

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500411

研究課題名(和文) レプチン・メラノコルチン系摂食調節回路と迷走神経の連関を形態学的に解析する

研究課題名(英文) Morphological analysis for the relationship between the leptin-melanocortin control system and the vagus nerve in feeding.

研究代表者

津森 登志子 (Tsumori, Toshiko)

県立広島大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：30217377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：メラノコルチン4受容体(MC4R)がキイロルを果たすとされる中枢レプチン・メラノコルチン情報伝達系は、摂食行動やエネルギー消費のみならず、血糖値やインスリンの恒常性にも重要な役割を担っている。MC4Rプロモーターの支配下に緑色蛍光蛋白を発現する遺伝子導入マウスを用いて、研究代表者らは迷走神経背側運動核(DMV)が多数のMC4R発現ニューロンを含むこと、またこれらのニューロンの中に胃や十二指腸の壁内神経節あるいは膵内神経節のニューロンにシナプス形成するものを見いだした。これらのことから、MC4R発現DMVニューロンからの投射線維は胃腸や膵臓の機能調節に密接に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The central melanocortin system including melanocortin-4 receptor (MC4R) plays an important role not only in the control of feeding and energy expenditure but also in glucose/insulin homeostasis. Using a transgenic mouse model in which green fluorescent protein is produced under the control of the MC4R promoter, we found that the dorsal motor nucleus of the vagus nerve contains many MC4R-expressing neurons, some of which made synapses with the postganglionic cells in the intramural ganglia of the stomach and duodenum, as well as in the intrapancreatic ganglia. These results suggested that projection fibers from the MC4R-expressing DMV neurons to the enteric and intrapancreatic ganglia may be closely related to the control of gastrointestinal and pancreatic functions.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：メラノコルチン4受容体 摂食行動 エネルギーバランス 迷走神経背側運動核 迷走神経 膵内神経節 壁内神経節 遺伝子導入マウス

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞から内分泌されるレプチンが中枢神経系を介して食行動やエネルギーバランスを調節するという「中枢レプチン・メラノコルチン調節機構」が提唱されてきた(Elmqvist et al. 1999)。末梢からのレプチン情報は、血液を介して視床下部に存在するレプチン受容体発現ニューロンに伝えられ、そこからさらに脳内に広く分布するメラノコルチン4受容体(MC4-R)発現ニューロンに情報伝達されるという(Kishi et al. 2003; Liu et al. 2003)。MC4-Rを介する情報伝達系が遮断されると、過食、肥満、高血糖などが惹起されることから(Huszar et al. 1997)、MC4-Rはレプチン・メラノコルチン調節回路におけるキイロールを果たすと言われている。一方、脳内のMC4-R発現ニューロンの投射経路に関する解析はほとんど行われておらず、先行する薬理的あるいは分子遺伝学的な所見を支持するに足る形態学的基盤は未だ築かれていない。

申請者の所属講座では、MC4-Rプロモーターの支配下に緑色蛍光蛋白(GFP)を発現する遺伝子導入マウス(MC4-R/GFPマウス)を系統維持している(作製者のロックフェラー大学・フリードマン博士より提供)。申請者はこのマウスの脳内におけるMC4-R強発現部位の一つ、延髄の迷走神経背側運動核(DMV)に着目した。DMVは腹部内臓への副交感神経節前線維の起始核であり、上部消化管や膵臓投射ニューロンがMC4-Rを発現する可能性が高い。よって、本研究ではレプチン・メラノコルチンエネルギー摂食調節系が、迷走神経を介して消化管運動や膵血糖調節に関与する経路を形態学的観点から解明するため、DMVのMC4-R発現節前ニューロンと臓器内の節後ニューロンとの連絡様式について、光顕的および電顕的に詳細な解析を行うことにした。

2. 研究の目的

摂食行動の調節に重要な役割を担うとされる中枢レプチン・メラノコルチン情報伝達系が、上部消化管の運動や膵血糖調節機構に如何に関与するかについて、延髄から迷走神経を経由して上部消化管や膵臓に至るまでのニューロン連鎖を、メラノコルチン4受容体(MC4-R)のレポーターマウスを用いた神経路標識法により形態学的に明らかにする。

3. 研究の方法

MC4-R/GFPマウスを用いて、DMVのMC4-R発現(GFP免疫陽性)ニューロンのうち、

胃・十二指腸・膵臓投射ニューロンの分布様態と、各臓器内でDMV由来のGFP免疫陽性神経線維終末と節後ニューロンとの接合様態を解析する。これらの解析手法として、順行性または逆行性標識法に免疫組織化学的手法を組み合わせた多重標識法を用い、共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡下で観察および形態学的解析を行う。

(1) DMVにおけるGFP免疫陽性/臓器投射ニューロンの分布

① MC4-R/GFPマウスの胃体部に、逆行性標識物質であるコレラトキシンBサブユニット(CTb)を圧注入し、注入1週間経過後に4%パラホルムアルデヒドと0.2%ピクリン酸の混合液で灌流固定し、脳を摘出する。凍結ミクロトームを用いてDMVを含む延髄領域を30μmの前頭断切片とする。

抗CTb抗体とAlexa546標識二次抗体、抗GFP抗体とAlexa488標識二次抗体の組み合わせを用いて蛍光二重免疫染色を行い、CTb標識ニューロンとGFP免疫陽性ニューロンを可視化する。

共焦点レーザー顕微鏡を用いてDMVでのCTb標識/GFP免疫陽性ニューロンの分布を解析する。

十二指腸と膵臓についても上記と同様に行う。

GFP陽性を示すそれぞれの臓器投射ニューロンの分布領域と分布数を比較検討する。

(2) 臓器内における迷走神経由来GFP陽性線維の分布と節後ニューロンとの連絡

① MC4-R/GFPマウスを迷走神経切断群と対照群に分け、術後10日経過したものを上記と同様に灌流固定し、胃から十二指腸まで膵臓とともに摘出する。

摘出臓器はクライオスタットを用いて15μmの前頭断連続切片を作成する一方、一部の胃・十二指腸についてはwhole-mount標本を作成する。

臓器内のGFP免疫陽性線維を抗GFP抗体とAlexa488標識二次抗体の組み合わせを用いて可視化すると同時に、抗neuron specific enolase(NSE)とAlexa546標識二次抗体を用いて、胃・十二指腸の壁内神経節や膵内神経節も可視化する。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、各臓器内のGFP免疫陽性線維終末とNSE免疫陽性ニューロンとの接合様態を観察し、迷走神経切断群と対照群との間で比較解析する。

(3) GFP陽性/DMVニューロンの軸索終末と臓器内節後ニューロンとの連絡

① MC4-R/GFPマウスを4%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタルアルデヒドおよび0.2%

ピクリン酸の混合液で灌流固定し、臓器(胃・十二指腸・膵臓)を摘出する。

胃・十二指腸については whole-mount 標本を作成し、膵臓は臓器の凍結切片を作成してスライドガラスに貼付ける。

GFP 陽性終末を ABC 法で可視化した後、光顕下で観察して視野選択を行う。

常法通りオスミウム酸後固定、脱水、エポキシ樹脂浸透を行い、包埋する。

超薄切片作製後、GFP 免疫陽性線維終末と NOS 免疫陽性ニューロンとのシナプス構築を電顕下で解析する。

4. 研究成果

(1) メラノコルチン 4 受容体 (MC4-R) プロモーターの支配下に緑色蛍光蛋白 (GFP) を発現する遺伝子導入マウス (MC4-R/GFPマウス) を用いて、腹部内臓への副交感神経節前線維の起始核である延髄の迷走神経背側運動核 (DMV) が MC4-R を発現する上部消化管あるいは膵臓投射ニューロンを含むかどうかを、逆行性標識法と免疫組織化学的手法を組み合わせ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。その結果、DMV に含まれる胃・十二指腸・膵臓投射ニューロンのそれぞれ約半数近くが MC4-R を発現することが明らかになった。各臓器内においては、胃・十二指腸の筋叢間神経叢の神経節、あるいは膵内神経節の節後ニューロン周囲に、多数の GFP 陽性軸索終末 (すなわち、MC4R を発現するニューロンの軸索終末) が接着しているのが認められた。これらの GFP 陽性軸索終末は、横隔膜直下で両側の迷走神経を切断して 10 日経過した動物ではほとんど消失していたことから、迷走神経由来であることが確認された。さらに、pre-embedding 法を用いて電子顕微鏡下で観察すると、迷走神経由来の GFP 陽性軸索終末は壁内神経節あるいは膵内神経節ニューロンとシナプス形成していることが明らかになった。膵組織内に MC4-R 発現 DMV ニューロンからの線維が分布すること、またそれらが膵内神経節ニューロンとシナプス形成することはこれまで報告がなく、本研究で初めて明らかにした。

(2) 胃・十二指腸・膵臓内に分布する GFP 陽性軸索終末は、臓器内の神経節のみならず胃・十二指腸の粘膜上皮下あるいは膵臓のランゲルハンス島内にも観察されたことから、迷走神経節状神経節由来の求心性線維の可能性が推察された。よって、逆行性標識法と免疫組織化学的手法を組み合わせ共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した結果、迷走神経節状神経節の胃・十二指腸・膵臓投射ニューロンのそれぞれ一部が GFP 陽性を示すことが明らかになった。膵臓内に分布する GFP

