

平成30年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11245

研究課題名(和文) 脳内生理活性物質による摂食行動パターン制御機構の解明

研究課題名(英文) Analyses of the effects of neuropeptides activated in hypothalamus on the characteristics of feeding behavior.

研究代表者

田中 晋 (Tanaka, Susumu)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00367541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部において産生される神経ペプチドをラット側脳室内に投与した際の摂食行動特性変化について検討したところ、 α -MSHは摂食行動開始までの潜時を延長し、総摂食量、bout持続時間を減少、短縮した。また、AgRPは摂食行動よりも飲水行動を有意に促進した。一方、パッチクランプ法を用いて三叉神経中脳路核ニューロンに摂食促進作用を有するorexin、NPYを作用させると、内向き電流の形成、AHP再分極過程の短縮と持続的発火活動におけるスパイク周波数上昇による膜興奮性の増大変化が観察され、PKA、PKCに関連した細胞内シグナル伝達機構が修飾作用発現に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of neuropeptides produced in the hypothalamic area on the pattern of feeding behavior using adult Wistar rats. Intraventricular injection of α -MSH, antiorexigenic agent, prolonged the latency to eat, decreased cumulative food intake and the duration of feeding bouts. In contrast, AgRP, orexigenic agent produced in arcuate nucleus, stimulated the drinking behavior in all cases examined, but showed only modest effects on the feeding behavior. We also examined the direct effects of neuropeptides on the membrane properties of mesencephalic trigeminal neurons using whole cell patch-clamp recording technique. Both orexin and NPY demonstrated inward current and stimulated membrane excitabilities by acceleration of spike repolarization and increase of spike frequency in repetitive discharges. These effects were suppressed in the presence of H89 or chelerythrine, suggesting the involvement of PKA, PKC dependent signaling pathway.

研究分野：口腔外科学，神経生理学

キーワード：脳内生理活性物質 神経ペプチド 顎口腔刺激 摂食行動 三叉神経中脳路核

1. 研究開始当初の背景

食欲や空腹感を制御している間脳視床下部では、摂食行動を制御すると考えられている様々な脳内生理活性ペプチドや神経伝達物質が分泌されることが知られており、脳室内投与あるいはノックアウトした際の摂食量や体重変化について様々な報告がなされてきた。しかしながら個々の生理活性物質が「食べ方」すなわち食行動様式や末梢における咀嚼筋の筋活動特性に如何なる影響を及ぼすのか詳細は明らかにされてこなかった。我々は、生理活性ペプチドであるオレキシン(Orexin)をラット側脳室へ投与した際に、摂食量の増加に加えて、一定飼料に対する摂食開始時間の短縮、摂食率の上昇が観察されることや、咀嚼筋特に閉口筋の筋活動が振幅値の上昇やバースト持続時間の延長を伴い増大することを明らかとしてきた。しかしながら、脳室内投与した場合、生理活性物質はvolume transmissionにより複数の神経系に作用する結果、食行動促進作用は、交感神経系の賦活作用や覚醒レベルの亢進による二次的变化として発現している可能性は否定できない。したがって、それらが摂食運動に関わる神経系に直接作用していることを証明するには、咀嚼筋への運動出力と運動の基本パターン構成すなわちcentral pattern generation (CPG)に関与する三叉神経運動核と周辺核(Tanaka et al., Brain Res., 1999)のニューロン活動特性への神経修飾作用について明らかにすることが不可欠であるが、摂食運動の制御に関わっていると考えられている神経ペプチドの三叉神経系ニューロンに対する神経修飾作用については未だ明らかとされていない。

2. 研究の目的

ヒトを対象とした近年の調査より、「早食い」の習慣は、摂食量が同じでも「肥満」になりやすいことが報告されている。また先行研究より、摂食促進作用を有する脳内生理活性物質の一つであるオレキシンは、咀嚼筋筋活動特性の変化を伴い、「早食い」に類似した食行動パターンを引き起こすことが明らかとなっている。本研究は、1. オレキシン以外の摂食促進・抑制作用を有する脳内生理活性物質が如何なる食行動パターンの変化を引き起こすか、相互作用も含めて咀嚼筋筋電図活動を指標に明らかにするとともに、2. 脳内生理活性物質が有する他の本能・情動機能に対する影響を排除して、咀嚼運動パターンを構成する三叉神経系ニューロン特性へ直接如何なる影響を及ぼすか修飾作用を検討し、咀嚼筋活動特性変化との関連性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 視床下部生理活性物質脳室内投与による摂食行動・咀嚼筋活動特性への影響について Wistar系雄性成獣ラット(体重250-300g)を用いた。ペントバルビタールナトリウム

(50 mg/kg)腹腔内麻酔下にて、脳定位固定装置(Stereo Drive)に頭部を固定後、ガイドカニューレ(C315G,Plastics One)先端を左側側脳室に留置した。カニューレ留置部位の確認は、術後7日間の回復期の後、アンギオテンシンII(100 ng /3 μ l生食)を脳室内投与して、口渇に対する行動反応の有無を確認した。行動特性実験はHDD video cameraを用いて2方向から観察するとともに、実験動物の概日リズムを考慮してして、明期(AM 9時)、暗期(PM 9時)にそれぞれ施行した。側脳室内に脳内生理活性物質(AgRP, -MSH)を種々の濃度条件で単独投与した際の累積摂食量の違いと一定飼料条件下での摂食開始時間(latency to eat)、摂食率(mg/s)について測定した。また、bout(途切れることのない単一の摂食行動)を指標に平均時間、回数を測定し、摂食行動以外への薬理効果についても評価を行った。

(2) 視床下部生理活性物質による三叉神経系ニューロンの膜興奮特性変化について 実験には生後2-18日齢SD系ラットを用いた。八口セン深麻酔下でKrebs Ringer液中で脳幹を摘出し、厚さ300-400 μ mの冠状スライス標本を作製した。赤外線透視条件下で中脳路核ニューロン(MTN)を同定してホールセルパッチクランプ記録法を用いて、単一ニューロンから記録を行った。NPY, orexin (Ox)をそれぞれ単独でMTNに作用させた際の膜電流、膜電位変化を測定し、濃度依存変化・生後変化の有無を検討した。また、Current-clamp recording条件下で刺激時間をshort pulse (3 ms), long pulse (1 sec)に分けて細胞内通電した際に誘発される単一活動電位(AP)、連続発火(spike train)のスパイク活動特性(最大振幅値、スパイク持続時間、AHP特性)をそれぞれ解析した。MTNではlow-frequency(<10 Hz), high-frequency(50-70 Hz)な入力信号に対して選択的に反応を示す特性(周波数依存応答特性: resonance)を有することから、薬剤投与後の同反応特性の変化についても検討を行った。Bath内投与した際に予想される膜電流、スパイク発射特性変化について修飾に関わる細胞内セカンドメッセンジャー機構を明らかにする目的で、AC-cAMP-PKA, PKC 活性化カスケードに作用する作動薬、拮抗薬を用いて修飾作用が影響を受けるか検討を行った。

4. 研究成果

(1) 視床下部生理活性物質脳室内投与による摂食行動・咀嚼筋活動特性への影響について -MSHを側脳室内投与後、摂食行動開始までの潜時(latency)は明らかに延長する傾向が観察された。また単一時間における摂食量、摂食効率は減少し、boutを指標に評価した場合、boutの持続時間は短縮し、bout数も減少することが明らかとなった。こうした摂食行動の抑制効果とは異なり、AgRPを側脳室内に

投与すると速やかに飲水行動が誘発され、Control群（生理食塩水）と比較して、有意に飲水開始までの時間（latency）、総飲水量（4hr）が増大した。摂食行動についてはOrexin, NPYと同様に、摂食行動開始までのLatencyの短縮やbout持続時間の延長、総摂食量の増大が基本的にみられたが、一部の動物では、飲水行動は促進されるものの摂食行動については促進効果があまり観察されない場合が観察された。また、NPY同様に、AgRP投与後多動性を示す傾向が観察されたが、以上の結果よりAgRPは同じ弓状核から分泌されるNPYとは異なる機序で摂食・飲水行動を制御している可能性が示唆された。

(2)視床下部生理活性物質による三叉神経系ニューロンの膜興奮特性変化について標準細胞内液、外液(normal ACSF)を用いる条件下でwhole-cell recordingを行った。Ox, NPYともに脳室内投与による行動生理実験からは摂食行動を促進させることが明らかとなっていることから、口腔末梢感覚受容器からの求心性情報を統合するMTNのニューロン興奮性にいかなる影響を与えるかを検討したところ、両神経ペプチドともにBath内灌流投与後3-5分後よりvoltage-clamp記録条件下で内向き電流形成が観察された。またCurrent-clamp記録条件下では膜の脱分極傾向がみられ、いずれも薬剤灌流中止により可逆的に変化の収束が観察された(図1)。TTX存在下でも同様の反応がみられたことからニューロンへの直接反応であることが明らかで、外液中のNa, Ca濃度に依存して電流値が変化したことから、両イオンが荷電担体として作用していることが推察された。入力抵抗値には有意な変化を認めなかった。3msの矩形波脱分極パルス通電により誘発される活動電位について、Ox, NPYともにAP成分に対して有意な修飾効果を認めなかったものの、活動電位後過分極(AHP)成分に対しては、再分極過程を促進する傾向が観察された。特にNPYにおいては、AHP最大振幅値の増大と持続時間の短縮を伴い、外液中のCaイオン濃度の変化により修飾効果が影響されることが明らかとなった。また、長時間(>1s)の矩形波脱分極パルスを細胞内通電した際に観察される連続発火活動や内因性バースト活動においてOx, NPYともに平均スパイク周波数の有意な上昇を認めた。また活動誘発に必要な最小電流刺激(rheobasic current)は有意に減少した。バースト活動については単一バースト持続時間が短縮する一方で、バースト出現頻度は上昇したことから、全体的にニューロンの興奮性が増大することが示唆された。こうしたスパイク活動、周波数特性変化が細胞内のいかなるセカンドメッセンジャー機構の制御を受けているかを検証するためにPKA拮抗薬(H89)、PKC拮抗薬(Cherelythrine)をそれぞれ前投与後にOxをMTNに作用させると、スパイク周波数上昇変化はH89投与条件下で一部抑制される傾向がみられたが、活動電位後過分極(AHP)の振幅増大、持続時間短縮変化はいずれも影響を認めなかった。これに対してNPYでは、H89, Cherelythrine

前投与にてスパイク周波数、AHP特性変化はいずれも抑制されることが明らかとなった。以上の結果よりNPYによるMTN修飾作用発現にはPKA, PKCによるシグナル伝達経路が関与している可能性が示唆された(図2)。

一方、MTNの発火特性に関連する周波数依存性膜応答特性についてOrexin, NPYを対象に検討したところ、Orexinについてはhigh frequency resonance (HFR), low frequency resonance (LFR)ともにQ-value, resonant frequencyともに有意な変化を認めなかったが、NPYについてはHFRについてQ-valueの有意な上昇を認めたことから、NPYによるMTNの膜興奮性増大には、持続性Naコンダクタンスの変化が関与している可能性が示唆された。

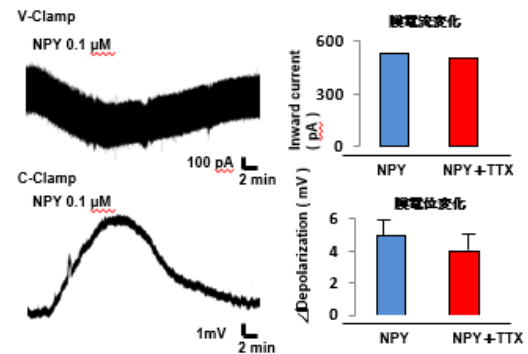


図1 .MTNにおけるNPY投与後の内向き電流および脱分極変化

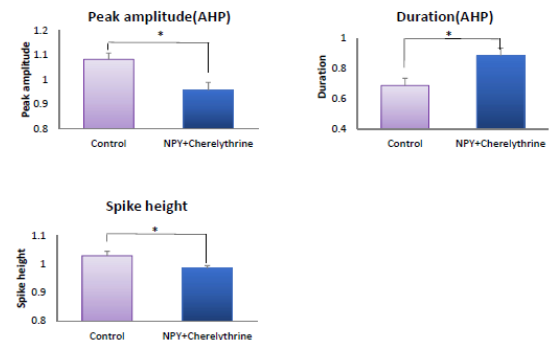


図2 .PKC拮抗薬投与条件下におけるNPYによるAP特性, ST特性変化率の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Akifumi Enomoto, Soju Seki, Susumu Tanaka, Kohji Ishihama, Tadashi Yamanishi, Mikihiro Kogo. Development of resurgent and persistent sodium currents in mesencephalic trigeminal neurons. *Journal of Neuroscience Research* 96(2), 2018, 305-312
DOI:10.1002/jnr.24134

〔図書〕(計1件)

1. Susumu Tanaka, Akifumi Enomoto, Saori Yamada, Soju Seki, Tadataka Tsuji, Kohji Ishihama, Mikihiro Kogo. Slow inward rectifying currents participate in control of bursting behavior in mesencephalic trigeminal neurons. in *Oral Science in Japan 2016*. *Journal of Stomatological Society* 13-16,

2017.

〔学会発表〕（計4件）

1. Soju Seki, Susumu Tanaka, Tadataka Tsuji, Yudai Ono, Mikihiro Kogo.
Neuropeptide Y modulates the spike discharge characteristics in mesencephalic trigeminal neurons. Neuroscience 2015(Oct 17th-21th) Chicago, USA.
2. 山田早織、田中晋、関壮樹、小野雄大、辻忠孝、古郷幹彦 脳内生理活性物質による三叉神経ニューロンの神経修飾作用に関わるシグナル伝達機構
第61回日本口腔外科学会総会・学術集会, 2016年11月25日～27日 千葉県千葉市
3. Susumu Tanaka, Saori Yamada, Akifumi Enomoto, Soju Seki, Tadataka Tsuji, Mikihiro Kogo. Slow inward rectifying currents participates in control of bursting behavior in mesencephalic trigeminal neurons. Oral Neuroscience 2017, Aug.26th, 2017.
4. Akifumi Enomoto, Soju Seki, Susumu Tanaka, Kohji Ishihama, Tadashi Yamanishi, Mikihiro Kogo. Development of resurgent and persistent sodium current in mesencephalic trigeminal neurons. Oral Neuroscience 2017, Aug.26th, 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 晋 (TANAKA, Susumu)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：00367541

(2) 研究分担者

古郷 幹彦 (KOGO, Mikihiro)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号：20205371

石濱 孝二 (ISHIHAMA, Kohji)
大阪大学・歯学研究科・招へい教員
研究者番号：30432454

榎本 明史 (ENOMOTO, Akifumi)
近畿大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70432549

辻 忠孝 (TSUJI, Tadataka)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：50527231