

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 24日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592361

研究課題名（和文） 摂食関連ペプチドによる上唾液核ニューロン活動の調節機構に関する研究

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of neuronal activity in the superior salivatory nucleus by feeding-related peptides.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ラット顎下腺・舌下腺の副交感性の一次中枢である上唾液核ニューロンは、視床下部外側野（摂食中枢）ニューロンが産生する摂食関連ペプチドのオレキシンにより興奮した。この興奮はオレキシン受容体のOX1RとOX2Rのアンタゴニストにより完全に消失した。またOX1RとOX2Rに対する免疫活性が示されたことから、その興奮作用はこれらの受容体を介していることが示唆された。摂食時の豊富な唾液分泌はオレキシンが上唾液核ニューロンを刺激することが関与しているのかもしれない。

研究成果の概要（英文）：The superior salivatory nucleus (SSN) neurons which is the primary parasympathetic center of the submandibular and sublingual salivary glands in rats were excited by orexins, one of feeding-related peptides, from lateral hypothalamic neurons (feeding center). The excitation in SSN neurons was completely inhibited by antagonists for OX1R and OX2R, orexins receptors subtypes. Additionally, SSN neurons showed immunoreactivities for OX1R and OX2R, suggesting that the excitation is mediated by OX1R and OX2R. Orexin-induced excitation in SSN neurons may be involved in abundant salivation in feeding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔生理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生理学 上唾液核ニューロン 摂食関連ペプチド ホールセルパッチクランプ法 免疫組織化学 視床下部 脳幹

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、下位脳幹を介した「咀嚼-唾液反射」の概念を中心に多くの研究がなされてきた。我々は下記のような背景から本研究の着

想に至った。

(1) 行動学的背景 ラットに固形食を与えた時と歯ぎしりをしている時の顎下腺分泌を比

較した。歯ぎしり中はほとんど分泌が起こらないのに対して咀嚼中は豊富な分泌が見られた。咬筋活動がどちらも同じくらいであるにもかかわらず摂食中の唾液が多いのは、口腔感覚による反射による分泌に加えて視床下部外側野（摂食中枢）などが分泌を促進していることが示唆される。

(2) 組織化学的背景 ラットでHRPやフルオロゴールドを顎下腺・舌下腺の副交感性の一次中枢である上唾液核に注入することによって、上唾液核と連絡する上位および下位脳の神経を調べた。その結果、視床下部外側野を始め摂食、飲水などに関する多くの神経核が染色された。またHRPやフルオロゴールドがシナプスを飛び越えない性質からして、染色された神経は単シナプス性に上唾液核ニューロンと連絡があることが示唆される（図1）。

これらの背景から、視床下部外側野ニューロンは上唾液核ニューロン活動を直接的に調節していることが考えられる。よって我々は視床下部外側野ニューロンが放出する摂食関連ペプチドに注目した。

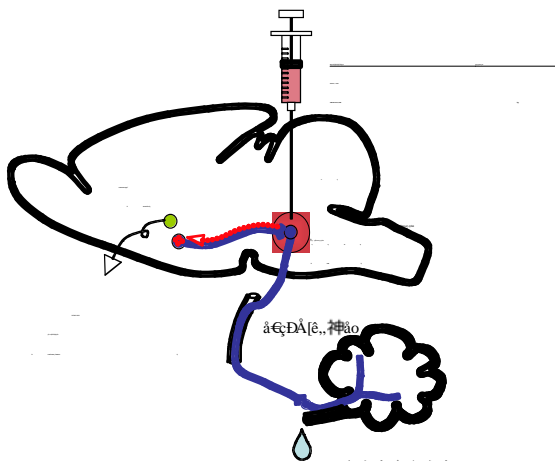


図1 視床下部外側野から上唾液核への軸索投射

## 2. 研究の目的

摂食関連ペプチドには摂食を促進するものと抑制するものがあるが、本研究では特に摂食促進ペプチドに焦点を絞った。その理由は、摂食時に豊富な唾液分泌が起こることか

ら、摂食促進ペプチドが上唾液核ニューロンの興奮性を促進し、それにより顎下腺・舌下腺分泌が促進されることが考えられるためである。本研究では上唾液核ニューロン活動に影響する可能性のある摂食促進ペプチドを免疫組織化学的に検索し、その調節機構を電気生理学的実験により検索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

上唾液核ニューロンに投射する摂食促進ペプチド含有神経の軸索線維や受容体を免疫組織化学的実験により検索する。それにより上唾液核ニューロン活動に影響するペプチドが示唆されるので、この情報を基に電気生理学的実験を行った。

### (1) 免疫組織化学的実験

Wistar 系雄性ラット（体重 290-300 g）の鼓索—舌神経に Fast Blue を注入することにより上唾液核ニューロンを標識した。4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し厚さ 4  $\mu\text{m}$  の連続横断切片を作製し標識された上唾液核ニューロンにおける摂食促進ペプチドの免疫活性やその受容体に対する免疫活性を検索した。

### (2) 電気生理学的実験

Wistar 系ラット（7-13 日齢）の鼓索—舌神経に TexasRed-lysine (MW 3000) を注入することにより上唾液核ニューロンを標識した。新鮮脳スライス切片を作製し標識された上唾液核ニューロンからホールセルパッチクランプ法により記録を行った。電圧固定下で膜電位を -70 mV に固定しテトロドトキシン存在下にてペプチドを投与した時の電流変化を観察した。電流固定下でペプチドを投与した時の膜電位変化を観察した。

## 4. 研究成果

オレキシン、グレリン、NPY、コレシスト

キニンに対する免疫組織化学的実験を行った。その結果 NPY とオレキシンに対する免疫活性のある軸索線維が上唾液核に観察された。中には上唾液核ニューロンと極めて近接している線維も見られた。ところで NPY は当初陽性線維が観察されなかったが電気生理学的実験で内向き電流（興奮性）が観察されたニューロンが存在したので、他社の一次抗体の検討を行った経緯がある。この様なケースがあったので慎重に免疫組織化学的および電気生理学的実験を行った。

一方オレキシンは摂食の他に睡眠・覚醒の調節も行い、睡眠・覚醒の研究は生理学研究のトピックスの一つである。そこで安静時唾液の日内変動はオレキシンによる可能性がある。今後の研究の発展性を考え、オレキシンの上唾液核ニューロンに対する作用や組織化学的特徴を重点的に検索した。

オレキシンにはオレキシン A および B のサブタイプが存在する。電流固定実験で 100 nM オレキシン A および B を投与した時、ともに多くの上唾液核ニューロンは脱分極または発火したが、この興奮作用はオレキシン B よりもオレキシン A の方が強い様に思われた。つまりオレキシン A による脱分極時間はオレキシン B よりも長く発火を伴ったが、オレキシン B では脱分極させてもほとんど発火させることは無かった (8/8)。またオレキシン A 投与前後において過分極パルスの直流通電を行い電流-電圧曲線を作成した。オレキシ

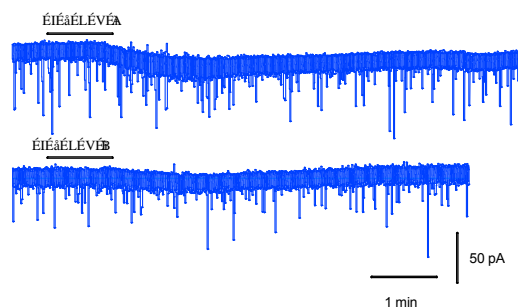


図 2 上唾液核ニューロンから記録されたオレキシン A および B 誘発電流の代表例

ンにより入力抵抗は投与前 232.5 MΩ で投与後は 362.5 MΩ に増加した。これは  $K^+$  のコンダクタンスを減少させることによって上唾液核ニューロンの興奮性を高めることが示唆される。オレキシン A による  $K^+$  のコンダクタンスの減少は過去の報告とも一致する。

電圧固定実験において（膜電位 -70 mV）、多くの上唾液核ニューロンは 300 nM オレキシン A (75%, n = 18/24) および B (40%, n = 4/10) の投与により内向き電流を発生した。オレキシンの受容体は OX1 および OX2 受容体 (OX1R, OX2R) が存在するが、オレキシン A は OX1R と OX2R 両方を、オレキシン B は OX2R のみを刺激する。オレキシン A 誘発性の内向き電流は SB334867 (OX1R アンタゴニスト) により大きく減少し、残りの電流成分は TCS OX2 29 (OX2R アンタゴニスト) により完全に消失した。以上の実験から上唾液核ニューロンには OX1R と OX2R の両方の存在が示唆されるが、OX1R アンタゴニストの効果が大きかったことから上唾液核ニューロンに存在する主なオレキシン受容体は OX1R かもしれない。オレキシンのシナプス前膜に対する作用について、微小興奮性シナプス後電流の頻度がオレキシン投与前後でほとんど変化していないことから、オレキシンのシナプス前膜に対する影響は少ないことが示唆される。

免疫組織化学的実験で OX1R と OX2R の発現を定量的に調べた結果、上唾液核ニューロンに発現する OX1R および OX2R はそれぞれ 53% (172/317) と 40% (124/307) で若干 OX1R の発現が多いことが明らかになった。よってオレキシンは上唾液核ニューロンの主に OX1R を介して興奮作用を示すことが示唆される。

オレキシンの抑制性シナプス伝達に対する影響について検討した。上唾液核ニューロンは GABA およびグリシンによる抑制性シナプ

ス伝達を受けている。抑制性シナプス伝達を観察しやすくする為に 0 mV で電圧固定シテトロドトキシシン存在下でオレキシシン A および B を投与した。十分な例数ではないが (n=6) 全ての上唾液核ニューロンにおいて外向き電流および微小抑制性シナプス後電流の頻度や大きさに変化は無かった。よってオレキシシンは抑制性シナプス伝達にはほとんど影響しないことが示唆された。

まとめ

多くのラット顎下腺・舌下腺支配の上唾液核ニューロンは視床下部外側野のオレキシシン作働性ニューロンの調節を受け、主にオレキシシン受容体サブタイプの OX1R を介してその興奮性は促進されることが示唆される。

#### 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 6 件)

① Ueda H, Mitoh Y, Fujita M, Kobashi M, Yamashiro T, Sugimoto T, Ichikawa H, Matsuo R. (2011) Muscarinic receptor immunoreactivity in the superior salivatory nucleus neurons innervating the salivary glands of the rat. *Neurosci Lett*, 499, 42-46. 査読有り.

② Kobashi M, Xuan SY, Fujita M, Mitoh Y, Matsuo R. (2010) Central ghrelin inhibits reflex swallowing elicited by activation of the superior laryngeal nerve in the rat. *Regul Pept*, 160(1-3), 19-25. 査読有り.

③ Kobashi M, Yanagihara M, Fujita M, Mitoh Y, Matsuo R. (2009) Fourth ventricular administration of ghrelin induces relaxation of the proximal stomach in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296(2), R217-R223. 査読有り.

④ Mitoh Y, Funahashi M, Fujita M, Kobashi M, Matsuo R (2009) Postnatal development of inhibitory synaptic transmission to superior salivatory neurons in rats. *J Med Invest*, 56 (Suppl), 270-272. 査読無し.

⑤ Ueda H, Mitoh Y, Ichikawa H, Kobashi M, Yamashiro T, Matsuo R. (2009) Cevimeline enhances the excitatory of rat superior salivatory neurons. *J Med Invest*, 56 (Suppl), 267-269. 査読無し.

⑥ Matsushima A, Ichikawa H, Fujita M, Mitoh Y, Kobashi M, Yamashiro T, Matsuo R. (2009) Immunohistochemical study of the distribution and origin of GABAergic nerve terminals in the superior salivatory nucleus. *J Med Invest*, 56 (Suppl), 264-266. 査読無し.

[学会発表] (計 19 件)

① 水谷諭史、嚥下反射抑制におけるオレキシシン A 作用部位の検討、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 29 日、松本。

② 松尾龍二、精神ストレスと上唾液核への下降性ニューロンにおける神経調節機構、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都。

③ 小橋基、オレキシシン中枢投与による反射性嚥下の抑制、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011 年 10 月 2 日、岐阜。

④ 美藤純弘、オレキシシンはラット顎下腺・舌下腺を支配する上唾液核ニューロンの興奮性を促進する、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011 年 10 月 2 日、岐阜。

⑤ 前田直人、ラット大脳皮質咀嚼野の電気刺激が誘発するリズムカルな顎運動と唾液分泌の関連、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011 年 10 月 1 日、岐阜。

⑥ 水谷諭史、ラット中枢オレキシシンによる反射性嚥下の抑制、第 88 回日本生理学会大会、2011 年 3 月 28 日、横浜。

⑦ 松島あゆみ、第 52 回 歯科基礎医学会学術大会・総会、ラット上唾液核への GABA 作働性抑制性入力に関する免疫組織化学的研究、2010 年 9 月 21 日、東京。

⑧ 柳原衛、上喉頭神経刺激による背側迷走神経複合体での c-fos 発現ニューロン、コ・メディカル形態機能学会第 9 回総会学術集会、2010 年 9 月 11 日、新潟。

⑨ 美藤純弘、ラット顎下腺・舌下腺支配の上唾液核ニューロンに対するセビメリンの作用機序、第 19 回神経行動薬理若手研究者の集い、2010 年 3 月 15 日、岡山。

⑩ Kobashi M, Central ghrelin induces proximal stomach relaxation and inhibits reflex swallowing in the anaesthetized rats, 2009 International Symposium on Ghrelin, 2009/Nov/18, Tokyo.

⑪ 植田紘貴、ラット上唾液核ニューロンに対するセビメリンの興奮性作用に関する電気生理学および免疫組織化学的解析、第51回 歯科基礎医学会学術大会・総会、2009年9月11日、新潟。

⑫ 松島あゆみ、ラット上唾液核における抑制性受容体と抑制性ニューロンの中枢分布に関する免疫組織化学的研究、第51回 歯科基礎医学会学術大会・総会、2009年9月11日、新潟。

⑬ 小橋基、摂食促進ペプチドによる食物受入と嚥下機能の調節作用、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 機能再生・再建科学専攻主催 ミニシンポジウム、2009年8月11日、岡山。

⑭ Mtsushima A, GABAergic nerve terminals in the superior salivatory nucleus; immunohistochemical and retrograde tracing study, 36th International congress of Physiological Sciences, 2009/Jul/31, Kyoto.

⑮ Kobashi M, Central ghrelin induces gastric relaxation of the proximal stomach via the caudal dorsal vagal complex in the rat, 36th International congress of Physiological Sciences, 2009/Jul/30, Kyoto.

⑯ Ueda H, Cevimeline enhances the excitability in the rat superior salivatory nucleus neurons, 36th International congress of Physiological Sciences, 2009/Jul/28, Kyoto.

⑰ Mitoh Y, Postnatal development of inhibitory synaptic transmission to the superior salivatory neurons in rats, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion (ISES), Tokushima 09, 2009/Jul/24, Tokushima.

⑱ Matsushima A, Immunohistochemical study on the Distribution and origin of GABAergic nerve terminals in the superior salivatory nucleus, The 11th International Symposium on Exocrine

Secretion (ISES), Tokushima 09, 2009/Jul/24, Tokushima.

⑲ Ueda H, Cevimeline enhances the excitability in the rat superior salivatory nucleus, The 11th International Symposium on Exocrine Secretion (ISES), Tokushima 09, 2009/Jul/24, Tokushima.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

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

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

市川 博之 (ICHIKAWA HIROYUKI)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：20193435

### (3) 連携研究者