

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 28 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：2019～2021

課題番号：19K24117

研究課題名（和文）ALS咀嚼障害の電気生理学的検討とAIを用いた行動研究

研究課題名（英文）Electrophysiological and behavioral studies of ALS masticatory disorders using Artificial Intelligence

研究代表者

関 壮樹（Seki, Soju）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60755081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動神経の変性を伴った重篤な筋力低下を伴う難病であり、病気の進行に伴い、咀嚼障害がみられ、経口摂取困難となり死に至る。

本研究ではALSモデルマウスの摂食行動の動画より人工知能（AI）を用いて、ALSモデルマウスの咀嚼障害を自動検出するAIモデルの開発を行った。このAIモデルによって、ALSモデルマウスの咀嚼サイクルは、野生型マウスと比較し、12週齢以降有意に延長することを突き止めていた。現在、咀嚼障害出現時のALSモデルマウスにおける一次感覚神経の発火異常を検出、ALSの咀嚼障害の治療に有益な治療法の考案を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はALSの咀嚼障害の治療に限らず、咀嚼障害鑑別AIを用いたALS患者のスクリーニング検査という点においても、臨床応用が早期に可能になる可能性を持っている。ALSの咀嚼障害メカニズムが解明、予防治療法が発見されれば、ALS患者の栄養を改善し生存期間を延長するのみならず、ALSの骨格筋の運動障害にも応用できる可能性があるため、ALSの治療戦略として、咀嚼障害の解明は大変重要である。これまで困難を極めたALSの治療に電気生理学とAIを癒合させることで新たな一歩を踏み出せると確信する。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an intractable disease with severe muscle weakness accompanied by degeneration of motor nerves. As the disease progresses, masticatory disorders and difficulty of oral intake are observed, leading to death.

In this study, we developed an artificial intelligence (AI) model that automatically detects masticatory disorders in ALS model mice using videos of feeding behavior in these mice. We found that the masticatory cycle of ALS model mice was significantly prolonged after 12 weeks of age compared to wild-type mice by using this AI model. Currently, we try to detect the treatment for masticatory disorders of ALS by focusing on the firing abnormality of primary sensory nerves in ALS model mice with masticatory disorders.

研究分野：ALS

キーワード：ALS AI 咀嚼障害 一次感覚神経 電気生理 ALSモデルマウス パッチクランプ ディープラーニング

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

咀嚼障害は様々な疾患で認められるが、ALS 患者では病期の比較的初期から咀嚼障害が認められ、ALS 患者の栄養管理に悪影響を与える。現在根本的な治療法が存在しない ALS において咀嚼障害を治療することは、ALS 患者の生存予後に直接影響すると指摘されている。ALS 患者の約 25%は最初に口腔領域の異常を訴え受診する。その後 ALS の診断に至り、病状の進行とともに多数の ALS 患者で咀嚼障害を認め、経口摂取が困難になる。そのため、ALS 患者の治療戦略において、口腔領域の異常、特に咀嚼嚥下障害に注目する必要がある。

現在、国内で認可された ALS 治療薬はリルゾールとラジカットのみで、平均寿命を 2~3 か月延ばすといわれているが、咀嚼障害は改善せず、ALS の根本的な治療薬が存在しないのが現状である。

リルゾールは Na 電流抑制剤で ALS の運動神経で認められる過剰興奮を抑制し、神経の変性を保護すると言われているが、リルゾールで運動神経の過剰興奮を治療しても ALS の根本的な解決につながらないことが報告されている (Leroy et al. *Elife*. 2014)。そのため、ALS の根本的な治療には運動ニューロンだけの治療では限界があり、一次感覚ニューロンを含めた運動サーキットに注目する必要性があると考え、本研究の着想に至った。

咀嚼運動は、咀嚼筋、運動ニューロン、一次感覚ニューロンの三者で咀嚼運動サーキットを形成するが、一次感覚ニューロンは運動ニューロンを制御し、咀嚼運動をコントロールすると報告されている (Komuro et al. *J Neurophysiology* 2001)。

