

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08225

研究課題名(和文) 嗅球コリン作動性神経系機能の発達・成長・老化

研究課題名(英文) Age related changes in cholinergic function in the olfactory bulb

研究代表者

内田 さえ (UCHIDA, SAE)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：90270660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はコリン作動性神経系機能の加齢に伴う低下が嗅覚機能に最も早く現われると予想し、嗅球のアセチルコリン放出、血流調節について調べ、大脳新皮質の結果と比較した。その結果、老齢ラットで前脳基底部刺激によるアセチルコリン放出が嗅球で最も少なく、血流調節には関与しないこと、一方で嗅覚刺激による血流増加で観察される嗅覚感受性が $\alpha 4\beta 2$ 型ニコチン受容体を介して高まることを明らかにした。この結果から、嗅球のコリン作動性神経系機能が認知機能低下の早期診断マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To test the hypothesis that the age-related decline of basal forebrain cholinergic function occurs earlier in the olfactory function, the release of extracellular acetylcholine (ACh), regulation of regional blood flow, and regulation of olfactory processing were measured in the olfactory bulb. The results were compared with the cholinergic function in the neocortex. In aged rats, the extracellular ACh in the olfactory bulb was increased by basal forebrain stimulation, but the amount was smaller than that in the neocortex. Basal forebrain stimulation did not significantly alter the blood flow in the olfactory bulb, while increases were observed in the neocortex. In the olfactory bulb, olfactory stimulation-induced increase in blood flow was potentiated by activation of the $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic ACh receptors. These results suggest that cholinergic function in the olfactory bulb may be an early marker for cognitive decline.

研究分野：環境生理学

キーワード：嗅球 コリン作動性神経 加齢

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病のごく初期(認知機能障害が現れる前)に嗅覚機能の低下が現れることから、認知症の早期診断マーカーとしての嗅覚検査の有用性が注目されている(Djordjevic et al., 2008). 嗅覚を司る嗅球は、認知・記憶に関わる大脳新皮質・海馬とともに前脳基底部に由来するコリン作動性神経の入力を受ける(Rye et al., 1984, 図1A). この前脳基底部コリン作動性神経はアルツハイマー病患者の脳では顕著に脱落すること(Whitehouse et al., 1982), 正常老化過程でも軽度に減少すること(Grothe et al., 2013)が知られている. 嗅球に入力するコリン作動性神経の割合は、新皮質や海馬と比べて少ない(Rye et al., 1984). 以上の背景から研究代表者は、前脳基底部コリン作動性神経機能の低下は、最も入力の少ない嗅覚に関わる嗅球において、認知・記憶機能に関わる新皮質・海馬よりも早期に現れると予想した(図1B). 研究代表者はこれまでに、大脳新皮質において、コリン作動性の脳血管拡張機能の老化過程を動物実験で報告した(Uchida et al., 1997; 2000). 前脳基底部刺激による新皮質血流増加反応は30ヶ月齢を超える超老齢ラットで低下する(図1B). この低下の原因と予想されたACh放出機能は超老齢ラットにおいても比較的維持されており、加齢に伴う

ニコチン性 ACh 受容体の機能低下が明らかとなった(Uchida et al., 1997; 2009). 嗅球に入力するコリン作動性神経の ACh 放出機能、血流調節機能、嗅覚調節機能の詳細な研究はなされていない.

2. 研究の目的

本研究は、認知症の初期に現れる嗅覚機能低下の機序を明らかにする目的で、嗅球に入力するコリン作動性神経機能とその加齢変化を調べ、認知機能に関わる新皮質のコリン作動性神経機能と比較する(図1C).

(1) 嗅球のアセチルコリン(ACh)放出量とその加齢変化を明らかにする.

嗅球には、新皮質や海馬とともに前脳基底部コリン作動性神経が入力することが組織学的に証明されている. しかし、嗅球でのACh放出に関する生理学的証明はなされていない. 本研究では、嗅球の細胞外ACh放出量を *in vivo* で測定し、前脳基底部刺激の影響を明らかにする. さらに、嗅球の細胞外ACh放出量を新皮質や海馬と比較する.

