

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19274

研究課題名（和文）抑制系とシナプス刈り込みを介した咀嚼筋痛障害の原因の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the causes of masticatory muscle pain disorders through the inhibitory system and synaptic pruning

研究代表者

古川 みなみ（Furukawa, Minami）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00806474

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）：我々は、幼少期ストレスの1つである母子分離をマウスに行い、GABAスイッチのタイミングが変化するか、GABAスイッチに關与する、KCC2やNKCC1の発現が変化するか、抑制系の成熟に關与することが示唆されているシナプスの刈り込みは影響を受けるのかを調査した。その結果、母子分離によりGABAスイッチが遅延すること、KCC2の細胞体周囲の発現は減少するが、NKCC1の発現は母子分離により影響を受けないことを示した。また、抑制系の成熟が正常に行われないことで、シナプスの刈り込みが正常に行われないこともわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
精神疾患や発達性障害、筋異常疼痛などの発症の予防、改善に、KCC2 や GABA スイッチを介した、抑制系の成熟を標的とした新たな治療法の確立が期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it is reported that child neglect and abuse are involved in the onset of mental disorders, developmental disorders, abnormal muscle pain, etc. However, the detailed mechanism and cause are unknown. We have discovered that  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) acts excitatory in order to form normal neural circuits during the newborn period, and that it is necessary to change its function to inhibitory at a certain timing. Therefore, we conducted mother-infant separation, which is a form of childhood stress, on mice in a child abandonment model. We decided to investigate whether mother-infant separation changes the timing of the GABA switch. We also investigated whether mother-infant separation changes the expression of KCC2 and NKCC1 and whether it affects synaptic pruning. The results showed that mother-infant separation delays the GABA switch and decreases KCC2 expression around the cell body, but NKCC1 expression around the cell body is not affected by mother-infant separation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：幼少期ストレス GABAスイッチ KCC2 NKCC1 シナプス 筋異常疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

筋異常疼痛は繊維筋痛症などにみられる全身の耐え難い自発痛と痛覚過敏を特徴とする状態である。しかし、これらの疾患に器質的な異常がみられないため、診断が困難であり、有効な治療法も確立されていない。近年、この筋異常疼痛が幼少期ストレスにより誘発されることが報告された。また、幼少期ストレスにより、精神疾患や発達障害といった様々な疾患が起こることも報告されている。しかし、これらの原因、メカニズムの詳細は解明されていない。

中枢神経系の機能獲得はある一定のタイミングにて、どのような脳機能が発現するのか決まっていると言われている。このような脳神経発達に敏感な時期に、神経回路網に問題が起きると、生涯において非常に強い影響を及ぼす可能性がある。このような敏感な時期のひとつで、マウスにおいて生後1~2週にて、抑制系の主要な神経伝達物質のγ-アミノ酪酸(GABA)は興奮性から抑制性に機能変化する。これをGABAスイッチという。GABAスイッチのタイミングはクロライドイオン( $Cl^-$ )の共輸送体の機能バランスによって決定される。主要な $Cl^-$ の共輸送体は細胞内の $Cl^-$ を減少させる $K^+ - Cl^-$ 共輸送体(KCC2)と細胞内の $Cl^-$ を増加させる $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$ 共輸送体(NKCC1)である。GABAスイッチの遅延は中枢神経系における興奮性および抑制性ニューロンの不適切な生理学的バランスをもたらす可能性があり、不適切な興奮性/抑制性バランスは神経発達障害にてみ込まれている。

KCC2およびNKCC1のGABAスイッチにおいて重要な分子だが、KCC2およびNKCC1に対する幼少期ストレスの影響は完全には解明されていない。幼少期ストレスとKCC2に関するこれまでの研究では、幼少期ストレスの一つである母子分離において、KCC2は増加するまたは減少するといった異なる結果が得られている。しかし、これからは異なる評価方法を用いており、KCC2およびNKCC1の活性は細胞内での発現に比例するため、細胞内での発現を評価すべきだと考えられる。

成体ラットにおいて、慢性ストレスの影響を最も受けやすい領域として、海馬のCA3が報告されている。反復性の母子分離は一種の慢性ストレスとみなすことができるが、幼少期ストレスの評価はCA1では行われているが、CA3では行われていない。また、母子分離ストレスに対するCA3領域の脆弱性は調査されていない。さらに、精神神経疾患の多くが思春期に初めて現れるが、マウスの思春期相当での脳や行動に対する母子分離の影響もあまり報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は新生児マウスに母子分離を行い、KCC2またはNKCC1の発現が変化するか、GABAスイッチ時期は影響されるのか、思春期相当時期において海馬関連の行動試験を行い行動に変化が現れるのか調査することとした。

## 3. 研究の方法

マウスの飼育環境は12時間の明暗サイクルで行った。C57BL6Jマウスを搬入後1週間の馴化期間をおき、雄と雌を1ペアずつ同じゲージに入れ交配させ、実験には産まれた雄性新生児マウスを使用した。幼少期ストレスの一つである母子分離を新生児マウスに、生後1~21日の21日間、1日3時間行った。母子分離は元のゲージから遮断された環境でヒーティングパッドで温められた別のゲージにて行った。母子分離を行う群を母子分離群、行わない群をコントロール群とした。すべての新生児マウスは生後22日で離乳し、群ごとに集団飼育した。

生後7、14、21、35日にて、脳を摘出し、免疫染色にてKCC2およびNKCC1の定量解析を行った。

生後2、8、11、15日にて、脳を摘出し、 $Ca^{2+}$ イメージングにて、GABAの応答を確認した。GABAスイッチのタイミングを決定するために、 $Ca^{2+}$ イメージングにて、GABAアゴニストのムシモールは生後2日、8日、11日、15日での海馬CA3にて、脱分極または過分極として機能するのか評価した。脱分極反応であり、ムシモール誘発性 $Ca^{2+}$ 応答を示すニューロンの割合を二元配置分散分析によって分析した。

思春期相当時期の行動解析として、生後35~38日にオープンフィールド試験、新奇物質探索試験、高架十字迷路試験、攻撃行動計測システムを使用した攻撃行動試験をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) 海馬におけるKCC2およびNKCC1の発現について

海馬領域で細胞体周囲でのKCC2の発現は、生後7日、14日、21日、35日で、CA3およびCA1の錐体細胞において母子分離群で有意に少なかった。また、歯状回(DG)の顆粒細胞におけるKCC2の発現は生後7日、35日において有意差はなかったが、生後14日、21日において母子分離群で有意に少なかった。

NKCC1の細胞体周囲の発現は生後7日、14日、21日、35日において海馬のCA3、CA1、DGいずれの領域でも母子分離群、コントロール群で有意差はみられなかった。

(2)  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを用いた GABA スイッチ時期の検討について

生後 2 日ではムシモールはコントロール群および母子分離群の両方のマウスに由来する CA3 ニューロンにおいて 100%の  $\text{Ca}^{2+}$  応答を誘導した。生後 8 日、11 日では、ムシモール誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  応答は、コントロール群よりも母子分離群のニューロン割合が高かった。生後 11 日のコントロール群では  $\text{Ca}^{2+}$  応答を検出することができなかったが、生後 11 日の母子分離群では約 20%に  $\text{Ca}^{2+}$  応答があった。生後 15 日では、コントロール群および母子分離群の両群とも  $\text{Ca}^{2+}$  応答を検出することができなかった。

(3) 思春期相当時期の海馬関連の行動試験における行動の変化について

オールフィールド試験において、母子分離群のマウスは自発的活動の増加を示した。新奇物質探索試験では、母子分離群ではより長い総探索時間を示したが、コントロール群のマウスよりも新しい対象を識別することができなかった。高架十字迷路試験では、母子分離群のマウスはオープンアームへの進入時間、進入回数が増加した。攻撃行動計測システムを使用した攻撃行動試験では、母子分離群のマウスはコントロール群よりも強い噛みこみ強度とより多くの噛みこみ回数を示した。

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 0件）

1. 著者名 オノ木みなみ, 八木孝和, 楠元淳也, 大賀泰彦, 前田綾, 宮脇正一	4. 巻 81
2. 論文標題 顎口腔機能の改善が認められた顔面非対称を有する骨格性 級ハイアングル症例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Investigative orthodontics-Japanese Edition	6. 最初と最後の頁 85-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 前田綾, オノ木みなみ, 日野 沙耶佳, 南 弘之, 宮脇 正一	4. 巻 81
2. 論文標題 外傷で喪失した上顎左側中切歯の空隙を矯正歯科治療で閉鎖した開咬を伴う骨格性 級症例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Investigative orthodontics-Japanese Edition	6. 最初と最後の頁 19-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋広太郎, 前田綾, 大賀泰彦, 福嶋美佳, 中川祥子, 大迫佑季, 古川みなみ, 原田真利那, 成昌建, 上村修司, 井戸章雄, 宮脇正一
2. 発表標題 酸刺激時の食道知覚が咀嚼筋活動と嚥下回数に及ぼす影響について
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会 & 第9回日韓ジョイントシンポジウム
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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