から三叉神経中脳路核への直接投射が認められた。(2)外側手綱核の外側部から同側優位に両側の三叉神経中脳路核に投射が認められ、(3)三叉神経中脳路核ニューロンの細胞体との接触(図1)も認められた。(4)外側手綱核の内側部からは、三叉神経中脳路核にはほとんど投射しなかった。さらに、(5)外側手綱核から、背側縫線核または正中縫線核を介した、三叉神経中脳路核への間接投射が明らかになった。

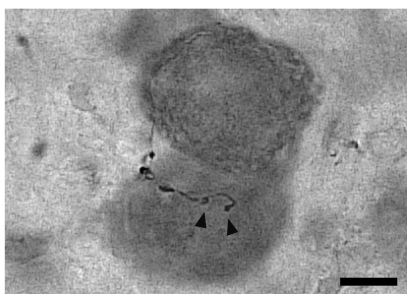


図1 外側手綱核から三叉神経中脳路核ニューロンの細胞体との接触

以上の結果より、三叉神経中脳路核ニューロンが伝達する咀嚼筋筋紡錘や歯根膜の感覚が惹起または修飾している咀嚼運動が、情動関連領域として注目され、負の情動に関わる外側手綱核からの直接制御を受けていることが明らかになった。この投射経路を介し

て、咀嚼運動が負の情動によっても制御されている可能性が示唆された。さらに、外側手綱核はその外側部(LHbl)と内側部(LHbm)とでは異なる機能を持ち、咀嚼運動は、LHblからより強い影響を受けることが明らかになった。

また、拘束ストレスを動物に与えた後に、c-Fosを発現する外側手綱核ニューロンの解明をおこなった。拘束ストレスを与えた実験群とsham ope群において、FG標識された三叉神経中脳路核に注射するニューロン、拘束ストレスで活性化されたc-Fosニューロン、FG/c-Fos double labeled neuronの3種のニューロンの数と分布を調べた。(1)実験群とsham ope群ともに、double-labeled neuronが認められた。(2)FG標識された外側手綱核ニューロン中でdouble-labeled neuronの割合は、実験群の方が多くのdouble-labeled neuronが認められた。(3)外側手綱核の内側部および外側部においても同様に、実験群で多くのdouble-labeled neuronが認められた。内側部と外側部では、内側部で多くのdouble-labeled neuronが認められた。以上の結果から、三叉神経中脳路核へのFG注入で標識された外側手綱核ニューロンには、ストレス負荷によって賦活化されるニューロンが存在することが示された。

本研究より、咀嚼筋および歯根膜感覚を伝達し頭頸部の運動の制御に関わっている三叉神経中脳路核ニューロンの細胞体が外側手綱核ニューロンからの投射を受け、この投射経路を介して、ストレス負荷で惹起される「負の情動」によって賦活される様態が明らかとなり、ストレスが自律神経系を介して咀嚼に影響を与えている脳神経機構の一端が解明された。

尚、外側手綱核から三叉神経中脳路核への投射様態について、国際誌Brain Researchに、Haruka Ohara et al. (2016) Direct projection from the lateral habenula to the trigeminal mesencephalic nucleus in rats. Brain Res 1630: 183-197 に公表された。しかし、このBrain Research誌による審査の過程で、実験の追加等を求められたので、扁桃核から三叉神経中脳路核に注射し、拘束ストレス負荷時および口腔内の痛み刺激時に働く扁桃核ニューロンの解明(実験、解析)の進捗状況が少し遅れている。疼痛刺激やストレスを動物に与えた後に、c-Fosを発現する扁桃核ニューロンの増減の探索については、研究室員の協力を得ながら、早急に成果をうるように努める予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Ohara H, Tachibana Y, Fujio T, Takeda-Ikeda R, Sato Fumihiko, Oka A, Kato

T, Ikenoue E, Yamashiro T, Yoshida A:
Direct projection from the lateral
habenula to the trigeminal mesencephalic
nucleus in rats, Brain Research: 183-197,
2016

〔学会発表〕(計3件)

大原春香、佐藤文彦、加藤隆史、山城 隆、
吉田 篤：外側手綱核から三叉神経中脳路核
ニューロンへの直接投射 第57回歯科基礎
医学会学術大会、2015年9月12日、新潟

大原春香、佐藤文彦、加藤隆史、吉田 篤：
情動はどのような神経機構によって咀嚼に
影響を及ぼすのか 第55回日本顎口腔機能
学会学術大会、2015年11月1日、大阪

大原春香 岡綾香 黒坂寛 山城隆：永久
歯の多数歯欠損を伴う骨格性下顎前突症例
第58回 近畿東海矯正歯科学会学術大会、
2016年7月17日、大阪

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大原 春香 (OHARA, Haruka)
大阪大学歯学部附属病院・医員
研究者番号：40757026

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

山城隆 (YAMASHIRO, Takashi)
佐藤文彦 (SATO, Fumihiko)
岡綾香 (OKA, Ayaka)