

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06746

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Elucidation of the basis for transmission of the cholecystokinin receptor CCK1R in the brain-gut correlation

研究代表者

今野 幸太郎 (konno, kohtarou)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：20599641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：消化管ホルモンであるコレシストキニン（CCK）は、迷走神経の求心性神経のCCK1受容体（CCK1R）を介して食後の摂食量減少に関与する。本研究は、マウス脳の迷走神経背側複合体（DVC）におけるCCK1Rの発現を詳細に検討した。CCK1Rの特異的な反応は、孤束核（NTS）と最後野（AP）に終末する迷走神経下神経節の中枢枝に多く認められた。また、NTSとAPにおけるCCK1R分布は、血管内に投与したエバンスブルー色素の拡散領域と重なっていた。以上の結果から、DVCのCCK1Rを介する神経活動は血液脳関門を欠くAPから拡散するホルモン性CCKによって制御されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在に至るまで「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た。CCK1Rの詳細な局在解析により、CCK1Rは延髄の迷走神経背側複合体に局在することが明らかとなった。さらに、血液脳関門を欠く最後野から拡散するホルモン性CCKによってDVCのCCK1Rを活性化する可能性が示唆されることから、CCKが関与する脳腸機能相関の情報伝達基盤の解明に大きく寄与する研究成果である。

研究成果の概要（英文）：Gut hormone cholecystokinin (CCK) mediates postprandial reduction of food intake by acting on CCK1 receptors (CCK1R) on vagal afferents. The present study examined CCK1R expression in the dorsal vagal complex (DVC) in the mouse brain. Specific immunohistochemical labeling for CCK1R was intense in the central branch of vagal afferents terminating in the nucleus tractus solitarius (NTS) and area postrema (AP). Moreover, CCK1R-immunoreactive elements in the NTS and AP were overlapped with diffusing areas of Evans Blue dye administered into the circulation. These results suggest the possibility of activation of CCK1R in the DVC by hormonal CCK diffusing from the AP lacking the blood-brain barrier.

研究分野：神経解剖学

キーワード：コレシストキニン CCK 脳腸相関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コレシストキニン (cholecystokinin: CCK) は管腔内の脂質やタンパク質の消化産物に対して十二指腸や空腸の内分泌細胞より分泌され、膵酵素の分泌や胆嚢収縮を促進させる働きを持つ (Liddle et al., 1985; Walsh, 1987)。また、CCK は胃酸分泌抑制や胃内容物排出抑制といった胃の機能をコントロールし、食後摂食量の減少に重要な役割を担っている (Gibbs et al., 1973; Hewson et al., 1988; Lin et al., 1992; Lloyd et al., 1992)。CCK 受容体は G タンパク質共役型受容体に属し、末梢組織に豊富な CCK1 受容体 (CCK1R, CCKAR) と中枢組織に豊富な CCK2 受容体 (CCK2R, CCKBR) の 2 種類が存在する。

末梢型の CCK1R は、脳においても視床下部室傍核や弓状核、延髄迷走神経背側運動核など摂食制御に深く関わる脳領域に mRNA の発現が報告されている (Honda et al., 1993)。CCK1R タンパクに関しては、延髄弧束核および血液脳関門を欠く脳室周囲器官の最後野において豊富な ^{125}I -CCK binding site が存在すること、CCK1R 選択的拮抗薬や迷走神経下神経節の切除術により弧束核および最後野における ^{125}I -CCK binding site は減少すること (Ladenheim et al., 1988)、弧束核および最後野に中枢枝を送る迷走神経下神経節細胞の 30% が CCK1R mRNA を発現することから (Widdop et al., 1994; Broberger C, et al., 2001)、弧束核や最後野における CCK1R タンパク局在は求心性迷走神経上に存在するのではないかと報告されている。またラットにおいて摂食あるいは CCK の腹腔内投与により、対象群では弧束核・最後野での c-fos 発現が上昇するのに対し、CCK1R 欠損ラットでは c-fos 発現の上昇が認められないことから (Glatzle et al., 2001)、弧束核や最後野は迷走神経背側運動核と共に迷走神経背側神経核複合体領域として摂食制御の統合中枢として機能することがこれまで示唆されている。しかしながら、タンパクレベルでの検出を行うための特異的抗体がないために、分子解剖学的基盤は未だ不明であり CCK1R を介する脳腸機能関連の伝達基盤と生理機能も不明である。

2. 研究の目的

これまで脳内における CCK1R の局在は間接的に報告されてきたが、特異的抗体がないために詳細な細胞局在は不明であった。本研究は、脳における CCK1R を介する脳腸機能関連の分子解剖学的基盤と生理機能の解明を目的とする。

3. 研究の方法

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以下の研究項目に焦点を当てて行う。

CCK1R の脳内分布および細胞局在を明らかにする。

まず始めに、申請者らが報告した高感度検出系の chromogenic *in situ* hybridization 法を用いて CCK1R mRNA 脳内発現マップを作製する。また、発現細胞の神経化学的特性を fluorescent *in situ* hybridization 法を用いて検出する。CCK1R タンパクの脳内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。

CCK1R 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弧束核および最後野における ^{251}I -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。続いて迷走下神経節に順行性トレーサーを注入し迷走神経背側神経核複合体領域における標識神経終末上に CCK1R の局在があるかどうかを検討する。

CCKの由来を明らかにする

CCK1R が局在する延髄最後野は血液脳関門が欠如する脳室周囲器官の1つであることから、神経性 CCK 終末由来のみならず血液中の CCK が漏出し作用することも考えられる。その可能性を検討するために、CCK と分子量が近いエバンスブルーを静脈投与し、エバンスブルーの漏出領域と CCK1R の分布を比較する。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. 研究成果

はじめに CCK1R mRNA の細胞発現を蛍光 *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内側領域のコリン作動性ニューロンに発現が認められた。続いて CCK1R の特異的抗体を用いて脳内分布を検討した。CCK1R の特異的な免疫反応は孤束核内側部および最後野で強く、孤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。CCK1R が豊富に認められる孤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 (VGluT2) 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。孤束核内側領域および最後野に中枢性投射線維を送る迷走神経下神経節において CCK1R mRNA およびタンパクの発現分布を蛍光 *in situ* hybridization 法および蛍光抗体法を用いて検討した結果、VGluT2 陽性グルタミン酸作動性神経節細胞に CCK1R mRNA の発現が認められ、VGluT2 陽性細胞の細胞体表面に CCK1R タンパクの強い局在が認められた。続いて、順行性神経トレーサーを迷走神経下神経節に注入し、迷走神経背側神経核複合体領域における迷走神経下神経節ニューロンの中枢枝の分布を検討した。順行性に標識された終末は両側の孤束核および最後野に認められたが、対側に比べ注入側の孤束核において数多くの標識終末が認められた。標識終末の神経化学的特性および標識終末上の CCK1R 局在を検討するために、CCK1R および VGluT2 の多重蛍光免疫染色を行った。その結果、順行性に標識された神経終末は VGluT2 陽性のグルタミン酸作動性神経終末であり、標識神経の終末近傍に数多くの CCK1R の免疫反応が認められた。また、片側の迷走神経下神経節を切断後、延髄孤束核において CCK1R および VGluT2 の蛍光免疫染色を行った結果、切断側の孤束核において CCK1R および VGluT2 の染色性は非切断側と比較して有意な低下が認められた。

最後に迷走神経背側神経核複合体領域における神経性 CCK 終末の分布を検討した。CCK-8 の抗体を用いて神経性 CCK 終末の分布を検討した結果、CCK-8 陽性終末は孤束核の外側領域や迷走神経背側運動核領域にまばらに認められ、CCK1R が豊富な孤束核内側領域や最後野には少ないことが明らかとなった。最後野は血液脳関門を欠く領域として知られており、CCK と分子量が近いエバンスブルーを静脈内投与すると、最後野だけではなく周囲の孤束核まで広がることを以前確認している。そこで、エバンスブルーの浸潤領域と CCK1R の分布領域を比較した結果、CCK1R が豊富な孤束核内側領域および最後野においてエバンスブルーの浸潤領域と一致することが明らかとなった。

以上の結果から、脳内において CCK1R タンパクは延髄孤束核内側部および最後野に強く

分布し、弧束核外側部や迷走神経背側運動核にまばらに分布することが明らかとなり、CCK1Rが介する情報伝達は血中のCCK及び神経性CCKによって制御されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Konno Kohtarou, Yamasaki Miwako, Miyazaki Taisuke, Watanabe Masahiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Glyoxal fixation: An approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adf7084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamauchi K, Okamoto S, Ishida Y, Konno K, Hoshino K, Furuta T, Takahashi M, Koike M, Isa K, Watanabe M, Isa T, Hioki H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Fluorochromized tyramide-glucose oxidase as a multiplex fluorescent tyramide signal amplification system for histochemical analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19085-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Y, Kadoya K, Terkawi MA, Endo T, Konno K, Watanabe M, Ichihara S, Hara A, Kaneko K, Iwasaki N, Ishijima M.	4. 巻 5
2. 論文標題 Neutrophils delay repair process in Wallerian degeneration by releasing NETs outside the parenchyma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202201399.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takamiya S, Kawabori M, Yamazaki K, Yamaguchi S, Tanimori A, Yamamoto K, Ohnishi S, Seki T, Konno K, Tha KK, Hashimoto D, Watanabe M, Houkin K, Fujimura M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Intravenous transplantation of amnion-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery and alleviates intestinal dysfunction after spinal cord injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0270606.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki T, Morimoto-Tomita M, Berthoux C, Konno K, Noam Y, Yamasaki T, Verhage M, Castillo PE, Watanabe M, Tomita S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Excitatory and inhibitory receptors utilize distinct post- and trans-synaptic mechanisms in vivo.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e59613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.59613.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今野幸太郎、山崎美和子、渡辺雅彦
2. 発表標題 Calleja島におけるNeurologin1の入力依存的局在特性
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今野幸太郎、渡辺雅彦
2. 発表標題 グルタミン酸受容体GluD1は高次脳機能領域に強く発現し、小脳では平行線維 - 介在細胞シナプスの形成に関与する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kotaro Konno, Kenji Sakimura, Michisuke Yuzaki, Masahiko Watanabe.
2. 発表標題 GluD1 interacts with Cbln1 to connect glutamatergic/cholinergic afferents from the parabrachial nucleus to the visual thalamus and superior colliculus.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 今野幸太郎、山崎美和子、渡辺雅彦
2. 発表標題 マウス脳におけるNeuroigin 1の発現および局在特性
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------