

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659091

研究課題名(和文) マウス迷走神経終末を順行性に標識できる手法の確立 隠れ糖尿病発症機構の解明

研究課題名(英文) The establishment of anterograde tracing label of vagus nerve terminal in mice.-Resolution of the onset of hiding diabetes-

研究代表者

舟橋 久幸 (Funahashi, Hisayuki)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：20317514

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)：研究目的は、隠れ糖尿病の発症機構の解明である。インスリン分泌の調節因子として4型メラノコルチン受容体(MC4-R)が注目されている。MC4-R GFPマウスの形態学的な解析より、MC4-R発現神経が延髄迷走神経背側運動核から、直接、膵細胞へ投射し、インスリン分泌を調節している可能性が示唆された。そこで、マウス迷走神経終末を順行性に、効率良く標識する方法を検討した。その結果、高輝度蛍光物質を標識した順行性トレーサーとIVIS Imaging systemを併用すれば、検討時間の節約ばかりか、実験動物の削減をももたらす可能性が出てきた。トレーサーの使用条件は決定していなく、今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：The goal the present study is to clarify the onset mechanism of the hiding diabetes. Melanocortin-4 receptor(MC4-R) has been noticed as critical regulator of insulin secretion. Morphological and histochemical analysis on MC4-R GFP mice indicates that the possibilities that the DMV neurons directly project to B cell in the pancreas. The method to efficiently label the vagus nerve terminals with anterograde tracer has been examined. The interesting combination of the tracer conjugated with special fluorescence agent and high sensible detector "IVIS Imaging system" may produce not only time-saving of the work but also decrease of a number of mice sacrificed has been found. The working condition of the tracer is problem to be solved in the future.

研究分野：組織学

キーワード：神経標識

1. 研究開始当初の背景

近年増加傾向にある「隠れ糖尿病」の発症機構の解明が最終的な研究目的である。「隠れ糖尿病」は、空腹時の血糖値は正常でも食後の血糖値が正常よりも上昇する病態で、糖尿病に移行する可能性が高く、「初期の耐糖能異常症」に位置づけられ、また、食後の血糖上昇に応じた「瞬時のインスリン分泌」不足が原因と考えられている (Metabolism, 36:721, 1987)。その「耐糖能の低下」は迷走神経の切除により惹起されることが報告されているが、発症機構については、不明な点が多い (Endocrinology, 125:2400, 1989)。

最近、インスリン分泌の調節因子として 4 型メラノコルチン受容体 (MC4-R: melanocortin-4 receptor) が注目されている。中枢神経系では、主に、視床下部の弓状核に分布しているメラニン細胞刺激ホルモン (-MSH: -melanocyte stimulating hormone) の強力な食欲抑制作用を媒介する主たる受容体分子である。私は、当時、この受容体の局在を可視化する GFP マウスを用いた形態学的な解析から、以下の結果を得ていた。

(1) 抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色の結果、MC4-R 含有神経線維らしき線維状構造物の存在が、膵島に多数認められた。しかしながら、MC4-R 含有の神経細胞体はほとんど認められなかった。

(2) 抗 GFP 抗体と、副交感神経の神経伝達物質の関連物質として末梢神経系で同定されている VACht (Vesicular acetylcholine transporter) の特異抗体を用いた 2 重免疫染色の結果、膵島の MC4-R 含有神経線維には VACht の共存が認められた。

(3) 抗 GFP 抗体と抗インスリン抗体を用いた 2 重免疫染色の結果、MC4-R 含有の神経線維およびその終末らしき部位が膵細胞 (インスリン分泌細胞) に近接している様子が観察された。

(4) 抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色の結果、MC4-R 含有神経細胞が延髄の迷走神経背側運動核 (DMV: dorsal motor nucleus of the vagus) に多数認められた。

(5) (2) で用いた抗 VACht 抗体を用いた免疫染色の結果、延髄 DMV の多数の神経細胞体に陽性反応が認められた。

上記の結果と、膵島には副交感神経線維が非常に多い、との報告 (J Histochem Cytochem, 23:645, 1975) があることから、MC4-R 発現神経が延髄の上記 DMV を起始し、直接、膵β細胞へ投射し、インスリン分泌を瞬時に調節している可能性が浮上した。

