

令和元年6月13日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19775

研究課題名(和文)咀嚼運動と自律神経系のクロストークの解明

研究課題名(英文) Crosstalk between the neural circuit for controlling mastication and the autonomic nervous system

研究代表者

井上 富雄 (INOUE, TOMIO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：70184760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：三叉神経運動核の上方には、咀嚼運動制御に関わる三叉神経上核と自律神経系の入力を受ける結合腕傍核が存在し、さらに自律神経系の発生に関わる転写因子Phox2bを持つニューロンが多数存在する。そこで本研究は、Phox2b陽性ニューロンの性質を調べた。その結果、Phox2b陽性ニューロンは、グルタミン酸作動性で、発火頻度が低かったが、Phox2b陰性ニューロンはGABAかグリシン作動性で、発火頻度が高かった。また、両者の約半数は出力を三叉神経運動核に送った。以上からPhox2b陽性と陰性ニューロンは正反対の性質を持ち、自律神経系の入力を受けて咀嚼運動の制御に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自律機能と運動機能は、それぞれ生体の恒常性のための重要な機能の一つであり、本来、密接に関わって働いていると考えられる。自律神経系の機能はこれまで詳細に研究されてきたが、運動機能の制御系とのインタラクションの観点でなされたものは極めて少ない。本研究は、咀嚼運動の遂行に関わる三叉神経上核から自律機能に関わる結合腕傍核にわたって存在するPhox2b陽性ニューロンに着目して、自律神経系と咀嚼の運動機能のクロストークの解明を試みるものである。本研究結果は、自律神経系と運動機能の相互作用という新たな学問領域を切り開く可能性を有し、その端緒としての意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The supratrigeminal nucleus and the parabrachial nucleus are located dorsal to the trigeminal motor nucleus (RdV). The former is related to controlling jaw movements and the latter receives autonomic inputs. Furthermore, PHOX2B is essential for autonomic nervous system development and the neurons expressing Phox2b (Phox2b+ neurons) are abundantly found in the RdV. In this study, we examined the properties of Phox2b+ neurons located in the RdV. Phox2b+ neurons were glutamatergic, whereas Phox2b-negative (Phox2b-) neurons are GABAergic and glycinergic. Phox2b+ neurons showed low-frequency firing, while Phox2b- neurons exhibited high-frequency firing. About half of the Phox2b+ and Phox2b- neurons send their axons to the trigeminal motor nucleus. These results suggest that Phox2b+ neurons have clearly different properties from Phox2b- neurons and might play important roles in feeding-related functions under the crosstalk control between motor and autonomic systems.

研究分野：吸啜、咀嚼、嚥下を中心とした摂食行動の神経生理

キーワード：Phox2b 顎運動 三叉神経上核 グルタミン酸作動性 GABA作動性 グリシン作動性 発火パターン

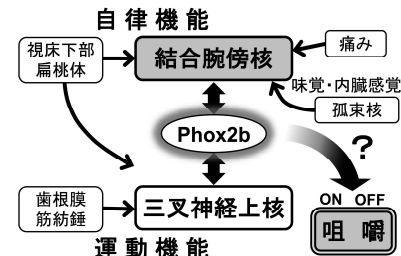
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

三叉神経上核は、三叉神経運動核の上方に位置し、摂食行動の調節に関わる大脳皮質、扁桃体、視床下部からの入力を受ける。さらに歯根膜受容器や咀嚼筋筋紡錘からの感覚情報が豊富に入力し、咀嚼運動のコントロールに重要な役割を果たすと考えられる。

結合腕傍核は、三叉神経上核の上方に位置し、扁桃体や視床下部からの入力を受けるとともに孤束核を介する味覚や内臓感覚、痛みの情報も入力する。結合腕傍核が活性化すると悪心や食欲不振を起こし、摂食行動が抑制される。したがって、三叉神経運動核の上方の狭い領域に咀嚼運動を遂行する神経回路と自律神経系の入力を受けて摂食行動を抑制する神経回路の両方が存在する。両神経回路機能のクロストークにより咀嚼運動の on-off が制御されている可能性がある。

Phox2b は自律神経中枢の発生に関する転写因子の一つであり、三叉神経上核から結合腕傍核に至る領域にも多数存在する。予備実験の結果から、この部位の Phox2b 陽性ニューロンは、同じ領域の Phox2b 陰性ニューロンと比べてスパイク発射頻度が低いことなど、全く異なった性質を持つことが分かった。したがって、この部位の Phox2b 陽性ニューロンが何らかの特異的な機能を有し、自律機能と咀嚼の運動機能のクロストークに重要な役割を果たしている可能性がある。



Phox2b ニューロンによる咀嚼運動と自律神経系のクロストークの仮説

2. 研究の目的

本研究は、Phox2b 陽性ニューロンと Phox2b 陰性ニューロンについて、(1) 発現する神経伝達物質、(2) 電気生理学および形態的特性、(3) 摂食行動の制御に関わる生理活性物質のオレキシン投与に対する応答も差異があるかどうかを確かめた。さらに、(4) 光照射による ChR2 の活性化を起こすことで Phox2b 陽性ニューロンを強制的に活動させ、その影響を調べた。以上の実験から咀嚼運動と自律系のクロストークについて解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Phox2b 陽性ニューロンと Phox2b 陰性ニューロンに発現する神経伝達物質

連携研究者の Ikeda らが開発した Phox2b 陽性ニューロンに EYFP を発現する遺伝子改変ラット (Ikeda et al. PLoS one 10:e0132475, 2015) を 4 匹 (生後 3 から 5 日齢) を用いた。イソフルランの深麻酔後 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定、浸漬固定を行い、凍結ミクロトームにて厚さ 16-20 μm の連続切片を作成した。Vglut2, GAD65/67, Glyt2 mRNA プロブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、Phox2b 陽性および Phox2b 陰性ニューロンの神経伝達物質表現型を検索した。シグナルはアルカリフォスファターゼを結合させた抗ジゴキシゲニン抗体によって可視化した。

(2) Phox2b 陽性ニューロンと Phox2b 陰性ニューロンの電気生理学および形態的特性

上記の Phox2b 陽性ニューロンに EYFP を発現する遺伝子改変ラットを 103 匹 (生後 2 から 7 日齢) 用いた。イソフルランの深麻酔後断頭して脳幹を摘出し、三叉神経運動核、三叉神経上核、結合腕傍核を含む厚さ 400 μm の前頭断スライス標本をピプラトームを用いて作成した。標本は 34 時間に 1 時間保持した後に室温に戻し、傾向装置付きで正立の近赤外光微分干渉顕微鏡に設置した記録チャンバーに移し、蛍光観察下で Phox2b 陽性ニューロンを同定し、Multiclamp 700B 増幅器を用いてホールセルパッチクランプ記録を行った。

(3) 摂食行動の制御に関わる生理活性物質のオレキシン投与に対する応答

実験(2)と同様の方法で Phox2b 陽性ニューロンと Phox2b 陰性ニューロンからそれぞれホールセルパッチクランプ記録を行い、200 nM のオレキシン A および 200 nM のオレキシン B を灌流投与した。

(4) Phox2b 陽性ニューロンの光刺激による活性化の影響

Phox2b 陽性ニューロンに光感受性蛋白質のチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させたラットを用い、三叉神経上核に光刺激を行い、同部の Phox2b 陽性ニューロンを活性化させた。

4. 研究成果

(1) Phox2b 陽性ニューロンと Phox2b 陰性ニューロンに発現する神経伝達物質

Vglut1, Vglut2, GAD65/67, あるいは Glyt2 のプロブを用いて mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で検索した。その結果、ほとんどすべての Phox2b 陽性ニューロンに

Vglut2 mRNA が発現していたが、*GAD65/67* や *Glyt2* の mRNA は見られなかった。一方、Phox2b 陰性ニューロンでは、*GAD65/67* や *Glyt2* の mRNA を発現しているものが多くみられたが、*Vglut2* mRNA を発現しているものは少なかった。以上の結果から、Phox2b 陽性ニューロンのほとんどはグルタミン酸性の興奮性ニューロンであるのに対し、Phox2b 陰性ニューロンのほとんどは、GABA あるいはグリシン性の抑制性ニューロンであることが明らかとなった。

(2) Phox2b 陽性ニューロンと Phox2b 陰性ニューロンの電気生理学のおよび形態的特性

ホールセルパッチクランプ法にてスパイク発射特性を解析した結果、Phox2b 陽性ニューロンは以下の性質を有していた： 85.7% (48/56) のニューロンで 1 秒間の脱分極パルス通電で連続スパイク発射を起こした時の後半 0.5 秒間の平均スパイク発射頻度は 33 Hz を越えなかった (LF タイプ)、1 個を除くすべてで (55/56) 自発発射が無く、43% で脱分極によって不規則なスパイク発射が誘発され、約 30% でリズムカルなバースト発射が観察された。これに対して Phox2b 陰性ニューロンでは、83.3% (35/42) のニューロンで、1 秒間の脱分極パルス通電の後半 0.5 秒間の平均スパイク発射頻度は 33 Hz を越え (HF タイプ)、74% (31/42) のニューロンに自発発射があり、82% (22/27) のニューロンは、脱分極により規則的な連続スパイク発射が誘発された。これら、の特性は、Phox2b 陽性ニューロンと Phox2b 陰性ニューロンの間で有意の差が認められた。また、受動的な電気生理学的特性については、LF タイプの Phox2b 陽性ニューロンは HF タイプの Phox2b 陰性ニューロンに比べて、静止膜電位は有意に深く、入力抵抗が有意に小さく、閾膜電は有意に浅く、活動電位の持続時間は有意に長く、スパイク裕過分極電位の持続時間と振幅が有意に小さかった。また、持続的なスパイク発射の発現に寄与する持続性 Na⁺電流の電流密度は、Phox2b 陽性ニューロンは Phox2b 陰性ニューロンより有意に小さかった。また、三叉神経中脳路核の電気刺激に应答するニューロンの割合は、Phox2b 陰性ニューロンに比べて Phox2b 陽性ニューロンで有意に小さかった。

バイオサイチンをパッチ電極封入することで、パッチクランプ記録中に記録した細胞にバイオサイチンを拡散させ、記録終了後、HRP にて記録した細胞を可視化した。その結果、42% (5/12) の Phox2b 陽性ニューロンと 60% (6/10) の Phox2b 陰性ニューロンの軸索が三叉神経運動核に投射していることが確認された。

(3) Phox2b 陽性ニューロンと Phox2b 陰性ニューロンのオレキシン投与に対する応答

実験(2)と同様の方法で Phox2b 陽性ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行い、200 nM のオレキシン A および 200 nM のオレキシン B を灌流投与すると、それぞれ 18 個中 15 個と 8 個中 7 個のニューロンで約 13 mV の脱分極が起き、活動電位が誘発された。一方、Phox2b 陰性ニューロンでは、200 nM のオレキシン A および 200 nM のオレキシン B の投与で、それぞれ 12 個中 3 個と 6 個中 3 個のニューロンで脱分極が起こるのみであった(右図)。

(4) Phox2b 陽性ニューロンの光刺激による活性化の影響

三叉神経上核の上方に光照射のためのプローブを慢性的に設置した Phox2b 陽性ニューロンに ChR2 を発現させたラットを用い、光刺激を行うと、2 匹中 2 匹のラットで咀嚼様の顎運動が誘発された。

以上 4 つの実験結果から、三叉神経上核と結合腕傍核の間には、グルタミン酸作動性で、発火頻度の低い Phox2b 陽性ニューロンが存在し、その活性化によって咀嚼様顎運動が誘発される可能性が示唆された。一方、同部位には GABA あるいはグリシン作動性で、高頻度発火する能力を持ち、三叉神経運動ニューロンを抑制する Phox2b 陰性ニューロンが混在することが明らかとなった。したがって Phox2b 陽性と陰性ニューロンは正反対の性質を持ち、自律神経系の入力を受けて咀嚼運動の制御に関わる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1) Tobe T, Shibata Y, Mochizuki A, Shimomura N, Zhou J, Wurihan, Tanaka R, Ikeda S, Zhang Z, Li Q, Inoue T, Miyazaki T. Nanomechanical characterization of time-dependent deformation/recovery on human dentin caused by radiation-induced glycation. J Mech Behav Biomed Mater, 査読有, 90, 2019, 248-255.

2) Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y, Mabuchi Y, Hata K, Nakamura S, Yasuhara R, Takamatsu K, Irié T, Fukada T, Sakai T, Inoue T, Nishimura R, Ohara O, Saito I, Ohba S, Tsuji T and Mishima K. Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. Nat Commun, 査読有 9, 2018, 4216.

3) 井上富雄: 咀嚼制御の神経メカニズム. 日本咀嚼学会誌, 査読有, 28(2), 2018, 64-71.

- 4) Mochizuki A, Nakayama K, Nakamura S, Dantsuji M, Kamiyo R, Shioda S, Sakurai T, Ozeki M, Inoue T. Involvement of orexin in lipid accumulation in the liver. *J Oral Biosci*, 査読有, 60(3), 2018, 76-82.
- 5) Kiyomoto M, Shirota T, Moriya T, Sato H, Nakamura S, Inoue T. Experimental study on involvement of the central nervous system in inferior alveolar nerve damage-associated hyperalgesia of the mental region. *J Oral Maxillofac Surg*, 査読有, 76(10), 2018, 2089.e1-2089.e8, doi: 10.1016/j.joms.2018.06.021.
- 6) Onimaru H, Nakamura S, Ikeda K, Kawakami K, Inoue T. Confocal calcium imaging analysis of respiratory-related burst activity in the parafacial region. *Brain Res Bull*, 査読有, 139, 2018, 16-20, doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.01.013.
- 7) Matsuda K, Nakamura S, Nonaka M, Mochizuki A, Nakayama K, Iijima T, Yokoyama A, Funahashi M, Inoue T. Premotoneuronal inputs to early developing trigeminal motoneurons. *J Oral Biosci*, 査読有, 59(2), 2017, 96-103.
- 8) 井上富雄, 中山希世美, 中村史朗, 咀嚼の運動制御機構; 網様体 古くて新しいシステム. *Clinical Neuroscience*, 査読無 (依頼原稿), 35(6), 2017, 689-691.
- 9) Inoue T, Nakayama K, Ihara Y, Tachikawa S, Nakamura S, Mochizuki A, Takahashi K, Iijima T. Coordinated control of the tongue during suckling-like activity and respiration. *J Oral Science*, 査読有, 59(2), 2017, 183-188, doi: 10.2334/josnusd.16-0850.
- 10) Nagoya K, Nakamura S, Ikeda K, Onimaru H, Yoshida A, Nakayama K, Mochizuki A, Kiyomoto M, Sato F, Kawakami K, Takahashi K, Inoue T. Distinctive features of Phox2b-expressing neurons in the rat reticular formation dorsal to the trigeminal motor nucleus. *Neuroscience*, 査読有, 358, 2017, 211-226, doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.06.035. Epub 2017 Jul 1.
- 11) Nakamura S, Nagata S, Nonaka M, Nishimura A, Nagoya K, Dantsuji M, Nakayama K, Mochizuki A, Iijima T, Ozeki M, Yamamoto M, Inoue T. Central neural mechanisms involved in the control of jaw movement during postnatal development. *Showa Univ J Med Sci.*, 査読有, 29 (3), 2017, 221-229, <https://doi.org/10.15369/sujms.29.221>
- 12) Saito E, Suzuki D, Kurotaki D, Mochizuki A, Manome Y, Suzawa T, Toyoshima Y, Ichikawa T, Funatsu T, Inoue T, Takami M, Tamura T, Inagaki K, and Kamiyo R. Down-regulation of *Irf8* by *Lyz2-cre/loxP* accelerates osteoclast differentiation *in vitro*. *Cytotechnology*, 査読有, 69(3), 2017, 443-450, doi: 10.1007/s10616-016-0013-z. Epub 2016 Aug 8.

