

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462883

研究課題名(和文) 嘔吐誘発と摂食調節に関わる延髄最後野ニューロンの機能分化とその分子基盤の解明

研究課題名(英文) Study for elucidation of the functional significance and molecular basis of area postrema neurons relating to the induction of emesis and the regulation of food intake.

研究代表者

船橋 誠 (FUNAHASHI, Makoto)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80221555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：摂食抑制ペプチドホルモンのアミリンとCCK-8に反応するニューロンは、摂食調節に積極的に関与すると考えられる。これらに対する最後野ニューロンの反応を調べたところ、アミリンに対する反応は全てlh(-)ニューロンに検出され、CCK-8に対する反応は42例のうち38例がlh(-)ニューロンであるという結果を得た。また、両ホルモンの受容体はシナプス前膜に存在していることが明らかとなった。これらは、気持ち悪くて食べられない調節と、気持ち悪く無くても食べられない調節が存在していることが示唆された。最後野の分子基盤の異なるニューロン群が異なる摂食調節機序を担うべく、機能分化している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：As neurons responding to amylin and/or CCK-8 are considered to be a neuron group that participates in the regulation of food intake, we examined responsiveness of area postrema neurons to these peptide hormones. Excitatory responses to amylin were found in lh(-) neurons alone. Excitatory responses to CCK-8 were found in lh(-) neurons (n=38/42) and lh(+) neurons (n=4/42). These data indicate that lh(-) neurons in the area postrema contribute in the regulation of food intake. We also demonstrated that amylin and CCK-8 receptors were located on the presynaptic membrane, and regulate the transmitter, glutamate, release. The present study suggests two possible regulation mechanism of food intake, such as anorexia with visceral uncomfortable feeling (nausea) or appetite suppression without nausea. lh(+) neurons and lh(-) neurons in the area postrema may contribute to organizing neuron network for different modulation system of food intake.

研究分野：口腔生理学

キーワード：最後野 嘔吐 悪心 摂食 電気生理学 行動科学 コレシストキニン ヒスチジン

## 1. 研究開始当初の背景

最後野は脳幹背側部にある神経核であり、嘔吐中枢(延髄網様体の領域内で疑核の背側部あたり)のニューロン活動を惹起する化学受容性嘔吐誘発域としてよく知られている(Borison & Wang, 1953)。また、最後野ニューロンのグルコース感受性(Funahashi & Adachi, 1993)や摂食関連ペプチド(Fry & Ferguson, 2010; Riediger et al., 2001, 2004)に対する化学受容性や、さらに視床下部との神経連絡についても明らかにされ(Shapiro and Miselis, 1985; Miselis and Shapiro, 1987)、摂食調節に関与するとされる。最後野には血液脳関門がなく、血液中の化学物質が容易に到達するため、最後野ニューロンは血液中の化学物質動態を感知するセンサーとなり得る。このような特徴から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、悪心・嘔吐誘発や摂食調節意外にも、体液調節、血圧調節に関与しているとする報告が多数ある。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、基本的膜特性などが報告された(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る状態を重視して、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かった特性を明らかにし、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ン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ンネル(Hチャンネル)については、上記の急性単離細胞では発見できなかったものであり、我々が世界に先駆けて研究成果を発表してきた(Funahashi et al., 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チャンネルの活性を抑制することから(Funahashi

et al., 2001, 2004)、Hチャン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チャンネル活性を示し、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チャン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チャンネルの活性がなく、一過性外向きカリウムチャンネル(速減衰型fastI<sub>TO</sub>と遅減衰型slowI<sub>TO</sub>)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。今後は、神経活動の増減と行動変化を直接結び付けることが、最後野ニューロンの機能を解明するために不可欠であり、我々の研究室では行動実験による解析にも着手している。嘔吐誘発や摂食調節、さらに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ったが、最近の我々の研究によりHチャンネル活性を示すニューロン群(I<sub>h</sub>(+)ニューロン)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、Hチャンネル活性を示さないニューロン群(I<sub>h</sub>(-)ニューロン)の摂食調節への関与を示唆するデータを得ており、これらの機能分化様式と分子基盤を明らかにしたい。最近、背内側前頭連合野ニューロンのグルコース感受性を電気生理学的に示した報告があり(Nagy et al., 2012)、同部と関連したニューロン活動にも着目して機能的関連を明らかにしたい。以上のように、嘔吐誘発ニューロンと摂食調節ニューロンの機能分化を証明し、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脳幹部調節メカニズム」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

