

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11683

研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの摂食制御機構の解明と進行抑制の手法の考案

研究課題名（英文）Feeding behavior and mastication in the mutant SOD1 mouse model of ALS

研究代表者

辻 忠孝（TADATAKA, TSUJI）

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：50527231

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ALSモデルマウスは、70日前後で下肢の運動障害が顕著となり歩行困難となった。しかし、死亡前日まで摂食量は減少することなく、咀嚼に関わる運動ニューロンの変性は比較的、遅いことが推測された。咀嚼を制御する感覚ニューロンの三叉神経中脳路核ニューロン(MTN)を同定し、電気記録を行った。MTNは、lowとhigh-frequencyな入力信号に対して選択的に反応を示す特性を示すが、ALSモデルマウスではhigh-frequencyの入力信号に対するResonanceが有意に低下していた。ALSモデルマウスの一次感覚ニューロンの発火特性に異常が認められる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは全身の運動ニューロンが変性していく疾患であるが、ALSマウスは、死亡前日まで摂食量は減少することなかったことから、咀嚼に関わる運動ニューロンの変性は比較的、遅いことが推測された。ALSの三叉神経運動ニューロンは過剰興奮していることが報告されているが、感覚ニューロンについての報告はない。今回、一次感覚である三叉神経中脳路核ニューロンに着目し、ALSマウスではhigh-frequencyの入力信号に対するResonanceが有意に低下しており、一次感覚ニューロンの発火特性に異常が認められる可能性が示唆された。この成果はヒトのALSの咀嚼のメカニズムを解明する上でも有益であると思われる。

研究成果の概要（英文）：Body weight of SOD mice were gradually increased, reached a peak at day 40-60, and then decreased. It was hard to walk around 70 days later. However, food intake was not changed even though it was the day before death, suggesting that degeneration of motor neuron related to mastication might be relative slow. We recorded membrane current and potential from MTN related to mastication in both SOD mice and WT mice by whole-cell patch clamp recording technique. In SOD mice, resonance in response to input signal with high-frequency was lower than that in WT mice, indicating that ignition output of primary sensory neuron in SOD mice was different from that in WT mice.

研究分野：行動生理学

キーワード：筋萎縮 摂食 咀嚼 MTN

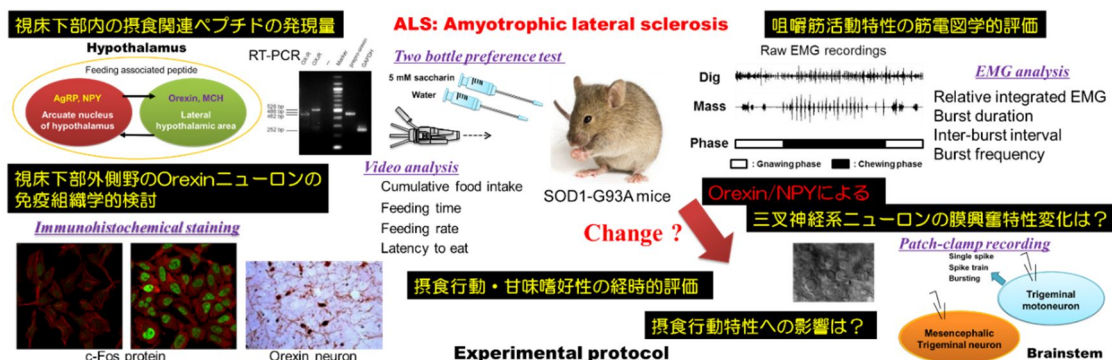
1. 研究開始当初の背景

『食べ物のおいしさ』を感じる上で、特に味覚と嗅覚の化学感覚情報を正確に認識することが重要となる。感冒に罹患し、鼻が詰まって食事をして、いつもと味の感じ方が異なり、おいしくない経験することがあるだろう。申請者は、口腔内の味覚情報や嗅覚情報を一時的に遮断し、味のおいしさを低下させることで、ヒト糖液摂取後の血中糖動態(血糖値や血清インスリン値)が、自律神経系を介して変化することを明らかとした(Tsuji et al., SpringerPlus, 2015)。また、様々な匂い刺激を付与し、ヒトやラットでの糖負荷後の血中糖動態への影響について検討を行い、匂い刺激の種類・時間・持続性を制御することにより、食後の血中糖動態を調整し得るものとして非常に興味深い成果を得てきた(H23-24 年度若手 B)。つまり、おいしく味わうことが、食の満足度といった主観的な指標を上昇させるだけでなく、消化吸収にも重要であることが示唆された。

しかしながら、先天的に嚥下障害のある患児(口唇口蓋裂)や後天的に嚥下障害が発症する患者(筋萎縮性側索硬化症)は、経口摂取が困難となり、栄養補給のために経管栄養を強いられる。経管栄養は経口摂取に比較して食の感覚情報が乏しく、食事に対する拒絶感を抱きやすい。連携協力者である山本らは、ラットでの甘味を呈する飼料の摂取によって、胃の活動性は促進され、苦味を呈する飼料では抑制されること、また味覚嫌悪学習を用いて、好ましい味が、経験や学習により後天的に嫌いな味になった場合の胃の活動性を評価したところ、好ましい味は胃の活動性を促進し、嫌悪性を示す味は胃の活動性を抑制することを明らかとした(Inui-Yamamoto et al., Physiol Behav., 2009)。つまり、おいしさという味覚による情動性が胃の活動性を促進させ、さらに摂食を促進するために、消化器官の運動が変化していることを示唆している。味覚による胃の活動の調節機構に関しては、味覚反射による調節だけではなく、視床下部外側野で主に発現する摂食促進ペプチドである Orexin の作用も大きく関連していると考えられる。山本らは、Orexin を麻酔下ラットの側脳室に投与すると、数分の潜伏で、胃の近心側での受け入れ弛緩、遠心側での律動的収縮が観察されること、甘味を呈するサッカリン溶液を通常よりも多く摂取すること(Furudono et al., Behav Brain Res., 2006)を明らかとした。つまり、おいしいものを積極的に摂取する時に、Orexin の発現が上昇し、胃の活動性が増加することが示唆された。

筋萎縮性側索硬化症(ALS: Amyotrophic lateral sclerosis)は、全身の運動ニューロンが選択的にかつ進行性に変性・消失していく疾病であり、病因は現時点では明らかとされておらず、治療は症状を軽減する対症療法に限られている。病期の進行とともに、嚥下困難、抑鬱、食欲不振、摂食動作の障害による摂取量の減少、代謝亢進によるエネルギー消費量の増加が原因となり、筋肉および脂肪の減少による体重減少が一般的に認められる。一方、ALS 患者の体格指数(BMI)と生存期間には関連が認められるとする報告があり、痩せすぎの BMI < 18.5kg/m<sup>2</sup> では生存期間が短く、中度肥満の BMI 30-35kg/m<sup>2</sup> では生存期間が長いと指摘されている。さらに、ALS モデル(SOD1-G93A)マウスに高カロリー・高脂肪食を与えた結果、体重が増加し、疾患進行が遅延したという報告もある。しかしながら、ALS モデルマウスがどのような摂食制御機構を有しているのか、咀嚼運動がどのように変化していくのか、「食べ方」や「噛み方」といった咀嚼筋活動特性は明らかとなっていない。

先行研究にて、桂花(中国産のキンモクセイ)の匂い刺激が、1.) ラット視床下部内での摂食促進ペプチドである Orexin・NPY・MCH・AgRP mRNA 発現を抑制し、一方、摂食抑制ペプチドである CART・POMC mRNA 発現を促進することを発見し、2.) 一定時間当たりの摂食量減少、同量の飼料を与えた際の摂食開始までの時間および摂食時間の延長と摂食行動抑制効果を確認した



(Yamamoto T, Inui T, and Tsuji T. Sci Rep. 2013)。また、筋電図学的にも咬筋の咀嚼筋活動が低下し、咀嚼パターンを変化させることを明らかとした。さらに、摂食促進ペプチドと摂食行動特性の関連性について、Orexin・NPY をラット脳室内に投与することで、一定時間当たりの摂食量の増加、同量の飼料を与えた際の摂食開始までの時間および摂食時間の短縮といった摂食行動促進効果だけでなく、閉口筋の筋活動が振幅値の上昇やバースト持続時間の延長を伴い増大することを明らかとした(Tsuji T et al., J Neurophysiol. 2011; Ushimura A, Tsuji T, et al., Behav Brain Res. 2015)。つまり、桂花の匂い刺激の摂食行動抑制効果は、Orexin・NPY の脳室内投与の摂食行動促進効果と相反する結果であり、簡易な匂い刺激で摂食関連ペプチドの発現調節が可能となり、捕食から嚥下に至る能動的な摂食行動を修飾する手法となることが示唆された。

