

コレシストキニン受容体による脳腸機能相関の伝達基盤と生理機能に関する研究

研究代表者 渡辺雅彦¹⁾
研究分担者 崎村建司²⁾

1) 北海道大学大学院医学研究科 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

コレシストキニン (CCK) は上部小腸から分泌され、食後の胃酸、膵液、胆汁の分泌を制御する重要な消化管ホルモンである。CCK 受容体は、標的となる消化腺や胆嚢に発現するだけでなく、脳にも豊富に発現して摂食行動や消化機能制御に影響を与える。しかし、消化管で産生放出された CCK が、どのようにして消化器官や脳に作用するかという基本的情報は大きく欠落している。その原因は、CCK 受容体発現解析に必要な特異的抗体や生理機能検証に必要な動物モデルが無いことによる。本研究では、新潟大学脳研究所共同研究プロジェクトを活用して、完全欠失型および誘導型の CCK 受容体欠損マウスを開発し、これを用いて CCK を介する脳腸機能相関の伝達基盤と生理機能の解明を目指す。平成 25 年度の共同研究により、摂食行動に直接影響を与える延髄迷走神経複合体における CCK 1 型受容体の細胞発現および神経回路局在を明らかにした。

A. 研究目的

CCK 受容体欠損およびその flox マウスを、本共同研究プロジェクトにより脳研究所の崎村教授と共同して開発する。このモデルマウスを用いて、特異的な CCK 受容体抗体を作成し、神経回路レベルにおける CCK 伝達機構の分子局在を明らかにする。さらに、このモデルマウスの視床下部、扁桃核、孤束核、最後野に Cre 組み換え酵素をウイルスベクターを用いて局所導入して神経回路選択的な CCK 伝達阻害を行い、CCK 伝達機構の生理機能を摂食・消化機能制御の脳腸相関という観点から解明する。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1) 1 型および 2 型 CCK 受容体欠損およびその flox マウスの開発

マウスの 1 型 (CCKAR) 遺伝子は、第 5 染色体に存在しており、5 つの exon でコードされる約 9kb 程度のコンパクトな遺伝子構造をしている。

CCKAR-flox マウス作製にあたり、exon3 を含む領域約 0.5 kb を flox することを計画している。この部分が Cre の組み換えにより欠失すると、exon4 以下のフレームシフトにより KO が遂行出来る。また、2 型 (CCKBR) 遺伝子は、第 7 染色体に存在しており、同じく 5 つの exon でコードされており、約 10 kb 程度のコンパクトな遺伝子構造をしている。CCKBR-flox マウスは、exon2 と exon3 を含む領域約 1kb を flox することを計画している。この部分が Cre の組み換えにより欠失すると、exon4 以下のフレームシフトにより KO が遂行出来る。

2) 1 型および 2 型 CCK 受容体の特異抗体作成

大腸菌融合蛋白および合成ペプチドを用いてポリクロナール抗体を作成し、その特異性を、上記欠損マウスを用いて検定する。

3) 1 型および 2 型 CCK 受容体の消化器官および脳における発現局在解析

蛍光標識多重 in situ hybridization により、CCK 受容体を発現する細胞種を脳と腸において明らかにする。さらに、抗体を用いた電子顕微鏡レベルの免疫組織化学により、CCK 受容体の細胞内

およびシナプス分布を解明する。さらに、リガンドである CCK 陽性線維や血管との関係についても検討し、ホルモン性および神経性の伝達基盤を解明する。

4) ウイルスベクターを用いた Cre 組み換え酵素の局所導入による CCK 受容体による摂食・消化機能制御機構の解明

Cre 組み換え酵素の視床下部、扁桃核、孤束核、最後野への局所導入を CCK 受容体 flox マウスに対して行い、摂食行動や消化管運動に対する調節機構を明らかにする。

C. 研究結果

平成 25 年度における研究活動から、以下の結果が得られた。

1) 延髄迷走神経複合体における 1 型 CCK 受容体の細胞発現解析

内臓からの感覚情報を受け内臓反射を制御する延髄迷走神経複合体（最後野、孤束核、迷走神経背側運動核）に焦点を絞って、蛍光標識 *in situ* ハイブリダイゼーション法により、1 型 CCK 受容体 mRNA の発現細胞を同定した。その結果、この受容体を発現する細胞は、反射弓の求心路を作る一部の nodose ganglion 細胞と、遠心路を作る一部の迷走神経背側運動核ニューロンに発現していた。

2) 迷走神経求心路における 1 型 CCK 受容体の回路発現

特異抗体を用いた免疫組織化学により、迷走神経の求心路における 1 型 CCK 受容体は、nodose ganglion 細胞の細胞体表面と、孤束核および最後野に投射する中枢性投射軸索に分布していた。免疫電顕法により、1 型 CCK 受容体陽性の投射軸索は、孤束核と最後野のニューロン樹状突起との間にシナプスを形成していた。興味深いことに、1 型 CCK 受容体陽性の中枢性投射軸索の分布領域は CCK 陽性線維の分布は乏しいが、最後野より漏出する循環由来のエバンス青の浸透領域とほぼ一致していた。対照的に、消化管に分布するの末梢性投射軸索には 1 型 CCK 受容体は検出されなかつ

た。

3) 迷走神経遠心路における 1 型 CCK 受容体の回路発現

一方、迷走神経遠心路では、胃に投射する運動核ニューロンの細胞体と樹状突起に 1 型 CCK 受容体の陽性反応が観察された。この運動ニューロンの領域は最後野より漏出する循環由来のエバンス青の浸透領域ではなかったが、nodose ganglion 細胞に由来するとかんがえられる CCK 陽性線維が分布していた。一方、胃壁内の遠心性投射軸索には認められなかった。

4) 1 型 CCK 受容体欠損マウス作製

1 型 CCK 受容体欠損マウス作成の完成は目前となっている。

D. 考察

以上の所見から、迷走神経求心路に発現する 1 型 CCK 受容体は、食後の消化管から放出され血液脳関門を欠く最後野より漏出する CCK を感知する様式で分布し、その求心性終末からのグルタミン酸放出を促進していることが考えられる。一方、迷走神経遠心路に発現する 1 型 CCK 受容体は、迷走神経求心路の活動性に伴って神経性に放出される CCK を感知して、胃の運動性を調節していることが考えられる。

E. 結論

求心性および遠心性の臓性神経情報を運ぶ特定の迷走神経の感覚ニューロン（孤束核ニューロン）と運動ニューロン（背側運動核ニューロン）における発現は、CCK1 受容体が脳腸相関を構成する分子本体であることを物語っている。今後、1 型 CCK 受容体欠損マウスを用いて、摂食行動制御における CCK の生理機能の解明が待たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

・Hills LB, Masri A, Konno K, Kakegawa K, Lam A-TN, Lim-Melia E, Chandy N, Hill RS, Partlow JN,

Al-Saffar M, Nasir R, Stoler JM, Barkovich AJ,
Watanabe M, Yuzaki M, Mochida GH: Deletions in
GRID2 lead to a recessive syndrome of cerebellar
ataxia and tonic upgaze in humans. **Neurology**,
81:1378-1386, 2013.

・ Hashizume M, Miyazaki T, Sakimura K, Watanabe M, Kitamura K, Kano M: Disruption of cerebellar microzonal organization in GluD2 (GluRδ2) knockout mouse. **Front Neural Circuits**, 7:130, 2013.

2. 学会発表

今野幸太郎、岩永敏彦、渡辺雅彦：孤束核におけるコレシストキニン1受容体は迷走神経下神経節由来のグルタミン酸作動性神経終末のシナプス外膜に局在する、第118回日本解剖学会総会、2013年3月30日、高松。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし