

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09689

研究課題名(和文) 光遺伝学的手法を用いたオレキシンの咀嚼運動に関わる調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism for mastication of orexin

研究代表者

池田 美菜子 (Ikeda, Minako)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：90551268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経ペプチドであるオレキシンは三叉神経運動核に作用し、咀嚼筋活動を亢進する作用を示すが、詳細な作用メカニズムは不明である。そこで本研究では、生理的状态のオレキシンが三叉神経領域を介して咀嚼運動にどのように影響するのか、生体レベルで解析した。三叉神経運動核の周囲にオレキシン神経からの投射があるかどうか検討するために、両側の三叉神経運動核に逆行性のAAVベクターである AAV-CAG-tdTomatoを注入し、脳切片を作製して観察したところ、オレキシン産生ニューロンから三叉神経運動核周囲に投射があることが確認できた。このことから、オレキシンが三叉神経運動核に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民の多くが悩んでいる歯ぎしりや食いしばり(まとめてブラキシズムと言う)の治療法を探すために、ブラキシズムがどうして起こるのかメカニズムを探索している。そのメカニズムの1つの候補として、オレキシンという脳内物質が顎を動かす筋肉の調節をしている可能性があったため、オレキシンが顎を動かす筋肉を調節するかどうか調べた。今回の研究では、オレキシンを産生する神経が顎を動かすための神経と連絡していることが明らかとなった。このことから、オレキシンを産生する神経の活動を調節することで、顎の筋肉の活動を調節できる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Orexin, a neuropeptide, acts on the trigeminal motor nucleus and exhibits an action of enhancing masticatory muscle activity, however, the detailed mechanism of action is unknown. In this study, we analyzed how orexin effects masticatory activity through the trigeminal motor nucleus. To examine whether there is projection from the orexin innervation around the trigeminal motor nucleus, the retrograde AAV-CAG-tdTomato was injected into the bilateral trigeminal motor nucleus to prepare a brain section. It was confirmed that there was a projection from the orexin-producing neurons around the trigeminal motor nucleus. This suggests that orexin may have some effects on the trigeminal motor nucleus.

研究分野：神経科学

キーワード：オレキシン 三叉神経運動核 三叉神経中脳路核 光遺伝学 薬理遺伝学 ブラキシズム スポレキサント

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経ペプチドであるオレキシンを産生するニューロンは視床下部外側野に局限して存在し、その軸索を中枢神経系全域に巡らせ、動物の恒常性を維持する様々な作用に影響している (Nambu T et al, *Brain Res*, 1999)。咀嚼に関わる三叉神経領域においても、視床下部のオレキシン産生ニューロンからの軸索の存在や受容体の発現部位などが明らかにされている (Greco MA et al, *Mol Brain Res*, 2001)。オレキシンと咀嚼運動の関与については、オレキシンの脳内過剰投与が咀嚼筋活動を上げること (Yamamoto T et al, *J Neurophysiol*, 2011)、オレキシンを三叉神経運動核に過剰投与すると咬筋活動が亢進すること (J. H. Peever et al, *J Neurophysiol*, 2003)、オレキシンを持続的あるいは異所的に発現させるとレム睡眠中の異常な筋収縮を起こすこと (Willie J. T. et al, *J Mol Neurosci*, 2011) などが報告されている。

我々はパッチクランプ法を用い、歯根膜や閉口筋筋紡錘の感覚情報を中枢に伝える感覚ニューロンである三叉神経中脳路核ニューロンのオレキシン受容体にオレキシンが作用すると三叉神経中脳路核ニューロンの活動が抑制されるという結果を得た (未発表)。このことから、オレキシンの咬合感覚・口腔感覚に応じた咀嚼運動の遂行への関与が示唆された。

2. 研究の目的

オレキシンの三叉神経領域での作用は、単に運動ニューロンや筋活動の興奮性をもたらすだけでなく、感覚情報に応じた、より複雑な咀嚼運動制御に関与していると考えられる。しかしながら、これを生体内の生理的状态で調べた研究はなく、三叉神経運動核におけるオレキシンの作用メカニズムも解明されていない。そこで、咀嚼筋の活動を制御する三叉神経運動核に対してオレキシンがどのように影響するのか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

咀嚼筋の筋活動を 24 時間記録するシステムの構築

実験には、C57BL/6 系統の雄性マウスを用いた。マウスは個別に飼育ケージに入れ、12 時間の明暗サイクル (点灯 [明期] : 午前 8 時 ~ 午後 8 時、消灯 [暗期] 午後 8 時 ~ 午前 8 時) の環境下で飼育し、餌と水は自由摂取とした。マウスにケタミン (100 mg/kg) 塩酸キシラジン (10 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔をした。脳波の記録用ビス電極を頭蓋骨に埋入し、眼電図、頸筋および咬筋の筋電図の記録用ワイヤー電極をそれぞれの筋に刺入した。これらの電極からの接続ケーブルを頭頂部に誘導し、頭蓋骨に歯科用レジンで固定したコネクタに接続した。電極留置後 1 週間は術後の回復期として、個別に飼育ケージに入れて水と餌は自由に摂取できるようにした。回復期を経過したマウスは、記録環境に順応させるため、記録解析システムには接続しないで生体信号記録用のケーブルだけを頭頂部のコネクタに接続し、7 日間時間飼育して、トレーニング期間とした。馴化終了後、午後 8 時より 24 時間、コントロール記録として生体電気信号を記録した。記録された生体電気信号は、増幅器を用いて増幅した後、アナログ/デジタル変換器 (PowerLab®, ADInstruments 社) を用いてデジタル信号に変換し、パーソナルコンピュータ (Dynabook® T552/58FB, TOSHIBA 社) のハードディスクに保存した。脳波の振幅、頸筋および咬筋筋電図、眼電図活動を睡眠覚醒記録解析システム (SleepSign®, キッセイコムテック社) を用いて解析した。得られた脳波、眼電図、頸筋筋電図の記録から、覚醒 (Wake)、ノンレム睡眠 (NREM)、レム睡眠 (REM) に分類し、咬筋筋活動は 10 秒毎のスコアリングエポックを作成し、10 秒エポック毎の積分値を算出した^{1,2)}。筋活動を個体間で比較するために、24 時間の Wake の平均値を 100% として正規化し、Wake、NREM、REM の各ステージにおける、各エポックの筋活動量を % 表示で求めた。また、咬筋 EMG の基底レベルの波形に心電図波形が混入したため、閾値を 15% として、15% 以下は除外して検討した。すべてのデータは 14 日目の 24 時間のデータを 6 時間毎 (20-02 h, 02-08 h, 08-14 h, 14-20 h) に分けて解析し、Wake、NREM、REM の各ステージの時間、Wake、NREM、REM において咬筋活動が認められた時間 (咬筋活動時間) とそのときの平均筋活動量を解析した。

三叉神経運動核に投射する神経の同定

三叉神経運動核に投射する神経を同定するため、三叉神経運動核周囲に逆行性 AAV を投与し、脳内での分泌様式を検討した。まず、マウスにケタミン (100 mg/kg) 塩酸キシラジン (10 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔をした。その後、マウスを脳定位固定装置 (Model 940 Small Animal Stereotaxic Instrument with Digital Display Console, Kopf Instruments 社製) に固定した。頭部の平衡性を確認した後、頭部皮膚を切開し、頭蓋骨を露出させ、Bregma を基準として、両側の三叉神経運動核 (AP, -4.85 mm; ML, ±1.45 mm to bregma; DV, -3.50 mm to brain surface) に逆行性 AAV (AAV-CAG-tdTomato, 59462-AAVrg, Addgene 社製) を 140nL ずつ投与した。投与後、頭部皮膚を

縫合して麻酔からの回復を待ち、手術を終了した。手術後 3 週間経過したとき、マウスを深麻酔させ、心臓から 4% PFA を用いて還流固定を行い、脳を摘出して、4% PFA で 24 時間浸漬固定を行った。24 時間後、30% スクロース溶液に少なくとも 2 日間浸漬した。その後、凍結切片用包埋剤 (O.C.T. compound, サクラファインテックジャパン株式会社製) で包埋し、 -80°C で凍結させた後、脳組織を $40\ \mu\text{m}$ に薄切した。薄切した脳切片は、一次抗体として抗 orexin 抗体 (sc-8071, Santa Cruz Biotechnology 社製)、抗 RFP 抗体 (PM005, MBL 社製)、抗 ChAT 抗体 (AB144P, Merck Millipore 社製)、二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG (Invitrogen 社製)、Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen 社製) を用いて免疫組織化学染色を行った。染色後の脳切片はスライドガラスに張り付けて、封入剤とカバーガラスを用いて封入した (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, H-1500, VECTOR Lab 社製)。封入剤が完全に硬化した後、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700, 株式会社キーエンス社製) を用いて観察を行った。

4. 研究成果

咀嚼筋の筋活動を 24 時間記録するシステムの構築

過去の報告と同様に、マウスの暗期の覚醒時の時間は、明期と比較して有意に長く、暗期の NREM、REM の時間は明期と比較して有意に短く、実験に用いたマウスにおいて暗期が活動期であることが確認された。

咬筋および頸筋の 24 時間での筋活動量の推移を 6 時間毎の平均値で比較した。その結果、Wake と NREM の咬筋および頸筋の平均筋活動量は、暗期もしくは明期の時間内ではほとんど変動がなかったが、暗期から明期での切り替え時に、平均筋活動量が有意に低下した。また、Wake の咬筋および頸筋の平均筋活動量は NREM、REM と比較して 4 倍以上高く、NREM の両筋の平均筋活動量は REM と比較して有意に高いことがわかった。

暗期・明期における咬筋および頸筋の筋活動の時間的経過が同様の傾向を示したので、次に Wake、NREM、REM における咬筋および頸筋の筋活動量の相関関係を検討した。その結果、暗期も明期も同様に、NREM では咬筋の筋活動と頸筋の筋活動は正の相関関係が認められたが、一方、暗期や明期に関わらず、Wake や REM の両筋には相関関係は認められなかった。また、咬筋と頸筋の筋活動は、暗期も明期も同様に、NREM、REM では、咬筋は頸筋と比較してより大きな変動を示したが、Wake では両筋の筋活動量の変動に違いは認められなかった。

上記のように、マウスの脳波、眼電図、頸筋および咬筋の筋電図などの生体電気信号を 24 時間あるいはそれ以上の長時間、記録するシステムはこれまで構築できておらず、特に頸筋および咬筋の筋電図を長時間記録することが可能となった。また、本研究では 1 匹のマウスから脳波、眼電図、頸筋および咬筋の筋電図の 4 種類の生体電気信号を取得したが、最大 8 つの生体電気信号を取得できるシステムに改良することができた。

三叉神経運動核に投射する神経の同定

三叉神経運動核に存在し、咬筋などの咀嚼筋の筋活動を制御する三叉神経運動ニューロンへの直接的な投射部位を同定するために、両側の三叉神経運動核に逆行性 AAV (retroAAV-CAG-tdTomato) を投与し、三叉神経運動核に投射する神経を探索した。その結果、視床下部外側野に局在するオレキシン産生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わかった。このことから、オレキシンが三叉神経運動核に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Katayama K, Mochizuki A, Kato T, et al. Dark/light transition and vigilance states modulate jaw-closing muscle activity level in mice. *Neurosci Res.* 2015; 101: 24-31.
- 2) Ikawa Y, Mochizuki A, katayama K, Kato T, et al. Effects of citalopram on jaw-closing muscle activity during sleep and wakefulness in mice. *Neurosci Res.* 2016, 113: 48-55

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 望月文子, 池田美菜子, 中村史朗, 中山希世美, 壇辻昌典, 加藤隆史, 馬場一美, 井上富雄.
2. 発表標題 マウス咬筋の筋活動に対するSSRIの影響.
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田美菜子, 望月文子, 中村史朗, 中山希世美, 馬場一美, 井上富雄
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会, 福岡
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田美菜子, 望月文子, 中村史朗, 中山希世美, 馬場一美, 井上富雄
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本顎口腔機能学会第60回学術大会, 神奈川
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	井上 富雄 (Inoue Tomio) (70184760)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	

6. 研究組織（つづき）

	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	馬場 一美 (Baba Kazuyoshi) (80251536)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	

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