

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11482

研究課題名(和文)咬合不全が高次脳機能低下を招く神経機構の解明：三叉神経中脳路核周囲の回路網の解析

研究課題名(英文) Mechanisms inducing cognitive dysfunction following occlusion/mastication disorder: Analyses of neural circuits around mesencephalic trigeminal nucleus

研究代表者

齋藤 充 (Saito, Mitsuru)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：50347770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病菌への感染がアルツハイマー病とそれによる認知症の発症の危険因子であることを示す報告が為されて来ている。一方で、歯周病菌への感染の有無に関わらず咬合・咀嚼の不全が認知機能の低下を惹き起こすことが多くの疫学研究によって示唆されている。咬合・咀嚼不全が生じると閉口筋紡錘や歯根膜機械受容器を支配する三叉神経中脳路核(MTN)ニューロンの活動低下や死滅を惹き起こす。本研究ではMTNの障害が認知機能の低下を招く機構について解析した。その結果、MTNの障害はMTNに近接する青斑核ニューロンの機能低下や死滅を招くが、それはMTNと青斑核のニューロン間の接合を介するものではないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療の発達により平均寿命が延長している中、高齢者における認知症発症が重大な問題となっており、その抑制が医学が果たすべき重大な使命のひとつとなっている。歯周病菌への感染がアルツハイマー病とそれによる認知症の発症の危険因子であることを示す報告は数多くある。一方で、歯周病への感染が無くとも、多数歯の脱落等によって食物を十分に咀嚼しない状態が継続すると、閉口筋紡錘や歯根膜機械受容器を支配している三叉神経中脳路核ニューロンが障害され、更にそれが青斑核ニューロンの異常に繋がることで、学習・記憶等の認知機能の低下を惹き起こすことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Many studies indicate that the infection of periodontal disease-causing bacteria is a risk factor of Alzheimer disease and dementia, while a lot of epidemiological studies suggest that mastication disorder could induce cognitive dysfunction regardless of the presence or absence of periodontal disease. The mastication disorder causes activity decline and/or death of the neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus (MTN) innervating jaw-closer muscle spindles and periodontal mechanoreceptors. In this study, we investigated the mechanisms inducing the cognitive dysfunction following the impairment of the MTN. It is suggested that the MTN impairment leads to activity decline and/or death of the neurons of the locus coeruleus which locates near the MTN, and that this is not mediated by the synaptic connections between the neurons of the two nuclei.

研究分野：口腔生理学・神経生理学

キーワード：認知症 咀嚼障害 三叉神経中脳路核 青斑核 閉口筋紡錘 歯根膜機械受容器 神経栄養因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1992年、世界保健機構とアメリカ国立老化研究所は、世界的な大規模疫学調査の結果を基に「多数歯欠損は老年性アルツハイマー病発症の危険因子である」と発表した。それ以前にも、歯の動揺や欠損による咬合・咀嚼不全を有する者は、学習・記憶等の高次脳機能の低下を患うリスクが高いという考えが長年に亘り多くの臨床家に支持されてきた。しかし依然として、その神経機構については不明である。

老齢ラットにおいて歯冠切除や粉餌飼育を行なうと、学習・記憶機能に重要な大脳皮質・海馬等へ軸索を送る前脳基底部コリン作動性ニューロンの細胞死が引き起こされる(Terasawa et al. 2002)。前脳基底部コリン作動性ニューロンの細胞死による大脳皮質・海馬等へのコリン作動性出力の減少が、当該部位の正常な活動を乱すことで、学習・記憶機能の低下を招くであろうことは想像に難くない。しかし、咬合・咀嚼状態の変化、具体的には恐らく歯根膜機械受容器や閉口筋筋紡錘に由来する感覚情報の減弱が、何故前脳基底部コリン作動性ニューロンの細胞死をもたらすかについては全く判っていなかった。

