

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3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592064

研究課題名（和文） 摂食関連ペプチドを介した摂食中枢による嚥下機能の修飾作用の研究

研究課題名（英文） Central orexin-A inhibits reflex swallowing via caudal brainstem

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：視床下部の摂食中枢で産生され摂食を促進する働きを持つ脳内ペプチドのオレキシンが、嚥下反射に及ぼす効果について麻酔下のラットを用いて調べた。その結果、オレキシン A は上喉頭神経刺激で生じる嚥下反射の頻度を減少させ、その潜時を延長させた。オレキシン A は延髄背側部の正中部に位置する孤束核交連部を介して発現し、その受容体はオレキシン I 受容体であった。これらのことから、空腹の状態が嚥下反射の起こりやすさを調節していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： We examined the effects of orexins on the reflex swallowing using anaesthetized rats. Orexins were administered into the fourth ventricle. Swallowing was induced by repeated electrical stimulation of the central cut end of the superior laryngeal nerve (SLN) and was identified by the electromyogram lead penetrated the mylohyoid muscle through bipolar electrodes. The frequency of swallowing during the electrical stimulation of the SLN decreased after the administration of orexin-A in a dose-dependent manner. The latency of the first swallowing tended to be extended after the administration of orexin-A. The administration of orexin-B did not affect swallowing frequency. Pre-administration of SB334867, an orexin1 receptor antagonist, attenuated the degree of inhibition of swallowing frequency induced by the administration of orexin-A. To identify the effective site of orexin-A, the effect of a microinjection of orexin-A into the dorsal vagal complex (DVC) was evaluated. Orexin-A was injected into one of the lateral DVC, the intermediate DVC, or the medial DVC. Microinjection of orexin-A into the medial DVC but not the other two sites decreased swallowing frequency. Pre-injection of SB334867 into the medial DVC disrupted the inhibitory response induced by fourth ventricular administration of orexin-A. The electrical lesion of the commissural part of the NTS, but not ablation of the AP, abolished the inhibition of reflex swallowing induced by fourth ventricular administration of orexin-A. These results suggest that orexin-A inhibits reflex swallowing via orexin1 receptors situated in the commissural part of the NTS and/or its vicinity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：嚥下、上喉頭神経、延髄、視床下部、オレキシン

1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初には摂食亢進ペプチドの一つであるグレリンが、延髄背側部の嚥下中枢 (DSG; dorsal swallowing group) を介して反射性嚥下を抑制的に調節することが明らかになっていった (小橋他、日本味と匂学会誌 2007)。さらに我々は第四脳室に投与したオレキシン A もグレリン同様に反射性嚥下を抑制的に調節する予備的知見を得ており、この作用は摂食亢進ペプチドに共通したものであると推察していた (Kobashi, Neuropeptide Research Trends 2007)。また、上記研究中に他の研究者により、飽食ペプチドのレプチン投与、悪心刺激、胃の膨満により反射性嚥下が変調することも明らかになっており (Felix et al. Am J Physiol 2006; Kurozumi et al. Autonom Neurosci 2008)、摂食亢進と食欲不振時の両方で反射性嚥下が変化しうることが明らかになっている。グレリンは中枢にあっては比較的散在して存在するが、オレキシンは脳では摂食中枢 (LHA) のみに限局して存在する。したがってオレキシンが作用する部位 (オレキシン受容体が存在する部位) は、摂食中枢から直接情報を受け取っていると考えられるので、オレキシンは LHA と延髄背側部との機能連関を調べるための良いツールとなる。これら背景のもとに研究を行った。

2. 研究の目的

オレキシンはもっぱら視床下部外側野で産生され睡眠・覚醒や摂食に関与することが明らかとなっている。オレキシンは摂食を亢進するとともに、摂食に関連した事象、すなわち咀嚼や消化管運動、分泌機能をも調節する。嚥下は、咀嚼と消化吸収の中間に位置し、栄養を摂取するために不可欠な筋運動であり、多種類の神経系がその遂行に関与している。我々は以前の研究で、摂食亢進作用を持つペプチドのグレリンが、上喉頭神経刺激により惹起された嚥下反射を抑制することを明らかにした。その際、オレキシン A も同様の作用を持つことを示すことにより、この応答は摂食亢進ペプチドに共通する応答であることを示唆した。しかし、オレキシンの作用機構の詳細は明らかにされていない。オレキシンは A と B があり、その受容体はオレキシン I 受容体と II 受容体がある。初期の実験からオレキシン A は I 受容体と II 受容体に親和性を持ち、オレキシン B は II 受容体に強い親和性を持つことが明らかになっている。そ

してそれぞれ役割が違うと考えられている。摂食行動に関してみれば、オレキシン I 受容体の方が II 受容体よりもより強い摂食亢進作用を持つ。このように、どの受容体に関与するかを明らかにすることは意義がある。また、延髄背側部には摂食行動に関連する様々な部位があるが、オレキシン含有線維は、延髄背側部の広範な部位に投射しているため、どの部位が嚥下抑制に関与するかは生理学的な手法で明らかにする必要がある。尾側延髄背側部、いわゆる dorsal vagal complex (DVC) は、孤束核、迷走神経背側運動核、最後野より構成される。孤束周囲の DVC 外側部は、いわゆる嚥下中枢である dorsal swallowing group の存在する部位であり、グレリンやレプチンはこの部位を介して嚥下反射を抑制することが知られている。DVC 中間部は、孤束核と迷走神経背側運動核からなり、消化管機能と関連を持つ。DVC 正中部は、最後野と孤束核からなり、悪心や嘔吐、食塩嗜好性、好ましい食品の嗜好性の発現などに関与している。このように延髄背側部にも regional specificity が認められ、多様な調節に関与している。従って、オレキシンの反射性嚥下抑制に関与する部位を明らかにすることは、延髄内での摂食に関連した神経回路網の働きを理解するうえで重要である。そこで、今回我々はオレキシンが嚥下反射を抑制することを確固とするとともに、オレキシンが作用する受容体及びその延髄背側部での作用部位を明らかにするために本研究を行った。

3. 研究の方法

実験にはウレタン・クロラロース麻酔下の SD 系雄性ラットを用いた。剥離した上喉頭神経中枢端を電気刺激することにより嚥下反射を惹起した。双極釣針電極により舌骨上筋群の筋電図を導出し、目視の結果と合わせて嚥下を同定した。オレキシン A とオレキシン B は Ringer 液に溶解し第四脳室内に滴下投与した。オレキシン I 受容体アンタゴニストの SB-334867⁶⁾ はジメチルスルホキシドに溶解し、第四脳室内に滴下投与した。オレキシン A (0.3 - 3 nmol, 3 μ L) の投与前後で刺激期間中の嚥下の回数と初回嚥下筋電図の潜時を測定した。オレキシン B (3 nmol, 3 μ L) も第四脳室内に滴下投与し、同様に投与前後で刺激期間中の嚥下の回数と初回嚥下筋電図の潜時を測定した。オレキシン A の効果がオレキシン I 受容体を介することを明らか

にする為、SB-334867 (10 nmol, 3 μ L) を第四脳室内に滴下投与し、20分後にオレキシンA (1 nmol, 3 μ L) を第四脳室内に滴下投与した。オレキシン-A (60 pmol, 180 nL) を背側迷走神経核群の正中中部、中間部、外側部のいずれかに注入した。オレキシン-A による嚥下反射抑制は正中中部注入時のみ観察された。この部位のオレキシン1受容体が嚥下反射抑制に関与することを明らかにするためにSB334867 (600 pmol, 180 nL) を正中中部に微量注入し、20分後にオレキシン-A (1 nmol, 3 μ L) を第四脳室内に滴下投与した。

背側迷走神経核群正中中部には最後野と孤束核交連部が含まれる。オレキシン-A による嚥下反射抑制がどちらを介するかを明らかにするため、最後野の吸引除去もしくは孤束核交連部の電気焼灼を行った。これらの部位の破壊後に、オレキシン-A (1 nmol, 3 μ L) を第四脳室内に滴下投与しその効果を検討した。結果の解析にはオレキシン-A 投与前後の刺激期間中の嚥下回数を用いた。数値データは平均値 \pm 標準誤差で示した。時系列データの統計学的検討にはDunnett法を用い、試薬投与5分前と投与10分後を比較した。多重比較にはANOVAを用い、post hocテストにはStudent-Newman-Keuls法を用いた。

4. 研究成果

(1) オレキシンA 第四脳室投与が上喉頭神経由来の反射性嚥下に及ぼす効果：オレキシンA 溶液を第四脳室内に滴下投与して、嚥下に及ぼす効果を調べた。オレキシンA 投与5分前の値とオレキシンA 投与10分後の値を比較した。嚥下回数は1 nmol (投与前: 14.33 \pm 0.76 回/20秒、投与後: 8.67 \pm 1.38 回/20秒) ($p < 0.05$, $n = 6$)、3 nmol (投与前: 15.33 \pm 1.69 回/20秒、投与後: 3.67 \pm 2.03 回/20秒) ($p < 0.05$, $n = 6$) のオレキシンA の投与で有意な減少を示したが、0.3 nmol (投与前: 14.00 \pm 1.13 回/20秒、投与後: 12.33 \pm 1.48 回/20秒) (NS, $n = 6$) の投与では有意な減少は認められなかった。溶媒 (Ringer) (投与前: 18.33 \pm 2.68 回/20秒、投与後: 19.17 \pm 2.88 回/20秒) (NS, $n = 6$) の投与は反射性嚥下の回数に影響を及ぼさなかった(図1)。嚥下回数の有意な減少はオレキシンA 投与15分後まで観察された。また、電気刺激により誘発された初回の嚥下潜時はオレキシンA の投与により有意に延長した ($p < 0.05$, $n = 6$) が、溶媒 (Ringer) 投与は有意な変化をもたらさなかった (NS, $n = 6$) 。

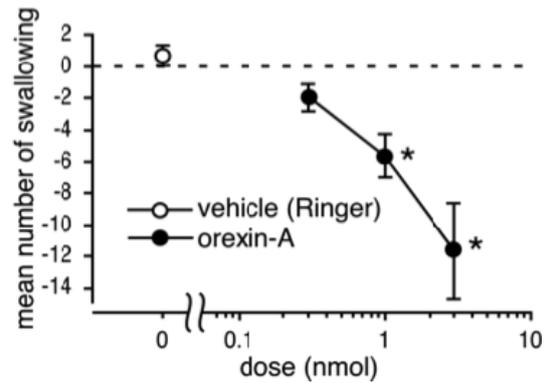


図1 オレキシンA 第4脳室投与の嚥下に及ぼす効果。

(2) オレキシンB 第四脳室投与が上喉頭神経由来の反射性嚥下に及ぼす効果：第四脳室内に滴下投与したオレキシンA がオレキシンI 受容体とオレキシンII 受容体に作用するかどうかを明らかにする為、オレキシンI 受容体への親和性がオレキシンA より低いオレキシンB 溶液を第四脳室内に滴下投与して、嚥下に及ぼす効果を調べた。オレキシンB 投与5分前の値とオレキシンB 投与10分後の値を比較した。3 nmol オレキシンB 投与 (投与前: 15.33 \pm 1.84 回/20秒、投与後: 14.50 \pm 2.49 回/20秒) (NS, $n = 6$) の投与では嚥下回数の有意な減少は認められなかった。

(3) オレキシンA 由来の嚥下抑制作用に及ぼすオレキシンI 受容体アンタゴニストの効果：第四脳室内に滴下投与したオレキシンA がオレキシンI 受容体を介して作用するかどうかを明らかにする為、オレキシンI 受容体のアンタゴニストであるSB-334867 の効果を検討した。オレキシンA 投与の20分前にSB-334867 を投与し、オレキシンA 投与5分前の値とオレキシンA 投与10分後の値を比較した。SB-334867 前投与を行うと1 nmol オレキシンA 投与 (投与前: 9.83 \pm 1.08 回/20秒、投与後: 9.33 \pm 1.36 回/20秒) (NS, $n = 6$) による嚥下回数の有意な減少は認められなかった。

(4) オレキシン-A 延髄微量注入の反射性嚥下におよぼす効果：オレキシン-A の反射性嚥下抑制に関与する延髄内の作用部位を明らかにするために、背側迷走神経核群の3つの異なった部位にオレキシン-A (60 pmol) を微量注入し、嚥下におよぼす効果を調べた。オレキシン-A 投与5分前とオレキシン-A 投与10分後の嚥下反射回数を比較した。その結果、背側迷走神経核群正中中部にオレキシン-A を微量注入したときのみ嚥下回数の有意な減少が観察された ($p < 0.05$, $n = 6$)

が、中間部 (P = 1.0000, NS, n = 6) および、外側部 (P = 0.9957, NS, n = 6) へのオレキシン-A 投与では有意な差は認められなかった。3 群の間に有意な差が認められ (F = 19.5642, p < 0.05)、正中中部注入は中間部 (p < 0.05) および外側部 (p < 0.05) 注入よりも有意に大きな嚥下回数の減少が認められた。一方、正中中部への溶媒の微量注入では嚥下回数の減少は認められなかった (P = 1.0000, NS, n = 6) (図 2 左)。

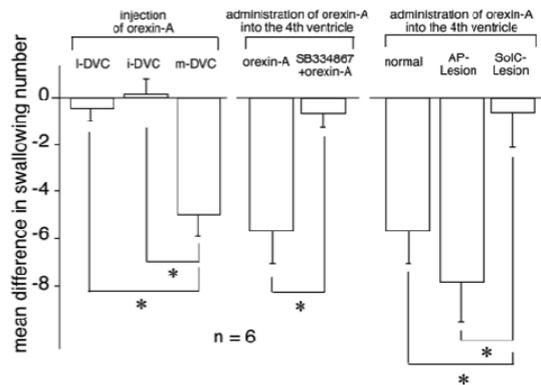


図 2 オレキシン A 及びアンタゴニストの微量注入の効果と脳部位の選択的破壊の効果。

(5) オレキシン 1 受容体アンタゴニスト延髄内微量注入の効果: オレキシン-A の背側迷走神経核群正中中部投与による嚥下頻度の減少がオレキシン 1 受容体を介することを明らかにするため、オレキシン-A アンタゴニスト前投与の効果を検討した。SB334867 注入後、オレキシン-A 投与 5 分前と投与 10 分後を比較して有意な差は認められなかった (p = 0.8292, NS, n = 6)。SB334867 の単独注入は嚥下頻度に変化をもたらさなかった (p = 1.0000, NS, n = 6) (図 2 中央)。

(6) 延髄背側迷走神経核群正中中部の部分破壊の効果: オレキシン-A による反射性嚥下抑制に最後野と孤束核交連部のどちらが関与しているかを明らかにするために、最後野吸引除去後または孤束核交連部電気焼灼後にオレキシン-A を第四脳室内滴下投与した。無破壊群、最後野破壊群、交連部破壊群の 3 群間に有意な差が認められた (F = 5.8035, p < 0.05)。無破壊群と最後野吸引除去群の間には有意な差は認められなかったが (p = 0.3223)、無破壊群と孤束核交連部電気焼灼群の間には有意な差が認められた (p < 0.05) (図 2 右)。