最後野(Area Postrema)の化学受容性ニューロン群が悪心誘発と摂食調節に関わっていることはよく知られている。しかし、同部のニューロン活動の変調を決定づけるいくつかの特徴的な分子基盤(Funahashi et al., 2002, 2006)と機能分化との関連は不明であったが、最近の

我々の研究により、Hチャネル活性を示すニューロン群が悪心・嘔吐誘発に深く関与することが示唆された(Shinpo et al., 2012)。そこで、本研究では、最後野ニューロンの機能分化様式とその分子基盤の詳細を調べることにより、悪心・嘔吐誘発および摂食調節の中枢メカニズムを明らかにしたい。これにより、最後野ニューロンのホメオスタシス維持における生理学的意義について包括的に解析し、悪心・嘔吐誘発と摂食調節の中枢神経機構に関する新たな概念の樹立を目指す。

### **研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか**

- (1) 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同定
- (2) 最後野グルコース応答性ニューロンの化学感受性と形態的特徴の解明  
心・嘔吐誘発と摂食調節の機能収束を明らかにする。
- (3) 悪心・嘔吐誘発と摂食・飲水調節に機能分化したニューロンの存在部位および細胞形態、さらに脳幹から前頭連合野に至る神経連絡の解明
- (4) 機能分化したニューロン活動の分子基盤とその活動変調による行動変化の解明

### 3. 研究の方法

SD系またはWister系ラットを用いて、北海道大学動物実験指針を遵守して動物実験を行う。最後野ニューロンの機能分化様式とその分子基盤を調べるために、神経活動およびシナプス伝達、受容器電位を計測する方法として主に電気生理学的手法(脳スライスパッチクランプ法、脳磁図計測)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も用い、各機能分化したニューロン群の細胞形態および局在部位を同定と各種受容体およびニューロンの細胞内情報伝達、およびニューロンネットワークの情報処理に関わる分子を同定する方法として免疫組織化学的手法を用い、脳内の物質動態の変化やシナプス入力の変調に伴って生じる行動変化(摂食、飲水行動および条件づけ学習行動)を測定する方法として、行動科学の手法を用いる。

- (1)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同定

最後野のIh(+)ニューロンが悪心・嘔吐誘発に特化して機能分化しているか否かを明らかにする。

アポモルヒネ(10 mg/ml/kg body wt ip)や塩化リチウム投与(0.15M with DW, 2%/kg body wt ip)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。また、両側迷走神経切除群については、新鮮脳スライス標本を作製し、最後野ニューロンのパッチクランプ記録を行い、Ih(+)ニューロンとIh(-)ニューロンの存在比率を調べる。これにより、迷走神経軸索からの入力を受けている最後野ニューロンのサブタイプを同定する。

最後野のIh(-)ニューロンが摂食行動調節に特化して機能分化しているか否かを明らかにする。

アミリンに応答するニューロンは全てIh(-)ニューロンであり、アミリンはIh(-)ニューロンに接続しているニューロンのシナプス前部に作用してグルタミン酸の放出を増強するという作用機序を示唆するデータ(未発表)を得ており、パッチクランプ法により更にデータ数を増やしてこれを確定する。その後、アミリン投与による摂食・飲水量の変化について行動実験により調べ、コントロール群のデータとする。実験群としてHチャネル阻害薬投与群、両側迷走神経切除群、最後野切除群を作成して、アミリン投与による摂食・飲水量の変化を測定する。

- (2)最後野グルコース応答性ニューロンの化学感受性と形態的特徴の解明

ハロセン麻酔(20%O<sub>2</sub>)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 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 10 Glucose, 中に1分間浸漬する。マイクロスライサー(現有)を用いて最後野を含む厚さ150-400μmの新鮮脳前額断脳スライス標本を作製する。スライス標本は室温の人工脳脊髄液ACSF (mM) 124 NaCl, 5 KCl, 1.6 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 10 Glucose中95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>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 観察用顕微鏡下のパッチクランプ記録用の灌流装置に移す。

蛍光顕微鏡下での観察により、同定したニューロンに従来の方法(Funahashi et al., 2001~2012)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(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。続いてグルコース感受性および用量依存性を調べる。同時に, アポモルヒネ等の催吐物質や摂食抑制物質であるアミリンに対する応答性を調べる。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。

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。

#### (3)悪心・嘔吐誘発と摂食・飲水調節に関わるニューロンネットワークの解明

催吐剤投与群とアミリン投与群について, 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。脳を摘出しマイ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, cFos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cFos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。

#### (4)各機能分化したニューロンの活動変調による行動変化の解明

上記で述べたような各種受容体や細胞内情報伝達機構に対する作用するアゴニストまたはアンタゴニスト投与により惹起される行動変化を, 摂食量, 飲水量, 味覚や恐怖の条件付け学習を指標に評価する。また, 精神機能の変調を検索するために, 高架十字迷路試験を行う。行動学的実験後に, c-Fosタンパクの免疫染色によりニューロン活動の変化を可視化して定量評価し, 神経活動の増加と行動変容の相関関係を調べる。また, パイロツ

トスタディとして脳磁計(MEG)を用いて悪心誘発時の脳活動を捉えることを試みる。

## 4. 研究成果

最後野(Area Postrema)の化学受容性ニューロン群が悪心誘発と摂食調節に関わっていることはよく知られているが, 従来, 同部のニューロン群の全てがこれらの機能に関与していると思われてきたが, 最近の我々の研究によって最後野ニューロンは電気生理学的特性の分類により大きく二つのサブタイプ(Hチャネル活性陰性Ih(-)ニューロンとIh(+)ニューロン)に大別され, それぞれのニューロン群が異なる機能を担当する可能性が示唆された。そこで, 本研究では, 同部のニューロン活動の変調を決定づけるいくつかの特徴的な分子基盤と機能分化との関連に着目し, 最後野ニューロンの機能分化様式とその分子基盤の詳細を調べた。摂食抑制ペプチドホルモンのアミリン(臍ホルモン)とコレシストキニン(CCK-8, 消化管ホルモン)に反応するニューロンは, 摂食調節に積極的に関与するニューロンと考えられるため, これらに対する応答を調べたところ, アミリンに対する応答は全て過分極作動性カチオン電流(Ih)を示さないIh(-)ニューロンに検出され, CCK-8に対する応答は42例のうち38例がIh(-)ニューロンであるという結果を得た。このことは, 摂食調節に関与するニューロン群の膜の分子基盤としてHチャネルの発現が見られないことを示すものであった。さらに, これらのペプチドホルモンの受容体はシナプス前膜に存在する事も明らかとなり, 迷走神経の求心路が最後野へ投射する際に, Ih(+)ニューロンとIh(-)ニューロンを別々に認識してシナプス接続していることが示唆された。これらは, 最後野ニューロンが悪心・嘔吐誘発と摂食調節の中核機構を担う上で, 気持ち悪くなったので食べられないという調節と, 気持ち悪くなくても食べられないという調節が存在し, ニューロンの分子基盤とシナプス接続のレベルで区別されて合目的に機能分化している可能性を示すのであった。これらをさらに詳しく調べて行くことにより, 悪心・嘔吐と摂食調節の神経基盤に新たな概念を樹立できる可能性が考えられた。

最後野ニューロンにはHチャネルを発現するタイプが全最後野ニューロンの約60%を占めているため, Hチャネル発現タイプとHチャネル非発現タイプに大別される。我々はこれら二つの異なるタイプの最後野ニューロンを同定して, それぞれの機能的役割について解析を行ってきた。本研究においては, 脳スライス中の最後野ニューロンのパッチクランプ記録によって, 細胞外液に投与したコレシストキニン(CCK-8)に対して反応する最後野ニューロンのタイプがHチャネル非発現タイプであることを同定すると共に, その受容機序について解析を行い, シナプス前膜上にコレシストキニン受容

体が存在することを同定し、シナプス前部からのグルタミン酸の放出を増加させて最後野ニューロンを興奮させていることを明らかにした。多重免疫染色法を用いてノルアドレナリン作動性ニューロンおよびドパミン作動性ニューロンを同定し、Ih(-)ニューロンとIh(+)ニューロンの別を検討したところ、いずれのニューロン群においてもノルアドレナリン作動性およびドパミン作動性の両方のニューロンが同定され、特異性や局在は認められなかった。また、MEGを用いて、悪心誘発時の脳活動を捉えるためのパイロットスタディとして、舌を前方突出させたときの口腔感覚、舌運動、舌筋電図とのコヒーレンスを解析した。さらに、脳内ヒスタミン系の賦活による摂食抑制に悪心経路が関与しているかを味覚嫌悪学習の獲得を指標に解析を行い、生理的濃度のヒスチジン摂取によって摂取後1時間の摂餌量は増加するものの、統計学的有意差は認めなかった。ヒスチジンを大量摂取させた場合には味覚嫌悪学習を獲得するため、悪心が生じていることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Maezawa H, Onishi K, Yagyu K, Shiraishi 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
2. Maezawa H, Mima T, Yazawa S, Matsuhashi M, Shiraishi H, Funahashi M, Cortico-muscular synchronization by proprioceptive afferents from the tongue muscles during isometric tongue protrusion. *Neuroimage*. 128:284-292, 2016.
3. 船橋誠 延髄最後野ニューロンの機能解明 –摂食調節と悪心誘発に関わるニューロンの機能分化が見えてきた–北海道歯学雑誌 36(1):24-26, 2015
4. Sugeta S, Hirai Y, Maezawa H, Inoue N, Yamazaki Y, Funahashi M, Presynaptically mediated effects of cholecystokinin-8 on the excitability of area postrema neurons in rat brain slices, *Brain Research*, 1618:83-90, 2015
5. Tsuboi H, Hirai Y, Maezawa H, Notani K, Inoue N, Funahashi M, Effects of treadmill exercise on the LiCl-induced conditioned taste aversion in rats. *Physiology & Behavior*, 138:1-5, 2015

6. Maezawa H, Hirai Y, Shiraishi H, Funahashi M, Somatosensory evoked magnetic fields following tongue and hard palate stimulation on the preferred chewing side. *J Neurol Sci*, 347(1-2), 288-294, 2014

7. Maezawa H, Mima T, Yazawa S, Matsuhashi M, Shiraishi H, Hirai Y, Funahashi M, Contralateral dominance of corticomuscular coherence for both sides of the tongue during human tongue protrusion: An MEG study. *Neuroimage*, 101C:245-255, 2014

8. Fukuda T, Hirai Y, Maezawa H, Kitagawa Y, Funahashi M, Electrophysiologically identified presynaptic mechanisms underlying amylinergic modulation of area postrema neuronal excitability in rat brain slices. *Brain Research* 1494:9-16, 2013

〔学会発表〕(計17件)

1. 前澤仁志, 美馬達哉, 平井喜幸, 久留和成, 船橋誠, ヒトの等尺性舌運動時における双方向の皮質-筋カップリング: 脳磁図による研究, 第93回日本生理学会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)2016. 3.22-24
2. 久留和成, 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋誠, マウス脳幹部における GLP-1 分泌細胞の電気生理学的特性, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)2016. 3.22-24
3. 久留和成, 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋誠, 食欲調節因子に対するマウス脳幹部GLP-1分泌神経細胞の応答特性, 第57回歯科基礎医学会, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)2015. 9.11-13
4. 平井喜幸, 久留和成, 前澤仁志, 船橋誠, シスプラチン投与による遅延性悪心誘発に対する脳幹部ドーパミン作動性ニューロンの関与, 第57回歯科基礎医学会, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)2015. 9.11-13
5. 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋誠, 最後野および孤束核のカテコールアミン作動性ニューロンのシスプラチンによる悪心・嘔吐誘発への関与, 第92回日本生理学会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)2015. 3. 21-23

6. 前澤仁志, 美馬達哉, 白石秀明, 平井喜幸, 船橋誠, 脳磁図によるヒトの等尺性舌突出時の脳-筋コヒーレンス解析, 第56回歯科基礎医学会, 福岡コンベンションセンター (福岡県・福岡市) 2014. 9. 25-27

7. 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋誠, 最後野および孤束核のノルアドレナリン作動性ニューロンの悪心・嘔吐誘発への関与, 第56回歯科基礎医学会, 福岡コンベンションセンター (福岡県・福岡市) 2014. 9. 25-27

8. 奥舎有加, 平井喜幸, 前澤仁志, 山崎裕, 船橋誠, L-ヒスチジン誘発の摂食抑制及び悪心誘発に対するノルアドレナリン作動性神経の関与, 第56回歯科基礎医学会, 福岡コンベンションセンター (福岡県・福岡市) 2014. 9. 25-27

9. 槌本愛巳, 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋誠, 色覚による味覚閾値の変化, 第94回日本生理学会北海道地方会, 北海道大学 (北海道・札幌市) 2014. 8. 30

10. 奥舎有加, 平井喜幸, 前澤仁志, 山崎裕, 船橋誠, L-ヒスチジン誘発の摂食抑制及び悪心誘発に対するノルアドレナリン作動性神経の関与, 第94回日本生理学会北海道地方会, 北海道大学 (北海道・札幌市) 2014. 8. 30

11. 前澤仁志, 美馬達哉, 矢澤省吾, 松橋眞生, 白石秀明, 平井喜幸, 船橋誠, ヒト舌突出時における脳磁図-筋電図コヒーレンス解析, 第94回日本生理学会北海道地方会, 北海道大学 (北海道・札幌市) 2014. 8. 30

12. 船橋誠, 菅田真吾, 播磨美樹, 最後野におけるニューロンの膜特性と機能分化との関連, 第91回日本生理学会, 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市) 2014. 3. 16-18

13. 前澤仁志, 吉田和也, 美馬達哉, 平井喜幸, 船橋誠, 長峯隆, 福山秀直, 体性感覚誘発脳磁場による口唇感覚異常の客観的評価, 第55回歯科基礎医学会, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市) 2013. 9. 20-22

14. 奥舎有加, 平井喜幸, 船橋誠, L-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制と脳幹部神経活動の関連, 第55回歯科基礎医学会, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市) 2013. 9. 20-22

15. 菅田真吾, 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋誠, ラット最後野ニューロンのシナプス前CCK受容体を介した興奮

性調節, 第55回歯科基礎医学会, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市) 2013. 9. 20-22

16. 菅田真吾, 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋誠, ラット最後野ニューロンのコレシストキニン受容機構, 第93回日本生理学会北海道地方会, 旭川医科大学 (北海道・旭川市) 2013. 8. 31

17. 奥舎有加, 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋誠, L-ヒスチジン誘発の摂食抑制に伴う脳幹部神経活動の変化, 第93回日本生理学会北海道地方会, 旭川医科大学 (北海道・旭川市) 2013. 8. 31

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

平井 喜幸 (HIRAI, Yoshiyuki)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号: 40344519

前澤 仁志 (MAEZAWA, Hitoshi)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号: 80567727