(2) コリン作動性神経が嗅球の血管に作用して血流を調節する可能性を明らかにする.

研究代表者のグループでは、新皮質や海馬に入力する前脳基底部コリン作動性神経が、新皮質や海馬の血流を増加させる血管拡張神経としての機能をもつことを明らかにしてきた. 本研究では、嗅球に入力する前脳基底部コリン作動性神経が、新皮質や海馬と同様に血流調節機能をもつか明らかにする.

(3) コリン作動性神経が嗅球における嗅覚情報処理過程を調節するか明らかにする.

におい刺激を与えると嗅球の血流はニューロン活動を反映して増加する. この嗅球血流反応を指標として、コリン作動性神経の嗅覚調節機能を明らかにする.

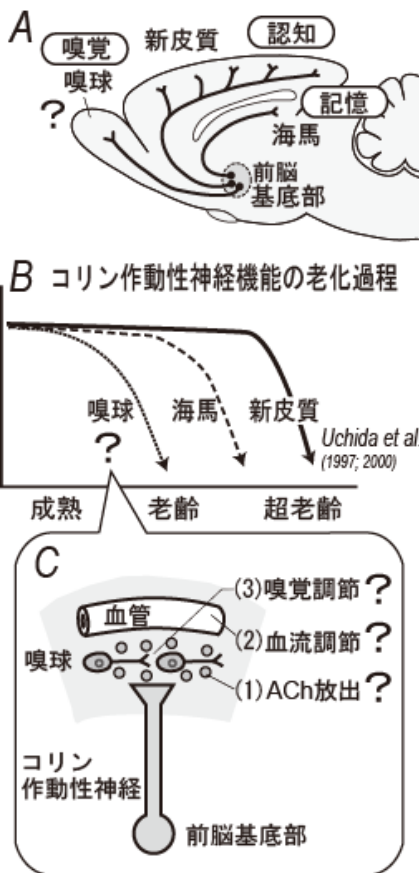


図1 本研究の目的

3. 研究の方法

(1) 動物

成熟(4-8ヶ月齢)および超老齢(31-34ヶ月齢)のWistar系雄性ラットを用いた. 実験はウレタン麻酔下でおこない、ラットの呼吸、体温、血圧を生理的状態に維持した.

(2) 嗅球細胞外ACh放出量の測定

ラットの頭部を脳定位固定装置に固定し、歯科用ドリルで嗅球上部の頭蓋骨を削り、嗅球を露出した. マイクロダイアリシス法を用いて嗅球灌流液を3分毎に採取した(図2A). 灌流液中のACh量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と電気化学検出器(ECD)を用いて測定した.

(3) 嗅球および新皮質の血流の測定

上述と同様に、嗅球上部および頭頂部の頭蓋骨を削り、脳表面を露出した. 嗅球表面の血流をレーザースペックル血流計およびレーザードップラー血流計を用いて連続測定した(図2B, C).

(4) 前脳基底部コリン作動性神経の刺激

嗅球に投射するコリン作動性神経の起始

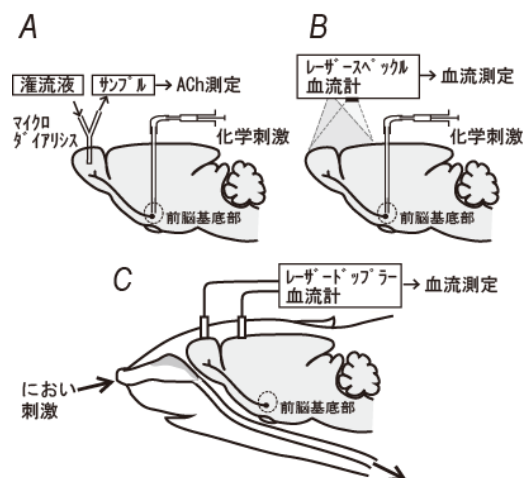


図2 in vivo 実験の方法を示す模式図

A: マイクロダイアリシス法を用いた嗅球 ACh 放出量の測定. B: レーザースペックル血流計を用いた嗅球と新皮質の血流測定. C: におい刺激時の嗅球と新皮質の血流反応の測定.

核である前脳基底部領域（プロカ対角帯核の水平脚：HDB）を化学的あるいは電氣的に刺激した。化学刺激は L-glutamate の微量注入により、電気刺激は同心円電極を用いて行った（図 2 A, B）。実験終了後に脳凍結切片にて刺激位置をラット脳アトラス（Paxinos and Watson, 2009）に従い確認した。

(5) におい刺激

鼻腔に 5% 酢酸アミルの飽和気体を 30 秒間流入させる、におい刺激を与えた。流入気体の流路を電磁弁により切り替え、5% 酢酸アミルあるいは無臭のいずれかの気体を鼻腔から流入させた。流入気体は咽頭に挿入したカテーテルを介して排出させた。同刺激を 5-7 分毎に繰り返し与えた（図 2 C）。

(6) ニコチン受容体刺激薬・遮断薬の投与
大腿静脈に挿入したカテーテルを介して、ニコチン受容体作動薬 (nicotine, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、 $\alpha 4\beta 2$ 受容体サブタイプの遮断薬 (dihydro- β -erythroidine hydrobromide: DH β E, 5 mg/kg) を静脈内投与した。

4. 研究成果

(1) ACh 放出に関する結果

安静状態での嗅球の細胞外 ACh 放出は、 38 ± 6 fmol/3min だった。一側の HDB に 1 分間かけて L-glutamate (50 nmol/50 nl) を微量注入すると、同側の嗅球で細胞外 ACh 放出が有意に増加した。ACh 放出は HDB への L-glutamate 注入後最初の 3 分および次の 3 分において、注入前の約 1.4 倍に上昇し、その後もとに回復した。100 および 200 μA の強度での HDB の電気刺激は刺激強度依存性に刺激中に嗅球の細胞外 ACh 放出を増加させた。この結果から、HDB に起始するコリン作動性神経の興奮は、嗅球に ACh を放出させること

が in vivo で明らかとなった。超老齢ラットにおける安静時および HDB 電気刺激時の嗅球細胞外 ACh 放出量は、成熟ラットと同程度であった。

超老齢ラットにおいて、嗅球の細胞外 ACh 放出量を新皮質や海馬と比較すると、嗅球で最も少なかった。この生理学的結果は、嗅球に投射するコリン作動性神経の割合が新皮質や海馬よりも少ないことを示した組織学的結果 (Rye et al., 1984) と一致する。

(2) 血流調節に関する結果

レーザースペックル血流計を用いて、嗅球と前頭葉・頭頂葉の広範な領域の血流を測定した。一側の HDB の化学刺激は、嗅球の血流に有意な影響を及ぼさなかった。一方、前頭葉や頭頂葉の血流は顕著に増加した。刺激前の血流量を 100% とすると、化学刺激開始後 2-3 分における前頭葉と頭頂葉の血流増加の大きさは、それぞれ $114 \pm 3\%$ と $117 \pm 4\%$ であった。同時記録した平均動脈圧には有意な変化は認められなかった。この結果から、嗅球ではコリン作動性神経が ACh 放出を高めるものの、血流には影響しないことが明らかとなった。新皮質と異なり、嗅球で血流変化が認められない理由としては、嗅球で放出される ACh 量が、血管拡張を起こすには少ない可能性、嗅球では血管拡張に関わる ACh 受容体が少ない可能性、血管拡張に関わるコリン作動性神経終末の接続が少ない可能性などが考えられる。

(3) 嗅覚調節に関する結果

におい刺激を 30 秒間与えると、嗅球の血流が増加した。同時記録した前頭葉血流や平均動脈圧は、嗅覚刺激により変化しなかった。におい刺激により、嗅球で特異的に見られる血流増加反応は、嗅球のニューロン活動に起因する反応であることが知られている (Chaigneau et al., 2007)。この嗅覚刺激に対する嗅球血流反応を指標として、ニコチン受容体刺激の効果を調べた。ニコチン 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与後、5-10 分に、再びにおい刺激を与えたところ、嗅球血流増加反応が増大した。前頭葉血流や血圧は、ニコチン投与後、におい刺激時に僅かに変動したが、有意な変化には至らなかった。この結果から、ニコチン受容体刺激により、嗅球での嗅覚処理反応が増大したと考えられる。この増大効果に係るニコチン受容体のサブタイプとして、代表的な脳内ニコチン受容体の一つである $\alpha 4\beta 2$ サブタイプの関与を受容体遮断薬 (DH β E) の投与により調べた。におい刺激による嗅球血流増加反応は DH β E 投与の影響を受けなかった。しかし、ニコチン投与後の嗅球血流反応の増大効果は DH β E 投与後に消失した。すなわち、ニコチンによる嗅球血流反応の増大作用は、主に $\alpha 4\beta 2$ 型サブタイプを介すると考えられる。