2. 研究の目的

マウス迷走神経終末を順行性に標識できる手法を確立する。

また、膵島に観察される MC4-R 発現神経線維が DMV から直接膵β細胞へ投射しているのか (I)、別な神経回路 (下記 II、III、IV) を介してβ細胞へ投射しているのかを明らかにする。

II: 延髄 DMV からの節前神経も節後神経も MC4-R を発現している。

III: 上記節前神経は MC4-R を発現しているが、節後神経は MC4-R を発現していない。

IV: 上記節前神経は MC4-R を発現していないが、節後神経は MC4-R を発現している。

さらに、上記の実験において見出された神経回路の興奮伝導速度と情報伝達様式に関わる性質を解剖学的に明らかにする。

今回、こうした MC4-R 発現神経を介する神経回路の解明こそが「隠れ糖尿病」の発症機構の解明につながるものと考えられた。

3. 研究の方法

野生型マウス (C57BL/6) を材料として、順行性トレーサーの使用条件及び検出方法について計画した。順行性トレーサーには、幾種類か候補があったが、中でも特に、扱いがしやすいと考えられる Biotinylated Dextran Amine (BDA) を用いた。また、その順行性トレーサーの注入には、延髄の DMV におこなうマウスと視床下部の背内側核 dorsal medial hypothalamus (DMH) におこなうマウスを用意した。一般的に、順行性トレーサーを末梢神経系で用いた報告はほとんどみられないのに対し、中枢神経系では成功例が多数報告されていることから、視床下部 DMH へ注入した場合の BDA の到達部位は中枢神経系にとどまる可能性が高いので、BDA の検出をおこなうための組織化学的な方法の陽性コントロールとなりうる (もっとも、延髄の注入部位における BDA の検出も陽性コントロールとなりうる可能性はあるが、念のために用意した。)。BDA の注入には、組織へのダメージがより少ないと考えられる電気泳動的な注入方法を選択した。

まず、マウスを ketamin HCl/xylazine HCl (40:5mg/kg) による全身麻酔下で、脳定位固定装置を用い、次いで、イヤーパーを通して頭部左右を固定し、さらに、頭部前方は、上顎骨の上からと、上顎骨と下顎骨の間から挟むように固定した。次に、マウスの尾を強くつまんでも特に反応がみられないことを確認して後、頭頂部の毛をバリカンで剃り、頭皮をメスで露出し、マウス脳のマップを参考にし

ながら頭蓋骨の該当位置にドリルで穴を空け、予め BDA を充填させた内径 1.2mm の硝子チューブを、DMH を目指して挿入した。電流値は 5 μ A に設定し、その注入時間 (20 分間) は、電流値が 0~5 μ A の間を触れ続けていることを確認した。

また、DMV への注入では、DMH への注入と同様、まず、マウス頭部を全身麻酔下で脳固定装置のイヤーパーで頭部の左右を固定して、次に、その頸部を大きく内側に曲げ、額を前方からしっかり押さえて固定した。次に、頭部と頸部の境界辺りの毛をバリカンで剃り、その辺りの皮膚にメスで割を入れ、その奥の筋肉を加熱したピンセットを用いて止血をしながら取り除いた。そして、その深部に、菱形窩の CS: Calamus scriptorius を露出し、脳脊髄液を吸い取りながら、その左右のどちらか 0.2mm の位置に、BDA を充填させた硝子チューブをあて、さらに、その表面から下へ 0.1mm 挿入し、DMH の場合と同様の設定で BDA を電気泳動的に注入した。

DMH や DMV への BDA 注入直後、頭頸部の傷口は、ステンレスのクリップで塞いで消毒した後、flunixin (2mg/kg) を皮下投与した。

BDA を注入して 2 週間の生存期間の後、マウスを chloral hydrate (500mg/kg) による全身麻酔下で、心臓より生理食塩水を灌流の後、10% 中性ホルマリン溶液で灌流固定をおこなった。摘出した脳と腭臓は、同固定液中 (4) でさらに 4 時間固定をおこない、次に、20% ショ糖を含むリン酸塩緩衝液 (PBS) 中 (4) に移し、一晚振盪後、脳はドライアイスアセトンで凍結し、腭臓は OCT compound (凍結用包埋剤) に凍結包埋した。脳および腭臓の、厚さ 25 μ m の凍結切片を作製した。それぞれ、ブロッキング (0.3% 過酸化水素水/PBS で 30 分間、さらに、3% Normal donkey serum (NDS) + 0.25% Triton-X (TX) /PBS で常温、1 時間) をおこなってから、peroxidase 標識の Avidin と biotin の複合体を作製し、それを切片に 5 分間反応させた後、そこに、基質として、0.1% の過酸化水素水と 3% の diaminobenzidine (DAB) を加え、BDA の存在部位を標識し、脱水および封入後、光学顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

視床下部の背内側核 DMH に BDA を注入したマウスの、DMH における神経細胞体と神経線維に DAB 沈着が認められた他、視床下部室傍核 (PVH: paraventricular nucleus hypothalamus) における神経線維に、多数の DAB 陽性反応産物が検出された。これは、すでに報告のある、DMH

から PVH への神経投射の存在を示すものである。

一方、延髄 DMV に BDA を注入したマウスの DMV では、多数の神経細胞体と神経線維に DAB の沈着が認められた。

しかしながら、延髄 DMV に BDA を注入したマウスの腭臓には、BDA の存在を示す DAB の沈着は認められなかった。

そこで、次に、酵素標識法による DAB の発色反応よりも検出感度が高いとされる蛍光標識法による検出を試みた。蛍光色素には、輝度が高く非特異的な反応が出にくいとされる Cy3 を用いた。延髄 DMV における注入部位が正しいことの確認がとれている個体の腭臓切片を用いた。3% NDS と 0.25% TX を含む PBS でブロッキングを常温、1 時間おこなってから、Cy3 標識の streptavidin を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。しかしながら、DAB の発色反応による酵素標識法の場合と同様、腭臓には、BDA の存在を示す Cy3 の蛍光標識は認められなかった。

上記の染色結果は、BDA の組織化学的な検出方法には問題がないこと、また、BDA が延髄 DMV へは正しく注入されていること、さらに、BDA が順行性トレーサーとして脳においては正常にワークしていること、を示している。一方、問題点としては、腭臓のような末梢器官へはトレースの距離が長いため、さらなる長期の生存時間を要する可能性が考えられた。ただ、従来の方法では、最適の生存時間を決定するにも十分な根拠のないままとりあえず適当に設定せざるを得なく、また、マウスなどの実験動物を犠牲にし、ホルマリンなどで化学固定をおこない、その組織切片上で注入トレーサーに対する抗体などを用いて組織化学的な作業を施さなければ、注入物質の末梢器官への到達の有無や存在部位を知ることはできないのである。しかしながら、実際、このような作業をその都度繰り返しおこなうことは如何にも非効率的に感じられた。

そこで、こうしたトレーサー注入後の生存時間の決定に要する時間と労力の無駄や動物の犠牲を減らすための方法がないものか、と検討を試みた。

その結果、マウスを生きたまま、順行性の標識トレーサーの存在部位を可視化することの可能な方法を見出すに至った。その方法とは、PerkinElmer 社の IVIS Imaging System である。この新型機器は非常に高感度であり、マウスの体内に存在している蛍光物質の存在を検出することができる。そのためには、予め、体内へ注入するトレーサーに高輝度の標識物質を結合させておくことが必須であるが、そのための、高輝度標識物質 (実際、ヒトの手の指でも十分に透過

することほどの輝度がある。)も、また、この物質をトレーサーに結合させるためのキットも販売されていることを知った。この方法によれば、注入トレーサーが目的とする内臓へ到達していることを確認した後から動物を解剖し、必要な解析を進めることが可能となる。トレーサーの生存時間の最適条件の決定のための方法が格段に改善されるばかりでなく、使用するマウスの匹数を大幅に減少させることが可能になると思われる。このように、調査の結果、現在のところ、こうした効率的な方法は見出したものの、残念ながら、注入トレーサーの最適条件の決定には至っていないため、マウス迷走神経終末を順行性に標識する手法は確立できていない。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明:

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

舟橋 久幸 (FUNAHASHI, Hisayuki)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号: 20317514

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: