

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00818

研究課題名(和文) 血糖調節因子GLP-1による食物受け入れ過程の調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study for regulatory mechanism of feeding-related phenomena by GLP-1

研究代表者

小橋 基 (Kobashi, Motoi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80161967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食事によって分泌され食欲を抑える作用をもつグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) が、嚥下能をどのように調節するかについて麻酔下ラットを用いて検討した。本課題の研究によりGLP-1は嚥下反射の誘発を抑制的に調節することが明らかとなった。その作用部位は延髄の嚥下を起動する神経群が存在する部位よりも内側の孤束核であった。空腹により摂食中枢から分泌され摂食を促進するオキシシンAをGLP-1投与に先立って投与しておくこと、GLP-1の嚥下抑制作用は見られなくなった。これらから摂食に関連した物質は、嚥下を抑制的に調節しながら安定した嚥下の発現に寄与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：The effects of glucagon like peptide-1 (GLP-1), which is appetite-reducing peptide, on reflex swallowing were examined using anaesthetized rats. GLP-1 suppressed reflex swallowing via the medial part of the NTS in the dorsal medulla. Orexin-A, which is appetite enhancing peptide, also suppressed reflex swallowing. The administration of orexin-A prior to the injection of GLP-1 attenuated the degree of suppression of the swallowing response induced by GLP-1-administration. Suppression of reflex swallowing by appetite-related peptides is thought to be helpful in keeping the ability of reflex swallowing constant in cooperation with the suppression of appetite-enhancing peptides.

研究分野：口腔生理学 神経生理学

キーワード：GLP-1 嚥下 延髄 上喉頭神経 ラット 最後野 孤束核 インクレチン

1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初には摂食亢進ペプチドの一つであるグレリンが、延髄背側部の嚥下起動神経群 (DSG; dorsal swallowing group) を介して反射性嚥下を抑制的に調節することが明らかになっていた (Kobashi et al. 2010)。さらに第四脳室に投与したオレキシン A もグレリン同様に反射性嚥下を抑制的に調節することを明らかにしており、この作用は摂食亢進ペプチドに共通したものであると推察していた (Kobashi et al. 2014)。しかし、摂食抑制作用をもつ物質の嚥下に及ぼす効果は飽食ペプチドのレプチンが反射性嚥下を抑制することが明らかになっているのみであった (Felix et al. 2006)。また、これら結果から、摂食亢進と食欲不振時の両方で反射性嚥下が抑制されるということになり、やや整合性に欠けた知見であった。このような背景のもとに本課題研究を行った。

2. 研究の目的

グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) は胃膨満により腸管 L 細胞より分泌され血糖下降作用と共に摂食を抑制する。GLP-1 は、空腹・満腹の直接的メディエーターである血糖と結びついた飽食ペプチドであり、胃収縮性との関連はよく調べられていたが嚥下との関連は調べられていなかった。そこで、私は GLP-1 の摂食抑制作用に着目して、GLP-1 が嚥下反射をどのように調節するかを明らかにするとともに、延髄背側部での作用部位を明らかにするために本研究を計画した。さらに、飽食ペプチドである GLP-1 が摂食亢進ペプチドのオレキシン A とどのように協調してはたらいているのかについても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 嚥下の記録

実験にはウレタン・クロラロス麻酔下の SD 系雄性ラットを用いた。実験中はラットを脳定位固定装置に固定し、直腸温を 36.0-36.5 °C に維持した。上喉頭神経中枢端をプラチナイリジウム線電極を用いた埋め込み型双極フック電極で電気刺激 (20 Hz、20 秒間) することにより反射性嚥下を惹起した。刺激パルスは幅 0.1-0.3 msec、強度 0.1-0.3 mA の範囲で薬液注入前の嚥下回数が 10 回から 20 回の間になるように調整した。舌骨上筋群に刺入した双極釣針電極から導出した筋電図により嚥下運動を同定した。刺激開始時点から初回の嚥下筋電図波形のピークまでの時間を計測し、潜時として示した。

(2) 試薬の注入

GLP-1 及び GLP-1 受容体拮抗薬、オレキシン A はリンゲル液に溶解した。オレキシン受容体拮抗薬の SB334867 はジメチル

スルホキシドに溶解した。これら試験溶液は、第四脳室に滴下投与 (3 μ l) または延髄背側部に微量注入 (60 nl) した。微量注入には微量注入装置を用い、装置に装着した尖端径 30 μ m のガラス管を延髄背側部に刺入し注入を行った。

(3) 試薬の注入部位

リンゲル液に溶解した GLP-1 を DVC の異なる 2 部位、すなわち嚥下起動神経群の存在する孤束周辺の部位 (外側部)、または最後野と孤束核交連部を含む部位 (正中部) のいずれかに微量注入した。

(4) 延髄の部分破壊

延髄正中領域のどの部位に GLP-1 が作用し、反射性嚥下を抑制したか明らかにするため、正中領域内の異なる 3 部位を破壊した。最後野は吸引除去、孤束核交連部は電気焼灼、孤束核の内側核は電気焼灼した。破壊後に、リンゲル液に溶解した GLP-1 (20 pmol) を正中部位に 60 nL 微量注入した。

(5) 結果の解析

GLP-1 投与前後の刺激期間中の嚥下回数と潜時を用いた。数値データは平均値 \pm 標準誤差で示した。試薬投与の効果の有無は、投与 5 分前と投与 10 分後の値を Dunnett 法を用いて比較検討した。多重比較には ANOVA を用い、post hoc テストには Student-Newman-Keuls 法を用いた。

4. 研究成果

(1) GLP-1 延髄注入が反射性嚥下に及ぼす効果

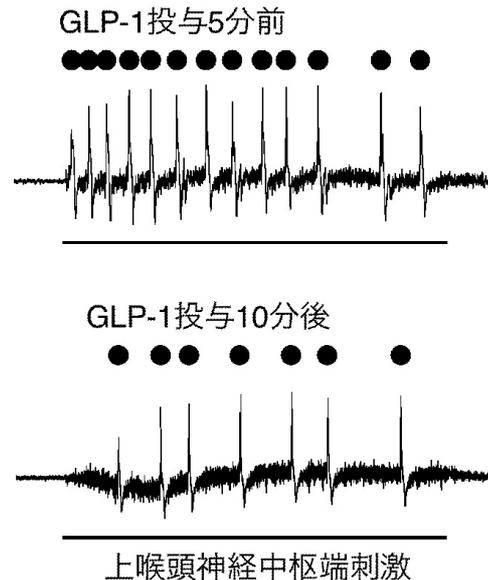


図 1 上喉頭神経中枢端刺激により誘発された舌骨上筋群の筋電図を示す。GLP-1 投与 5 分前 (上) と比して投与 10 分後 (下) には嚥下回数は減少し、初回嚥下潜時は増大した。

GLP-1 を延髄背側部に微量注入した。延髄

背側部の異なる2部位にGLP-1を微量注入し、嚔下におよぼす効果を調べた。GLP-1投与5分前とGLP-1投与10分後の反射性嚔下回数と初回嚔下潜時を比較した(図1)。その結果、正中部に注入したときには、GLP-1投与5分前と比較して嚔下回数($p < 0.05$, $n = 8$)の有意な減少と初回嚔下潜時($p < 0.05$, $n = 8$)の有意な延長が観察された(図2)。外側部に注入したときには、嚔下回数($p = 1.00$, NS, $n = 5$)および初回嚔下潜時($p = 0.89$, NS, $n = 5$)に有意な差が認められなかった。正中部への溶媒の微量注入は、嚔下回数($p = 1.00$, NS, $n = 6$)および初回嚔下潜時($p = 1.00$, NS, $n = 6$)共に有意な変化を生じなかった。試薬投与10分後の変化量では正中部に溶媒を注入した群、正中部にGLP-1を注入した群、外側部にGLP-1を注入した群の三群で嚔下回数($F = 5.85$, $p < 0.05$)、初回嚔下潜時($F = 7.78$, $p < 0.05$)ともに有意な差を示した。

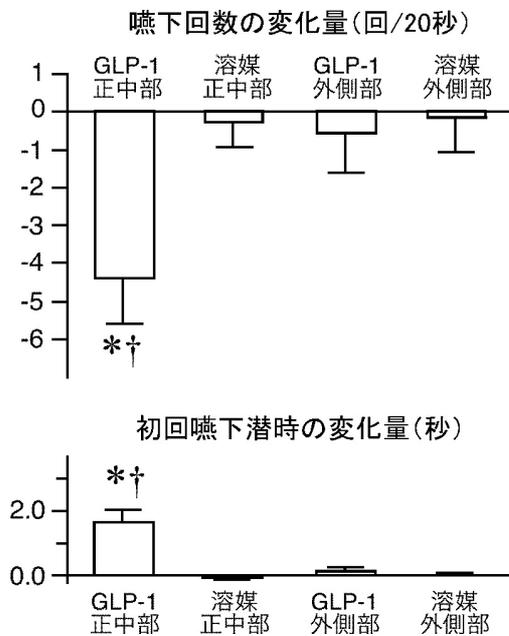


図2 GLP-1及び溶媒を、延髄背内側部の正中部または外側部に注入したときの嚔下回数の変化量(上)と初回嚔下潜時の変化量(下)を示す。GLP-1正中部注入時にのみ嚔下回数の現象と初回潜時の増大がみられた。

正中部にGLP-1を注入した群と正中部に溶媒を注入した群の間に嚔下回数($p < 0.05$)、初回嚔下潜時($p < 0.05$)ともに変化量に有意な差が認められ、正中部にGLP-1を注入した群と外側部にGLP-1を注入した群の間にも嚔下回数($p < 0.05$)、初回嚔下潜時($p < 0.05$)ともに変化量に有意な差が認められた。

(2) GLP-1による反射性嚔下抑制作用を

もたらす部位の同定(図3)

延髄正中部の異なる3部位を部分破壊した後、GLP-1を正中部に微量注入した。GLP-1投与5分前とGLP-1投与10分後の反射性嚔下回数と初回嚔下潜時を比較した。その結果、孤束核内側核破壊群ではGLP-1の効果は嚔下回数($p = 0.98$, $n = 7$)、初回嚔下潜時($p = 1.00$, $n = 7$)ともに消失した。一方、最後野除去群では、嚔下回数($p < 0.05$, $n = 7$)が有意に減少し、初回嚔下潜時($p < 0.05$, $n = 7$)の有意な延長が認められ、GLP-1の効果は消失しなかった。さらに、孤束核交連部破壊群でも、嚔下回数($p < 0.05$, $n = 7$)が有意に減少し、初回嚔下潜時($p < 0.05$, $n = 7$)の有意な延長が認められ、GLP-1の効果は消失しなかった。すなわち、最後野除去群と孤束核交連部破壊群では破壊による効果が認められなかった。試薬投与10分後の変化量では、無破壊群、最後野除去群、孤束核交連部破壊群、孤束核内側部破壊群の4群間においては、嚔下回数($F = 6.81$, $p < 0.05$)と初回嚔下潜時($F = 4.32$, $p < 0.05$)はともに有意な差を示した。孤束核内側核破壊群は無破壊群($p < 0.05$)、最後野除去群($p < 0.05$)、孤束核交連部破壊群($p < 0.05$)と比べて嚔下回数の変化量に有意な差が認められた。さらに、孤束核内側核破壊群は無破壊群($p < 0.05$)、最後野除去群($p < 0.05$)、孤束核交連部破壊群($p < 0.05$)と比べて初回嚔下潜時の変化量に有意な差が認められた。

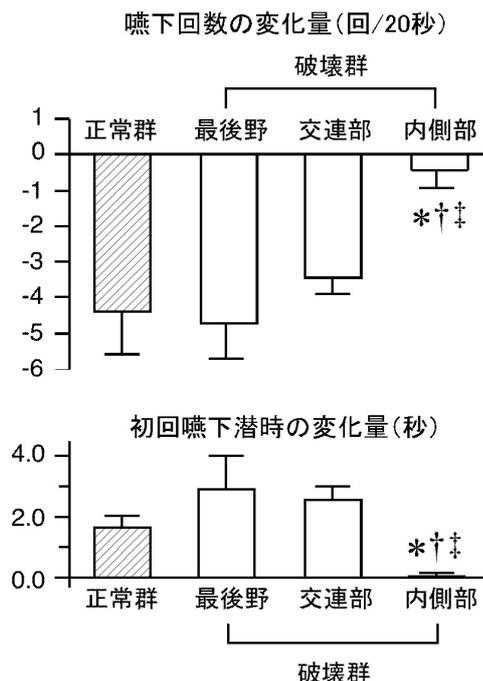


図3 延髄背内側部正中部の部分破壊の効果を示す。いずれの群でももGLP-1を延髄正中部に注入した。その結果、内側部破壊群ではGLP-1注入による応答(嚔下回数の減少と得初回嚔下潜時の増大)がみられなくなった。

(3) 嚥下反射に及ぼす GLP-1 の作用に及ぼすオレキシン A の効果

GLP-1 を延髄孤束核の内側核に微量注入した際の嚥下に及ぼす効果が、オレキシン A あるいはオレキシン 受容体拮抗薬 (SB334867) の前投与によりどのように変化するかを検討した。

オレキシン A 前投与の効果：溶媒の第四脳室滴下投与 20 分後に 20pmol の GLP-1 を孤束核の内側核に注入した。その結果、GLP-1 注入により嚥下頻度は減少し ($F(5,25) = 11.74, P < 0.0001$) 初回嚥下潜時は増加した ($F(5,25) = 4.53, P < 0.0045$)。一方、0.3 nmol のオレキシン A の第四脳室滴下投与 20 分後に同じく 20 pmol の GLP-1 を孤束核の内側核に注入したが、嚥下頻度及び初回嚥下潜時はほとんど変化しなかった (平均嚥下頻度: 0.67 ± 0.92 回/20 秒の増加、平均嚥下潜時: 0.08 ± 0.05 ミリ秒の減少)。溶媒前投与群とオレキシン A 前投与群の GLP-1 応答間では有意な差が認められた (平均嚥下頻度: $t = 4.53, p = 0.0010$; 平均潜時: $t = 3.63, p = 0.0046$)。尚、前投与に用いたオレキシン A の容量 (0.3 nmol) は、単独投与では嚥下反射に影響をもたらさない容量である。

オレキシン 受容体拮抗薬前投与の効果：嚥下に効果を及ぼさない微量の GLP-1 投与に対するオレキシン A 受容体拮抗薬前投与の効果を検討した。溶媒の第四脳室滴下投与 20 分後に、6 pmol の GLP-1 を孤束核の内側核に注入した。6 pmol の注入では嚥下頻度も初回嚥下潜時も変化は認められなかった。SB334867 (10 nmol) 第四脳室滴下投与 20 分後に、6pmol の GLP-1 を孤束核の内側核に注入した。GLP-1 注入により嚥下頻度は減少し、初回嚥下潜時は増加した。溶媒前投与群と比べると、嚥下回数 of 減少量も嚥下潜時の延長幅も有意に大きかった (平均嚥下頻度: $t = 5.78, p = 0.0001$; 平均潜時: $t = 3.01, p = 0.0131$)。さらに、SB334867 (200 pmol) を孤束核交連部に微量注入後に、6pmol の GLP-1 を孤束核の内側核に注入した。GLP-1 注入により嚥下頻度は減少し、初回嚥下潜時は増加した。溶媒投与群と比べると、嚥下回数の減少量も嚥下潜時の延長幅も有意に大きかった (平均嚥下頻度: $t = 7.89, p < 0.0001$; 平均潜時: $t = 3.58, p = 0.0050$)。

(4) これらの結果から、血糖調節因子で摂食抑制作用をもつ GLP-1 は延髄孤束核の内側核を介して嚥下を抑制的に調節することが明らかとなった。また、摂食亢進作用をもつオレキシン A は GLP-1 の嚥下抑制作用を消失させる (脱抑制) が明らかとなった。これらから摂食に関連した物質は、嚥下を抑制的に調節しながら安定した嚥下の発現に寄与していることが示

された。

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7件)

Matsuo, R., Kobashi, M., Fujita, M., 2018. Electrophysiological study on sensory nerve activity from the submandibular salivary gland in rats. Brain Res. 1680, 137-142. 査読あり。

Kobashi, M., Mizutani, S., Fujita, M., Mitoh, Y., Shimatani, Y., Matsuo, R., 2017. Central glucagon like peptide-1 inhibits reflex swallowing elicited by the superior laryngeal nerve via caudal brainstem in the rat. Brain Res. 1671, 26-32. 査読あり。

小橋基, 島谷祐二, 美藤純弘, 藤田雅子, 松尾龍二, 2017. 嚥下反射に及ぼすオレキシン A とグルカゴン様ペプチド 1 の相互作用. 日本味と匂学会誌. 第 51 回大会 Proceeding 集, 69-72. 査読あり。

Mitoh, Y., Ueda, H., Ichikawa, H., Fujita, M., Kobashi, M., Matsuo, R., 2017. Effects of cevimeline on excitability of parasympathetic preganglionic neurons in the superior salivatory nucleus of rats. Auton Neurosci. 206, 1-7. 査読あり。

Matsuo, R., Kobashi, M., Mitoh, Y., Fujita, M., 2015. Role of the lateral hypothalamus in submandibular salivary secretion during feeding in rats. Brain Res. 1596, 99-107. 査読あり。

小橋基, 水谷諭史, 藤田雅子, 美藤純弘, 島谷祐二, 松尾龍二, 2015. GLP-1 の嚥下反射減弱作用に及ぼすオレキシン A の効果. 日本味と匂学会誌. 22, 371-374. 査読あり。

松尾龍二, 小橋基, 2015. 特集/自律神経をもう一度考える 唾液分泌異常と自律神経. JOHNS. 31, 1017-1019. 査読なし。

(学会発表)(計5件)

小橋基, 島谷祐二, 藤田雅子, 美藤純弘, 松尾龍二. GLP-1 はオレキシン A による嚥下減弱作用を抑制する. 日本生理学会第 95 回大会. 2018 年 3 月 28 日. 高松市。

小橋基, 島谷祐二, 藤田雅子, 美藤純弘, 松尾龍二. オレキシン A は GLP-1 による嚥下減弱作用を抑制する. 第 94 回日本生理学会大会. 2017 年 3 月 28 日. 浜松市。

小橋基, 島谷祐二, 美藤純弘, 藤田雅子, 松尾龍二. 嚥下反射に及ぼすオレキシン A とグルカゴン様ペプチド 1 の相互作用. 日本味と匂学会第 51 回大会. 2017 年 9 月 25 日. 神戸市。

小橋基, 藤田雅子, 美藤純弘, 島谷祐二, 松尾龍二. オレキシン A は GLP-1 の嚥下反射減弱作用を相殺する. 第 58 回歯科基礎医学学会学術大会・総会. 2016 年 8 月 26 日. 札幌

市.

小橋基, 水谷諭史, 藤田雅子, 美藤純弘, 島谷祐二, 松尾龍二. GLP-1 の嚔下反射減弱作用に及ぼすオレキシンAの効果. 日本味と匂学会第49回大会. 2015年9月24~26日. 岐阜市.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小橋 基 (KOBASHI MOTOI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号: 80161967

(2) 研究分担者

島谷 祐一 (SHIMATANI YUICHI)

東京都市大学・工学部・准教授

研究者番号: 20154263

美藤 純弘 (MITOH YOSHIHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号: 20240872

松尾 龍二 (MATSUO RYUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授

研究者番号: 30157268

藤田 雅子 (FUJITA MASAKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助手

研究者番号: 40156881

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()