

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 :

体内時計機構における cholecystinin-1 受容体の関与

(分野名) 臨床育薬学分野 (氏名) 山川 裕介

【目的】

体内時計の自律的なリズムの周期は正確に 24 時間ではないため、生物は外環境との時間差を同調機能によって日々補正している。この同調に関わる因子の中でも光はほぼ全ての生物における最も強い因子である。光により惹起される生体リズムの位相変化には時刻依存性があることが知られている。しかし、この時刻依存性を作り出している生理的な機序は未だ明らかでない。

一方、Cholecystinin(CCK)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り、大脳皮質、視床下部、脳幹などに存在する。げっ歯類においてCCKがSCNに分布していることが報告されている。加えて、網膜においてもCCKが存在しており、ラットにおいてアマクリン細胞上に存在するという報告がある。CCKの受容体にはCCK-1(A)、CCK-2(B)の2種類が知られているが、CCK-1受容体遺伝子特異的欠損型マウスを用いて同様の検討をしたところ、光刺激による行動リズムの位相変化や時計遺伝子の発現促進の減弱、瞳孔反射の低下が認められた¹。この研究において、機能的なCCK-1受容体の発現を検討し、SCNよりも網膜における発現が多いことも明らかとなった。すなわち、光同調への関与という点では、中枢であるSCNではなく、光を受容する網膜での役割が重要であることが示唆されている。しかし、詳細な関与の経路やメカニズムについては未だ明らかになっていない。そこで本研究では、第1章において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。

また、第2章において網膜以外のCCK-1受容体の関与について、SCNやメラトニンシグナルに着目し、検討を行った。

また、Ca²⁺結合タンパク質の一つであるCalbindin(CalB)は、主SCN内にも存在しており、欠損によりSCNの時計遺伝子の日内変動や光刺激による最初期遺伝子 fos の発現に影響が出るなど、体内時計機構に関与することが報告されている。CalBは線維に沿った移動により、背内側部のVP細胞との共発現にも日内変動を示すことが報告されており、SCN内の細胞間ネットワークを構築する重要な役割を持つと考えられる。

一方、概日リズムの周辺環境への同調には、光刺激を伝達する網膜視床下部路を介した光同調および温度や食餌、運動による刺激を介した非光同調があることが知られている。非光同調の強力な因子のひとつとしてメラトニンの存在が挙げられる。メラトニン受容体はMT₁、MT₂、MT₃に分類され、それぞれの受容体が全身の様々な臓器に発現し、異なった役割を担っている。中でも睡眠に関与するMT₁やSCNにおける神経発火リズムの位相を変化させるMT₂受容体が体内時計の調節に関わっているとされている。

Ramelteon (RAM) はメラトニンMT₁、MT₂受容体の特異的アゴニストであり、不眠症における入眠困難の改善に用いられている。臨床においてRAMは就寝前に服用されているが、RAMにも体内時計の位相調節作用があり、かつ服用時点によってその効果が違いを示すことが分かっている(Oliver et al., 2011)。

これは、体内時計の位相調節作用を持つ SCN 中のメラトニン受容体の発現に日内変動があることに起因すると考えられている。メラトニンシグナルと CCK-1 受容体の関与は未だ明らかではない。

そこで第 2 章においては、網膜以外に発現する CCK-1 受容体の体内時計機構への関与を評価した。第 1 節では、SCN における Ca1B 陽性線維の伸長に CCK-1 受容体の欠損が影響するか否かについて検討した。また、第 2 節では、RAM の投与時点を新規明暗環境下の暗記開始時点に定め、再同調機能に与える影響の評価を通じ、メラトニンシグナルと CCK-1 受容体シグナルとの関係を再同調促進作用の観点から検討を行った。

【方法】

実験動物

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、雌雄の交配による繁殖にて産生し、遺伝子型の判定を行った後に実験に用いた。このマウスはマウス CCK-1 受容体の exon1, exon2 を neo 耐性遺伝子および *lacZ* 遺伝子カセットで置換されている。野生型マウスは日本チャールズリバーより雌雄を購入し、KO マウスと同一条件下で繁殖させた。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。23±2°C の恒温部屋、自由摂食摂水、明期 100 lux、暗期 <1 lux の 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。暗期における作業は赤色光下で行った。本実験は九州大学動物実験規則を遵守して行った。

Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、速やかに脳および網膜を摘出した。脳はブレインマトリックス (MBS-S1C、ブレインサイエンス・イデア) を用いて coronal に 1 mm 厚で薄切り後、解剖用メスにて SCN を含む領域を 1 mm³ のブロックで回収した。ホモジナイズを行い、RNeasy Mini Kit (Qiagen) の公式プロトコルの手順に従い、total RNA の抽出を行った。Total RNA は 260/280 nm の吸光度比を 1.8-2.0 であることにより純度を確認し、Experion (Bio Rad) による電気泳動法にて rRNA のバンド比により品質を確認後、次の工程に進めた。SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用い、200 ng の total RNA に対し、公式のプロトコルに従って逆転写を行った。すぐに次の行程に移らない場合は -20°C で冷凍保存し、使用直前に氷上で融解させた。Applied Biosystems® 7500 リアルタイム PCR を用いてリアルタイム RT-PCR で *Cckar* 及び時計遺伝子 *Per1/Per2* の定量を行った。

ルシフェラーゼアッセイ

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了。細胞を 35mm dish に 1×10⁶ cells/ml、ルシフェリン (100 nM) 入り phenol red 不含 DMEM 培地中に播種し、24 時間後に、CCK 受容体アナログである CCK-8s (300 nM) および CCK-1 受容体遮断薬である lorglumide (300 nM) を投与し、1 時間ごとにルミサイクルによりルシフェラーゼ活性を測定した。

また、上記同条件で PER2::*LUC* マウスアストロサイトを播種し、播種した細胞に対してデキサメタゾン (100 nM) を処置し、その後のルミサイクルにてルシフェラーゼ活性リズムを 10 分毎に測定した。デキサメタゾン処置後 36 時間または 48 時間に lorglumide を投与し、リズムの変化を観測した。

再同調促進作用の評価

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 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。

統計解析

また、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。各値は野生型マウスの非照射群の値を基準 (1.0) として相対的に示した。

【結果】

CCK-1受容体欠損マウスにおける網膜時計遺伝子 *Per1*、*Per2* の日内変動

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 (Fig. 1)。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。

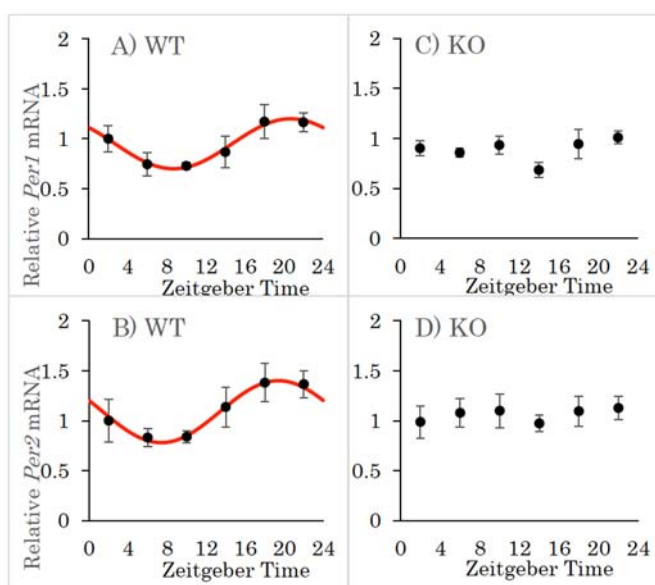


Fig. 1 Daily rhythm of *Per1* and *Per2* mRNA expression in the mouse retina

再同調までに要する日数

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 (Fig. 2)。

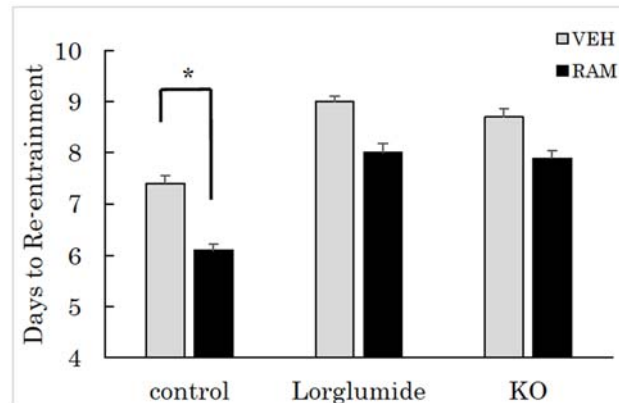


Fig. 2 Effect of RAM on locomotor activity reentrainment after 6 hr advance of light/dark cycle in mice

【考察】

第1章では、光同調におけるCCK-1受容体の関与を明らかにするために、網膜CCK-1受容体の日内変動、CCK-1受容体欠損マウスにおける網膜時計遺伝子Per1、Per2の日内変動、SCNにおける光刺激に対するc-Fos発現および時計遺伝子Per1、Per2の発現、網膜における光刺激に対する時計遺伝子Per1、Per2の発現について検討した。

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ではないかと考えられる。

第2章では、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およびCCK-1受容体遮断薬であるlorglumide (Lor)を投与し、経時的にルシフェラーゼ発光を測定した。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、Lor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。

現代社会では交代勤務やグローバル化、生活様式の多様化によって不規則な生活が常態化しつつある。それに伴う体内時計リズム失調は、睡眠障害や季節性情動障害を惹き起こす他、高血圧、糖尿病などの生活習慣病、がんなどの疾患のリスクファクターとなる。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。

【投稿中論文および引用文献】

Cholecystokinin-1 receptors in the mouse retina are involved in circadian rhythms (Scientific Reports 投稿中)

1 Shimazoe T et al, *Faseb J* 22, 1479-1490, 2008