



Uts2b is a microbiota-regulated gene expressed in vagal afferent neurons connected to enteroendocrine cells producing cholecystokinin

吉岡, 佑太

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8401号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477827>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Uts2b is a microbiota-regulated gene expressed in vagal afferent neurons connected to enteroendocrine cells producing cholecystokinin

求心性迷走神経ニューロンにおいて Uts2b は消化管ホルモンコレシストキニンに応答し、遺伝子発現が上昇する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

肝胆脾外科学

(指導教員：福本 巧 (教授))

吉岡 佑太

腸脳相関は我々の生体においてホメオスタシスを維持する上で非常に重要な役割を担っている。腸内環境は腸内細菌叢と宿主の相互作用により構築され、そこにはさまざまな栄養素や化学物質が存在する。腸管内分泌細胞 (EEC) はこれらの多様な情報を感知する感覚細胞であり、感覚刺激に応答して消化管ホルモンを分泌し、他臓器の機能を制御する。近年、EEC の一部が求心性迷走神経ニューロンとシナプスを形成し、中枢神経に感覚情報を伝達することが明らかになった。EEC-ニューロン結合の解剖・生理の解明は腸脳相関の理解に重要な情報を提供する。マウスにおいて、求心性迷走神経ニューロンは遺伝子学的に 12 のサブタイプに分類され、そのうち少なくとも 3 つのサブタイプが腸粘膜に投射する。腸粘膜に投射するこれらのニューロン群は、栄養素を感知して直接的に、そして EEC からの神経伝達 (消化管ホルモンや神経伝達物質) により間接的に腸内環境をモニタリングしていると考えられる。しかし、特定の EEC サブタイプからの情報を伝達する求心性迷走神経ニューロンの実体は未同定であり、それらのニューロンが個々の消化管ホルモンのどのような応答を示すかも未解明である。

EEC 結合性の求心性迷走神経ニューロンは腸内細菌叢に関連する細胞外刺激 (腸内代謝産物や消化管ホルモンなど) に反応して遺伝子発現を変化させる可能性が考えられる。本研究では、この作業仮説に基づき、SPF マウスと無菌 (Germ-Free: GF) マウスを用いて、求心性迷走神経ニューロンを含む舌咽迷走神経節 (NPG) の遺伝子発現比較解析を行った。その結果、GF マウスの NPG において有意に発現が減少する遺伝子群の一つとして、機能未知のニューロペプチド UTS2B をコードする遺伝子 *Uts2b* を同定した。In situ hybridization (ISH) 解析の結果、GF マウスでは、SPF マウスに比べて *Uts2b* を発現する NPG ニューロンの数が減少していた。一方、SPF マウスの糞便移植を受けた GF マウスの NPG では *Uts2b* 発現ニューロンの数が SPF マウスのレベルまで回復した。以上より、*Uts2b* 遺伝子は NPG ニューロンにおいて腸内細菌依存性に発現していることが分かった。

次に我々は腸内細菌関連の刺激による *Uts2b* 遺伝子発現変化を解析した。NPG を培養し、AR420626 (遊離脂肪酸受容体 3 の選択的アゴニスト)、LPS (Toll Like Receptor 4: TLR4 のリガンド)、Pam3CSK4 (TLR2/3 のリガンド) で刺激後、ISH 解析を行った結果、コントロールと比して AR420626 処理を受けた NPG で *Uts2b* 発現ニューロン数の増加を認めた。他の刺激では変化を認めなかった。このことは UTS2B が特定の代謝産物の感知に関与する可能性を示唆する。さらに同様の培養系を用いて、消化管ホルモンであるコレシストキニン (CCK)、グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1)、ペプチド YY (PYY) の作用も解析した。ISH による解析の結果、GLP-1 処理を受けた NPG では *Uts2b* 発現ニューロン数の減少を認めた。これに対し、CCK 処理を受けた NPG では *Uts2b* 発現ニューロン数が増加した。PYY の刺激では変化を認めなかった。二重蛍光 ISH により *Uts2b* 発現 NPG ニューロンにおける消化管ホルモンの受容体遺伝子発現を調べたところ、*Uts2b* 発現ニューロンの約 80% に *Cckar* (CCK 受容体遺伝子) の発現が認められ、*Uts2b* 発現 NPG ニューロンが CCK 反応性であるデータを支持していた。一方で *Cckar* 発現ニューロンの約 20% に *Uts2b* が発現して

いた。この結果は、*Uts2b* 発現 NPG ニューロンが CCK の作用の一部に関わるニューロン群であることを示唆する。また *Glp-1* (GFL-1 受容体遺伝子) と *Npy2* (PYY 受容体遺伝子) はそれぞれ *Uts2b* 発現ニューロンの約 60%, 約 40% に発現していた。NPG ニューロンにおける *Uts2b* の発現がさまざまな消化管ホルモンにより多様にコントロールされていることが窺える。これらの結果は、UTS2B が消化管ホルモンを介した異なる腸内感覚モダリティの伝達に寄与している可能性を示唆する。

Uts2b 発現 NPG ニューロンが CCK 応答性であることは、これらのニューロン群が CCK を発現する EEC と構造的・機能的に密接に関連していることを示唆する。そこで我々は *Uts2b* 発現 NPG ニューロンとその神経線維を特異的に蛍光標識し、組織解析により EEC との関連を明らかにすることを試みた。このため、組換え酵素 Cre と FLP による二重遺伝子組換えにより tdTomato を発現する *Ai65* レポーターを用い、*Vip-Cre* (*Vip* 発現 NPG ニューロンの約 90% が *Uts2b* を発現) および *Slc17a6-Flpo* (末梢組織に注射するほぼ全ての感覚ニューロンに組換えを誘導) アリルで組換えを誘導した。さらに、この標識の特異性を確認するために、*Vip-Cre* マウスの NPG に Cre 依存性に tdTomato を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV9-FLEX-tdT; セロタイプ 9) を注入してニューロン標識を並行して行った。いずれの方法でも *Uts2b* 発現 NPG ニューロンが tdTomato 蛍光で選択的に標識されたが、二重組換えシステムの方がより包括的なデータ取得が可能であった。*Uts2b* 発現ニューロンは十二指腸、空腸に豊富に注射していたが、胃にはほとんど注射していなかった。十二指腸、空腸において神経線維は絨毛上皮直下の粘膜に注射しており、この所見は全ての絨毛の約 3 分の 1 に認めた。消化管ホルモン CCK を分泌する EEC と *Uts2b* 発現ニューロンとの関連性を組織学的に検討したところ、*Uts2b* 発現 NPG ニューロンの神経線維と CCK 分泌 EEC は非常に近接しており、一部で直接的な結合が確認された。生体におけるこれらの解析結果は、*Uts2b* 発現 EEC ニューロンと CCK 分泌 EEC が生理的に結びついていることを強く示唆している。

本研究において、我々は NPG における遺伝子発現解析を行い、腸内細菌依存性に NPG ニューロンに発現する遺伝子として *Uts2b* を同定した。*Uts2b* は遊離脂肪酸受容体 3 の選択的アゴニストや消化管ホルモンに応答して発現変動することから、*Uts2b* 発現ニューロンは腸内細菌叢の代謝産物を直接感知したり EEC から分泌されるホルモンのシグナルを受容することにより腸内の感覚情報伝達に寄与していると考えられる。

消化管ホルモンの中でも特に CCK は NPG における *Uts2b* の発現を上昇させた。さらに、遺伝学的標識の結果、CCK を発現する EEC と *Uts2b* 発現 NPG ニューロン間の神経線維との直接的結合が確認された。以上から、*Uts2b* 発現 NPG ニューロンは CCK 産生 EEC からの腸内感覚を伝えるニューロン群であることが示唆される。

UTS2B の生理機能は未解明であるが、G 蛋白共役受容体 (GPCR) である UTS2R (urotensin 2 receptor) や SSTR5 (somatostatin receptor 5) を介してシグナル伝達することが報告されている。ニューロンにおいて GPCR の活性化は神経伝達に影響を与えるこ

とから、UTS2B は求心性迷走神経ニューロンが接続する孤束核 (臓器感覚中枢) ニューロンへの神経伝達を調節している可能性が考えられる。また求心性迷走神経ニューロンでの *Uts2b* の発現レベルは CCK、Glp-1、PYY の刺激によって異なる変動を示すため、*Uts2b* の発現量の違いによって異なる感覚情報を伝達していることも考えられる。

CCK は食欲抑制性の機能がよく知られているが、近年、CCK が栄養嗜好性にも関わっていることが報告された。CCK 発現 EEC は、グルタミン作動性とプリン作動性の 2 つの異なる求心性迷走神経ニューロンに情報伝達するが、前者は砂糖、後者は人工甘味料の感覚受容に関与する。重要なことに、砂糖の感覚受容は EEC から産生されるグルタミン酸だけでなく CCK にも依存していることが明らかとなった。つまり CCK は動物の行動を多角的に制御するホルモンである。*Uts2b* を発現する求心性迷走神経ニューロンは CCK 受容体 (CCKA) を発現するニューロンの一部であることから、UTS2B は砂糖の感知のように、CCK の一つの作用発現に特異的に関与するかもしれない。今後、求心性迷走神経ニューロン特異的な *Uts2b* 遺伝子破壊を通して、腸内感覚における UTS2B の機能を解明していくことが必要である。

論文審査の結果の要旨

受 付 番 号	甲 第 3192 号	氏 名	吉岡 佑太
論 文 題 目 Title of Dissertation	求心性迷走神経ニューロンにおいて <i>Uts2b</i> は消化管ホルモンのコレシストキニンに反応し、遺伝子発現が上昇する <i>Uts2b</i> is a microbiota-regulated gene expressed in vagal afferent neurons connected to enteroendocrine cells producing cholecystokinin		
審 査 委 員 Examiner	主 査 古屋敷 智之 Chief Examiner 副 査 児玉 裕三 Vice-examiner 副 査 鈴木 聡 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】

腸内環境は腸内細菌叢と宿主の相互作用により構築され、そこにはさまざまな栄養素や化学物質が存在する。腸管内分泌細胞 (EEC) はこれらの多様な情報を感知する感覚細胞であり、感覚刺激に応答して消化管ホルモンを分泌し、他臓器の機能を制御する。近年、EEC の一部が求心性迷走神経ニューロンとシナプスを形成し、中枢神経に感覚情報を伝達することが明らかになった。マウスにおいて、求心性迷走神経ニューロンは遺伝子学的に 12 のサブタイプに分類され、そのうち少なくとも 3 つのサブタイプが腸粘膜に投射する。腸粘膜に投射するこれらのニューロン群は、栄養素を感知して直接的に、そして EEC からの神経伝達 (消化管ホルモンや神経伝達物質) により間接的に腸内環境をモニタリングしていると考えられる。しかし、特定の EEC サブタイプからの情報を伝達する求心性迷走神経ニューロンの実体は未同定であり、それらのニューロンが個々の消化管ホルモンのような応答を示すかも未解明である。本研究では EEC が分泌する消化管ホルモンのような応答する求心性迷走神経ニューロン群について検証した。

【方法・結果】

I. *Uts2b* 遺伝子は舌咽迷走神経節 (NPG) において腸内細菌依存性に発現する
EEC 結合性の求心性迷走神経ニューロンは腸内細菌叢に関連する細胞外刺激 (腸内代謝産物や消化管ホルモンなど) に反応して遺伝子発現を変化させる可能性が考えられることから SPF マウスと無菌 (Germ-Free: GF) マウスを用いて、求心性迷走神経ニューロンを含む NPG の遺伝子発現比較解析を行った。その結果、GF マウスの NPG において有意に発現が減少する遺伝子群の一つとして、機能未知のニューロペプチド *UTS2B* をコードする遺伝子 *Uts2b* を同定した。In situ hybridization (ISH) 解析の結果、GF マウスでは、SPF マウスに比べて *Uts2b* を発現する NPG ニューロンの数が減少していた。一方、SPF マウスの糞便移植を受けたマウスの NPG では *Uts2b* 発現ニューロンの数が SPF マウスのレベルまで回復した。以上より、*Uts2b* 遺伝子は NPG ニューロンにおいて腸内細菌依存性に発現していることが分かった。

II. *Uts2b* 発現 NPG ニューロンは遊離脂肪酸受容体アゴニストと消化管ホルモンコレシストキニン (CCK) に応答する

腸内細菌関連の刺激による *Uts2b* 遺伝子発現変化を解析した。NPG を培養し、AR420626 (遊離脂肪酸受容体 3 の選択的アゴニスト) で刺激後、ISH 解析を行った結果、コントロールと比して AR420626 処理を受けた NPG で *Uts2b* 発現ニューロン数の増加を認めた。このことは *UTS2B* が特定の代謝産物の感知に関与する可能性を示唆する。さらに同様の培養系を用いて CCK の作用も解析した。ISH による解析の結果、CCK 処理を受けた NPG では *Uts2b* 発現ニューロン数の増加を認めた。この結果を踏まえ、二重蛍光 ISH により *Uts2b* 発現 NPG ニューロンにおける消化管ホルモンの受容体遺伝子発現を調べたところ、*Uts2b* 発現ニューロンの約 80% に *Ccka* (CCK 受容体遺伝子) の発現が認められ、*Uts2b* 発現 NPG ニューロンが CCK 反応性であるデータを支持していた。一方で *Ccka* 発現ニューロンの約 20% に *Uts2b* が発現していた。この結果は、*Uts2b* 発現 NPG ニューロンが CCK の作用の一部に関わるニューロン群であることを示唆する。

III. *Uts2b* 発現 NPG ニューロン神経線維は CCK 分泌 EEC と組織学的に結合する

Uts2b 発現 NPG ニューロンが CCK 応答性であることは、これらのニューロン群が CCK を発現する EEC と構造的・機能的に密接に関連していることを示唆する。次に *Uts2b* 発現 NPG ニューロンとその神経線維を特異的に蛍光標識し、組織解析により EEC との関連を明らかにすることを試みた。このため、組換え酵素 Cre と FLP による二重遺伝子組換えにより tdTomato を発現する *Ai65* レポーターを用い、*Vip-Cre* (*Vip* 発現 NPG ニューロンの約 90% が *Uts2b* を発現) および *Slc17a6-Flpo* (末梢組織に投射するほぼ全ての感覚ニューロンに組換えを誘導) アリルで組換えを誘導した。*Uts2b* 発現ニューロンは十二指腸、空腸に豊富に投射していたが、胃にはほとんど投射していなかった。十二指腸、空腸において神経線維は絨毛上皮直下の粘膜に投射しており、この所見は全ての絨毛の約 3 分の 1 に認めた。消化管ホルモン CCK を分泌する EEC と *Uts2b* 発現ニューロンとの関連性を組織学的に検討したところ、*Uts2b* 発現 NPG ニューロンの神経線維と CCK 分泌 EEC は非常に近接しており、一部で直接的な結合が確認された。生体におけるこれらの解析結果は、*Uts2b* 発現 EEC ニューロンと CCK 分泌 EEC が生理的に結びついていることを強く示唆している。

【結論】

本研究において、我々は NPG における遺伝子発現解析を行い、腸内細菌依存性に NPG ニューロンに発現する遺伝子として *Uts2b* を同定した。*Uts2b* は遊離脂肪酸受容体 3 の選択的アゴニストや消化管ホルモンの応答して発現変動することから、*Uts2b* 発現ニューロンは腸内細菌叢の代謝産物を直接感知する、あるいは EEC から分泌されるホルモンのシグナルを受容することにより腸内の感覚情報伝達に寄与していると考えられる。消化管ホルモンの中でも特に CCK は NPG における *Uts2b* の発現を上昇させた。さらに、遺伝学的標識の結果、CCK を発現する EEC と *Uts2b* 発現 NPG ニューロン間の神経線維との直接的結合が確認された。以上から、*Uts2b* 発現 NPG ニューロンは CCK 産生 EEC からの腸内感覚を伝えるニューロン群であることが示唆される。

以上、本研究は、腸内環境における EEC と求心性迷走神経との連関における *Uts2b* 発現ニューロンの働きを明らかにしたものであり、人体の恒常性維持に重要である腸脳相関を理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。