

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500009

研究課題名(和文) 摂食時の唾液分泌調節機構に関する研究

研究課題名(英文) A study on mechanisms regulating salivary secretion during feeding

研究代表者

藤田 雅子 (FUJITA, Masako)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助手

研究者番号：40156881

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)：摂食時の唾液分泌は、視床下部外側野(LH)の調節を受けていることが考えられる。顎下腺・舌下腺の副交感性の一次中枢である上唾液核(SSN)神経に対するLH局在の摂食促進ペプチドであるメラニン凝集ホルモン(MCH)の影響を調べた。SSN神経はMCH受容体を発現しておらず、またMCHに対して無応答であった。従って、LHによるSSN神経の調節は他の伝達物質、例えばオレキシンにより行われている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is most likely that salivary secretion during feeding is regulated by the lateral hypothalamic area (LH). We investigated the effects of melanin concentrating hormone (MCH) which is a feeding promoting peptide localized in the LH, on superior salivatory nucleus (SSN) neurons, which is the primary center of the parasympathetic nervous systems for the submandibular and sublingual glands. No SSN neurons exhibited immunoreactivity for MCH receptor and responded to MCH application. However, in the same recording neurons, orexin, a feeding promoting peptide localized in the LH as with MCH, showed excitatory responses. Therefore, regulation of SSN neuronal activity by LH would be conducted by other transmitters including orexin.

研究分野：口腔機能の自律神経性調節機構に関する研究

キーワード：摂食 唾液分泌 視床下部外側野 上唾液核ニューロン 摂食促進ペプチド メラニン凝集ホルモン
オレキシン

1. 研究開始当初の背景

唾液分泌は他の消化液と異なりホルモンの影響を受けず、もっぱら自律神経系によって調節されることが知られている (Matsuo, 1999)。交感神経は主にタンパク質成分の分泌を促し、副交感神経は主に水分分泌を促す。唾液分泌の調節機構に関する過去の多くの研究は、口腔感覚の刺激により下位脳幹を介した反射により唾液が分泌されるという概念の基に研究がなされてきた(図1を参照)。しかし歯ぎしりや単純な噛みしめで唾液はほとんど分泌されない。一方、摂食時には豊富な唾液分泌が起こることから、下位脳幹よりも前脳(上位中枢)が大きく関与していることが考えられる。しかし、その中枢神経機構はよく分かっていない。

顎下腺・舌下腺を支配する副交感神経の一次中枢である上唾液核神経に投射する神経核を調べた組織学的研究がある。交感神経を切断したラット顎下腺に偽性狂犬病ウイルスを接種することにより、唾液分泌に関与する副交感神経系がシナプスを超えて上位および下位の中枢神経系まで調べられた (Jansen et al., 1992, Hübschle et al., 2001)。感染された神経核、つまり上唾液核神経にシナプス連絡する主な神経核は、下位脳では三叉神経脊髄路核、孤束核および結合腕傍核である。上位脳では視床下部外側野、扁桃体中心核、室傍核、視索前野および大脳皮質である。これらの部位は、唾液分泌と密接に関係がある部位である。また、ラット上唾液核にホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を注入することにより、上唾液核神経に直接的にシナプス連絡する神経核が調べられた (Matsuo, 1999)。染色された神経が存在した神経核は、ウイルスを使った実験結果とほぼ一致していた。

我々は、これらの神経核の中で視床下部外側野に注目した。その理由は、この部位は摂食中枢と呼ばれ、摂食行動を促進する神経ペ

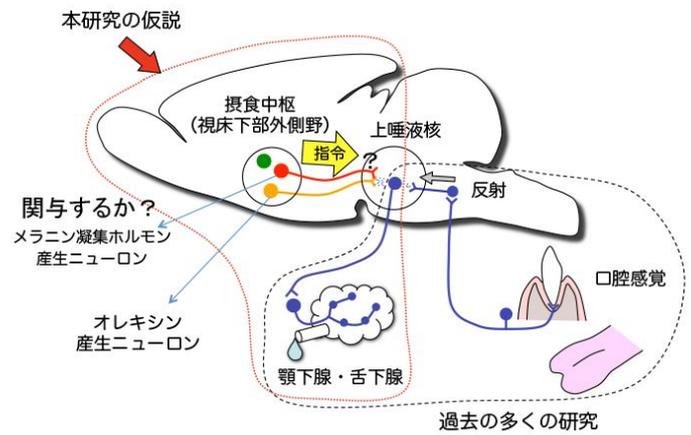


図1 上唾液核の神経活動に影響する入力

プチドを特異的に産生、分泌する神経が存在する為である。つまり、視床下部外側野の神経細胞から分泌される摂食促進ペプチドにより上唾液核神経の活動を直接的に調節していることが考えられた。

