

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19614

研究課題名（和文）咀嚼と機能関連する唾液分泌の中樞神経メカニズムの解明

研究課題名（英文）Research for the neural mechanisms of mastication-induced salivary secretion

研究代表者

井上 富雄（Inoue, Tomio）

昭和大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：70184760

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）：咀嚼運動時には大量に唾液が分泌される。咀嚼に伴って唾液を分泌させる神経メカニズムを明らかにするため、尾側小細胞性網様体（rPCRt）に存在するPhox2b陽性ニューロンと唾液腺を支配する上唾液核ニューロンの生理学的特性・シナプス伝達様式を解析した。その結果、rPCRtに存在するPhox2b陽性ニューロンは、興奮性のプレモーターニューロンである可能性が示された。さらに、これらの領域を興奮させると、上唾液核ニューロンにシナプス応答が誘発された。したがって、上唾液核背側のrPCRt Phox2b陽性ニューロンは、興奮性の出力を上唾液核ニューロンに送り、唾液分泌制御に関わる可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、rPCRtに存在するPhox2b陽性ニューロンが顎運動制御機構だけでなく、唾液分泌機構にも関与する可能性が示された。これらの成果は、咀嚼に伴う唾液分泌の神経制御メカニズムの解明に大きく寄与するとともに、この性質の基盤となる分子機構にアプローチすることで口腔乾燥症治療の創薬につながる可能性がある。さらに、その分子マーカーを利用して、光遺伝学による唾液分泌関連ニューロンの活動をコントロールすることが可能となり、唾液分泌研究ならびに口腔乾燥症治療法の確立が飛躍的に発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Mastication promotes salivary secretion more strongly, suggesting a neural basis for mastication-induced salivary secretion. To explore this possibility, this study analyzed the neuronal and synaptic properties of Phox2b-positive (Phox2b+) neurons distributed in the rostral parvocellular reticular formation (rPCRt). The Phox2b+ rPCRt neurons were predominantly excitatory glutamatergic premotor neurons for the trigeminal motoneurons, with low frequency firing properties, and the activation of these neurons using glutamate uncaging and ChRFR photoactivation elicited synaptic responses in the parasympathetic preganglionic neurons in the superior salivatory nucleus in rats. These results suggest that Phox2b+ rPCRt neurons may contribute to the coordination of salivation and mastication.

研究分野：口腔生理学

キーワード：唾液分泌 咀嚼 Phox2b陽性ニューロン 上唾液核ニューロン 生理学的特性

1. 研究開始当初の背景

加齢や疾患などで唾液分泌が低下すると咀嚼や嚥下が困難になり、栄養失調や誤嚥性肺炎のリスクが高まる。例えば、60歳以上の高齢者の20%以上が唾液分泌低下による口腔乾燥症状を訴えるが、根本的な治療法は確立されていない。咀嚼運動時には、味刺激単独と比べて大量に唾液が分泌される。粉碎された食片は、唾液と混じって適度な流動性を持った食塊になり、円滑に咀嚼と嚥下が行われる。すなわち咀嚼には唾液分泌が必須であり、咀嚼に伴って唾液を分泌させる神経メカニズムが存在する可能性が高い。

橋・延髄の小細胞性網様体 (PCRt) には、唾液分泌の一次中枢である上唾液核と下唾液核が存在する。我々は、同部に閉口筋の活動を上げるニューロンが多数存在することを示した⁽¹⁾⁽²⁾。さらに同部は、咀嚼のパターン形成に関わる領域と考えられている⁽³⁾。したがって咀嚼に伴って唾液を分泌させる神経回路が PCRt に存在する可能性がある (図1)。自律神経中枢の発生に関わる転写調節因子の Phox2b 遺伝子を発現するニューロンは、上記の PCRt にも多数存在し、ほとんどが興奮性ニューロンである。このことから、Phox2b 陽性ニューロンが上唾液核ニューロンを興奮させるニューロンである可能性が高い。そこで、Phox2b 陽性ニューロンが咀嚼に伴って唾液を分泌させる役割を果たすという仮説を着想した。一方、Phox2b 陽性ニューロンは存在部位によって CO₂ 感受性などの性質に違いがある⁽⁴⁾。そこで上唾液ニューロンを興奮させるニューロンを同定し、他の領域の Phox2b 陽性ニューロンと比較を行い、生理学的特性の背景にある因子を明らかにすることが重要だと考えられる。