陽性軸索終末の由来とそのシナプス後要素について逆行性標識法と免疫組織化学的手法の併用により解析したと膵臓内に分布する GFP 陽性線維は迷走神経由来であることが判明したため、膵臓内の GFP 陽性線維は迷走神経節状神経節由来であることが予想された。よって、逆行性標識物質としてコレラトキシン B サブユニット (CTb) を膵臓内に注入し、迷走神経節状神経節内での GFP 陽性かつ CTb で標識されるニューロンを検索した結果、CTb 標識ニューロンのうち約 25% が GFP 陽性であることが明らかになった。これらの CTb/GFP 陽性ニューロンは一般に小型で、神経節内ではより尾側方に位置していた。一方、膵臓内での GFP 陽性線維は明瞭な念珠状の軸索終末様構造を形成しながら膵臓辺縁部のみならず膵臓中心部にも分布していた。膵臓内での GFP 陽性線維のターゲットを調べるために膵臓細胞のマーカー (A 細胞: グルカゴン、B 細胞: インシュリン、D 細胞: ソマトスタチン) を用いた二重蛍光標識法を行うと、GFP 陽性線維は膵臓辺縁部では A 細胞や D 細胞に、膵臓中心部では B 細胞に接着していることが明らかになった。さらに pre-embedding 法を用いて膵臓内での GFP 陽性軸索終末部を電顕下で観察すると、これらの軸索終末部は腺細胞に直接接していることが明らかになった。膵臓腺細胞に MC4-R 発現 DMV ニューロン由来の神経終末がシナプス形成することはこれまで報告がなく、本研究で初めて明らかにした成果である。

(3) 迷走神経節状神経節に含まれる MC4-R 発現ニューロン (GFP 陽性ニューロン) からの軸索終末が、胃・十二指腸の粘膜内でどのように分布し、何をターゲットにしているのかを共焦点レーザー顕微鏡を用いて検索した。その結果、特に胃の幽門部から十二指腸近位部の粘膜において、GFP 陽性線維が明瞭な念珠状の軸索終末様構造を形成しながら多数分布していることが明らかになった。またそれらの終末部の中には、粘膜上皮の基底部に近接して存在するものが見られた。これらの結果から、胃・十二指腸からの求心性線維には、MC4-R を発現する迷走神経節状神経節ニューロン由来のものが含まれ、MC4-R を発現する迷走神経背側運動核ニューロン由来の節前線維の存在と併せて、消化管運動制御におけるメラノコルチン制御系の密接な関わりが示唆された。

(4) 当初の計画にはなかったが、MC4-R/GFP マウスを使用した予備実験により、迷走神経節状神経節以外の脳神経付随神経節にも GFP 発現ニューロンが存在すること、弧束核には豊富な GFP 陽性線維終末が存在すること、舌の

味蕾には豊富なGFP陽性線維終末が存在することが明らかになったことから、本研究のテーマを発展させて味覚の情報伝達に関わる神経路とメラノコルチン摂食調節系との関連についても調べた。その結果、MC4-R/GFPマウス舌内の有郭乳頭と茸状乳頭内の味蕾内線維は、それぞれ錐体神経節および膝神経節内のGFP陽性ニューロン由来であることが、逆行性標識法により明らかになった。これらのことから、MC4-R発現ニューロン由来の味蕾内線維は、味細胞における味覚の感受調節に関わる可能性が推察されることを初めて明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

① Tsumori Toshiko, Oka Tatsuro, Yokota Shigefumi, Niu Jian-Guo, Yasui Yukihiro, Intrapaneatic ganglia neurons receive projection fibers from melanocortin-4 receptor-expressing neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve of the mouse, Brain Research, 査読あり, 1537:132-142.
DOI: 10.1016/j.brainres.2013.09.002.

[学会発表](計 7 件)

① 津森登志子, 岡 達郎, 横田茂文, 安井幸彦, Melanocortin-4 receptor expressing neurons in the geniculate and petrosal ganglia send their fibers to the tongue taste bud cells. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014年3月29日, 自治医科大学キャンパス(下野市)

津森登志子, 岡 達郎, 牛 建国, 安井幸彦, Tongue taste buds receive nerve terminals originating from melanocortin-4 receptor expressing neurons in the mouse geniculate and petrosal ganglia. 第36回日本神経科学大会, 2013年6月20日, 国立京都国際会館(京都市)

津森登志子, 岡 達郎, 横田茂文, 安井幸彦, Pancreatic islets cells receive axon terminals from melanocortin-4 receptor-expressing nodose ganglion cells in the mouse. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013年3月28日, サポートホール高松・かがわ国際会議場(高松市)

津森登志子, 岡 達郎, 牛 建国, 安井幸彦, Axon terminals originating from

melanocortin-4 receptor-expressing nodose ganglion cells form synapses with pancreatic endocrine cells in the mouse. 第35回日本神経科学大会, 2012年09月18日, 名古屋国際会議場(名古屋市)

津森登志子, 岡 達郎, 牛 建国, 安井幸彦, Nodose ganglion cells expressing melanocortin-4 receptor send their fibers to the pancreatic islets in the mouse. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012年3月27日, 山梨大学甲府キャンパス(甲府市)

津森登志子, 岡 達郎, 牛 建国, 安井幸彦, Melanocortin-4 receptor-expressing neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve and nodose ganglia send their fibers to the pancreas in the mouse. 日本解剖学会 第66回中国・四国支部学術集会, 2011年11月13日, 徳島大学蔵本キャンパス(徳島市)

津森登志子, 岡 達郎, 牛 建国, 安井幸彦, Synaptic organization between melanocortin-4 receptor-expressing neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve and enteric ganglia neurons in the mouse. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月15日, 横浜パシフィコ(横浜市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

津森登志子 (TSUMORI, Toshiko)

県立広島大学・保健福祉学部看護学科・教授

研究者番号：30217377

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし