

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10064

研究課題名(和文) In vivo Ca<sup>2+</sup>イメージングの4次元解析による島皮質感覚情報処理機構解明

研究課題名(英文) Sensory information processing in the insular cortex: 4D analysis with in vivo calcium imaging

研究代表者

藤田 智史 (FUJITA, Satoshi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00386096

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)：動物の歯根膜に刺激を行うと、島皮質と二次体性感覚野の境界領域が強く応答し、上顎臼歯、下顎臼歯を刺激した時の応答領域は大半がオーバーラップしている。本研究では、2光子励起顕微鏡によるカルシウムイメージングを用いて、この領域に存在する個々の神経細胞が、上顎、下顎の刺激に対してどのように応答するのかを検討した。その結果、上顎、下顎のどちらの方に、より優位に応答するかという違いはあったものの、どちらかだけに応答するという神経細胞は少数であった。これらの結果から、島皮質と二次体性感覚野の境界領域の大半の神経細胞は上顎、下顎のどちらからも情報を受け取る機構になってい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

しばしば、歯科臨床において、痛みの原因が上顎か下顎か、患者自身では区別できないことがある。島皮質と二次体性感覚野の境界領域は歯を刺激した時に強く応答する場所で、歯の感覚情報を処理する重要な脳領域と考えられている。今回の研究では、この領域で歯根膜刺激に反応する神経細胞は、優位性があるものの上顎と下顎の両方に反応するものが大半であることが示された。もし、この領域に存在する神経細胞の興奮の度合いで上顎下顎を分別しているのであれば、強い刺激が入力された時や情報処理に関わる神経ネットワークに変化などが生じた時に、上下顎を区別するのに影響する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The information from the periodontal ligaments is primarily processed in the cortical region between the insular cortex and secondary somatosensory cortex. In this region, most areas in responses to maxillary molar periodontal ligament stimulation overlap the areas in responses to mandibular that. In this study, we performed calcium imaging with two-photon microscopy to investigate the responses to the maxillary and mandibular molar periodontal ligament stimulation at the cellular level. Although the neural responses varied among the neurons responding to the maxillary and mandibular molar periodontal ligament stimulation, the majority of neurons responded in both the maxilla and mandible. In addition, the minor neurons responded to either maxillary or mandibular molar periodontal ligament stimulation. These results suggested that most neurons processing molar periodontal ligament information receive information from both the maxilla and mandible.

研究分野：常態系口腔科学

キーワード：2光子励起顕微鏡 カルシウムイメージング 島皮質 二次体性感覚野 歯根膜

### 1. 研究開始当初の背景

末梢から運ばれる感覚情報は脳皮質の体性感覚野において処理される。体性感覚を処理するにあたり、身体各領域の位置関係が体性感覚野内にマップのように再現されており、体部位局在と呼ばれている。過去の膜電位感受性色素を用いた光学計測法による検討から、上下顎の臼歯歯根膜を刺激した時の脳皮質の応答は、一次体性感覚野 (S1) と二次体性感覚野と島皮質の境界領域 (S2/IOR) から興奮伝播が起こり、周囲に拡がることになっている。S1 と比較して S2/IOR における応答性は高く、そのため、特に S2/IOR は歯根膜の感覚情報処理に主体的な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、S2/IOR における上下顎の臼歯歯根膜刺激に対して応答する領域の大半は重なっており、体部位局在が明確とは言い難い。我々は普段であれば上下顎のどちらの歯からの感覚かを識別可能だが、しばしば、臨床では上下顎の区別が困難となる「歯痛錯誤」や「関連痛」と呼ばれる、「痛み」の原因部位と、「痛い」と自覚する部位の間が乖離した症状が認められる。もし、S2/IOR が上顎、下顎の部位情報の分別に関わっているのであれば、この体部位局在の乏しさは歯痛錯誤などの感覚異常の原因に関わっている可能性が考えられる。しかしながら、この S2/IOR における歯根膜の情報処理において、個々のニューロンが上顎、下顎の刺激に対して異なる応答性を有しているのかどうかについては完全には明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、S2/IOR に存在する歯根膜感覚情報を処理する個々のニューロンが、上下顎歯根膜刺激時にどのような応答を示すかを明らかにすることを目的とした。すなわち、もし、上顎に反応するニューロンと下顎に反応するニューロンが S2/IOR 内に混在しているのであれば、体部位局在は乏しくとも、上顎と下顎の分別は S2/IOR 内の個々のニューロン単位で行われていることとなる。一方で、上顎と下顎の両方に反応するニューロンで占められているのであれば、S2/IOR 以外の領域が上顎なのか、下顎なのかという位置情報の処理を担っていると考えられる。本研究では、2光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージングによって上顎臼歯歯根膜、下顎臼歯歯根膜をそれぞれ電気刺激した時の個々のニューロンの応答を記録し、検討した。

### 3. 研究の方法

本研究では、興奮性ニューロンにカルシウム指示タンパクである GCaMP6s を発現させた遺伝子改変マウス (GCaMP6s マウス) を用いた。GCaMP6s は活動電位発生に伴い、細胞内カルシウム濃度が上昇すると興奮したニューロンの蛍光輝度が上昇するという性質を有している。また、GCaMP6s は他の類似物質と比較して、非常に S/N 比が高く、輝度変化の持続時間が長いという特徴を有している。これを利用して、2光子励起顕微鏡によるカルシウムイメージングを行った。実験では、GCaMP6s マウスにウレタン麻酔を行い、右側上下顎の臼歯歯根膜に刺激電極を挿入した。マウスを観察台に固定後、頭蓋骨を切削し、左側の S2/IOR 上に小さい骨窓を形成した。その後、上顎臼歯歯根膜、下顎臼歯歯根膜をそれぞれ刺激 (5 V、50 ms 間隔で 10 回) した時の応答を記録した。応答の記録は脳表から 90 ~ 410 μm の範囲で、1 μm ずつ観察する深さを変えながら行い、3次元 + 時間軸のデータとした。

### 4. 研究成果

上顎、下顎の臼歯歯根膜に電気刺激をした際の GCaMP6s 蛍光強度の変化を 2光子励起顕微鏡で記録した (視野の大きさ, 0.51 mm × 0.51 mm, 512 × 512 pixels; サンプルレート, 30 Hz)。

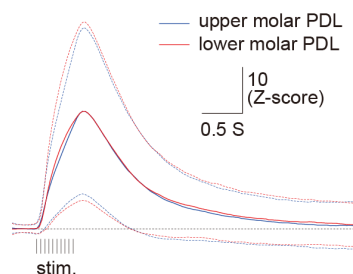


図 1 上下顎の臼歯歯根膜 (periodontal ligament, PDL) を電気刺激した時の各ニューロンにおける蛍光強度の経時変化を平均したもの (n = 1826)。下部の縦線は刺激 (stim.) のタイミング。破線は SD の範囲。

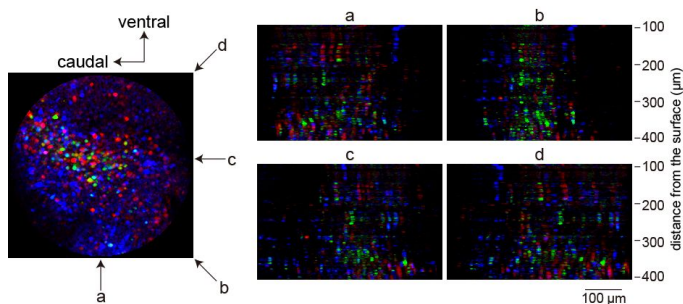


図 2 左: 脳表から深部に向かって応答するニューロンを重ね合わせた例。上顎 (青)、下顎 (赤)、上顎と下顎両方 (緑) の臼歯歯根膜刺激に高い応答をした領域。右: 左図の の方向から観察した時の応答を重ね合わせて観察したもの。3次元的に応答を示したニューロンの位置が再現されている。

得られたデータは深さ方向を含む空間フィルター処理などにより画像のスムージングを行い、ベースラインから 3SD 以上の輝度上昇を示したピクセルを検出した。刺激開始から最大応答に至るまでの時間を解析した結果、ほぼ 1.5 s 以内であり、その範囲における最大輝度変化を基準として 3D 画像を構成した (図 1, 2)。図 2 で示すように、S2/TOR において上顎刺激に対する応答部位、下顎刺激に対する応答部位が混在して認められ、この傾向はこの例以外でも同様であった。

その後、ニューロンの大きさを踏まえ、現在開発中のソフトウェアを用いて、箱状 (10  $\mu\text{m}$   $\times$  10  $\mu\text{m}$   $\times$  9  $\mu\text{m}$ ) の ROI を設定し、刺激に対する蛍光輝度の経時変化を解析した (図 3)。

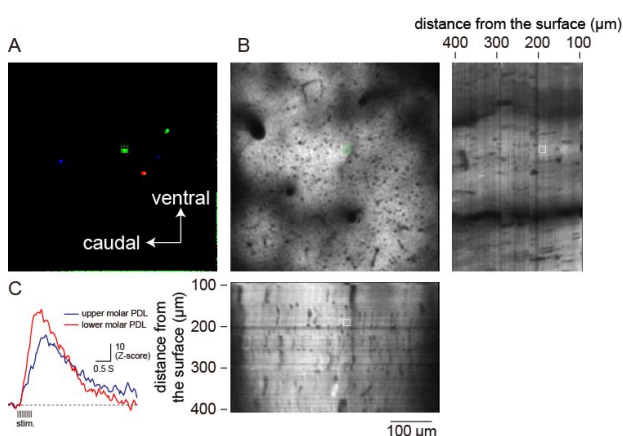


図 3 白歯歯根膜刺激に対する応答例。  
A: 上顎 (青) 下顎 (赤) 上顎および下顎 (緑) を刺激した時にベースラインから 3SD 以上の輝度変化があったものをカラーコードした。視野は脳表から深部に向かって観察した時のもの。ボックスは ROI の位置を示す。B: 表から深部に向かって観察した時の視野、深さ方向に断面上にした時の視野におけるバックグラウンドイメージ。ROI は A と B で同じ位置。C: A と B において示した ROI における蛍光輝度の経時変化。上顎、下顎いずれにも応答するが、下顎に対してより強い応答性を示している。

ボックス状の ROI から得られた輝度変化値を解析した (N=8, n=1826)。ベースラインの 3SD 以上の連続した蛍光輝度上昇が 500 ms 以上認められた応答を有意な応答とした。脳表 (101  $\mu\text{m}$ ) から深層 (400  $\mu\text{m}$ ) にかけての応答ニューロンの分布は図 4 の通りであった。

latency (応答潜時) の平均と sem は上顎  $92.2 \pm 2.2$  ms (n=1765)、下顎  $96.9 \pm 2.4$  ms (n=1735)、time to peak (最大応答に達するまでの時間) の平均と sem は上顎  $554.5 \pm 3.1$  ms、下顎  $551.0 \pm 3.6$  ms、最大応答の Z-score の平均と sem は上顎  $27.1 \pm 0.4$ 、下顎  $27.0 \pm 0.5$  であり、これらの値においては上顎と下顎の間に有意な差は認められなかった。一方で、rise time (最大応答時の輝度の 20% から 80% まで上昇するのにかかる時間) の平均と sem は上顎  $330.3 \pm 2.2$  ms、下顎  $308.7 \pm 2.8$  ms で下顎白歯歯根膜刺激時の方が有意に短かった (*t*-test,  $p < 0.001$ )。

得られたニューロン 1826 個に対して、91 例が上顎のみに応答し、61 例が下顎のみに応答した。また、上下顎いずれにも応答しているものは 1674 例であった。すなわち、ほとんどのニューロンは上下顎のいずれにも応答を示した。しかしながら、応答の大きさは図 1 に示したようにばらつきが大きいものであった。そこで、上顎、下顎のどちらにも同じように応答するのか、それともどちらかに優位に応答するのかを解析するため、散布図を作成した (図 5)。

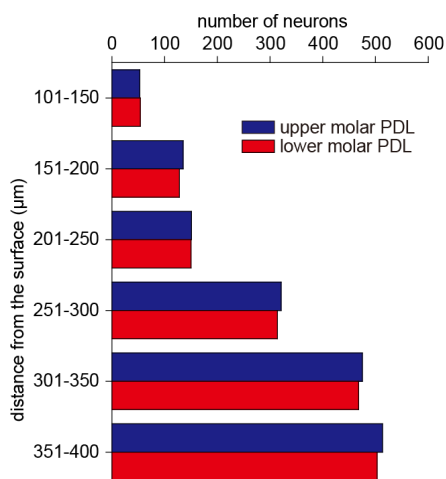


図 4 応答部位の垂直的分布。  
上顎白歯歯根膜刺激、下顎白歯歯根膜刺激に対する応答が得られた深さは、上顎、下顎特に大きな差は認められなかった。表層に対して深層にいくほど、応答部位が増加する傾向が認められる。