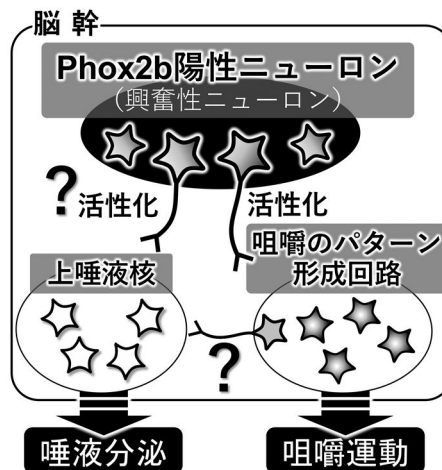


図1 咀嚼と唾液分泌の神経機構の仮説

2. 研究の目的

本研究では Phox2b 陽性ニューロンに着目し、尾側の PCRt (rPCRt) に存在する Phox2b 陽性ニューロンの形態学的・電気生理学的特性を検索し、さらに唾液腺を支配する上唾液核ニューロンおよびそれらを興奮させて唾液分泌を促す中枢ニューロンの生理学的特性・シナプス伝達様式を調べることで、咀嚼に伴って唾液を分泌させる中枢神経メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) rPCRt に存在する Phox2b 陽性ニューロンの形態学的・電気生理学的特性の検索

本研究は、昭和大学動物実験実施指針に基づいて施行した。実験には、2~11日齢の Phox2b-EYFP ラット (n = 75) を用いた。Phox2b 陽性ニューロンの脳幹内分布と神経伝達物質を検索するため、免疫組織化学染色と *in situ* hybridization を行った。電気生理学的・形態学的特性の検索には、矢状断脳幹スライス標本を使用した。イソフルラン深麻酔下にて動物を断頭し、混合ガス (95% O₂、5% CO₂) で飽和させた氷冷スクロース置換人工脳脊髄液 (Sucrose ACSF) 中で、閉口筋および開口筋運動ニューロンの存在する三叉神経運動核と rPCRt を含む脳幹部を摘出した。Sucrose ACSF の組成は以下の通りである (mM): 260 sucrose、3 KCl、2 CaCl₂、2 MgCl₂、1.25 NaH₂PO₄、26 NaHCO₃、10 glucose。摘出した脳幹を振動刃ミクロトーム (7000smz-2、Campden Instruments 社) を用いて三叉神経運動核と rPCRt を含む矢状断脳幹スライス標本 (厚さ 400 μm) を作製した。スライス標本を 34°C で 1 時間、室温で 30 分以上インキュベートした後、正立顕微鏡に設置した記録用チャンパーにスライス標本を移し、記録用 ACSF を灌流させた。記録用 ACSF の組成は以下の通りである (mM): 130 NaCl、3 KCl、2 CaCl₂、2 MgCl₂、1.25 NaH₂PO₄、26 NaHCO₃、10 glucose。rPCRt の Phox2b 陽性ニューロンおよび陰性ニューロンを蛍光顕微鏡下で同定した後、近赤外微分干渉顕微鏡下でホールセルパッチクランプ記録を行った。その後、biocytin または neurobiotin による細胞内染色を行った。さらに、他脳領域との結合関係を調べるために、Phox2b 陽性ニューロンが豊富に存在する三叉神経運動核背側網様体 (RdV) と孤束核を電気刺激した際に、Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンに応答がみられるかどうか解析した。

(2) Phox2b 陽性ニューロン - 上唾液核ニューロン間のシナプス伝達機序の解析

実験には、7~12日齢の Phox2b-EYFP ラット (n = 57) および Phox2b ニューロンにチャンネルロドプシン (ChRFR) を発現する Phox2b-ChRFR ラット (n = 5) を用いた。上述の方法にて矢状断脳幹スライス標本を作成した。脳組織採取の 2~3 日前に、逆行性蛍光トレーサーである 10% dextran-TexasRed をイソフルラン麻酔下のラットの舌神経にハミルトンシリンジを用いて注入した。色素が軸索中を逆行性に輸送される性質を利用して、顎下腺を支配する上唾液核ニューロンの細胞体を標識した。蛍光顕微鏡下で同定した上唾液核ニューロンからホールセルパッチクラ

ンプ記録を行い、rPCRt をケージドグルタミン酸のアンケーシングによる薬物刺激、またはChRFRの光刺激を行い、誘発されるシナプス後電流を解析した。

4. 研究成果

(1) rPCRt に存在する Phox2b 陽性ニューロンの形態学的・電気生理学的特性の検索

免疫組織化学染色より、Phox2b 陽性ニューロンが rPCRt に高密度に存在することが示された⁽⁵⁾。in situ hybridization では、Phox2b 陽性 RdV ニューロンと同様⁽⁴⁾、Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンの大部分がグルタミン酸性であった ($91.3 \pm 1.2\%$)。電気生理学的解析では、rPCRt には高頻度または低頻度の活動電位を示す Phox2b 陽性・陰性ニューロンが存在した。64.8%の Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンと、49.3%の Phox2b 陰性 rPCRt ニューロンが低頻度型を示し、陽性ニューロンの方が低頻度型の割合が高かった。自発的な活動電位を示す Phox2b 陽性ニューロンは、RdV (1.8%) よりも rPCRt (23.8%) と高い割合を示した。RdV を電気刺激すると、半数以上のニューロンでシナプス後電流が誘発されたが、孤束核の刺激に応答したニューロンは 10%であった。形態学的解析では、Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンの半数 (5/10) が三叉神経運動核内に軸索を伸張しており、中には顔面神経核の背側、腕傍核に軸索を伸張しているものも存在した (図 2)。

