

(様式 甲5)

氏 名	藤井 研介
(ふりがな)	(ふじい けんすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1175号
学位審査年月日	令和2年7月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Gastrointestinal neurons expressing HCN4 regulate retrograde peristalsis (逆蠕動を制御する新規腸管神経群の発見と解析)
論文審査委員	(主) 教授 樋口 和秀 教授 田中 慶太郎 教授 矢野 貴人

学位論文内容の要旨

《背景》

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) チャネルは、細胞膜が過分極することで開く非選択的陽イオンチャネルで、心臓洞房結節で発現しペースメーカー電位を形成することで心拍数を調整している。HCN チャネルは海馬や大脳皮質などの神経細胞でもみられ、神経系の構築に関わるとされている。腸管神経系においても発現が報告されているものの、これまで消化管における生理学的機能は分かっていない。

《目的》

胎生期ゼブラフィッシュモデルを用いて、消化管における HCN4 の発現と生理学的機能を解明する。

《方 法》

GAL4-UAS 法によってゼブラフィッシュゲノムの *hcn4* 遺伝子に酵母由来の転写因子 GAL4FF 遺伝子を挿入したモデル gSAIGFF249A; UAS: GFP を用いて、HCN4 発現細胞を視覚化した。また、神経マーカーである HuC に対する抗体と神経伝達物質セロトニンに対する抗体を用いた免疫組織化学的解析にて、消化管における HCN4 発現細胞を同定した。さらに、HCN4 発現細胞に GFP、神経細胞に mCherry を発現させたトリプルトランスジェニックモデル gSAIGFF249A; UAS: GFP; HuC: mCherry を作製し、生体内での組織学的特徴を観察した。ゼブラフィッシュの消化管蠕動に関しては、セルモーションイメージングシステム SI8000 (SONY) を用いて解析した。生体内での消化管蠕動をベクトル別に解析し、順蠕動と逆蠕動のそれぞれに関して、収縮頻度、収縮速度、伝播速度を定量解析した。さらに、HCN4 発現細胞を抑制する実験と活性化する実験を行い、それによる蠕動変化を解析した。HCN アンタゴニストを用いた薬理学的実験とアンチセンスモルフォリノオリゴによるノックダウンモデルによる抑制実験、HCN4 発現神経にチャネルロドプシン (ChR) を発現させたトランスジェニックモデル gSAIGFF249A; UAS: ChRWR-YFP による活性化実験を行い、HCN4 発現神経の蠕動における役割を生体内で検討した。

《結 果》

免疫組織化学染色によって、HCN4 発現細胞はセロトニン神経であることを同定した。トリプルトランスジェニックモデルからは、HCN4 発現神経が多くのバリコシティを有する特徴があることを確認した。ゼブラフィッシュモデルの消化管蠕動に関して、同一部位より周期的に発生する順蠕動と逆蠕動が存在することを SI8000 にて確認した。そして、方向別解析の結果、順蠕動は腸管に対し主に長軸方向、逆蠕動は主に短軸方向への収縮で構成されていることが確認できた。HCN チャネルアンタゴニストとアンチセンスモルフォリノオリゴによるノックダウンモデルから、HCN4 発現神経の活動を抑制すると、逆蠕動の発生頻度と収縮力が低下することが確認できた。また、HCN4 発現細胞にチャネルロド

プシンを発現させ、青色光により選択的に HCN4 発現神経の活性化すると、逆蠕動の発生頻度と輪走筋収縮力の増加し、さらに伝播速度も上昇することが明らかとなった。

《考 察》

胎生期ゼブラフィッシュの消化管において、HCN4 チャネルはセロトニン神経に発現していることが分かった。HCN アンタゴニストとモルフォリノオリゴを用いた神経活動の抑制実験、チャネルロドプシンを用いた神経活動の活性化実験は、いずれも HCN4 発現神経が逆蠕動を特異的に制御していることを示していた。

HCN4 チャネルは哺乳類の中樞神経系でも発現しており、膜電位を調節している。より多くの HCN4 チャネルが開けば、活動電位を生じる閾値までより速く達し、結果として活動電位の発生頻度が増加する。逆蠕動において、HCN4 発現神経が活性化すると、①収縮頻度が増加する、②短軸方向の収縮力が増強する、③消化管に沿ったシグナル伝達がより早く正確に行われることが分かった。これらの発見によって、HCN4 発現神経が逆蠕動の発生、伝播、輪走筋収縮を制御するという、3 つの新たな神経ネットワークの存在が示唆された。

組織学的特徴から HCN4 発現神経が活性化すると、セロトニンの放出が起こると考えられる。消化管では大量のセロトニンを介して生理学的機能が維持されている。今回チャネルロドプシンを用いた活性化実験において、青色光を消した後も逆蠕動は増強されたままであった。これは、HCN4 発現神経から放出されるセロトニンに対して、G タンパク質共役型のレセプターが存在することを示唆している。今後、セロトニンレセプターに着目した解析を行うことで、この神経ネットワークの理解が深まることが期待される。

《結 論》

今回われわれは、胎生期ゼブラフィッシュの消化管神経系を構成する新たな神経群、HCN4 発現神経によって消化管の逆蠕動が制御されていることを示した。

論文審査結果の要旨

蠕動とは、生命を維持するうえで必要不可欠な消化管運動であり、脳から独立した腸管神経系 (ENS: Enteric nervous system) によって制御されている。口側から肛門側へと伝播する順蠕動に関してはそのメカニズムは解明されつつあるが、逆蠕動メカニズムは未だ明らかにされていない。

本研究は、ゼブラフィッシュの遺伝学的特徴と生物学的特徴を活かした生体内での消化管蠕動解析である。セルモーションイメージングシステム SI8000 を用いて“収縮”を構成するベクトルを算出し、方向別解析を行うことで、「収縮頻度」「収縮力」「伝播速度」という3つのパラメーターを算出した。そして、HCN チャンネルアンタゴニストとモルフォリノオリゴによるノックダウンモデルによる抑制実験、チャンネルロドプシンを用いた光遺伝学的手法による活性化実験を行い、哺乳類モデルでは困難な生体内での消化管蠕動を解析している。遺伝学的手法を駆使したゼブラフィッシュモデルと生体内での消化管蠕動解析により、HCN4 発現神経が逆蠕動の“発生”“伝播”“輪走筋収縮”を制御するという3つの神経ネットワークの存在を導いている。

十二指腸や終末回腸で起こるとされてきた逆蠕動に関して、腸管自体の神経ネットワークである腸管神経系、特に HCN4 発現神経による制御機構を解明した。今後、HCN4 発現神経をさらに研究していくことで、新たな逆蠕動メカニズムとその生理学的意義の解明が望まれる。また、臨床においては HCN チャンネルに着目することで、新規制吐薬など蠕動治療薬の開発などに繋がることが期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Cell Reports 30(9): 2879-2888, 2020 Mar

doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.024. <オンライン連載>