

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592750

研究課題名(和文) 三叉神経運動ニューロンの樹状突起における情報処理機構

研究課題名(英文) Dendritic signal processing in the trigeminal motoneurons

研究代表者

井上 富雄 (Inoue, Tomio)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：70184760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：三叉神経運動ニューロンは極めて発達した樹状突起を持っているが、樹状突起上に存在するカルシウムチャンネルなどがシナプス後電位を増幅し、複雑な情報処理を行っている可能性が考えられる。そこで、まず二光子励起顕微鏡を用い三叉神経運動ニューロンの樹状突起各部位のカルシウムイオン動態について解析したところ、三叉神経運動ニューロンの樹状突起はシナプス入力を受動的に細胞体へと伝えるだけでなく、それ自体が興奮性を持つことによってシナプス入力情報の増幅や加工など複雑な情報統合処理を行っている可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The dendrites of neurons have long been considered as electrically passive structures that merely transmit synaptic potentials to the soma. However, the recent studies have shown that the dendrites of some neurons are not only passive but also contain voltage-sensitive conductances that cause an excitation and affect synaptic integration. In this study, we used the two-photon calcium imaging techniques to explore the active dendritic properties in response to the action potentials (APs) in soma of trigeminal motoneurons. We found that the dendrites of trigeminal motoneurons have active properties that could serve as the amplification and modification of synaptic inputs and the regulation of dendritic excitability contribute to the prevention of irregular excitability of trigeminal motoneurons in pathological conditions such as bruxism.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生理学 咀嚼 脳幹スライス標本 三叉神経運動ニューロン 樹状突起

1. 研究開始当初の背景

咀嚼筋の活動調節は、歯根膜機械受容器や閉口筋紡錘が感知した食物の性状に関する感覚情報をもとに、脳が適切な咀嚼の運動指令を形成し、その運動指令が最終的に三叉神経運動ニューロンに伝えられて下顎が運動することで実現されている。最終的に運動指令を受ける三叉神経運動ニューロンは生体内で最も大きな細胞のひとつで、シナプス入力を受容する部位である樹状突起は極めてよく発達しており、ラットでも樹状突起の直径は1 mmを超える。したがって、シナプス入力によって生じた電位変化(シナプス後電位)を受動的に細胞体に伝えるだけだと、樹状突起の先端部分にシナプス後電位が発生する場合は、細胞体まで伝導する間に振幅が著しく減弱する。しかし、ニューロンの樹状突起には電位依存性(電位変化によって開閉する)のイオンチャンネルがあり、このイオンチャンネルの働きで樹状突起上でシナプス後電位を増幅し、複雑な情報処理を単一の運動ニューロン上で行っていると考えられるようになってきた。しかし、多くの樹状突起は複雑に分岐し電氣的に一様な構造でないため、解析に有効な手段が無かった。

申請者はこれまで、咀嚼活動調節の中枢神経機構を探るべく、三叉神経運動ニューロンの発火パターンなどの基本的な膜特性を解析し(*J Neurophysiol* 1994, 1997 & 1999; *Brain Res* 2002)、口腔領域の感覚情報や咀嚼の運動指令を最終的に三叉神経運動ニューロンに伝えるプレモーターニューロンが三叉神経上核や顔面神経核背側の網様体に存在し、三叉神経運動ニューロンに興奮性および抑制性の入力を送っていることを明らかにしてきた(*Neurosci Res* 1992; *J Neurophysiol* 1994 & 2008; *Brain Res* 2005; *Neuroscience* 2010)。そこで、三叉神経運動ニューロンの樹状突起のさまざまな部位をcaged グルタミン酸を用いて刺激したときの電位応答を細胞体および樹状突起からのパッチクランプ法で記録し、どのようなパターンで電位依存性イオンチャンネルが存在してシナプス後電位の伝導を修飾しているか、種々のプレモーターニューロンや感覚ニューロンからの入力、樹状突起にどのようなパターンで入力して電位応答を引き起こすのかを解析する。さらに、閉口筋運動ニューロンと開口筋運動ニューロンの樹状突起で性質が異なるのかについても検討を行い、三叉神経運動ニューロンの樹状突起における情報処理メカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

咀嚼の顎運動パターンの運動指令は脳幹に存在する咀嚼のパターンジェネレータで形成され、最終的に premotor neuron を介して閉口筋および開口筋運動ニューロンに伝えられる。我々の先行研究から三叉神経上核(SupV)と顔面神経核の背側網様体に存在す

る premotor neuron は、咬筋運動ニューロン(MMN)あるいは顎二腹筋運動ニューロン(DMN)に、興奮性および抑制性のシナプス入力を送ることが明らかとなったが、この領域以外の premotor neuron からの入力特性は未だ不明である。そこで本研究は、新生仔ラット前頭断脳幹スライス標本にレーザー刺激法を適用し、MMN あるいは DMN へ入力を送る premotor neuron の存在部位および入力様式を解析した。

3. 研究の方法

実験には生後1-5日齢のWistar系ラット28匹を用い、イソフルレン麻酔下にて脳幹を摘出し、三叉神経運動核(MoV)を含む、厚さ500 μmの前頭断脳幹スライス標本を作製した。標本作製1~2日前に咬筋または顎二腹筋に蛍光色素のdextran-tetramethylrhodamine-lysine(DRL)あるいはcholera toxin subunit B Alexa Fluor 488 conjugate(CTB)をそれぞれ注入し、咬筋運動ニューロンおよび顎二腹筋運動ニューロンを逆行性に標識した。Axopatch 700B amplifier(Molecular Devices)を用いて、標識されたMMNあるいはDMNからパッチクランプ法を用いて電流記録を行った。

人工脳脊髄液の組成は、NaCl 130 mM, KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, NaHCO₃ 26 mM, Glucose 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mMであった。また、記録に用いたパッチクランプ電極の内液(mM)の組成は、135 K-gluconate, 0.2 CaCl₂, 5 EGTA, 10 HEPES, 2 MgATP, 0.2 NaGTP(pH 7.3, 285-300 mOsm)とした。

プレモーターニューロンの刺激は、あらかじめスライス標本に灌流投与したcaged-glutamateにレーザー光を照射して、解離したグルタミン酸でpremotor neuronを刺激し、咬筋運動ニューロンあるいは顎二腹筋運動ニューロンに誘発されたシナプス後電流(PSC)を解析した。レーザー光は、三叉神経主感覚核(PrV)とPrV背側の網様体(dRt), SupVおよびintertrigeminal region(IntV)を含み、MoVを囲むコの字型あるいはL字型に設定した59-73個の格子状の領域の各々の部位に照射した。また、レーザー刺激の空間解像度を調べる実験は、間隔40 μmで10×10の格子にレーザー光を照射した。

4. 研究成果

レーザー刺激の解像度を調べる実験をまず行った。三叉神経上核ニューロンからパッチクランプ記録を行い、記録したニューロンを中心に間隔40 μmで10×10の格子を設定し、レーザー刺激を行った。その結果、最も強い応答が出た部位の斜め上の部位の刺激では

活動電位が誘発されないことから、活動電位誘発の空間分解能は格子の対角線の距離である $57\mu\text{m}$ 以下であった。さらに、活動電位を誘発する最も遠位の樹状突起と細胞体との距離を 8 個のニューロンで調べたところ、平均で $126 \pm 22.7\mu\text{m}$ であった。したがって、 $126\mu\text{m}$ の倍の $252\mu\text{m}$ 以上離れた 2 点の刺激でそれぞれ応答が誘発されれば、異なったプレモーターニューロンからの入力と判定できることが分かった。

