

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19641

研究課題名（和文）革新技術で咀嚼筋感覚の脳内回路を解明し、世界のコネクトーム研究の新展開に挑戦する

研究課題名（英文）Trial to greatly contribute in the connectome study by evaluating its related brain pathways underlying the processing of masticatory sensations with innovative techniques.

研究代表者

吉田 篤（Yoshida, Atsushi）

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：90201855

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）：脳コネクトーム研究に口腔顎顔面機能の重要性を反映させるに値する研究として、咀嚼筋筋紡錘感覚が入力する三叉神経上核ニューロンの中枢投射の解明を試みた。三叉神経上核ニューロンの標識には、電気穿孔法によるプラスミドの注入とbiotinylated dextranamine（BDA）の細胞近接注入法は容易ではないことがわかった。BDAの細胞外注入法が有効であり、三叉神経上核ニューロンが視床髄板内核群内のoval paracentral nucleusに投射することがわかった。この経路で、咀嚼筋筋紡錘感覚が感覚の弁別や情動に関わる可能性が示された。この経路はEUのコネクトームデータベースに反映された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の深部に存在する三叉神経上核の単一ニューロンの標識に、電気穿孔法によるプラスミド注入法またはbiotinylated dextranamine（BDA）の細胞近接注入法を用いるのは容易ではないが、後者の方が成功の可能性が高いことがわかった。

この標識にはBDAの細胞外注入法が有用であり、三叉神経上核ニューロンが視床髄板内核群内のoval paracentral nucleusに投射し、咀嚼時に発生する筋紡錘感覚が、この経路を介して感覚の弁別に加え情動に関与する可能性が示された。本結果により、咀嚼の生物学的重要性を社会にアピールできた。また、世界の脳内コネクトーム研究に反映させることができた。

研究成果の概要（英文）：To reflect the biological importance of the orofacial functions to worldwide researches of the connectome, we have sought to label the entire axon trajectories of single neurons in the supratrigeminal nucleus (Su5), which transport masticatory sensation. We found that the electroporation method for the plasmid delivery and the juxtacelluar recording-labeling (with biotinylated dextranamine BDA) method are not so easy to label a single Su5 neuron located in the deep brain. Instead, we found that the extracellular injection of BDA into the Su5 is better to label efferent projections from the Su5. The Su5 sent efferent projections to the oval paracentral nucleus in the intralaminar thalamic nuclei. Through this pathway, the masticatory muscle sensation seemed to play a role in emotion as well as in sensory discrimination. This pathway conveying the masticatory sensation and its biological importance were already reflected to the brain connectome database organized by the EU.

研究分野：神経解剖学

キーワード：脳神経解剖学 咀嚼 神経回路 三叉神経上核 視床投射 閉口筋

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳の複雑な神経回路網(コネクトーム、connectome)の解読競争が、脳機能の解明と脳疾患の治療法の開発のためだけでなく、次世代の経済戦略からアメリカを中心に世界中で始まった。日本でも2014年に「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト」(略称「革新脳プロジェクト」)がスタートした(<http://brainminds.jp/>)。我々はこのプロジェクトで開発されたばかりの電気穿孔法で蛍光蛋白を発現させるプラスミド(*Furuta et al. 2001 J Histochem Cytochem 49:1497-507*)を単一ニューロンに注入する技術に、まず注目した。この方法を含む深部ニューロンの標識法を検討し、咀嚼に関わるニューロンの投射様態の解明を目指した。

(2) 口腔顎顔面の機能が生命活動にとって極めて重要であることの社会による理解は、残念ながら十分に高いとは言えない。社会による理解を得るために有効な方策として、口腔顎顔面機能に関わる脳神経機構の研究者である我々は、脳全体のコネクトームのデータに反映させることに値する口腔顎顔面の機能に関わる脳研究を行い、その研究成果を脳全体のコネクトームのデータに反映させることが求められていた。なお、我々が参加しているのはEUのデータベース(neuroVIISAS,<http://neuroviisas.med.uni-rostock.de/connectome/index.php>)であった。

### 2. 研究の目的

(1) これからの脳内神経回路研究に求められている上記の革新脳技術を我々の研究で試み、その有用性を調べることであった。応用可能であることがわかれば、これを学術論文に発表し、世界中の脳神経科学者がこの方法で脳全体のコネクトーム研究を飛躍的に推進させることに貢献することを目的とした。

(2) 口腔顎顔面機能にかかわる我々脳科学研究者が、研究成果を脳全体のコネクトームデータに十分に反映させることによって、口腔顎顔面の機能が生命活動にとって極めて重要であることを、日本ばかりでなく国際社会に訴えることを目的とした。

(3) 本研究で、(2)の脳全体のコネクトームに反映させるのに値する、口腔顎顔面機能にかかわる脳コネクトームを新たに解明することを目的とした。内臓感覚や深部感覚のコネクトームは不明のままであり、また情動などの自律機能との関与も不明なので、歯科領域で重要な咀嚼筋感覚の脳コネクトームを解明し世界に発信することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 全身の筋感覚のモデルとして、咀嚼筋感覚の脳コネクトームの解明を目指した。これには、三叉神経節ニューロンによって伝達される他の口腔顎顔面の感覚とは異なり、咀嚼筋感覚だけは三叉神経中脳路核ニューロンという別のニューロンによって三叉神経上核に伝達される(*Fujio, Yoshida et al. 2016 Neuroscience 324:307-20*)という、体部の感覚系には見られない、三叉神経系のみが持っている“筋紡錘感覚研究上のメリット”を最大限に活用して行った。具体的には、電気生理学的に機能を明らかにした三叉神経上核ニューロンの上位脳(主に視床と小脳)への投射の解明を試みた。

電気生理学的に咀嚼筋感覚の入力を確認した三叉神経上核ニューロンの標識のため、まず、電気穿孔法で蛍光蛋白を発現させるプラスミド(pCAG-palGFP)(Addgene plasmid 11160;*Furuta et al. 2001 J Histochem Cytochem 49:1497-507*)を単一三叉神経上核ニューロンに注入し(電気穿孔法でのプラスミド注入法)、その全投射の様態の解明を目指した。この方法の特徴を詳細に検討した。

(2) (1)の方法の代わりに、咀嚼筋感覚の入力を電気生理学的に確認した単一三叉神経上核ニューロンを標識するため、biotinylated dextranamine (BDA)の細胞近接法を用いて標識した(*Furuta T et al., 2009 J Neurosci, 29:4089-4095; 2011 J Neurosci, 31:6432-6439*)。単一三叉神経上核ニューロンの全投射の様態の解明を目指した。この方法の特徴を詳細に検討した。

(3) 三叉神経上核の電気生理学的同定法の向上を目指した(理由は、結果に記した)。これまでも行っていた咀嚼筋紡錘感覚の賦活に対する応答を記録して、その記録部位にBDAを電気泳動にて注入した。記録波形とBDA注入部位の脳切片上での位置とを慎重に対応させて検討した。この目的の中で三叉神経上核内にBDAが注入された結果、三叉神経上核から投射する軸索が標識されたので、その全投射の解明も目指した。

### 4. 研究成果

(1) プラスミド(pCAG-palGFP)を注入する電気穿孔法による単一三叉神経上核ニューロンの標識を試みた。脳内に刺入したガラス管微小電極を三叉神経上核に刺入し、咬筋神経の電気刺激で誘発される神経応答を細胞外記録して、咬筋紡錘感覚が入力する三叉神経上核に存在する単一ニューロンを探索したが、この探索が予想以上に困難であることが明らかになった。探索によ

って単一三叉神経上核ニューロンと思われたニューロンに電気穿孔法を試みたが、プラスミド (pCAG-paIGFP) 注入によって標識することは極めて困難であることが明らかになった。

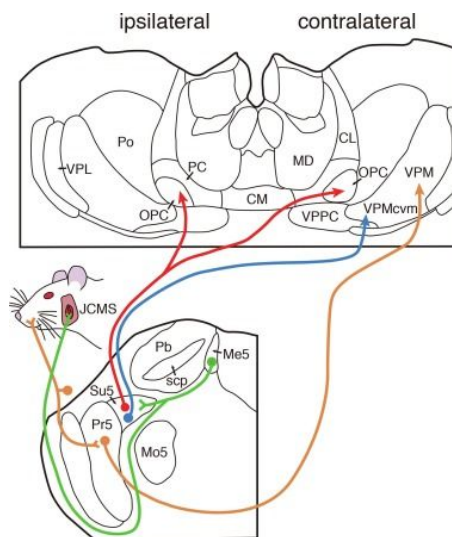
三叉神経上核は小脳下の橋の背部に存在する。電気穿孔法は、脳の深部に存在する単一ニューロンを標識することは極めて困難であると言われてきたが、我々は三叉神経上核が脳の深部であることよりも、脳内の動脈の拍動と呼吸による下位脳幹の移動 (動揺) が悪影響したとの感触を持った。その対策の為、麻酔震度を深くして拍動を抑え、人工肺 (ゴム製バルーン) を使用した人工呼吸を行ってみたが、それでも標識は困難であることが明らかになった。

(2) (1)の結果を受け、神経トレーサーである biotinylated dextranamine (BDA) の細胞近接注入法を採用し、(1)のように電気生理学的に同定された単一三叉神経上核ニューロンの標識を試みた。その結果、標識過程は電気穿孔法よりは良好であったが、数匹のラットのみで単一三叉神経上核ニューロンの細胞体に注入できたのみであった。これらの軸索は、細胞に近い部位のみとそこから分岐する軸索分枝のみが標識されただけで、それよりも遠位までは標識できなかった。BDA を含んだガラス管微小電極の先端と単一ニューロンの細胞膜との接触をより長く、安定して維持することができなかった、と考えられた。その主な原因は、(1)と同様の原因が考えられた。しかし、(1)よりは目的とする標識に近い結果が得られたので、我々の細胞近接注入法自体の skill をもう少し向上できれば、望んでいる標識ができると期待はできることが明らかになった。

(3) 上記のように、電気穿孔法によるプラスミド注入法または BDA の細胞近接注入法を用いて単一三叉神経上核ニューロンの全形の標識は、より多くの動物を用いて手技の向上を図れば、その成功率を上げることは可能と感じた。しかしこれに加え、両方法での標識の成功率を上げるためには、三叉神経上核の位置の電気生理学的同定をより迅速かつ正確に行うことの重要性を痛感した。そこで、三叉神経上核の同定法の改善に努めた。これまで行っていた咀嚼筋筋紡錘感覚の賦活で三叉神経上核から記録される反応波形の読解の仕方を再検討した。記録波形と記録部位に注入した BDA の脳切片上での位置とを対応を丁寧に行って、再検討した。その結果、三叉神経上核の位置の同定が、それまでよりもより迅速かつより正確に行うことができるようになった。

この再検討の過程で、三叉神経上核内に BDA が注入された結果、三叉神経上核から投射する軸索が標識された。これも調べたところ、既に発表済みの、視床の後内側腹側核尾腹内側縁 (VPMcvm) への反対側優位の強い投射 (Yoshida et al. 2017 Brain Struct Funct 222: 2655-2669) に加え、新たに視床髄板内核群内に存在する oval paracentral nucleus (OPC) への両側性の少し弱い投射が見つかった (Sato et al., 2020 Brain Res 1739)。よって、咀嚼筋筋紡錘からの感覚が三叉神経上核経由で OPC に投射されることが明らかになった (右図参照。咀嚼筋筋紡錘 [JCMS] の感覚は、三叉神経上核 (Su5) 経由で、視床の後内側腹側核尾腹内側縁 [VPMcvm] に加え、髄板内核群内の oval paracentral nucleus [OPC] にも伝達される経路 [図中の赤線] が存在することを示している)。また、咀嚼筋筋紡錘感覚は大脳皮質の一次感覚野の 3a 領域に投射されることが他の動物でわかっているので、ラットの OPC から大脳皮質一次感覚野の 3a に相当する部位に投射する可能性が示された。また、VPMcvm から情動に関わる島皮質内の顆粒性島皮質に投射することがわかっている (Sato et al. 2017 Neuroscience 365:158-178) ので、OPC も島皮質に投射して情動に関与する可能性が示された。

本研究で深部感覚の新しい視床投射回路が発見されたので、本研究の目的の一つである「世界中で競われている脳内コネクトーム研究に貢献」できたと思っている。現在、本研究で明らかにできた神経回路の EU のデータベース (neuroV11SAS) への登録を申請中である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsujisaka Akiko, Haraki Shingo, Nonoue Shigeru, Mikami Akira, Adachi Hiroyoshi, Mizumori Takahiro, Yatani Hirofumi, Yoshida Atsushi, Kato Takafumi	4. 巻 62
2. 論文標題 The occurrence of respiratory events in young subjects with a frequent rhythmic masticatory muscle activity: a pilot study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 317 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpjor.2017.12.004	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 Ikenoue Etsuko, Akhter Fatema, Tsutsumi Yumi, Sato Fumihiko, Ohara Haruka, Uchino Katsuro, Furuta Takahiro, Tachibana Yoshihisa, Yoshida Atsushi	4. 巻 1687
2. 論文標題 Transcortical descending pathways through granular insular cortex conveying orofacial proprioception	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 11 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.02.033	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
1. 著者名 Tsutsumi Yumi, Tachibana Yoshihisa, Sato Fumihiko, Furuta Takahiro, Ohara Haruka, Tomita Akiko, Fujita Masatoshi, Moritani Masayuki, Yoshida Atsushi	4. 巻 388
2. 論文標題 Cortical and Subcortical Projections from Granular Insular Cortex Receiving Orofacial Proprioception	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 317 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2018.07.047	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 Sato Fumihiko, Kado Seiya, Tsutsumi Yumi, Tachibana Yoshihisa, Ikenoue Etsuko, Furuta Takahiro, Uchino Katsuro, Bae Yong Chul, Uzawa Narikazu, Yoshida Atsushi	4. 巻 1739
2. 論文標題 Ascending projection of jaw-closing muscle-proprioception to the intralaminar thalamic nuclei in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146830 ~ 146830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2020.146830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 吉田篤、佐藤文彦、古田貴寛
2. 発表標題 咀嚼筋紡錘感覚の機能を脳内伝達経路から考える
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池之上悦子、佐藤文彦、古田貴寛、藤田雅俊、吉田篤
2. 発表標題 閉口筋紡錘の感覚が入力する顆粒性島皮質からの下行路の神経回路構築
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古田貴寛、柴田憲一、吉田篤
2. 発表標題 ラットヒゲ運動に関連する皮質運動野ニューロンの軸索投射様式
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Etsuko Ikenoue, Yumi Tsutsumi, Fumihiko Sato, Haruka Ohara, Katsuro Uchino, Takahiro Furuta, Yume Uemura, Akiko Tomita, Yoshihisa Tachibana, Atsushi Yoshida1
2. 発表標題 Corticofugal pathways from granular insular cortex conveying orofacial proprioception
3. 学会等名 Oral Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田篤、佐藤文彦、村上旬平、谷口あや、中島好明、下田麻央、秋山茂久
2. 発表標題 島皮質に達した咬筋筋紡錘感覚の脳内伝達
3. 学会等名 第25回トゥレット研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口あや、村上旬平、中島好明、下田麻央、佐藤文彦、吉田篤、秋山茂久
2. 発表標題 トゥレット症候群22症例における歯科スプリントのチックに対する治療成績
3. 学会等名 第25回トゥレット研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池之上悦子、佐藤文彦、古田貴寛、吉田篤
2. 発表標題 顆粒性島皮質に伝達された閉口筋筋紡錘固有感覚の脳内伝達機構の解明
3. 学会等名 第94回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堤友美、佐藤文彦、古田貴寛、藤田雅俊、吉田篤
2. 発表標題 顆粒性島皮質に伝達された閉口筋筋紡錘固有感覚の脳内伝達機構
3. 学会等名 第12回三叉神経領域の感覚 運動統合機構研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上村夢、佐藤文彦、古田貴寛、堤友美、吉田篤
2. 発表標題 上肢と頸部の筋紡錘の固有感覚を伝達する外側楔状束核から視床への投射の特徴
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤友美、佐藤文彦、古田貴寛、上村夢、藤田雅俊、森谷正之、吉田篤
2. 発表標題 島皮質に伝達された閉口筋筋紡錘固有感覚の脳内伝達機構の解明
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田貴寛、柴田憲一、竹中綾、吉田篤
2. 発表標題 三叉神経系感覚情報処理における一次感覚野への皮質内線維投射
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumihiko Sato, Yumi Tsutsumi, Haruka Ohara, Yume Uemura, Takahiro Furuta, and Atsushi Yoshida
2. 発表標題 Efferent projections of granular insular cortex receiving proprioception from jaw-closing muscle spindles
3. 学会等名 IBR02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加戸聖也、佐藤文彦、堤友美、池之上悦子、古田貴寛、吉田篤
2. 発表標題 ラットの閉口筋紡錘感覚の視床髄板内核群への伝達路の解明
3. 学会等名 第95回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2019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	古田 貴寛 (Furuta Takahiro)  (60314184)	大阪大学・歯学研究科・講師  (14401)	
研究分担者	佐藤 文彦 (Sato Fumihiko)  (60632130)	大阪大学・歯学研究科・助教  (14401)	
研究分担者	富田 章子 (Tomita Akiko)  (10585342)	大阪大学・歯学部附属病院・医員  (14401)	