

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592144

研究課題名（和文）

脳内摂食亢進ペプチドによる嚥下関連自律応答の修飾作用とその中枢メカニズムの解析

研究課題名（英文）Central ghrelin inhibits reflex swallowing and induces gastric relaxation of the rats.

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：空腹を起こし、その結果食事の量を増やす作用を持つグレリンという物質の作用を、麻酔を施したラットを用いて検討した。グレリンを脳に投与すると胃の弛緩が生じ、嚥下の頻度が減少することが明らかとなった。胃の弛緩は食事の量が増えても胃に適切に食事が収まるように、胃の容量を広げてやる作用があることを示している。嚥下の頻度の減少の意味を明らかにするには、さらなる研究が必要である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：摂食、嚥下、食物受入、グレリン、延髄、迷走神経、上喉頭神経、ラット

1. 研究開始当初の背景

本研究の開始当初には、グレリンが摂食を亢進し、胃酸分泌や胃蠕動運動を亢進することが明らかになっており、食欲不振の改善薬として期待されていた。また我々の研究でグレリンと類似の摂食亢進作用を持つペプチドである、オレキシンAやニューロペプチドYが胃の弛緩をもたらすことが明らかとなっていた。この現象は摂食亢進ペプチドによる摂食の亢進をもたらす胃の受け入れ容量を増やすことを示している。そこで、グレリン

も同様の作用を持つはずであり、胃の受入と密接に関連する嚥下にも影響をおよぼすことが考えられていた。このような背景のもとに本研究を計画した。

2. 研究の目的

グレリン (ghrelin) は grows hormone secretagogue receptor (グレリン受容体；GHS-R) の内因性リガンドとして胃組織から見いだされ、強い摂食亢進作用を持つことが明らかとなっている。また、上部消化管の空腹

期収縮パターン形成に関与することが明らかとなっており、胃収縮性の調節にも関与していることが考えられる。グレリンは胃組織のみならず視床下部にも含有細胞が存在し、末梢と中枢の両方から摂食調節に関与していると考えられている。我々はこれまで、オレキシンAやニューロペプチドYの視床下部摂食亢進ペプチドが胃遠位部の律動収縮を亢進すると共に、胃近位部の弛緩を惹起することを明らかにしてきた。胃遠位部の律動収縮亢進は胃排泄能を高め、胃近位部の弛緩は食物の受け入れを促進すると考えられる。ところが、グレリンと胃弛緩性との関連については報告がない。組織学的研究によるとGHS-RのmRNAは、視床下部の摂食に関連した核に多数見られる。また、延髄の最後野、孤束核および迷走神経背側核等のいわゆる迷走神経背側複合核群 (DVC; dorsal vagal complex) にも見られる。これらは胃の収縮性に強く関連した部位である。そこで本研究では、グレリンをDVCに作用させるために第四脳室内に滴下投与し、胃近位部の収縮性について検討した。また、胃の弛緩は、食物受け入れ促進の役割を持つことから嚥下と強い関連を持つ。また上述のGHS-RやそのmRNAが存在する迷走神経背側複合核群の部位は胃の収縮性に強く関連と共に、嚥下の背側パターンジェネレーター (DSG; dorsal swallowing group) が存在する部位でもある。反射性嚥下は咽頭・喉頭の機械刺激や化学刺激で惹起されるが、上喉頭神経を経由する求心性神経情報が嚥下惹起に対して最も閾値が低いと言われている。そこで本研究では、上喉頭神経惹起性嚥下におよぼすグレリン中枢投与の効果をもあわせて検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：実験には、ウレタン・クロロコース麻酔 (ウレタン ; 0.8 g/kg bw、クロラ

コース ; 65 mg/kg bw) 下のSD系雄性ラットを用いた。

(2) 胃運動の測定：胃近位部の収縮性は胃底部先端より胃内に挿入したバルーンを用いて、胃遠位部の収縮性はlimiting ridge近傍より挿入したバルーンを用いて、ストレンゲージ血圧計で測定した。体温調節装置を用いて動物の体温を36°Cに維持した。胃の収縮応答を記録しながら、リンガー液に溶解したグレリンを第四脳室内に滴下投与し、用量依存性応答を検討した。グレリンの効果がGHS-Rを介することを明らかにするために、GHS-Rアンタゴニストである[D-Lys3] GHRP-6とグレリンを同時に第四脳室内に投与した。副交感神経節前線維の関与を明らかにするために、グレリン惹起性弛緩応答におよぼす両側頸部迷走神経切除の効果を検討した。胃収縮の記録はパワーラボに取り込み解析した。胃近位部の弛緩は収縮曲線の1分毎の最低値を、胃遠位部の律動収縮は収縮曲線の1分毎の面積 (収縮指標) を用いて定量化した。試薬投与後20 - 21分の1分間の値と投与直前1分間の値とを比較し、対応のあるt検定を用いて統計学的検討を行った。数値はすべて平均 ± 標準偏差で示した。

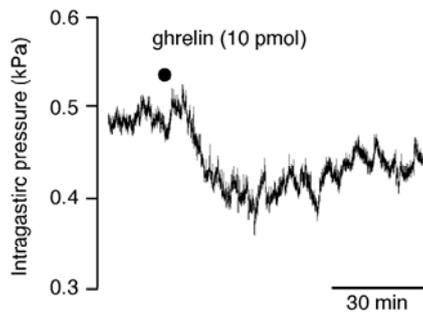
(2) 嚥下反射の測定：上喉頭神経中枢端を頻回電気刺激することにより嚥下反射を惹起し、顎舌骨筋に刺入した双極形釣針電極により筋電図を導出し嚥下をモニターした。グレリンはRinger液に溶解し第四脳室内に滴下投与した。グレリンの投与前後で刺激期間中の嚥下の回数と初回嚥下筋電図の潜時を測定した。グレリンの効果がグレリン受容体を介することを明らかにするために、グレリン受容体アンタゴニストである[D-Lys3] GHRP-6とグレリンを第四脳室内に同時投与し嚥下反射を観察した。嚥下の修飾作用が延髄背側部のニューロンを介することを明らかにするために、微

定量注入装置を用いてDSGの存在する延髄背側部の孤束周辺部にグレリンを微量注入し、嚥下におよぼす作用を調べた。グレリンに対する嚥下応答の修飾が摂食亢進ペプチドに共通した応答であるかどうかを明らかにする目的で、摂食亢進ペプチドのオレキシンAを、第四脳室内に滴下投与し、嚥下に対する効果がグレリンと同様であるかどうかを検討した。数値データは平均値±標準誤差で示し、統計学的検討にはt検定を用いた。

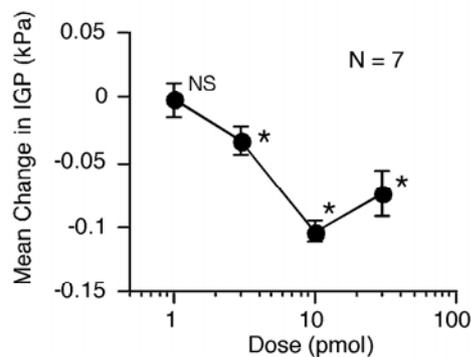
4. 研究成果

(1) グレリンによる胃近位部弛緩の解析

①グレリン第四脳室内投与による胃近位部弛緩：グレリンの第四脳室内滴下投与により、胃近位部の弛緩が観察された（下図）。

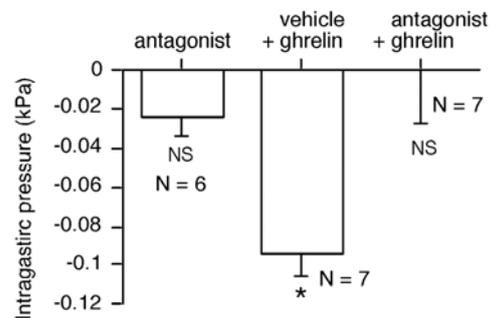


胃内圧の減少のピークは約20分目に見られ、3 pmol、10 pmol、30 pmolの投与で有意な差が認められた。1 pmolの投与では有意な差は認められなかった（下図）。

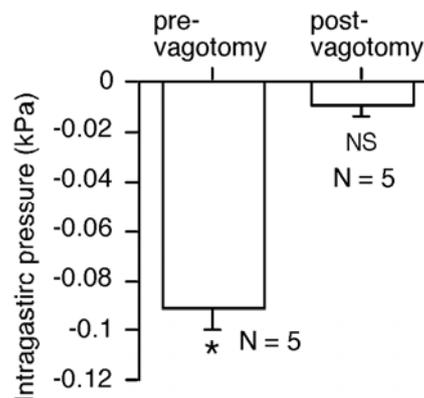


②グレリン由来の胃近位部弛緩におよぼすGHS-Rアンタゴニストの効果：第四脳室内に

投与したグレリンがGHS-Rを介して作用するかどうかを明らかにするために、GHS-Rアンタゴニストである[D-Lys3] GHRP-6の効果を検討した。あらかじめ、アンタゴニスト単独投与の効果を検討した。第四脳室内へのアンタゴニスト単独投与（1 nmol）により内圧はわずかに減少したが、有意な変化は認められなかった。グレリン投与（10 pmol）により有意な内圧の減少が認められるたが、同一動物でグレリン（10 pmol）とアンタゴニスト（1 nmol）の同時投与を行った際には、有意な内圧の減少は認められなかった（下図）。

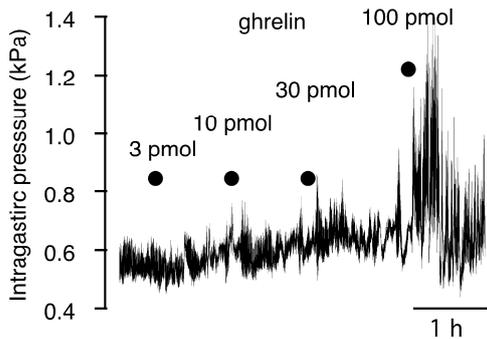


③グレリン由来の胃近位部弛緩におよぼす迷走神経切除の効果：グレリンの作用が副交感神経の節前ニューロンによりもたらされるかどうかを明らかにするために、頸部で両側の迷走神経を切除してグレリンの作用を観察した。切除前はグレリン投与（10 pmol）により有意な内圧の減少が観察されたが、迷走神経切除後は有意な内圧の減少は観察されなかった（下図）。



④グレリン第四脳室内投与による遠位部律

動収縮亢進：胃遠位部の律動収縮についても、同様にグレリンの第四脳室滴下投与の作用を検討した。律動収縮は収縮曲線の面積をもとに収縮指標として定量化した。有意な収縮指標の増加は、100 pmol のみで見られ、胃近位部弛緩に最も効果を示した 3 pmol、10 pmol、30 pmol の投与では有意な増加は観察されなかった（下図）。



⑤グレリンの延髄背側部への微量注入の効果：グレリン（200 fmol）を obex より前方部の DVC と後方部の DVC に微量注入した。その結果、前方部 DVC への微量注入は効果をもたず、後方部への微量注入により有意な弛緩が観察された。また、2 fmol

グレリンの後方部 DVC への投与は有意な内圧の減少を示したが、0.2 fmol の投与では有意な内圧の減少は認められなかった。

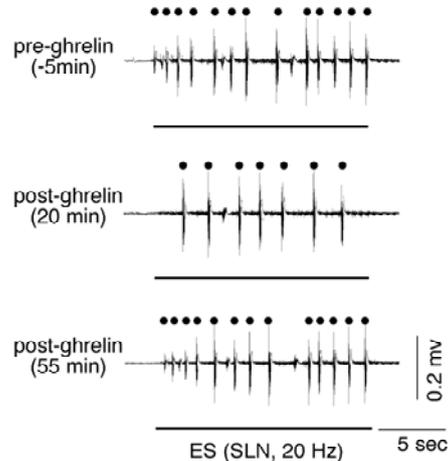
⑥免疫組織化学的手法を用いて延髄背側部のグレリン受容体の存在を確認した。その結果、グレリン受容体は門の前方部および後方部の孤束核、迷走神経背側核に分布しており、前方部と後方部で受容体の分布に量的な差は認められなかった。

⑦以上の結果からグレリンは、後方部 DVC に存在する GHS-R を介して、迷走神経経由で胃近位部の弛緩をもたらすことが明らかとなった。

(2) グレリンによる嚥下反射の抑制

①グレリン第四脳室内投与が上喉頭神経由来の反射性嚥下におよぼす効果：グレリン溶液を第四脳室内に滴下投与して、嚥下におよ

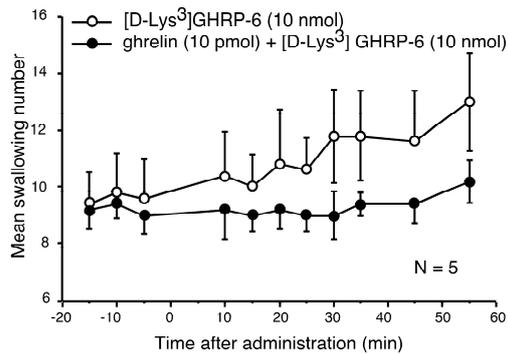
ぼす効果を調べた。グレリン投与 5 分前の値とグレリン投与 20 分後の値を比較した。その結果、グレリンの第四脳室内滴下投与後には、上喉頭神経刺激により惹起された嚥下回数減少が観察された（下図）。



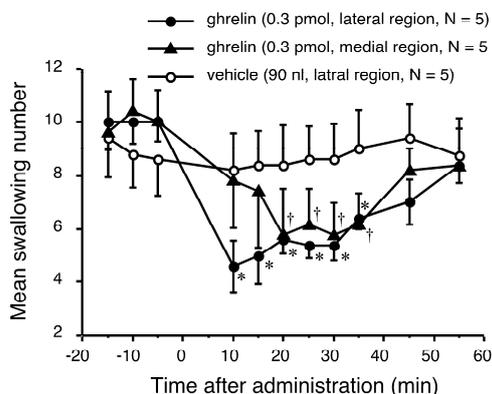
嚥下回数は 10 pmol、30 pmol、100 pmol の用量の投与で有意な減少を示した。3 pmol の投与では有意な減少は認められなかった。一方、溶媒（Ringer）投与は反射性嚥下の回数に影響を及ぼさなかった。嚥下回数の有意な減少はグレリン投与 25 分後まで観察された。また、電気刺激により誘発された初回の嚥下潜時はグレリン投与により有意に伸長したが、溶媒（Ringer）投与は有意な変化をもたらさなかった。

②グレリン由来の嚥下抑制作用におよぼす GHS-R アンタゴニストの効果：第四脳室内に滴下投与したグレリンがグレリン受容体を介して作用するかどうかを明らかにするため、グレリン受容体のアンタゴニストである [D-Lys3] GHRP-6 の効果を検討した。あらかじめ、グレリン受容体アンタゴニスト単独投与（10 nmol）の効果を検討した。試薬投与 5 分前の値と投与 20 分後の値を比較した。その結果、第四脳室内へのグレリン受容体アンタゴニスト単独投与により嚥下の回数に有意な変化は認められなかった。グレリン（10 pmol）とグレリン受容体アンタゴニスト（10

nmol) の同時投与を行った際にも、有意な嚥下回数の変化は認められなかった (下図)。



③ グレリンの延髄背側部への微量注入の効果：グレリンの延髄内での作用部位を明らかにするため、孤束周辺の延髄背側部にグレリン (0.3 pmol) を微量注入した。グレリン微量注入 5 分前の値と注入 10 分後の値を比較した。その結果、嚥下回数は有意に減少した。溶媒の同部位への注入では、嚥下回数の変化は観察されなかった。グレリンの注入 10 分後から 35 分後まで有意な嚥下回数の減少が観察された。初回嚥下の潜時もグレリン微量注入 10 分後に有意な延長が認められた。また、グレリンを内側孤束核に注入した時、注入 10 分、15 分後には有意な嚥下回数の減少は認められなかった。20 分後から 35 分後まで有意な嚥下回数の減少が認められた (下図)。



④ オレキシン A 第四脳室内投与が上喉頭神経由来の反射性嚥下におよぼす効果：グレリン

投与による嚥下回数の減少が摂食亢進ペプチドに共通した性質であるかどうかを確かめるため、グレリンと同様摂食亢進作用を持つオレキシン A の嚥下におよぼす効果を調べた。オレキシン A (3 nmol) 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。その結果、グレリンと同様嚥下回数の有意な減少が観察された。オレキシン A 投与 15 分後まで有意な延長が観察された。潜時はオレキシン A の第四脳室内投与 10 分後に有意な増加が確認された。

⑤ 以上の結果から、グレリンは孤束周辺の嚥下中枢近辺のニューロンに作用して、嚥下反射を抑制する作用があると考えられる。

(3) これらの結果から、グレリンは延髄ニューロンに作用して、摂食の初期段階である嚥下とその結果生じる食物受入の両方を調節していることが明らかとなった。胃の弛緩はグレリンにより摂食量が増えた場合の、胃の食物受入容量を増やすことを示しており、合目的な応答である。一方、嚥下反射が抑制される意味については現在のところ不明であり、さらなる研究が必要と考えられる。

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 3 件)

- ① Kobashi M, Yanagihara Y, Fujita M, Mitoh Y and Matsuo R. Fourth ventricular administration of ghrelin induces relaxation of the proximal stomach in the rat. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296: R217-R223, 2009, 査読有り.
- ② 小橋基, 玄松玉, 美藤純弘, 藤田雅子, 松尾龍二. 上喉頭神経由来の反射性嚥下におよぼす中枢グレリンの調節作用.

日本味と匂学会誌 14: 365-368, 2007,
査読有り.

- ③ Tsukamoto G, Ichikawa H, Kobashi M, Yamada Y, Kikuchi T, Mese H, and Sasaki A. Cisplatin-induced long-term dynorphin A-immunoreactivity in cell somata of rat area postrema neurons. Neuroscience Letters 424: 122-126, 2007, 査読有り.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小橋基、藤田雅子、美藤純弘、松尾龍二、
中枢摂食亢進ペプチドによる麻酔下ラ
ット胃近位部の弛緩応答、第 7 回せとう
ち消化管運動研究会、2009 年 2 月 7 日、
岡山市
- ② 小橋基、美藤純弘、藤田雅子、松尾龍二、
ラット中枢グレリンによる反射性嚥下
の調節作用、第 49 回歯科基礎医学会、
2007 年 8 月 31 日、札幌市
- ③ 小橋基、玄松玉、美藤純弘、藤田雅子、
松尾龍二、上喉頭神経由来の反射性嚥下
におよぼす中枢グレリンの調節作用、日
本味と匂学会第 41 回大会、2007 年 7 月
27 日、江戸川区
- ④ 小橋基、美藤純弘、藤田雅子、松尾龍二、
中枢摂食亢進ペプチドによるラット近
位部の弛緩応答、第 49 回日本平滑筋学
会総会、2007 年 7 月 6 日、橿原市

[図書] (計 1 件)

- ① Kobashi M. Possible Role of Orexiogenic
Neuropeptides in the Reservoir
Function of the Stomach (Chapter IV).
In: Neuropeptide Research Trends,
edited by Levine BA. New York: Nova
Science Publishers, Inc., 2007, p.
121-141, 査読有り.

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

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

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

塚本 剛一 (TSUKAMOTO GOICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40263610

(3) 連携研究者

なし