

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 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21390535

研究課題名（和文）摂食促進ペプチド活性が脳幹内咀嚼リズム形成機序に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effects of neuropeptides implicated in stimulation of feeding behavior on the masticatory rhythm generation in the brainstem

研究代表者

古郷 幹彦 (KOGO MIKIHICO)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：20205371

研究成果の概要（和文）：摂食促進ペプチドであるオレキシン(0x)およびニューロペプチドY(NPY)の脳室内投与により摂食量の増大だけではなく、咀嚼筋活動特性を変化させ、摂食行動を促進させることが明らかとなった。さらに、咀嚼筋活動発現に関わる三叉神経運動ニューロン、三叉神経中脳路核ニューロンからのホールセル記録において、0xは膜の脱分極と連続発火活動におけるスパイク周波数の上昇を伴って、興奮性に作用することが明らかとなった。以上の結果から脳内0xレベルの上昇は、TMNからの運動出力を興奮性に調節し、摂食促進作用に関わっていると推察された。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that centrally injected orexin (0x) or neuropeptide Y (NPY), potent stimulants of ingestive behavior, augmented food intake and facilitated feeding behavior occurring with characteristic changes of EMG activities of masticatory muscles. Whole cell recordings from both trigeminal motoneurons and mesencephalic trigeminal neurons involved in the emergence of masticatory muscle activities revealed excitatory effects of 0x on these neurons by depolarizing membrane potential and increasing action potential frequency in repetitive firing activities. These results suggest that an elevation of intracerebral 0x may have a facilitative role in feeding behavior by regulating excitabilities of trigeminal motor outputs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：摂食行動，顎運動，脳幹，オレキシン

1. 研究開始当初の背景

摂食行動は、栄養を摂取してエネルギー恒常性を維持するために不可欠な生命活動の一つであり、視床下部に存在する摂食中枢、満腹中枢が血中の糖動態、情動の変化や報酬系、睡眠・覚醒などの様々な入力系により相互に活性化されることで高次に制御されて

いる。しかしながら、豊食の時代にあつて「栄養の過剰摂取」は勿論のこと、不規則あるいは短時間での食事を余儀なくされる人々においては「早食い」「一気食い」が日常化されることによって、生活習慣病の引き金となる「肥満」になりやすいと指摘されている。この一因として摂食中枢が刺激される際に

分泌される神経ペプチドであるオレキシンが摂食促進作用を引き起こすことが近年明らかとなったが、出力となる顎運動パターンとその基礎となる脳幹レベルのリズム形成機序への影響については未だ不明である。本研究では、オレキシン神経系の活性化が、末梢の摂食運動パターンおよび脳幹に存在するリズム形成機構に如何なる影響を及ぼすかを明らかにすることで、「早食い」から「肥満」に結びつかせない臨床的な方策を考案していく。

2. 研究の目的

まず、脳内のオレキシン活性レベルを脳室内へのオレキシン投与やキンモクセイの嗅覚刺激により変化させた条件下で同一飼料を摂食させて摂食運動パターン（摂食開始時間、摂食時間、咀嚼回数など）ならびに血中の糖代謝動態（血糖値、インスリン濃度）を比較検討する。次に遊離脳幹標本を用いて三叉神経根より薬剤性に誘発した咀嚼運動様の神経活動に対してオレキシンを投与して活動特性の変化を検討する。さらに免疫組織化学染色法を用いて、脳幹内の三叉神経関連諸核におけるオレキシン受容体の発現様相について明らかとした上で、三叉神経根からの出力に関わる運動核ニューロン、中脳路核ニューロンのオレキシンによる膜特性変化について Whole-cell patch-clamp recording 法を用いて詳細に検討を加える。このように、オレキシンによる摂食行動の制御機構の内、運動の基幹となる脳幹レベルでのリズム形成回路に及ぼす効果について様々な角度から検証を行っていく。

3. 研究の方法

「早食い」にみられる咀嚼運動パターン（リズム）の変化と「肥満」との関係を科学的に解明するために、全動物 (in vivo) 実験および摘出脳幹標本、脳幹スライス標本 (in vitro) を用いた実験を通して多角的に解析・検討を行っていく。まず、ラットによる行動生理実験について、(1). 脳内のオレキシン活性レベルを変化させた際の摂食運動パターン特性を比較検討するとともに、飼料を一定量とした際の各オレキシン活性レベル条件下での血中の糖代謝動態についても合わせて検討する。In vivo で得られた知見をもとに、オレキシンの脳幹レベルへの作用機序をさらに追及する。免疫組織化学染色法を用いて、(2). 脳幹内の三叉神経関連諸核におけるオレキシン受容体の発現様相について明らかとした上で、(3). 遊離脳幹標本を用いて三叉神経根より薬剤性に誘発した咀嚼運動様の神経活動に対するオレキシンの薬物効果について調べる。さらに三叉神経根からの出力に関わる三叉神経関連諸核の

内、これまでに細胞特性が明らかとされてきた(4). 運動核ニューロン、中脳路核ニューロンについて、オレキシンによる膜特性変化を検討する。得られた結果より「早食い」から「肥満」に至る脳幹レベルでの神経機構を解明し、「肥満」に結びつかせないための新たな臨床的な方策を考案していく。

4. 研究成果

【脳内オレキシン活性レベルを上昇させた際の摂食行動特性への影響】

雄性成獣ラット (280-300 g, n=10) を用いて、左側側脳室に薬物注入用のガイドカニューレ、左側咬筋・顎二腹筋前腹に双極誘導電極を留置した。術後 10 日の回復期間を経て、OX-A (3 nmol) あるいは Control として生理食塩水を脳室内投与した。薬物投与 4 時間後までの摂食量を測定し、ビデオ撮影による行動解析実験ならびに咀嚼筋からの筋活動記録実験を行い、二条件間で比較検討した。

薬液注入後の累積摂食量は二条件間で有意な差を認めた (4 時間後 Control: 2.5 g, OX-A 投与条件下: 6.6 g)。摂食開始までの時間は OX-A 投与条件下で有意に短縮し (Control: 110 min, OX-A: 16 min), 摂食率も増大した (Control: 5.9 mg/s, OX-A: 8.1 mg/s)。また、一定飼料量 (2 g ペレット) の咀嚼回数は、OX-A 投与条件下で有意に減少した (Control: 1278 回, OX-A: 965 回)。また、咬筋からの筋活動記録において Control 条件下では、咀嚼準備期および粉碎期に相当する規則的な交替性の筋活動が観察されたが、OX-A 投与条件下では咀嚼準備期と粉碎期に相当する筋活動の規則的な交替性が一部消失する傾向がみられた。さらに、OX-A 投与条件下において咀嚼準備期では筋活動の最大振幅値の増大 (Control: 51.1 mV, OX-A: 72.9 mV), バースト間インターバルの短縮 (Control: 13.4 msec, OX-A: 11.6 msec), バースト発生頻度の増加傾向 (Control: 4.5 Hz, OX-A: 4.9 Hz) が観察された。一方、粉碎期においては、最大振幅値の増大 (Control: 96.2 mV, OX-A: 136.1 mV) に加え、バースト持続時間の延長 (Control: 5.7 msec, OX-A: 7.1 msec), バースト発生頻度の有意な減少傾向 (Control: 6.6 Hz, OX-A: 6.1 Hz) が認められた。さらに咀嚼準備期における二条件間のバースト間インターバルの減少率はバースト発生頻度の増加率と相関関係を示した。粉碎期でのバースト持続時間の増加率はバースト発生頻度の減少率と強い相関関係を示した。

【ニューロペプチド Y が咀嚼筋活動特性へ与える影響】

オレキシン以外の摂食促進ペプチドであるニューロペプチド Y (Neuropeptide Y; NPY)

は視床下部弓状核に特異的に発現しており、オレキシンとともに摂食活動の誘起に関与していることが知られている。また、NPY 含有神経細胞はオレキシン神経細胞と相互に神経ネットワークを形成していると報告されている。

NPY 側脳室内投与は、摂食量の増大と摂食行動特性を表わす各パラメータの変化を伴って摂食行動を促進した。飲水行動に対しては飲水時間・量の延長、増加を認めるものの、NPY の摂食の増大に伴う二次的な変化である可能性が示唆された。また、筋電図学的な検討から、NPY による摂食行動促進時には、咀嚼準備期における開閉口筋および粉碎期における閉口筋の筋活動量の増大を伴うことが明らかとなった。さらに脳室内 NPY レベルの上昇時(10 μg)には、多動性が亢進することで摂食量の濃度の上昇に伴った増大とは相反して単位時間あたりの摂食率が低下すると考えられた。筋電図記録実験から、多動性が亢進する条件下では咀嚼準備期・粉碎期の開閉口筋の筋活動量の低下がみられ、摂食効率の低下に関与していると推察された。

【三叉神経系ニューロンにおける活動特性のオレキシン作動性神経修飾作用】

(1). 三叉神経運動ニューロン(TMN)に対する影響

対象には SD 系新生仔ラット(P3-7)を用いた。三叉神経運動核(MoV)を含む厚さ 300 μm の脳幹冠状スライス標本を作製し、赤外線透視下にて単一ニューロンから K-gluconate を含む標準的内液を注入した先端抵抗値 3-4M Ω のパッチ電極を用いてホールセル記録を行った。記録用標準人工脳脊髄液還流下でオレキシン受容体作動薬(Orexin-A, Orexin-B 100-200 nM)投与前後におけるニューロンの活動電位特性ならびに反復発射活動特性変化についてそれぞれ検討した。

Orexin-A, Orexin-B 投与により、運動ニューロンの静止膜電位は脱分極を引き起こし、 Na^+ , Ca^{2+} を荷電担体とする内向き電流の形成が観察された。また活動電位後過分極(AHP)持続時間の延長と連続発火活動におけるスパイク周波数の上昇がそれぞれ観察された。前者は細胞外 Ca^{2+} の増減により修飾効果が制御されることが明らかとなった。一方スパイク周波数の変化に細胞内外 Ca^{2+} 動態は直接作用しておらず、他のセカンドメッセンジャー機構が関与していると推察された。

(2). 三叉神経中脳路核ニューロン(MTN)に対する影響

実験には、生後 2 日から 14 日齢の SD 系ラットを用いた。ハロタン深麻酔下で脳幹組織

を摘出し、三叉神経中脳路核を含む厚さ 300 μm の冠状脳幹スライス標本を作製した。赤外線透視条件下で中脳路核を同定し、標準人工脳脊髄液(N-ACSF)灌流下で先端抵抗値 3-5 M Ω の記録用電極を用いてホールセル記録を行った。TMN 同様に MTN においても、Ox 投与により膜の脱分極変化と内向き電流が誘発されて、定常状態におけるニューロンの興奮性は増大することが明らかとなった。また内向き電流の形成には Na^+ , Ca^{2+} が荷電担体として作用していることが推察された。一方、TMN とは異なり MTN においては、活動電位における AHP の持続時間は有意に短縮を引き起こし、日齢後期のニューロン群において短縮率は増大し、細胞外 Ca^{2+} の増減により修飾効果が制御されることが明らかとなった。さらに連続発火活動や内因性バースト活動においてはスパイク周波数が上昇することが明らかとなった。スパイク周波数は細胞外高 Ca^{2+} 条件下では低下し、4-AP(100 μM)投与条件下において修飾効果が消失したことから、本修飾作用は AHP コンダクタンス変化と内向き電流形成による効果が相互に作用した結果として起こっている可能性が示唆された。本研究で明らかとなった Ox による TMN, MTN の神経修飾効果は、脳内 Ox レベルが上昇した際に脳幹レベルにおける三叉神経系の運動出力が興奮性に修飾されることで、摂食促進作用に関わっていると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

(1). Yamamoto T(1/3), Inui T, Tsuji T(3/3), The odor of *Osmanthus fragrans* attenuates food intake, *Sci Rep.* 22;3:1518, 2013, 査読有

(2). Tsuji T(1/5), Yamamoto T(2/5), Tanaka S(3/5), Kogo M(5/5). Analyses of the facilitatory effect of orexin on eating and masticatory muscle activity in rats, The 42th Society for Neuroscience abstract, 362.15, BB19, 2012, 査読無

