

体内時計機構におけるcholecystokinin-1受容体の関与

山川, 裕介

<https://hdl.handle.net/2324/2236173>

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (臨床薬学) , 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏名	山川 裕介
論文名	体内時計機構における cholecystokinin-1 受容体の関与
論文調査委員	主査 島添 隆雄 副査 松永 直哉 副査 齊藤 秀俊 副査 小林 大介

論文審査の結果の要旨

【目的】

本研究では、中枢神経系で働く重要な神経伝達ペプチドの一つである cholecystokinin (CCK)-1 受容体に注目した。第1章では、CCK-1受容体の光同調への関与について、光受容器である網膜に着目して検討を行った。第2章では、網膜以外のCCK-1受容体の関与について、SCNやメラトニンシグナルについて検討を行った。

【方法】

CCK-1 受容体 KO マウスは九州がんセンターの瀧口聡一博士より供与を受けた。実験には野生型マウスおよびCCK-1受容体KOマウス雄性の2-6ヶ月齢のものを用いた。恒温部屋、自由摂食摂水、12:12明暗周期条件下で1~2週間単独で飼育し、周辺環境への同調を完了させた。本実験は九州大学動物実験規則を遵守して行った。

Applied Biosystems® 7500 リアルタイム PCR を用いてリアルタイム RT-PCR で *Cck1r* 及び時計遺伝子 *Per1/Per2* の定量を行った。また、*Per2* 遺伝子の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウスから単離し株化した PER2::LUC アストロサイトを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

個別に飼育し明暗環境に同調させた CCK-1 受容体 KO および WT マウスを、実験開始当日 (day1) に新規明暗環境として明暗周期を6時間前進させた。一日後 (day2)、新規環境の暗期開始直後 (ZT12) に WT マウスに対しては saline または lorglumide を体重あたり 0.2 mg/kg で、KO マウスに対しては saline を腹腔内投与した。30分後、0.5% CMC 水溶液 (VEH) または ramelteon (RAM) を体重あたり 0.1 mg/kg で経口投与した。前日と比較して行動開始時点の時間のずれが30分以内である状態が三日以上続けて認められたとき、行動位相の同調が完了したものと定義して明暗周期の変更から同調完了までの日数を測定した。

日内変動の解析のため、コサイナー法解析を cosinor program (by Refinetti, <http://www.circadian.org/software.html>) を用いて行い、 $P < 0.05$ にて有意な日内変動があるとした。各値は野生型マウスの ZT2 の値を基準 (1.0) として示した。

光照射による変動は同一遺伝子群において、照射 vs 非照射の対応のない t 検定にて行い、 $P < 0.05$ にて有意な差があるとみなした。解析には JMP pro 11 (SAS Institute) を用いた。

【結果】

第1章では、CCK-1受容体の欠損による時間生物学的な影響を調べるべく、WT および KO マウスの網膜における時計遺伝子 *Per1*、*Per2* の発現の日内変動を比較検討した。WT マウスにおいて、*Per1*、*Per2* ともに有意な日内変動を示し、夜間の発現が上昇していたのに対し、KO マウスにおいてはどちらも統計学的に有意な日内変動を示さなかった。また、PER2::LUC 導入マウスのアストロサイトに対し、CCK受容体アナログである CCK-8s を投与した群では経時的なルシフェラーゼ活性の上昇が検出された。一方で、lorglumide 群においては経時的なルシフェラーゼ活性の低下が検出され、反応後3、4時間においては DMSO 群に比べて有意な活性の低下が認められた。

また第2章では、WTのsaline前投薬群においては、VEH群に比べ、RAM群で投与後2日後まで行動開始時点の前進が大きい傾向にあった。また、再同調完了日までの日数はRAM群が有意に短かった。一方でWTのlorglumide前投与群における投与では、RAM群での行動開始時点の前進が抑えられ、再同調までの日数に有意な差はなかった。また、KOマウスでもlorglumide投与と同様に有意差は認められなかった。

【考察】

第1章の結果から、CCK-1受容体KOマウスは網膜の時計遺伝子Per1/Per2のmRNAの発現に日内変動が認められなくなっていた。今回の試験において、時計遺伝子の発現が完全に消失したわけではなく、リズムの消失も網膜でのみの確認であったが、我々が以前報告したようにCCK-1受容体KOマウスにおいて瞳孔反射の光応答が減弱したのはこの網膜の概日リズムが弱まったためだと考えられる。PER2::LUC導入マウスのアストロサイトの結果から、CCK-1受容体の発現が増加して刺激が増えるのに続いてPer2の発現が増加するという関係が生体内でも存在し、時間生物学的環境の維持に関与していることが示唆された。

第2章の結果、RAMの再同調促進作用は、CCK-1受容体の遮断や欠損により減弱することが明らかとなった。しかし、より詳細な検討の結果、SCNにおけるMT1受容体の発現はむしろ増加しており、下流に位置するpCREBの発現は低下していた。このことから、網膜における光受容への関与以外にもCCK-1受容体が体内時計の調節に関与していることが示唆された。

本研究の成果がCCK-1受容体に関する機能的役割の解明の契機となり、体内時計機構の解明の一助となることが期待される。

本研究で得られた内容および結果は、博士（臨床薬学）に値すると認める。