

令和元年5月30日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07962

研究課題名(和文) 口腔感覚が脳機能を調節する神経機構および分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of neural and molecular mechanisms regulating brain function by oral sensation

研究代表者

柏柳 誠 (Kashiwayanagi, Makoto)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：20169436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔感覚情報が黒質緻密部に伝えられる経路に存在する大脳皮質体性感覚野の神経細胞が固形飼料を摂取した際に興奮することとこの経路の神経細胞の活動を反映する外側網様体、橋核、三叉神経脊髄路核、黒質網様部などの神経細胞の活動が亢進することを見いだした。また、脳室下層で新生した神経細胞が移動する嗅球では、GABAの放出が変化するなど介在神経の活動が影響を受けていたことを見いだした。これらの結果は、粉末飼料で飼育したマウスの脳室下層の神経新生の低下に伴う新生細胞の嗅球への移動の減少が、嗅球の出力細胞の僧帽細胞の活動に影響を与えることを直接示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が見いだした咀嚼不全モデルマウスでは、柔らかいエサを摂取すると脳内に伝わる口腔感覚情報が減弱することを確認した。その結果生じた脳室下層における神経新生の低下のために、嗅覚一次中枢の神経活動が変化することを示した。平均寿命が延びた日本では、医療費の負担を軽減するためにも日常生活を改善する必要に迫られている。ヒトにおいても咀嚼を維持することにより、神経活動の維持をはかる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the neural pathway where oral sensory information is transmitted to the substantia nigra parenchyma were investigated when mouse ingested chow. For example, neurons at the cerebral cortex somatosensory area, lateral reticular body, pontine nucleus, trigeminal spinal cord tract were excited. In addition, at the olfactory bulb where nerve cells newly generated in the subventricular zone migrated, the activity of interneurons such as the change of GABA release was affected. These results directly indicate that the decrease in migration of newly generated cells to the olfactory bulb associated with the decrease in neurogenesis in the subventricular zone of mice fed a powder diet affects the mitral cell, output cells of the olfactory bulb, activity.

研究分野：感覚生理学

キーワード：咀嚼 神経新生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急速に高齢化が進んだ我が国では、高齢者の脳機能障害が社会問題の一つとなっている。研究代表者は、日常生活の一部である咀嚼の強弱で、脳室下層における神経新生が大きく影響を受けることを見いだした。このことは、咀嚼という単純な生活習慣を変えることで脳機能障害が改善できる可能性を示唆している。本研究課題は、その脳内機構と分子機構を明らかにして、咀嚼の大切さをエビデンスを元に科学的に示す。本研究課題の成果は、国民を啓蒙して医療費の膨張を改善することができるかと期待される。また、そのメカニズムを解明することで脳機能障害を改善する新たな薬の開発を促すことができる。

2. 研究の目的

咀嚼不全は認知障害のリスクファクターの一つとして考えられており、マウスやラットでは咀嚼不全が海馬の神経新生の低下を引き起こすと同時に空間認知能の低下を引き起こすことが報告されている。脳室下層 (SVZ) は、海馬と同様に成体でありながら神経細胞が新生する大変ユニークな脳の一部である。新生した細胞は、嗅球 (OB) に移動した後に介在神経として匂い情報の処理を行っている。我々は、咀嚼不全のモデルを作成するために粉末飼料で飼育を行ったところ、脳室下層における神経新生が低下するとともに嗅覚機能が低下することを見いだした (Utsugi et al., 2014)。一方、これらの低下は、固形飼料で飼育すると回復することを見いだした。咀嚼により生ずる口腔感覚情報が三叉神経を介して三叉神経主知覚核 (Pr5) に入力する。感覚情報は視床 (Tal)、体性感覚野 (SI)、運動野 (MI) を経由し、脚橋被蓋核 (PTg) に送られる。PTg のグルタミン作動性神経あるいはコリン作動性神経の興奮は、黒質緻密部 (SNc) のドーパミン作動性神経の興奮を引き起こし、上皮活性因子 (EGF) を介して SVZ の神経新生を亢進する。SVZ で新生した神経細胞は RMS を通り OB に移動し、介在神経として嗅覚機能を維持する。本研究課題では、咀嚼が上記の脳内経路で、あるいは、どのような分子基盤で嗅覚機能に影響をおよぼすかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

全ての実験は旭川医科大学の実験動物の使用に関するガイドラインに従い、旭川医科大学動物実験委員会の承認を受け行った。

動物

C57BL/6 メスのマウス (24~28 週齢) を用いた。固形飼料および成分が同一の粉末飼料は、三共ラボラトリー (札幌) から購入した。一つのケージで飼育された 5 匹のマウスは、一週間にそれぞれ 25 g の固形もしくは粉末飼料を一ヶ月間にわたって摂餌させた。

ダイエットによる刺激

自由摂餌により固形および粉末飼料で刺激する前に、マウスを 2 日間絶食させた。

Fos 免疫組織化学

神経活動の指標となる Fos 陽性細胞の染色は、宇津木らの方法を用いた (Utsugi et al., 2014)。Pentobarbital (35 mg / ml) で深麻酔した後マウスは 4 % paraformaldehyde で固定し、厚さ 100 μm の矢状断切片を作成した。さらに、抗 Fos ポリクローナル抗体 (1 : 8000、Ab-5; Calbiochem)、ABC (ABC Elite キット ; Vector) および DAB で処理した。マウントした切片は $20.04 \pm 2.0 \mu\text{m}$ ($n = 10$) であった。倒立顕微鏡 (BX51 ; オリンパス) に取り付けた CCD カメラ (DP72; オリンパス) で撮影した後、Fos 陽性細胞の数をカウントした。

僧帽細胞からの電気生理学的記録

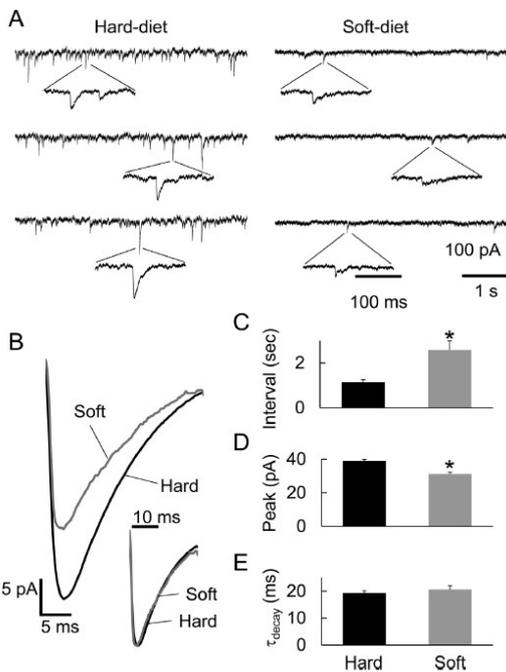
介在神経の活動を示す自発的興奮性抑制電流 (sIPSC) は、野口らの方法に従って測定した (Noguchi et al., 2017)。Pentobarbital (35 mg / ml) で深麻酔した後、マウスは 95% O₂ and + 5% CO₂ 混合ガスで酸素化して氷冷したショ糖リンガー液 (234 mM sucrose, 2.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 11 mM glucose, pH 7.4) で灌流した。取り出した嗅球を含む脳ブロックから 200 μm の厚さの矢条断切片をビブラトーム (DOSAKA EM, Kyoto, Japan) を用いて作成した。切片は、95% O₂ and + 5% CO₂ 混合ガスで酸素化したリンガー液 (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 11 mM glucose, pH 7.4) で 30 分間 37 °C でインキュベートし、使用まで同じ溶液で保存した。全ての記録は、室温で行った。

僧帽細胞は、微分干渉顕微鏡 (E600FN、ニコン) で確認した。ガラス電極は、CsCl 細胞内液 (115 mM CsCl, 15 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM Na₂ATP, 0.5 mM EGTA/CsOH, 10 mM HEPES, 10 mM tetraethylammonium chloride, pH 7.2/CsOH) を充填した電極の電極抵抗は $5.7 \pm 0.11 \text{ M}\Omega$ ($n = 60$; mean \pm SE) であった。電流記録は、Axopatch 200 B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) で記録し、Clampex software (Molecular Devices) で制御した Digidata 1320A digitizer (Molecular Devices) を用いて解析した。保持電位 -80 mV の膜電位固定下で自発的抑制性後シナプス電流 (sIPSC) を僧帽細胞から記録した。興奮性活動は、20 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, 20 μM 2-amino-5-phosphonovaleric acid

と 10 μ M tetrodotoxin により抑制した。

4. 研究成果

体性感覚が脳室下層における神経新生に影響を与える経路の一つの可能性として、三叉神経



粉末飼料飼育により減弱した僧帽細胞から記録した自発的抑制性後シナプス電流 (sIPSC)。

A, 固形もしくは粉末飼料で飼育したマウスの僧帽細胞から記録した典型的な。B, sIPSCのアンサンブル平均 (2945: 固形飼料, 586: 粉末飼料) の sIPSC。C, 粉末飼料飼育による sIPSC 強度の低下 ($p < 0.01$, Mann-Whitney U test)。D, 粉末飼料飼育による sIPSC 間の時間の短縮 ($p < 0.01$, Mann-Whitney U test)。E, sIPSC の平均減衰時間。

の低下に伴う新生細胞の嗅球への移動の減少が、介在神経からの GABA 放出の変化を引き起こし、嗅球の出力細胞の僧帽細胞の活動に影響を与えることを示唆した。

参考文献

- C. Utsugi, S. Miyazono, K. Osada, H. Sasajima, T. Noguchi, M. Matsuda, and M. Kashiwayanagi. Hard-diet feeding recovers neurogenesis in the subventricular zone and olfactory functions of mice impaired by soft-diet feeding. PLoS ONE. 9 (e9309):1-9, 2014.
- T. Noguchi, C. Utsugi and M. Kashiwayanagi. Soft-diet feeding impairs neural transmission between mitral cells and interneurons in the mouse olfactory bulb. Arch. Oral Biol. 83 (2017) 209-213.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① T. Noguchi, C. Utsugi and M. Kashiwayanagi. Soft-diet feeding impairs neural transmission between mitral cells and interneurons in the mouse olfactory bulb. Arch. Oral Biol. 83 (2017) 209-213.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 柏柳誠, 宇津木千鶴. 咀嚼不全により低下した神経新生と嗅覚機能とその回復. 第 58 回歯科基礎医学会. 札幌. 2016
- ② Utsugi C., Kashiwayanagi M., Katayama T., Machino M. and Muramoto K. Does the

主知覚核から視床、体性感覚野、運動野、脚橋被蓋核を経て、黒質緻密部のドーパミン作動性細胞を興奮させ、脳室下層における神経新生を亢進させる経路を想定し研究を実施した。先行実験では不明であった大脳皮質体性感覚野において神経興奮のマーカーである Fos を発現していた細胞を解析した結果、粉末飼料を摂餌させてもエサを与えなかったマウスと同様の低い Fos 陽性細胞の発現しか認めなかった、一方、固形飼料を与えたマウスでは、有意な Fos 陽性細胞の発現を認めた。また、堅いエサを摂餌するためには、強い咀嚼が必要である。そのため、脳の様々な部位が活動することが必要となる。実際、外側網様体、橋核、三叉神経脊髄路核、黒質網様部では固形飼料を摂餌したマウスで Fos 陽性細胞が増加していた。本研究では、強度の堅いエサを摂餌する際に強い体性感覚入力を受けることにより、脳の様々な部位の活動が活発化することが示された。

脳室下層で新生した神経細胞は嗅球まで移動して介在神経として匂い情報処理を行っている。固形飼料で飼育したマウスの嗅球の僧帽細胞からは、高い頻度で自発的抑制性後シナプス電流 (sIPSC) が測定できる。この電流は、GABA 受容体の阻害薬である bicucullin により抑制されたために、介在神経から放出される GABA に由来する後シナプス電流であることが示された。一方、粉末飼料で飼育したマウスの僧帽細胞では、bicucullin を作用させたときと同様に sIPSC のイベント間時間を延長し、イベント強度を抑制した。また、粉末飼料飼育のマウスで測定された sIPSC の時間経過は、減衰時間には影響を与えないように固形飼料飼育のマウスのものと同様だった。この結果は、GABA_A 受容体で知られている fast と slow の両者の電流が減弱していることを示した。以上の結果は、粉末飼料で飼育したマウスの脳室下層の神経新生

number of residual teeth effect to the olfactory functions in human? XVII International symposium on Olfaction and Taste, Yokohama, 2016

③野口智弘、宇津木千鶴、柏柳誠. 歯ごたえのない食事は嗅覚の神経回路機能を弱める. 日本味と匂学会第 51 回大会. 神戸. 2017.

④野口智弘、宇津木千鶴、柏柳誠. 口腔内の体性感覚を介して制御されるマウス嗅球の GABA 作動性入力. 平成 29 年度日本生理学会北海道地方会. 当別. 2017

〔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

研究分担者氏名: 野口智弘

ローマ字氏名: Tomohiro Noguchi

所属研究機関名: 旭川医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 10466500

研究分担者氏名: 笹島仁

ローマ字氏名: Hitoshi Sasajima

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 医学研究院

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 00374562

研究分担者氏名: 宮園貞治

ローマ字氏名: Sadaharu Miyazono

所属研究機関名: 旭川医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 50618379