

令和元年5月13日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11471

研究課題名(和文) 化学受容性悪心・嘔吐を誘発する神経活動とその分子基盤および行動変容の解明

研究課題名(英文) Study of neuronal activity, a molecular basis and a behavioral change related to chemoreceptor-mediated nausea and emesis.

研究代表者

船橋 誠 (FUNAHASHI, MAKOTO)

北海道大学・歯学研究科・教授

研究者番号：80221555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：最後野ニューロンのグルコース応答性に関する細胞内機序として、細胞外グルコース濃度の増加によりATP依存性カリウムチャンネル(KATPチャンネル)が閉鎖して脱分極が起こり活動電位の発生に至ることが分かった。このグルコース応答性ニューロンはHチャンネル非発現細胞であることが示唆された。エメチンによる悪心誘発機序には最後野のニューロン活動が不可欠であり、また、孤束核、扁桃体中心核、床核の各部の中樞ニューロンにおいて脱分極が生じることも判明した。味覚嫌悪の記憶想起には悪心誘発に関わる神経系の活動を伴わないことも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は化学受容性悪心・嘔吐の中樞機序について、延髄最後野のニューロン活動および連携する中樞ニューロン活動に着目して実験を行い、これまで不明であった点を明らかにして新たな概念を樹立するための基礎となる知見を得たものであり、その学術的意義は深い。また、抗がん剤の副作用による悪心・嘔吐の機序解明と新たな制吐方法の創出や制吐薬の開発につながる点では社会的意義が深い。

研究成果の概要(英文)：As an intracellular mechanism for glucose responsiveness of the area postrema neurons, it was found that the ATP-dependent potassium channel (KATP channel) was closed by an increase in the extracellular glucose concentration, leading to the generation of depolarization and action-potentials. The glucose-responsive neurons were suggested to be H-channel non-expressing cells. The neuronal activity of the area postrema is crucial for the inducing mechanism of emetine-induced nausea, and it was also found that depolarization occurs in the central neurons including the nucleus tractus solitarius, the central nucleus of amygdala, the bed nucleus. It became clear that the memory recall of the taste aversion did not involve the activity of the nervous system related to a nausea induction.

研究分野：口腔生理学

キーワード：悪心 嘔吐 最後野 迷走神経 化学受容器 ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最後野は延髄背側に位置する神経核であり、脳室周囲器官の一つである。また、最後野は化学受容性嘔吐誘発域としてよく知られており、嘔吐中枢(延髄網様体の領域内で疑核の背側部あたり)の神経活動を惹起する(化学受容器引金帯, Borison & Wang, 1953)。また、最後野ニューロンは摂食調節にも関与しており、グルコース応答性(Funahashi & Adachi, 1993)や摂食関連ペプチド応答性(Fry & Ferguson, 2010; Riediger et al., 2001, 2004)、さらに最後野から視床下部への神経投射も明らかにされている(Shapiro and Miselis, 1985; Miselis and Shapiro, 1987)。最後野ニューロンが数百種類の化学物質に対して受容性を示すこと、および、最後野には血液脳関門が欠落しているため血液中の比較的大きな化学物質が透過できることから、血液中の化学物質動態を感知するセンサーと考えられている。最後野には密な神経連絡があり、腹部迷走神経からの求心路、内臓感覚および味覚の一次中継核である孤束核との相互連絡、さらに視床下部への上行路を認める。このため、最後野は孤束核および視床下部と関連して自律系の反応に関与すると共に、悪心・嘔吐の誘発や摂食調節に加えて、体液調節、血圧調節にも関与することが報告されている。1980年代にCarpenterやStromingerらによって、最後野ニューロンの多様な化学感受性が解明された。1995年に急性単離した最後野ニューロンからのパッチクランプ記録が行われ、基本的膜特性が報告された(Hey et al., 1995)。その後、我々は急性単離細胞ではなく、可及的に神経連絡が保たれた新鮮脳スライス標本中の最後野ニューロンからパッチクランプ記録を行い、急性単離細胞では検出できない膜特性があることを発見し、最後野ニューロンの電気生理学的特性およびその活動基盤についてイオンチャネルレベルで解明する研究を展開し、その成果を国内外の科学雑誌等に発表してきた。特に、最後野ニューロンの過分極作動性カチオンチャネル(Hチャネル)については、上記の急性単離細胞では全く発見できなかったことであり、我々が世界に先駆けて研究成果を発表してきた(Funahashi et al., 2001, 2002, 2003)。制吐作用が強いとされる静脈麻酔薬の一つであるプロポフォールがHチャネルの活性を抑制することから(Funahashi et al., 2004)、Hチャネルの活性制御と悪心・嘔吐の中枢性調節機序との関連についても報告してきた。最後野ニューロンの60%はHチャネル活性を示し、膜電位の過分極により内向き電流が生じて膜の持続的脱分極が生じ、Hチャネル閉鎖時にはブレーキ電位が発生してリバウンド活動電位の発生が著明となる。他の40%はHチャネルの活性がなく、一過性外向きカリウムチャネル(速減衰型 fast I_{T0} と遅減衰型 slow I_{T0})の活性により活動電位発生が調節される。このように最後野ニューロンの電気生理学的特性について飛躍的に解析が進んだ。また、最近の我々の研究成果として、Hチャネル活性を示すニューロン群が、悪心・嘔吐誘発に関与していることが判明した(Shinpo et al., 2012)。更に、摂食抑制ペプチドであるアミリンおよびコレシストキニンに対する各受容体がHチャネル活性を示さない最後野ニューロンに接続しているシナプス前部に存在することを明らかにした(Sugeta et al., 2013, 2015)。これらはHチャネル活性の有無により区別される異なる膜特性を示す二つのニューロン群が、それぞれに機能分化して、摂食調節系と悪心・嘔吐誘発系のネットワークを形成している可能性を示唆するものであった。

以上のように、悪心誘発、嘔吐誘発、摂食抑制の各神経性調節系はオーバーラップする部分の他に、独立したニューロンネットワークを形成する調節メカニズムによってホメオスタシスの維持に関与している可能性があり、その分子基盤を解明できれば、従来の研究を発展させて、「悪心、嘔吐および摂食行動の調節メカニズム」について包括的に理解することができ、新たな生理学的概念を樹立することができる。

2. 研究の目的

本研究代表者らの先行研究により明らかにされた延髄最後野ニューロンの化学受容性とその分子基盤に関する知見 (Funahashi et al., 2002, 2003; Shinpo et al., 2012; Fukuda et al., 2013; Sugeta et al., 2015)を基に同領域の研究を飛躍的に発展させるために、血中の化学物質に応答して最後野ニューロンの活動が変化する時に生じる心象と行動の変化についてその詳細を明らかにしたい。心象として悪心誘発、不安、忌避に着目し、また、行動として摂食、拒食、嘔吐に着目して解析を進める過程において、化学受容性悪心・嘔吐を完全に制圧する新たな方法を見いだすことも本研究の大きな目的である。最後野の化学受容性ニューロン活動が引き金となって起こる上位中枢の活動変化を解析することにより、最後野の化学受容性ニューロン活動の変化に伴って生じる心象と行動変容の機序を解明し、当該分野における新たな概念の樹立を目指す。

3. 研究の方法

北海道大学動物実験指針および臨床研究倫理指針を遵守して、ラット（通常ラットおよび c-Fos-GFP トランスジェニックラット）を用いた動物実験およびボランティアによる人脳機能解析実験を行う。最後野ニューロンの化学感受性とその分子基盤を調べるために、1)神経活動に伴う膜電位変化およびシナプス伝達を計測する方法として主に電気生理学的手法(スライスパッチクランプ法)を用い、ニューロンネットワーク活動の計測には c-Fos タンパク免疫染色法を用いる。2)細胞形態および局在部位、受容体および細胞内情報伝達とその分子機構を同定する方法として免疫組織化学的手法を用いる。3)悪心、摂食、飲水行動および糸づけ学習を測定する行動科学の手法を用いる。4)人の脳機能の非侵襲的解析には脳磁図計測を用いる。

1) 最後野ニューロンの化学感受性を調べる実験

<新鮮脳スライス標本の作製>

ハロセン麻酔(20%O₂)下にて断頭後、脳を摘出し1~2°Cの蔗糖リンゲル液: (mM) 248 Sucrose, 5 KCl, 1.6 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 2.0 CaCl₂, 10 Glucose, 中に1分間浸漬する。マイクロスライサーを用いて最後野を含む厚さ150-400 μmの新鮮脳前額断脳スライス標本作製する。スライス標本は室温の人工脳脊髄液(ACSF) (mM) 124 NaCl, 5 KCl, 1.6 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 2.0 CaCl₂, 10 Glucose 中で95% O₂-5% CO₂でバブリングしながら1時間インキュベートした後、ノマルスキー微分干渉 IR-DIC 観察用顕微鏡下に設置したパッチクランプ記録用の灌流装置に移す。

<ニューロンの同定とパッチクランプ記録>

従来通法として行ってきたスライスパッチクランプ法を用いて、蛍光顕微鏡下の観察によって同定したニューロンの電気生理学的特性(静止電位、活動電位、膜時定数、膜容量、膜抵抗、イオンチャネル活性)を調べる(Funahashi et al., 2001~2012)。続いてエメチン、セファエリン、アポモルヒネ、アミリン、コレシストキニン、グルコースに対する応答性および用量依存性を調べる。細胞形態観察のためニューロバイオチントレーサーを電極内液に入れて用いる。Hチャンネルの有無から判断して、悪心・嘔吐誘発と摂食・飲水調節に関わる最後野ニューロン群の比較同定を行う。パッチクランプ記録後にスライス標本を4%パラホルムアルデヒド固定し、免疫染色により記録ニューロンの形態観察を行う。

2) 最後野のニューロンの受容体と神経伝達物質について調べる実験

最後野は A2 領域の一部であり、ノルアドレナリン作動性ニューロンが同定されているほか (Mangano et al., 2012), セロトニン, ドパミン, GABA を産生するニューロンの存在も示唆さ

れている。しかし、同部のニューロンにおける外因性のノルアドレナリンや GABA に対する応答性は極めて低いことや、セロトニン受容体や P_2X_2 受容体がシナプス前部に多く分布することが我々のこれまでのデータにより示唆されることから、最後野内のシナプス伝達は主としてグルタミン酸を伝達物質として用いており、多くの受容体がシナプス前部に存在してグルタミン酸の放出を調節していると仮説を立てている。そこで、これを証明するために、多重免疫染色法を用いて細胞内産生物質と各種受容体(P_2X_2 受容体, セロトニン受容体, アドレナリン受容体, ドパミン受容体, GABA 受容体, グルタミン酸受容体)を同定しその相対分布を調べる。セロトニン, ノルアドレナリン, ドパミン, GABA 産生能について, チロシン, トリプトファン, 脱水酵素活性, グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)活性を免疫染色法により同定する。さらに, 電気生理学的に 1h ニューロンと非 1h ニューロンを同定した後に、同一の単一細胞を収集し RT-PCR 法により各種受容体の発現を調べ、免疫染色のデータと照合して検討する。

3) エメチンの催吐作用における用量反応関係と 50%効果濃度を調べる実験

トコン腹腔投与による悪心誘発の程度について味覚条件付けを指標にして調べる。トコンシロップ(0.5~30 mg/kg, i.p.), アポモルヒネ(10 mg/kg, i.p.), トラネキサム酸(1.5 g/kg, i.p.), 塩化リチウム (0.15M with DW, 2%/kg, i.p.) 投与により内臓不快感惹起し, 0.1%サッカリン水溶液に対する味覚嫌悪学習の獲得を解析する。悪心誘発に伴って見られるサッカリン摂取量の減少は, Hチャネル阻害薬(ZD7288)を前投与すると有意に抑制される(Shinpo et al., 2012)。この時の Hチャネル阻害薬の標的部位を明らかにするために, 両側迷走神経切除の影響, 最後野切除を行った場合のサッカリン嗜好性の変化を調べる。

4) 悪心誘発に関わるニューロンネットワークを同定する実験

催吐剤投与群について, 各薬剤投与の 2 時間後に麻酔下にて 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行う。脳を摘出しミクロトームを用いて厚さ 50 ミクロンの凍結切片を作成し c-Fos 抗体を用いた免疫染色を行い脳幹部, 視床下部, 視床背内側核, 背内側前頭連合野の各部における c-Fos 陽性細胞を同定し細胞数を定量して解析を行い, 機能的ニューロンネットワークを明らかにする。

5) 最後野のニコチン, セロトニン受容体を介した心象および行動変容を調べる実験

最後野ニューロンのシナプス後膜に存在するニコチン型アセチルコリン受容体と, シナプス前膜に存在するセロトニン 3 型受容体受容体の各アゴニストを腹腔内または脳室内投与した場合の摂食量, 飲水量, 悪心, 不安, 味覚嫌悪学習について定量的に計測する。コントロール群と最後野切除群を設定して上述の薬物による行動変容を比較して解析する。

6) 悪心の誘発に関わる大脳皮質の神経活動を調べる実験

非侵襲的脳機能計測法とし高い空間分解能 (mm 単位で検出) と時間分解能 (ms 単位で検出) を有する脳磁図計測を行う。健常者を対象に脳磁図計測装置(Neuromag 社製)を用いて, 悪心誘発時と安静時(コントロール)の自発脳磁場反応の計測を 3 分間ずつ行う。悪心を誘発するために動揺性視覚刺激(手振れビデオの画像)を与える。計測した各セッションのデータについて, 高速フーリエ変換(FFT)を行い, 帯域におけるピーク周波数を求める。ピーク周波数の前後 1 Hz を各被験者の関心周波数帯とし, 悪心誘発時と安静時(コントロール)の各セッションについて関心周波数帯のパワー値を解析する。安静時のパワー値から正常域を算出し, 悪心誘発時のパワー値と比較する。不快時には皮質の帯域のピークパワー値が減少することが分かっており, 悪心誘発時に帯域のピークパワー値の変動を指標にヒトの悪心を定量的に評価する。

4．研究成果

電気生理学の実験手技のひとつであるアンフォテリシン B 穿孔パッチクランプ法を用いて、脳スライス中に同定した最後野ニューロンのグルコース応答を記録して、その応答メカニズムは ATP 依存性カリウムチャンネル (K_{ATP} チャンネル) の開閉であることが分かった。従来用いていたホールセルパッチクランプ法ではピペット内の ATP が細胞内に流入して K_{ATP} チャンネルを閉じるため記録開始当初から膜電位が脱分極した状態になるため、グルコース応答を検出できていなかったことも明らかとなった。また、グルコース応答を示すニューロンが H チャンネル非発現細胞である可能性を示唆するデータを得ており、さらに標本数を増やして解析することによりグルコース応答性と膜特性との関連を明らかにすることができると考えている。

エメチンの催吐作用における用量反応関係について、ラットを用いた味覚嫌悪学習の獲得を指標にした行動実験によって調べた結果、エメチンによる悪心誘発作用の ED50 (50%効果濃度) の値は 0.37 mM であった。エメチンによる悪心誘発作用の濃度依存性を調べた実験結果から、実際の行動実験においてエメチン (1.0 mM, 10 ml/body weight, i.p.) によってラットに悪心を確実に誘発できることを確定した。そこで、エメチンの腹腔内投与を無条件刺激として、また 0.1% サッカリンナトリウム溶液 (甘味) を条件刺激として用い、条件付け味覚嫌悪 (CTA : conditioned taste aversion) を解析する行動実験を行った。両側迷走神経切除術と最後野切除術については試行錯誤の末に術式を確立できたので、エメチンによる悪心誘発の神経機序を明らかにするために、カプサイシンを用いて横隔膜下両側迷走神経求心路切除術を施したラット (VX 群) と電気メス焼灼を用いて最後野切除術を施したラット (APX 群) を作成して CTA 実験を行い、データを解析してコントロール群と比較した。その結果、VX 群はコントロール群と同程度の CTA を獲得し、一方、APX 群は CTA を獲得しなかった。この結果からエメチン誘発の悪心は迷走神経求心性情報が無くても起こり、最後野が無い場合には悪心誘発は起こらないことが明らかとなった。すなわち、エメチンは血流を介して延髄最後野ニューロンに作用して悪心を誘発していることが示唆された。トラネキサム酸の腹腔内大量投与による悪心も同様の神経機序によることを示唆するデータを得たが、これについては更にデータ数を増やして検討を重ねる予定である。エメチン、シスプラチン、塩化リチウム投与によって悪心を誘発した際に脱分極する中枢ニューロンを同定するために脳内全体の c-Fos タンパク発現を免疫組織化学的手法を用いて可視化したところ、最後野、孤束核、扁桃体中心核、床核の各部において c-Fos タンパク陽性細胞を認めた。悪心によるサッカリンに対する味覚嫌悪条件付け後に行ったサッカリンの味覚刺激ではこれらの脳部位には c-Fos タンパク陽性細胞を認めなかった。このことから、サッカリンに対する CTA を獲得してサッカリンの甘味と内臓不快感の連合学習の神経回路が成立しているものの、この記憶の想起には悪心を感じる神経回路は関与していない可能性が示唆された。セロトニン 3 型受容体アゴニスト投与群についても同様に解析を行い、パイロットデータを得ることができた。また、悪心誘発に伴う大脳皮質の神経活動変化を検討するためのパイロットスタディとして、舌運動時の大脳皮質神経活動を脳磁図計測して基礎データを収集した。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) [Funahashi M](#), Electrophysiological analysis of neurons in the area postrema. *Hokkaido J Dent Sci*, 38 suppl: 63-67, 2017. (査読無し)
- 2) [Maezawa H](#), [Oguma H](#), [Hirai Y](#), [Hisadome K](#), [Shiraishi H](#), [Funahashi M](#), Movement-related cortical

magnetic fields associated with self-paced tongue protrusion in humans. *Neurosci Res*, 117:22-27, 2017.

(査読有り)

3) Okusha Y, Hirai Y, Maetzawa H, Hisadome K, Inoue N, Yamazaki Y, Funahashi M, Effects of intraperitoneally administered L-histidine on food intake, taste, and visceral sensation in rats. *J Physiol Sci*, 67:467-474, 2017. (査読有り)

4) Maetzawa H, Onishi K, Yagyu K, Shiraiishi H, Hirai Y, Funahashi M, Modulation of stimulus-induced 20-Hz activity for the tongue and hard palate during tongue movement in humans. *Clin Neurophysiol*, 127 (1):698-705, 2016. (査読有り)

5) Maetzawa H, Mima T, Yazawa S, Matsushashi M, Shiraiishi H, Funahashi M, Cortico-muscular synchronization by proprioceptive afferents from the tongue muscles during isometric tongue protrusion. *Neuroimage*, 128:284-292, 2016. (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1) 船橋 誠, 平井 喜幸, 藤田 麻由, 久留 和成, 前澤 仁志, 「Effects of vagotomy and area postrema lesion on induction of emesis by emetine.」, FAOPS & 第 96 回日本生理学会大会, 神戸, 2019 年 3 月

2) 藤田麻由, 久留和成, 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋 誠, 「トラネキサム酸の悪心・嘔吐誘発機序の解析」, 第 98 回北海道医学大会生理系分科会 (日本生理学会北海道地方会), 札幌, 2018 年 10 月

3) 船橋 誠, 平井 喜幸, 藤田 麻由, 久留 和成, 前澤 仁志, 「エメチン誘発の悪心に対する迷走神経切除と最後野損傷の影響」, 博多, 2018 年 9 月

4) 佐藤孝紀, 久留和成, 平井喜幸, 船橋誠, 「エメチンの催吐作用とその中枢機序」第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 松本, 2017 年 9 月

5) 船橋 誠, 最後野ニューロンの膜特性と機能の解析, 摂食・摂水シンポジウム「食べる」「飲む」を科学する, 小倉, 2016 年 4 月

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：久留 和成

ローマ字氏名：HISADOME KAZUNARI

所属研究機関名：北海道大学

部局名：歯学研究院

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 00592081

研究分担者氏名：前澤 仁志

ローマ字氏名：MAEZAWA HITOSHI

所属研究機関名：北海道大学

部局名：歯学研究院

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 80567727

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。