(4) 成果のまとめと今後の展望

前脳基底部コリン作動性神経の活性化あるいはニコチン投与の効果について、嗅球と新皮質、海馬で比較する。

第一に、細胞外 ACh 放出は、嗅球においても新皮質や海馬と同様に前脳基底部刺激により増加した。嗅球 ACh 放出量は、安静時・前脳基底部刺激時ともに、新皮質や海馬と比較して最も少ないことが明らかとなった。

第二に、血流は嗅球では前脳基底部の刺激の影響を受けないことが明らかとなった。この結果は、新皮質や海馬の血流がコリン作動性神経により増加することと異なっていた。

第三に、におい刺激で誘発される嗅球血流増加反応は、ニコチン投与により増大した。この増大効果には、 $\alpha 4\beta 2$ 型ニコチン受容体の関与が明らかとなった。新皮質は、におい刺激の影響を受けなかった(表1)。

表1 本研究成果のまとめ

前脳基底部コリン作動系活性化の影響

	嗅球	新皮質
(1) ACh放出	↑	↑↑
(2) 血流調節	—	↑↑
(3) 嗅覚調節	↑↑	—

以上の結果から、嗅球に入力する前脳基底部コリン作動性神経は、 $\alpha 4\beta 2$ 型ニコチン受容体を介して、嗅覚感受性を高めると考えられる。ニコチン受容体の $\alpha 4$ および $\beta 2$ サブユニットの mRNA レベルの加齢変化については、嗅球では調べられていないものの、大脳新皮質や海馬などの種々の脳部位で減少することがラットで証明されている (Ferrari et al., 1999)。さらに、PET で調べた前頭葉の $\alpha 4\beta 2$ 型ニコチン受容体結合能は、アルツハイマー病患者の脳で減少することが報告されている (Sabri et al., 2008)。おそらく嗅球においても老化や認知症における減少が予想される。 $\alpha 4\beta 2$ 型ニコチン受容体数の減少に伴う受容体機能の低下が、認知症の早期に観察される嗅覚機能の低下の原因であることが予想される。今後、コリン作動性神経による嗅覚調節の加齢変化の機序を解明する研究に発展させる必要がある。

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5件)

Uchida, S., Kagitani, F. Effect of basal forebrain stimulation on extracellular acetylcholine release and blood flow in the olfactory bulb. Journal of Physiological Sciences, 査読有, 68 巻, 2018 年, 415-423.

DOI: 10.1007/s12576-017-0542-z

内田さえ, 鍼刺激がラットの脳循環に及ぼす影響—基礎研究の up to date、自律神経、査読有, 54 巻, 2017 年, 185-189.

内田さえ, 鍵谷方子, 堀田晴美, 渡辺さおり, 三澤日出巳. 麻酔下マウスの脳局所血流に及ぼす橈骨神経電気刺激の影響. 自律神経, 査読有, 54 巻, 2017 年, 26-33.

Uchida, S., Bois, S., Guillemot, J-P., Leblond, H., Piché, M. Systemic blood pressure alters cortical blood flow and neurovascular coupling during nociceptive processing in the primary somatosensory cortex of the rat. Neuroscience, 査読有, 343 巻, 2017 年, 250-259.

DOI: 10.1016/j.neuroscience

Uchida, S., Kagitani, F. Effect of acupuncture-like stimulation on cortical cerebral blood flow in aged rats. Journal of Physiological Sciences, 査読有, 65 巻, 2015 年, 65-75.

DOI: 10.1007/s12576-014-0340-9.

