

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659913

研究課題名(和文) 時期・組織特異的ノックアウトマウスを用いた咀嚼中枢・摂食中枢形成障害の機序解明

研究課題名(英文) Investigation into the mechanism in the development of disorder of masticatory and swallowing centers using time and brain-specific conditional knockout mice

研究代表者

吉田 教明 (YOSHIDA, Noriaki)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40230750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：咀嚼・摂食機能障害の病因を解明することを目的として、神経伝達の異常を発現する遺伝子改変マウスを対象とし、咀嚼・嚥下時の顎運動および関連筋群筋活動を解析した。その結果、咀嚼・嚥下のセントラル・パターン・ジェネレータ(CPG)の形成に異常をきたし、CPGを起点として、顎・口腔領域の感覚受容器が食物の性状を検知し、その性状に見合った適切な咀嚼筋活動の調節を行うフィードバック機構に障害をもたらすことが示唆された。神経伝達物質の咀嚼・嚥下運動制御の役割を解明することにより、摂食機能障害の治療に有用な薬物療法の開発につながるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the etiology of masticatory or feeding disorders, jaw-movement trajectories and the relevant muscles' activities during mastication and swallowing were recorded in mice expressing disorder of neural transmission. As a result, it was suggested that the central masticatory or swallowing pattern generator was impaired, and then sensory feed-back system, which modulates the relevant muscles' activities depending on the food consistency. The investigation into the role of neural transmitter in regulatory mechanism of masticatory and swallowing system would lead to the development of chemotherapy for masticatory or feeding disorders.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：顎運動 筋電図 咀嚼機能 嚥下機能 顎口腔機能 咀嚼中枢

1. 研究開始当初の背景

現代において、咀嚼・嚥下運動における障害様症状を有する児童が増加傾向にあるとの報告がある。中枢神経機構と咀嚼・嚥下機能の発達には密接な関係があることが示唆されているが、いまだ厳密な意味での科学的エビデンスに裏付けされているとはいえ、成長発達期における顎口腔機能獲得のメカニズムについての研究が注目されている。一方、加齢や脳神経疾患に付随する摂食・嚥下障害が急増していることも周知の事実である。

われわれは、これまで食品の軟食化と正常機能獲得との関係に注目し、軟食化モデルとして離乳後に液状飼料飼育したマウスの咀嚼機能変化を解析し、軟食化が咀嚼機能の発達を妨げるという仮説を検証した。さらに咀嚼・嚥下機能の発達と障害の過程を詳細に解析し、また摂食障害の原因因子を特定するために、遺伝子改変マウスを用いて、時限的に咀嚼中枢あるいは摂食中枢に限定して障害を起こさせることで、咀嚼中枢形成障害ならびに摂食中枢形成障害の発症機序を解明することが必要である。

2. 研究の目的

咀嚼ならびに摂食・嚥下機能は生命維持に最も重要な役割を果たすと同時に、人が人として豊かに生きるために不可欠な機能であるが、その神経機構の複雑さゆえに制御システムの解明には困難を伴う。本研究では、任意の時期に咀嚼中枢・摂食中枢に限定して、障害を生じさせる時期・組織特異的ノックアウトマウスを作製し、これを咀嚼中枢・摂食中枢異常モデルとする。本モデルを対象として、咀嚼・嚥下運動の多元的機能解析を行い、咀嚼中枢・摂食中枢の形成機構あるいは病態発症のメカニズムを明らかにし、咀嚼・嚥下機能障害、摂食障害の診断、予防、治療法の開発に向けた統合的研究を行うことを目的

とする。

3. 研究の方法

(1) 当初、CreER/loxP system による咀嚼中枢・摂食中枢コンディショナルノックアウトマウスの作製することを計画したが、予算、期間の両面で制限があったことから、条件なしの通常のノックアウトマウスを用いた。

(2) 全身麻酔下で、下顎運動記録装置と筋電図用電極を取り付ける。磁気センサとして、小型のホール素子を用い、4つのセンサからなるユニットを鼻骨に取り付ける。一方、標点となる磁石を下顎骨上の顎二腹筋前腹起始部に取り付け、下顎骨上の一点3次元運動記録(開閉・左右・前後)が可能となる。

(3) 筋電図を記録するために、一对の銀線電極を直視下にて、両側の咬筋、側頭筋および顎二腹筋に挿入する。筋電図用電極は、皮下を通して頭頂部に取り付けたコネクタに接続する。

(4) 実験動物用3DマイクロCT(R_mCT:リガク社製)の透視モードイメージングにより、嚥下造影を行う。全行程のビデオ・レントゲン撮影を行うことにより、咀嚼・嚥下時の食塊、舌、咽頭、喉頭の運動を同時に可視化する。上記手法を組み合わせることにより、咀嚼から嚥下にいたるシーケンスにおいて、小動物を対象に顎運動と舌運動を同時に記録する(多元的機能解析)。

各計測データは、健常マウスを対象に採得した正常な機能発達による変化をコントロールとし、2週齢、4週齢、6週齢、8週齢、10週齢での健常マウスと咀嚼中枢・摂食中枢異常モデルマウスの機能発達変化を評価する。

4. 研究成果

(1) 摂食機能障害発症の機序解明について、遺伝子改変マウスを対象に、顎機能解析を用いて検討した。興奮性、抑制性神経伝達の障

害が起こることを特徴とするマウスを咀嚼中枢障害モデルマウスとし、顎口腔機能解析を行った。自由運動下において、咀嚼時の顎運動、嚥下運動を計測した結果、基本的な運動パターンは健常マウスと比較して、咀嚼・嚥下リズムが不安定で、咀嚼・嚥下時の顎運動経路にも再現性がみられなかった。嚥下時の顎舌協調運動においても、健常マウスと比べて、関連筋の活動のタイミングに大きなバラツキがみられた。また、咀嚼飼料の性状変化に対する筋活動あるいは咬合力の調節機構が十分に働いていない可能性が示唆された。

この結果、咀嚼・嚥下のセントラル・パターン・ジェネレータ（CPG）の形成に異常をきたし、CPGを起点として、顎・口腔領域の感覚受容器が食物の性状を検知し、その性状に見合った適切な咀嚼筋活動の調節を行うフィードバック機構に障害をもたらしたことが示唆された。咀嚼において、口腔領域の感覚受容器からの情報は三叉神経中脳路核にインプットされるが、このニューロンには、様々な神経情報伝達を担う受容体が多く発現しており、咀嚼機能の調節に何らかの役割を果たしていると考えられた。

(2) 咀嚼・嚥下機能の臨界期（critical period）について、7週齢以降で、下顎運動時における咀嚼系路の安定性、すなわち変動係数が固形飼料飼育群と比較し、液状飼料飼育群で有意に大きかった。また、液状飼料で飼育する実験群に対し、液状飼料飼育終了後に固形飼料に切り替えた場合に、咀嚼・嚥下機能の回復（catch-up）がどの程度なされるか、顎運動の安定性の変化、変動係数の変化などを調べた結果、固形飼料飼育群と比較し、咀嚼系路の変動係数は、わずかに正常値に歩み寄ったが、100%の回復傾向はみられなかった。

生後特に離乳期以降の数週間、咀嚼機能の学習にとってきわめて重要な時期であり、

機能発育および発達の最適、決定的な時期といわれる臨界期は、7週齢以降に存在することが示唆された。逆に、この時期に噛み応えのある食べ物を与えられなければ、機能獲得のための最適な時期を逃し、後に摂食機能・嚥下機能にも大きな障害を残す原因となることも考えられた。そうした場合に、機能のキャッチアップのため、相当な訓練が必要となるか、あるいはキャッチアップ自体が不可能となることが示唆された。

(3) 咀嚼・嚥下運動制御の神経機構における神経伝達物質の放出制御や受容体機能に異常が生じると、円滑な咀嚼・嚥下の遂行に必要な筋活動の協調性が乱され、運動障害が引き起こされると考えられた。種々の化学伝達物質を介した情報伝達機序が咀嚼・顎口腔領域の運動調節に重要な役割を果たすことが示唆された。

(4) 本研究で用いた遺伝子改変マウスは、ターゲット遺伝子を全て欠損させると、致死性機能不全となるため、ヘテロ型のマウスを用いざるを得なかった。したがって、顎・口腔領域における運動異常の表現型がやや弱く、健常マウスとの有意差のない解析パラメータも少なからずあった。本来の目的は、時期特異的ノックアウトマウスを作製することで、成長終了後、機能発達の臨界期以降においても、任意の時期にタモキシフェンを投与することにより、CreERを活性化させ、時期特異的にターゲット遺伝子をノックアウトすることであったが、研究期間内に完遂することができなかった。今後、時期特異的ノックアウトマウスを用いることで、時系列での顎口腔機能解析を可能とし、咀嚼・嚥下機能の発達と障害の機序、臨界期の特定、摂食機能障害の病因、病態の解明とその治療戦略について研究を進めていきたい。

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 13 件)

Nakano T, Hotokezaka H, Hashimoto M, Sirisoontorn I, Arita K, Kurohama T, Darendeliler MA, Yoshida N. Effects of different types of tooth movement and force magnitudes on the amount of tooth movement and root resorption in rats. *Angle Orthod* 査読有り 2014 (in press)

Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Sato F, Haque T, Yoshida A, Inoue T. Electrophysiological and morphological properties of rat supratrigeminal premotor neurons targeting the trigeminal motor nucleus. *J Neurophysiol*. 査読有り 2014, 111(9):1770-82.

Tominaga J, Ozaki H, Chiang P-C, Sumi M, Tanaka M, Koga Y, Bourauel C, Yoshida N. Effect of bracket slot and archwire dimensions on anterior teeth movement during space closure in sliding mechanics: A three-dimensional finite element study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 査読有り, 2014 (in press)

Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Rokutanda S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Asahina I, Komori T. Bcl2 deficiency activates FoxO through Akt inactivation and accelerates osteoblast differentiation. *PLoS One*, 査読有り, 9(1):e86629.

doi:10.1371/journal.pone.0086629.
eCollection 2014.

Nakamura A, L. Zeredo J, Utsumi D, Fujishita A, Koga Y and Yoshida N. Influence of malocclusion on the development of masticatory function and mandibular growth. *Angle Orthod* 83(5), 査読有り, 2013, 749-757.

Hashimoto M, Hotokezaka H, Sirisoontorn I,

Nakano T, Arita K, Tanaka M, Yoshida N. The effect of bone morphometric changes on orthodontic tooth movement in an osteoporotic animal model. *Angle Orthod*, 査読有り, 83(5), 2013, 766-773.

Ihara Y, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Takahashi K, Inoue T. Coordination of NMDA-induced rhythmic activity in the trigeminal and hypoglossal nerves of neonatal mice in vitro. *Neurosci Res*, 査読有り, 75(2), 2013, 138-49.

Okayasu I, Yoshida N, Oi K. Effects of chewing efforts on the sensory and pain thresholds in human facial skin: A pilot study. *Arch Oral Biol*, 査読有り, 57(9), 2012, 1251-5.

Nonaka M, Nishimura A, Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Iijima T, Inoue T. Convergent pre-motoneuronal inputs to single trigeminal motoneurons. *J Dent Res*, 査読有り, 2012, 91(9), 888-93.

Yoshimatsu M, Kitaura H, Yoshida N (他 4 名、7 番目): Inhibitory effects of IL-12 on experimental tooth movement and root resorption in mice. *Arch Oral Biol*, 査読有り, 2012, 57(1), 36-43.

Sirisoontorn I, Hotokezaka H, Yoshida N (他 4 名、2 番目): Orthodontic tooth movement and root resorption in ovariectomized rats treated by systemic administration of zoledronic acid. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 査読有り, 2012, 141(5), 563-573.

Hayashi B, Inoue T (他 3 名、5 番目) A possible synaptic configuration underlying coeruleospinal inhibition of visceral nociceptive transmission in the rat. *Neurol Sci*, 査読有り, 2012, 33(2):463-8.

Kohara H, Kitaura H, Yoshida N (他 4 名、7 番目): Inhibitory effect of interferon- γ on

experimental tooth movement in mice. J Interferon Cytokine Res, 査読有り, 2012, 32(9):426-31.

〔学会発表〕(計 6 件)

Nakamura A, Utsumi D, Fujishita A, Koga Y, Yoshida N. Does malocclusion affect masticatory function development and mandibular growth? 2nd Meeting of the International Association of Dental Research-Asia Pacific Region (IADR-APR), 21-23 August 2013, Bangkok, Thailand

Fujishita A, Nakamura A, Utsumi D, Tanaka M, Koga Y, Yoshida N. Experimental investigation into development and catch-up of masticatory function, 2nd Meeting of the International Association of Dental Research-Asia Pacific Region (IADR-APR), 21-23 August 2013, Bangkok, Thailand

藤下あゆみ, 中村 文, 内海 大, 田中基大, 古賀義之, 吉田教明. 咀嚼機能の発達過程において臨界期は存在するか?, 第 72 回日本矯正歯科学会大会, 2013 年 10 月 7~9 日, 松本

藤下あゆみ, 中村文, 内海大, 田中基大, 古賀義之, 吉田教明. 軟食化モデルマウスにおける咀嚼機能発達とキャッチアップに関する実験的研究, 第 50 回日本顎口腔機能学会学術大会, 2013 年 4 月 20~21 日, 東京

Yoshida N, Nakamura A, Utsumi D, Fujishita A, Koga Y. Influence of Malocclusion on Masticatory Function and Mandibular Growth, 90th IADR/LAR general session, June 20-23, 2012, Iguassu falls Brazil

中村 文, 藤下あゆみ, 内海 大, 田中基大, 古賀義之, 吉田教明. 成長期の不正咬合が顎口腔領域における形態成長と機能発達に及ぼす影響について, 第 71

回日本矯正歯科学会大会, 2012 年 9 月 26~28 日, 盛岡

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 教明 (YOSHIDA NORIAKI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 40230750

(2) 研究分担者

古賀 義之 (KOGA YOSHIYUKI)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 50175329

内海 大 (UTSUMI DAI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 80622604

井上 富雄 (INOUE TOMIO)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号: 70184760

(3) 連携研究者

小守 壽文 (KOMORI TOSHIHISA)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 00252677