本研究では、ALS の咀嚼運動に関わる脳幹内の三叉神経感覚-運動系の中枢制御機構、摂食行動を修飾する視床下部内の摂食関連ペプチドの発現、摂食時の開閉口筋活動特性といった摂

食制御機構を総合的に検討し、最終的には摂食関連ペプチドを調整することで ALS の進行抑制に有益な手法を考案していく。

## 2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロンの変性・消失を生じる難病であり、進行することで嚥下障害を引き起こし、経口摂取困難となり、経管栄養を強いられる。近年、ALS モデルマウスを用いて多くの研究がなされてきたが、摂食制御機構、つまり、どのように咀嚼や食べ方が経時的に障害されていくのか、報告はほとんどない。先行研究より、ラット脳室内に摂食促進ペプチドを投与することで咀嚼筋活動特性の変化を伴い、「早食い」に類似した食行動パターンを引き起こすこと、匂い刺激にて摂食関連ペプチドの発現を変化させることを明らかとした。本研究では、ALS モデルマウスを用いて、ALS の咀嚼運動に関わる脳幹内の三叉神経感覚-運動系の中枢制御機構、摂食行動を修飾する視床下部内の摂食関連ペプチドの発現、摂食時の開閉口筋活動特性といった摂食制御機構を総合的に検証し、ALS 進行抑制に有益な手法の考案を目的とする。

## 3. 研究の方法

<筋萎縮性側索硬化症(ALS)に関わる摂食制御機構を解明>

### 1)筋萎縮モデル老齢ラットの摂食行動の経時的評価

ALS のような経時的に筋活動が低下していくモデルと比較検討するために、老齢ラットを用いて、人工的に筋萎縮モデルを作製し、摂食行動実験を行った。生後 9 ヶ月齢の Wistar 老齢ラットを全身麻酔下にて顎下部皮膚切開、左側咬筋を剖出、切断、止血後に、縫縮した。2 週間の回復期を経て、摂食行動特性実験を HDD video camera を用いて二方向から観察するとともに、実験動物の概日リズムを考慮して明期(9:00-13:00)、暗期(18:00-22:00)にそれぞれ施行した。咬筋切断後 2 週間、1 ヶ月、2 ヶ月の時点で切断前と比較し、経時的な評価を行った。

### 2)筋萎縮性側索硬化症モデル(SOD1-G93A)マウスの摂食行動の経時的評価

生後 30 日齢の male hemizygous SOD1-G93A mice (B6SJL-Tg [SOD1-G93A] 1 Gur/J) と female B6SJL/F1 hybrids mice (control) を購入 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) し、40 日齢まで飼育する。生後 40・90・120 日齢の時点で、摂食行動実験を行い、経時的な評価を行う。摂食行動特性実験は HDD video camera を用いて二方向から観察するとともに、実験動物の概日リズムを考慮して明期(9:00-13:00)、暗期(18:00-22:00)にそれぞれ施行する。累積摂食量(mg)・摂食行動開始までの時間(latency to eat)・一定飼料量における摂食時間(s)・摂食率(mg/s)の項目を解析する (Tsuji T et.al.: J Neurophysiol. 2011, Ushimura A and Tsuji T et al., Behav Brain Res. 2015 参照)。

### 3)SOD1-G93A マウスの咀嚼筋活動特性の筋電図学的評価

実験2と同様の ALS モデルマウスとコントロールマウスを使用して、全身麻酔下にて筋電図導出用コネクタを頭頂部に固定し、コネクタからのテフロン被覆ステンレス線(径: 0.25 mm)を双極誘導電極として左側顎二腹筋前腹と咬筋筋腹に刺入固定する。摂食時に観察される顎二腹筋と咬筋からの活動特性変化を記録する。切歯で飼料を咬断する咀嚼準備期と臼歯で飼料を粉碎する粉碎期に分けて、連続するバースト活動を無作為に抽出し(サンプル数 30-50 burst)、バースト持続時間(ms)、バースト間インターバル(ms)、バースト発生頻度(Hz)、バースト積分値(control に対して正規化 %)を算出し、咀嚼パターンを解析する。先行研究にて、Wistar 系ラットは、咀嚼準備期と粉碎期に異なる二種類の筋活動様式が観察されている (Tsuji T et al., J Neurophysiol. 2011) ため、ALS モデルマウスの咀嚼筋活動の評価に参考にする。

