141　咀嚼運動における神経回路の同定	小野　岳人

【目的】咀嚼運動は、栄養を摂取するために必須の生体機能である。咀嚼機能が障害されると、発育障害や誤嚥性肺炎、さらには認知機能の低下が起こりうる。一方、咀嚼運動の亢進は記憶／集中／覚醒といった脳機能を向上させることが知られている。このような背景から、近年、口腔の健康に対する関心が高まっている。

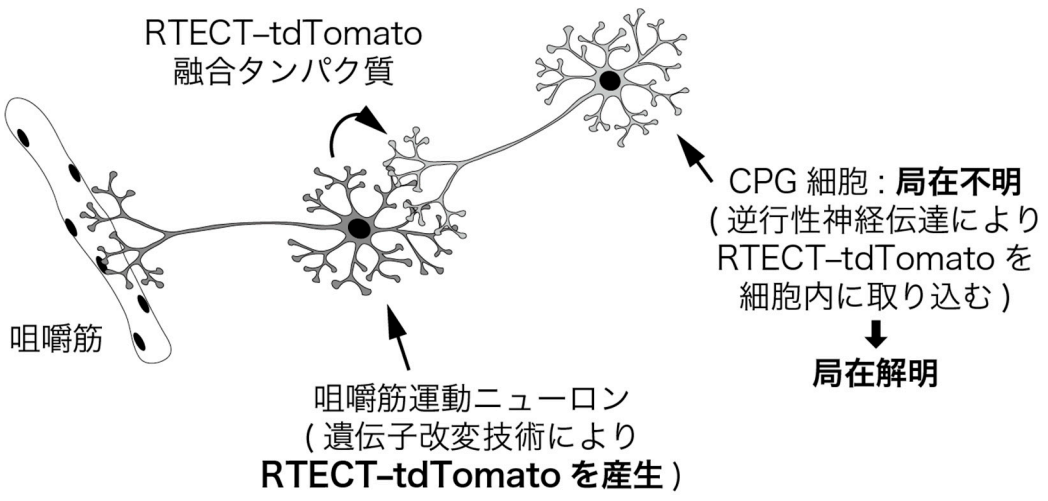
咀嚼に際しては、咀嚼筋をはじめ多くの筋が協調し、顎がスムーズかつリズミカルに動く。そのためには、上位脳や末梢臓器からの情報がセントラルパターンジェネレーター（CPG）により統合される必要がある。CPG の実体は不明であり、現状では概念的な存在でしかない。本研究では、既存の方法とは全く異なる CPG 探索法の確立を目的とした。

【方法】脳幹への侵襲の無い CPG 探索法として、逆行性神経伝達を利用した特異性の高い神経細胞の標識方法を考案した。シナプス間を逆行性に伝達され、上位ニューロンに取り込まれる因子、retrogradely–transmitted and endocytosed CPG tracer（RTECT、仮称）と蛍光分子 tdTomato の融合タンパク質を咀嚼筋運動ニューロンで発現するマウスを作出することで、咀嚼筋運動ニューロンの上位ニューロンが標識できると考えた。

マウスの咀嚼筋運動ニューロンが存在する三叉神経運動核が位置する脳幹部の免疫組織学的解析により、RTECT の組織内での発現を評価した。RTECT と tdTomato の融合タンパク質 RTECT–tdTomato をレトロウイルスベクターにサブクローニングした。ウイルス感染細胞が産生する RTECT–tdTomato 分子の細胞外への分泌を tdTomato の蛍光を指標に評価した。RTECT–tdTomato を発現するノックイン細胞を作製するために、ベクターの設計と構築を行った。