そんな中、2011年に Fuller et al.は、互いに隣接する結合腕傍核内側部及び青斑核が、前脳基底部へグルタミン作動性出力を送り、脳の覚醒レベルの上昇と脳波の脱同期化に中心的な役割を果たし、上行性脳賦活系の中軸を成していることを報告した。そして、歯根膜機械受容器及び閉口筋筋紡錘を支配し、咬合・咀嚼運動の制御において中心的な役割を果たす三叉神経中脳路核ニューロンは、固有感覚を担う一次感覚ニューロンとして唯一中枢神経内に位置し、細胞体や軸索に種々の神経伝達物質の受容体を発現しており(Lazarov 2000)、ラットやヒトの脳幹(Nieuwenhuys et al. 1991)において結合腕傍核内側部や青斑核と互いに隣接している。

以上の報告を合わせて鑑みると、歯の動揺や喪失により歯根膜機械受容器や閉口筋筋紡錘に由来する感覚情報が減弱し三叉神経中脳路核ニューロンの活動が低下することで、結合腕傍核内側部や青斑核のニューロンの活動にも変調が生じ、投射先の前脳基底部コリン作動性ニューロンに対して過興奮等による細胞死を惹起することが想定される[前脳基底部コリン作動性ニューロンは superoxide dismutase mRNA レベルが低く、酸化ストレスに対し脆弱であることが知られている(Kent et al. 1999)]。この仮説の妥当性を検討するため、先ず本研究において、組織学的・電気生理学的手法を用い脳幹における三叉神経中脳路核～結合腕傍核内側部・青斑核ニューロン間の形態・機能的関係の解析を試みる。我々が知る限り、関連する所見として現時点では、青斑核のアドレナリン作動性ニューロンが三叉神経中脳路核ニューロンにシナプスを形成しており(Takahashi et al. 2010)、その入力により三叉神経中脳路核ニューロンのh電流が抑制されること(我々による予備実験)が報告されているのみである。

### 2. 研究の目的

ラット及びマウスにおいて、大別して、三叉神経中脳路核・結合腕傍核内側部・青斑核ニューロン同士の(A)形態学的関係と(B)機能的関係を解明する。

(A)形態学的関係:三つの神経核のニューロンを免疫組織学的に多重染色し、細胞体・樹状突起・軸索及び神経終末の相互関係を解析する。必要に応じ、標本全体の一括染色か遺伝子改変 *Sindbis* バイラルベクターを用いた一細胞染色[研究分担者である倉本恵梨子助教らのグループが開発した手法]を使い分ける。シナプス形成の可能性が見出された場合は免疫電子顕微鏡法で詳細に検証する。これらの解析の結果を基に、相互のニューロン間におけるシナプス接続の有無や、容量性伝達の可能性の存否、神経伝達物質の種類を検討する。本解析で得た所見は、続く(B)機能的関係の解析の実施にあたり重要な基礎資料となる。

(B)機能的関係:(A)の形態学的関係の所見に基づき、相互のニューロン間に生じうる作用、具体的にはシナプス伝達・容量性伝達の有無と、その影響について電気生理学的に詳細に解析する。三叉神経中脳路核から結合腕傍核内側部或いは青斑核への伝達だけでなく、逆方向のものも解析する。脳幹薄切標本における全細胞パッチクランプ記録法(電流固定法/電位固定法;1細胞記録/2細胞同時記録)を用いる。3以上の細胞や神経回路全体での観察が必要となった場合は、カルシウムイメージング法・光学的膜電位測定法を行なう。

神経伝達物質、受容体、及び、伝達により修飾を受ける電流系とその影響について明らかにし、必要に応じて細胞内情報伝達系の解析を加える。例えば、我々は予備実験において、単一の青斑核アドレナリン作動性ニューロンの活性化(活動電位の発生)により、電気的シナプス(ギャップ結合チャネル)で結合している青斑核ニューロン群が同期興奮してアドレナリンを大量に分泌し、これが三叉神経中脳路核ニューロン上の  $2A$  受容体に結合することで三叉神経中脳路核ニューロン上のHCNチャネル電流(h電流)が抑制されることを見出した。三叉神経中脳路核ニューロンにおいて同電流が抑制されると、静止膜電位の過分極シフト及びグルタミン酸作動性(AMPA受容体媒介性)入力の脱抑制が生じる(投稿準備中)。

以上の所見を基に、歯根膜機械受容器・閉口筋筋紡錘に由来する感覚入力の減弱が、三つの神経核のニューロンの活動にどの様に影響するかを検討し、結果として前脳基底部への出力の変動を招き得るかを考察する。

### 3. 研究の方法

三叉神経中脳路核・結合腕傍核内側部・青斑核のニューロン間の形態学的関係の解析を先行して行い、その結果に基づいて機能的関係の解析を進める。電気生理学的記録(パッチクランプ記録法)・カルシウムイメージング法・光学的膜電位測光を用いた実験は齋藤が、免疫染色・神経標識等の形態学的解析については倉本及び倉本の指導を受けた齋藤が行なう。また、研究計画全体についての助言を姜(大阪大学名誉教授)に乞う。

#### (1) 三叉神経中脳路核・結合腕傍核内側部・青斑核のニューロン間の形態学的関係の解析

標本全体を一括して染色する方法に加え、必要に応じて、倉本らのグループが開発した遺伝子改変 *Sindbis* ウイルスベクター (SVV) 法を用い、単一 (乃至数個の) 細胞の詳細な形態学的解析を行なう。従来の BDA や PHA-L といった神経トレーサーは、極少数の細胞だけを標識しようとして注入量を減らすと、それに比例して標識が弱くなり、軸索末端まで完全に標識できないという問題がある。一方 SVV は、一つのウイルス粒子の感染が成立すれば、感染した細胞内においてウイルスが標識物質 (膜移行性シグナル付き GFP) を大量産生するため、単一ニューロンを完全に可視化できるという利点がある [図2]。膜移行性シグナルにより、GFP は翻訳直後に脂質修飾 (palmitoyl 基の付加) を受け、細胞膜直下に局在する。その結果、細胞は Golgi 染色様に微細構造にわたるまで明瞭に可視化される。

予備実験で、この SVV を三叉神経脊髄路核に注入したところ、単一のニューロンが感染し、発現した GFP の蛍光により細胞体と樹状突起がはっきりと観察できた。抗 GFP 抗体を用いて DAB 染色を行うと、軸索も細部まで明瞭に観察できた。

本研究では、歯根膜機械受容器或いは閉口筋筋紡錘を支配する三叉神経中脳路核ニューロンを標識するため、麻酔下でラット閉口筋 (咬筋・側頭筋) が歯周組織に dextran-conjugated tetramethylrhodamine (TMR) を注入する。次に、ラットを脳定位固定装置に取り付け、結合腕傍核内側部や青斑核へウイルス液を充填した微小ガラス針を刺入し、空気圧によりウイルス液を少量ずつ注入する。注入から約 48 時間後に動物を灌流固定する。固定脳を蔗糖液に浸漬し凍結保護した後、厚さ 50  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製する。そして、TMR で標識された三叉神経中脳路核ニューロンとウイルス感染し GFP を発現した細胞の形態学的関係を観察する。対照染色 (propidium iodide 等による Nissl 様蛍光染色) や、必要に応じて tyrosine hydroxylase (TH) や vesicular glutamate transporter (VGLUT) 等に対する蛍光免疫染色を行い、標識細胞の性状を同定する。ニューロンの同定が終了した後、全ての連続切片を、GFP 並びに TMR に対する抗体を用いて二次染色 (DAB 染色等) を施すことで、細胞体・樹状突起・軸索を完全に可視化し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた撮影によって標的ニューロンの三次元形態を再構築する。