### 4)SOD1-G93A マウスの三叉神経系ニューロンの膜興奮特性変化について

実験2と同様の生後 8-12 日齢 ALS モデルマウスとコントロールマウスを使用して、ハロセン深麻酔下で Krebs Ringer 液中で脳幹を摘出し、厚さ 300-400  $\mu\text{m}$  の冠状スライス標本を作製する。赤外線透視条件下で運動ニューロン(TMN)、中脳路核ニューロン(MTN)を同定し、whole-cell patch clamp recording technique にて whole-cell recording を行う。先行研究では、Orexin を SD ラットの TMN、MTN に作用させた際、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンを荷電担体とした内向き電流と膜の脱分極が観察され、AHP の短縮とスパイク周波数上昇を伴いニューロンの膜興奮性は増大することが明らかとなっている(未公表データ)。Orexin, NPY をそれぞれ単独で TMN, MTN に作用させた際の膜電流、膜電位変化を測定し、濃度依存変化・生後変化の有無について検討する。Current-clamp recording 条件下で刺激時間を short pulse(3 ms), long pulse(1 sec)に分けて細胞内通電した際に誘発される単一活動電位(AP)、連続発火(spike train)のスパイク活動特性(最大振幅値、スパイク持続時間、AHP 特性)をそれぞれ解析する。また、TMN では薬剤性(NMA+5-HT)、MTN では持続性脱分極によりリズムカルな(内因性)バースト活動が誘発されることから、上記薬剤を作用させた際のバースト活動周波数、バースト内スパイク周波数等のパラメータ値の変化についてもあわせて検討する。さらに、MTN では low-frequency(<10 Hz), high-frequency(50-70 Hz)な入力信号に対して選択的に反応を示す特性(周波数依存応答特性: resonance)を有することから (Tanaka et al., J. Neurophysiol., 2003)、薬剤投与後の同反応特性の変化についても検討を行う。

#### 4. 研究成果

##### 1) 筋萎縮モデル老齢ラットの摂食行動の経時的評価

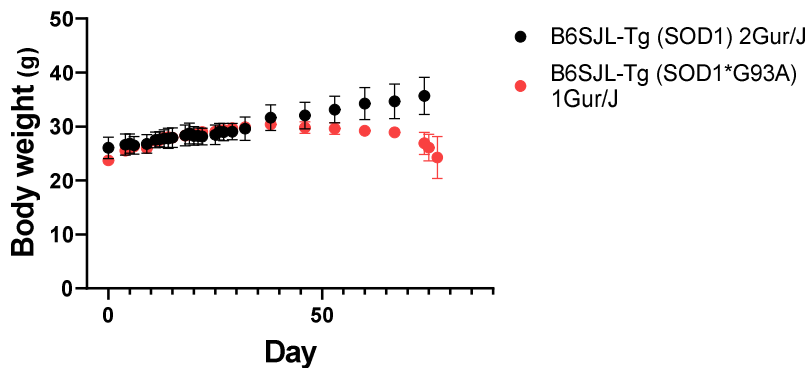
ALS モデルマウスの購入や遺伝子組換え実験の承認に時間を要したため、老齢ラットを用いて、人工的に筋萎縮モデルを作製し、咀嚼筋活動の経時的な変化を検討した。咬筋切断後 2 週間、1 ヶ月、2 ヶ月の時点で摂食行動実験を行い、切断前と比較した。切断後 2 週間の時点で摂食率は最も低下し、徐々に回復するも、2 ヶ月の時点でも切断前より低値であった。また、bout は、途切れることのない単一の摂食と定義されているが、その duration は、咬筋切断後 2 ヶ月経過しても、術前に比べ、延長したままであった。また、筋電図学的にも、切断後に、有意に咬筋の筋活動量が低下しており、徐々に回復していくことが確認できた。

つまり、人工的に咬筋切断という咀嚼機能を低下させると、咬筋の筋活動量の低下にともない摂食率が低下し、一回の摂食時間が延長するが、治癒とともに徐々に回復していく。この回復過程を ALS のような経時的に筋活動が低下していくモデルと比較検討する。

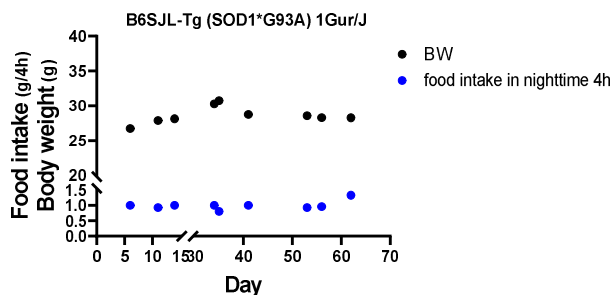
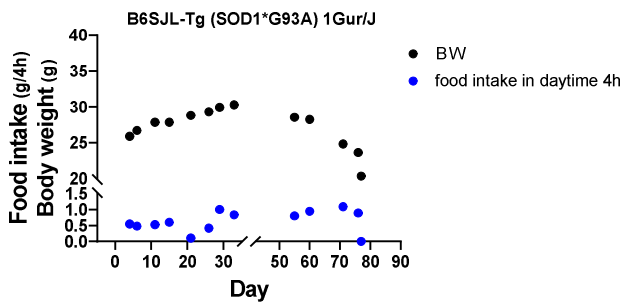
##### 2) 筋萎縮性側索硬化症モデル(SOD1-G93A)マウスの摂食行動の経時的評価

ALS モデル(B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J)マウス群の 4 時間の累積摂食量は、日中に比較して夜間に有意に(Daytime: 0.71±0.02 g, Nighttime: 1.00±0.11 g)多かった。対象群である B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J マウス群においても 4 時間の累積摂食量は、日中に比較して夜間に有意に(Daytime: 0.54±0.04 g, Nighttime: 0.83±0.03 g)多かった。二群間では、B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J 群の方が B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J 群と比較し、日中も夜間も摂食量は多い傾向にあった。

B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J マウスの体重は、実験開始から徐々に増加していったが、40-60 日目をピークに体重が減少していき、実験開始 70 日前後で下肢の運動障害が顕著となり歩行困難となった。

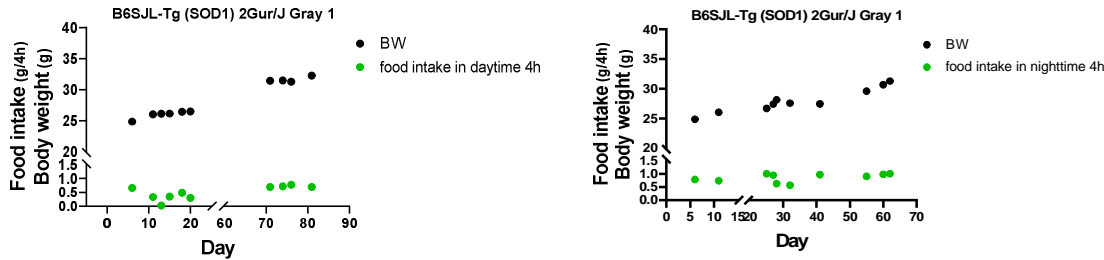


しかしながら、下肢の運動障害が明らかとなってからも、摂食量は減少することなく、1 週間後に摂食が困難となり、80 日前後で死亡した。



左記に代表的な B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J マウスの体重と Daytime と Nighttime の各 4 時間の累積摂食量を示す。このマウスは、実験開始 77 日目に死亡したが、76 日目の Daytime の摂食量は、0.89 g/4h と過去数週間の摂食量と大きな変化は見られなかった。つまり、ALS は全身の運動ニューロンの変性・消失していく進行性の疾患であるが、咀嚼に関わる運動ニューロンの変性は比較的、遅いことが推測された。

一方、コントロールである B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J マウスは、実験開始後 70 日を過ぎても、下肢の運動障害や摂食量の減少は認められなかった。



### 3) SOD1-G93A マウスの咀嚼筋活動特性の筋電図学的評価

当初は咀嚼筋内に筋電図電極を留置し、筋活動を記録する予定であったが、手術の侵襲が強いのか、これまでに確立された手術方法(Tsuji T et al., J Neurophysiol. 2011; Ushimura A and Tsuji T et al., Behav Brain Res. 2015) を改良しても、術後に生存させることが困難であった。

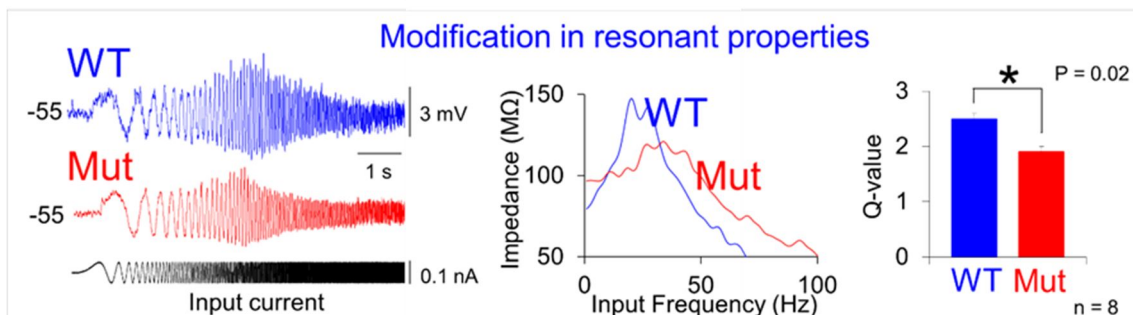
昨年度、B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J マウスの体重は、実験開始から徐々に増加していったが、40-60 日目をピークに減少する傾向が観察された。そこで、実験開始から 40 日目までの期間を前半、40 日目以降を後半とし、それぞれの期間で 4 回以上、摂食行動実験を実施し、摂食量を分析した。B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J 群の日中の 4 時間の累積摂食量は、前半が  $0.63 \pm 0.07$  g、後半が  $0.85 \pm 0.08$  g、また、夜間の 4 時間の累積摂食量は、前半が  $1.06 \pm 0.11$  g、後半が  $0.92 \pm 0.12$  g であった。つまり、体重減少がみられた後半の時期では、活動が亢進する夜間の摂食行動が抑制され、日中の活動休止期での摂食量が増加しており、全身の筋肉萎縮にとまない摂食行動様式が変化していることが推測された。

一方、B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J 群の日中の累積摂食量は、前半が  $0.49 \pm 0.14$  g、後半が  $0.61 \pm 0.11$  g であった。夜間の累積摂食量は、前半が  $0.86 \pm 0.05$  g、後半が  $0.81 \pm 0.17$  g であった。両群間の累積摂食量の差は、前半では日中は  $0.14$  g であったが、夜間は  $0.21$  g であり、後半になると、日中は  $0.24$  g、夜間は  $0.12$  g であった。B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J マウスの日中の摂食量の増加が起因していると推測される。通常、C57BL6 マウスであれば、実験開始 1 時間以内に摂食行動が観察されるが、両群の摂食行動開始までの時間は、夜間にも関わらず、1 時間以上をこえており、摂食に対するモチベーションも変化していることが示唆された。

### 4) SOD1-G93A マウスの三叉神経系ニューロンの膜興奮特性変化について

ALS の咀嚼を制御する三叉神経系ニューロンについて、乳幼児期 ALS モデルマウスの三叉神経運動ニューロン(TMN)は過剰興奮していることが報告されているが(Venugopal et al. J Neuroscience 2015)、一次感覚ニューロンである三叉神経中脳路核ニューロン(MTN)については報告されていない。MTN は、咀嚼運動リズムの形成に重要な役割を果たす可能性が示唆されている(Komuro et al., J.Neurophysiol.,2001)ため、今回、MTN の膜興奮特性変化について、電気生生理学的検証を行った。

生後 8-12 日齢 ALS モデルマウスとコントロールマウスを使用して、ハロセン深麻酔下で脳幹を摘出、厚さ  $300 \mu\text{m}$  の冠状スライス標本作製、MTN を同定し、whole-cell patch clamp recording technique にて電気記録を行った。MTN は、low-frequency ( $<10$  Hz)、high-frequency (50-70 Hz) な入力信号に対して選択的に反応を示す特性(周波数依存応答特性: Resonance)を示すが(Tanaka et al., J.Neurophysiol.,2003)、ALS モデルマウスでは high-frequency の入力信号に対する Resonance (Q-value) が有意に低下していた(ALS モデルマウス;  $1.9 \pm 0.1$ , コントロールマウス;  $2.5 \pm 0.1$ ,  $p=0.02$ ,  $n=8$ ) (未報告データ)。Resonance は、MTN のバースト発火活動を制御しているため、ALS モデルマウスの一次感覚ニューロンの発火特性に異常が認められる可能性が示唆された。ALS の咀嚼について、運動ニューロンのみならず、感覚ニューロンにも注目し、今後検討を行う必要がある。また MTN に対する薬剤投与後の同反応特性の変化についても検討を行う予定である。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 晋  (TANAKA SUSUMU)  (00367541)	大阪大学・歯学部附属病院・講師    (14401)	
研究分担者	古郷 幹彦  (KOGO MIKIHICO)  (20205371)	大阪大学・歯学研究科・教授    (14401)	