

令和 元 年 6 月 1 6 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08448

研究課題名（和文）シクリッド咽頭顎骨の神経 骨代謝クロストークに関わる神経回路の解析

研究課題名（英文）Analysis of neural circuit for cross talk with bone metabolism in cichlid pharyngeal jaw

研究代表者

井村 幸介（Imura, Kosuke）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：10415086

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：神経と骨組織の相互作用の可能性を研究するために、魚類ティラピアの咽頭顎骨をモデルとして用いた。咽頭顎骨内の破骨細胞と神経終末の分布を免疫組織化学的に二重染色によって可視化した。その結果、神経終末と少数の破骨細胞が近接して存在することが観察された。また、咽頭顎骨内を支配している末梢神経束が迷走神経の分枝であることを免疫組織化学と実体顕微鏡観察において明らかにした。神経トレーサ－実験により、この咽頭顎骨を支配する迷走神経枝が延髄の迷走葉に投射することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咽頭顎内の破骨細胞と神経終末が近接していることが観察され、末梢で神経 骨の相互作用が存在する可能性を形態学的に示した。これは、魚類において末梢の細胞レベルで異なる器官の直接連絡があることを初めて示したものであると考える。また、咽頭顎骨を支配する迷走神経分枝の中樞投射領域を明らかにしたことにより、上位中樞のどの領域が下行性に当該領域に情報を送るのかという、今後解明すべき興味深い課題を提示した。本研究は、脊椎動物の神経と骨という異なる器官が、どのように機能的に結びついているのかを探るための神経解剖学的な基盤を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Pharyngeal jaw bone of tilapia fish was used as a model to investigate for a possible interaction nerve and bone tissues. Distributions of osteoclasts and nerve terminals were visualized by double immunohistochemical staining in the pharyngeal jaw bone. As a result, I observed some nerve terminals contacted with a few osteoclasts. The nerve fibers innervating the pharyngeal jaw bone was identified as a branch of the vagal nerve by immunohistochemical and stereomicroscopic observations. Neuro-tracing experiments revealed that the vagal nerve branch innervating the pharyngeal jaw bone projected to vagal lobe in the medulla oblongata.

研究分野：比較神経解剖学

キーワード：シクリッド ティラピア 咽頭顎 神経 骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

### （1）げっ歯類の骨と神経の関係

げっ歯類の骨組織に分布する末梢神経には、骨のリモデリングに重要な役割を担っている破骨細胞に働きかける可能性のあるカルシトニン遺伝子関連ペプチドを含有している。さらに破骨細胞とその神経終末が接しているという形態学的な観察結果から、神経組織が骨組織に働きかける可能性を示唆する。

本研究代表者も、カルシトニン遺伝子関連ペプチドや骨代謝に働くことが想定される因子を含有する末梢神経終末が、げっ歯類の骨組織内に分布しているのを確認していた。

一方で、神経突起伸長制御因子に着目して、これを遺伝子工学的に欠損させて骨に分布する感覚神経が骨代謝に重要である事が報告された。この報告では、神経突起伸長制御因子が骨代謝に直接作用するという事を示したわけではないものの、神経突起伸長制御因子の欠損によって、骨に分布する神経の増減と骨粗鬆症様の発現が相関し、感覚神経が骨に分布することの重要性を示した。

このように末梢神経が骨組織にとって重要な働きかけをすることが示されているにも関わらず、中枢神経系において、どの領域からの情報がどのような神経回路を通して、最終的に骨組織に働きかけることになるのか、その詳細は明らかではなかった。

### （2）魚類における骨と神経の関係 モデル動物としての可能性

上述の問題を解析するのにあたって、げっ歯類をモデル動物として用いた場合、骨に分布する末梢神経と中枢神経を分けて解析することは可能であるが、骨に分布する末梢神経を含めた中枢神経との連絡を全体として同時に可視化して解析することは、その領域の膨大さから困難が予想された。さらに、骨の形態変化を促して経時的に観察する実験系を実行する場合など、全体を同時に可視化することは重要なアプローチであるものの、手技的に困難であることが予想された。

そこで本研究代表者は、このような問題点を解決するために、コンパクトな神経系を有し、骨を含めた末梢から中枢神経までの全体を同時に可視化できる可能性のあるシクリッド魚類（ティラピア）と金魚の咽頭鰓骨に存在する顎骨（咽頭顎骨）に、以下のような報告例などがあるために注目した。

三叉神経の破壊実験によって、生涯にわたり歯が生え変わるとされる、ティラピアの下顎骨歯の萌出が抑制されるとの報告があり、神経系の硬組織リモデリングに対する影響が強く示唆されている。

ティラピアと同属のシクリッド魚類では、生息域の環境依存性の食性変化に応じて、咽頭鰓骨の形態がリモデリングされており、硬い餌を常食するようになった個体では、食性変化に適応した咽頭鰓骨・歯の著しい形態変化が認められる。

ティラピア・金魚においても、哺乳類と同様な骨構成細胞（骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞）が存在する。

本研究開始前から、研究代表者は咽頭顎骨に分布する可能性がある末梢神経と関連する中枢神経領域を予備的な観察から予測していた。

## 2. 研究の目的

本研究は、神経系が骨代謝に関与することを神経解剖学的に明らかにする。特に神経回路レベルで骨内の末梢から中枢までの領域を明らかにするため、一個体内の関連領域が可視化できる、魚類の咽頭顎骨を材料にしてその可能性を探る。咽頭顎骨において、特に破骨細胞と末梢神経終末の分布を調べる。次に、咽頭顎骨に分布する末梢神経を同定する。同定した末梢神経に対して、神経トレーサーによる神経標識実験を行い、骨組織に分布する末梢神経の神経節細胞を同定し、中枢神経領域のどこに連絡をするのかを明らかにする。最終的には、同定した中枢側の領域が味覚などの感覚情報と、または咀嚼・嚥下運動に関わるニューロンとどのように連絡するのかを神経解剖学的手法でその回路を可視化したい。

### （1）咽頭顎骨内の構成細胞（特に破骨細胞を中心として）のマーカー分子を用いた免疫組織

化学法で同定して、骨内の分布を明らかにする。

(2) 咽頭顎骨を支配する末梢神経を実体顕微鏡下で同定したのちに、その分枝が骨内に進入したのち、骨内のどの領域で神経終末構造をつくるのかを光学顕微鏡的に確認する。

(3) 同定した咽頭顎骨を支配する末梢神経に、標識物質を注入して中枢神経領域との連絡を明らかにし、さらにその領域が他の脳領域とどのように連絡しているのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 咽頭顎骨内の構成細胞(特に破骨細胞)のマーカー分子を用いた免疫組織化学法による同定

麻酔下で動物をパラホルムアルデヒドで固定した後、咽頭顎骨をEDTAで脱灰処理した。凍結切片を薄切して、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)をマーカーとして破骨細胞を可視化した。

神経マーカーであるニューロフィラメント抗体等を用いて、凍結切片で免疫組織化学染色を施し、その後にTRAP染色をして二重染色を実施し、同一切片上に破骨細胞と神経終末を可視化した。

(2) 咽頭顎骨を支配する末梢神経の同定

麻酔下で動物をパラホルムアルデヒドで固定した後、実体顕微鏡下で咽頭顎骨の骨孔に進入する末梢神経を剖出して中枢神経側まで追跡し、どの脳神経に相当するのかを同定した。

凍結切片を薄切して神経マーカーであるニューロフィラメント抗体等を用いて、免疫組織化学染色を施し神経終末を可視化し、可視化した神経終末と実体顕微鏡下で剖出した末梢神経の位置関係(走行と骨孔の同定)を確認した。

(3) 咽頭顎骨を支配する末梢神経の標識実験

麻酔下にて、動物をパラホルムアルデヒドで固定した後、実体顕微鏡下で咽頭顎骨の骨孔に進入する末梢神経を剖出して中枢神経側まで追跡し、どの脳神経に相当するのかを確認した。

確認した末梢神経に、脂溶性のトレーサー物質であるDiIを挿入した。<sup>37)</sup>にて同固定液中で、神経組織中のDiIが拡散し標識されるまで2~6カ月ほど保存した。その後、ビブラトームまたはクライオスタットで切片を作成して、蛍光顕微鏡にて観察した。

また、麻酔下にて末梢神経あるいは脳を露出して、ビオチン化デキストランアミンをガラス電極に充填して電気泳動的に注入する手術を行った。2~4日間の生存期間を経た後、連続凍結切片を薄切して光学顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

(1) 咽頭顎骨内の破骨細胞と神経終末の分布

TRAP陽性の破骨細胞を金魚とティラピアで確認することができた。細胞の特徴としては、単核や多核の細胞がみられた。ティラピアでは、特に脱落しつつあると思われる咽頭歯の周囲に破骨細胞が多数分布していることが観察された。このことから、TRAP染色によって観察された破骨細胞は、その機能を反映した細胞分布を示していると考えられた。

また、二重染色ではTRAP陽性の破骨細胞と神経終末様構造が近接している像が観察され、神経と骨組織との相互作用が存在する可能性をティラピアにおいて、形態学的に示すことができた。他に、骨内部に進入した神経束のうち、髄腔内に神経終末として終止するものや、さらに咽頭歯の歯髄内に明確な終末構造をもって終止するものも多数観察された。

(2) 咽頭顎骨を支配する末梢神経の同定

実体顕微鏡による観察から、咽頭顎骨の骨孔から骨内に進入する神経束が迷走神経の分枝であることが分かった。また、この分枝を中枢側に追跡すると迷走神経の臓性の神経束から枝分

かれすることも明らかとなった。ティラピアでは上下の咽頭顎が存在するが、ともに迷走神経の分枝が支配していることが分かった。最終的には、中枢枝が延髄の迷走葉の外側へと走行していることが観察された。

### (3) 咽頭顎骨を支配する迷走神経の中枢投射領域

上咽頭顎骨を支配する迷走神経束に Dil を挿入した結果、標識された神経線維束が延髄の迷走葉の外側まで走行することが、蛍光実体顕微鏡による観察で明らかになった。切片を観察すると標識された線維束が、背側方向に走行し迷走葉に明確な終末構造をもって投射することが明らかとなった。さらに、終末領域は層状に分布しており、背腹方向に未投射領域を挟み込むような、空白領域を伴った投射パターンが観察された。下咽頭顎を支配する神経束の投射領域は今のところ、明確ではないがこの空白領域に局所対応性に投射するのかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

井村幸介、跡部好敏、武田昭仁、遠藤雅人、船越健悟：シクリッド咽頭顎に分布する末梢神経、第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017年

井村幸介、跡部好敏、武田昭仁、遠藤雅人、船越健悟：ティラピア咽頭顎骨内における破骨細胞と末梢神経の分布について Distributions of osteoclasts and nerve fibers in the pharyngeal jaw of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)、第2回モナッシュ大学脳科学研究所 富山大学理学部国際シンポジウム「神経行動学の最新動向」第12回シンポジウム「水生動物の行動と神経系」合同シンポジウム、2017年

井村幸介、跡部好敏、武田昭仁、遠藤雅人、船越健悟：シクリッド咽頭顎内の末梢神経と破骨細胞の分布について、第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018年

井村幸介、武田昭仁、遠藤雅人、船越健悟：シクリッド咽頭顎に分布する末梢神経の中枢連絡について、第124回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019年

〔その他〕

ホームページ等

[www-user.yokohama-cu.ac.jp/~neuroana/index.html](http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~neuroana/index.html)