(3). Tsuji T(1/4), Tanaka S(2/4), Yamamoto T(3/4), Kogo M(4/4). Elimination of olfactory and taste sensory information modulates glucose kinetics and sweet preference, *Obesity Facts*, vol.5, suppl.1, 74, 2012, 査読無

(4). Tsuji T(1/5), Tanaka S(3/5), Yamamoto T(4/5), Kogo M(5/5). Olfactory and taste sensory information modulate glucose kinetics and sweet preference, The 41th Society for Neuroscience abstract, 375.14, MM29, 2011, 査読無

(5). Tsuji T(1/5), Yamamoto T(2/5), Tanaka S(3/5), Kogo M(5/5). Analyses of the facilitatory effect of orexin on eating

and masticatory muscle activity in rats. *J Neurophysiol.* 106(6): 3129-35. 2011, 査読有

(6). Tsuji T(1/5), Tanaka S(2/5), Yamamoto T(4/5), Kogo M(5/5). Effects of olfactory stimulation on glucose kinetics, *The Journal of Physiological Sciences*, vol. 61, suppl.1, S209, 2011, 査読無

(7). Tsuji T(1/6), Tanaka S(2/6), Yamamoto T(5/6), Kogo(6/6). Orexin-A changes the characteristics of masticatory muscle activities in feeding behavior: : The 40th Society for Neuroscience abstract, 7711, AA10, 2010, 査読無

(8). Tsuji T(1/4), Tanaka S(2/4), Yamamoto T(3/4), Kogo M(4/4). Effects of intracerebral orexin on the characteristics of feeding behavior, *The Journal of Physiological Sciences*, vol. 60, suppl.1, S179, 2010, 査読無

[学会発表] (計 23 件)

(1). Tsuji T, Yamamoto T, Tanaka S, Kogo M: Analyses of the facilitatory effect of orexin on eating and masticatory muscle activity in rats: *NEUROSCIENCE 2012*: 2012 年 10 月 13-17 日: New Orleans, USA

(2). 樋口将隆, 田中 晋, 辻 忠孝, パハシヤンサナン, 小野雄大, 古郷幹彦: オレキシンによる三叉神経運動ニューロンの神経修復作用に関わる電気生理学的検討: 第 66 回日本口腔科学会学術集会: 2012 年 5 月 17-18 日: 広島

(3). 牛村彩子, 辻 忠孝, 田中 晋, 古郷幹彦: ニューロペプチド Y 脳室内投与時の摂食率変化に関する行動生理学的検討: 第 66 回日本口腔科学会学術集会: 2012 年 5 月 17-18 日: 広島

(4). 辻 忠孝, 田中 晋, 牛村彩子, 樋口将隆, 栗本聖之, 古郷幹彦: 味覚・嗅覚情報の遮断が摂食行動特性および糖負荷後の血中糖動態に及ぼす影響: 第 66 回日本口腔科学会学術集会: 2012 年 5 月 17-18 日: 広島

(5). Tsuji T, Yamamoto T, Tanaka S, Kogo M: Elimination of olfactory and taste sensory information modulates glucose kinetics and sweet preference: *The 19th European Congress on Obesity*: 2012 年 5 月 9-12 日: Lyon, France

(6). Tsuji T, Tanaka S, Bakhshishayan S, Yamamoto T, Kogo M: Olfactory and taste sensory information modulate glucose kinetics and sweet preference: *The 41th ANNUAL MEETING NEUROSCIENCE 2011*: 2011 年 11 月 12-16 日: Washington DC, USA

(7). 辻 忠孝, 田中 晋, 牛村彩子, 樋口将隆, 古郷幹彦: 味覚・嗅覚刺激遮断が糖負荷

後の血中糖動態・甘味嗜好性へ与える影響: 第 56 回日本口腔外科学会総会: 2011 年 10 月 21-23 日: 大阪府

(8). 牛村彩子, 辻 忠孝, 田中 晋, 古郷幹彦: The effects of intracerebroventricular administration of neuropeptide Y on the electromyographic properties of masticatory muscles: 第 56 回日本口腔外科学会総会: 2011 年 10 月 21-23 日: 大阪府

(9). 辻 忠孝, 田中 晋, 山本 隆, パハシヤンサナン, 古郷幹彦: 味覚・嗅覚情報の遮断が糖負荷後の血中糖動態・甘味嗜好性へ与える影響: 第 45 回日本味と匂学会大会: 2011 年 10 月 5-7 日: 石川県

(10). 辻 忠孝, 田中 晋, 山本 隆: 味覚・嗅覚情報の遮断が糖負荷後の血中糖動態・甘味嗜好性へ与える影響: 第 32 回日本肥満学会: 2011 年 9 月 23-24 日: 兵庫県

(11). Tsuji T, Tanaka S, Bakhshishayan S, Yamamoto T, Kogo M: Fragrance of grapefruit changes blood glucose level: *The 18th European Congress on Obesity*: 2011 年 5 月 25-28 日, Istanbul, Turkey

(12). 辻 忠孝, 田中 晋, 牛村彩子, 樋口将隆, 古郷幹彦: 嗅覚情報が甘味嗜好性及び血中糖動態へ与える影響: 第 65 回日本口腔科学会学術集会: 2011 年 4 月 21-22 日: 東京

(13). 牛村彩子, 辻 忠孝, 田中 晋, 樋口将隆, 古郷幹彦: ニューロペプチド Y の脳室内投与が摂食行動特性へ与える影響: 第 65 回日本口腔科学会学術集会: 2011 年 4 月 21-22 日: 東京

(14). 樋口将隆, 田中 晋, 川寄康大, 辻 忠孝, 牛村彩子, 古郷幹彦: 三叉神経系ニューロンにおける活動特性の Orexin 作動性神経修飾作用: 第 65 回日本口腔科学会学術集会: 2011 年 4 月 21-22 日: 東京

(15). Tsuji T, Bakhshishayan S, Tanaka S, Yamamoto T, Kogo M: Effects of olfactory stimulation on glucose kinetics: *The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan*: 2011 年 3 月 28-30 日: 千葉県

(16). Tsuji T, Tanaka S, Inui T, Bakhshishayan S, Yamamoto T, Kogo M: Orexin-A changes the characteristics of masticatory muscle activities in feeding behavior: *40th ANNUAL MEETING NEUROSCIENCE 2010*: 2010 年 11 月 13-17 日: San Diego, USA

(17). 辻 忠孝, 田中 晋, 古郷幹彦: Effects of cerebral levels of orexin on pattern of feeding behavior: 第 55 回日本口腔外科学会総会: 2010 年 10 月 21-23 日: 千葉県

(18). 辻 忠孝, 田中 晋, 山本 隆: Effects of fragrance of grapefruit on glucose kinetics: 第 31 回日本肥満学会: 2010 年 10

月 1-2 日：群馬県

(19). 辻 忠孝, 田中 晋, 山本 隆：グレープフルーツの匂いが糖負荷後の血中糖動態へ与える影響：第 44 回日本味と匂学会大会：2010 年 9 月 8-10 日：福岡県

(20). 辻 忠孝, 田中 晋, 古郷幹彦：脳内オレキシン活性レベルが摂食行動特性へ与える影響：第 64 回日本口腔科学会学術集会：2010 年 6 月 24-25 日：北海道

(21). Tsuji T, Tanaka S, Yamamoto T, Kogo M：Effects of intracerebral orexin on the characteristics of feeding behavior：The 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan：2010 年 5 月 19-21 日：岩手県

(22). 辻 忠孝, 田中 晋, 乾 賢, 山本 隆, 古郷幹彦：桂花の匂いが糖負荷後のヒト血糖値および血清インスリン値へ与える影響：第 43 回日本味と匂学会大会：2009 年 9 月 2-4 日：北海道

(23). 辻 忠孝, 田中 晋, 古郷幹彦：脳内オレキシン活性レベルが摂食行動パターンへ与える影響：第 54 回日本口腔外科学会総会：2009 年 10 月 9-11 日：北海道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古郷 幹彦 (KOGO MIKIHICO)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20205371

(2) 研究分担者

田中 晋 (TANAKA SUSUMU)
大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員
研究者番号：00367541

榎本 明史 (ENOMOTO AKIHUMI)
大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員
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

(3) 連携研究者

山本 隆 (YAMAMOTO TAKASHI)
畿央大学・健康科学部・教授
研究者番号：60028793