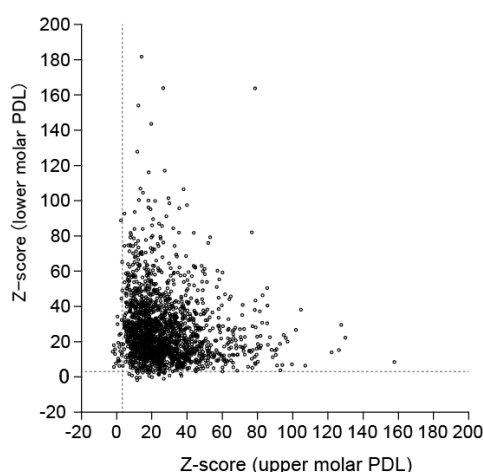


図 5 上顎白歯歯根膜刺激と下顎白歯歯根膜刺激に対する最大応答の Z-score の散布図。  
多くの例で上下顎いずれにも 3SD 以上の蛍光輝度変化を伴う応答が認められた。縦、横の破線は 3SD のライン。

図5の散布図で示すように、上顎臼歯歯根膜刺激に対する応答が大きい場合、下顎臼歯歯根膜刺激に対する応答も大きいというような相関関係は認められなかった。一方で、上顎刺激、下顎刺激に対してどちらにも同じ様な大きさを示す応答から、上下顎のどちらかにより大きな応答をしていると考えられる応答まで幅広いパターンが含まれていることが示唆された。

図5からは、どちらかに優位に反応していると思われるニューロンのクラスターは認められなかった。優位性を検討するため、過去の眼球優位性に関して検討した手法 (Mrsic-Flogel et al., 2007, *Neuron*. 54, 961-972) を参考に顎優位性 (jaw dominance, JD) を求めた。JD score は上顎臼歯歯根膜刺激時の最大応答を上顎と下顎臼歯歯根膜をそれぞれ刺激した時の最大応答の和で割った値とし、上顎および下顎のいずれにも応答するニューロンの集計に用いた (図6)。

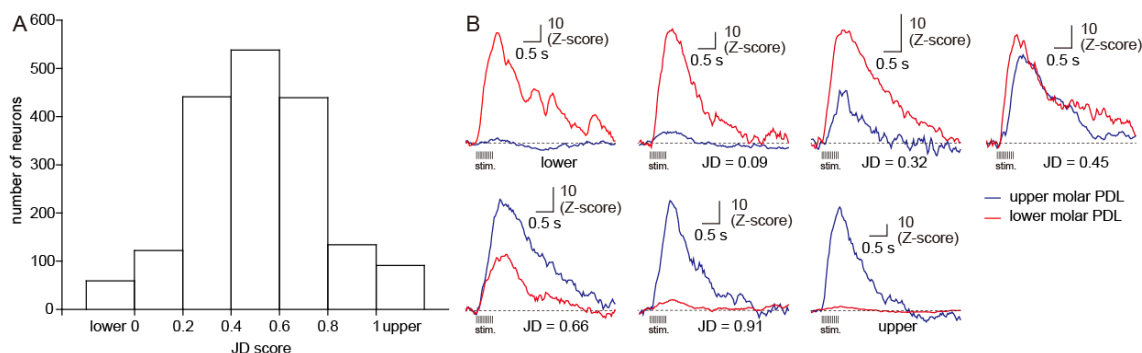


図6 JD score に基づいたニューロン数 (A) と上下顎臼歯歯根膜刺激に対する応答例 (B)。A の lower、upper はそれぞれ、下顎の刺激のみに有意な応答を示したもの、上顎の刺激のみに有意な応答を示したものを示している。B の下部の縦線は刺激 (stim.) のタイミング。

その結果、上下顎の両方に反応したニューロンのうち、一部のニューロンは上顎、下顎どちらかに優位性を持って反応していることが示唆された。また、S2/IOR におけるニューロンの上顎、下顎に対する優位性は、JD score による分布から特に上顎、下顎のどちらが多いというような傾向は認められなかった。

本研究では、上顎と下顎の臼歯歯根膜を刺激した時の感覚情報処理に大きな役割を果たしていると考えられる大脳皮質の S2/IOR に着目をして、2 光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージングを行い、この領域に存在する個々のニューロンの応答性を検討した。その結果、応答性を示すニューロンは大脳皮質 2/3 層の深層に、より多く分布していることが示唆された。また、上顎、下顎のどちらかだけに応答性を示すニューロンは、存在しているものの少数であり、大半はどちらの刺激に対しても応答性を示した。上顎、下顎のどちらにも応答するニューロンは、その応答の大きさから上顎優位、下顎優位という特性を持って反応しているニューロンが一定数存在していると考えられた。これらのことから、S2/IOR に存在するニューロンは、上顎、下顎の部位情報に関しての分別も行っている可能性が考えられた。多くのニューロンは上顎、下顎に対する優位性はあるつつも、上顎、下顎の刺激に対してどちらにも応答を示していることから、神経の可塑的な変化などによって応答性が変化した場合、部位の分別に影響する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zama M, Fujita S, Nakaya Y, Tonogi M, Kobayashi M	4. 巻 10
2. 論文標題 Preceding administration of minocycline suppresses plastic changes in cortical excitatory propagation in the model rat with partial infraorbital nerve ligation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Neurol.	6. 最初と最後の頁 1150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2019.01150	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 -
1. 著者名 Noma D, Fujita S, Zama M, Mayahara K, Motoyoshi M, Kobayashi M	4. 巻 1728
2. 論文標題 Application of oxytocin with low-level laser irradiation suppresses the facilitation of cortical excitability by partial ligation of the infraorbital nerve in rats: An optical imaging study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 146588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2019.146588	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 Shinoda M, Fujita S, Sugawara S, Asano S, Koyama R, Fujiwara S, Soma K, Tamagawa T, Matsui T, Ikutame D, Ando M, Osada A, Kimura Y, Kobayashi K, Yamamoto T, Kusama-Eguchi K, Kobayashi M, Hayashi Y, Iwata K	4. 巻 21
2. 論文標題 Suppression of superficial microglial activation by spinal cord stimulation attenuates neuropathic pain following sciatic nerve injury in rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E2390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21072390	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 -
1. 著者名 Kirihara Yuki, Zama Manabu, Fujita Satoshi, Ogisawa Shouhei, Nishikubo Shuichi, Tonogi Morio, Kobayashi Masayuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Asymmetrical organization of oral structures in the primary and secondary somatosensory cortices in rats: An optical imaging study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Synapse	6. 最初と最後の頁 e22222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/syn.22222	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 Kobayashi Shutaro, O'Hashi Kazunori, Kaneko Keisuke, Kobayashi Satomi, Ogisawa Shouhei, Tonogi Morio, Fujita Satoshi, Kobayashi Masayuki	4. 巻 64
2. 論文標題 A new phenotype identification method with the fluorescent expression in cross-sectioned tails in Thy1-GCaMP6s transgenic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 156 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnugd.21-0528	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3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林秀太郎、藤田智史、新井嘉則、小林真之
2. 発表標題 上下顎臼歯歯根膜刺激に应答するニューロンの3次元的分佈解析
3. 学会等名 第13回 三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野間 大地、藤田 智史、小林 真之
2. 発表標題 眼窩下神経部分結紮が誘発する大脳皮質応答増強はオキシトシン処置、低出力レーザー照射で抑制される
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田智史
2. 発表標題 下歯槽神経損傷後の口腔顔面領域へ痛み刺激に対する大脳皮質応答の変化
3. 学会等名 第25回日本口腔顔面痛学会総会・学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学歯学部薬理学講座  
<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/pharmacology/>

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
研究協力者	小林 真之 (Kobayashi Masayuki) (00300830)	日本大学・歯学部・教授  (32665)	2光子励起顕微鏡を用いたイメージング全体に関わる支援
研究協力者	新井 嘉則 (Arai Yoshinori) (20212607)	日本大学・歯学部・教授  (32665)	4次元解析に関わるソフトウェア開発の支援
研究協力者	小林 秀太郎 (Kobayashi Shutaro)	日本大学・歯学部  (32665)	2光子励起顕微鏡イメージングデータ採取の協力
研究協力者	中野 善夫 (Nakano Yoshio) (80253459)	日本大学・歯学部・教授  (32665)	抽出データの集計支援ソフトウェアの提供

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