Osaka University Knowledge Archive

Title	三叉神経運動核閉口筋領域内のγ運動ニューロンの電気生理学的および形態学的特性
Author(s)	西村, 佳世
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34350
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　西村　佳世　　）	
論文題名	三叉神経運動核閉口筋領域内のγ運動ニューロンの電気生理学的および形態学的特性

【背景・目的】

伸張反射回路は筋収縮運動の最も基本的な調節機構として機能する。伸張反射は、筋紡錘錘内筋を支配している環螺旋形終末（一次終末）の活性化によって生じるが、その感度は、錘内筋の両側の収縮蛋白を支配するγ運動ニューロン（γMN）の活動によって制御されている。

咀嚼筋は機能的に閉口筋および開口筋に大別される。筋紡錘は開口筋にはほとんど存在しないが、閉口筋には多数存在する。特に咬筋では、１個の筋紡錘に含まれる錘内筋線維数が全身の骨格筋中で最大であり，極めて鋭敏な筋紡錘を持つことが判っている（Eriksson et al. 1994）。また、閉口筋筋紡錘を支配する三叉神経中脳路核一次感覚ニューロン（Ia）の軸索終末が、三叉神経運動核（TMN）内ので、単一の閉口筋α運動ニューロン（αMN）に対し形成している興奮性シナプスの個数は、四肢筋におけるIa－αシナプスに比べて少ない（Bae et al. 1996）。これらのことから、閉口筋の伸張反射回路は、四肢筋のものとは異なり、興奮性シナプス後電位の時間的加重を基盤として制御されていると考えられる。一方、四肢筋の一次感覚ニューロン（Mendell et al. 1968 & 1971）　と同様に、1個の三叉神経中脳路核ニューロンはTMN内で多数の分枝をもち、その背外側部の閉口筋領域内にある多数のαMNに対し興奮性シナプスを形成すること（Shigenaga et al. 1990 & 1988）が知られており、そうしたIa入力がαMNの序列動員に寄与すると考えられている(Henneman et al 1991) 。これらの知見を総合すると、四肢筋と閉口筋では、その運動制御機構が異なる可能性が大である。特に、等尺性収縮運動の制御にはγMNが重要な役割を果たすこと(Valbo 1970) が知られていることから、「噛み締め運動」時のような閉口筋等尺性収縮運動が行われる際のγMN－Ia－αMN回路は、四肢筋等のそれとは極めて異なる機能を発揮するものと考えられる。従って、咀嚼運動制御機構を明らかにするためには、γMNの電気生理学的および形態学的特性を解明することが不可欠であると考えられる。

そこで、本研究ではγMNの電気生理学的特性および形態学・組織学的特性を明らかにするため、幼弱ラット脳幹スライス標本において三叉神経運動核閉口筋領域内に存在する運動ニューロンの発火特性をホールセル電流固定記録によって電気生理学的及び免疫組織化学的に検討した。電気生理学的記録終了後、記録細胞の免疫組織化学的解析を行った。成獣マウスの腰髄前根において、α運動ニューロンには NeuN（neuronal nuclei）が発現しているのに対して、γ運動ニューロンには発現していない（Friese et al 2009）との報告があることから、電気生理学的記録終了後、固定したスライス標本において choline acetyltransferase（ChAT；コリン作動性ニューロンのマーカー）および NeuN に対する蛍光免疫染色を行い、免疫組織化学的に記録ニューロンの細胞種を同定した。

【方法】

7～12日齢のWistar系ラットから三叉神経運動核を含む厚さ250 μmの冠状断脳幹スライス標本を作製し、閉口筋領域のニューロンからホールセル電流固定下で膜電位記録をした。パッチ電極には、グルコン酸カリウムを主成分とする内液を充填し、記録後に組織学的解析を行うため、10 mMビオシチンを添加した。細胞外灌流液には標準人工脳脊髄液を用いた。

電気生理学的記録終了後、固定したスライス標本において ChAT および NeuN に対する二重蛍光免疫染色とビオシチンの可視化（蛍光標識）を行った。染色後、標本をスライドグラスにマウントし、共焦点レーザー顕微鏡で観察して画像を取得した。得られた画像上で、記録細胞の形状と、ChAT および NeuN に対する蛍光標識の強度を解析した。

【結果】

三叉神経運動核閉口筋領域内に存在する運動ニューロン（ChAT陽性細胞）のうち、免疫組織学的手

法によりαMNと同定された細胞（NuuN陽性細胞）には、A型K^+電流（A-like K^+ current ; I_{KA}）のみを呈する細胞（Type I）と、I_{KA}および低閾値型Ca^{2+}スパイク（low-threshold calcium spike ; LTS）を呈する細胞（Type II）が認められた。その樹状突起は豊富で、比較的大型の細胞であった。一方、免疫組織学的手法によりγMNと同定された細胞（NeuN陰性細胞）は、I_{KA}およびLTSを共に示さないがパルス後脱分極電位（pulse afterdepolarization ; pulse-ADP）および持続性Na^+電流（persistent Na^+ current ; I_{NaP}）を呈し、αMNとは全く異なる興奮性を持つことが、明らかとなった。その細胞径は比較的小さく、その樹状突起はαMNに比べて比較的短く、分枝も少ないことが明らかとなった。パルスADPを示したニューロンについて、細胞外灌流液中に、TRPCチャネル等のCa^{2+}依存性カチオンチャネルの遮断薬flufenamic acidを投与すると、pulse-ADPの振幅が減少した。

【考察】

後根神経刺激により運動ニューロンにおいて引き起こされるシナプス後電位は胎生15日齢で初めて観察され（Kudo et al. 1987）、ほぼ同時期に運動神経線維は筋線維に初めてシナプス接合する。しかし、この時期には、個々の筋線維は複数の神経線維により多重支配を受けており、正常な筋収縮は引き起こされない（Dennis et al. 1981）。運動ニューロンの出生直後の興奮性の増加は、運動に関与する神経ネットワークにおけるシナプス伝達の生後発達を促進するだけでなく、筋線維の分化や神経筋接合部におけるシナプス伝達の分化をも促進する（Navarette et al. 1993）。例えば、ヒラメ筋の神経筋接合部では、特定の運動神経線維による筋線維の選択的支配が、運動ニューロンの興奮性の増加に依存して、生後10日齢くらいまでに終了し、さらに、白筋や赤筋等の筋線維種に従った運動単位の分化が生後10~12日齢で出現し、14日齢までに確立される。

脊髄運動ニューロンにおける活動電位の特性や発火パターンは胎生後期から出生直後に著しく変化し（Fulton, B.P. et al. 1986）、その興奮性が増加する。運動ニューロンにおける自発性活動電位の発生頻度は、胎生15~16日齢に比べて、生後1~3日齢で顕著に増加し、電流刺激に対しても反復発火し得るようになる。さらに、生後2~3週齢の間に反復発火頻度の増加が見られるようになり、成熟型に近いものになる（Gao, B.X.et al. 1998）。こうした生後発達に伴う，活動電位波形の変化や反復発火能の獲得は，新しいイオンチャネルの出現よりも，既存のイオンチャネルの発現密度の増加によることが明らかにされている（Gao, B.X.et al. 1998）。

ラットの顎運動の様式は、出生後12日までに母乳の吸啜から餌の咀嚼へと移行し、生後2~3週齢で咀嚼運動パターンが成熟する（Thexton et al. 1979）。咀嚼運動、特に噛み締め運動におけるγMNの重要性を考慮すると、吸啜から咀嚼への運動様式の変化過程とγMNの分化発達は密接に関連する可能性が高い。このこととαMNによる筋線維の多重支配から選択的支配への変化が生じる過程を合わせて考えると、αMNが錘外筋を支配し、γMNが錘内筋を支配する選択性は生後10日齢くらいまでに完了しており、生後10~12日齢ではαMNおよびγMNは支配するそれぞれの筋線維種に整合した分化、つまり、広義の意味での運動単位の分化を開始するようになると考えられ、吸啜から咀嚼運動への移行体性が整うことになると考えられる。従って、本研究で用いた7~12日齢の標本は、成熟型に近いγMNの性質を記録したものと考えることができる。

Pulse-ADPは少なくとも5秒以上持続していることから、Ca2+依存性カチオンチャネルの脱活性化が極めて遅いか、或いは、活性化が電位依存性Ca2+チャネルを通じた細胞外からのCa2+流入だけでなく、そのCa2+流入により引き起こされる細胞内Ca2+ストアからの緩徐なCa2+の放出（Ca2+-induced Ca2+-release; CICR）（Endo et al. 1977） によっても生じている可能性が想定される．後者の場合、こうしたCa2+依存性カチオンチャネルは、さまざまな神経修飾物質により調節を受けることが想定される。例えば、ムスカリン受容体や代謝調節型グルタミン酸受容体の活性化によりIP3-induced Ca2+ release（IICR）が生じ、細胞内Ca2+が増加する。その結果、Ca2+依存性カチオンチャネルが活性化され、γMNの興奮性が増加すると考えられる．従って、γMNの興奮性がαMNの興奮性と同様に修飾可能であるということになる。このことは、α−γ連関におけるゲイン比率のダイナミックレンジが極めて大きくなり、噛み締め運動のような等尺性収縮運動のより厳密な調節が可能となることを示唆している。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　西村　佳世　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	姜　英男
	副 査　教授	吉田　篤
	副 査　准教授	中村　渉
	副 査　講師	本間　志保

論文審査の結果の要旨

本研究では、「噛み締め運動」時のような閉口筋等尺性収縮運動の制御に重要な役割を果たすとされているγ運動ニューロンの電気生理学的および形態学・組織学的特性を解明するため、幼年ラット脳幹スライス標本を用いて、三叉神経運動核閉口筋領域内に存在するニューロンから記録を行い、それらの特性を検討した。

その結果、三叉神経運動核閉口筋領域内に存在するニューロンのうち、免疫組織学的手法によりγ運動ニューロンと同定された細胞は、Ca^{2+}依存性カチオン電流により特徴付けられる発火特性を示し、α運動ニューロンとは全く異なる興奮性を持つことが初めて明らかとなった。

本研究の結果は、等尺性収縮要素が大きい咀嚼運動の神経制御機構を明らかにする上で、極めて重要な知見であると考えられる。従って、本論文を博士（歯学）の学位取得に値するものと認める。