【結果】免疫組織染色法により、三叉神経運動核における RTECT およびその受容体 RTECTR の発現が確認された。RTECT と tdTomato の融合タンパク質 RTECT–tdTomato を作製するために、マウスの *Rtect* 遺伝子及び tdTomato 遺伝子をクローニングした。*Rtect* と tdTomato の間にリンカー配列を挿入し、レトロウイルスベクターにサブクローニングした。ウイルス感染細胞には tdTomato の蛍光が認められ、融合タンパク質の tdTomato 部分が正常にフォールディングされていることが示唆された。ウイルス感染細胞の培養上清からも tdTomato の蛍光が検出され、RTECT–tdTomato の細胞外への分泌が示唆された。Cre 依存的に内因性の RTECT の代わりに RTECT–tdTomato を発現するノックイン細胞を作製するために、マウスゲノムを切断する gRNA および Cas9 タンパク質の発現ベクターの構築、そしてノックインアレルのサブクローニングを行った。

逆行性神経伝達を利用した CPG 細胞の同定



141. 咀嚼運動における神経回路の同定

小野　岳人

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子情報伝達学

Key words：キ咀嚼運動，セントラルパターンジェネレーター，神経伝達

緒　言

咀嚼運動は、栄養を摂取するために必須の生体機能である。咀嚼機能が障害されると、発育障害や誤嚥による肺炎が起こりうる。誤嚥性肺炎は時として致死的であり主要な死因の一つである。さらに、歯の喪失による咀嚼障害は認知機能の低下を引き起こす。一方、咀嚼運動の亢進は記憶／集中／覚醒といった脳機能を向上させることが知られている。また、実験動物においても咀嚼と脳機能の関連が示されている［1］。したがって、咀嚼運動が生きていく上で重要であることに異論を挟む余地はなく、近年、口腔の健康に対する関心が高まっている。

咀嚼に際しては、咀嚼筋をはじめ多くの筋が協調することで、食物を噛み切ったりすり潰すことが可能となる。咀嚼は歩行や呼吸などと同様に、意識せずとも関連する筋群が協調することでスムーズかつリズミカルに行われる。そのためには、上位脳からの筋収縮シグナルと末梢臓器からの感覚情報が司令塔となる神経細胞、セントラルパターンジェネレーター（CPG）により統合される必要があるが［2］、CPG の本体となる細胞は不明であり、概念的な存在でしかない。

これまで、頭蓋内に電極を刺入したりトレーサーを注射することにより咀嚼運動の CPG 細胞の同定が試みられてきた。しかし、頭蓋内への物理的な介入は手技的に困難であり、未だ同定には至っていない。本研究では、既存の方法とは全く異なる CPG 細胞の探索法の確立を目的とした。

方法および結果

1.　CPG 細胞の新規探索法に用いるトレーサー分子の選定

咀嚼、呼吸、歩行など、意識せずとも行うことが可能なリズミカルな運動は CPG 細胞により制御されると考えられている。CPG 細胞を同定するために、候補となる神経核に電極を刺入したりトレーサーを注射するという方法が採られてきた。しかし、咀嚼筋運動ニューロンが位置する脳幹には呼吸中枢や嚥下中枢も存在し、電極や注射針によるこれらの中枢の損傷のリスクがあることから、物理的な介入は望ましくない。本研究では、逆行性神経伝達を利用した CPG 細胞の探索法の確立に取り組んだ。

Retrogradely–transmitted and endocytosed CPG tracer（RTECT、仮称）は、シナプス間を逆行性に伝達され上位ニューロンに取り込まれる分子である。この分子が三叉神経運動ニューロンで発現すれば、CPG 細胞のトレーシングに用いることが可能であると考えた。そこで、成獣マウスの脳幹の凍結切片を作製し、RTECT とその受容体 RTECTR の発現を免疫組織染色法により検討した（図 1a）。その結果、三叉神経運動核において、咀嚼筋運動ニューロンと思われる細胞突起が多くサイズが大きい細胞において RTECT の発現が認められた（図 1b）。また、運動ニューロンおよびその近傍の細胞において RTECTR の発現が認められた（図 1b）。よって、RTECT を蛍光分子によって標識した融合タンパク質を咀嚼筋運動ニューロンで発現させることで、CPG 細胞を含む上位のニューロンを標識することができると考えた。

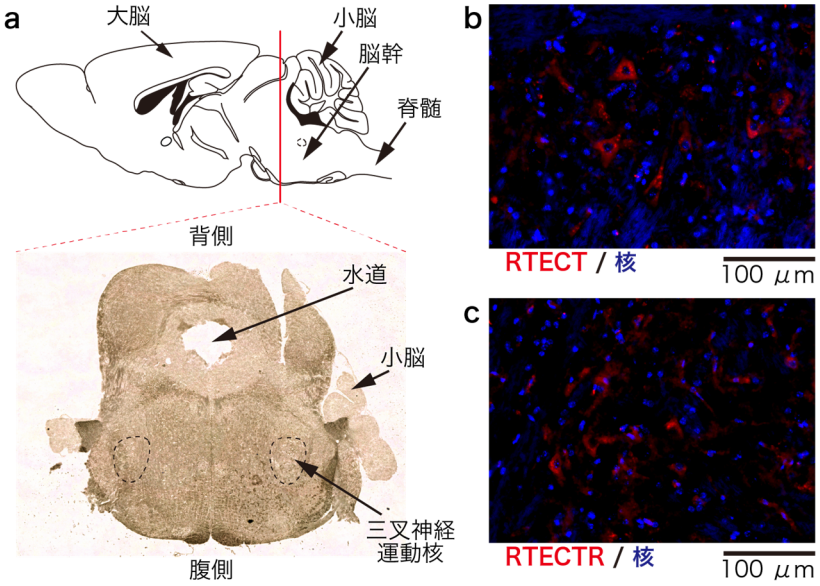


図 1. 咀嚼筋運動ニューロンにおいて RTECT と RTECTR が発現する成獣マウスの三叉神経運動核の凍結切片。

a) マウス脳組織の模式図。上: 矢状断。下: 赤線部の冠状断。

b) 三叉神経運動核における RTECT の発現。

c) 三叉神経運動核における RTECTR の発現。

2. RTECT–tdTomato 融合タンパク質の作製

RTECT を蛍光標識するために、RTECT–tdTomato 融合タンパク質の作製を行った。野生型および tdTomato を発現するマウスのゲノム DNA より PCR 法によりそれぞれ *Rtect* と tdTomato 遺伝子をクローニングした。*Rtect* の終止コドンの代わりにリンカー配列を付与し、さらに 5'–および 3'–末端に制限酵素認識配列を付与し、プラスミド pBlueScript Ⅱ にサブクローニングした（pBS–*Rtect*–linker）。tdTomato も同様にサブクローニングした（pBS–tdTomato）。pBS–*Rtect*–linker の linker 配列の 3'–末端に pBS–tdTomato より切り出した tdTomato を挿入し、pBS–*Rtect*–linker–tdTomato を得た。このプラスミドの *Rtect*–linker–tdTomato 部分の配列を確認後、同配列をレトロウイルスベクターpMXs–IRES–GFP（pMXs–IG）に挿入し、pMXs–*Rtect*–linker–tdTomato–IG を得た。また、tdTomato 配列のみを挿入したプラスミド pMXs–tdTomato–IG を作出した。

pMXs–*Rtect*–linker–tdTomato–IG とコントロールプラスミド pMXs–IG、pMXs–tdTomato–IG をパッケージング細胞 PlatE 細胞にそれぞれトランスフェクションさせたところ、いずれのプラスミドを用いた場合にも同程度の GFP 陽性細胞を認めた。tdTomato の蛍光は pMXs–IG をトランスフェクションさせた場合には認められず、pMXs–tdTomato–IG の場合は強い蛍光を認め、pMXs–*Rtect*–linker–tdTomato–IG の場合には弱い蛍光を認めた（図 2a）。

これらの細胞の培養上清を限外濾過により濃縮し、プレートリーダーにて tdTomato の蛍光強度（波長 581 nm）を測定したところ、pMXs–*Rtect*–linker–tdTomato–IG をトランスフェクションした場合、コントロールプラスミドよりも大きな吸光度を示した（図 2b）。以上より、作製した RTECT–tdTomato 融合タンパク質の一部が培養上清中に分泌された可能性が考えられた。今後、ウエスタンブロッティング法によりこの仮説を検証する。

3. RTECT–tdTomato 融合タンパク質発現細胞株の樹立

PlatE 細胞を用いて作製したレトロウイルスを MC3T3-E1 細胞に感染させたところ、GFP 陽性の感染細胞を認めた。tdTomato–IG 発現ウイルスに感染した GFP 陽性 MC3T3-E1 細胞は tdTomato 強陽性となった。RTECT–linker–tdTomato–IG 発現ウイルスに感染した GFP 陽性細胞は tdTomato 弱陽性であった（図 3）。フローサイトメトリー法にて、コントロールウイルスおよび、tdTomato–IG 発現ウイルスの感染効率は 80%を超えていたが、RTECT–linker–tdTomato–IG 発現ウイルスの感染効率は 50%程度であった。そこで、セルソーティングを行い、GFP 陽性細胞のみを分取した。これらの細胞を用いて、融合タンパク質の評価を行う予定である。また、必要であれば限界希釈法を行うことにより、この融合タンパク質を安定して発現する細胞クローンを樹立する。

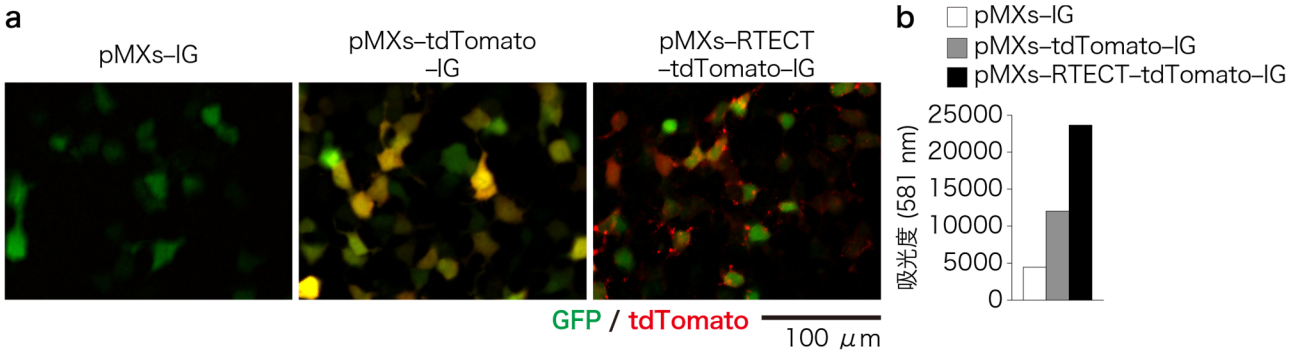


図 2.　レトロウイルスベクターにより RTECT–tdTomato が発現し培養上清中に分泌される

a)　レトロウイルスベクターをトランスフェクションした PlatE 細胞における tdTomato の発現。pMXs–IG、pMXs–tdTomato–IG、pMXs–*Rtect*–linker–tdTomato–IG をトランスフェクションした細胞の蛍光顕微鏡写真。

b)　各々の細胞の培養上清の tdTomato の蛍光強度。

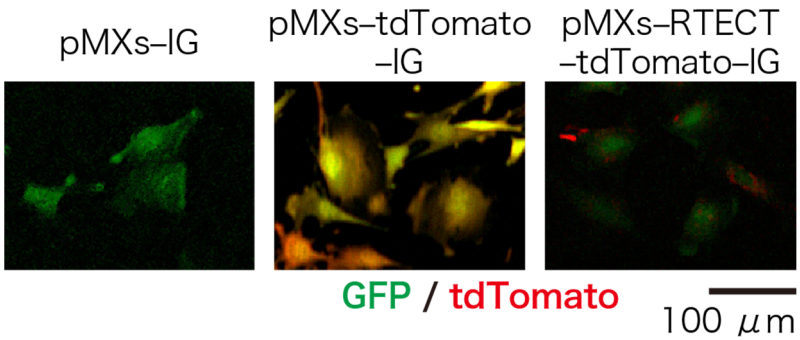


図 3.　レトロウイルス感染により RTECT–tdTomato が発現する

pMXs–IG、pMXs–tdTomato–IG、pMXs–*Rtect*–linker–tdTomato–IG のトランスフェクションにより得られたレトロウイルスを感染させた MC3T3-E1 細胞における GFP および tdTomato の発現。

4.　Cre 依存的 RTECT–tdTomato 発現ノックイン細胞の樹立

ゲノム編集により RTECT–tdTomato 融合タンパク質が Cre 依存的に発現する細胞株を作出するために、以下のベクターを設計した：CRISPR 5’; CRISPR 3’; ノックインベクター（図 4）。CRISPR 5’と CRISPR 3’は *Rtect* のエクソンのそれぞれ 5’-UTR および 3’-UTR に存在する PAM 配列を認識するガイド RNA（gRNA）が U6 プロモーターにより発現する。また、これらのベクターは CMV プロモーターによって Cas9 タンパク質を発現するため、トランスフェクションした細胞では *Rtect* のエクソンが切り出される。ノックインベクターには 5’および 3’PAM 配列とそれらに挟まれた loxP–*Rtect*–polyA–loxP、それに続く *Rtect*–linker–tdTomato がコードされており、CRISPR 5’と CRISPR 3’により誘導される gRNA と Cas9 によってノックイン配列部分が切り出される。DNA の修復機構によってノックイン配列が細胞のゲノム DNA に組み込まれる。遺伝子組み換えに際し、HITI 法により逆向きのノックインを防ぐ［3］。さらに、2H2OP 法を組み合わせることにより、ノックインの効率を上げる［4］。

設計した DNA コンストラクトがノックインされた細胞においては、通常の細胞と同様に *Rtect* が発現するが、ウイルスなどを用いて Cre を発現させることにより、2 つの loxP 配列に挟まれた *Rtect* がループアウトされ、*Rtect*–linker–tdTomato が発現する。現在すでに 3 種類のベクターが完成しており、まずは培養細胞にこれら 3 種類のベクターをトランスフェクションし、ノックイン効率の評価を行う予定である。十分なノックイン効率が得られ、Cre 組み換えによって *Rtect*–linker–tdTomato が発現することが確認されたら、同様の遺伝子変異を有する遺伝子改変マウスの作出に取り組む予定である。

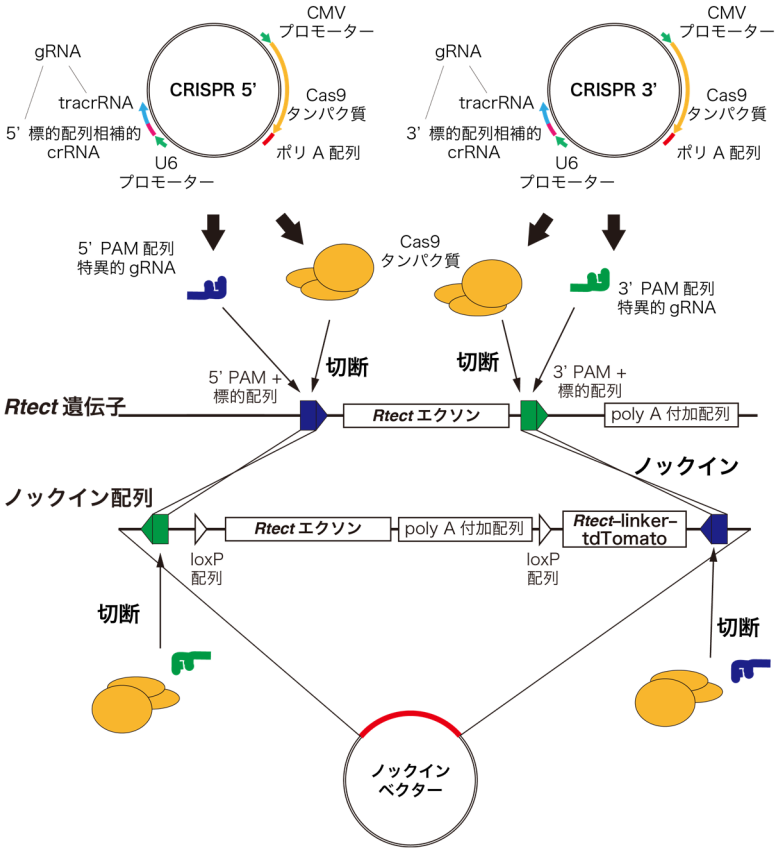


図 4. ゲノム編集によって Cre 依存的に RTECT–tdTomato を発現する細胞／マウスを作出する。
Cre 依存的に RTECT–tdTomato を発現する細胞を作製するためのゲノム編集の概略図。*Rtect* の 5’–および 3’–UTR の PAM 配列を Cas9 により切断するためのベクターおよび、ノックイン配列を有するベクター、計 3 種類のベクターをトランスフェクションすることによって、ノックイン配列を切断部位に挿入する。

考　察

咀嚼や呼吸運動を制御するパターンジェネレーターの概念が提唱され 50 年以上が経つが、その同定は進んでいない［5］。既存の手法は、脳への操作を必要とするため神経への侵襲が大きく、手技も困難である。

本研究は、マウスジェネティクスを用いることで、既存のものとは全く異なるコンセプトのトレーシングシステムを開発し、パターンジェネレーターの同定に挑戦するものである。このシステムの開発に成功すれば、咀嚼運動を制御する複雑な神経ネットワークの司令塔となる細胞が明らかになり、神経ネットワークの全貌解明が加速する。また、このシステムは、咀嚼運動の制御機構だけでなく、呼吸運動や歩行運動の制御機構研究の原動力にもなることが期待できる。現時点で、作製した RTECT–tdTomato が細胞外に分泌されること、この融合タンパク質において tdTomato の蛍光が保持されることが確認されており、タンパク質のフォールディングやトラフィッキングはタンパク質の融合により大きく阻害されないと考えられる。今後、融合タンパク質の受容体発現細胞における取り込みや、RTECT としての生理活性の検討が必要である。

老化や薬剤の副作用による咀嚼機能障害に対する有効な治療法は存在しない。本研究により咀嚼運動の司令細胞を同定し、咀嚼機能障害におけるCPGの異常を解析することで、それらの病態の詳細の解明や治療標的の発見につながることが期待できる。わが国においては平均寿命が延長し、高齢者のQOLを高めるために口腔の健康にも注目が集まっている。CPG細胞を標的とした咀嚼機能障害の治療薬の開発に成功すれば、高齢者の平均寿命と健康寿命の両方を延伸することができ、臨床的・社会的にも大きな意義があると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人上原記念生命科学財団の「研究奨励金」事業の助成を受けた。関係者諸氏に心より感謝申し上げる。

文　献

1) Ono T, Nakashima T. [Exercise and brain function.]. Clinical calcium. 2018;28(1):57-64. Epub 2017/12/28. doi: CliCa18015764. PubMed PMID: 29279427.
2) Nakamura Y, Katakura N. Generation of masticatory rhythm in the brainstem. Neuroscience research. 1995;23(1):1-19. Epub 1995/08/01. PubMed PMID: 7501294.
3) Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. Nature. 2016;540(7631):144-9. Epub 2016/11/17. doi: 10.1038/nature20565. PubMed PMID: 27851729; PubMed Central PMCID: PMCPMC5331785.
4) Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. Nature communications. 2016;7:10431. Epub 2016/01/21. doi: 10.1038/ncomms10431. PubMed PMID: 26786405; PubMed Central PMCID: PMCPMC4736110.
5) Wilson DM, Wyman RJ. MOTOR OUTPUT PATTERNS DURING RANDOM AND RHYTHMIC STIMULATION OF LOCUST THORACIC GANGLIA. Biophysical journal. 1965;5:121-43. Epub 1965/03/01. PubMed PMID: 14268949; PubMed Central PMCID: PMCPMC1367713.