

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10061

研究課題名(和文) Phox2B陽性ニューロンを基にした咀嚼運動形成回路の解明

研究課題名(英文) Analysis of neural networks generating masticatory movements based on Phox2B-positive neurons

研究代表者

中山 希世美 (Nakayama, Kiyomi)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：00433798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：咀嚼運動はヒトが効率良くエネルギー摂取をするために重要な運動であるが、その神経回路の理解は遅れている。本研究では、脳幹内の延髄孤束核において、転写調節因子であるPhox2B遺伝子を発現するニューロンが、リズムカルな顎運動の形成に重要な役割を果たす事を明らかにした。このニューロンは、三叉神経上核、中間網様核および後巨細胞性傍核に豊富な出力を送るが、これらの中で、中間網様核および後巨細胞性傍核への出力が、リズムの形成に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咀嚼運動はヒトが生きていくためのエネルギーを食物から効率良く摂取するためにも、脳の活性化を促し健康寿命を延ばすためにも重要な運動である。本研究では、Phox2Bという遺伝子を発現するニューロンの活動を、光遺伝学の技術を用いてコントロールし、咀嚼のリズムジェネレーターを構成する神経回路の一部を明らかにした。この方法は、咀嚼の神経回路の解明に貢献する新たな技術であり、今後、神経回路の解明が飛躍的に進む事が期待される。その結果、高齢者の運動性咀嚼障害の改善のための基礎的知識を得て、健康長寿の実現に貢献することが出来ると考える。

研究成果の概要(英文)：Mastication is an important movement for efficient energy intake in humans, although the neural networks that generate rhythmic jaw movements during mastication are poorly understood. In the present study, we have shown that neurons that express the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in the medullary solitary nucleus in the brainstem play an important role in the generation of rhythmic jaw movements. The neurons sent abundant projections to the supratrigeminal nucleus, the intermediate reticular nucleus, and the nucleus paragigantocellularis posterior. Among these nuclei, projections to the intermediate reticular nucleus and the nucleus paragigantocellularis posterior were suggested to be involved in the rhythm generation of mastication.

研究分野：神経生理学

キーワード：Phox2B 咀嚼 顎運動 チャネルロドプシン 孤束核

1. 研究開始当初の背景

(1) 咀嚼のリズムジェネレーター

ヒトが生きていくためのエネルギーを食物から効率良く摂取するため、咀嚼運動は非常に重要な役割を果たしている。また、咀嚼運動は脳の血流の上昇による神経活動の上昇をもたらすことが報告されており、子供の知育を助け高齢者の認知症予防に繋がると考えられている。咀嚼運動時の顎の動きは、脳幹に存在するリズムジェネレーターと呼ばれる神経回路でつくられることが知られている。この神経回路の構成について知ることは、脳血管疾患の後遺症や神経変性疾患等による運動障害性咀嚼障害を根本的に改善するために重要である。しかしながら、このリズムジェネレーターの構成要素である神経細胞の局在や入出力に関しては、多くの候補が挙げられながらも、明らかになっていなかった。

麻酔下のモルモットの脳幹を大脳、小脳、脊髄から切り離し、脳幹の錐体路を電気刺激すると咀嚼様運動が誘発されることから、脳幹内に咀嚼のリズムジェネレーターが存在することは共通認識となっていた。しかしながら、脳幹内での局在は明らかではなく、脳幹網様体内側部(中村ら)、中間網様核および小細胞網様体(Traversら)、三叉神経主感覚核背側部(Koltaら)、三叉神経上核(Chandlerら)など様々な部位が候補として挙げられていた。これらの部位におけるリズムジェネレーターを構成する細胞の同定は進んでおらず、また、これらの部位への入出力経路も十分に明らかになっていなかった。これらの部位が相互に関係しあって咀嚼運動を発現している可能性もあれば、複数のリズムジェネレーターが独立して存在し、それぞれが異なった形式のリズムを形成することで、咀嚼の複雑な運動パターンを形成している可能性もあるが、これについても仮説の段階であった。

(2) 脳幹の Phox2b 陽性ニューロン

Phox2B 遺伝子は神経堤細胞の転写調節因子をコードしている遺伝子で、呼吸中枢の形成および自律神経系の分化・誘導に重要な役割を果たすことが報告されてきた。Phox2B 遺伝子を発現する神経細胞は脳幹内に広く分布しており、グルタミン酸を神経伝達物質として持つことが知られている。我々は、Phox2B を発現している神経細胞で光活性化タンパク質を発現するトランスジェニックラットを用い、延髄孤束核周囲に光刺激を与えると、顎舌の筋を支配する末梢神経において咀嚼様の神経活動が誘発されることを予備実験において発見していた。本研究で、Phox2B 陽性ニューロンを軸に咀嚼を誘発する神経回路と関係する細胞群の同定を行うことで、咀嚼運動のリズムジェネレーターの構成を明らかにするきっかけとなることが期待された。

2. 研究の目的

(1) 孤束核の Phox2B 陽性ニューロンが咀嚼運動の形成に果たす役割の解明

本研究は、延髄孤束核周囲の Phox2B 陽性ニューロンが咀嚼運動の誘発にどのように関与するのかを明らかにする目的で行った。孤束核は味覚を含む口腔感覚が入力する部位であるが、これまで咀嚼運動の誘発部位としては報告されておらず、咀嚼運動の形成に関わる新規の部位である可能性が考えられた。孤束核に存在する Phox2B 陽性ニューロンが、咀嚼運動を形成する神経回路の中でどのような役割を担うのか調べ、その下流に存在すると思われる咀嚼運動を起こす神経回路が、どこに局在するどのような性質の神経細胞からなるのかを明らかにする。これにより、高齢者の運動性咀嚼障害の改善のための基礎的知識を得て、健康長寿の実現に貢献する。

(2) 咀嚼運動のリズムジェネレーターを構成するニューロンの同定

Phox2B 陽性ニューロンは、運動ニューロンに直接出力を送る神経細胞が数多く存在し咀嚼運動の形成に重要な働きをされると考えられている三叉神経上核や小細胞性網様体/中間網様核にも多く存在する。これらの部位について、Phox2B 陽性ニューロンを手がかりに、咀嚼のリズムジェネレーターを構成する神経回路の一部を明らかにする。これまで、咀嚼運動のリズムをつくるリズムジェネレーターの局在は、物理的な破壊実験や、グルタミン酸などの興奮性伝達物質の局所投与などで調べられてきた。本研究では、Phox2B という特定の遺伝子を発現する神経細胞に注目し、咀嚼運動を形成する神経回路内での特定の遺伝子を発現する細胞の役割を明らかにする。このことは、咀嚼運動の神経回路を形成する細胞群の電気生理学的な性質や神経伝達物質による分類に、遺伝学的な分類を新たに加えることになり、神経回路の解明をさらに一歩進めるという意味がある。

3. 研究の方法

(1) 除脳動脈灌流標本を用いた孤束核の咀嚼様運動誘発部位の同定

吻尾方向に伸びる孤束核のどの部分の Phox2b 陽性ニューロンが咀嚼様の顎運動の誘発に関与しているかを、除脳動脈灌流標本を用いて調べた。実験には、Phox2B を発現している神経細胞で、青色の光刺激により活性化する光活性化タンパク質チャンネルロドプシン FR (ChRFR) を発現するトランスジェニックラット (Phox2B-ChRFR ラット) を用いた。2~3 週齢のラットで除脳動脈灌流標本を作成し、孤束核を含む脳幹背側表面の様々な部位を、青色 LED を用いて 2 mW の強度で光刺激した。咀嚼様の顎運動の指標には、咬筋神経、顎舌骨筋神経および舌下神経からの複合活動電位の記録を用いた。

(2) Phox2B-ChRFR ラットの孤束核 Phox2B 陽性ニューロンの活性化による咀嚼様運動の誘発

Phox2B-ChRFR ラットの孤束核に光刺激用のファイバークニューレを挿入し、自由行動下での光刺激により誘発される顎運動を観察した。Phox2B 陽性ニューロンを活性化させるための光刺激には青色 LED を用い、1~5 mW の刺激強度で 1 秒間の光照射を行った。顎運動の観察のためにビデオ撮影を行うとともに、咬筋と顎二腹筋からの筋電図記録を行った。実験後は、脳の組織標本を作製し、光刺激用のカニューレを挿入した位置を確認することにより、咀嚼を誘発する Phox2B 陽性ニューロンの孤束核での局在を明らかにした。

(3) 咀嚼様運動を誘発する孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの出力先の検討

孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの出力先のうち、どこへの出力が咀嚼運動を起こすために有効なのかを調べた。Phox2B を発現している神経細胞で DNA 組換え酵素 Cre を発現するトランスジェニックラット (Phox2B-cre ラット) を用い、孤束核の咀嚼運動誘発部位にアデノ随伴ウイルス AAV1-Ef1a-DIO-EYFP を注入することで、孤束核咀嚼誘発部位の Phox2B 陽性ニューロンを特異的に蛍光標識し、その投射先を組織学的に解析した。さらに、AAV1-Ef1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP を用いて孤束核咀嚼誘発部位の Phox2B 陽性ニューロン特異的に青色の光刺激により活性化する光活性化タンパク質チャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させた。投射先のうち主要な部分に光刺激用のカニューレを挿入し、青色 LED を用いて 2 mW の刺激強度で 2, 5, 10, 20, 50 Hz の光刺激をそれぞれ 30 秒間与えた。顎運動の観察のためにビデオ撮影を行うとともに、咬筋と顎二腹筋からの筋電図記録を行った。

(4) 咀嚼様運動を誘発する孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの出力先の逆行性のアデノ随伴ウイルスを用いた確認

逆行性のアデノ随伴ウイルス AAVrg-Ef1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP を孤束核咀嚼誘発部位の Phox2B 陽性ニューロンの投射先に注入し、それぞれの投射先に軸索を伸ばす孤束核の Phox2B 陽性ニューロンに ChR2 を発現させた。孤束核に光刺激カニューレを挿入し、青色の光刺激を行うことで、孤束核の咀嚼様運動を誘発する Phox2B 陽性ニューロンの出力先を確認した。

(5) 孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの出力先の抑制による咀嚼運動への影響の検討

Phox2B-ChRFR ラットにデザイナー受容体 (DREADD) システムを用いることで、孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの出力先のニューロン活動を抑制させ、咀嚼運動への影響を検討した。アデノ随伴ウイルス AAV2-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry を孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの投射先に注入することにより、デザイナー受容体である hM4D(Gi) をニューロン特異的に発現させた。そのリガンドである化学物質 CNO を腹腔内投与することによって、孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの投射先のニューロン活動を低下させた。この結果、咀嚼様運動の抑制が起こるかどうかを調べ、咀嚼運動の形成に重要な部位を明らかにした。

(6) Phox2B-ChRFR ラットの三叉神経上核および小細胞性網様体/中間網様核 Phox2B 陽性ニューロンの活性化による咀嚼様運動の誘発

三叉神経上核や小細胞性網様体/中間網様核の Phox2B 陽性ニューロンが咀嚼運動の形成に関与しているかを調べた。Phox2B-ChRFR ラットの三叉神経上核もしくは小細胞性網様体/中間網様核に光刺激のためのカニューレを挿入し、光刺激による Phox2B 陽性ニューロンの活性化で咀嚼運動が誘発されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 除脳動脈灌流標本を用いた孤束核の咀嚼様運動誘発部位の同定

Phox2B-ChRFR ラットで除脳動脈灌流標本を作製し、孤束核を含む脳幹背側表面の様々な部位を光刺激したところ、吻尾方向に伸びる孤束核の中央付近への光刺激で、顎舌骨筋神経と舌下神経にリズムカルな神経活動が見られた。咬筋神経の神経活動は顎舌骨筋神経および舌下神経に比べて小さかった。この結果から、孤束核の吻尾方向の中央部分に存在する Phox2B 陽性ニューロンが、リズムカルな顎運動の形成に関与していることが示唆された。

(2) Phox2B-ChRFR ラットの孤束核 Phox2B 陽性ニューロンの活性化による咀嚼様運動の誘発

Phox2B-ChRFR ラットの延髄孤束核に挿入した光刺激用のカニューレを介して、青色 (470 nm, 1-5 mW, 1 秒間) の光刺激を行ったところ、咬筋と顎二腹筋にリズムカルな筋活動が誘発された。咬筋の筋活動と顎二腹筋の筋活動のタイミングは同期しているが、咬筋の活動が顎二腹筋の活動に先行して出ている。筋活動の誘発に同期して、口の開閉運動が観察された。リズムの平均頻度は 4.69 Hz であった。咬筋で観察されたリズムカルな筋電図バーストの平均持続時間は 120 msec、顎二腹筋で観察されたリズムカルな筋電図バーストの平均持続時間は 126 msec で、ほぼ同じであった。一方、咬筋でのバースト最大振幅の平均は 0.16 mV、顎二腹筋でのバースト最大振幅の平均は 0.31 mV であり、顎二腹筋が優位なリズムであった。これらの結果から、延髄孤束核の Phox2B 陽性ニューロンは、顎二腹筋優位のリズムカルな顎運動の形成に関与していることが示唆された。

(3) 咀嚼様運動を誘発する孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの出力先の検討

延髄孤束核の Phox2B 陽性ニューロンを活性化することにより誘発されるリズムカルな顎運動に関与する神経核について調べた。Phox2B-cre ラットを用い、孤束核の咀嚼運動誘発部位にアデノ随伴ウイルス AAV1-Ef1a-DIO-EYFP を注入することで、孤束核咀嚼誘発部位の Phox2B 陽性ニューロンの投射先を調べたところ、三叉神経上核、中間網様核および後巨細胞性傍核に多くの投射が見られた。孤束核への AAV1-Ef1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP の注入により、孤束核咀嚼誘発部位の Phox2B 陽性ニューロン特異的に ChR2 を発現させ、これらの投射先それぞれを光刺激したところ、中間網様核および後巨細胞性傍核では、青色の光刺激により、咬筋と顎二腹筋にリズムカルな筋活動が誘発された。一方、三叉神経上核の光刺激では、20 Hz での刺激でのみ、わずかにリズムカルな筋活動が見られた。これらの結果から、延髄孤束核の Phox2B 陽性ニューロンは、主に、中間網様核と後巨細胞性傍核を介して、咀嚼様の顎運動の形成に関与していることが示唆された。

(4) 咀嚼様運動を誘発する孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの出力先の逆行性のアデノ随伴ウイルスを用いた確認

逆行性のアデノ随伴ウイルス AAVrg-Ef1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP を三叉神経上核、中間網様核もしくは後巨細胞性傍核に注入し、孤束核での光刺激を行った。その結果、中間網様核もしくは後巨細胞性傍核への逆行性アデノ随伴ウイルスの注入では、青色 (470 nm, 1-2 mW, 2-50 Hz) の光刺激により、咬筋と顎二腹筋でリズムカルな筋活動が誘発された。一方、三叉神経上核では、リズムカルな筋活動は見られなかった。これらの結果から、延髄孤束核の Phox2B 陽性ニューロンは、主に、中間網様核と後巨細胞性傍核を介して、咀嚼様の顎運動の形成に関与していることが確認された。

(5) 孤束核の Phox2B 陽性ニューロンの出力先の抑制による咀嚼運動への影響の検討

Phox2B-ChRFR ラットに DREADD システムを用いて中間網様核もしくは三叉神経上核のニューロンの活動を抑制したところ、中間網様核の抑制では孤束核の刺激によるリズムカルな筋活動が減弱したが、三叉神経上核の抑制では変化しなかった。これらの結果から、延髄孤束核の Phox2B 陽性ニューロンが、中間網様核を介して、咀嚼様の顎運動の形成に関与していることがさらに裏付けられた。

(6) Phox2B-ChRFR ラットの三叉神経上核および小細胞性網様体/中間網様核 Phox2B 陽性ニューロンの活性化による咀嚼様運動の誘発

延髄孤束核と同様に多くの Phox2B 陽性ニューロンが存在する三叉神経上核および小細胞性網様体/中間網様核の咀嚼様運動の誘発について調べた。Phox2B-ChRFR ラットの三叉神経上核/小細胞性網様体/中間網様核の青色 (470 nm, 1-5 mW, 1sec) の光刺激では、刺激開始から 500 msec ほど遅れて、咬筋と顎二腹筋の両方に 4-6 Hz のリズムカルな筋活動が見られた。これらの筋活動は、位相にずれがあり、咬筋の活動が顎二腹筋の活動に先行して起こっていた。また、三叉神経上核への光刺激を行ったところ、8-10 Hz のリズムカルな筋活動が見られた。これらの結果から、孤束核のみならず、三叉神経上核や小細胞性網様体/中間網様核の Phox2B 陽性ニューロンも、咀嚼様の顎運動の形成に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ofuji T, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Dantsuji M, Ishiguro M, Yamamoto M, Inoue T	4. 巻 738
2. 論文標題 Responses evoked by electrical stimulation of the brainstem reticular formation in the jaw-opening and hypoglossal motor nerves of an arterially perfused rat preparation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135-400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2020.135400	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 Ishiguro M, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Dantsuji M, Ihara Y, Inoue T.	4. 巻 192
2. 論文標題 Involvement of ghrelin in the regulation of swallowing motor activity in an arterially perfused rat preparation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Research Bulletin	6. 最初と最後の頁 62-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainresbull.2022.11.006	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakayama K, Ofuji T, Nakamura S, Mochizuki A, Dantsuji M, Ishiguro M, Yamamoto M, Inoue T
2. 発表標題 Responses evoked by electrical stimulation of the brainstem reticular formation in the mylohyoid and hypoglossal nerves of an arterially perfused rat preparation
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inoue T, Moriya T, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Dantsuji M, Shirota T
2. 発表標題 Facilitatory effects of the ACE inhibitor imidapril on swallowing motor activity in nerves innervating the infrahyoid and laryngeal muscles in an arterially perfused rat preparation
3. 学会等名 FENS2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ofuji T, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Dantsuji M, Inoue T
2. 発表標題 Induction of masticatory rhythmic motor activity using in situ rat preparation
3. 学会等名 第63回 日本顎口腔機能学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishiguro M, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Dantsuji M, Ihara Y, Inoue T.
2. 発表標題 Ghrelin-induced enhancement of swallowing motor activity in an arterially perfused rat preparation. (2/
3. 学会等名 第100回 日本生理学学会
4. 発表年 2023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)	

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
---------	---------