本研究より、Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンの大部分がグルタミン酸性で、軸索を三叉神経運動核に伸張していたことから、Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンが興奮性出力を三叉神経運動核に送るプレモーターニューロンであると考えられた。また、Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンは、RdV の Phox2b 陽性ニューロンと同様に、低頻度型の活動電位発火を示すニューロンが多かったが、その割合が RdV と異なることから、脳領域ごとに Phox2b 陽性ニューロンの population が異なる可能性が考えられた。さらに RdV の電気刺激で応答が得られたことから、Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンは他の顎運動関連領域と神経回路を形成することで、顎運動の制御に関与することが示された。軸索を三叉神経運動核だけでなく上唾液核の存在する顔面神経の背側領域や自律機能に関する腕傍核に伸張しているものが存在したことから、Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンの中には顎運動制御のみならず、唾液分泌や他の自律機能にも関与している可能性が考えられた。

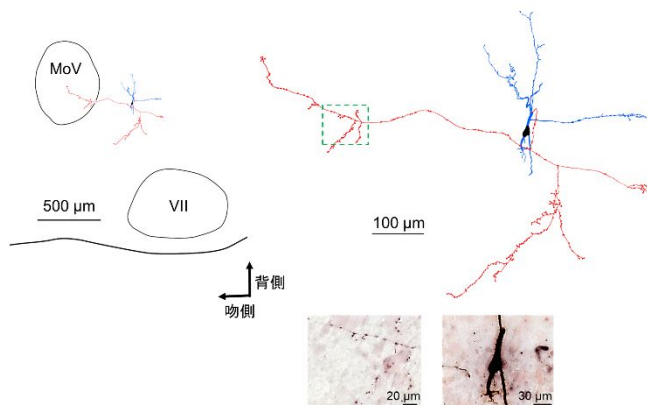


図 2 Phox2b 陽性ニューロンの投射

(2) Phox2b 陽性ニューロン - 上唾液核ニューロン間のシナプス伝達機序の解析

スライス標本上にケージドグルタミン酸を灌流投与し、rPCRt において Phox2b 陽性ニューロンが多数存在する部位に、格子状にレーザー光照射を行ってケージドグルタミン酸からのグルタミン酸解離で同部のニューロンを刺激することで、上唾液核ニューロンに興奮性の出力を送るニューロンの存在部位を探った。その結果、60%の上唾液核ニューロンに上唾液核背側の rPCRt 領域のグルタミン酸刺激により興奮性のシナプス応答が誘発された。さらに、Phox2b-ChRFR ラットの rPCRt 領域に光刺激を行ったところ、光刺激に対して 5 例中 3 例の上唾液核ニューロンで内向き電流が誘発された。これらの結果より、上唾液核背側の Phox2b 陽性 rPCRt ニューロンは、興奮性の出力を上唾液核ニューロンに送り、唾液の分泌の制御に関わる可能性が明らかとなった。

引用文献

1. Takamatsu J, Inoue T, Tsuruoka M, Sukanuma T, Furuya R, Kawawa T. Involvement of reticular neurons located dorsal to the facial nucleus in activation of the jaw-closing muscle in rats. *Brain Res.* 1055: 90-102, 2005.
2. Gamba-Nishimura A, Inoue T, Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Shintani S, Yoshimura S.

Properties of synaptic transmission from the reticular formation dorsal to the facial nucleus to trigeminal motoneurons during early postnatal development in rats. *Neuroscience* 166: 1008-1022, 2010.

3. Travers JB, Herman K, Travers SP. Suppression of 3rd ventricular NPY-elicited feeding following medullary reticular formation infusions of muscimol. *Behav Neurosci.* 124: 225-233, 2010.

4. Nagoya K, Nakamura S, Ikeda K, Onimaru H, Yoshida A, Nakayama K, Mochizuki A, Kiyomoto M, Satoh F, Kawakami H, Takahashi K, Inoue T. Distinctive features of Phox2b-expressing neurons in the reticular formation dorsal to the trigeminal motor nucleus. *Neuroscience.* 358: 211-226, 2017.

5. Kajiwarra R, Nakamura S, Ikeda K, Onimaru H, Yoshida A, Tsutsumi Y, Nakayama K, Mochizuki A, Dantsuji M, Nishimura A, Tachikawa S, Iijima T, Inoue T. Intrinsic properties and synaptic connectivity of Phox2b-expressing neurons in rat rostral parvocellular reticular formation. *Neurosci Res.* 178: 41-51, 2022.

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishiguro Mitsunori, Nakayama Kiyomi, Nakamura Shiro, Mochizuki Ayako, Dantsuji Masanori, Ihara Yoshiaki, Inoue Tomio	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 -
1. 著者名 Koyama Shiori, Nakayama Kiyomi, Mochizuki Ayako, Dantsuji Masanori, Nakamura Shiro, Maki Koutaro, Inoue Tomio	4. 巻 65
2. 論文標題 Optical imaging of neurons related to fictive swallowing using GCaMP6f in an arterially perfused rat preparation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 126～131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2023.01.009	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 Risa Kajiwara, Shiro Nakamura, Keiko Ikeda, Hiroshi Onimaru, Atsushi Yoshida, Yumi Tsutsumi, Kiyomi Nakayama, Ayako Mochizuki, Masanori Dantsuji, Akiko Nishimura, Satoshi Tachikawa, Takehiko Iijima, Tomio Inoue	4. 巻 178
2. 論文標題 Intrinsic properties and synaptic connectivity of Phox2b-expressing neurons in rat rostral parvocellular reticular formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 41-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.12.009	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 Abe Yoshifumi, Yagishita Sho, Sano Hiromi, Sugiura Yuki, Dantsuji Masanori, Suzuki Toru, Mochizuki Ayako, Yoshimaru Daisuke, Hata Junichi, Matsumoto Mami, Taira Shu, Takeuchi Hiroyoshi, Okano Hideyuki, Ohno Nobuhiko, Suematsu Makoto, Inoue Tomio, Nambu Atsushi, Watanabe Masahiko, Tanaka Kenji F.	4. 巻 4
2. 論文標題 Shared GABA transmission pathology in dopamine agonist- and antagonist-induced dyskinesia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 101208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xcrm.2023.101208	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上富雄, 中山希世美, 中村史朗, 梶原里紗, 望月文子, 壇辻昌典
2. 発表標題 転写調節因子Phox2bを発現するニューロンの咀嚼様顎運動リズム形成と唾液分泌制御に対する役割
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inoue T, Noguchi T, Kajiwara R, Nakayama K, Mochizuki A, Dantsuji M, Nakamura S.
2. 発表標題 Differential postnatal development of excitatory and inhibitory synaptic inputs to jaw-closing and jaw-opening motoneurons
3. 学会等名 Society for Neuroscience 52nd annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2022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
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koyama S, Nakayama K, Mochizuki A, Dantsuji M, Nakamura S, Maki K, Inoue T.
2. 発表標題 ラットの動脈灌流標本を用いたGCaMP6fによる嚥下関連ニューロンの光学的解析
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梶原里紗, 中村史朗, 池田啓子, 鬼丸洋, 吉田篤, 堤友美, 中山希世美, 望月文子, 壇辻昌典, 飯島毅彦, 井上富雄
2. 発表標題 ラット小細胞性網様体に存在するPhox2b発現細胞の生理学的・形態学的特性解析
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石黒光哲, 中山希世美, 中村史朗, 望月文子, 壇辻昌典, 井上富雄
2. 発表標題 動脈灌流ラットにおいて上喉頭神経刺激により誘発された嚥下時神経活動へのグレリンの効果
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片桐崇史, 橘吉寿, 中山希世美, 望月文子, 壇辻昌典, 井上富雄, 中村史朗
2. 発表標題 in vivoカルシウムイメージングによる咀嚼大脳皮質活動パターンの解析
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 井上富雄	4. 発行年 2022年
2. 出版社 口腔保健協会	5. 総ページ数 96
3. 書名 口腔生理学から見た咀嚼の重要性；咀嚼の本3 噛むことの大切さを再認識しよう	

1. 著者名 井上富雄	4. 発行年 2023年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 320
3. 書名 歯周組織の生理学；ザ・ペリオドントロジー 第4版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学歯学部口腔生理学講座 研究業績 https://www10.showa-u.ac.jp/~oralphys/gyoseki.html
--

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	中村 史朗 (Nakamura Shiro) (60384187)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	
研究分担者	中山 希世美 (Nakayama Kiyomi) (00433798)	昭和大学・歯学部・准教授 (32622)	
研究分担者	望月 文子 (Mochizuki Ayako) (10453648)	昭和大学・歯学部・講師 (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	壇辻 昌典 (Dantsuji Masanori) (60826634)	昭和大学・歯学部・助教 (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