

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07279

研究課題名(和文) 口腔顔面筋のパターン運動形成機構におけるコリン作動性投射の形態学的意義の解明

研究課題名(英文) Morphological study of cholinergic projections in the pattern generation mechanism for orofacial movement

研究代表者

松井 利康 (Matsui, Toshiyasu)

岡山理科大学・獣医学部・准教授

研究者番号：90531343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔顔面筋を支配する運動ニューロンは、網様体のプレモーターニューロンからコリン作動性入力を受ける。我々は、コリン作動性プレモーターニューロンが存在する延髄網様体の尾側領域に逆行性トレーサーを注入し、標識ニューロンの分布を観察した。逆行性標識ニューロンは中間網様核や小細胞性網様核、縫線核に分布していた。網様体は口腔顔面筋のパターン運動に機能しており、この結果はコリン作動性プレモーターニューロンが脳幹のパターン運動形成ネットワークと神経連絡をもつ可能性を示している。またマウス生後発生期において、口腔顔面筋支配の運動ニューロンに接するC-terminalのシナプスマーカー発現を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脳幹網様体に分布するコリン作動性プレモーターニューロンに注目し、口腔顔面筋の運動ニューロンに出力する神経連絡の解析に取り組んだ。睡眠時無呼吸症候群といった疾患は口腔顔面筋のパターン運動制御の障害に原因の一部があると考えられており、その病態理解にプレモーターニューロンの神経連絡の形態学的情報は有用な知見となる。本研究課題により、網様体のコリン作動性プレモーターニューロンが脳幹網様体、縫線核などから入力を受ける可能性が示され、運動パターン形成にコリン作動性投射も関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Orofacial motor neurons receive cholinergic inputs from premotor neurons in the brainstem reticular formation. We injected a retrograde tracer into the caudal medulla reticular formation that contains cholinergic premotor neurons and examined the distribution of tracer-labeled neurons. Retrogradely labeled neurons were distributed in the intermediate and parvicellular reticular formations and the raphe nuclei. This result provides the possibility that cholinergic premotor neurons connect to the pattern generation network in the brainstem, because the reticular formation plays a role in the pattern movement of orofacial muscles. The expression of synaptic markers was also investigated in cholinergic C-terminals on orofacial motor neurons during mouse postnatal development.

研究分野：神経解剖学

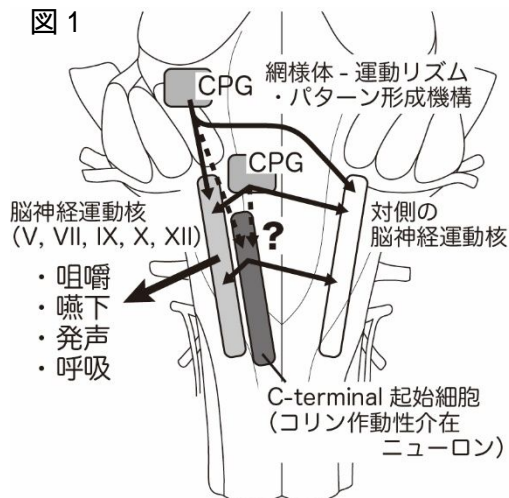
キーワード：網様体 コリン作動性ニューロン 運動ニューロン プレモーターニューロン トレーサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳幹網様体には、運動パターン(リズム)形成機構(Central Pattern Generator: CPG)が存在し、その出力を脳神経運動核に伝達することで、口腔顔面筋の協調運動を制御する(図1)。また、様々なプレモーターニューロンが網様体の広い領域に分布しており、運動ニューロンの活動を調節することで、咀嚼・嚥下・発声といった口腔顔面筋のパターン運動形成に重要な役割を担っている。しかしながら、CPGとプレモーターニューロンの神経連絡の詳細や、異なる細胞形態・神経化学的性質をもつプレモーターニューロンがどのように頭頸部のパターン運動に関与するのかが不明である。