2. 研究の目的

視床下部外側野神経によって特異的に産生、分泌されるペプチドには、オレキシン (Orx) とメラニン凝集ホルモン (MCH) がある。そこで我々は「摂食時に、視床下部外側野神経から Orx あるいは MCH が分泌され、上唾液核神経はその刺激により唾液分泌に向けたシグナルを唾液腺に送り唾液分泌が起こる」という仮説を立てた。本研究課題では、上唾液核神経に対する MCH の影響に焦点を絞り、その影響を電気生理学および免疫組織化学的に検討した。

3. 研究の方法

(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-舌神経にデキストラン-フルオレセイン-アニオンリジン (MW 10000) を注入することにより上唾液核神経を標識した。4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、厚さ 8 μm の連続横断切片を作製した。MCH 受容体の MCHR1 と MCHR2 に対する一次抗体 (ミリポア社のそれぞれ ABN740 と

AB5861) を反応させて、ローダミンレッドTM-X で標識した二次抗体を反応させた。フルオレセイン標識された上唾液核神経について、ローダミンレッドTM-X の呈色を示した神経を陽性とした。

(2) 電気生理学的実験

成熟ラット上唾液核神経から記録することが技術的に困難である為に、Wistar 系の幼弱ラット(7-13 日齢)を用いた。鼓索-舌神経にテキサスレッド-リジン(MW 3000)を注入することにより上唾液核神経を標識した。新鮮脳スライス切片を作製し、標識された上唾液核神経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刺激液を 30 秒間投与した時の電流変化を観察した。また電流固定下で膜電位変化も検討した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学的実験

MCH 受容体のサブタイプには、MCHR1 および MCHR2 がある。MCHR1 は多くの動物の中樞神経系に発現しており、MCHR2 は齧歯類では発現していないことが知られているが(Tan et al., 2002) 上唾液核神経ではどのような発現傾向であるか両サブタイプとも検討した。

フルオレセイン標識された上唾液核神経は、4 匹のラットでトータル 641 細胞あった。これら神経において、MCHR1 および MCHR2 の両サブタイプともに免疫活性は全く検出



図2 上唾液核神経におけるメラニン凝集ホルモン受容体に対する免疫活性

A: フルオレセイン標識された上唾液核神経、B: メラニン凝集ホルモン受容体のサブタイプである MCHR1 に対する免疫染色、C: A と B を重ね合わせたイメージ。スケールバーは 100 μm 。

されなかった(図2)。従って、上唾液核神経は MCH に対して応答しないことが推察された。

(2) 電気生理学的実験

上唾液核神経は MCH に対して興奮性応答(内向き電流、活動電位)を示すかどうか調べる為に、電圧固定モードにおいて保持電位 -70 mV で 300 nM MCH を投与したときに内向き電流を発生するかどうか観察した(n=10)。内向き電流を発生する神経はまったく

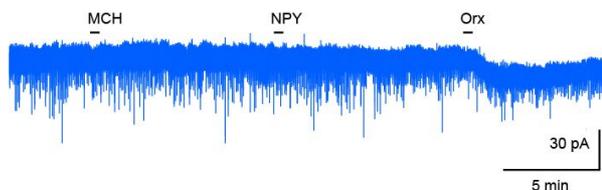


図3 上唾液核神経に対するメラニン凝集ホルモン、ニューロペプチド Y およびオレキシンの影響

存在しなかった。この内 3 例においては、上唾液核神経の活性が低くなかったことを確認するために、1 mM という高濃度の MCH を投与したときの影響を調べた。また同じ記録細胞で、摂食促進ペプチドの Orx(Orx-A) およびニューロペプチド Y(NPY) に対する影響を調べた。Orx については、多くの上唾液核神経がその受容体を持っていることや、興奮性応答を示すことを報告している(2016 年 International Symposium on Olfaction and Taste, 2016 ISOT 発表、Mitoh ら)。NPY は視床下部に豊富に存在する摂食促進ペプチドであり、上唾液核神経に影響する可能性が高い。結果として、MCH および NPY は内向き電流を発生しなかったが、Orx は大きな内向き電流を発生した(図3)。

別の実験で、MCH、Orx および NPY を同じ記録神経に投与(300 nM)したとき、ランプ電位を与えたときの電流応答を調べた(n=2)。MCH および NPY に対する電流応答はどちらもコントロール(灌流液)と変化はなかったが、Orx 投与に対しては -85 mV 付近を起点に電流応答が小さくなった(図4)。すなわち上唾液核神経のシナプス後膜の入力抵抗が増大(膜コンダクタンスの減少)が

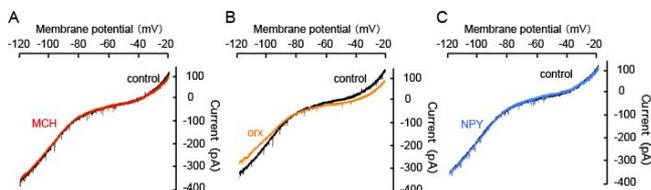


図4 MCH、Orx および NPY 投与時に、ランプ波電位を与えたときの、上唾液核神経の電流応答
電位は-120 mV~-20 mV 間において 10 mV/秒で変化させた。

観察された。Orx の作用は我々の過去の報告と一致した(2016年 ISOT 発表, Mitoh ら)。

電流固定モードにおいて、静止膜電位で MCH および Orx を投与(100 nM)したときの膜電位変化を調べた(n=3)。上唾液核神経の膜電位は MCH に対して変化しなかったが、Orx に対してはすべての神経が活動電位を発生した(図5)。



図5 MCH およびオレキシン A に対する上唾液核神経の膜電位応答

MCH の抑制性応答に関する報告は無いのだけれども、電圧固定モードにおいて保持電位 0 mV で 300 nM MCH に対する影響を調べてみた(n=3)。上唾液核神経は外向き電流を発生しなかったことから、MCH による抑制性応答は無いと考えられる。

以上の結果から、上唾液核神経は MCH の影響をほぼ受けないと考えられる。この結果は免疫組織化学的データと一致した。最近、我々は、ラット視床下部外側野を破壊した実験で、摂食中の唾液分泌が大きく減少することを報告した(Matsuo et al., 2015)。このことから視床下部外側野神経が上唾液核神経活動に大きく影響していることは間違いない。現在、上唾液核神経の興奮性を促進する伝達物質には Orx の他にグルタミン酸(Mitoh et al., 2004) やアセチルコリン(Ueda et al., 2011; Mitoh et al., 2017)があ

るが、これらも上位中枢からの指令を媒介している伝達物質と考えられ、摂食時の唾液分泌の調節に関与する可能性がある。アセチルコリンはまた安静時唾液に関与することが考えられている。

今回、MCH に関する研究成果はネガティブなものであったが、上位中枢による唾液分泌の調節機構に注目した研究は国内外において無いので、それなりの意義はあると考えられる。

まとめ

上唾液核神経は、MCH による調節をほぼ受けていないと考えられるが、MCH と同様に視床下部外側野に局在する Orx に多くの神経が興奮性を示した。Orx は摂食時の唾液分泌を調節する調節因子の一つかもしれない。

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 2 件)

Mitoh Y, Ueda H, Ichikawa H, Fujita M, Kobashi M, Matsuo R. Effects of cevimeline on excitability of parasympathetic preganglionic neurons in the superior salivatory nucleus of rats. *Auton Neurosci*, in press. (DOI:10.1016/j.autneu.2017.05.010)

(査読有り)

Matsuo R, Kobashi M, Mitoh Y, Fujita M. (2015) Role of the lateral hypothalamus in submandibular salivary secretion during feeding in rats. *Brain Res*, 1596, 99-107. (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

Yoshihiro Mitoh, Tadasu Sato, Masako Fujita, Motoi Kobashi, Hiroyuki Ichikawa, Ryuji Matsuo. Orexins excite parasympathetic preganglionic neurons in the superior salivatory nucleus innervating salivary glands. 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT 2016) 2016年6月8日、横浜市

美藤純弘、佐藤 匡、藤田雅子、小橋基、市川博之、松尾龍二、顎下腺・舌下腺を支配する上唾液核ニューロン活動の摂食中枢による調節、第 35 回岡山歯学会総

会・学術集会、2014年10月26日、岡山市
美藤純弘、佐藤 匡、藤田雅子、小橋基、
市川博之、松尾龍二、オレキシンはラット顎下唾液腺を支配する上唾液核ニューロンを興奮させる、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014年9月27日、福岡市

〔その他〕

ホームページ等

岡山大学研究者総覧（藤田雅子）

<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=e2ec9f3cec02146674506e4da22f6611&f1=10&f2=74&sm=field&sl=ja&sp=6>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

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