

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

コレシストキニン受容体 CCK1R の脳腸機能相関における伝達基盤解明

研究代表者 渡辺 雅彦¹⁾

研究分担者 阿部 学²⁾, 笹岡 俊邦²⁾, 今野 幸太郎¹⁾

1) 北海道大学大学院医学研究院 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 受容体は末梢組織に豊富な CCK 1 R と中枢神経系に豊富な CCK2R が存在する。末梢型の CCK1R は標的となる消化腺や胆嚢に発現するだけでなく、脳にも一部発現し摂食行動や消化機能制御に影響を与えることがこれまで報告されている。しかし、「消化管で産生放出された CCK が、どのようにして脳に作用するか」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、CCK1R 特異的抗体および完全欠失型・誘導型の CCK 1 R 受容体欠損マウスを用いて、CCK 1 R 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。

A. 研究目的

CCK1R および CCK2R は結合実験や特異性が確立されていない抗体を用いた空間分布の報告はあるものの、過去に特異的な分子局在を示す報告はなかった。申請者らは 2015 年に CCK1R に対する特異的抗体を作製し、膵臓・胃・胆嚢・小腸における CCK1R の局在を光顕・電顕レベルで解析し報告した (Konno et al. Histochem Cell Biol. 2015)。本研究課題の予備検討で 2015 年に報告した抗体を用いることによって、延髄孤束核や最後野において CCK1R の特異的な免疫反応を検出できることが明らかとなった。この抗体を用いることで CCK1R の脳内における空間分布や細胞局在が明らかとなり、リガンドである CCK の由来との関連性も明らかとなっていくことが予想される。さらに、CCK 1 R 欠損およびその flox マウスを用いて CCK1R 発現領域に 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、神経回路選択的な CCK 伝達阻害を行うことで、CCK 1 R を介する脳腸機能相関の伝達基盤と生理機能の解明が期待される。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究は、脳における CCK1R の局在解析およびその機能を解明するために①—④の研究項目に焦点を当てて行う。

①CCK1R の脳内分布および細胞局在を明らかにする。

始めに高感度検出系の *in situ* hybridization 法を用いて CCK1R mRNA 発現マップを作製する。続いて CCK1R 抗体を用いて CCK1R タンパクの発現分布を検討する。延髄における詳細な局在は多重蛍光抗体法および包埋前免疫電顕法を用いて検討する。

②CCK1R の関与する神経回路を明らかにする。

迷走神経下神経節切断により孤束核および最後野における CCK binding site が減少することから、これらの領域における CCK1R は迷走神経下神経節由来の中枢枝に局在することが強く予想される。迷走神経背側神経核複合体領域における CCK1R が関与する神経回路を解明するために、迷走神経下神経節切断による CCK1R 免疫反応の定量解析を行う。続いて神経標識法を用いて CCK1R が関与する神経回路を同定する。

③CCK の由来を明らかにする。

迷走神経求心路に発現する CCK1R は、血液-脳関

門を欠く最後野より漏出するホルモン性CCKを感知する様式で分布する可能性が考えられるが、脳内には神経性に分泌されるCCKも豊富に存在するため、CCK抗体およびCCK1R抗体の多重染色および血管より漏出したエバンスブルーの浸潤領域との関連を詳細に追求し、ホルモン性CCKおよび神経性CCKの伝達基盤とCCK1Rの局在関係を解明する。

④摂食制御におけるCCK1Rの生理学的意義を明らかにする。

Cre組み換え酵素を搭載したウイルスベクターを用いて迷走神経下神経節、迷走神経背側運動核への局所導入をCCK1R flox マウスに対して行う。その後、摂食飲水量の経時的変化測定や硫酸バリウムを用いた腸管クリアランスの測定を行い、CCK1Rが関与する消化機能制御機構を明らかにする。

C. 研究結果

本年度は研究計画「①CCK1Rの脳内分布および細胞局在を明らかにする。」に従って研究を行った。はじめにCCK1R mRNAの脳内細胞発現について蛍光 *in situ* hybridization法を用いて検討した。CCK1R mRNAは、延髄迷走神経背側運動核に認められ、アセチルコリン神経マーカーであるコリントランスポーターを共発現することが明らかとなった。続いて蛍光抗体法を用いてCCK1Rの脳内分布を検討した。脳研究所の提供によるCCK1R遺伝子欠損マウスを用いることで、CCK1Rの特異的な免疫反応を確認することができた。特異的なCCK1Rの反応は、弧束核内側部および最後野で強く、弧束核外側部や迷走神経背側運動核ではまばらに認められた。続いてCCK1Rが豊富に認められる弧束核内側領域および最後野において、CCK1Rの詳細な局在を蛍光抗体法および包埋前免疫電顕法を用いて検討した結果、CCK1Rは小胞型グルタミン酸トランスポーター2陽性グルタミン酸作動性神経終末の細胞膜近傍に豊富に局在することが明らかとなった。

D. 考察

今回の検討によって、脳内におけるCCK1R mRNAおよび特異的なタンパク分布が明らかとなった。特異的CCK1Rタンパク発現は延髄弧束核内側部や

最後野のグルタミン酸作動性神経終末に認められたが、これらの領域には迷走神経下神経節由来の興奮性神経終末が豊富に入力することが知られている。迷走神経下神経節切断により弧束核および最後野におけるCCK binding siteが減少する過去の報告からも、延髄弧束核内側部や最後野領域におけるCCK1Rは迷走神経下神経節由来の中枢枝に局在することが強く予想される。

次年度は、迷走神経下神経節由来の中枢枝にCCK1Rが局在することを確定させるために、研究計画に沿って遂行する予定である。

E. 結論

マウス脳内におけるCCK1Rは、延髄弧束核内側部および最後野に豊富に分布し、グルタミン酸作動性神経終末の細胞膜近傍に広く局在する。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Konno K, Yamasaki M, Miyazaki T, Watanabe M. Glyoxal fixation: An approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research. *Sci Adv.* 2023 Jul 14;9(28):eadf7084. doi: 10.1126/sciadv.adf7084. Epub 2023 Jul 14.

2. 学会発表

1. 今野幸太郎、山崎美和子、渡辺雅彦. マウス脳におけるNeurologin1の領域依存的な興奮性・抑制性シナプス局在. 第129回日本解剖学会総会全国学術集会、那覇文化芸術劇場なは一と（沖縄県、那覇市）、2024年3月21-23日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし