

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792407

研究課題名（和文）発達期における摂食機能の神経制御機構についての組織学的解析

研究課題名（英文）The histological research of the developing feeding center

研究代表者

大島 昇平（OSHIMA SHOHEI）

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00374546

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウスの吸綴(母乳を吸う)運動がどのように制御されているかを調べる事を目的とした。上唇部の感覚入力(吸綴反射)に重要であるが、生後 12 日では、上唇部の感覚入力は吸綴運動に既に関与していないようであった。また、摂食機能の発達過程に歯の萌出はおきるが、脳内の神経細胞に豊富に発現しているカルシニューリンという分子が歯の形成にも関与している事がわかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate the center of sucking reflex in mice by the histological methods. The sensory input from upper jaw is important for suckling reflex, however, it has not taken part in suckling reflex yet at post natal days 12. Calcineurin exists abundantly in the central nervous system. We confirmed that calcineurin took part in the formation of tooth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児歯科学

キーワード：吸綴運動、発達

1. 研究開始当初の背景

ものを食べる、という行為は生命の維持に必要な不可欠であるだけでなく、生きる喜びという面からも非常に重要である。摂食・嚥下障害への対応は医療・介護現場の重要な課題の一つになっている。摂食・嚥下機能は生後発達期に吸綴から咀嚼へダイナミックな変化を遂げる。胎児は母胎内で指しゃぶりを行っており、胎児期に既に原始反射による吸綴運動を獲得している。生後しばらくは原始反射による母乳の吸綴運動のみで栄養を摂取しているが、生後発達の間には咀嚼運動を獲得する。摂食機能を制御している神経機構については国内外で研究が行われている。咀嚼運動時には同一なパタンのリズムカルな顎運動が見られる。

そのリズムカルな活動は中枢性パターン発生器によることがモルモットを使った実験で推定された(Nozaki *et al.*, *J Neurophysiol*, 55:806-825, 1986)。一方、吸綴運動時にもリズムカルな舌、顔面、顎筋の動きがみられる。咀嚼運動と同様に、脳幹部には吸綴運動と思われるリズムカルな活動を舌下神経ニューロンに起こす事ができる中枢性パターン発生器が存在する事が確認され、その中枢性パタンの発生にはグルタミン酸受容体のサブタイプである NMDA 受容体が関与している事も明らかされた(Katakura *et al.*, *Neuroreport*, 5:601-604, 1995)。顎、舌筋の運動ニューロンの premotor neuron の存在部位についても研究は進められており(Mizuno *et al.*, *J Comp Neurol*,

215:290-298, 1983 ; Fay *et al.*, Brain Res Brain Res Rev, 25:291-311, 1997)、それらのシナプス伝達に関わる神経伝達物質についても研究は進められている (Muller *et al.*, Mol Cell Neurosci, 32:254-273, 2006)。

しかし中枢性パタン発生器も含め、どのような神経ネットワークが摂食機能を制御しているかはまだ不明な点が多い。また、吸啜運動と咀嚼運動では顎、舌の動きが大きく異なる事、吸啜運動でも次第に意識的に制御する事が可能になる事、吸啜運動と咀嚼運動では筋電図の活動パタンが明らかに異なる事、大脳皮質に吸啜野と咀嚼野がそれぞれ存在する事 (Iriki *et al.*, Develop Brain Res, 44:189-196, 1988)、顎、舌筋の運動核に存在する神経伝達物質の受容体は生後発達期に変化が見られる事 (Turman, Arch Oral Biol, 52:313-316, 2007 ; Oshima *et al.*, Neurosci Res, 43:239-250, 2002) などから、吸啜から咀嚼への発達の過程においては中枢性パタン発生器を含む神経制御機構も大きな変化がみられる事が想定される。これらの中枢性パタン発生器を含む神経制御機構がどのように変化するのか、例えば吸啜と咀嚼の神経制御機構は同じものなのか、それとも関連しているのか、全く異なるものなのかを解明する事は大変興味深い。

これまでに行われた摂食機能の神経制御機構の解析は筋電図や電気生理を用いた機能を解析したものが多く、本研究では、申請者がこれまで行ってきた組織学的な手法を用いて、吸啜運動の神経制御機構の解析の可能性を検討したい。

さらに現在、口腔の発達に関与する分子としてカルシニューリンに注目している。カルシニューリンはカルシウムを介する情報伝達機構に関わる分子であり、転写因子 NFAT の活性を制御している (Rusnak *et al.*, Physiol Rev, 80:1483-521, 2000)。カルシニューリンは脳内に豊富に発現しており、神経可塑性に関与していることが明らかにされている (Shibasaki *et al.*, J Biochem. 131:1-15 2002)。また、報告者は以前の研究により、カルシニューリンが歯胚に発現している事も確認しているが、さらなる解析が必要な段階である。

2. 研究の目的

吸啜期のマウス脳幹部において、吸啜運動に必要な舌運動の制御に関わるニューロンと上唇の感覚入力に関わるニューロンを同定する。また、脳内の神経細胞に豊富に発現しているカルシニューリンが、歯の形成に関わっているか検討する。

3. 研究の方法

(1) 生後4日目 (P4) の仔マウスを十分なベントバルビタール麻酔下において固定した。固定液は4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝溶液を使用した。抜脳後、舌下神経核と思われる領域にDiO ペーストを注入した。その後、脳幹部の凍結切片を作成した。得られた試料について、DiO が舌下神経核に注入されているか、脳幹部にDiOにて標識されるニューロンがあるか調べた。

(2) 生後2日目 (P2) と生後10日目 (P10) の仔マウスを低温麻酔後に右眼窩下神経を切断した。どちらも生後12日目 (P12) 朝に吸啜活動をさせた仔マウスを十分なベントバルビタール麻酔下において固定した。固定液は4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝溶液を使用した。脳幹部の凍結切片を作成し、抗 c-fos 抗体を用いた免疫組織化学を行った。

(3) 生後3日目 (P3)、生後7日目 (P7)、生後14日目 (P14) のマウスを十分なベントバルビタール麻酔下において固定した。固定液は4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝溶液を使用した。歯胚領域を含む顎骨部をEDTAにて脱灰し、パラフィン切片を作成した。作成した切片について、抗カルシニューリン A α サブユニット (CnA α) 抗体、抗カルシニューリン A β サブユニット (CnA β) 抗体、抗カルシニューリン B1 サブユニット (CnB1) 抗体を用いて免疫組織化学を行った。抗体については本学医学研究科解剖発生学渡辺雅彦教授より供与を受けた。

4. 研究成果

(1) DiO ペーストのマウス舌下神経核への注入

DiO ペーストを舌下神経核付近に注入する事は可能になった (図1)。

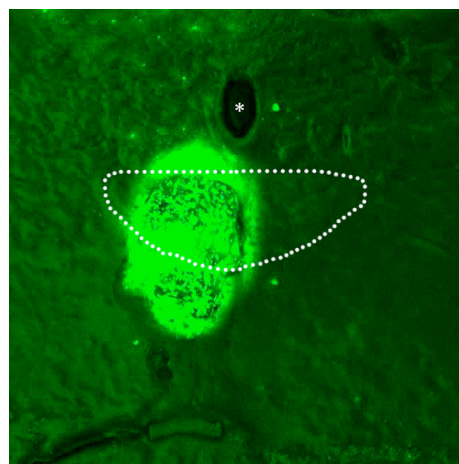


図1 舌下神経核に注入された DiO ペースト。点線内が舌下神経核。*は延髄の中心管を示す。

しかし、舌下神経核のみに DiO ペーストを

注入する事は困難であり、今回の解析では脳幹部のニューロンは Di0 で標識されなかった。今回の方法では舌下神経核のニューロンとシナプスする舌下神経ニューロンの premotor neuron を同定する事は難しく、他の方法を検討する必要があると思われた。

(2) 眼窩下神経切断後、吸啜運動時に三叉神経核での c-fos を発現するニューロンの変化

P2 または P10 で眼窩下神経切断後に P12 での吸啜運動時のマウス三叉神経核での c-fos の発現を調べた (図 1 から図 4)。

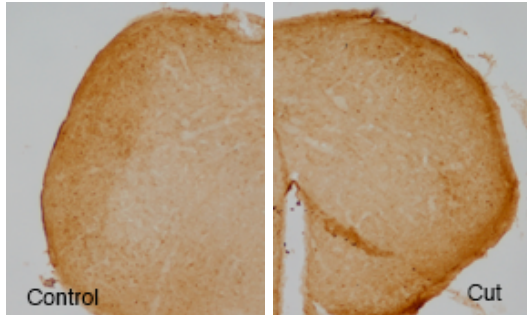


図 1 P2 で眼窩下神経切断後に吸啜運動をさせた P12 マウスの三叉神経脊髄路核での c-fos の発現。右側が切断側、左側が非切断側。

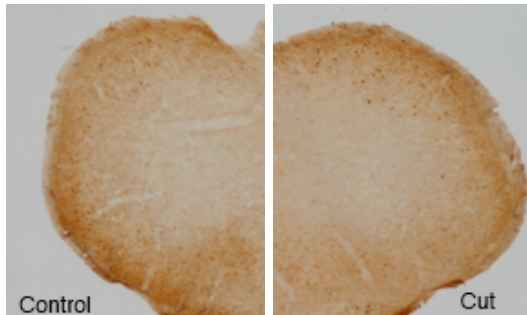


図 2 P10 で眼窩下神経切断後に吸啜運動をさせた P12 マウスの三叉神経脊髄路核での c-fos の発現。右側が切断側、左側が非切断側。

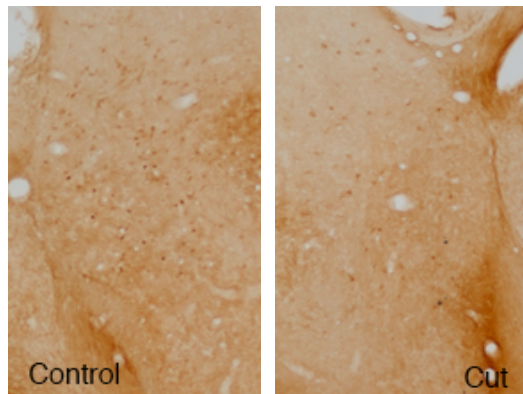


図 3 P2 で眼窩下神経切断後に吸啜運動をさせた P12 マウスの三叉神経主知覚核での

c-fos の発現。右側が切断側、左側が非切断側。

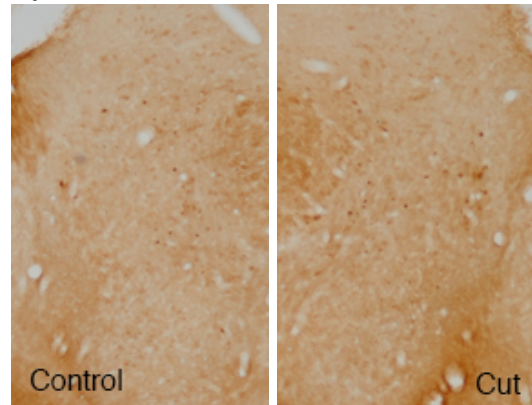


図 4 P10 で眼窩下神経切断後に吸啜運動をさせた P12 マウスの三叉神経主知覚核での c-fos の発現。右側が切断側、左側が非切断側

温痛覚に関わる脊髄路核では P2 での P10 でも切断側と非切断側で c-fos の発現に差が無いようであった。圧触覚に関わる主知覚核でも P2 での P10 でも切断側と非切断側で c-fos の発現に差が無いようであった。今回の解析では上唇の知覚を司る眼窩下神経神経を切断しても、吸啜運動時における三叉神経核での c-fos の発現に変化がみられなかった。生後間もなくは吸啜運動の開始に上唇からの感覚入力重要と考えられているが、P12 の段階では上唇からの感覚入力は吸啜運動にあまり関与していない可能性が考えられた。

(3) 歯胚におけるカルシニューリンの発現

分泌期エナメル芽細胞では CnA α と CnA β が発現していた (図 1)。

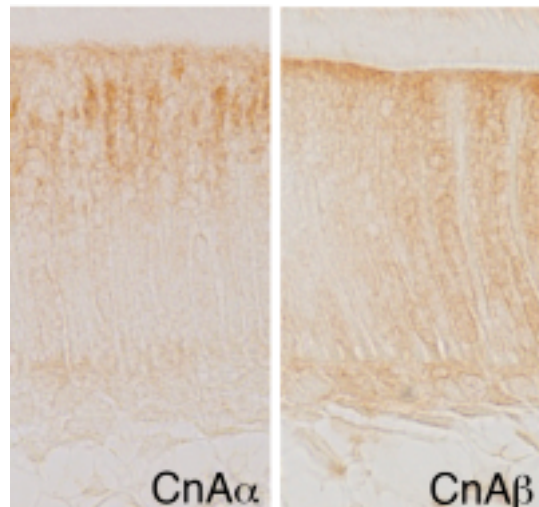


図 1 分泌期エナメル芽細胞での CnA α と CnA β の発現。

成熟期エナメル芽細胞では CnA α の発現は減弱するが、波状縁を有するエナメル芽細胞では CnA β が豊富に発現していた (図 2)。

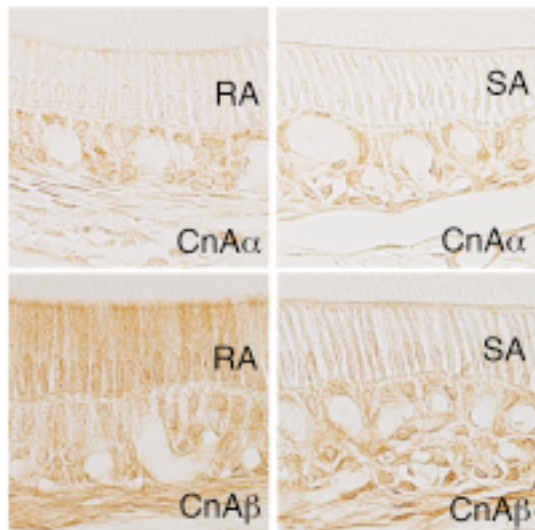


図2 成熟期エナメル芽細胞でのCnA α とCnA β の発現。RAは波状縁を有するエナメル芽細胞、SAは波状縁を有しないエナメル芽細胞。
象牙芽細胞では象牙質形成中にはCnA α とCnA β が豊富に発現していたが、象牙質形成後にはCnA α とCnA β は殆ど発現していなかった(図3)。

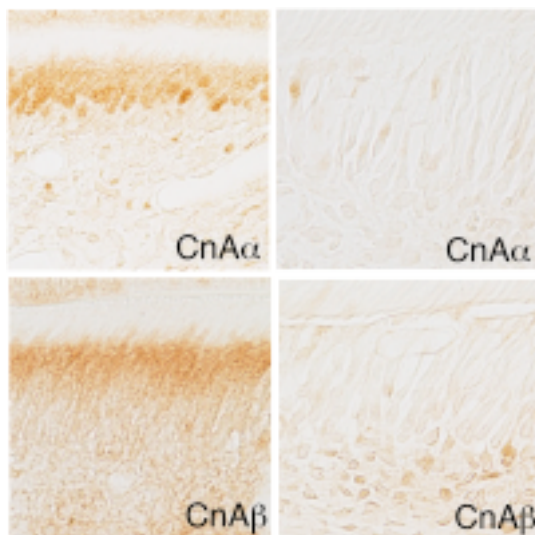


図3 象牙芽細胞でのCnA α とCnA β の発現。左側は象牙質形成中、右側は象牙質形成後。
カルシニューリンはエナメル質形成中のエナメル芽細胞、象牙質形成中の象牙芽細胞に発現していた。脳内で神経可塑性に関与しているカルシニューリンが歯の形成にも関わっている事が明らかになった。カルシニューリンが吸啜から咀嚼への摂食機能の発達に広く関わっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Oshima S, Watanabe M.: Elevated expression of calcineurin subunits during

active mineralization of developing mouse molar teeth. Eur J Oral Sci. 2012 Oct;120(5):386-94. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

(1) 太島昇平、八若保孝：口腔領域の硬組織におけるカルシニューリンの発現 第49回日本小児歯科学会大会 H23年11月28日 いわて県民情報交流センター・アイーナ(盛岡)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大島 昇平 (OSHIMA SHOHEI)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00374546

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし