

令和元年6月25日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06695

研究課題名(和文)光操作技術を用いた嚥下神経機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the swallowing neural network by optogenetics

研究代表者

那小屋 公太(Nagoya, Kouta)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：10806491

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)：Phox2bは自律機能の発現に重要な転写因子である。我々は過去にラット三叉神経運動核背側網様体(RdV)に存在するPhox2bニューロンが顎運動制御に関与している可能性を報告した。今回、RdVに分布するPhox2bニューロンに対して摂食や睡眠・覚醒に関与する神経ペプチドであるオレキシンがどのような変調効果をもたらすが電気生理学的に検証を行なった。オレキシン投与によりPhox2bニューロンの多くは膜電位上昇を認め、その上昇は2型受容体拮抗薬により抑制された。また、発火頻度は投与により減少を示した。以上より、オレキシンはRdVに存在するPhox2bニューロン特異的な変調効果を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

摂食や睡眠・覚醒など様々な生理作用を有することが知られているオレキシンと顎運動制御に関与するPhox2bニューロンとの関連を電気生理学的に検証した。その結果、オレキシン投与はPhox2bニューロン特異的な変調効果を示すことがわかった。これは神経回路レベルでの摂食行動やブラキシズムにおけるメカニズム解明の一助となる可能性が考えられ、さらなる機能研究が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Phox2b is a member of transcription factors and essential for the development of the autonomic nervous system. We recently reported that Phox2b-expressing neurons are involved in the control of coordinated jaw-movements such as chewing and swallowing. In the present study, we investigated physiological changes of Phox2b-expressing neurons located at RdV by the administration of orexin known as regulating physiological functions such as feeding, and wake/sleep stabilities. The majority of Phox2b-expressing neurons were produced membrane depolarization during the application of orexin. However, orexin-induced membrane depolarization were prominently reduced in the presence of Orexin type2 antagonist. All Phox2b-expressing neurons exhibited reduction of firing rate by the administration of orexin. Taken together, present study suggests that orexin modulate passive membrane and firing properties of Phox2b-expressing RdV neurons.

研究分野：摂食嚥下リハビリテーション

キーワード：顎運動 咀嚼 Phox2b オレキシン パッチクランプ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Phox2b は転写因子の一種であり、自律機能の発現に重要な役割を果たしている。ラット脳幹において Phox2b を持つニューロン (Phox2b⁺ ニューロン) は、自律機能を司る部位に広く分布するだけでなく、三叉神経運動核背側網様体 (RdV) にも存在することが報告されている。我々は過去の研究において、RdV に分布する Phox2b⁺ ニューロンと Phox2b を持たないニューロン (Phox2b⁻ ニューロン) の電気生理学的特性、形態学的特性の比較検討を行なった。その結果、RdV に存在する Phox2b⁺ ニューロンと Phox2b⁻ ニューロンは全く異なる性質を有しており、両ニューロンが協調して咀嚼や嚥下をはじめとした顎運動制御に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

オレキシンは視床下部外側に存在するオレキシン含有ニューロンに由来する神経ペプチドの一種であり、小脳を除く中枢神経系全域に投射している。当初摂食促進作用に基づいてその名が付けられたオレキシンであったが、その後研究が進むにつれて睡眠・覚醒の調節、自律神経系の機能調節、報酬系への関与などさまざまな生理作用を有することが明らかになっている。このオレキシンと顎運動に関する研究は摂食行動や睡眠・覚醒に起因するブラキズムの観点から In vivo、In vitro の両者において様々な研究が報告されているが、咀嚼や嚥下をはじめとした顎運動制御に関連している Phox2b ニューロンとオレキシンの関連は明らかになっていない。そこで本研究は、RdV に存在する Phox2b⁺ ニューロンに対するオレキシン変調効果を電気生理学的に検証することを目的に実験を行なった。

3. 研究の方法

実験には Phox2b 遺伝子を有するニューロン特異的に蛍光色素 EYFP を発現させたトランスジェニックラット (Phox2b-EYFP ラット) を用いた。P2-14 の Phox2b-EYFP ラットの脳幹から厚さ 400 μ m の RdV を含む前頭断スライス標本を作成した。RdV に存在する Phox2b⁺ ニューロンを蛍光顕微鏡下で識別した後、同ニューロンから whole-cell recording を行なった。また、比較検討のため RdV に存在する Phox2b⁻ ニューロンからも記録を行った。解析項目としては、各ニューロンの膜特性の他に、Orexin-A (200nM) および Orexin-B (200nM) 還流投与時の (1) 膜電位変化、(2) 発火頻度の変化を解析した。また、(3) Orexin-A 還流時に Orexin-antagonist である TCS OX2 29 投与 (10 μ M) による膜電位変化についても検証を行なった。

4. 研究成果

(1) Orexin 投与による膜電位変化

Orexin-A および Orexin-B 還流投与により Phox2b⁺ ニューロンの大多数は膜電位の上昇を認めたが、Phox2b⁻ ニューロンの多くは膜電位に変化はみられなかった。Orexin-A (200nM) の還流投与により Phox2b⁺ ニューロンの 83% (15/18) は膜電位上昇を認めたが、Phox2b⁻ ニューロンの 75% (9/12) は膜電位の変化を示さなかった。同様に、Orexin-B (200nM) 還流投与により Phox2b⁺ ニューロンの 86% (6/7) は膜電位上昇を認めたが、Phox2b⁻ ニューロンの 50% (3/6) は膜電位の変化を示さなかった。膜電位上昇は Orexin-A 投与で 12.8mV、Orexin-B 投与で 11.7mV であったが有意差は認められなかった。(図 1)

(2) Orexin 投与による発火頻度変化

また、Orexin-A (200nM) 投与による発火頻度変化を解析したところ、Phox2b⁺ ニューロン、Phox2b⁻ ニューロンいずれも発火頻度の減少を示した。Phox2b⁺ ニューロンでは 5.8Hz、Phox2b⁻ ニューロンでは 5.2Hz の減少を示したが両ニューロンで減少の程度に有意差は認めなかった。(図 2)

(3) antagonist による膜電位への影響

Orexin-antagonist である TCS OX2 29 投与では Phox2b⁺ ニューロンの膜電位上昇が

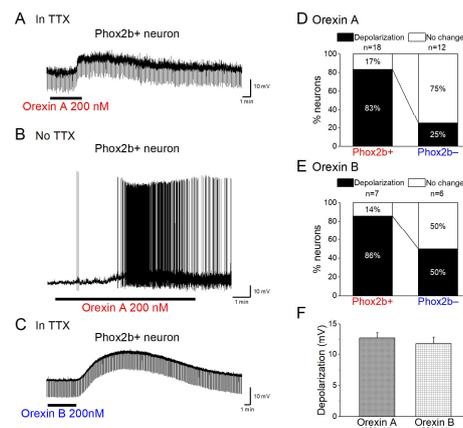


図 1. Orexin A および Orexin B 還流投与による膜電位変化

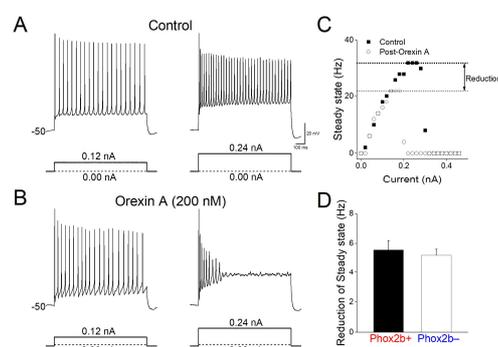


図 2. Orexin A および Orexin B 還流投与による発火頻度変化

抑制された(4/4)。膜電位上昇は Orexin-A のみの投与では 8.6mV であったのに対し、TCS OX2 29 還流下での Orexin-A 投与では 1.3mV と減少を示した。以上より、type2 Orexin 受容体が膜電位の上昇に關与していることが示唆された。(図 3)

以上より、Orexin は RdV に存在する Phox2b⁺ ニューロン特異的な変調効果を示し、その効果は顎運動制御に關しても影響を及ぼすことが考えられた。この効果は摂食行動やブラキシズムに關連している可能性が考えられ、さらなる機能的な研究が望まれる。

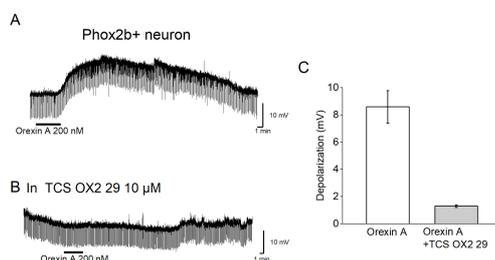


図 3. Orexin antagonist である TCS OX2 29 存在下での Orexin A の膜電位変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nagoya K, Nakamura S, Ikeda K, Onimaru H, Yoshida A, Nakayama K, Mochizuki A, Kiyomoto M, Sato F, Kawakami K, Takahashi K, Inoue T: Distinctive features of Phox2b-expressing neurons in the rat reticular formation dorsal to the trigeminal motor nucleus. *Neuroscience*. 2017 Sep 1;358:211-226.

〔学会発表〕(計 8 件)

Naru Shiraishi, Kouta Nagoya, Takanori Tsujimura, Makoto Inoue: Development of a rat model for studying the behavioral assessment of dysphagia. *Dysphagia Research Society (DRS) 27th Annual Meeting*, Wyndham San Diego Bayside (San Diego), USA, 2019.3.7-9.

Midori Yoshihara, Taku Suzuki, Kouta Nagoya, Takanori Tsujimura, Makoto Inoue: Modulation of initiation of swallows evoked by continuous laryngeal TRPV1 activation in anesthetized rats. *Neuroscience 2018*, San Diego Convention Center (San Diego), USA, 2018.11.3-7.

Midori Yoshihara, Taku Suzuki, Kouta Nagoya, Naru Shiraishi, Jin Magara, Takanori Tsujimura, Makoto Inoue: Effect of continuous laryngeal TRPV1 activation on initiation of swallowing in anesthetized rats. 第 23 回日本摂食嚥下リハビリテーション学会学術大会, 仙台国際センター(宮城県, 仙台市), 2018 年 9 月 8-9 日.

Kouta Nagoya, Shiro Nakamura, Tomio Inoue, Makoto Inoue: Functional properties of Phox2b-expressing neurons located in the brainstem for chewing. 3rd Japan Korea Joint Symposium, Tohoku University Centennial Hall (Sendai) Japan, 2018.9.7.

Nagoya K, Nakamura S, Ikeda K, Onimaru H, Nakayama K, Mochizuki A, Sato F, Yoshida A, Kawakami K, Inoue M, Inoue T: Distinctive properties of Phox2b neurons located in the rat reticular formation dorsal to the trigeminal motor nucleus. *Society for Neuroscience*, Walter E. Washington Convention Center (Washington, DC), USA, 2017.11.11-15.

那小屋公太: ラット三叉神経運動核の背側網様体に存在する Phox2b 陽性ニューロンの電気生理学および形態学的特性は Phox2b 陰性ニューロンと異なる. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 松本歯科大学キャンパス(長野県・塩尻市), 2017 年 9 月 16 日-18 日.

那小屋公太, 中村史朗, 中山希世美, 望月文子, 佐藤智彦, 吉田 篤, 井上 誠, 井上 富雄: ラット三叉神経運動核背側網様体に存在する Phox2b 陽性ニューロンの電気生理学・形態学的性質. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 松本歯科大学キャンパス(長野県・塩尻市), 2017 年 9 月 16-18 日.

那小屋公太, 中村史朗, 中山希世美, 望月文子, 吉田 篤, 井上 誠, 井上 富雄: 転写因子 Phox2b を発現する三叉神経運動核背側網様体ニューロンの生理学および形態学的特性. 日本顎口腔機能学会第 58 回学術大会, 徳島大学藤井節郎記念医科学センター(徳島県・徳島市), 2017 年 5 月 15-16 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。