

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19700322

研究課題名(和文) PACAPによるアストロサイト活性化制御機構の解明

研究課題名(英文) Effect of PACAP on reactive astrocyte in vivo and in vitro

研究代表者 中町 智哉(NAKAMACHI TOMOYA)

昭和大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：30433840

研究成果の概要：

虚血性神経細胞死誘導後に認められるグリオース(アストロサイトの活性)における PACAP の作用を検討した。PACAP 受容体は神経損傷領域を取り囲むアストロサイトにおいて強く発現し、培養細胞を用いた実験により、PACAP はアストロサイトの増殖を促進する作用を有することが明らかになった。本研究により、PACAP がアストロサイト活性化およびグリオース形成機構に重要な役割を担うと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2000000	0	2000000
20 年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	360000	3560000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：細胞・組織、脳神経疾患、病理学

1. 研究開始当初の背景

脳虚血や頭部外傷などの中枢神経系の損傷後、アストロサイトが損傷領域を取り囲むように活性化する現象(グリオース)が知られている。この現象が発見されてから既に 50 年以上経過しているが(Anderson E *et al.*; Am Pract Dig Treat. 1950)、活性化したアストロサイトが成長因子やサイトカイン分泌などにより神経修復に関与しているという説(Sofroniew MV. Neuroscientist. 2005:review)と、逆に細胞外基質分泌により神経再生を阻害しているという説(Nieto-Sampedro M. Adv Exp Med Biol. 1999:review)があり、そ

の生理的意義についてはよくわかっていない。

近年、慶応大学・岡野らの研究グループは、脊髄損傷後の亜急性期におけるグリオースの促進が神経損傷領域を軽減させることを示した(Okada S *et al.*; Nature Med. 2006)。しかしその反面、慢性期では神経軸索再生は抑制された。このように、アストロサイト活性化機構やその動態がまだ十分に解明されていないためにアストロサイトをターゲットとした創薬は進んでいないのが現状である。

申請者はこれまでに虚血性神経細胞死メカニズムの解明とその臨床応用を目指した研究を行ってきた。これまでの研究の中で、PACAP はアストロサイトを刺激してサイトカイン放出を促すことが *in vitro* 実験により見出されている (Tatsuno I et al.; Ann N Y Acad Sci. 1996)。また申請者のグループは、マウス大脳皮質への外傷モデル後に認められる活性化アストロサイトに PACAP 特異的受容体 (PAC1R) が強く発現していることを明らかとした (Suzuki R et al.; Brain Res Mol Brain Res. 2003)。これらの知見は PACAP がアストロサイトの活性化促進因子であることを示唆している。しかし、PACAP が生体内でアストロサイトの活性化因子として機能するか、また PACAP 処理されたアストロサイトがどのような動態を示すかについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では虚血性神経細胞死誘導後に認められるアストロサイトの活性における PACAP の作用を *in vivo* および *in vitro* にて検討した。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスを用い、一過性前脳虚血後におけるアストロサイト活性化領域 (海馬領域) での GFAP、PACAP および PAC1R 発現量の経時的变化をウェスタンブロッティング (WB) 法および RT-PCR 法により半定量化した。さらに 2 重蛍光免疫染色法により PAC1R 発現細胞を同定した。

①マウス前脳虚血モデル; マウスはセボフレンによる吸入麻酔下において頸部を切開し、両総頸動脈を Zen 式クリップにより閉塞した。閉塞 12 分後に再び麻酔を導入しクリップの除去および総頸動脈の血流の再開を確認し再灌流とした。35°C の恒温槽内で一晚飼育した後、常温維持された飼育ケース内で飼育した。

②タンパク質および mRNA 抽出用試料の調整; 一過性前脳虚血 0, 8, 16, 24 時間、2, 4, 7, 14, 28 日後のマウスは、断頭後直ちに脳を摘出し、海馬領域のみを液体窒素で凍結し -80°C にて保存した。

③WB 法: サンプルはタンパク分解酵素含有溶解バッファー中でホモジェナイズし、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後に PVDF 膜へタンパクを転写した。PAC1R 抗体を用いて免疫反応を行い、得られたシグナルをゲル画像解析ソフト (UN-SCAN IT gel; Silk Scientific Inc) により解析し、それぞれの発現量を比較した。

④リアルタイム PCR 法: サンプルは AGPC 法により RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作成した。PACAP、PAC1R 特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。

⑤2 重蛍光免疫染色法: 一過性前脳虚血 2, 4, 7, 14, 28 日後のマウスは 4% パラフォルムアルデヒドにて灌流固定を行い、定法に従い厚さ 8 μ m の凍結切片を作成した。切片は 5% ウマ正常

血清にてブロッキング後に一次抗体としてマウス抗 GFAP 抗体、ウサギ抗 PAC1R 抗体溶液に反応させた。1 次抗体に対する蛍光標識 2 次抗体を反応させた後、水溶性封入剤にて封入し、蛍光顕微鏡下 (Carl Zeiss) で観察した。

(2) マウス胎仔から初代アストロサイト培養細胞を調整し、掻き傷モデル作成後に生じる反応性アストロサイトにおける PAC1R 発現を免疫細胞化学的に観察し、さらに PACAP を添加して反応性アストロサイトの増殖に与える影響を免疫染色法により評価した。

①マウスの新生仔 (生後 1 日目) から終脳を摘出し、氷冷した PBS にストックした。終脳をミンした後、0.025% trypsin, 0.02% L-cysteine monohydrate, 0.5% glucose, 0.02% bovine serum albumin in PBS 溶液にて 37°C, 15 分間インキュベートした。newborn calf serum (FBS) を加えて酵素反応を停止し、細胞懸濁液をフラスコに加えた。Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% FBS, 1% glucose, 10 U/mL penicillin and 10 μ g/mL streptomycin 溶液にて 1 週間培養後、フラスコを 50 rpm または 150 rpm で 20 時間振盪し、アストロサイト以外の細胞を除去した。細胞を 1×10^5 cells/cm² になるように 60 mm シャーレに添加し、再びコンフルエントになるまで 5-7 日間培養した。

②掻き傷モデル; 細胞がコンフルエントになった後、ピペッターのチップ (ϕ 1 mm) を用いて細胞層に十字の掻き傷 (スクラッチ) を作成した。その後、DMEM with 1% glucose, 10 U/mL penicillin, 10 μ g/mL streptomycin, G-5 supplement にて 2 日間培養した。

③免疫細胞化学染色; 培養細胞は 4% パラフォルムアルデヒドにより 30 分間、氷冷下で固定した。細胞は 0.3% Triton-100 溶液、続いて 5% ウマ正常血清にて 1 時間ブロッキングした。1 次抗体として、マウス抗 GFAP 抗体、ウサギ抗 PAC1R 抗体溶液、マウス抗 NeuN 抗体、ウサギ抗 Iba1 抗体、マウス抗 GalC 抗体、マウス抗 Ki67 抗体にて反応させた。その後、細胞は 蛍光標識 2 次抗体で反応させた。封入前に DAPI による対染色を行った。細胞は 蛍光顕微鏡下 (Carl Zeiss) で観察した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスを用い、海馬に遅発性神経細胞死が誘導される一過性前脳虚血を施し、アストロサイト活性化領域 (海馬領域) での PAC1R 発現量と発現細胞種の経時的变化をリアルタイム PCR 法、ウェスタン

プロット法および免疫染色法により比較した。その結果 PAC1R は脳虚血 12 時間後、PAC1R 免疫陽性反応は脳虚血 1 日後に発現がピークとなり、その後緩やかに低下して 56 日後には正常値に戻った(図 1)。

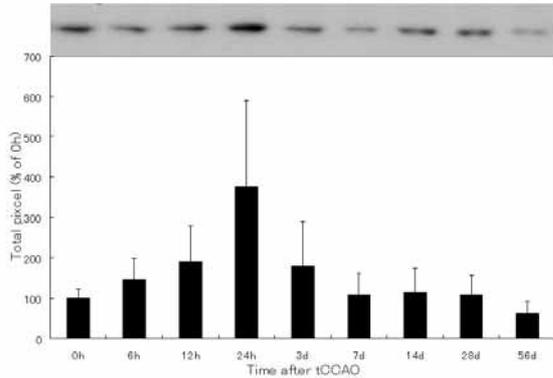


図1. 脳虚血後の海馬における PAC1R 発現量の変化

また PAC1R 免疫陽性反応は、脳虚血 1 日目では主に神経細胞マーカーと重なったが、虚血 3 日後からはアストロサイトと一部重なるようになり、7 日後には海馬の広範囲において PAC1R 免疫陽性のアストロサイトが観察された。14 日後には海馬損傷領域周囲部に PAC1R 免疫陽性のアストロサイトが多数観察された(図 2、矢印)。

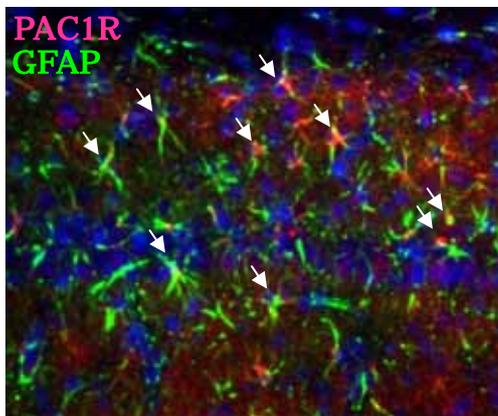


図 2. 脳虚血 14 日後の海馬神経損傷部位における PAC1R 免疫染色像

(2)培養アストロサイトに掻き傷を作成し、反応性アストロサイトを誘導する培養実験を確立した。掻き傷作成 2 日後には傷の周辺に強い PAC1R 免疫陽性反応を示す反応性アストロサイトが観察された(図 3)。

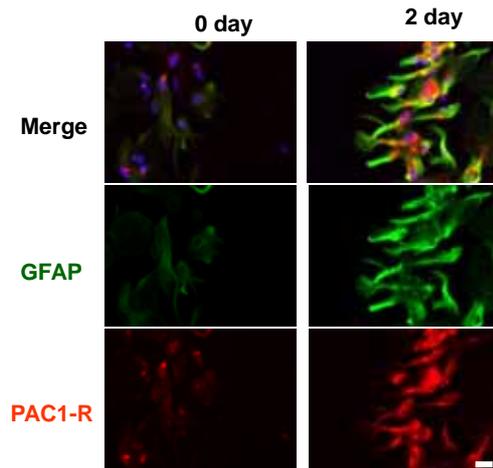


図 3. 培養アストロサイトにおける PAC1R 免疫陽性反応

そこで掻き傷作成後に最終濃度 10^{-15} から 10^{-7} M になるように PACAP を添加したところ、PACAP 10^{-11} 、 10^{-13} M 添加群では傷害領域周辺部の増殖している反応性アストロサイトの割合が溶媒添加群の約 2 倍に増加した(図 4)。さらに PAC1R アンタゴニストを PACAP と同時に投与することにより、PACAP 誘導性のアストロサイトの増殖が有意に抑制された。

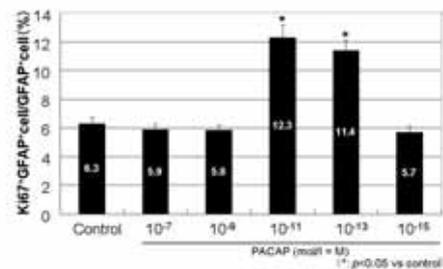


図 4. PACAP 添加による培養アストロサイトの増殖への影響

以上の結果から、PAC1R は神経損傷領域を取り囲むアストロサイトにおいて強く発現し、PACAP は反応性アストロサイトの増殖を促進する作用を有することが明らかになった。

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)

- 1) Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Mori H, Sato A,

- Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shioda S. Endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is involved in suppression of edema in the ischemic brain. *Acta Neurochir Suppl.*2009 (in press)
- 2) Dogrukol-Ak D, Kumar VB, Ryerse JS, Farr SA, Verma S, Nonaka N, Nakamachi T, Ohtaki H, Niehoff ML, Edwards JC, Shioda S, Morley JE, Banks WA. Isolation of peptide transport system-6 from brain endothelial cells: therapeutic effects with antisense inhibition in Alzheimer and stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29:411-422,(2009).
 - 3) Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S. Suppression of Ganglion Cell Death by PACAP Following Optic Nerve Transection in the Rat. *J Mol Neurosci*, 36:57-60, (2008).
 - 4) Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S. Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci*, 36:16-25, (2008).
 - 5) Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Hayashi D, Matsuno R, Nonaka N, Itabashi K, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) co-localizes with activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) in the mouse brains. *Regul Pept*, 145:88-95, (2008).
 - 6) Matsuno R, Ohtaki H, Nakamachi T, Watanabe J, Yofu S, Hayashi D, Takeda T, Nonaka N, Seki M, Nakamura M, Itabashi K, Shioda S. Distribution and localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-specific receptor (PAC1R) in the rostral migratory stream of the infant mouse brain. *Regul Pept*, 145:80-87, (2008).
 - 7) Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S. Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides*. 2007 Sep;28(9):1713-9. Review.
 - 8) Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Yofu S, Hiratsuka K, Nakamura S, Ohtaki H,

Yoshikawa T, Shioda S, Aruga T. Does Edaravone (MCI-186) Act as an Antioxidant and a Neuroprotector in Experimental Traumatic Brain Injury? *Antioxid Redox Signal* 2007;9:281-287

[学会発表](計 22 件)

- 1) 中町 智哉、押田 佳菜子、養父 佐知子、大滝 博和、森 敬善、佐藤 敦、塩田 清二. 反応性アストロサイトにおけるPACAP受容体発現とその機能的意義の解析. 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会(2009年3月)岡山
- 2) 中町 智哉、大滝 博和、養父 佐知子、野中 直子、William A. Banks、塩田 清二. 内因性PACAPによる虚血性神経細胞死抑制作用の解析. 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会(2009年3月)岡山
- 3) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Sachiko Yofu, Naoko Nonaka, William A. Banks and Seiji Shioda. Endogenous PACAP protects the brain against focal cerebral ischemia in mice. 17th International Symposium on Regulatory Peptides (2009年1月)
- 4) 中町智哉、大滝博和、養父佐知子、会沢洋一、渡邊 潤、関 保、塩田清二. マウス涙腺組織におけるPACAP/PAC1 受容体の分布局在と機能解析. 第 33 回日本比較内分泌大会. (2008年12月)、広島
- 5) Nakamachi T, Oshida K, Yofu S, Mori H, Watanabe J, Ohtaki H, Dohi K, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates proliferation of reactive astrocyte *in vitro*. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. (2008年11月), Washington, DC
- 6) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Naoko Nonaka, William A. Banks and Seiji Shioda. Neuroprotective effect of PACAP and the mechanisms: therapeutic effects in Stroke models.

- Showa University International Symposium for Life Sciences 5th Annual Meeting (2008年9月)
- 7) Nakamachi T, Ohtaki H, Nonaka N, William A. Banks, Shioda S. Neuroprotective effect of PACAP and the mechanisms: therapeutic effects in Stroke models. Showa University International Symposium for Life Science 5th Annual Meeting New Frontiers in Neuroscience: Transmitters/modulators in Health and Disease. (2008年9月), 東京 (シンポジウム)
 - 8) 中町 智哉, 渡邊 潤, 大滝博和, 養父左知子, 塩田清二. 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)の神経幹細胞に対する作用. 第35回日本神経内分泌学会・第23回日本下垂体研究会合同学術集会. (2008年8月), 東京
 - 9) 中町智哉, 渡邊 潤, 養父 佐知子, 大滝博和, 野中直子, 土肥謙二, 塩田 清二. PACAPによる成体神経幹細胞の増殖促進作用. 第5回GPCR研究会 (2008年5月) 東京
 - 10) 中町 智哉, 大滝 博和, 養父 佐知子, 会沢 洋一, 渡邊 潤, 関 保, 塩田 清二. 涙腺におけるPACAPおよびPAC1 受容体の組織分布と涙液分泌促進機構. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2008年3月) 大分
 - 11) 中町 智哉, 養父 佐知子, 大滝 博和, 渡邊 潤, 森 敬善, 塩田 清二. マウス成体神経幹細胞におけるPACAPおよびPAC1R受容体免疫陽性反応の分布局在. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2008年3月) 大分
 - 12) 渡邊潤, 中町智哉, 中村正久, 中条茂夫, 塩田清二. PACAPはin vivoで神経幹細胞のラジアルグリアへの分化誘導に関与する. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会(2008年3月)大分
 - 13) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Kenji Dohi, Sachiko Yofu, Jun Watanabe, Daisuke Hayashi, Hitoshi Hashimoto, Norihito Shintani, Akemichi Baba, Akira Arimura and Seiji Shioda; Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Attenuates Focal Cerebral Ischemic Injury via Bcl-2 and IL-6 Signaling; The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2007年11月) San Diego CA
 - 14) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Kenji Dohi, Sachiko Yofu, Jun Watanabe, Daisuke Hayashi, Hitoshi Hashimoto, Norihito Shintani, Akemichi Baba, Akira Arimura and Seiji Shioda; Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Attenuates Focal Cerebral Ischemic Injury via Bcl-2 and IL-6 Signaling; The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2007年11月) San Diego CA
 - 15) Jun Watanabe, Tomoya Nakamachi, Daisuke Hayashi, Masahisa Nakamura, Shigeo Nakajo, Seiji Shioda; Involvement of beta isoform of protein kinase C in the PACAP-induced differentiation of neural stem cells into astrocytes; The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2007年11月) San Diego CA
 - 16) 中町 智哉, 松野 良介, 林 大祐, 養父 佐知子, 大滝 博和, 渡邊 潤, 塩田 清二; 成体神経幹細胞に対する下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)の作用; 第32回日本比較内分泌学会大会(2007年10月)東京
 - 17) 渡邊潤 中町智哉 中村正久 中条茂男 塩田清二; in vitro及びin vivoにおけるPACAPの神経幹細胞に対するアストロサイト分化誘導作用; 第32回日本比較内分泌学会大会(2007年10月)東京
 - 18) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Kenji Dohi, Sachiko Yofu, Hitoshi Hashimoto, Norihito Shintani, Akemichi Baba, Akira Arimura, Seiji Shioda; NEUROPROTECTIVE MECHANISM OF PACAP ASSOCIATED WITH IL-6 SIGNALING; 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides (2007年9月) Manchester, VT.
 - 19) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Sachiko Yofu, Jun Watanabe, Daisuke

- Hayashi and Seiji Shioda; Distribution of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) and (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) in the mouse brain; 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides (2007 年 9 月) Manchester, VT.
- 20) Jun Watanabe, Tomoya Nakamachi, Daisuke Hayashi, Masahisa Nakamura, Shigeo Nakajo and Seiji Shioda; THE ROLE OF PACAP IN ASTROGLIAL DIFFERENTIATION IN VIVO AND IN VITRO; 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides (2007 年 9 月) Manchester, VT.
- 21) Daisuke Hayashi, Tomoya Nakamachi, Ryosuke Matsuno, Jun Watanabe, Seiji Shioda; Effect of PACAP on neuronal progenitor cells in vivo; 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides (2007 年 9 月) Manchester, VT.
- 22) 中町 智哉、養父 佐知子、渡邊 潤、林大祐、大滝 博和、塩田 清二; マウス脳におけるADNPとPACAP特異的受容体の分布・局在; 第 4 回GPCR研究会(2007 年 5 月)東京

〔図書〕(計 3 件)

- 1) Arata T, Hosono T, Taketomi Y, Kageyama H, Nakamachi T, Shioda S. Increased behavioral activity with regular circadian rhythm in PACAP specific receptor (PAC1) transgenic mice. Transmitters and Modulators in Health and Disease -New Frontiers in Neuroscience-, Springer-Verlag, (Tokyo), (2009) (*in press*)
- 2) Morikawa K, Dohi K, Yofu S, Mihara Y, Nakamachi T, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T. Expression and localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) specific receptor (PAC1R) after traumatic brain injury in mice. Transmitters and Modulators in Health and Disease -New Frontiers in Neuroscience-, Springer-Verlag, (Tokyo), (2009) (*in press*)
- 3) Ohtaki H, Nakamachi T, Watanabe J, Yofu S, Matsunaga M, Matsuno R, Dohi K, Shioda S. Does PACAP have therapeutic potential in the field of neuroregenerative medicine?

Kusano M, Shioda S eds. New Frontiers in regenerative Medicine, Springer-Verlag, 2007 pp135-142.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www10.showa-u.ac.jp/~anat-1/index.html>

受賞

第 35 回日本神経内分泌学会「下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)の神経幹細胞に対する作用」若手研究奨励賞(2008 年 8 月)受賞

6. 研究組織

(1)研究代表者

中町 智哉(NAKAMACHI TOMOYA)

昭和大学・医学部・ポストドクター

研究者番号:30433840

(2)研究分担者

(3)連携研究者