

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791990

研究課題名(和文) 延髄味覚神経回路の成熟における味覚性入力の影響の解析

研究課題名(英文) Role of gustatory input in development of the nucleus of the solitary tract.

研究代表者

諏訪部 武 (Suwabe, Takeshi)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：00610312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期の不良な栄養状態により、生まれてきた仔ラットに味覚障害が生じることが報告されていることから、胎生期は味覚にとって重要な時期である。味覚伝導路の一次中継核である孤束核を構成する細胞は胎生11日目～14日目の間に誕生することが報告されているが、この時期に求心性神経線維の伸長も進み、さらに細胞が細胞誕生の場所から移動を開始することが明らかになり、孤束核における神経回路の初期形成に重要な時期であることが示唆された。移動した細胞は孤束核を形成するが、細胞誕生の時期によって孤束核における分布部位が異なることが明らかになり、細胞誕生の時期が孤束核における分布部位を決定している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The nucleus of the solitary tract (NST) and the parabrachial nucleus (PBN) are the first and second central relay in the ascending gustatory pathway, respectively. Cells constructing the NST and PBN are generated in the period between embryonic day (E) 11 thru E14. This study shows that E11- and E12-generated cells are differentially distributed in the NST and PBN. In these nuclei, the percentage of E11-generated cells becomes high in the region reported to be responsive to mechanical stimuli to the oral cavity, whereas there are many E12-generated cells in the region known to be responsive to taste stimuli. This result indicates the possibility that cell distribution and function in the NST and PBN are determined by the timing of the cyto-genesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：味覚 孤束核 傍腕核 ラット

1. 研究開始当初の背景

味覚伝導路の一次中継核である孤束核では、胎生 19 日目ごろには求心性神経線維と孤束核ニューロンの間にシナプス結合がみられ、味覚の中樞伝導路は出生前に形成が開始することが報告されていた (Zhang and Ashwell 2001)。しかし、味蓄の構造は出生後に完成すると報告されていたため (Hill and Mistretta 1990)、出生後の味覚の成長についての研究は多いが、胎生期に行われる味覚伝導路の形成に関する研究は少なく、不明な点が多い。

申請者は胎生ラットの孤束核神経回路に関する電気生理学的研究を行い、胎生 14 日目には孤束核ニューロンは興奮性を獲得していること、また胎生 16 日目には求心性神経線維と孤束核ニューロンの間のシナプス結合は、シナプス伝達が可能な状態にまで成長することを明らかにした (Suwabe et al. 2011, 2013)。

胎生 16 日目にシナプス伝達が可能であるということは、胎生 16 日目以前に神経回路の形成が始まっていることを示唆する。孤束核を構成する細胞は胎生 11 日目～14 日目の間に誕生することが報告されているが (Altman and Bayer 1980)、求心性神経線維の成長や、細胞の誕生時期と孤束核の構造や機能との関係は不明な点が多い。胎生期の不良な栄養状態により、生まれてきた仔に味覚障害が生じることが報告されていることから、胎生期は味覚神経回路の形成にとって重要な時期であると考え、今回の研究計画立案に至った。

2. 研究の目的

【実験 1】 胎生 11 日目～14 日目の間に延髄で誕生した細胞がいつ、どのような経路で移動を開始するのかを調べ、孤束核における神経回路形成の初期過程を明らかにする。

【実験 2】 孤束核を構成する細胞の誕生時期とその細胞の分布部位との関係を調べ、細胞の誕生時期と孤束核の機能との関係を明らかにする。味覚伝導路の二次中継核である傍腕核でも同様の実験を行う。

3. 研究の方法

【EdU の投与 (「細胞の誕生時期」の標識)】 交配日確認妊娠ラットにチミジン類似体である 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を胎生 11 日目～14 日目のいずれかの日の午前 9 時から 11 時の間に 1 回のみ腹腔内投与した。EdU は細胞周期の DNA 合成期に染色体に取り込まれるため、生まれてきた仔の傍腕核や孤束核で観察される EdU 陽性細胞は EdU の投与時期 (胎生 11 日目～14 日目のいずれかの日) に誕生したものと考えられる。

【実験 1】 EdU 投与の翌日に仔の脳を摘出し、浸漬固定した後、脳幹のスライス標本を

作製した。EdU 陽性細胞を蛍光色素で標識した後、抗 Neurofilament 免疫染色および細胞核の染色をおこなった。

【実験 2】 生まれてきた仔は生後 80 日以上飼育した後、灌流固定し、脳幹のスライス標本を作製した。EdU 陽性細胞を蛍光色素で標識した後、蛍光 Nissl 染色をおこなった。共焦点レーザー走査型顕微鏡で傍腕核と孤束核の各亜核を撮影した後、取得した画像上で EdU 陽性細胞と Nissl 染色された細胞の数をカウントし、各亜核の EdU 陽性細胞の割合 (%) を算出した。

4. 研究成果

【実験 1】 孤束核における神経回路形成の開始

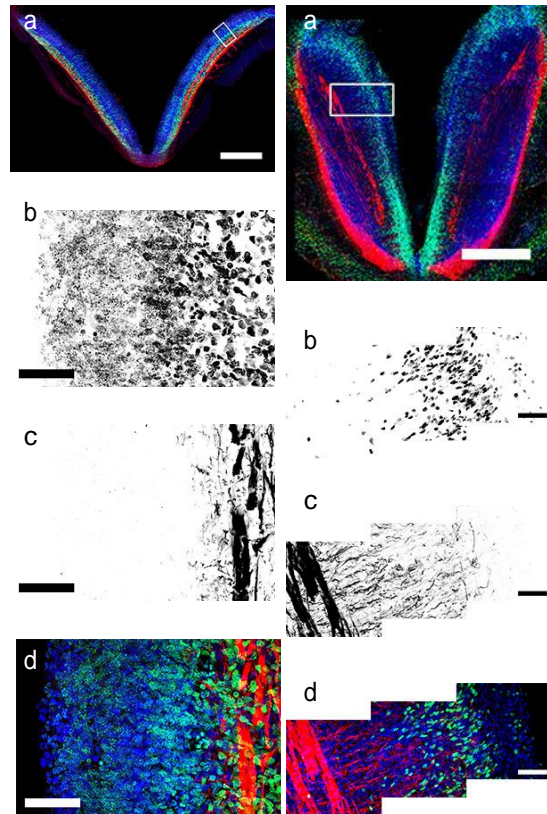


図 1 (左列) 胎生 12 日目に誕生した細胞の分布を胎生 13 日目の延髄で調べた一例。(右列) 胎生 14 日目に誕生した細胞の分布を胎生 15 日目の延髄で調べた一例。a: 延髄の水平面観。EdU 陽性細胞 (緑) 孤束 (赤) 細胞の核 (青) の重ね合わせ像。四角で囲まれている領域の拡大像を b～d に示してある。b: EdU 陽性細胞。c: 孤束。d: EdU 陽性細胞 (b を緑に変換) 孤束 (c を赤に変換) および細胞の核 (青) の重ね合わせ像。

第 4 脳室の外側縁から孤束の間の領域に多数の EdU 陽性細胞が分布していた。特に胎生 12 日目および 13 日目の延髄では多数の EdU 陽性細胞が著しく密に分布していた。胎生 14 日目および 15 日目の延髄では孤束から第 4 脳室の方向へ側方に伸びる多数の神経線維

がみられた。EdU 陽性細胞の核はこの神経線維に沿って細長く伸展しており、第4脳室近傍の脳室帯で誕生した細胞が、神経線維の伸長方向とは逆に、孤束核の方向へ外側に向かって移動していること、またこの移動に孤束から伸びる神経線維を足場として利用している可能性が示唆された。

この時期の延髄では神経線維の伸長を制御するような分子や、神経細胞の移動のガイドとなるグリア細胞の存在が報告されていることから (Corson et al. 2013; May et al. abstract in AChemS 2007) 胎生 12 日目から 14 日目ごろは孤束核の神経回路の形成に重要な時期であることが明らかになった。

【実験 2】 傍腕核および孤束核における細胞の分布部位とその細胞の誕生時期の関係

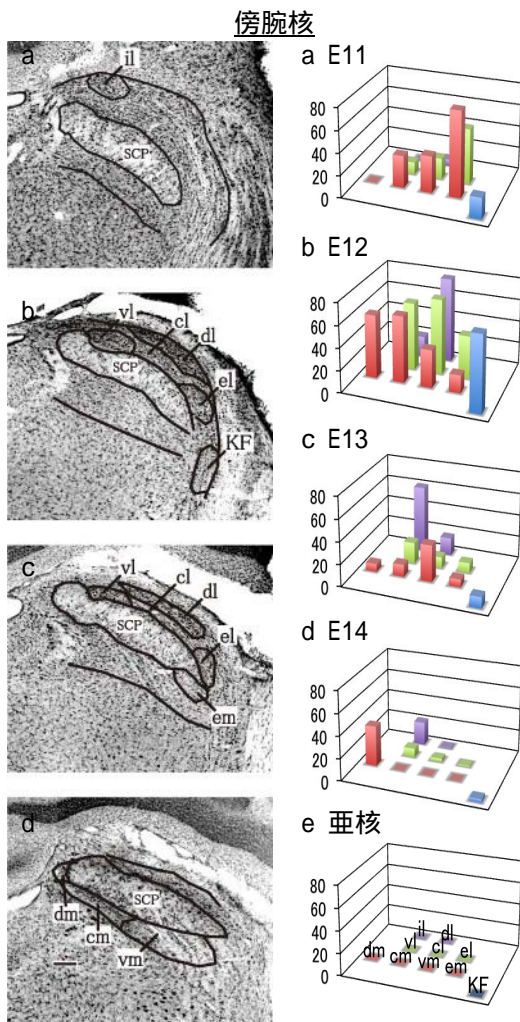


図 2 (左列) 傍腕核の冠状断 Nissl 染色標本。a が最も吻側、d が最も尾側の観察部位を示している。スケールバーは 200 μ m を示す。(右列) 傍腕核の各亜核で観察された胎生 11 日目 (a) ~14 日目 (d) の各日に誕生した細胞の割合 (%), 各棒グラフは図 e に示す亜核のデータを示している。

生後 80 日以上の子ラットでは傍腕核を構成する細胞の約半数は胎生 12 日目に誕生した

細胞であった。興味深いことに、胎生 12 日目に誕生した細胞は傍腕核の各亜核に同じ割合で分布しておらず、外側亜核 (dl, vl, cl) および中心内側亜核 (cm) で割合が高く、逆に、外部亜核 (el, em) および吻側の亜核である il で割合が低かった。胎生 11 日目および 13 日目に誕生した細胞はそれぞれ傍腕核の細胞の約 20% を占めるに過ぎないが、特定の部位で分布の割合が著しく高い。胎生 11 日目に誕生した細胞は外部亜核 (el, em) で、胎生 13 日目に誕生した細胞は il で割合が高い。外部亜核および il は胎生 12 日目に誕生した細胞の分布が少ない部位である。

胎生 11 日目に誕生した細胞が多かった外部亜核には口腔内への触刺激に、一方、胎生 12 日目に誕生した細胞が多かった外側亜核 (特に vl) および中心内側亜核には口腔粘膜への味刺激に反応して活動電位を発生する細胞が多いことが報告されており (Halsell and Travers 1997) 傍腕核では、胎生 11 日目に誕生した細胞と 12 日目に誕生した細胞との間に、反応する刺激の種類に違いがあることが明らかになった。

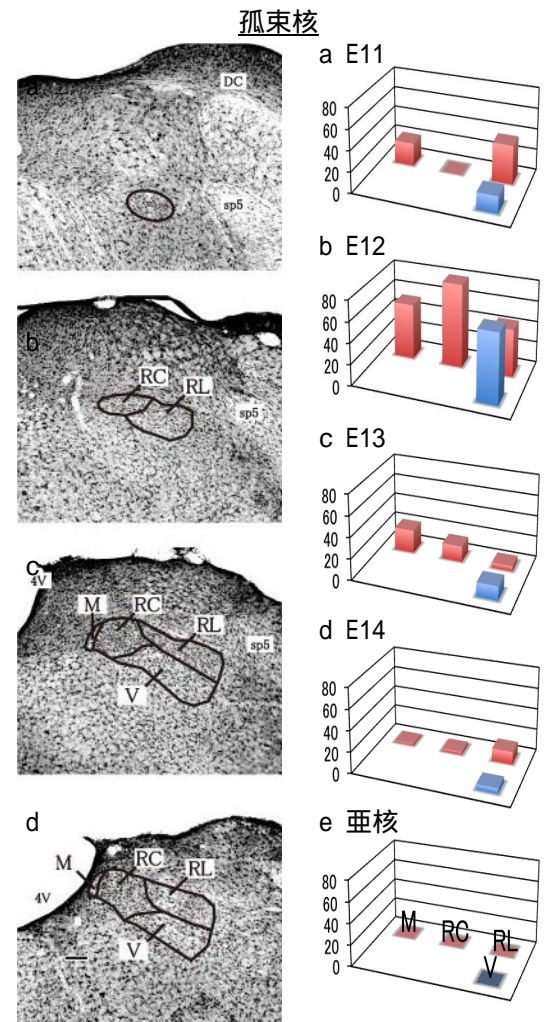


図 3 (左列) 孤束核の冠状断 Nissl 染色標本。a が最も吻側、d が最も尾側の観察部位を示している。スケールバーは 200 μ m を示す。(右列) 孤束核の各亜核で観察された胎

生 11 日目 (a) ~14 日目 (d) の各日に誕生した細胞の割合 (%)。各棒グラフは図 e に示す亜核のデータを示している。

生後 80 日以上 of ラットでは孤束核吻側部を構成する細胞の約 60% は胎生 12 日目に誕生した細胞であった。孤束核吻側部でも胎生 12 日目に誕生した細胞は各亜核に同じ割合で分布しておらず、中心亜核 (RC) および腹側亜核 (V) で割合が著しく高かった (それぞれ約 80% と約 70%)。また吻側寄り (図 2 の左列の上から 2 番目の画像で示される辺り) の外側亜核 (RL) ではほぼ全ての細胞が胎生 12 日目に誕生した細胞であった。しかし、この割合は尾側へ向かうにつれて (図 2 の左列の上から 3・4 番目の画像で示される辺りで) 約 40% まで低下し、逆に、胎生 11 日目および胎生 14 日目に誕生した細胞の割合が高かった (それぞれ約 40% と約 20%)。

胎生 11 日目および 14 日目に誕生した細胞が多かった尾側寄りの外側亜核には口腔内への色刺激に反応して活動電位を発生する細胞が多いことが報告されている。一方、胎生 12 日目に誕生した細胞が非常に多かった中心亜核および吻側寄りの外側亜核には口腔粘膜への味刺激に反応して活動電位を発生する細胞が多いことが報告されており (Travers and Norgren 1995)、孤束核吻側部でも、胎生 11 日目に誕生した細胞と 12 日目に誕生した細胞との間に、反応する刺激の種類に違いがあることが明らかになった。

本研究は胎生 11 日目~14 日目の間に延髄で起こる神経回路形成の様子および生後の傍腕核と孤束核でみられる細胞の分布部位とその細胞の誕生時期との関連を明らかにした。孤束核の細胞は胎生 11 日目~14 日目の間に誕生し、この細胞誕生期の終わり頃には細胞の移動が始まる。この時期には孤束から細胞誕生の場所へ神経線維が伸長を開始し、また誕生した細胞がこの神経線維に沿って細長く伸長していることから、誕生した細胞が伸長した神経線維を利用して孤束の方向へ外側に移動している可能性がある。さらにこの後、シナプスを構成する各種タンパク質が孤束核の領域で見られるようになることから、胎生 11 日目以降、孤束核の神経回路は急速に形成されていくと考えられる。

本研究の結果で非常に驚いたのは、傍腕核と孤束核では誕生時期の異なる細胞は分布する亜核も異なり、これが亜核間の機能の違い (触刺激に反応 vs. 味刺激に反応) とも関連している、言い換えれば、傍腕核と孤束核は解剖学的には離れているが、これら神経核の誕生時期が同じ細胞は機能的に結ばれているということである。

細胞誕生の時期がどのような因子によって決定されるのか、また細胞誕生の時期が細胞の移動・分布の過程にどのように影響するのかを今後さらに検証する。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

諏訪部 武、安尾 敏明、碓 哲崇 ラット孤束核を構成する細胞の新生時期とその局在との関係、第 56 回歯科基礎医学学会学術大会・総会、2014 年 9 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諏訪部 武 (SUWABE, Takeshi)
朝日大学・歯学部口腔機能修復学講座口腔生理学分野・講師
研究者番号：00610312

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：