(7) 結論: これらの結果からオレキシン A は延髄正中中部の孤束核交連部に存在するオレキシン I 受容体を介して嚥下反射に抑制的な効果をもたらすことが明らかとなった。

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 4 件)

① 水谷 諭史、小橋 基、藤田 雅子、美藤 純弘、島谷 祐一、松尾 龍二、オレキシン-A による反射性嚥下抑制を惹起する中枢作用部位の検討. 日本味と匂学会誌 19 2012掲載決定済, 査読有り.

② Ueda, H., Mitoh, Y., Fujita, M., Kobashi, M., Yamashiro, T., Sugimoto, T., Ichikawa, H. and Matsuo, R. Muscarinic receptor immunoreactivity in the superior salivatory nucleus neurons innervating the salivary glands of the rat. Neuroscience Letters 499: 42-46, 2011, 査読有り.

③ 水谷 諭史、小橋 基、藤田 雅子、美藤 純弘、島谷 祐一、松尾 龍二、オレキシン中枢投与による嚥下反射の抑制. 日本味と匂学会誌 18: 327-330, 2011, 査読有り.

④ Kobashi, M., Xuan, S. Y., Fujita, M., Mitoh, Y. and Matsuo, R. Central ghrelin inhibits reflex swallowing elicited by activation of the superior laryngeal nerve in the rat. Regulatory Peptides 160: 19-25, 2010, 査読有り.

[学会発表] (計 8 件)

①水谷 諭史、小橋 基、藤田 雅子、美藤 純弘、松尾 龍二、ラット中枢オレキシンによる反射性嚥下の抑制、第 88 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 28 日、横浜市

②水谷 諭史、小橋 基、藤田 雅子、美藤 純弘、松尾 龍二、オレキシン-A は孤束核交連部のオレキシン 1 受容体を介して嚥下反射を抑制する、第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27 日、東京

③水谷 諭史、小橋 基、藤田 雅子、美藤 純弘、島谷祐一、松尾 龍二、オレキシン中枢投与による嚥下反射の抑制、2012 年 10 月 5 日、金沢市

④水谷 諭史、小橋 基、藤田 雅子、美藤 純弘、島谷祐一、松尾 龍二、オレキシン-A による反射性嚥下抑制を惹起する中枢作用部位の検討、2012 年 10 月 4 日、吹田市

⑤柳原 衛、水谷雅年、小橋 基、上喉頭神経刺激により c-fos を発現した NOS 免疫陽性近胃部投射ニューロン、コ・メディカル形態機能学会第 11 回学術集会・総会、2012 年 9 月 22 日、東京

⑥水谷 諭史、小橋 基、藤田 雅子、美藤 純弘、松尾 龍二、嚥下反射抑制におよぼすオレキシン A 作用部位の検討、第 89 回日本生理学会、2012 年 3 月 29 日、松本市

⑦小橋基、水谷諭史、藤田雅子、美藤純弘、松尾龍二、オレキ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、岐阜市
⑧柳原 衛、水谷雅年、小橋 基、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 11 回学術集会・総会、2010 年 9 月 11 日、新潟市

〔図書〕 (計 1 件)

① Kobashi, M., Mizutani, S., Shimatani Y. Role of Central Ghrelin in the Gastric Accommodation and Reflex Swallowing (Chapter IV). In: Ghrelin: Production, Action Mechanisms and Physiological Effects. Edited by Yamada H. and Takahashi K. New York: Nova Science Publishers Inc., 2012, p. 77-94, Hardcover ISBN: 978-1-61942-400-5, eBook ISBN: 978-1-61942-443-2.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

島谷 祐一 (SHIMATANI YUICHI)
東京都市大学・工学部・准教授
研究者番号：20154263

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

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

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

(3) 連携研究者

なし