青斑核ニューロンの標識については、Cre-TH マウスを利用する方法も採る。つまり tyrosine hydroxylase (TH) のプロモーター下流に Cre recombinase を発現する遺伝子組み換えマウスに対し、Cre/loxP システムを用いることで、TH 発現細胞、青斑核においてはノルアドレナリン作動性細胞にのみ蛍光蛋白を発現させるというものである。本法を用いると、蛍光観察用の装置を備えた赤外線微分干渉顕微鏡下で、脳幹薄切標本上の青斑核ニューロンを事前同定し電気生理学記録を行なえるという極めて大きな利点がある。

#### (2) 三叉神経中脳路核・結合腕傍核内側部・青斑核のニューロン間の機能的関係の解析

(1) の形態学的関係の解析の結果に基づいて、相互のニューロン間に生じるシナプス伝達・容量性伝達の有無と、その影響について電気生理学的に詳細に解析する。三叉神経中脳路核から結合腕傍核内側部或いは青斑核への伝達だけでなく、逆方向のものも解析する。脳幹薄切標本における全細胞パッチクランプ記録法 (電流固定法 / 電位固定法; 1細胞記録 / 2細胞同時記録) を用いる。3 以上の細胞や神経回路全体での観察が必要となった場合は、カルシウムイメージング法・光学的膜電位測定法を行なう。

解析対象として、神経伝達物質、受容体のサブタイプ、伝達により修飾を受ける電流系とその影響について明らかにする。生理学的な重要性が認められた場合については細胞内情報伝達系の解析を加える。予備実験で行なった解析例を以下に記す。

単一の青斑核アドレナリン作動性ニューロン (組織学的に事後確認) に対し全細胞パッチクランプを形成し、電流固定記録下で直流通電し活動電位を発生させると、電気的シナプス (ギャップ結合チャンネル) で結合している青斑核ニューロン群が同期興奮 (カルシウムイメージング法で確認) してノルアドレナリンを大量に分泌し、これが三叉神経中脳路核ニューロン上の  $\alpha_2\text{A}$  受容体に結合 (薬理的に確認) することで三叉神経中脳路核ニューロン上の HCN チャンネル電流 (h 電流) が抑制されることを見出した。三叉神経中脳路核ニューロンにおいて同電流が抑制されると、静止膜電位の過分極シフト及びグルタミン酸作動性 (AMPA 受容体媒介性) 入力脱抑制が生じる (投稿準備中)。

## 4. 研究成果

予備実験の結果から示唆されていた青斑核ニューロンから三叉神経中脳路核ニューロンへのアドレナリン作動性の投射の存在を明らかにできた (投稿準備中) が、それ以外の直接的なシナプス結合や容量性伝達について、形態学的及び機能的検索によって見出すことが出来なかった。その結果を受け、他の可能性を検討した。互いに脳内で隣接・混在している青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロン及び三叉神経中脳路核ニューロンは、発生段階において転写因子である *Onecut* ファミリー (HNF-6, OC-2, OC-3) が必須となる。*Onecut* 因子が存在しなければ、青斑核ニューロンは正常な分化や細胞移動をすることもアドレナリン分泌も得ることができず、つまり、青斑核ニューロンはその表現型を獲得・維持できない。しかし、青斑核ニューロンにおける *Onecut* 遺伝子の発現は発生の初期段階に限られ、以降は三叉神経中脳路核ニューロンが *Onecut* 因子を供給することが示唆されている (España & Clotman, 2012)。これらことから、咬合・咀嚼不全が三叉神経中脳路核の活動低下や死滅を招くことで、青斑核への同因子への供給が低下して青斑核ニューロンの異常をもたらし、それが投射先のひとつである前脳基底部コリン作動性ニューロンの障害へと繋がること示唆される。但し、同因子の欠乏が成熟動物において青斑核ニューロンの異常を生じるかどうかについては検討が必要である。一方、末梢の感覚受

容器によって生成される神経栄養因子は末梢神経細胞の生存・維持に関与していることが知られている。代表的なものとしては、侵害受容器に発現する神経成長因子(NGF)、表面感覚の機械受容器に発現する脳由来神経栄養因子(BDNF)、固有感覚受容器に発現する(NT-3)が知られており、これらの受容体は高親和性神経栄養因子受容体 Trk ファミリーのそれぞれ TrkA、TrkB、TrkC である。従って、歯根膜機械受容器と閉口筋筋紡錘を支配している三叉神経中脳路核ニューロンには TrkB 及び TrkC が発現して居り、それぞれ BDNF 及び NT-3 と結合して形成された複合体を内包化し、逆行性軸索輸送によって細胞体へと取り込むことが想定される。BDNF は青斑核ニューロンのノルアドレナリン作動性神経支配の維持(Matsunaga et al., 2004)、また、NT-3 は同ニューロンの細胞死の抑制(Arenas & Persson, 1994)にそれぞれ関与していることが知られていることから、正常な状態では三叉神経中脳路核が咀嚼・咬合の遂行によって活動することで歯根膜機械受容器と閉口筋筋紡錘からそれぞれ BDNF と NT-3 を取り込み、細胞体へと達したそれらの因子が傍分泌されることで、青斑核ニューロンの生存と機能維持に作用することが想定される。今後はこの新たな仮説を検証すべく研究を進めたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kawasaki Y, Saito M, Won J, Bae JY, Sato H, Toyoda H, Kuramoto E, Kogo M, Tanaka T, Kaneko T, Oh SB, Bae YC, Kang Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of GluR current in microvilli of sensory neurons via Na(+)-microdomain coupling among GluR, HCN channel, and Na(+)/K(+) pump	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2018.00113	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 Nishimura K, Ohta M, Saito M, Morita-Isogai Y, Sato H, Kuramoto E, Yin DX, Maeda Y, Kaneko T, Yamashiro T, Takada K, Oh SB, Toyoda H, Kang Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Electrophysiological and morphological properties of and motoneurons in the rat trigeminal motor nucleus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2018.00009	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 Okamoto K, Emura N, Sato H, Fukatsu Y, Saito M, Tanaka C, Morita Y, Nishimura K, Kuramoto E, Xu Yin D, Furutani K, Okazawa M, Kurachi Y, Kaneko T, Maeda Y, Yamashiro T, Takada K, Toyoda H, Kang Y	4. 巻 3
2. 論文標題 The possible role of TASK channels in rank-ordered recruitment of motoneurons in the dorsolateral part of the trigeminal motor nucleus	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 eNeuro	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) 10.1523/ENEURO.0138-16.2016	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 Kang Y, Sato H, Saito M, Yin DX, Park SK, Oh SB, Bae YC, Toyoda H	4. 巻 6
2. 論文標題 A role of CB1R in inducing -rhythm coordination between the gustatory and gastrointestinal insula	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 32529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep32529	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 Morita-Isogai Y, Sato H, Saito M, Kuramoto E, Yin DX, Kaneko T, Yamashiro T, Takada K, Oh SB, Toyoda H, Kang Y	4. 巻 222
2. 論文標題 A distinct functional distribution of      and      motoneurons in the rat trigeminal motor nucleus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Structure and Function	6. 最初と最後の頁 3231-3239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00429-017-1400-8	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 Kang Y, Saito M, Toyoda H	4. 巻 21
2. 論文標題 Molecular and regulatory mechanisms of desensitization and resensitization of GABA(A) receptors with a special reference to propofol/barbiturate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020563	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 八木 孝和, 齋藤 充, 後藤 哲哉, 小柳 宏太郎, 菅 真有, 宮脇 正一
2. 発表標題 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの脳内投与が顎機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八木 孝和, 倉本 恵梨子, 関 遥, 齋藤 充, 岩井 治樹, 山中 淳之, 後藤 哲哉
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスにおける三叉神経系の神経変性が咀嚼機能に与える影響
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018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
研究 分担者	倉本 恵梨子  (Kuramoto Eriko)  (60467470)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教   (17701)	
連携 研究者	姜 英男  (Kang Youngnam)  (50177755)	大阪大学・大学院人間科学研究科・名誉教授   (14401)	