

研究者：廣瀬 健佑（所属：日本大学歯学部 小児歯科学講座）

研究題目：光遺伝学的手法による腕傍核における侵害情報機構の解明

目的：

ヒトの成長段階のうち、離乳食から幼児食へ切り替わる時期に味の嗜好性も現れるため不適切な摂食行動が生じやすくなる。その対応として、食事の形態や味付けを変えるなど、摂食指導が主である一方、生理機能での対応はほとんど確立されていない。そこで、本研究では嫌悪味覚について弧束核を介して味覚情報および口腔領域における侵害情報を受容する腕傍核（PBN）が口腔領域の感覚を統合する島皮質（IC）によってどのように嫌悪味覚情報の調節を受けているかについて解析を行うこととした。

対象および方法：

実験には PBN 内に分布する興奮性ニューロン、抑制性ニューロンおよびアセチルコリン作動性介在ニューロンを各々同定するために GABA 作動性ニューロンに緑色蛍光タンパク質（Venus）を発現し、コリン作動性ニューロンに赤色蛍光タンパク質（tdTomato）を発現させた遺伝子改変動物である Venus×ChAT-tdTomato ラットを用いた。はじめに、キニーネに反応する腕傍核ニューロンの分布を同定するため、ラットの舌にキニーネによる苦味刺激を加え、2 時間後に 4 % パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、PBN を含むスライス標本作製し、c-fos 発現領域を免疫組織学的に解析した。次に、青色光刺激によって活性化される非選択的陽イオンチャネルである Channel rhodopsin-2（ChR2）をアデノ随伴ウイルスベクターによってラットの IC ニューロンに導入した。4～5 週間後に腕傍核を含む急性脳スライス標本作製し、キニーネに応答する腕傍核ニューロンが発現している領域に波長 473nm の LED 光刺激を加え、それにより誘発される興奮性ならびに抑制性シナプス応答をホールセル・パッチクランプ法にて記録した（図 1）。

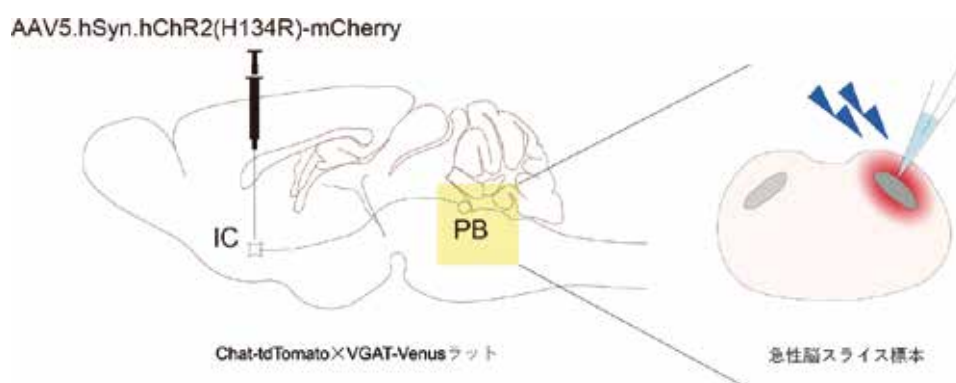


図 1 Chat-tdTomato×VGAT-Venus ラットの IC に AAV5.hSyn.hChR2 (H134R) -mCherry を注入し、LPBN がある軸索終末まで ChR2 を発現させる。4～5 週間飼育し、同ラットより腕傍核を含む急性脳スライス標本作製し、同スライスで ChR2 を発現した IC → LPBN 下行性投射線維を光刺激にて選択的に興奮させる光刺激時のニューロンにおける電位変化をホールセル・パッチクランプ法にて記録した。

結果および考察：

共焦点レーザー顕微鏡にて免疫組織学的に解析した結果、腕傍核外側部（LPBN）に集中して分布することが確認できた。そこで、IC → LPBN を選択的に ChR2 を発現した IC → LPBN 下行性投射線維を光刺激にて選択的に興奮させ、その時の応答をホールセル・パッチクランプ法にて電気生理学的に解析した結果、興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、アセチルコリン作動性介在ニューロンの各々から興奮性シナプス後電流（pEPSC）を記録できた。各々のニューロンは、非選択的アセチルコリン受容体作動薬であるカルバコールの灌流投与により EPSC の振幅は有意に減弱し、ムスカリン M₁ 受容体選択的拮抗薬であるピレンゼピンの灌流投与により振幅の減弱は阻害された（図 2）。これは、口腔顔面領域における侵害情報の 1 次中継核である三叉神経脊髄路核尾側亜核（Sp5C）に ChR2 を発現させ、Sp5C → LPBN においても、興奮性ニューロンに関しては同様の結果が得られた。したがって、IC は LPBN へ興奮性の入力を送ることで LPBN から上位脳への伝達を増幅する一方で、ChNs を活性化することで、その過興奮を制御している可能性が示唆された。今後は味覚の中継核である弧束核へ ChN2 を発現させ、LPBN へ投射するニューロンを同波長の LED にて選択的に光刺激を行い、IC → LPBN、Sp5C → LPBN と同等の応答が出るか解析する予定である。

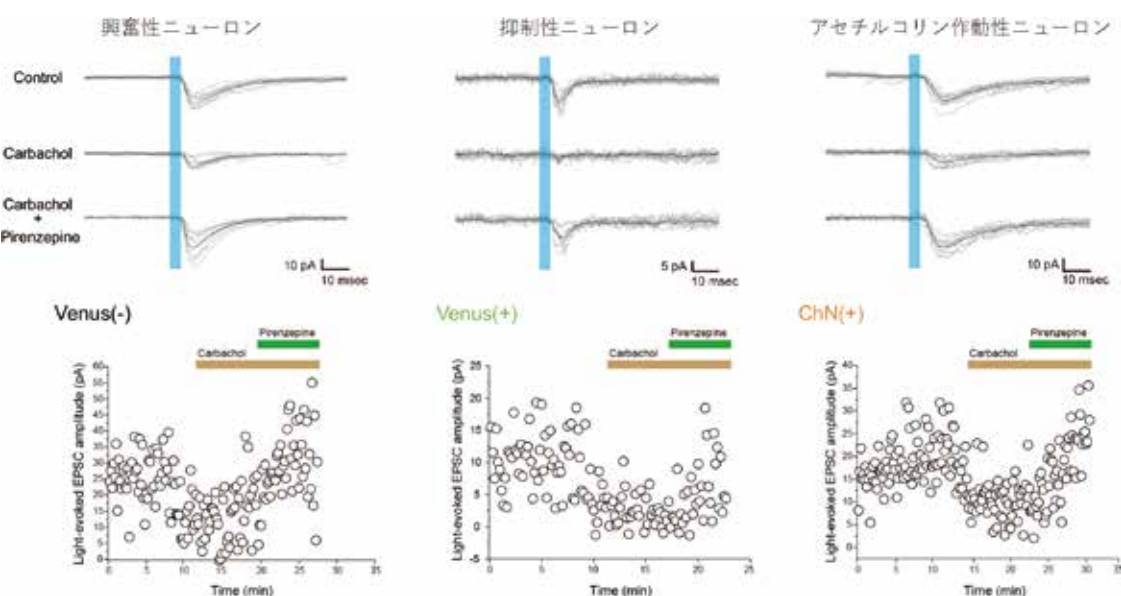


図 2

成果発表：（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）

- ・ 第 67 回 歯科基礎医学会学術大会にて口頭発表予定