

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32676

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15670

研究課題名(和文)神経ペプチドによる脊髄損傷治療法の新戦略

研究課題名(英文)New strategy for treatment of spinal cord injury by neuropeptide

研究代表者

塩田 清二(Shioda, Seiji)

星薬科大学・先端生命科学研究所・教授

研究者番号：80102375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：PACAPは、神経細胞の保護および神経修復・再生作用を有する神経ペプチドであり、マウスの脊髄損傷モデルを用いた実験で神経細胞死を超微量で抑制することが分かった。さらにPACAPによる神経細胞死抑制の機能解析を行ったところ、PACAPは神経細胞内にCRMP2タンパク質(軸索伸長タンパク)の発現を亢進させて軸索伸長を促進させることも明らかになった。以上の研究結果により、PACAPは脊髄における神経細胞損傷領域で損傷後の軸索再生を誘導することにより運動機能の回復を促進することが明らかになった。PACAPは将来的に脊髄損傷の治療薬として使える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) is a neuropeptide having neuronal protection, nerve repair and neuroregeneration activity. We have found that in the experiment using a spinal cord injury model of mouse, PACAP suppresses nerve cell death with a very low concentration. Furthermore, functional analysis of neuronal cell death inhibition by PACAP was performed, and it was also revealed that PACAP promotes axon outgrowth by promoting the expression of CRMP2 (Collapsin response mediator protein, axon elongation protein) in nerve cells. These findings suggest that PACAP promotes recovery of motor function by inducing axon regeneration after injury in nerve cell injured region in the spinal cord. PACAP may be used as a remedy for spinal cord injury in near future.

研究分野：神経解剖学

キーワード：PACAP 脊髄損傷 神経細胞死防御 神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) は 27 または 38 アミノ酸残基からなる神経ペプチドである。申請者は PACAP の脳室内投与のみならず静注によっても遅発性神経細胞死が抑制されることを申請者らは発表した(文献 1)。また申請者は脳梗塞モデル動物を用いた実験で、PACAP が MAP キナーゼを介して神経細胞死を抑制し、IL-6 の産生を促すことを明らかにした(文献 2,3)。申請者は、脳梗塞モデル動物を用いて PACAP の細胞死抑制と神経再生の機構をしらべていく過程で、PACAP が CRMP2 (Collapsin Response Mediator Protein 2) という軸索伸張因子の遺伝子発現を亢進し、ペナンブラ領域で軸索伸張がみられることを発見した(文献 4)。CRMP2 には培養実験下で軸索伸張を促進することはすでに知られていたが、申請者は生体下の脳虚血実験で初めて明らかにした(文献 5, 6)。しかし、PACAP による脊髄損傷時の軸索伸張と運動機能回復・修復作用についての詳細は全く不明のままであった。

## 2. 研究の目的

PACAP という神経ペプチドの脊髄損傷の新規治療法を開発する目的で、マウスの脊髄損傷モデルを作成し、機能形態学的研究を行う。さらに、新規ドラッグデリバリーシステム (DDS) 法としてハイドロゲルおよび点鼻投与法の開発を行う。研究概要としては、脊髄損傷モデル動物に PACAP を投与し、脊髄実質内への移行効率、移行過程、細胞死抑制・神経再生機構の詳細を明らかにするための基盤研究を行い、ヒトに臨床応用可能な新規脊髄損傷の治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究は、脊髄損傷治療の新規 DDS の開発を目指し、脊髄損傷のモデル動物を用い、PACAP をターゲットとしたオリゴアンチセンスを用いた血液脳関門の透過性および点鼻投与による神経細胞死抑制・神経再生作用の評価を行う。さらに脊髄実質内での作用機序の解明をサイトカインネットワークおよびマイクログリアの活性化から行う。最後にそれらの遺伝子網羅的解析を含むオミックス解析を試み PACAP の機構の本体に迫る。

(1) PACAP の新規 DDS 開発に向けて、脊髄損傷モデル動物 (マウス、マーモセット) の作成を行なった。

麻酔したマウス (C57BL/6-J) の脊髄 (Th7) を外科的に露出する。その後インパクト (Benchmark Stereotaxic Impactor) を用いて脊髄を機械的に損傷した。

脊髄損傷後、PACAP を含むハイドロゲルを損傷部位に留置した。用いた PACAP は 0.1 pM

から 10 nM 濃度に生食で溶解してハイドロゲルに溶かした。さらに PACAP の点鼻投与としては、このペプチドの血液脳関門の透過率を調べ、他のペプチドとの比較を行い透過率の比較検討を行なった。また、点鼻投与法の脊髄内移行への取り込みの有効性を評価した。

(2) PACAP による脊髄損傷後の神経細胞死防御機構を明らかにした。

脊髄損傷モデルマウスを作成・評価した。神経細胞死抑制効果については脊髄損傷部位を GFAP の免疫染色を行い、切片上で GFAP 陰性の領域を計測 (polygon fitting software) し、さらにその体積変換を指標にして神経損傷部位の評価を行なった。また運動機能の解析は Basso Mouse Scale (BMS) に基づいてスコア化し、PACAP による運動機能評価を行なった。

(3) PACAP 投与による神経細胞死抑制の分子機構の解明と軸索伸張の機能形態解析。

PACAP の神経細胞死抑制作用の解析  
申請者らは PACAP をマウス虚血脳内に投与すると海馬の神経細胞死が有意に低下し、同時に歯状回における神経新生の起きることを見出している (未発表)。しかし神経細胞死保護機構における PACAP の実体証明はできていない。マウスに点鼻投与あるいはハイドロゲルを用いて直接投与した PACAP が脊髄損傷後の神経細胞死を抑制できるかどうか、組織切片を用いて損傷部位を含む領域の細胞死を Tunnel 法などで定量的に解析する。どのような遺伝子産生を誘導するかは以下の研究を行なった。

PACAP による脊髄の神経修復・再生機構の解明

PACAP 投与による軸索伸張についての可能性はすでに培養実験でしらべている。そこで脊髄損傷 1 日後に動物を麻酔し、順行性トレーサーであるローダミンデキストラン (蛍光標識) を第 5 頸椎レベルの脊髄実質に注入し、2 週間後に動物をと殺して組織切片を作成し、蛍光顕微鏡観察を行い軸索伸張の状況を形態学的に計測し、軸索伸張作用を評価した。

PACAP の脊髄損傷抑制作用に係る遺伝子およびタンパク質の網羅的解析。

脊髄損傷をした脊髄の頸椎から腰髄に至る組織から RNA を調整し、cDNA マイクロアレイ解析 (アジレント社製) およびプロテオミックス解析 (MALDI/TOFMS; Shimadzu 社製) を行う。cDNA マイクロアレイおよびプロテオミックス解析に関する施設、装置はすでに導入済みであり現在稼働している。本解析は連携研究者のランデエブ博士の協力・支援を得て行なった。さらにマイクロダイセクション装置 (Leica, LMD 7000) を用いて採取した脊髄組織から神経細胞およびグリア細胞を採取し、その MAP キナーゼ活性を In gel assay 法および免疫沈降、gel-shift assay 法、RNase protection assay 法を用いて、

PACAP による IL-6 以外のサイトカイン誘導の可能性をしらべた。

マイクログリアを介した炎症制御作用に係る PACAP 経路の存在証明。

PACAP は脳虚血の際に脳内のマイクログリアの活性化を修飾し神経細胞死を抑制する可能性がある。そこで脊髄においても脳と同じような機構の存在する可能性を検証するために、PACAP KO マウスを脊髄損傷し、PACAP を含有するハイドロゲルを直接脊髄損傷部位に投与あるいは PACAP の点鼻投与を行なって細胞死抑制がおきるかどうかを GFAP の免疫染色法により評価した。マイクログリアの活性化を活性化マーカーの抗体を用い組織学的に検討した。

#### 4. 研究成果

PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) は、神経細胞の保護および神経修復・再生作用を有する神経ペプチドである。

我々は、プロテオミクス解析によりマウスの中大脳動脈閉塞による脳虚血後に PACAP を脳室内投与することにより、CRMP2 タンパク質(軸索伸長タンパク)の発現が投与6時間後で上昇し、CRMP2 陽性反応が梗塞周囲の虚血巣領域の神経細胞に強く認められることをすでに論文で報告した。

そこで運動機能や軸索新生を評価し易いマウスの脊髄損傷モデルを用いた機能解析を行った。具体的にはカミソリを用いて脊髄を離断して損傷させたマウスに PACAP を浸み込ませた徐放性ゲルを損傷脊髄に塗布し、その後の運動機能を経時的に評価したところ、PACAP $10^{-12}$  M 添加群では生理的食塩水添加群と比較して損傷後2週間で有意な運動機能の回復が認められた。さらに損傷後の脊髄において CRMP2 mRNA 発現量を測定したところ、PACAP 添加群では生理的食塩水添加群と比較して7日目で増加傾向を示し、14日目で有意差が認められた。CRMP2 の発現は脊髄の大型及び小型の神経細胞と一部のオリゴデンドロサイトにみられ、さらに傷害後では傷害部と正常部の境界領域において強い陽性反応が観察された。これはインパクターを用いた脊髄損傷モデル動物とほぼ同じ結果であり、異なる脊髄損傷モデルにおいても軸索伸長が起きたことが分かった。順行性蛍光トレーサーを損傷部位の上位の頸髄レベルに投与を行なって軸索伸長を蛍光顕微鏡にて検索した結果、PACAP 添加群では損傷領域より下位における軸索伸長が多数観察された。

以上の結果より、PACAP は損傷領域で CRMP2 発現量を上昇させ、損傷後の軸索再生を誘導することにより運動機能の回復を促進することが明らかになった。

#### <引用文献>

(1) Uchida D, Arimura A, Somogyvári-Vigh

A, Shioda S, Banks WA. Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. Brain Res.736,280-6 (1996)

(2) Shioda S, Ozawa H, Dohi K, Mizushima H, Matsumoto K, Nakajo S, Takaki A, Zhou CJ, Nakai Y, Arimura A. PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. Ann N Y Acad Sci. 11, 111-7 (1998)

(3) Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 7488-93 doi: 10.1073/pnas.0600375103 (2006)

(4) Tsuchida M, Nakamachi T, Sugiyama K, Tsuchikawa D, Watanabe J, Hori M, Yoshikawa A, Imai N, Kagami N, Matkovits A, Atsumi T, Shioda S. PACAP stimulates functional recovery after spinal cord injury through axonal regeneration. J Mol Neurosci.54(3), 380-7. doi: 10.1007/s12031-014-0338-z. (2014)

(5) Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Ogawa T, Aiuchi T, Tsuruyama T, Tamaki K, Shioda S. Transcriptomics and proteomics analyses of the PACAP38 influenced ischemic brain in permanent middle cerebral artery occlusion model mice. J Neuroinflammation. 23;9:256. doi: 10.1186/1742-2094-9-256. (2012)

(6) Hori M, Nakamachi T, Shibato J, Rakwal R, Tsuchida M, Shioda S, Numazawa S. PACAP38 differentially effects genes and CRMP2 protein expression in ischemic core and penumbra regions of permanent middle cerebral artery occlusion model mice brain. Int J Mol Sci.15(9):17014-34 doi: 10.3390/ijms150917014. (2014)

#### 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8件)

SASAKI S, WATANABE J, OHTAKI H, MATSUMOTO M, MURAI N, NAKAMACHI T, HANNIBAL J, FAHRENKLUG J, HASHIMOTO H, WATANABE H, SUEKI H, HONDA K, MIYAZAKI A, SHIODA S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. Br J Dermatol. 176 (2), 413-422 doi: 10.1111/bjd.14885. (2016)

NAKAMACHI T, OHTAKI H, SEKI T, YOFU S, KAGAMI N, HASHIMOTO H, SHINTANI N, BABA A, MARK L, LANEKOFF I, KISS P, FARKAS J, REGLODI D, SHIODA S. PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. Nat Commun. 7:12034. doi: 10.1038/ncomms12034. (2016)

XU Z, OHTAKI H, WATANABE J, MIYAMOTO K, MURAI N, SASAKI S, MATSUMOTO M, HASHIMOTO H, HIRAIZUMI Y, NUMAZAWA S, SHIODA S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. Sci Rep. 6:22373. doi: 10.1038/srep22373. (2016)

MATSUMOTO M, NAKAMACHI T, WATANABE J, SUGIYAMA K, OHTAKI H, MURAI N, SASAKI S, XU Z, HASHIMOTO H, SEKI T, MIYAZAKI A, SHIODA S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is involved in adult mouse hippocampal neurogenesis after stroke. J Mol Neurosci. 59(2):270-9. doi: 10.1007/s12031-016-0731-x. (2016)

MATOBA Y, NONAKA N, TAKAGI Y, IMAMURA E, NARUKAWA M, NAKAMACHI T, SHIODA S, BANKS WA, NAKAMURA M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhances saliva secretion via direct binding to PACAP receptors of major salivary glands in mice. Anat Rec (Hoboken). 299(9), 1293-9. doi: 10.1002/ar.23388. (2016)

SHIODA S, TAKENOYA F, WADA N, HIRABAYASHI T, SEKI T, NAKAMACHI T. Pleiotropic and retinoprotective functions of PACAP. Anat Sci Int. 91(4):313-24. doi: 10.1007/s12565-016-0351-0. (2016)

TSUMURAYA, T., OHTAKI, H., SONG, D., SATO,

A., WATANABE, J., HIRAIZUMI, Y., NAKAMACHI T., XU, Z., DOHI, K., HASHIMOTO, H., ATSUMI, T., AND SHIODA, S.: Human mesenchymal stem/stromal cells suppress spinal inflammation in mice with contribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). J Neuroinflammation, 12, 35 (2015) doi: 10.1186/s12974-015-0252-5

SHIODA, S., AND NAKAMACHI, T. PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. Peptides, 72, 202-207 (2015) doi: 10.1016/j.peptides.2015.08.006

[学会発表](計16件)

Shioda S

Neuroprotective effect of PACAP on spinal cord injury through CRMP-2 protein  
REGPEP2016  
2016年7月13日  
Rouen (France)

Nakamachi T, Shioda S

Neuroprotective and neurogenic effect of PACAP after stroke  
Satellite Symposium of REGPEP2016  
2016年7月12日  
Rouen (France)

塩田 清二

神経ペプチド PACAP の多彩な生理作用  
第13回 GPCR 研究会  
2016年5月13日  
日本科学未来館(東京)

渡邊 潤、佐々木 駿、中町 智哉、大滝 博和、  
荒田 悟、本田一穂、塩田 清二  
エクリン汗腺における PACAP の汗分泌促進作用  
第13回 GPCR 研究会  
2016年5月13日(東京)

中町 智哉、大滝 博和、関 保、渡邊 潤、塩田 清二  
PACAP はアクアポリン 5 を介して涙液分泌を促進する  
第13回 GPCR 研究会(東京)  
2016年5月13日

柏木 太一、塩田 清二、石 龍徳  
胎生期海馬歯状回形成過程における BPP シグナルの役割  
第121回日本解剖学会  
2016年3月30日  
ビッグパレットふくしま(郡山市)

渡邊 潤、大滝 博和、荒田 悟、本田 一穂、  
塩田清二

PACAP による神経幹細胞のラジアルグリアへの分化誘導作用  
第 121 回日本解剖学会  
2016 年 3 月 30 日  
ビッグパレットふくしま (郡山市)

中町 智哉、渡邊 潤、塩田 清二  
マウスにおける PACAP の唾液分泌促進作用  
第 121 回日本解剖学会  
2016 年 3 月 29 日  
ビッグパレットふくしま (郡山市)

篠原 広志、塩田 清二、石 龍徳  
細胞移動を基軸とする海馬歯状回形成のメカニズム  
第 121 回日本解剖学会  
2016 年 3 月 29 日  
ビッグパレットふくしま (郡山市)

T. Nakamachi, J. Watanabe, T. Seki, H. Ohtaki, S. Shioda  
Effects of PACAP on the secretions of tear and saliva in mouse.  
Neuropeptide 2015  
2015 年 9 月 28 日  
Aberdeen (UK)

J. Watanabe, H. Ohtaki, T. Nakamachi, M. Matsumoto, S. Sasaki, N. Murai, S. Arata, S. Shioda  
Crucial role of PACAP in neural progenitor cells during development and after degeneration.  
Neuropeptide 2015  
2015 年 9 月 28 日  
Aberdeen (UK)

J. Watanabe, H. Ohtaki, T. Nakamachi, S. Sasaki, M. Matsumoto, N. Murai, T. Seki, S. Arata, S. Shioda  
Involvement of PACAP in differentiation of neural progenitor cells via radial glia.  
12th international symposium on VIP/PACAP and related peptides.  
2015 年 9 月 21 日  
Cappadocia (Turkey)

S. Shioda, F. Takenoya, M. Hori, J. Shibato, T. Nakamachi, R. Rakwal  
Neuroprotective effect of PACAP on spinal cord injury through CRMP2 protein.  
12th international symposium on VIP/PACAP and related peptides.  
2015 年 9 月 21 日  
Cappadocia (Turkey)

T. Nakamachi, N. Wada, K. Endo, T. Seki, S. Shioda  
PACAP attenuates retinal damage in association with modulation of the

microglia/macrophage status and cytokines expression.  
12th international symposium on VIP/PACAP and related peptides.  
2015 年 9 月 21 日  
Cappadocia (Turkey)

中町 智哉、松田 恒平、塩田清二  
PACAP 遺伝子欠損マウスにおける加齢に伴う学習記憶障害  
日本動物学会第 86 回大会  
2015 年 9 月 17 日  
新潟コンベンションセンター (新潟)

中町 智哉、渡邊 潤、佐々木駿、塩田清二  
PACAP の唾液および汗分泌促進作用  
第 12 回 GPCR 研究会  
2015 年 5 月 15 日  
日本科学未来館 (東京)

〔図書〕(計 2 件)

WATANABE J, SEKI T, SHIODA S.  
PACAP and Neural Development.  
Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide- Current Topics in Neurotoxicity 11. pp 65-82  
D. Reglodi, A. Tamas (eds) Springer, 2016

OHTAKI H, SHIODA S.  
PACAP Regulation of Inflammatory and Free Radical Networks in Neuronal and Nonneuronal Diseases.  
Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide- Current Topics in Neurotoxicity 11. pp 671-690  
D. Reglodi, A. Tamas (eds) Springer, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 汗分泌促進剤及び該汗分泌促進剤を含有するドライスキンの予防薬又は治療薬  
発明者: 塩田清二、佐々木 駿、渡邊 潤  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-008753  
出願年月日: 平成 28 年 1 月 20 日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
塩田 清二 (SHIODA, Seiji)  
星薬科大学・先端生命科学研究所・教授  
研究者番号: 80102375

(2) 研究分担者  
土肥 謙二 (DOHI, Kenji)

昭和大学・医学部・教授  
研究者番号：20301509

中町 智哉 (NAKAMACHI, Tomoyai)  
富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・  
助教  
研究者番号：30433840