

食品成分による迷走神経求心路の活性化を介した 食欲亢進作用とその機構解明

岩 崎 有 作

自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門 助教

緒 言

日本はすでに高齢化社会へと突入し、高齢者の健康や生活の質(QOL)を維持する方法を確立し、実行することが急務である。「食と健康」の重要性は近年の多くの研究成果により明らかである。しかし、加齢に伴い食は細くなり、必要量の食物を摂取することが困難となる事もある。さらに、消化管摘出術後、ガンおよび抗ガン剤治療による食欲不振・悪液質は、体力・QOLの低下、最終的には寿命の短縮へと繋がる。

視床下部が食欲中枢であり、全身の栄養・代謝情報を監視し、摂食量を調節している。視床下部が全身の栄養・代謝情報を受容する機序として、血液脳関門を通過した末梢因子を直接視床下部が受容する経路(液性経路)はよく知られているが、近年、内臓感覚神経である「迷走神経求心路」が末梢の栄養状態をセンスし、それを神経情報として脳に伝達する経路(神経経路)の重要性が明らかとなりつつある。例えば、食後、コレシストキニン(CCK)やグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)等の消化管ホルモンが消化管内分泌細胞より分泌され、これらが直接、求心性迷走神経を活性化し、その情報が脳に伝達されることで満腹感が誘導され、摂食行動が抑制される^{1,2)}。逆に、食前に胃から分泌されるグレリンは求心性迷走神経を介して空腹感を誘導し、摂食量を亢進させる²⁾。したがって、求心性迷走神経に作用する食品成分の中には食欲増進作用を有する成分が存在するかもしれない。

特徴的な刺激と香りを有する“香辛料・ハーブ・香辛野菜”は、伝承的・食経験的に“食欲を増進させる食材”として我々は利用している。例えば、日本料理では薬味として利用されるワサビ、ネギ、ニンニク、サンショウ、ショウガなどは食欲を刺激する脇役として利用されている。また、カレーやキムチなど、香辛料を多く使用した料理も食欲増進効果が言われている。しかし、これら香辛料等の「食欲を増進させる作用成分」と

「その作用機序」は不明である。これら香辛料の辛味成分のほとんどは温度感受性TRP(Transient receptor potential)チャンネルのアゴニストである。代表例として、トウガラシのCapsaicin(CAP)はTRPV1のアゴニスト、ワサビのAllyl isothiocyanate(AITC)やニンニクのDiallyl trisulfide(DATS)³⁾はTRPA1のアゴニストである。TRPV1やTRPA1は主に感覚神経に発現するイオンチャンネルで、求心性迷走神経にも発現している。しかしながら、求心性迷走神経のTRPチャンネルの活性化と摂食行動についての研究報告はこれまでにない。

本研究では、食欲を増進させる食品成分を探索・同定する目的で、香辛料中のTRPV1、およびTRPA1アゴニスト成分が迷走神経求心路の活性化を介して摂食量を亢進させるのか、検討した。CCKは求心性迷走神経を介して摂食量を低下させる最も有名なホルモンである。そこで、CCK応答性・非応答性求心性迷走神経細胞に対するTRPV1アゴニスト(CAP)、TRPA1アゴニスト(AITC、DATS)の作用を、単離した求心性迷走神経細胞の細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)を測定し、解析した。TRPA1アゴニストがCCK非応答性求心性迷走神経細胞を活性化したことより、摂食量を亢進させる可能性が考えられ、求心性迷走神経に作用しうる量のAITC、DATSをマウスの腹腔内に投与し、摂食行動への作用を解析した。

実験方法

1. 単一求心性迷走神経細胞(NGニューロン)の調製と細胞内Ca²⁺濃度測定

求心性迷走神経の細胞体が集合するnodose ganglion(NG)は左右の頸静脈孔直下に存在する。麻酔下のICRマウス(6~16週齢、雄)からの左右のNGを摘出し、collagenase/dispase/DNase混合酵素溶液にて処理することで単一NGニューロンを調製し、最小必須培地を用

いて一晚培養した。Ca²⁺感受性蛍光色素のfura-2 AMをNGニューロンに取り込ませ、蛍光顕微鏡ステージ上の灌流チャンバーにセットし、蛍光画像解析法により経時的に [Ca²⁺]_iを測定した⁴⁾。

2. 摂食行動解析

雄性ICRマウス（8~10週齢）は個別ケージにて、温度23±1℃、湿度55±5%、12時間明暗サイクル（明期：7:30~19:30）、自由摂食飲水の環境下で、1週間以上順化させた。実験当日、9:15からサンプル溶液、もしくはvehicle溶液（2% EtOH, 10% Tween 80, 88% saline）を腹腔内投与（5 ml/kg）し、9:30からの摂食量を経時的に測定した。

多量のCAPを皮下投与することで全身のCAP感受性感覚神経を脱感作させたマウスを作成し¹⁾、上記同様の摂食行動解析を行った。

結 果

CAPはTRPV1を、AITCとDATSはTRPA1を活性化して単離NGニューロンの [Ca²⁺]_iを上昇させる

TRPV1とTRPA1はNGニューロンに発現している。本研究では、CAP、AITC、DATSがTRPチャネルを介して求心性迷走神経を直接活性化して [Ca²⁺]_iを上昇させるのか、さらにその作用濃度を調べた。

CAP、AITC、DATSはそれぞれ、濃度依存的に単離NGニューロンの [Ca²⁺]_iを上昇させた。CAP、AITC、DATSの最大活性濃度はそれぞれ、0.1 μM、10 μM、1 μMであった。CAP (0.1 μM) 誘発 [Ca²⁺]_i上昇はTRPV1アンタゴニストのcapsazepine (10 μM) で、AITC (10 μM) およびDATS (1 μM) 誘発 [Ca²⁺]_i上昇はTRPA1アンタゴニストのHC-030031 (30 μM) で完全に抑制された。したがって、CAPはTRPV1に、AITCとDATSはTRPA1に作用し、NGニューロンの [Ca²⁺]_iを上昇させていることが示された。

最大活性濃度のCAP、AITC、DATSを用いた本実験結果より、TRPV1発現NGニューロンは約60%であったのに対して、TRPA1発現NGニューロンはおよそ35%であった。さらに、TRPA1発現NGニューロン（AITC応答ニューロン）の88.4%がTRPV1発現NGニューロン（CAP応答ニューロン）であり、NGニューロンはTRPA1とTRPV1を共発現していることが判明した。

TRPA1アゴニストはCCK非応答性NGニューロンを活性化する

CCKは求心性迷走神経に発現するCCK-1受容体に作用し、脱分極、[Ca²⁺]_i上昇により神経を活性化し、その神経情報を脳に伝達することで摂食量を低下させる。本研究では、TRPA1アゴニストで活性化されるNGニューロンに対するCCKの作用を解析し、TRPA1アゴニストの迷走神経求心路を介した摂食調節作用の可能性を検討した。

図1に示すようにCCK-8 (10 nM) とAITC (30 μM) を連続してNGニューロンに投与し、その時の [Ca²⁺]_i変化を測定した。AITCに反応するNGニューロンの約60%がCCK非応答性ニューロンであった（図1）。この実験方法と同様にしてCCK-8 (10 nM) とDATS (10 μM) のNGニューロンへの作用を解析した結果、DATSに反応するNGニューロンの約70%がCCK非応答性ニューロンであった。筆者はこれまでにCCK以外の摂食抑制性消化管・膵ホルモンのNGニューロンへの直接作用を解析し、GLP-1、ネスファチン-1、インスリン、膵ポリペプチドは全てCCK応答ニューロンに作用することを明らかにしている^{1,4,5)}。したがって、本実験より、TRPA1アゴニストは摂食抑制性ホルモンとは異なる、「CCK非応答性NGニューロン」に作用することが明らかとなった。このことから、TRPA1アゴニストの求心

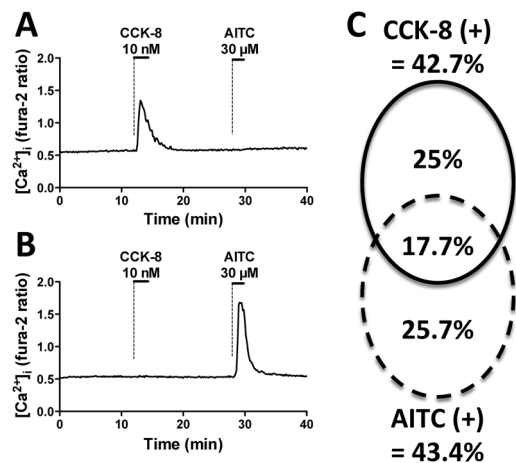


図1 単離求心性迷走神経細胞（NGニューロン）に対するCCK-8とAITCの作用

A & B：単離したマウスNGニューロンのうち、CCK-8のみに応答を示すニューロン（A）とAITCのみに応答を示すニューロン（B）の代表的な細胞内Ca²⁺トレースを示す。C：AとBのプロトコルで実験した時のニューロン反応性の結果を分布図で示す。AITC応答NGニューロンの約60%はCCK非応答性ニューロンである。

性迷走神経への作用は、摂食抑制とは異なる脳機能とリンクすることが予測された。

TRPA1アゴニストの腹腔内投与は感覚神経を介してマウスの摂食量を増加させる

CCK非応答性NGニューロンを活性化するTRPA1アゴニストが摂食量を亢進させるか、マウスを用いて検討した。

CCK-8のNGニューロンへの作用濃度、EC₅₀は0.1 nMである¹⁾。一方、NGニューロンに対するAITCとDATSのEC₅₀は、CCKのEC₅₀と比較して約14,000倍と5,000倍高値であった。ICRマウスにおけるCCK-8の腹腔内投与による摂食抑制効果は、7 nmol/kgが十分効果を示す最小投与量であった。そこで、AITCとDATSを腹腔内投与した際に求心性迷走神経に作用できる最小投与量は、それぞれ7 nmol/kg×14,000=100 μmol/kgと7 nmol/kg×5,000=35 μmol/kgと計算された。本実験では、AITC (20 μmol/kg, 100 μmol/kg) とDATS (20 μmol/kg, 100 μmol/kg) をそれぞれICRマウスに腹腔内投与し、その後の摂食量を測定した。

AITC 20 μmol/kgは投与後3時間の摂食量には全く影響を与えなかったが、AITC 100 μmol/kgは有意に摂食量を増加させ、対照群の約2倍の摂食量となった(図2A)。DATS 20 μmol/kgおよび100 μmol/kg投与は、共に摂食量を対照群の約2倍へと増加させ、100 μmol/kg投与では有意な上昇であった(図2A)。さらに、AITCやDATSの摂食亢進作用は、CAPを末梢投与して全身のCAP感受性感覚神経を障害させたマウスで完全に消失した(図2B)。したがって、TRPA1アゴニストの腹

腔内投与は、迷走神経求心路を含むCAP感受性感覚神経を介してその情報が脳へと伝達され、摂食量を亢進させることが明らかとなった。

考 察

本研究では、TRPA1アゴニストが満腹ホルモンCCKによって活性化させる求心性迷走神経集団とは異なる神経集団を活性化することを見出した。TRPA1をマウスの腹腔内へ投与すると摂食量が亢進させることを発見し、さらに、この効果が求心性迷走神経を含む感覚神経を介した効果であった。

本研究成果は、「香辛料やハーブを加えた料理が食欲を増進させるという伝承療法、食文化」に対する科学的根拠を示すものとなるかもしれないが、いまだ検討すべき項目が残されている。今後は、上記の科学的根拠の立証、および本研究成果を「食欲を増進させる方法」として実生活もしくは臨床現場で応用するために、TRPA1アゴニストの経口投与で摂食亢進作用があるのか明らかにする必要がある。そして、その作用機序として、経口投与したTRPA1アゴニストも求心性迷走神経を介して食欲を増進させているのか、その機能を司る求心性迷走神経の神経化学的な特徴、脳へ伝達するための神経伝達物質、および脳での活性化領域等を明らかにすることが重要である。この機序を明らかにすることで、血液脳関門によって末梢血液からの物質の移行が厳しく制限されている脳という特殊な器官に対して、末梢から脳機能(食欲等)を変化させるための治療の作用点として“求心性迷走神経”が有用であることを示され、求心性迷走神経を標的とした脳機能(食欲)改善薬の開発・発展に大きく貢献する。

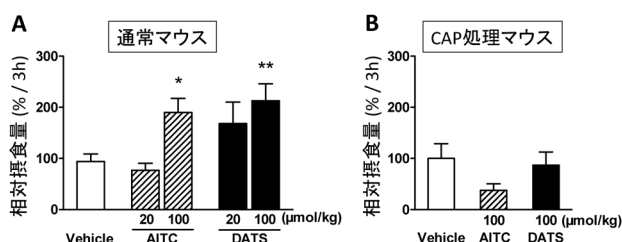


図2 TRPA1アゴニスト (AITC, DATS) 腹腔内投与後の摂食量

Vehicle, AITC (20, 100 μmol/kg), DATS (20, 100 μmol/kg) を明期 (満腹時) にマウスの腹腔内へ投与し、その後3時間の摂食量を測定した。摂食量はVehicle群の摂食量の平均を100%とした相対摂食量を示す。Aは通常マウス、BはCAP処理マウスの摂食量を示す。値は平均値±標準誤差を示す。n=5~17。*p<0.05, **p<0.01 (one-way ANOVA followed by Dunnett's comparison test)。

要 約

香辛料やハーブは、時には食欲を増進させる食材として経験的に使用してきたが、実際の効果、そして科学的根拠は示されていない。内臓感覚神経である求心性迷走神経は末梢情報を受容して脳に伝達し、食欲を調節している。求心性迷走神経にはTRPA1が発現しており、また、多くの香辛料にはTRPA1アゴニストが多く含まれている。そこで、本研究では、香辛料中のTRPA1アゴニスト (AITC、DATS) が求心性迷走神経を介して摂食量を亢進させるか検討した。AITC、DATSによって活性化される求心性迷走神経細胞の2/3が満腹ホルモンのCCK-8に非感受性であった。マウスへのTRPA1ア

ゴニストの腹腔内投与は摂食量を亢進させ、この効果はCAPで全身の感覚神経を障害させたマウスで完全に消失した。したがって、TRPA1アゴニストは求心性迷走神経を含む感覚神経を介して末梢情報を脳へ伝達して摂食量を亢進させることが明らかとなった。

謝 辞

DATSを頂きました日本大学生物資源科学部生命化学科栄養生理化学研究室の細野崇助教、関泰一郎教授に感謝致します。また、本研究を支援して頂きました公益

財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Y. Iwasaki, T. Yada: *Neuropeptides*, **46**(6), 291-297, 2012.
- 2) H. R. Berthoud: *Regul. Pept.*, **149**, 15-25, 2008.
- 3) K. Koizumi, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **382**, 545-548, 2009.
- 4) Y. Iwasaki, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 958-962, 2009.
- 5) Y. Iwasaki, et al.: *PLoS ONE*, **8**(6), e67198, 2013.