[学会発表](計32件)

- 1) Inoue T: Properties of Phox2b-expressing premotor neurons targeting jaw-muscle motoneurons. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2019.
- 2) Kanamaru M et al.: Effects of optogenetic inhibition of 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus on respiratory control. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2019.
- 3) Nakamura S et al.: Phox2b-expressing neurons in the rat reticular formation dorsal to the trigeminal motor nucleus. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2019.
- 4) 守谷崇ら: 下改善薬の投与による嚙下への影響、第65回昭和大学学士会総会、2018
- 5) Dantsuji M et al.: Activation of 5-HT_{2A} receptor enhances function of GluN2A-containing NMDA receptor via Src kinase in dendrites of rat jaw-closing motoneurons, Society for Neuroscience 48th annual meeting, 2018
- 6) Moriya T et al.: Effects of pharmacological agents administered for swallowing disorders on swallowing motor activity in nerves innervating infrahyoid and laryngeal muscles, Society for Neuroscience 48th annual meeting, 2018
- 7) 中村史朗ら: 閉口筋および開口筋運動ニューロンへの興奮性シナプス伝達の生後発達様式の比較、日本顎口腔機能学会第61回学術大会、2018
- 8) Nakamura S et al.: Developmental alteration of synaptic properties of jaw-closing and jaw-opening motoneurons. *Oral Neuroscience 2018 in Osaka Univ*, 2018.
- 9) 井上富雄: 閉口筋運動ニューロンにおけるグルタミン酸性シナプス応答のセロトニンによる増強。第60回歯科基礎医学会学術大会 メインシンポジウム2「食に関わる運動・感覚の生理学」, 2018.
- 10) 望月文子ら: マウスの脂質代謝におけるオレキシンの影響、第60回歯科基礎医学会学術大会、2018
- 11) 中村史朗ら: 発達期における閉口筋および開口筋運動ニューロンのグルタミン酸入力比較、第60回歯科基礎医学会学術大会、2018
- 12) 池田美菜子ら: マウスの睡眠覚醒ステージにおける咬筋活動に対するSSRIの影響、第60

回歯科基礎医学会学術大会、2018

13) 壇辻昌典ら：咬筋運動ニューロン樹状突起のグルタミン酸応答に対するセロトニンの効果、第60回歯科基礎医学会学術大会、2018

14) Dantsuji M et al.: 5-HT2A receptor mediates enhancement of NMDA receptor function via Src pathway in dendrites of jaw-closing motoneurons in rats, 11th Forum of Neuroscience, 2018

15) 壇辻昌典：シンポジウム「咀嚼筋・舌圧・意識から考える摂食嚥下」, 日本顎口腔機能学会 第61回学術大会, 2018.

16) 池田美菜子ら：マウスの睡眠覚醒ステージにおける咬筋活動に対するSSRIの影響、日本顎口腔機能学会第60回学術大会、2018

17) Moriya T et al.: Effects of Imidapril on swallowing activity in in situ rat preparations, 第95回日本生理学会大会, 2018

18) Shimono S et al.: Postnatal change of glutamatergic synaptic transmission in the jaw-closing and jaw-opening motoneurons, 第95回日本生理学会大会, 2018

19) 田中準一ら、マウスES細胞を用いた3次元唾液腺組織の分化誘導、第17回再生医療学会、2018

20) Mochizuki A et al.: The effects of Citalopram on the masseter muscle activity during non-REM sleep in mice, The 6th Annual International Institute for Integrative Sleep Medicine (IIIS) Symposium, 2017

21) 望月文子ら：マウス咬筋に対するシタロプラムの影響、第11回三叉神経領域の感覚運動統合機構研究会、2017

22) 永田愛ら：咬筋運動ニューロンへのシナプス入力に対するセロトニンの影響、第64回昭和大学学士会総会、2017

23) 田中準一ら：自己組織化技術を用いたマウスES細胞由来3次元唾液腺組織の誘導、第62回日本唾液腺学会総会・学術大会、2017

24) 壇辻昌典ら：咬筋運動ニューロン樹状突起における興奮性シナプス入力のセロトニンによる増幅機構、日本顎口腔機能学会第59回学術大会、2017

25) Mochizuki A et al.: The effect of citalopram administration on the occurrence of vigilance states in the mouse model of depression, The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR), 2017

26) Teshima R et al.: Postnatal changes of glutamatergic inputs to rat jaw-closing and jaw-opening motoneurons, The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR), 2017

27) Nagoya K et al.: Distinctive properties of Phox2b neurons located in the rat reticular formation dorsal to the trigeminal motor nucleus, Society for Neuroscience 47th annual meeting, 2017

28) Nakamura S et al.: Glutamatergic synaptic currents of rat jaw-closing motoneurons during transition period from sucking to chewing, Society for Neuroscience 47th annual meeting, 2017

29) 井上富雄：三叉神経運動核背側網様体 Phox2b ニューロンの生理学的・形態学的解析、日本咀嚼学会第28回学術大会、2017

30) 那小屋公太ら：ラット三叉神経運動核背側網様体に存在する Phox2b 陽性ニューロンの生理学的・形態学的性質、第59回歯科基礎医学会学術大会、2017

31) 那小屋公太ら：ラット三叉神経運動核の背側網様体に存在する Phox2b 陽性ニューロンの電気生理学および形態学的特性は Phox2b 陰性ニューロンと異なる、第59回歯科基礎医学会学術大会、2017

32) 那小屋公太ら：転写因子 Phox2b を発現する三叉神経運動核背側網様体ニューロンの生理学および形態学的解析、日本顎口腔機能学会第58回学術大会、2017

〔図書〕(計 3件)

1) 井上富雄、永末書店、歯周組織の生理学；ザ・ペリオドントロジー 第3版、2019、総ページ数29(79-11ページ)。

2) 井上富雄、永末書店、顎口腔系の機能；新編 顎関節症 改訂版、2018、総ページ数197(37-42ページ)。

3) 井上富雄ほか136名、クインテッセンス出版、日本顎関節学会学術用語集 第1版、2017、総ページ数128。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralphys/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中村 史朗

ローマ字氏名：NAKAMURA, Shiro

所属研究機関名：昭和大学

部局名：歯学部口腔生理学講座

職名：准教授

研究者番号(8桁)：60384187

研究分担者氏名：中山 希世美

ローマ字氏名：NAKAYAMA, Kiyomi

所属研究機関名：昭和大学

部局名：歯学部口腔生理学講座

職名：講師

研究者番号(8桁)：00433798

研究分担者氏名：望月 文子

ローマ字氏名：MOCHIZUKI Ayako

所属研究機関名：昭和大学

部局名：歯学部口腔生理学講座

職名：講師

研究者番号(8桁)：10453648

研究分担者氏名：鬼丸 洋

ローマ字氏名：ONIMARU Hiroshi

所属研究機関名：昭和大学

部局名：医学部生理学講座 生体調節機能学部門

職名：客員教授

研究者番号(8桁)：30177258

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：池田 啓子

ローマ字氏名：IKEDA, Keiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。