

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11489

研究課題名(和文) ヒスタミンによる摂食抑制への口腔感覚・咀嚼運動の関与

研究課題名(英文) Involvement of oral sensation and masticatory movement in inhibition of feeding by histamine

研究代表者

中山 希世美 (Nakayama, Kiyomi)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：00433798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳内ヒスタミンは、咀嚼によって濃度が上昇し、摂食を抑制すると考えられている。本研究では、感覚や運動などの生体機能を残した状態で、脳深部に存在するヒスタミンニューロンの活動を可視化する実験モデルを確立した。また、光照射や合成リガンドの腹腔内投与によりニューロンを活動させることの出来るチャンネルタンパクをヒスタミンニューロンに発現させたマウスを作成した。このマウスを用いてヒスタミンニューロンを活性化させた時に摂食行動や咀嚼運動にどのような影響があるかを調べたが、ヒスタミンニューロンの活性化は摂食行動や咀嚼運動に有意な変化をもたらさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒスタミンは摂食抑制を起こすことから、その抑制メカニズムを明らかにすることで肥満防止に役立てることができると考えられる。今回の実験モデルの確立は、どのようなメカニズムで脳内ヒスタミン濃度が上昇するか明らかにすることにつながる。また、脳内ヒスタミンの枯渇は食餌量の増加を起こすという報告がされていたにもかかわらず、今回の実験でヒスタミンニューロンの活性化が摂食抑制を起こさなかったことから、ヒスタミンニューロンの活動が直接的に摂食抑制を起こしているのではない可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Neuronal histamine is thought to increase in concentration during mastication and inhibit feeding. In this study, we have established an experimental model to visualize the activity of histamine neurons in the deep brain while maintaining biological functions such as sensory and motor functions. In addition, we generated mice expressing channel proteins that can activate neurons by light stimulation or intraperitoneal administration of synthetic ligands in histamine neurons. We used the mice to investigate the effects of activated histamine neurons on feeding behavior and masticatory movement, although activation of histamine neurons did not significantly alter feeding behavior or masticatory movement.

研究分野：神経生理学

キーワード：ヒスタミンニューロン 摂食行動 咀嚼 顎運動 チャンネルロドプシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒスタミンは摂食行動を抑制する

脳内ヒスタミンは、視床下部結節乳頭核とその周囲に存在するヒスタミンニューロンにより産生されている。その投射先は、脳内の全域に亘るが、その中でも摂食行動の停止に關与する視床下部腹内側核や室傍核にはヒスタミンの豊富な投射があり、ヒスタミンは食事終了のサインとして働き、摂食抑制の働きをされると考えられている。実際に視床下部腹内側核のヒスタミンを枯渇させると、食事量の増加、食事時間の延長がみられ、ヒスタミンが摂食行動の抑制にとって重要な物質であることが示されている (Fujise et al., 1998)。

マイクロダイアリシスにより視床下部のヒスタミン濃度を測定した実験により、摂食行動の開始後に、ヒスタミン濃度が上昇することが示された (Itoh et al., 1991)。また、柔らかい餌を与えられたラットでは、硬い餌を与えられたラットより、食事量が増えることが報告されている (Fujise et al., 1993)。これらのことから、ある程度の硬さのある食べ物をよく咀嚼して食べることが、ヒスタミンニューロンの活動を盛んにし、それにより摂食量が抑制され、肥満防止につながると考えられている。

(2) 摂食により脳内ヒスタミン濃度が上昇する神経経路は明らかになっていない

食物の咀嚼を始めると、咬筋などの閉口筋の長さを感じする筋紡錘と、食物の硬さなどの情報を受け取る歯根膜から、三叉神経中脳路核ニューロンを通して固有感覚情報が中枢へと送られる。これらの情報により、閉口筋運動ニューロンの活動レベルを調節することによって、食物の形状や硬さに応じた適切な咀嚼がなされている。摂食による脳内ヒスタミン濃度の上昇は、これらの固有感覚情報が引き金となっていると考えられているが、その経路は明らかではない。三叉神経中脳路核からヒスタミンニューロンが存在する視床下部結節乳頭核への直接投射が報告されているが、その細胞は固有感覚を伝えるニューロンに比べ非常に小型で、投射の量も少ない (Ericson et al., 1989)。また、摂食時には、味覚や食材の触覚などの感覚もあり、これらの感覚が關与していることも考えられる。

(3) ヒスタミンは咀嚼運動に關与する三叉神経領域にも作用する

一方で、ヒスタミンは、咀嚼運動に關与する感覚ニューロンや運動ニューロンの存在部位にも作用している。三叉神経中脳路核周囲においてヒスタミンを枯渇させた場合には、食事量は変わらないが、食事時間が延長することが報告されている (Fujise et al., 1998)。このことから、ヒスタミンが咀嚼に關与する三叉神経領域に作用し、食事速度を調節していることが示唆されたが、実際にヒスタミンが顎運動にどのような影響を与えているかはわかっていなかった。

(4) シナプス前終末の H_1 受容体を介したヒスタミンの作用により閉口反射が抑制される

脳幹スライス標本において、咬筋から三叉神経中脳路核ニューロンへ情報を送る神経軸索を電気刺激すると、咬筋運動ニューロンに反射性の電氣的応答が見られる。我々は以前の研究で、ヒスタミンの投与により、この閉口反射の応答が減弱することを発見し、その現象に三叉神経中脳路核ニューロンのシナプス終末に存在する H_1 受容体が關わることを見いだした (Gemba et al., 2015)。これにより、ヒスタミンは三叉神経系に働いて、顎運動の一つである閉口反射を抑制することが示された。しかしながら、咀嚼運動がヒスタミンによりどのように影響されるのかは解っていないかった。

2. 研究の目的

(1) 視床下部のヒスタミンニューロンの活動を可視化する実験モデルを作成する

摂食による脳内ヒスタミン濃度の上昇が、咀嚼に伴うどのような感覚もしくは運動によって起こっているのかを明らかにするために、感覚や運動などの生体機能を残した標本で、ヒスタミンニューロンの活動を調べられるような実験モデルを確立する。

(2) ヒスタミンニューロンの活性化により摂食行動や咀嚼運動にどのような変化が見られるかを調べる

上述のように、視床下部腹内側核のヒスタミンを枯渇させると、食事量の増加、食事時間の延長がみられることはすでに報告されている。しかしながら、生体内でのヒスタミンニューロンの活動が実際に摂食行動にどのような影響を及ぼすかは明らかになっていない。また、三叉神経領域にヒスタミンニューロンの豊富な投射が見られることから、ヒスタミンが咀嚼時の顎運動の調節に關わるということが推測されるが、実際の影響は明らかでない。そこで、生体内でのヒスタミンニューロンの活動が摂食行動や咀嚼運動に及ぼす影響を調べることを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 視床下部のヒスタミンニューロンの活動を可視化する実験モデルの作成

ヒスタミン合成酵素(HDC)のプロモーターの下流に DNA 組み換え酵素である Cre 遺伝子を導入した HDC-Cre マウスを用いた。カルシウムセンサーである GCaMP6s の遺伝情報を持つアデノ随伴ウイルスベクターを HDC-Cre マウスの結節乳頭核に注入し、Cre/loxP システムを用いて、結節乳頭核のヒスタミン合成酵素を発現する細胞に GCaMP6s を発現させた。この標本を用いて、除

皮質灌流標本を作製し、結節乳頭核における GCaMP6s の発現を共焦点レーザー顕微鏡下でリアルタイムに観察した。また、野生型 Wistar ラットの結節乳頭核のニューロンにアデノ随伴ウイルスベクターの感染により GCaMP を発現させ、除皮質灌流標本を作製する実験も行った。

(2) 光刺激によりヒスタミンニューロンが選択的に活動するマウスの作成

HDC-Cre マウスと、青色光を照射することによって陽イオンを細胞内に輸送するタンパクであるチャンネルロドプシン 2 (ChR2) をもつ loxP-ChR2 マウスを掛け合わせることによって、光刺激によりヒスタミンニューロンを選択的に活動させる HDC-ChR2 マウスを作成した。生後 1 週齢の HDC-ChR2 マウスを用いて、視床下部を含む前頭断スライス標本を作成し、光刺激をすることによって、細胞の興奮が起こるかどうかを調べた。ChR2 と同時に発現させている EYFP の蛍光を指標にホールセルパッチクランプ記録を行い、青色 LED で光刺激を行った。また、三叉神経運動核を含む前頭断スライス標本を作成し、三叉神経運動ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行った。青色 LED で光刺激を行い、ヒスタミンニューロンの軸索末端を興奮させることによる運動ニューロンへの影響を調べた。

(3) ヒスタミンニューロンの活性化による摂食行動や咀嚼運動への影響

HDC-ChR2 マウスを用い、結節乳頭核に光刺激をするためのカニューラを埋入し、咬筋および顎二腹筋に筋電図記録用のワイヤー電極を挿入した。5 Hz, 30 秒の光刺激(470 nm)を 5 分間隔で繰り返し行い、ビデオ画像による行動の観察および筋電図の、実験群とコントロール群との比較を行った。また、ChR2 の遺伝情報を持つアデノ随伴ウイルスベクターを HDC-Cre マウスの結節乳頭核に注入することでヒスタミンニューロンに ChR2 を発現させる方法でも同様の実験を行った。さらに、HDC-Cre マウスの結節乳頭核に、デザイナー受容体である hm3Dq をアデノ随伴ウイルスベクターを用いて発現させたマウスを作成し、その合成リガンドである化学物質クロナジン-N-オキシド(CNO)の腹腔内投与によってヒスタミンニューロンを活性化させた時の摂食量、飲水量、行動量の計測を行った。

4. 研究成果

(1) 視床下部のヒスタミンニューロンの活動を可視化する実験モデルの作成

HDC-Cre マウスの結節乳頭核に GCaMP6s の遺伝情報を持つアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入した。ウイルス注入後 4 週間において免疫組織染色を行ったところ、結節乳頭核およびその周囲のヒスタミンニューロンに GCaMP6s の発現が見られた。この標本を用いて、除皮質灌流標本を作製したところ、GCaMP による蛍光を確認出来た。また、野生型 Wistar ラットの結節乳頭核のニューロンに GCaMP6s の遺伝情報を持つアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入する実験も行い、結節乳頭核のニューロンに GCaMP による蛍光を確認出来た。この 2 つの実験系の確立により、感覚や運動などの生体機能を残した標本で、脳深部のニューロン活動を可視化することが可能となった。

(2) 光刺激によりヒスタミンニューロンが選択的に活動するマウスの作成

ヒスタミンニューロン特異的に ChR2 を発現するマウスを作成するため、HDC-Cre マウスと loxP-ChR2 マウスを掛け合わせ HDC-ChR2 マウスを作成した。生後 1 週齢の HDC-ChR2 マウスを用いて、視床下部の EYFP 陽性細胞でホールセルパッチクランプ記録を行い、青色 LED で光刺激を行ったところ、静止膜電位の上昇が見られ、活動電位が発生した。この結果、HDC-ChR2 マウスへの光刺激により、ヒスタミンニューロンを興奮させることが出来ることが示された。次に、三叉神経運動ニューロンを含む前頭断スライス標本を作製した。三叉神経運動ニューロンからホールセルパッチクランプ法を用いて静止膜電位を記録し、青色 LED で光刺激を行った。その結果、光の強さ依存性に膜電位の上昇が起こり、活動電位の発生も見られた。これにより、ヒスタミンニューロンの興奮により放出されたヒスタミンが三叉神経運動ニューロンを興奮させることが示唆された。しかし、この HDC-ChR2 マウスで免疫組織染色を行ったところ、ニューロンのマーカーである NeuN 陽性細胞以外でも、ChR2 と同時に発現させている EYFP の蛍光が見られ、肥満細胞、グリア細胞、血管内皮細胞などのヒスタミンニューロン以外のヒスタミン合成酵素を持つ細胞も ChR2 を発現している可能性が出てきた。そこで、ヒスタミンニューロンに、より限局して ChR2 を発現させるため、ChR2 の遺伝情報を持つアデノ随伴ウイルスベクターを HDC-Cre マウスの結節乳頭核に注入することでヒスタミンニューロンに ChR2 を発現させるマウスも作成することにした。ウイルスベクター注入から 4 週間後のマウスを用いて免疫染色を行ったところ、結節乳頭核およびその周辺でのみ EYFP 陽性細胞が見られ、これらの細胞は NeuN 陽性であった。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、三叉神経中脳路核ニューロンおよび三叉神経運動ニューロンの周囲に EYFP 陽性の軸索が投射していた。

(3) ヒスタミンニューロンの活性化による摂食行動や咀嚼運動への影響

HDC-ChR2 マウスの結節乳頭核に埋入したカニューラを介し、自由行動下で 5 Hz, 30 秒の青色

光刺激を5分間隔で繰り返し行った。しかしながら、摂食運動に関与する筋の筋電図に変化は見られなかった。また、光照射によって摂食行動が抑制されることは無かった。次に、ChR2の遺伝情報を持つアデノ随伴ウイルスベクターを結節乳頭核に注入したマウスと注入していないコントロールマウスで、結節乳頭核の光刺激を行った。しかしながら、実験群とコントロール群の間で、マウスの行動および咀嚼筋筋電図に顕著な差は見られなかった。さらに、HDC-Creマウスの結節乳頭核に、hM3Dqをアデノ随伴ウイルスベクターを用いて発現させたマウスを作成し、CNOの腹腔内投与によってヒスタミンニューロンを活性化させた時の摂食量、飲水量、行動量の計測を行った。コントロールとしては、生理食塩水の腹腔内投与を行った。摂食量、飲水量、行動量のいずれもCNO投与群とコントロール群で有意な差は見られなかった。これらの結果から、ヒスタミンニューロンの活動の咀嚼運動への関与は限られた条件下での限定的なものである可能性がある。また、ヒスタミンニューロンの活動が直接的に摂食抑制を起こしているのではない可能性が示された。

<引用文献>

Ericson H, Blomqvist A, Köhler. Brainstem afferents to the tuberomammillary nucleus in the rat brain with special reference to monoaminergic innervation. *J Comp Neurol* 281: 169-192.

Fujise T, Yoshimatsu H, Kurokawa M, Fukagawa K, Nakata M, Sakata T. Food consistency modulates eating volume and speed through brain histamine in rat. *Brain Res Bull* 32: 555-559.

Fujise T, Yoshimatsu H, Kurokawa M, Oohara A, Kang M, Nakata M, Sakata T. Satiety and masticatory function modulated by brain histamine in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 228-234, 1998

Gemba C, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Inoue M, Inoue T. Involvement of histaminergic inputs in the jaw-closing reflex arc. *J Neurophysiol* 113: 3720-3735.

Itoh Y, Oishi R, Saeki K. Feeding-induced increase in the extracellular concentration of histamine in rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 125: 235-237.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tachikawa S, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Iijima T, Inoue T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Coordinated respiratory motor activity in nerves innervating the upper airway muscles in rats.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0166436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0166436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Moriya T, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Ofuji T, Shirota T, Inoue T.	4. 巻 861
2. 論文標題 Enhancement of swallowing motor activity by the ACE inhibitor imidapril in an arterially perfused rat preparation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 172601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2019.172601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagata A, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Gemba C, Aoki R, Dantsuji M, Maki K, Inoue T.	4. 巻 149
2. 論文標題 Serotonin1B receptor-mediated presynaptic inhibition of proprioceptive sensory inputs to jaw-closing motoneurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res Bull	6. 最初と最後の頁 260-267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainresbull.2019.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Moriya T, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Shirota T, Inoue T.
2. 発表標題 Effects of pharmacological agents administered for swallowing disorders on swallowing motor activity in nerves innervating infrahyoid and laryngeal muscles.
3. 学会等名 Neuroscience 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Moriya T, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Shirota T, Inoue T.
2. 発表標題 Effects of Imidapril on swallowing activity in in situ rat preparations.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakayama K, Tachikawa S, Ihara Y, Nakamura S, Mochizuki A, Iijima T, Takahashi K, Inoue T
2. 発表標題 Coordinated movement of the tongue in oral motor functions.
3. 学会等名 Oral Neuroscience 2017 in Osaka Univ. (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakayama K, Mochizuki A, Nakamura S, Inoue T
2. 発表標題 Inhibition of neuronal activities in mesencephalic trigeminal sensory neurons via orexin receptor-2 in rats.
3. 学会等名 17th international symposium of olfaction and taste (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 永田愛、中山希世美、山口徹太郎、榎宏太郎、井上富雄
2. 発表標題 咬筋運動ニューロンのシナプス入力のセロトニンによる調節
3. 学会等名 第75回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Inoue T, Nagata A, Nakayama K, Dantsuji M, Nakamura S, Mochizuki A, Maki K.
2. 発表標題 Serotonin1B receptors are involved in presynaptic inhibition of proprioceptive afferent transmission to jaw-closing motoneurons.
3. 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue T, Nagata A, Nakayama K, Dantsuji M, Nakamura S, Mochizuki A, Maki K.
2. 発表標題 Presynaptic Activation of 5-HT1B Receptors Inhibits Proprioceptive Sensory Inputs to Jaw-Closing Motoneurons.
3. 学会等名 FENS Regional Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama K, Nagata A, Dantsuji M, Nakamura S, Mochizuki A, Maki K, Inoue T.
2. 発表標題 Serotonin1B receptor-mediated presynaptic inhibition of jaw-closing motoneurons
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 富雄 (Inoue Tomio) (70184760)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	