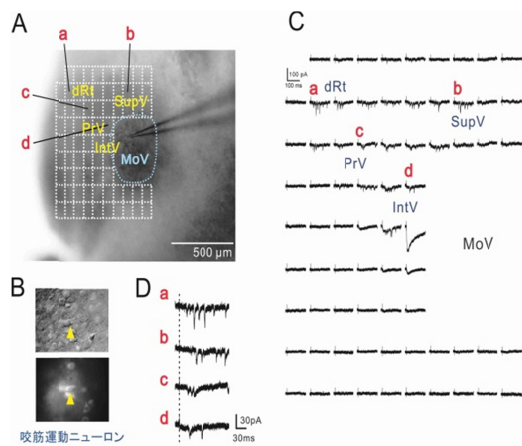


図1 .1-5日齢のラットのスライス標本の73か所の系統的な刺激によって示されたプレモーターニューロンと咬筋運動ニューロンのシナプス結合様式

次に、1-5日齢のラットで、三叉神経運動核周辺からの閉口筋運動ニューロンに対する入力を調べると、三叉神経上核と三叉神経間領域および三叉神経主感覚核の背側部のレーザー照射で、立ち上がりの早い内向き電流が誘発される(図1C、D)。図1Cのa、b、c、dは互いに $252\mu\text{m}$ 以上離れているので、この例の咬筋運動ニューロンは少なくとも異なる4個のプレモーターニューロンからの入力を受けていることが分かる。記録した19個の閉口筋運動ニューロンと26個の開口筋運動ニューロンは、共にその約70%が複数の領域から入力を受けていた。我々の先行研究から、三叉神経上核からの入力はグルタミン酸性、グリシン性およびGABA性であるが(Nakamura et al. *J Neurophysiol*, 2008)、グリシン受容体拮抗薬のストリキニンとGABA_A受容体拮抗薬のSR95531の存在下でも同様の結果が観察できるので、グルタミン酸性の入力が閉口筋および開口筋運動ニューロンに収束していると言える。また、三叉神経運動核近傍の刺激で、潜時が1ms程度と極めて早い、立ち上がりの遅い応答が誘発された。この応答は、活動電位を抑制するテトロドトキシン投与によっても消失しないことから、レーザー刺激によって解離されたグルタミン酸が記録した運動ニューロンの樹状突起を直接刺激したことによると考えら

れる。プレモーターニューロンからの入力様式については、三叉神経上核の外側から三叉神経主感覚核の内側にかけての部位を刺激した場合、60%以上の閉口筋運動ニューロンで立ち上がりの早い内向き電流応答がバースト状に誘発された(バーストPSC; 図1Ca)。しかし、開口筋運動ニューロンはそのような傾向はなく、主として低頻度の入力を受けていた。

9-12日齢のラットで、同様に三叉神経運動核周辺からの咬筋運動ニューロンと顎二腹筋運動ニューロンへの入力を検索した。1-5日齢のラットと同様に三叉神経上核と三叉神経間領域および三叉神経主感覚核の背側部のレーザー照射で、立ち上がりの早い内向き電流が誘発されたが、バーストPSCの発生が減少した。この原因としては、発育により三叉神経上核のプレモーターニューロン興奮の閾値が上がった可能性がある。そこで

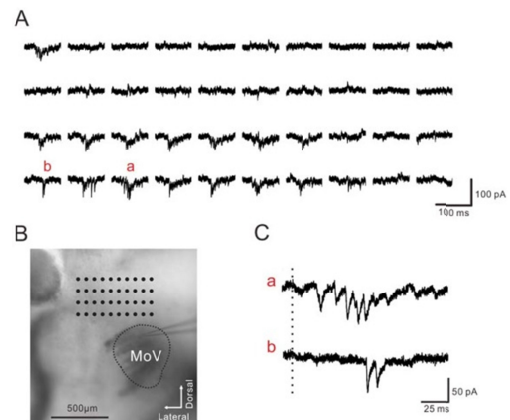


図2 .9-12日齢ラットにおいてRuBi-Glutamateを用いてレーザー刺激をした結果

caged-glutamateの代わりにより強力な刺激が可能となるRuBi-Glutamateを用いてレーザー刺激を行ったところ、三叉神経上核の多くの部位でバーストPSCが誘発された。

一方、解離したグルタミン酸が直接記録した運動ニューロンの樹状突起を刺激することによる応答を誘発する部位は、1-5日齢のラットに比べて外側に広がった。

三叉神経上核は、歯根膜機械受容器や閉口筋筋紡錘から豊富な感覚入力を受けることが知られている。咀嚼時の歯根膜機械受容器や閉口筋筋紡錘からの感覚情報は、閉口筋活動を増大させる効果があるが、本研究で明らかとなった三叉神経上核からの閉口筋運動ニューロンに送られるバースト状の入力は、これに対応している可能性が示唆された。さらに、咬筋運動ニューロンの樹状突起は、発育に伴ってI-SupVやIntVに伸張し、同部において末梢や中枢からの入力を直接受け

る可能性がある。一方で、三叉神経上核のプレモーターニューロンの閾値が、発育に伴って上昇した可能性も示唆された。このような変化は、吸啜から咀嚼への転換に関与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

