

新潟大学脳研究所
「脳神経病理標本資源活用の先端的共同研究拠点」
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 24 年度の共同研究により、CCK1 型受容体抗体を作成しその細胞発現を追求すると共に、CCK 受容体欠損マウス作製はキメラマウスの段階に達している。

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 0.5kb 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 10kb 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ーナル抗体を作成し、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、扁桃体、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 24 年度における研究活動から、以下の結果が得られた。

1) 1型および2型 CCK 受容体の特異抗体作成

1型および2型 CCK 受容体の特異抗体作製を行った。異なる抗原部位を用いて、数度のウサギ免疫を経て特異抗体を得ることができた。特に、1型 CCK 受容体抗体の特異性は、1型 CCK 受容体 cDNA を導入した HEK 細胞を選択的に認識し2型 CCK 受容体導入細胞を認識しないこと、また膵臓、胆嚢、胃などの CCK 受容組織の特定の細胞を認識することから明らかとなった。

2) 1型 CCK 受容体の消化器官および脳における発現局在解析

平成 24 年度は1型 CCK 受容体の消化管と脳における発現解析を進め、以下のような興味深い発現分布が明らかになっている。

- ・ 1 型 CCK 受容体は、内臓からの神経性情報および液性情報が最初に到達する中枢神経系領域である、延髄の孤束核と最後野に分布する神経線維に選択的に発現した。
- ・ 1 型 CCK 受容体は、迷走神経節神経節の VGluT2 陽性の一部のグルタミン酸作動性ニューロンに発現し、神経節除去により孤束核と最後野における発現分布は消失した。
- ・ 1 型 CCK 受容体は、消化管に副交感神経線維を投射する迷走神経背側運動核のアセチルコリン作動性ニューロンに発現し、この神経核に注入したトレーサーで標識される消化管神経線維にその免疫組織化学反応が観察された。
- ・ 消化管では、1 型 CCK 受容体は膵腺房細胞、胆嚢平滑筋、胃主細胞（ペプシノーゲン分泌細胞）、腸管筋間神経叢ニューロン、カハール間質細胞の

5 種類の細胞に選択的に発現した。また、腸管を走行する神経線維にも発現していた。

3) 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製はキメラマウスの段階まで来ており、平成25年度の研究推進により完成を目指している。

D. 考察

CCK1 受容体の特異抗体の作製に成功したことで、消化器系および消化器系と脳を結ぶ神経系に選択的な発現と分布をすることが明らかになってきた。今後、1型 CCK 受容体欠損マウスが完成したら、これらの反応が消失することで、反応特異性を確認する必要がある。

E. 結論

以上の結果より、1 型 CCK 受容体は消化管においては膵酵素分泌と胆汁分泌を促進する分子基盤と腸管運動を制御する分子基盤となる部位に、中枢ではその液性および神経性情報を延髄に伝達する分子基盤となる部位に、選択的に発現していることが明らかとなった。特に、求心性および遠心性の神経情報を運ぶ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と結論した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, Watanabe M: Cav2.1 in Cerebellar Purkinje Cells Regulates Competitive Excitatory Synaptic Wiring, Cell Survival, and Cerebellar Biochemical Compartmentalization. **J. Neurosci.** 32:1311-1328, 2012.
- ・ Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki Y, Yanagawa Y, Minami M, Watanabe M: Three types of neurochemical projection from the

bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. **J. Neurosci.**, 32:18035-18046, 2012.

・ Oshima S, Watanabe M: Elevated expression of calcineurin subunits during active mineralization of developing mouse molar teeth. **Eur J Oral Sci.** 120:386-394, 2012.

・ Iwakura A, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Watanabe M: Lack of molecular-anatomical evidence for GABAergic influence upon axon initial segment of cerebellar Purkinje cells by the pinceau formation. **J. Neurosci.** 32:9438-9448, 2012.

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