

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 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592057

研究課題名（和文） 延髄における嘔吐誘発ニューロンの同定とその機能の解明

研究課題名（英文） Identification of emesis-inducing medullary neurons and analysis of their functions.

研究代表者

船橋 誠（FUNAHASHI MAKOTO）

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：80221555

研究成果の概要（和文）：

本研究は化学受容性嘔吐誘発域である延髄最後野のニューロン群がどのように嘔吐誘発と摂食調節に関わっているのかを調べた。少なくとも H チャネル発現型ニューロンが悪心誘発に関与しているが摂食抑制物質であるアミリン受容体の発現は極めて少なく、H チャネル非発現型ニューロンにのみアミリン応答を認めた。これらは H チャネル発現型ニューロンと H チャネル非発現型ニューロンの機能分化の可能性を強く示唆する結果であった。

研究成果の概要（英文）：

We investigated how neurons in the area postrema known as a chemoreceptor trigger zone are related to the induction of nausea and/or emesis and to the control of food intake. We found that the neurons expressing H channels are closely related to the induction of nausea but they do not respond to amylin that is known as a satiety peptide. Responses to amylin were found only in the neurons not expressing H channels. We concluded that these data suggested the presence of functional differentiation between the neurons expressing H channels and the neurons not expressing H channels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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

1. 研究開始当初の背景

最後野は脳内の延髄背側部に位置する神経核であり、Borison & Wang (1953 年) により化学受容性嘔吐誘発域であることが証明され、嘔吐中枢（延髄網様体の領域内で疑核の背側部あたり）を駆動する引き金を引くとされる。最後野の血管系には血液脳関門が

なく、血液中の化学物質が容易に到達し、最後野ニューロンはこれらを検知するセンサーとして働く。このため最後野は視床下部の一部や脳弓下器官などと共に脳室周囲器官のひとつに分類される。最後野の神経連絡は多岐であり、腹部迷走神経からの求心路、味覚や内臓感覚の一次中継核である孤束核と

の相互連絡、視床下部への上行路がある。このため、最後野は孤束核および視床下部と共同して自律系の反応に関わっており、特に、摂食調節、体液調節、血圧調節、悪心・嘔吐誘発に関与している。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。単一細胞レベルでの最後野の研究は 1996 年頃から始まり、Hey のグループが急性単離した最後野ニューロンを用いてパッチクランプ法による計測を行い、イオンチャネルレベルでの基本的膜特性などが徐々に明らかになった (Hey et al., 1995)。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る状態を重視して、スライス中の最後野ニューロンからパッチクランプ法を用いてその特性を明らかにしてきた。2000 年より最後野および孤束核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行い、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 (通称 Hチャネルまたはペースメーカーチャネル) については、上記の急性単離細胞では発見できなかったことであり、最後野スライスを用いることにより、我々が世界に先駆けて研究成果を発表してきた (Funahashi et al., Brain Res, 2002; J Physiol Lond, 2003; 船橋 誠, 松尾龍二, 生体の科学, 2004)。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., Neurosci Lett, 2001; Brain Res, 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% は過分極作動性カチオンチャネル (Hチャネル) の活性を示し、膜電気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おり、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チャネルの活性が全くな一過性外向きカリウムチャネル (速減衰型 $fastI_{T0}$ と遅減衰型 $slowI_{T0}$) の活性により活動電気発生が調節を受ける。これまでに行ってきた研究によって、最後野の単一ニューロンの電気生理学的特性については飛躍的に解析が進んだが、嘔吐誘発やその他の自律系調節に対して全ての最後野ニューロンが一律に関与するのか、もしくは機能的役割分担があるのかについては全く不明であり、神経活動の増減と行動変化を直接結び付けて考える上で重要かつ不可欠であり、本研究計画の最初のプロジェクトとした。嘔吐誘発ニューロンを同定することができれば、ターゲットを絞って実験を進めることができ、これまでの研究を飛躍的に発展させて、「摂食行動

の調節メカニズム」について包括的に明らかにすることが可能となり、さらに「嘔吐を制御する方法や創薬」を目指した研究へ展開していきたい。

2. 研究の目的

(1) 概要

最後野 (Area Postrema) は化学受容性嘔吐誘発域としてよく知られているが、最後野内のどのニューロンが実際に嘔吐中枢を駆動して悪心・嘔吐を誘発するのかについては全く不明である。我々はこれまでに、最後野ニューロンの膜特性をパッチクランプ法により解析し、電気生理学的に 3 タイプに大別される各ニューロンの特性を報告してきた (Funahashi et al., Brain Res Bull, 2002; Brain Res, 2006)。本研究では、これらのうちのタイプのニューロン群が実際に悪心・嘔吐誘発に関与しているのかについて明らかにし、嘔吐誘発の中枢メカニズムを明らかにしたい。さらに、悪心・嘔吐時には摂食、体液、循環、自然免疫等の調節を含む様々な自立系の反射がおこることから、最後野ニューロンのホメオスタシス維持のための機能的意義について包括的に解析する。

(2) 何をどこまで明らかにするのか

① 最後野における悪心・嘔吐誘発ニューロンの同定

最後野には電気生理学的特徴が大きく異なる 3 タイプのニューロン群が混在しているが、悪心感受性と電気生理学的特性を同時に個々のニューロンにおいて測定して各電気生理学的特性と照合することにより、最後野ニューロンのうちのタイプが悪心・嘔吐誘発に直接関与するのかについて明らかにする。

② 悪心・嘔吐誘発ニューロンとして同定されたニューロンの存在部位と細胞形態の解明

悪心・嘔吐誘発ニューロンの最後野内における三次元的分布を明らかにし、同時に細胞形態 (細胞体、樹状突起、軸索の形状) を免疫染色により可視化して解析する。

③ 悪心・嘔吐誘発ニューロンとして同定されたニューロンの機能的役割の解明

セロトニンとカテコラミン産生能について、チロシンとトリプトファン脱水酵素活性を免疫染色法により調べ、悪心・嘔吐誘発ニューロンと視床下部との機能連関を明らかにする。さらに、悪心・嘔吐誘発ニューロン活動の変化にともなう、味覚嫌悪学習行動、ホメオスタシス (循環、呼吸、体液バランス、唾液分泌)、免疫担当細胞活性への影響を明らかにする。

(3) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義 延髄最後野が化学受容性嘔吐誘発域であ

ることが示されてから 50 数年が経過したが、なお中枢神経系における悪心・嘔吐の発症機序に関して未解明のことが多く残されている。近年、パッチクランプ法を用いて、最後野の単一ニューロンレベルでの研究が開始された。当初、酵素処理により急性単離された最後野ニューロンの膜特性やイオンチャネルの活性化特性が調べられ、最後野ニューロンの膜特性はどの細胞もほぼ均一で同様の性質を持っているという報告がなされた。一方、我々はスライス中の最後野ニューロンから神経活動の記録を行う方法で実験を行い、最後野ニューロンの膜特性およびシナプス入力特性を調べ、最後野ニューロンの活動制御にHチャネルの活性の有無が関与することを発見して、最後野ニューロンを膜特性の違いに基づいたサブタイプが存在を同定するに至った (Funahashi et al., Journal of Physiology, 2003)。最近では最後野内に自然免疫に関与するトールライク受容体の存在が明らかにされるなど、延髄レベルの自律系調節機序の全容解明と相まって、同部に関する論文数も増加の一途をたどり、関心の深さが伺える。

本研究計画は単一ニューロンレベルから行動までを調べて、生体のホメオスタシスを体系的に理解可能にすることを目的としており、地道な仕事を着実に進めて真理を追求していくものである。このように我々の手法は、最後野ニューロン研究においては他に例がなく独創的である。本研究はこれまでの独自の研究成果の上に新たな知見を積み上げようとするものである。悪心・嘔吐の中枢性メカニズムの解明は、悪心・嘔吐の予防、抑制および治療法を確立するために不可欠であり、有意義な研究である。悪心・嘔吐の治療に向けた創薬のみならず、悪心・嘔吐を軽減する麻酔薬および麻酔手技、歯科治療や全身麻酔の質のアップにつながり、患者の生活の質向上に貢献できる。本研究において着目しているHチャネルと悪心・嘔吐との関連は、我々が世界に先駆けて行ってきた研究成果を基盤とするものであり、これから得られる成果は発展的かつ独創性があり、全く新しい発想に基づいた悪心・嘔吐の制御法の開発にもつながる可能性があり、国際的にも高い評価を受けられるものと確信する。

3. 研究の方法

(1) 概要

行動実験により条件付け味覚拒否行動および摂食・飲水量を測定し、同時に cFos タンパクの発現を指標にして興奮した最後野ニューロン活動を計測し、ニューロン活動と行動変化との関連を解析した。次に、摂食抑制作用のあるアミリンやヒスタミン等のペプチドホルモンが最後野ニューロン活動に及

ぼす影響について、脳スライスを用いた電気生理学的手法 (パッチクランプ法) により、ニューロン活動を直接計測することにより解析を行った。

(2) 行動実験による悪心・嘔吐誘発ニューロンの機能解析

①条件付け味覚拒否行動 (味覚と内臓感覚の連合学習能の測定)

サッカリン甘味溶液 (CS) と 0.15M塩化リチウム腹腔内投与 (UCS) を用いて悪心誘発による味覚嫌悪学習をさせる。4 日間のサッカリン摂取量を測定してサッカリン摂取量の減少を指標に学習効果を測定する。(参考文献: Yamamoto et al., 1996) 実験群では最後野切除、迷走神経切除や催吐剤投与、さらに、22 年度に同定した嘔吐誘発ニューロンのイオンチャネル、受容体特性をもとに、それらの選択的阻害薬を投与することにより、悪心・嘔吐誘発ニューロンの行動変化への機能的役割を調べた。

②アミリンおよび L-ヒスチジン投与による摂食・飲水量の変化測定

アミリン L-ヒスチジンの腹腔内投与 (10~1000mg/kg 体重) を行い、その後の摂食・飲水量の変化を測定した。さらに、前述の味覚嫌悪学習を指標に、悪心誘発の有無を調べた。

(3) 新鮮脳スライス標本の作製とパッチクランプ記録法

①脳スライスの作成と人工灌流

SD 系哺乳ラット (7~21 日令) を用いて、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、落射蛍光ノマルスキー微分干渉 IR-DIC 観察用顕微鏡下のパッチクランプ記録用の灌流装置に移す。

②パッチクランプ記録法

ノマルスキー微分干渉 IR-DIC 観察によりニューロンを同定する。同定したニューロンにこれまで用いてきた方法 (Funahashi et al., 2001~2008) であるスライスパッチクランプ法により電気生理学的特性を調べた。

③データの解析

最後野のニューロンはその電気生理学的特性によって、a) Hチャネル活性 (+) ニューロン、約 60%、b) Hチャネル活性 (+), fastI₇₀ 活性 (+), 約 20% c) Hチャネル活性 (-), slowI₇₀ 活性 (+), 約 20% の 3 大グ

グループに分類する (Funahashi et al., 2002)。アミリン、コレシストキニン、ヒスタミンに応答を示したニューロンがどのグループのニューロンであるかを測定結果から判定する。判定結果の可能性は以下であり、これを踏まえて次のステップへと進めた。

a) cFos(+)ニューロンが1グループだけに特異的に検出された場合→1グループの重点的な解析

b) cFos(+)ニューロンが2グループに検出された場合→2グループの重点的な解析

c) cFos(+)ニューロンが3グループ全てに検出された場合→以前からの研究成果との照合

④実験データの収集と解析

パッチクランプ法による膜電流および膜電位記録は全てAD/DA変換器(AxonおよびAD Instrument)を用いてAD変換してパソコンにデータを収集し、データ収集解析ソフトウェアとして、Clampfit, Axograph(Axon), Mini Analysis(Synaptosoft), Chart(AD instruments)を用いた。

4. 研究成果

以前の我々の研究によって定義した3タイプの最後野ニューロンの中で、1)少なくともHチャンネル発現型ニューロンが悪心誘発に関与していることが行動実験から明らかとなった、2)Hチャンネル発現型ニューロンにはアミリン受容体の発現は極めて少なく、シナプス前部にアミリン受容体が存在する投射神経線維とのシナプス結合も希薄であることを電気生理学的解析により明らかにした。また、アミリンは摂食抑制ペプチドホルモンであり、ヒスタジンはヒスタミンの前駆体として摂食抑制物質とされるが、これらが悪心を誘発することにより摂食量が減少する可能性について検討したところ、アミリンやヒスタジンを腹腔内投与して摂食量減少が見られた場合でも、悪心を誘発していないことが、味覚嫌悪学習を指標にした行動実験により明らかとなった。これらより、最後野のHチャンネル発現型ニューロンは悪心誘発に関与するが、摂食抑制に関する神経ネットワークの一部として機能しているのではなく、悪心誘発を特異的に担当している可能性が示唆された。最後野ニューロンにおいてはヒスタミン応答性が見られず、孤束核ニューロンの関与が示唆された。さらに、同じく摂食抑制ペプチドホルモンであるコレシストキニンに対する最後野ニューロンの興奮性応答が主としてHチャンネル非発現型ニューロンにおいて検出され、これに接続するシナプス前CCK受容体を介してグルタミン酸の放出を調節して応答を引き起こすことが示唆された。以上の結果より、Hチャンネル発現型ニューロンとHチャンネル非発現型ニューロンの機能分

化の可能性が強く示唆された。今後、さらに研究を進めて、悪心、嘔吐誘発と摂食調節の中枢メカニズムの機能分化の観点から、これらの分子基盤を明らかにすることが重要であると考えられた。本研究より今後の研究を展開するための重要な手がかりが得られた。

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6件)

- ① Electrophysiologically identified presynaptic mechanisms underlying amylinergic modulation of area postrema neuronal excitability in rat brain slices. Takeshi Fukuda, Yoshiyuki Hirai, Hitoshi Maezawa, Yoshimasa Kitagawa, Makoto Funahashi, Brain Research, 査読有, 1494:9-16, 2013
- ② Kazuhiro Matsushita, Wei Wang, Soichiro Itoh, Takanori Domon, Makoto Funahashi, Yasunori Totsuka, Dental pulp can be a good candidate for nerve grafting in a xeno-graft model, Journal of Neuroscience Methods, 査読有, 205:246-251, 2012
- ③ 野島靖子, 八若保孝, 船橋誠, 強制運動が恐怖条件付けと記憶に及ぼす影響, 北海道歯学雑誌, 査読有, 33(1):10-16, 2012
- ④ Keisuke Shinpo, Yoshiyuki Hirai, Hitoshi Maezawa, Yasunori Totsuka, Makoto Funahashi, The role of area postrema neurons expressing H-channels in the induction mechanism of nausea and vomiting, Physiology & Behavior, 査読有, 107:98-103, 2012
- ⑤ 石尾知亮, 平井喜幸, 井上農夫男, 船橋誠, 脳幹スライス標本における中枢ニューロンの生命力に対するポリエチレングリコールの作用, 北海道歯学雑誌 査読有, 32(1):25-34, 2011
- ⑥ 児玉高有, 阿部貴恵, 兼平孝, 森田学, 船橋誠, 唾液中ストレスマーカの動態分析, 北海道歯学雑誌 査読有, 31(2):52-61, 2010

[学会発表] (計17件)

- ① 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋誠, Hチャンネルを発現する最後野ニューロンが悪心・嘔吐誘発を担う可能性, 第90回日本生理学会, The Journal of Physiological Sciences 63, suppl. 1, S259, 2013, 3月29日, タワーホール船堀(東京)
- ② 前澤仁志, 平井喜幸, 船橋誠, 口腔の習

- 慣性咀嚼側刺激により誘発される体性感覚野由来の神経活動-脳磁図を用いた検討, 第90回日本生理学会, The Journal of Physiological Sciences 63, suppl. 1, S208, 2013, 3月28日, タワーホール船堀 (東京)
- ③ 坪井寿典, 平井喜幸, 井上農夫男, 舩橋誠, トレッドミルによる運動が味覚嫌悪学習の保持に与える影響, Journal of Oral Biosciences, 54(supple), P1-31, 2012, 9月15日, 奥羽大学 (福島県)
- ④ 奥舎有加, 平井喜幸, 舩橋誠, L-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制と最後野神経活動の連関, 第54回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 54(supple), P1-36, 2012, 9月15日, 奥羽大学 (福島県)
- ⑤ 平井喜幸, 前澤仁志, 舩橋誠, Hチャンネル活性を示す最後野ニューロンの化学受容性と摂食行動調節機序, 第54回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 54(supple), P1-89, 2012, 9月15日, 奥羽大学 (福島県)
- ⑥ 前澤仁志, 平井喜幸, 白石秀明, 舩橋誠, 舌と硬口蓋の慣性咀嚼側刺激により誘発される体性感覚野由来の神経活動-脳磁図を用いた検討, 第54回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 54(supple), P1-105, 2012, 9月15日, 奥羽大学 (福島県)
- ⑦ Takeshi Fukuda, Yoshimasa Kitagawa, Makoto Funahashi, Amilynergic modulation of area postrema neuronal excitability via presynaptic receptors. 第41回北米神経科学 P822.15, VV60, 2011, 11月15日, ワシントン DC コンベンションセンター (米国)
- ⑧ 新保圭亮, 平井喜幸, 戸塚靖則, 舩橋誠, Hチャンネル活性を示す最後野ニューロンの悪心誘発への関与, 第53回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 53(supple) P1-37, 2011, 10月1日, 長良川国際会議場 (岐阜)
- ⑨ 坪井寿典, 平井喜幸, 井上農夫男, 舩橋誠, トレッドミルによる運動が味覚嫌悪学習に及ぼす影響, 第53回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 53(supple) P1-47, 2011, 10月1日, 長良川国際会議場 (岐阜)
- ⑩ 福田武志, 舩橋誠, 最後野ニューロンのアミリン受容機構と摂食調節, 第53回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 53(supple)p89:SS6-2, 2011, 9月30日, 長良川国際会議場 (岐阜)
- ⑪ 福田武志, 北川善政, 舩橋誠, ラット延髄最後野におけるアミリンによるシナプス伝達の修飾, 第88回日本生理学会 P1-214, The Journal of Physiological Sciences 61, suppl. 1, S148, 2011, 3月28~30日, 誌上セッション
- ⑫ 平井喜幸, 新保圭亮, 舩橋誠, 過分極作動性カチオン電流を示す最後野ニューロンがラットの悪心誘発を担う可能性, 第88回日本生理学会 P1-239, The Journal of Physiological Sciences 61, suppl. 1, S153, 2011, 3月28~30日, 誌上セッション
- ⑬ Takeshi Fukuda, Yoshimasa Kitagawa, Makoto Funahashi, Modulation of Synaptic Transmission by Nicotine, Serotonin and Amylin in the Area Postrema, 第40回北米神経科学学会 P394.1 HHH31, 2010, 11月15日, サンディエゴコンベンションセンター (米国)
- ⑭ 福田武志, 平井喜幸, 前澤仁志, 新保圭亮, 石尾知亮, 北川善政, 舩橋誠, ラット延髄最後野におけるアミリン応答性ニューロンに関する電気生理学的解析, 第52回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 52(supple)p131:P-24, 2010, 9月21日, タワーホール船堀 (東京)
- ⑮ 石尾知亮, 平井喜幸, 前澤仁志, 新保圭亮, 福田武志, 井上農夫男, 舩橋誠, ポリエチレングリコールによる舌下神経核ニューロンの細胞死抑制効果, 第52回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 52(supple)p132:P-27, 2010, 9月21日, タワーホール船堀 (東京)
- ⑯ 新保圭亮, 平井喜幸, 前澤仁志, 石尾知亮, 福田武志, 戸塚靖則, 舩橋誠, ZD7288の味覚嫌悪学習への影響, 第52回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 52(supple)p146:P-83, 2010, 9月21日, タワーホール船堀 (東京)
- ⑰ 吉澤知彦, 平井喜幸, 舩橋誠, 歯科用有機溶剤の中樞神経系への影響, 第52回歯科基礎医学会, Journal of Oral Biosciences, 52(supple) p188:P-251, 2010, 9月21日, タワーホール船堀 (東京)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船橋 誠 (FUNAHASHI MAKOTO)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：80221555

(2) 研究分担者

平井 喜幸 (HIRAI YOSHIYUKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40344519
前澤 仁志 (MAEZAWA HITOSHI)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：80567727

(3) 連携研究者

該当無し