- 1) Tsuruoka M, *et al.* The nucleus locus coeruleus/subcoeruleus contributes to antinociception during freezing behavior following the air-puff startle in rats. *Brain Res.* 2011;1393:52-61.
- 2) Hayashi B, *et al.* A possible synaptic configuration underlying coeruleospinal inhibition of visceral nociceptive transmission in the rat. *Neurol Sci.* 33(2):463-8, 2012.
- 3) Miyamoto A, *et al.* R848, a toll-like receptor 7 agonist, inhibits osteoclast differentiation but not survival or bone-resorbing function of mature osteoclasts. *Cytotechnology*, 64(3): 331-9, 2012.
- 4) Nonaka M, *et al.* Convergent premotoneuronal inputs to single trigeminal motoneurons. *J Dent Res*, 91(9): 888-893, 2012.
- 5) Mochizuki A, *et al.* Cell adhesion signaling regulates RANK expression in osteoclast precursors. *PLoS One*, 2012.
- 6) Ihara Y, *et al.* Coordination of NMDA-induced rhythmic activity in the trigeminal and hypoglossal nerves of neonatal mice in vitro. *Neurosci Res*, 75(2):138-49, 2013.
- 7) Inoue T, *et al.* Postnatal changes in the repetitive firing properties of rat jaw-closing motoneurons. *J Jpn Soc Stomatognath Funct*, 19 (2): 137-144, 2013.
- 8) Hayashi B, *et al.* Neural mechanisms that underlie angina-induced referred pain in the trigeminal nerve territory: a c-Fos study in rats. *ISRN Pain*, 2013.
- 9) Dandan Song, *et al.* The anti-inflammatory property of human bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells is preserved in late-passage cultures. *Journal of Neuroimmunology*, 263: 55-63, 2013.
- 10) Nakamura S, *et al.* Electrophysiological and morphological properties of rat supratrigeminal premotor neurons targeting the trigeminal motor

nucleus. *J Neurophysiol*, 111:1770-82, 2014.

[学会発表](計26件)

- 1) 望月文子ほか:Orexin knockout miceは蔗糖溶液摂取量が減少する(日本顎口腔機能学会 第46回学術大会,仙台,2011年)。
- 2) Nakayama K, *et al.*: Oromotor rhythmic activity evoked by electrical stimulation of the trigeminal nerve sensory root in an isolated brainstem preparation from neonatal mice (8th IBRO 2011)。
- 3) Ihara Y, *et al.*: Two types of NMDA-induced rhythmic activity in the trigeminal motor nerve of neonatal mice in vitro (8th IBRO. Florence 2011)。
- 4) Nonaka M, *et al.*: Properties of synaptic transmission from regions surrounding the trigeminal motor nucleus to trigeminal motoneurons in neonatal rats (8th IBRO 2011)。
- 5) 中村史朗ほか:味覚神経節細胞におけるカルシウムおよびナトリウム電流の多様性(第53回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム,岐阜,2011年)。
- 6) 伊原良明ほか:新生マウス脳幹摘出標本におけるNMDA誘発リズムの三叉-舌下神経間の連絡(第53回歯科基礎医学会学術大会・総会,岐阜,2011年)。
- 7) 西村晶子ほか:下顎・頬・口唇の協調運動に関する神経回路の解析(第53回歯科基礎医学会学術大会・総会,岐阜,2011年)。
- 8) 野中睦美ほか:三叉神経運動ニューロンには三叉神経運動核周囲の様々な部位からの入力収束する(日本顎口腔機能学会第47回学術大会,神戸,2011年)。
- 9) 松田啓資ほか:三叉神経運動ニューロンに対するプレモーターニューロンからの入力様式の発育変化(日本補綴歯科学会第121回学術大会,横浜,2012年)。
- 10) 伊原良明ほか:新生マウスにおけるNMDA誘発リズム活動の三叉神経,舌下神経間での同期について(第35回日本神経科学大会,名古屋,2012年)。
- 11) 伊原良明ほか:新生マウスにおけるNMDA誘発リズム活動の三叉神経,舌下神経間での同期について(第35回日本神経科学大会,名古屋,2012年)。
- 12) 中村史朗ほか:三叉神経運動ニューロン樹状突起における情報処理機構(日本顎口腔機能学会第49回学術大会,北九州,2012年)。
- 13) 望月文子ほか:脂質代謝におけるオレキシンの関与(第22回日本歯科医学会,大阪,2012年)。
- 14) 中山希世美ほか:呼吸,咀嚼および嚥下間の機能的相互作用を解析するための除皮

質ラット灌流標本の開発, 第 90 回日本生理学会大会, 東京, 2013 年).

15) 中山希世美ほか: 顎運動の生後機能発達を調べるための新規手法の開発(日本顎口腔機能学会第 50 回学術大会, 東京, 2013 年).

16) 中山希世美ほか: 除皮質ラット灌流標本では呼気相と同期して下顎の開口運動が起こる(第 36 回日本神経科学大会, 京都, 2013 年).

17) Nakayama K, *et al.*: Switching of lower jaw movements between the inspiratory and expiratory phases generated by chemoreceptor inputs (IUPS2013, Birmingham 2013).

18) Nakai K, *et al.*: Dendritic signal processing in the trigeminal motoneurons (2nd Meeting of the International Association for Dental Research - Asia Pacific Region, Bangkok, 2013).

19) Nakamura S, *et al.*: Postnatal development of convergent premotoneuronal inputs to single trigeminal motoneurons (2nd Meeting of the IADR - Asia Pacific Region, Bangkok, 2013).

20) 中村史朗ほか: 三叉神経上核プレモーターニューロンの形態学および生理学的特性(第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013 年).

21) 中井健人ほか: 三叉神経運動ニューロン樹状突起の能動的特性(第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013 年).

22) 片山慶祐ほか: マウス咬筋活動に対する睡眠-覚醒の影響(第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013 年).

23) 片山慶祐ほか: マウスの咬筋および顎筋活動に対する睡眠-覚醒パターンの影響(第 51 回日本顎口腔機能学会学術大会, 新潟, 2013 年).

24) Gemba C, *et al.*: Effects of histamine on neurotransmission from the mesencephalic trigeminal nucleus to trigeminal motoneurons in rats (Society for Neuroscience 43rd annual meeting, San Diego 2013).

25) Katayama K, *et al.*: Masseter muscle activity during awake state, non-REM sleep and REM sleep in mice (Society for Neuroscience 43rd annual meeting, San Diego 2013).

26) 望月文子ほか: オレキシンは肝臓における脂質代謝に関与する(第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島, 2014 年).

〔図書〕(計 7 件)

1) 井上富雄: 咬合と咀嚼・吸啜 摂食行動、咀嚼能力、吸啜; 最新衛生士教本 歯・口腔の構造と機能 口腔解剖学・口腔組織発

生学・口腔生理学(全国歯科衛生士教育協議会 監修; 前田 健康、遠藤 圭子、畠山 能子編) 医歯薬出版、東京、96 - 104頁、2011.

2) 井上富雄: 咀嚼運動と顎反射; 歯科生理学実習(岩田幸一・三枝木泰丈・泰羅雅登・西川泰央 編著) 医歯薬出版、東京、95 - 107 頁、2012.

3) 井上富雄: 顎口腔系の機能; 新編 顎関節症(日本顎関節学会編) 永末書店、京都、35-40 頁、2013.

4) 井上富雄: 口腔の感覚機能; 口腔科学(戸塚靖則・高戸毅 監修) 朝倉書店、東京、56-61 頁、2013.

5) 井上富雄: 咀嚼のメカニズム; 口腔科学(戸塚靖則・高戸毅 監修) 朝倉書店、東京、70-78頁、2013.

6) 井上富雄: 咀嚼; 基礎歯科生理学 第 6 版(森本俊文・山田好秋・二ノ宮裕三・岩田幸一 編) 医歯薬出版、東京、328 - 349頁、2014.

7) 井上富雄: 歯周組織の生理学; ザ・ペリオドントロジー 第 2 版(和泉雄一、木下淳博、沼部幸博、山本松男編) 永末書店、東京、9 - 13頁、2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.showa-u.ac.jp/sch/dent/major/oralphys/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 富雄 (INOUE TOMIO)

昭和大学歯学部口腔生理学教室・教授
研究者番号: 70184760

(2) 研究分担者

中村 史朗 (NAKAMURA SHIRO)

昭和大学歯学部口腔生理学教室・助教
研究者番号: 60384187

中山 希世美 (NAKAYAMA KIYOMI)

昭和大学歯学部口腔生理学教室・助教
研究者番号: 00433798

望月 文子 (MOCHIZUKI AYAKO)

昭和大学歯学部口腔生理学教室・助教
研究者番号: 10453648

(3) 連携研究者

なし