図1



骨格筋を支配する運動ニューロンには、コリン作動性介在ニューロンに由来する大型の神経終末 C-terminal (C-bouton) が接している。C-terminal のシナプス伝達は、運動ニューロンの活動電位の後過分極を抑制し、発火頻度を増加させ、支配筋の収縮力を増強する (Miles et al., 2007)。C-terminal は脊髄前角の運動核に加えて、口腔顔面筋を支配する舌下神経核、疑核、顔面神経核、三叉神経運動核といった脳神経運動核にも存在する。脳幹網様体は腹内側部を占める大細胞性網様体と、背外側部を占める小細胞性網様体からなるが、コリン作動性介在ニューロンは大細胞性網様体の外側領域(中間網様核)に多く分布する。申請者は、順行性トレーサーを脳幹網様体に注入し、大細胞性網様体とくに中間網様核のコリン作動性介在ニューロンが脳神経運動核に分布する C-terminal の起始細胞であることを明らかにした (Matsui et al., 2013)。また最近、C-terminal 起始細胞の存在する網様体領域が、脳幹の運動パターンの形成領域と神経連絡をもつ可能性を見出した。脊髄における C-terminal 起始細胞は歩行リズム形成に関与しており (Witts et al., 2014)、このことは脊髄の吻側延長構造である脳幹においても類似した運動制御機構が存在する可能性を示唆している。一方、脳幹網様体の介在ニューロンは脊髄の同系列のニューロンと一部異なる細胞性質をもつことが知られている。現状、網様体のコリン作動性介在ニューロンが口腔顔面筋の運動にどのような機能を担うのかが不明であるため、脳幹の運動パターン形成機構を理解するうえで、運動ニューロンに直接出力するコリン作動性介在ニューロンの形態学的情報は重要と考えられる。

2. 研究の目的

口腔顔面筋のパターン運動を生み出す運動ニューロンの活動調整を理解するためには、運動パターン形成に関与する脳幹網様体ネットワークを運動ニューロンにいたる経路まで解明することが重要である。本課題はコリン作動性介在ニューロンとその神経終末 C-terminal に着目し、その神経連絡や情報伝達における分子機構を包括的に解析することで、コリン作動性介在ニューロンの運動パターン形成における役割を解明することを目的とした。とくに、運動ニューロンに投射する網様体のコリン作動性介在ニューロン (C-terminal 起始細胞) と他の網様体領域との神経連絡、その情報伝達の機能分子を決定することに重点をおき、口腔顔面筋のパターン運動の形成ネットワークにおけるコリン作動性介在ニューロン投射系の機能的位置づけを検討に取り組んだ。

下記の研究目標を達成するため、トレーサー実験や免疫組織化学といった組織形態学的手法を用いて、コリン作動性介在ニューロンの神経連絡や伝達機構を解析した。

- (1) コリン作動性介在ニューロンと運動パターン形成機構との神経連絡の決定
- (2) ウイルストレーサーによるコリン作動性介在ニューロンの形態解析
- (3) コリン作動性運動ニューロンの口腔顔面筋運動ニューロン制御機構の解明

3. 研究の方法

- (1) コリン作動性介在ニューロンと運動パターン形成機構との神経連絡の決定 (逆行性トレーシング)

脳幹において C-terminal 起始細胞は、延髄尾側部の中間網様体に細胞集団をつくって存在する。そこで、マウス延髄の中間網様体に逆行性トレーサー Fluoro-Gold を注入し、脳幹における標識細胞の分布を解析した。Fluoro-Gold 標識は電気注入（8 μ A, 8 秒通電 - 8 秒休止, 10 分間）により行い、注入 3 日後に脳を摘出し、連続切片を作製した。一部標本では、FluoroGold の検出に抗体による免疫組織化学を用いた。また隣接切片にニッスル染色を行うことで、逆行性標識細胞が分布する神経領域の判定を行った。

(2) コリン作動性介在ニューロンの形態解析（単一ニューロンレベルによる可視化）

申請者らは、Cre/lox 誘導性ウイルスベクターによる標的領域に限局的かつ細胞系列特異的な標識法を確立した (Hongo, Matsui et al., 2022)。実験には、2 種類のアデノウイルスベクター (Ad-nDsRed/myrGFP, Ad-STOP/myrGFP-WPRE) を使用した。レポーター遺伝子 myrGFP は、Fyn 蛋白質 N 末端のミスチリン酸/パルミチン酸付加領域を GFP に結合したもので、膜移行の促進によって樹状突起と軸索を精細に標識できる。これらベクターを神経マーカー特異的な Cre 発現マウスに注入することで、網様体ニューロン (コリン作動性介在ニューロンを含む) を単一ニューロンの標識を行った。残念ながら、遺伝子導入されたニューロンにおける GFP の発現は弱かったため、抗 GFP 抗体による免疫組織化学で標識ニューロンを可視化した。ニューロン細胞体から伸びる樹状突起や軸索の形態解析は、連続切片上の突起断端をつなぎ合わせることで細胞全体像を再構築して検討した。

(3) コリン作動性運動ニューロンの口腔顔面筋運動ニューロン制御機構の解明

脊髄の運動ニューロンに接するコリン作動性終末 C-terminal は、幼若動物の歩行開始時期に同期して成熟する。一方で哺乳・嚥下に機能する口腔顔面筋の運動ニューロンは出生直後から活発に活動する必要があり、予備実験では脳神経運動核の亜核ごとに C-terminal の成熟速度が異なる可能性が示された。そこで口腔顔面筋の運動ニューロンの活動性調節における C-terminal の機能的意義を検証する目的で、生後発生期の C-terminal および運動ニューロンにおけるシナプス機能分子の発現変化を解析する。解析対象の分子として、コリン作動性シナプスのシナプス前マーカーである小胞性アセチルコリントランスポーター (VACHT), C-terminal のシナプス後部の局在分子である電位依存性カリウムチャネル (Kv2.1) などを選択した。

また申請者らが以前、コリン作動性終末における機能分子として新規に同定した有機カチオントランスポーター OCT2 について、脊髄の感覚ニューロンに由来するコリン作動性投射線維における局在と発現ニューロンの細胞特徴について検討した。

4. 研究成果

(1) コリン作動性介在ニューロンと運動パターン形成機構との神経連絡の決定

口腔顔面筋を支配する鰓弓運動性運動ニューロンは、脳幹網様体のコリン作動性介在ニューロン (プレモーターニューロン) から入力を受ける。延髄尾側部の網様体に逆行性トレーサーを注入し、コリン作動性介在ニューロンの存在領域に連絡するニューロンの分布を観察したところ、逆行性標識細胞の一部が淡蒼縫線核といった尾側部の縫線核に存在した。先行研究において、脳幹の運動ニューロンはセロトニン作動性神経の投射を受けることが知られている。本研究の逆行性標識細胞の分布と考え合わせると、縫線核のセロトニン作動性ニューロンが運動ニューロンとコリン作動性介在ニューロンの両方に投射する可能性が示された。

また、逆行性標識細胞は延髄から橋の中間網様核、青斑下核、小細胞性網様核などにも存在した。これらの神経核より少数ではあるが、橋吻側網様核や巨細胞性網様核にも標識細胞が見られた。前述の神経領域は、舌下神経核といった脳神経運動核に投射するニューロンも存在しており、我々の結果と考え合わせると、運動ニューロンとそのプレモーターニューロンの両者に投射する神経領域である可能性が示唆された。その他、逆行性標識は結合腕傍核複合体 (内側および外側結合腕傍核、Kolliker-Fuse 核) に分布が見られた。結合腕傍核複合体は味覚刺激に応答するニューロンが存在し、内臓感覚の受容や呼吸にも関与する。そのため、本研究課題で注目するコリン作動性プレモーターニューロンは結合腕傍核複合体を介して、感覚系からの情報を運動ニューロンへと出力する経路の一部を担う可能性も示された。

(2) コリン作動性介在ニューロンの形態解析

本研究では、コリン作動性ニューロンに特異的な標識を行うため、ChAT-Cre マウスと Cre/lox 発現系をもつウイルスベクターを利用した。これまでの研究により、この標識法は脊髄のコリン

作動性介在ニューロンの単一細胞解析などに有用であることが分かったが (Hongo, Matsui et al., 2022), コリン作動性神経核に対するベクター注入において標識細胞数の少ない傾向が見られた。そこで, 我々が作製・使用しているウイルスベクターを脊髄前角に注入し, コリン作動性ニューロンの標識効率を検討したところ, 注入部位で 10%以下の標識率であった。このことから, 本ベクターは多数のニューロンの標識・伝導路解析には不向きである一方, 細胞集団の中から少数細胞のみを可視化したい際に有用という特性が明らかになった。

(3) コリン作動性運動ニューロンの口腔顔面筋運動ニューロン制御機構の解明

脳幹のコリン作動性介在ニューロンが運動ニューロンと形成するシナプス (神経終末が C-terminal) について, 神経伝達機能分子の発現を検討した。分子マーカーのうち, コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 小胞性アセチルコリントランスポーター (VACHT) といったコリン作動性神経終末の一般的マーカーが, マウス鰓弓運動性神経核において出生直後から C-terminal に局在していた。シナプス後細胞である運動ニューロンでは, 電位依存性カリウムチャンネル Kv2.1 が細胞膜上に分布していたが, 成体に比較すると出生直後ではシナプス後部での局在が弱い傾向を示した。

脳幹のコリン作動性介在ニューロンの分布する神経領域は, 三叉神経脊髄路核など脳神経の感覚性神経核と神経連絡することが知られている。これまでの研究により, 脳神経の感覚性神経核は末梢からコリン作動性の神経投射を受けることを見出ししているが, この末梢からの感覚入力と脳幹網様体のコリン作動性介在ニューロンとの神経連絡は不明である。そこで, 脳幹網様体と細胞構築の共通性をもつ脊髄において, コリン作動性の末梢感覚ニューロンの神経化学的性質を決定し, 脳幹網様体における解析のための基礎的知見を得た。中枢神経系においてコリン作動性ニューロンの多くがトランスポーター OCT2 を発現するが, 末梢の感覚神経節におけるニューロンでは約 20%が OCT2 を発現していた。OCT2 発現ニューロンは, ペプチド作動性の侵害受容ニューロンのマーカー (substance P, CGRP) 陽性の集団と, 触覚・固有感覚受容ニューロンのマーカー (NF-200, TrkB, TrkC) 陽性の集団から構成された。脊髄中間帯 (脳幹の網様体に相当) のコリン作動性介在ニューロンは, 固有感覚受容ニューロンと神経連絡をもつため, 上記の結果よりコリン作動性の神経伝達が末梢の感覚ニューロンからコリン作動性介在ニューロンまでの一連の神経連絡を通して機能する可能性が示された。

【引用文献】

- Hongo Y, Matsui T, Nakata T, et al. Morphological characterization of cholinergic partition cells: A transmitter-specific tracing study by Cre/lox-dependent viral gene expression. *Ann Anat.* 2022 ; 240 : 151857.
- Matsui T, Hongo Y, Haizuka Y, et al. C-terminals in the mouse branchiomotor nuclei originate from the magnocellular reticular formation. *Neurosci Lett.* 2013 ; 548 : 137-142.
- Miles GB, Hartley R, Todd AJ, et al., Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 ; 104 : 2448-2453.
- Witts, EC, Zagoraiou, L, Miles, GB. Anatomy and function of cholinergic C bouton inputs to motor neurons. *J. Anat.* 2014 ; 224 : 52-60.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsui Toshiyasu, Komamoto Kazuyuki, Igarashi Hitomi, Kurohmaru Masamichi	4. 巻 49
2. 論文標題 Characterization of glycoconjugates and sialic acid modification in the olfactory bulb of the Chinese fire bellied newt (Cynops orientalis)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomia, Histologia, Embryologia	6. 最初と最後の頁 260 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ahel.12524	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 Matsui Toshiyasu, Komamoto Kazuyuki, Igarashi Hitomi, Kurohmaru Masamichi	4. 巻 67
2. 論文標題 Species-specific and heterogeneous distribution of sialoglycoconjugates in the primary olfactory center of three species of Asian salamanders (Cynops)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101428 ~ 101428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2020.101428	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 小林靖、松井利康	4. 巻 36(8)
2. 論文標題 口腔の感覚 - 体性感覚と特殊感覚 (味覚) 味覚の受容と伝導路	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Otolaryngology, Head and Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 941 ~ 943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Matsui T, Nakata T, Kurohmaru M, Kobayashi Y	4. 巻 31
2. 論文標題 Neurochemical characterization of mouse dorsal root ganglion neurons expressing organic cation transporter 2 (OCT2)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NueroReport	6. 最初と最後の頁 274-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001416	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 Kitazawa Toshio, Matsui Toshiyasu, Katsuki Shuichi, Goto Akira, Akagi Kai, Hatano Naoya, Tokumitsu Hiroshi, Takeya Kosuke, Eto Masumi	4. 巻 321
2. 論文標題 A temporal Ca ²⁺ desensitization of myosin light chain kinase in phasic smooth muscles induced by CaMKK /PP2A pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C549 ~ C558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00136.2021	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 Hongo Yu, Matsui Toshiyasu, Nakata Takahiro, Furukawa Hiroyo, Ono Takeshi, Kaida Kenichi, Suzuki Kazushi, Miyahira Yasushi, Kobayashi Yasushi	4. 巻 240
2. 論文標題 Morphological characterization of cholinergic partition cells: A transmitter-specific tracing study by Cre/lox-dependent viral gene expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger	6. 最初と最後の頁 151857 ~ 151857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aanat.2021.151857	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 -

〔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 松井利康、駒本和之、五十嵐瞳、九郎丸正道
2. 発表標題 シナイモリ (Cynops orientalis) の嗅球における糖鎖発現とそのシアル酸付加に関する組織化学的研究
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井利康、本郷悠
2. 発表標題 脊髄・脳幹のコリン作動性介在ニューロンのトレース
3. 学会等名 第127回日本解剖学会学術集会
4. 発表年 2022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	小林 靖 (Kobayashi Yasushi) (00195819)	防衛医科大学校・解剖学・教授 (82406)	
研究 分担者	九郎丸 正道 (Kurohmaru Masanichi) (00148636)	岡山理科大学・獣医学部・教授 (35302)	

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
---------	---------