ALS 発症前の乳幼児期 ALS モデルマウス (SOD1-G93A) では、すでに運動ニューロンが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どのような変化が起こっているのかについての報告は現在までなかった。先行研究で乳幼児期 ALS モデルマウスにおいて、一次感覚ニューロンでは興奮の過剰抑制と不規則な発火活動が起こっており、この発火異常は Na 電流の減少が原因であることを明らかにした (Seki et al. *J Neuroscience* 2019)。さらにコンピュータ上で形成した人工的な Na 電流を乳幼児期 ALS モデルマウスの一次感覚ニューロンに直接加えることで、発火異常が治療可能であることを証明した (Seki et al. *J Neuroscience* 2019)。免疫組織学的検討では、Na 電流を形成するイオンチャネル Nav1.6 のタンパク発現が乳幼児期 ALS モデルマウスの一次感覚ニューロンで低下していることを確認した (Seki et al. *J Neuroscience* 2019)。これらのことから、一次感覚ニューロンを Na 電流促進剤で治療することで、ALS 咀嚼障害の治療が可能になるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、全身性の疾患である ALS について、咀嚼障害の解明と治療に焦点を絞り、Na 電流促進剤を用いて一次感覚ニューロンの治療を行うことで、ALS の咀嚼障害を治療することが可能か検討することにある。予備実験において、ALS 発症後の成獣モデルマウスでは、運動ニューロン、一次感覚ニューロンともに不可逆的な状態まで変性が進んでいた。そのため本研究では、ALS 発症前の若齢 ALS モデルマウスを対象とした。乳幼児期 ALS モデルマウスの一次感覚ニューロンの発火異常を、Na 電流促進剤で補正し、ニューロンレベルでの治療効果が確認できた Na 電流促進剤を、ALS 発症前の若齢 ALS モデルマウスの脳室内に投与することで、実際に咀嚼障害が治療できるのか行動研究へ発展させる。

咀嚼障害の検出と治療効果の判定には Deep learning (以下 DL) による行動観察学習モデルを用いた、咀嚼障害鑑別 AI (Artificial Intelligence; AI) を開発、使用する。研究者の観察力、観察時間では限界があったが、ALS モデルマウスの咀嚼障害鑑別 AI を開発、使用

することで、ALS 発症前の若齢 ALS モデルマウスの咀嚼異常を早期に検出することが可能になる。さらに Na 電流促進剤の脳室内投与による、咀嚼障害の治療効果判定についても開発した咀嚼障害鑑別 AI を使用する。

一次感覚ニューロンを治療することで、ALS の咀嚼障害が治療可能となれば、ALS 患者の栄養を改善し生存期間を延長するのみならず、ALS の骨格筋の運動障害においても、一次感覚ニューロンに注目した画期的な治療戦略が生まれる可能性がある。パッチクランプ法を用いた電気生理学検討と AI を用いた行動学的検討を癒合させることで、ALS の咀嚼障害を改善し、これまで困難を極めた ALS 治療に新たな一步を踏み出せると考えた。

### 3 . 研究の方法

ALS モデルマウス (SOD1-G93A)を用いて、一次感覚ニューロンを Na 電流促進剤で治療することで、ALS の咀嚼障害が治療可能であるのか、パッチクランプ法を用いた電気生理学的な検証と AI を用いた行動学的検討を行う。

#### . Na 電流促進剤による一次感覚ニューロンの治療効果の検討

乳幼児期 ALS モデルマウスの一次感覚ニューロンで見られた不規則発火活動が、Na 電流促進剤 (ベラトリジン、ATX-) の灌流投与もしくは、細胞内投与によって規則化するのか、300 $\mu$ m 脳幹スライスを用いたパッチクランプ法で一次感覚ニューロンより記録、確認する。

#### . 一次感覚ニューロンの治療に伴う運動ニューロンの治療効果の検討

一次感覚ニューロンの不規則発火を治療することで、運動ニューロンの過剰興奮が改善するのか、上記脳幹スライスを用いたパッチクランプ法で運動ニューロンより記録、確認する。

#### . ALS モデルマウスの咀嚼障害鑑別 AI を開発

乳幼児期から成獣にかけて、ALS モデルマウスの咀嚼行動をビデオカメラで撮影、記録した大量の動画を DL にて解析、学習モデルを作成する。それより ALS モデルマウスと野生型マウスの間で、どの日齢でどのように咀嚼行動に差異が生まれるのか、ALS モデルマウスの診断支援に用いるための咀嚼障害鑑別 AI を開発する。

#### . 咀嚼障害鑑別 AI を用いた、ALS モデルマウスの咀嚼障害治療効果の検討

電気生理学的手法で有効であった Na 電流促進剤を、ALS 発症前の若齢 ALS モデルマウスの脳室内へ投与、咀嚼障害が治療可能なのか、開発した咀嚼障害鑑別 AI にて判定を行う。

### 4 . 研究成果

本研究では ALS モデルマウスの摂食行動の動画より人工知能 (AI) を用いて、ALS モデルマウスの咀嚼障害を自動検出する AI モデルの開発を行った。ALS モデルマウスの咀嚼行動をビデオカメラで撮影、撮影した動画を SSD (Single Shot MultiBox Detector) を用いて咀嚼サイクルを自動検出し、野生型マウスの咀嚼サイクルと比較検討したところ、ALS モデルマウスでは野生型マウスと比較し、12 週齢頃より咀嚼サイクルが有意に延長することがわかった。

現在、咀嚼障害出現時の ALS モデルマウスにおける一次感覚神経の発火異常を検出、ALS の咀嚼障害の治療に有益な治療法の考案を検討している。

本研究の成果は ALS の咀嚼障害の治療に限らず、咀嚼障害鑑別 AI を用いた ALS 患者のスクリーニング検査という点においても、臨床応用が早期に可能になる可能性を持っている。ALS の咀嚼障害メカニズムが解明、予防治療法が発見されれば、ALS 患者の栄養を改善し生存期間を延長するのみならず、ALS の骨格筋の運動障害にも応用できる可能性があるため、ALS の治療戦略として、咀嚼障害の解明は大変重要である。

当初検討していた Na 電流促進剤 (ベラトリジン、ATX-) の灌流投与では一次感覚ニュー

ーロンの発火を安定させることはできなかった。今後より効果的な薬剤の検討が必要であり、電気生理学的な有効性を認めれば、自動検出 AI モデルを使い、咀嚼障害への有効性を確認する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Soju Seki, Akira Nozoe, Takuya Shimooka, Kazuaki Miyagawa, Takayuki Hara, Kazuma Harada, Emiko Tanaka Isomura, Susumu Tanaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Dentigerous cyst excision using shading films in a patient with erythropoietic protoporphyria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2021.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 原 崇之, 石濱 孝二, 外川 健司, 関 壮樹, 田中 徳昭, 古郷 幹彦	4. 巻 67
2. 論文標題 舌下腺および口底粘膜下組織に発生した限局性結節性アミロイドーシスの1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 620-625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5794/jjoms.67.620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saori Yamada, Susumu Tanaka, Soju Seki, Mikihiro Kogo	4. 巻 63
2. 論文標題 Membrane excitabilities in neonatal rat mesencephalic trigeminal neurons under dietary zinc deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 242-246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnurd.20-0566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Soju Seki, Susumu Tanaka, Takayuki Hara, Nao Nishimura, Kaori Oya, Toshihiro Uchihashi, Shinichiro Hiraoka, Munehiro Hamaguchi, Mikihiro Kogo	4. 巻 33
2. 論文標題 A case of sclerosing odontogenic carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 592-598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2021.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Susumu Tanaka, Soju Seki, Yudai Ono, Akifumi Enomoto, Mikihiro Kogo	4. 巻 753
2. 論文標題 Persistent sodium conductance contributes to orexin-A-mediated modulation of membrane excitability in neonatal rat mesencephalic V neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2021.135846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuma Harada, Susumu Tanaka, Kaori Oya, Toshihiro Uchihashi, Yusuke Yokota, Soju Seki, Yohei Fujishita, Mikihiro Kogo	4. 巻 32
2. 論文標題 Multiple canalicular adenomas arising in the buccal mucosa and upper lip: Case report and literature review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 525-528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2020.07.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Susumu Tanaka, Masataka Higuchi, Soju Seki, Akifumi Enomoto, Mikihiro Kogo	4. 巻 23
2. 論文標題 Orexins modulate membrane excitability in rat trigeminal motoneurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 265-270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.19-0141.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Soju Seki, Susumu Tanaka, Saori Yamada, Tadataka Tsuji, Akifumi Enomoto, Yudai Ono, Scott H Chandler, Mikihiro Kogo	4. 巻 98
2. 論文標題 Neuropeptide Y modulates membrane excitability in neonatal rat mesencephalic V neurons.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 921 - 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.24583.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Soju Seki, Toru Yamamoto, Kiara Quinn, Igor Spigelman, Antonios Pantazis, Riccardo Olcese, Martina Wiedau-Pazos, Scott Chandler, Sharmila Venugopal	4. 巻 39
2. 論文標題 Circuit-Specific Early Impairment of Proprioceptive Sensory Neurons in the SOD1G93A Mouse Model for ALS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8798-8815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1214-19.2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Seki Soju, Tanaka Susumu, Yamada Saori, Tsuji Tadataka, Enomoto Akifumi, Ono Yudai, Chandler Scott H., Kogo Mikihiro	4. 巻 98
2. 論文標題 Neuropeptide Y modulates membrane excitability in neonatal rat mesencephalic V neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 921 ~ 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.24583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Susumu, Higuchi Masataka, Seki Soju, Enomoto Akifumi, Kogo Mikihiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Orexins modulate membrane excitability in rat trigeminal motoneurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 0141 ~ 0141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.19-0141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Seki Soju, Yamamoto Toru, Quinn Kiara, Spigelman Igor, Pantazis Antonios, Olcese Riccardo, Wiedau-Pazos Martina, Chandler Scott H., Venugopal Sharmila	4. 巻 39
2. 論文標題 Circuit-Specific Early Impairment of Proprioceptive Sensory Neurons in the SOD1G93A Mouse Model for ALS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8798 ~ 8815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1214-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関 壮樹, 田中 晋, 山田 早織, 石井 庄一郎, 古郷 幹彦
2. 発表標題 摂食関連神経ペプチドによる三叉神経中脳路核ニューロン周波数応答特性の神経修飾作用
3. 学会等名 口腔顔面神経機能学会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関 壮樹, 西村, 奈穂, 平岡, 慎一郎, 田中 晋, 福田, 康夫, 笹平, 智則, 竹田, 雅司, 古郷, 幹彦, 濱口 裕弘
2. 発表標題 硬化性歯原性癌の1例
3. 学会等名 日本口腔外科学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北岡 好大, 関 壮樹, 平岡 慎一郎, 田中 晋, 古郷 幹彦
2. 発表標題 モデルマウスを用いたALS咀嚼障害の解明
3. 学会等名 日本口腔外科学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野添 彬, 関 壮樹, 下岡 拓也, 小田 紗矢香, 原 崇之, 北川 太二, 田中 晋, 磯村 恵美子, 古郷幹彦
2. 発表標題 遮光板を用いて含菌性嚢胞の摘出を行った骨髄性プロトポルフィリン症の1例
3. 学会等名 日本口腔外科学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関 壮樹
2. 発表標題 摂食促進ペプチドNeuropeptide Yによる三叉神経中脳路核ニューロンのバースト活動促進に関わる発生機序の検討
3. 学会等名 日本口腔科学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田 計眞, 相川 友直, 新宅 優子, 村田 有香, 中津川 昂平, 黒坂 寛, 山本 沙優里, 関 壮樹, 山田 早織, 山城 隆, 古郷 幹彦
2. 発表標題 下顎正中骨延長術の治療バリエーション
3. 学会等名 日本顎変形症学会雑誌2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相川 友直, 新宅 優子, 原田 計眞, 関 壮樹, 山田 早織, 藤下 陽平, 石原 康貴, 古郷 幹彦
2. 発表標題 顎関節形成術におけるマイテックアンカースクリューの応用
3. 学会等名 日本顎変形症学会雑誌2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関 壮樹, 新宅 優子, 相川 友直, 原田 計眞, 山田 早織, 古郷 幹彦
2. 発表標題 骨格性II級顎矯正手術の術後安定性の検討
3. 学会等名 日本顎変形症学会雑誌2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関 壮樹 田中 晋 山田 早織 Scott Chandler Sharmila Venugopal 古郷 幹彦
2. 発表標題 ALS 咀嚼障害における 一次感覚ニューロンの解明と治療戦略
3. 学会等名 第64回 口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関 壮樹 田中 晋 山田 早織 古郷 幹彦
2. 発表標題 摂食促進ペプチドNeuropeptide Yによる三叉神経中脳路核ニューロンのバースト活動促進に関わる発生機序の検討
3. 学会等名 第74回 口腔科学会 学術大会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------