

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05541

研究課題名(和文) 味覚・嗅覚の感覚入力による口腔機能の出力制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Control of Oral Function with Oral Sensory Inputs

研究代表者

古郷 幹彦 (Kogo, Mikihiko)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：20205371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：嚥下のパターン形成器と考えられている延髄孤束核だけではなく、舌下神経核も switching neuron 的な役割を果たすことによって、嚥下活動の発現に関与し、それが5-HTによって制御されている可能性が考えられた。NPY/AgRP神経はSim1陽性メラノコルチン4受容体陽性神経を制御し孤束核近傍に投射する。咀嚼を制御できるMesV神経細胞へのNPYの投与は、活動電位に続くafterhyperpolarizationの持続時間を短縮し、反復放電中の平均スパイク周波数とバースト周波数も増加した。これらの効果は、主にY1およびY5受容体によって媒介され、咀嚼を亢進することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味や匂いなどが脳の神経回路に働いて人は食べようとする。この摂食活動が活発化するメカニズムを検討したものである。本研究は生きた生体を用いず、大脳脳幹脊髄を培養し、神経回路を保ったまま、検討を行ったところに刷新性がある。動物が呼吸して動くようなことはなく、麻酔の進捗に影響されることなく、神経生理研究を行った。嚥下や咀嚼でこの種の研究は少ない。生体筋肉からの雑音は排除されている。嚥下運動や咀嚼運動が促進される様子が見られた。

研究成果の概要(英文)：Not only the nucleus of the solitary medullary nucleus, which is considered to be a patterning device for swallowing, but also the hypoglossal nucleus plays a switching neuron-like role in the expression of swallowing activity, which is regulated by 5-HT. It is possible that NPY / AgRP nerves control Sim1-positive melanocortin 4 receptor-positive nerves and project near the solitary nucleus. Administration of NPY to MesV neurons which can control mastication shortens the duration of afterhyperpolarization following action potential. The average spike frequency and burst frequency during discharge also increased. These effects were considered to be mediated by Y1 and Y5 receptors and enhance mastication.

研究分野：外科系歯学

キーワード：嚥下 咀嚼 神経回路 脳幹 口腔機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

本研究代表者はこれまで、平成 25 年度から開始した基盤研究 (B)「味覚・嗅覚・咀嚼による感覚刺激入力の内処理メカニズムの解明」によって、味覚・嗅覚の感覚入力がかどのように統合・伝達され、咀嚼活動および摂食行動特性に影響を及ぼすかについて検討してきた。同研究では、味覚障害あるいは嗅覚障害モデルラットを用いた摂食行動解析、同ラットの脳幹スライス標本を用いた細胞膜電位の解析および免疫組織学的検索、同ラット脳内の特定部位における Orexin 蛋白の発現解析といった複合的アプローチを用いることで、味覚・嗅覚入力によって視床下部外側野に産生された Orexin および NPY が、摂食行動特性のみならず、咀嚼 CPG 形成に重要な役割を持つ三叉神経中脳路核ニューロンにおける細胞膜特性を制御することで咀嚼活動に影響を及ぼすことを明らかとした。従って次の段階として本研究では、統合・伝達された味覚・嗅覚の感覚入力刺激が、どのようにして咀嚼、嚥下という主要な口腔機能を制御するかという点に焦点を当て、その脳内メカニズムを解明することを目的とする。これまでの申請研究が味覚・嗅覚の感覚統合・伝達メカニズムに主眼を置いていたのに対し、本研究では統合・伝達された感覚入力がかどのような形で口腔機能の発現(出力)に影響を及ぼすかを明らかにすることに焦点を置いており、平成 25 年からの基盤研究 (B) と本申請研究を合わせて、口腔の感覚入力から機能出力までの脳内メカニズムを網羅した研究となる。

## 2. 研究の目的

味覚障害が孤束核嚥下関連ニューロンおよび三叉神経中脳路核ニューロンの膜特性および活動特性に及ぼす影響を、味覚障害モデルラット(新生仔)から作製したスライス標本を用いて明らかにする。

味覚・嗅覚障害がネットワークレベルで形成された咀嚼活動および嚥下活動に及ぼす影響を、味覚および嗅覚障害モデルラットから作製した *in situ* 標本を用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### スライス標本の作製

本研究における実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定 (動物実験委員会承認番号: 動歯-20-005-0) と動物の愛護及び管理に関する法律を順守して行った。実験には、生後 3 日から 17 日齢の Sprague-Dawley 系ラット(日本動物株式会社)を用い、尾側の MTN を含む厚さ 300  $\mu\text{m}$  の冠状脳幹スライス標本作製した。

### Whole-cell patch-clamp 法を用いた記録

スライス標本を記録用チャンバーに静置し、赤外線透視条件下で中脳路核を同定し、MTN からギガシール形成後、Whole-cell 記録を行った。パーソナルコンピュータと専用ソフトウェア (pCLAMP 9.0, Molecular Devices 社製) を用いて記録および解析を行った。

### 薬剤の投与

本研究において、MTN に対する神経修飾効果を検討するために用いた薬剤は、蒸留水またはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、以下の最終濃度となるように Bath 内灌流投与した。NPY (Human, Rat 0.1  $\mu\text{M}$ , 株式会社ペプチド研究所) Ox-A (Human, Rat, Mouse 200 nM, 株式会社ペプチド研究所) [Leu 31, Pro34]-NPY (Human, Rat 0.1  $\mu\text{M}$ , Tocris) BWX 46 (0.1  $\mu\text{M}$ , Tocris) BIBP 3226 trifluoroacetate (0.1  $\mu\text{M}$ , Tocris) CGP 71683 hydrochloride (0.1  $\mu\text{M}$ , Tocris) SB334867 (200 nM, Tocris) tetrodotoxin (TTX: 1  $\mu\text{M}$ , 和光純薬工業株式会社)

### 縫線核における嚥下のかかわり

Brainstem Block preparation *In vitro* を用いて薬剤の Bath Application による」嚥下

への連携の検討を行った。

#### 4 . 研究成果

##### NPYによるMTN活動電位特性の変化

MTN では、NPY 投与により  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  を電荷担体とする内向き電流が誘発され、定常状態におけるニューロンの興奮性は増大することが明らかとなった。NPY によるニューロンの興奮性増大には、活動電位における AHP 持続時間の短縮と、連続発火活動におけるスパイク周波数やバースト出現頻度の上昇が関わっていると推察された。

##### NPY 神経修飾作用における Y1、Y5 受容体の関与ならびにオレキシンの相互作用

本修飾作用は細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  動態変化により調節され、修飾発現には Y1、Y5 受容体双方が関与していることや、オレキシンの相互作用が関与していることが示唆された。オレキシンと NPY の相互作用は Y1、Y5 受容体双方が関与すること、オレキシンの受容体に対して直接 NPY が相互作用を示す可能性が報告されてきたが、本研究において NPY と Orexin は脳室内レベルの相互作用のみならず、細胞レベルでの相互作用の可能性が示唆された。今後さらに MTN の膜興奮性を制御する各イオンコンダクタンスや、細胞内相互作用のメカニズムの解明について、他の摂食促進ペプチドによる作用も含めて検討を行う必要がある。

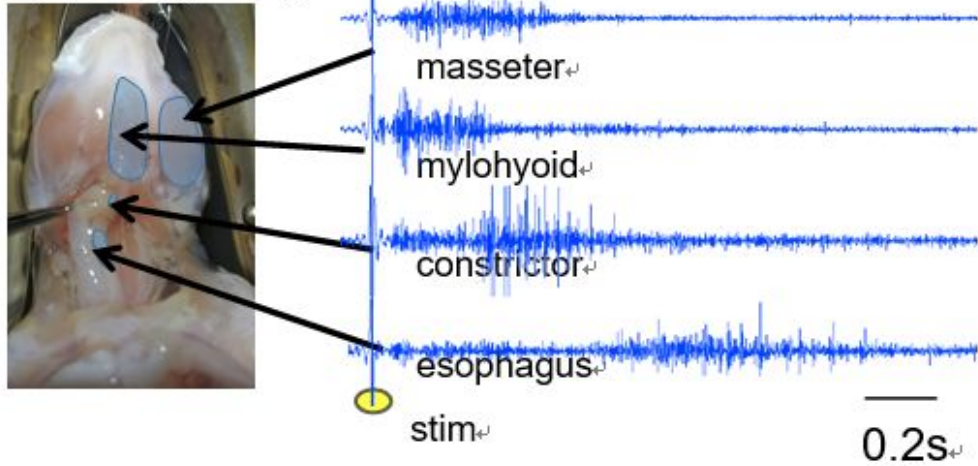
##### 縫線核と嚙下運動との連携

全槽 (Bath) 投与においては  $10\ \mu\text{M}$  の 5-HT 投与で嚙下活動を表す舌下神経ニューロンの発火活動は活動時間 (Duration)、最大振幅 (Amplitude) とともに増加する傾向を認めた。また迷走神経刺激に対する嚙下活動の反応性 (頻度) も増加する傾向が認められた。嚙下についてスライス標本で延髄孤束核、舌下神経核のそれぞれに 5-HT の局所微量投与 (micro injection) を行ったところ、舌下神経核への injection 時に全槽投与に類似する結果である活動時間、最大振幅、嚙下活動頻度の増加を認めた。一方で延髄孤束核への injection では活動時間、最大振幅は減少し、嚙下活動頻度は大きな変化が認められなかった。縫線核 (B2: 不確縫線核) への 5-HT の injection を行い、縫線核への外因的な 5-HT の作用を調べたところ、スライス内の吻尾方向に広く分布している縫線核において、スライスの吻側への injection と尾側への injection で嚙下活動頻度に相違があった。具体的にはスライス尾側の縫線核への injection によって嚙下活動頻度の著しい減少を認めた嚙下のパターン形成器と考えられている延髄孤束核だけではなく、moter neuron である舌下神経核も switching neuron 的な役割を果たすことによって、嚙下活動の発現に関与し、それが 5-HT によって制御されている可能性が考えられた。スライス内の尾側の縫線核の方が、吻側と比べ、より延髄孤束核や舌下神経核に存在する嚙下関連ニューロンへセロトニン神経投射を行っていることが示唆される。

こうした摂食促進ペプチドの脳内分泌をコントロールすることにより、異常摂食行動や、肥満傾向を抑止しようとする試みが存在するが、脳室内投与による作用時間が短いことや、代償性にその他の摂食促進ペプチドが減少、増加することなどから、一側面からのアプローチには限界があると考えられている。摂食促進ペプチドには種々のものがあり、それぞれが相互に作用して摂食行動を制御している。In vivo の研究で、オレキシンは NPY を産生するニューロンに投射しており、オレキシンによる摂食亢進には NPY ニューロンを介する経路が関与することや、オレキシンと NPY の相互作用は Y1、Y5 受容体双方が関与すること、オレキシンの受容体に対して直接 NPY が相互作用を示す可能性が報告されてきたが、本研究において NPY と Orexin は

脳室内レベルの相互作用のみならず、細胞レベルでの相互作用の可能性が示唆された。今後さらに MTN の膜興奮性を制御する各イオンコンダクタンスや、細胞内相互作用のメカニズムの解明について、他の摂食促進ペプチドによる作用も含めて検討を行う必要がある。

Sequential muscle activity evoked by SLN simulation  
(Swallowing Activity)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seki S, Tanaka S, Yamada S, Tsuji T, Enomoto A, Ono Y, Chandler SH, Kogo M.	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 J Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 305-312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jnr.24134	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	田中 晋 (Tanaka Susumu)  (00367541)	大阪大学・歯学部附属病院・講師  (14401)	
研究分担者	山西 整 (Yamanishi Tadashi)  (20397780)	大阪大学・歯学研究科・招へい教員  (14401)	
研究分担者	青海 哲也 (Seikai Tetsuya)  (40713194)	北海道大学・大学病院・医員  (10101)	変更：2018年10月1日 (0)大阪大学 (0)北海道大学
研究分担者	宮川 和晃 (Miyagawa Kazuaki)  (50635381)	大阪大学・歯学部附属病院・医員  (14401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	チャンドラー スコット  (Chandler Scott)		