[学会発表](計15件)

内田さえ, 鍵谷方子. “嗅球と大脳皮質に投射する前脳基底部コリン作動性神経機能の解析” 第95回日本生理学会大会, 2018年3月28-30日, 高松

内田さえ. “なぜ認知症になると『におい』が分からなくなるのか” 千葉県鍼灸師会生涯研修学術講習会, 2018年2月11日, 千葉

内田さえ, 鍵谷方子. “ニコチン受容体を介する大脳皮質血流増加反応の解析” 第45回自律神経生理研究会, 2017年12月2日, 東京

内田さえ, 鍵谷方子. “嗅覚調節に関わる前脳基底部コリン作動性神経の生理機能” 第40回日本神経科学大会, 2017年7月20-23日, 千葉

内田さえ, 鍵谷方子. “Mechanism of cerebral blood flow regulation via nicotinic acetylcholine receptors” 第40回日本基礎老化学会大会, 2017年6月14-16日, 名古屋

内田さえ, 鍵谷方子. “嗅覚調節に関わる前脳基底部コリン作動性神経機能” 第44回自律神経生理研究会, 2016年12月3日, 東京

内田さえ. “認知・記憶・嗅覚に関わる前脳基底部コリン作動性神経機能の基礎研究” 首都大バイオカンファレンス, 2016年11月18日, 八王子

内田さえ. “認知症早期診断のための嗅覚検査法開発に向けた基盤研究” Frontiers in aging research toward healthy longevity 理化学研究所老化シンポジウム~健康長寿をめざした老化研究の最前線~, 2016年11月17日, 東京

Uchida, S., Bois, S., Guillemot, J., Leblond,

H., Piché, M. “The relationship between cerebral blood flow and neuronal activity is altered by systemic blood pressure during nociceptive processing in the primary somatosensory cortex of the rat.” 16th World Congress on Pain , September 26-30, 2016, Yokohama

内田さえ, 鍵谷方子 . “Aging of the cholinergic vasodilative response in the cerebral cortex by somatosensory stimulation” 第 39 回日本神経科学大会 , 2016 年 7 月 20-22 日 , 横浜

Uchida, S. “Somatic regulation of cortical cholinergic system in aged rats” 15th Korea-Japan Joint Biogerontology Meeting , June 15-17, 2016, Daegu, Korea

Uchida, S., Kagitani, F. “Effect of acupuncture-like stimulation on blood flow and acetylcholine release in the cerebral cortex in aged rats-for preventing dementia-” The 6th International Society of Radiation Neurobiology Conference (ISRN-2016), February 12-13, 2016, Nagasaki

内田さえ, 鍵谷方子 . “鍼刺激が老齡ラットの脳皮質コリン作動性血管拡張系に及ぼす効果” 第 68 回日本自律神経学会総会 , 2015 年 10 月 29-30 日 , 名古屋

内田さえ, 鍵谷方子 . “老齡ラットにおいて鍼刺激が脳皮質アセチルコリン放出に及ぼす影響” 日本基礎老化学会第 38 回大会 , 2015 年 6 月 12-14 日 , 横浜

内田さえ, 鍵谷方子 . “嗅球のアセチルコリン放出と血流に対する前脳基底部刺激の影響” 日本基礎老化学会第 39 回大会 , 2016 年 5 月 27-28 日 , 伊勢原

[図書](計3件)

大橋敦子(監修)鍵谷方子,上村英記,金澤佑治,森田恵子,二本松明,大沢秀雄,斉藤光代,下井俊典,志村まゆら,鈴木敦子,鈴木郁子,内田さえ. 生理学実習 NAVI 第 2 版 p1-81, 医歯薬出版,東京,2017 年 1 月

内田さえ. 6. 自律神経反射(体性-内臓反射), 日本自律神経学会(編)自律神経機能検査 第 5 版 p35-40,(総ページ数 478) 文光堂,東京,2015 年 10 月

鈴木郁子,内田さえ, 鍵谷方子,原田玲子. “やさしい自律神経生理学, 命を支える仕組み” p1-247, 中外医学社,東京,2015 年 8 月

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 さえ (UCHIDA SAE)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号 : 90270660