

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 25日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592246

研究課題名(和文) 神経ペプチドPACAPの成体網膜神経幹細胞への作用と網膜神経再生機構の解明

研究課題名(英文) Effect of PACAP on adult retinal stem cell and the regenerative potential.

研究代表者

關保 (SEKI TAMOTSU)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：10245855

研究成果の概要(和文)：

ラット高眼圧モデルを用いて PACAP による網膜保護効果を評価したところ、PACAP は二峰性の網膜神経細胞死抑制効果を示し、cAMP と MAP キナーゼを介していることが示された。また、ヘテロ型 PACAP 遺伝子欠損マウスでは NMDA 硝子体内投与後の網膜障害が野生型と比較して有意に増加した。以上の結果より外因性・内因性の PACAP が神経節細胞に対して保護効果を示すことが明らかになった。さらに、NMDA 投与後の網膜では BrdU 標識細胞が投与3日目でピークとなり、それら BrdU 細胞のほとんどがマイクログリア/マクロファージであった。さらに PACAP 硝子体投与群では網膜神経保護効果を示すとともに網膜内マイクログリア/マクロファージ数も増加させることが明らかになった。PACAP の神経保護機構にはマイクログリア/マクロファージの網膜内の増加が関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Retinal neuroprotective effect of PACAP was evaluated in transient ischemia model induced by high intraocular pressure. PACAP suppressed retinal ganglion cells (RGCs) with bimodal fashion with cAMP and MAPK pathways. Retinal protective effect of endogenous PACAP was examined using heterozygous PACAP KO mice with NMDA model. heterozygous PACAP KO mice showed high number of RGCs and less number of TUNEL positive cells in NMDA-treated retina. These data suggest that exogenous and endogenous PACAP have a neuroprotective potential in retinal RGCs. Furthermore, number of BrdU positive cells peaked on day 3 after NMDA treatment, and about 90 % of BrdU positive cells were overlapped with microglia/macrophage marker. PACAP administration increased the number of BrdU positive cells after NMDA-treatment. Increment of the number of BrdU positive cells may be involved in neuroprotective effect of PACAP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼組織学、緑内障、PACAP、網膜保護

1. 研究開始当初の背景

網膜は中枢神経系に属する唯一の感覚器であり、長年の間、非再生組織と考えられてきた。網膜には視細胞（錐体、杆体）、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞の5つの神経細胞と、ミュラー細胞および網膜色素上皮細胞から構成され、共通の網膜幹細胞から発生する。従来、網膜幹細胞は胎生・新生児期にのみ存在すると考えられてきたが、その一部が成体に至るまで維持されることが明らかとなってきた。Colesらは、毛様体辺縁部の上皮細胞内に、自己複製能と全ての網膜神経細胞に分化する多分化能を併せ持つ網膜神経幹細胞が存在することを明らかにした（Coles BLK et al. PNAS 2004）。またほぼ同時期に、ラットの成体網膜にNMDAによる傷害を加えると、ミュラー細胞が脱分化・増殖し、新たな視神経に分化することが報告された（大音ら, PNAS 2004）。これらの発見は、内在性の成体網膜神経幹細胞が遺伝性もしくは加齢性の網膜変性疾患に対して網膜の機能回復、すなわち神経再生医療を可能にすることを意味している。しかし、成体網膜神経幹細胞の正常時および傷害時の動態に関してはまだ不明な点が多い。

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; 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。PACAPは強力な神経保護効果を持つのと合わせて、神経幹細胞に対して分化・誘導作用を示すことが知られている。PACAPおよびその受容体は網膜組織において発現しており、特に網膜障害後のミュラー細胞ではPACAP受容体の発現が強くなることが知られている。しかしながら、網膜組織におけるPACAPの機能としてはまだ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究はマウスの硝子体内にNMDAを投与して緑内障モデルを作成し、まずPACAPによる網膜神経保護効果とその機構を明らかにする。加えて、PACAP遺伝欠損マウスを用いて網膜内の内因性PACAPによる神経保護効果について明らかにする。さらに網膜損傷後における内在性網膜神経幹細胞に対するPACAPの効果を評価する。

3. 研究の方法

1) ラット高眼圧モデルを用いたPACAPの網膜保護機構の解析

SDラットを麻酔後、前房内に26G針を留置し、110 mmHgで60分間の眼圧負荷を行い、その後眼圧負荷を解除することにより網膜虚血・再灌流モデルを作製した。モデル作製後に実体顕微鏡下でPACAPまたは生理的食塩水を硝子体内に3 μ l単回投与した。PACAPの濃度は、 10^{-15} Mから 10^{-6} Mに分け、無処置群および溶媒コントロール群と比較検討した。高眼圧負荷14日後に眼球を摘出し、定法に従い網膜のパラフィン切片を作成した。顕微鏡下での網膜視神経節数の計測により、PACAPの網膜神経節細胞死抑制効果とその至適濃度の評価を行い、アンタゴニスト同時投与によりシグナル伝達機構を解析した。

2) PACAP遺伝子欠損(KO)マウスを用いた内因性PACAPの網膜保護効果の検討

C57BL/6系統の野生型雄マウスおよびPACAP(+/-) KOマウスをセボフルレンにて全身麻酔し、角膜輪部より約1mm強膜側から32G針を挿入してNMDA (N-methyl, D-aspartic acid, 40 nmol) を硝子体内投与した。またPACAP投与群ではPACAP(10^{-8} - 10^{-16} M)をNMDAと同時に硝子体内投与した。投与1, 3, 7, 14日後に眼球を摘出して10%ホルマリンで固定後に網膜連続パラフィン切片を作成した。HE染色およびTUNEL染色し、3枚の連続する切片を用いて網膜神経節細胞数を計数した。

3) PACAPによる成体網膜神経幹細胞への影響

2)と同様に、C57BL/6系統の野生型雄マウスにNMDAを硝子体内投与して緑内障モデルを作成した。PACAP投与群としてPACAP(10^{-8} - 10^{-12} M)をNMDAと同時に硝子体内投与した。屠殺3時間前にブロモデオキシウリジン(BrdU)を腹腔内に投与し、増殖性細胞をラベルした。投与1, 3, 7, 14日後に眼球を摘出して4%パラホルムアルデヒドで固定後に網膜連続凍結切片を作成した。BrdU抗体を用いて網膜組織を免疫染色し、BrdU陽性細胞を測定した。また、BrdU抗体と各種細胞マーカーとの2重免疫染色を行い、BrdU陽性細胞を同定した。

4. 研究成果

1) 本研究よりPACAP濃度10 f, 10 p, 100 pmol硝子体内投与群では高眼圧による網膜神経節細胞数の減少が有意に抑制されたこ

とから、PACAPの網膜神経保護効果が容量依存性ではなく二峰性であることが明らかになった(図1)。

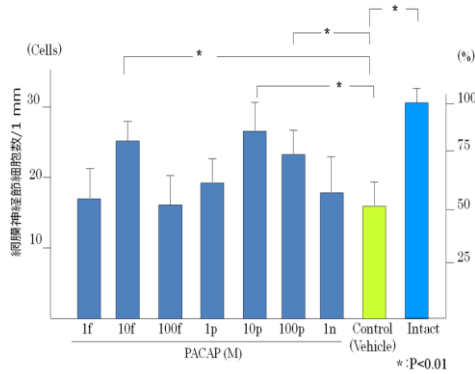


図1 高眼圧誘導性の網膜神経細胞死に対するPACAPの神経保護効果

神経保護作用を認めた3種のPACAP濃度に対してMAPキナーゼ抑制剤およびcAMP拮抗剤を同時投与した。MAPキナーゼ抑制剤投与群は100 pmol投与群にて、cAMP拮抗剤投与群は3群ともにPACAPの網膜神経保護作用を抑制した(図2, 3)。

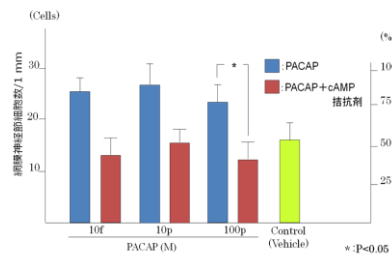


図2 cAMP拮抗剤投与によるPACAPの網膜細胞死抑制作用に対する影響

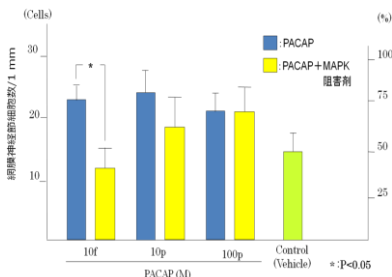


図3 MAPK阻害剤投与によるPACAPの網膜細胞死抑制作用に対する影響

以上の結果から、PACAPは二峰性の網膜神経細胞死抑制効果を示し、そのシグナル伝達は極小濃度の場合はcAMPとMAPキナーゼを介して、そして低濃度ではcAMPを介していると考えられる(Seki 2011)。

2) 野生型マウスにおいて、NMDA投与群の神経節細胞数は無処置群と比較して投与1日目から7日目にかけて減少し、細胞死マーカーであるTUNEL陽性細胞の数は投与1, 3日後で有意に増加した。PACAPの神経節保護効果を示す最適有効濃度を検討した結果、PACAP10-10 M同時投与群はNMDA投与群と比較して神経節細胞数が高値を示し、TUNEL陽性細胞の増加を抑制した。

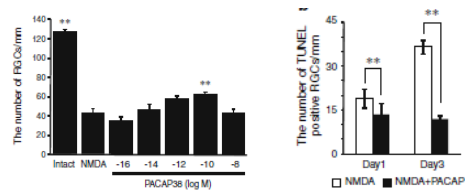


図4 NMDA網膜毒性に対する外因性PACAPの保護効果

野生型マウスとPACAP(+/-)KOマウスの網膜におけるPACAP mRNA発現量をリアルタイムPCR法により比較した結果、PACAP(+/-)KOマウスではPACAP mRNA発現量が野生型の約50%になっていることが確認された。そこで内因性PACAPの網膜保護効果を評価するためにPACAP(+/-)KOマウスにNMDA硝子体内投与を行った。PACAP(+/-)KOマウスではNMDA投与1,3,7日後における神経節細胞数が野生型と比較して有意に減少した。野生型マウスではTUNEL陽性細胞のピークはNMDA投与後3日目であったが、PACAP(+/-)KOマウスでは1日目にピークとなった。

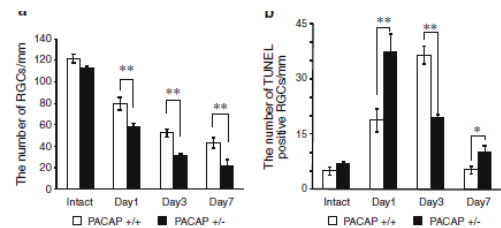


図5 野生型およびPACAP(+/-)KOマウスに対するNMDA毒性の評価

さらに、PACAP(+/-)KOマウスへのPACAP硝子体投与は神経節細胞数の減少およびTUNEL陽性細胞数の増加を抑制した。

以上の結果より、微量の外因性 PACAP は NMDA による網膜神経節細胞死を抑制し、内因性 PACAP の減少は NMDA 誘導性の神経細胞傷害を増悪させることが明らかになった。(Endo 2011)

3) 野生型マウスに NMDA 硝子体投与を行い、その後の BrdU 陽性細胞を評価することにより内在性網膜神経幹細胞の動態観察を試みた。その結果、NMDA 投与 3 日後において網膜内 BrdU 陽性細胞数が最大となり、特に神経節細胞層、内顆粒層および内網状層に多く観察された。PACAP 投与実験では、特に PACAP 10^{-10} M 投与群において、網膜 BrdU 陽性細胞数が増加した。BrdU を用いた 2 重免疫染色により、NMDA 傷害後の網膜内で増加した BrdU 陽性細胞の 90% 近くがマイクログリア/マクロファージであり、網膜神経幹細胞マーカーとして使用されているグルタミン合成酵素は BrdU 陽性細胞との共存を示すことが技術的に困難であり、わずかに重なっていると思われる細胞も 5% 以下であった。以上の結果は PACAP が網膜組織内のマイクログリア/マクロファージ細胞を増加させることを示唆している。

成体網膜神経幹細胞を可視化するためには免疫染色による組織学的評価では不十分であると思われる。今後は、網膜神経幹細胞特異的に蛍光物質を発現する遺伝子改変マウスを用いる必要がある。また、PACAP の網膜保護効果にはマイクログリア/マクロファージが関連していることが示唆されたことから、PACAP の神経保護機構における神経免疫の関わりについて検討していく予定である。

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 2 件)

- ① Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Endo K, Wada Y, Nakamura K, Shioda S: Suppression of rat retinal ganglion cell death by PACAP following transient ischemia induced by high intraocular pressure. *J Mol Neurosci* 43 (1); 30-34, 2011
- ② Endo K, Nakamachi T, Seki T, Kagami N, Wada Y, Nakamura K, Kishimoto K, Hori M, Tsuchikawa D, Shinntani N, Hashimoto H, Baba A, Koide R, Shioda S: Neuroprotective effect of PACAP against NMDA-induced retinal damage in the mouse. *J Mol Neurosci* 43 (1); 22-29, 2011

[学会発表] (計 13 件)

- ① 中町 智哉、会沢 洋一、大滝 博和、養父 佐知子、関 保、和田 悦洋、荒田 悟、新谷 紀人、橋本 均、馬場 明道、塩田 清二。PACAP 誘導性の涙液分泌におけるアควアポリン 5 の役割。第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会。(甲府, 2012. 3)
- ② Nakamachi T, Aizawa Y, Ohtaki H, Seki T, Wada Y, Kagami N, Arata S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Farkas J, Reglodi D and Shioda S. PACAP STIMULATES THE LACRIMATION VIA AQUAPORIN 5 TRANSLOCATOR IN MOUSE. The 10th international Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. (Eilat, Israel, 2011. 12).
- ③ Tomoya Nakamachi, Keisuke Nakamura, Yoshihiro Wada, Nobuyuki Kagami, Daisuke Tsuchikawa, Motohide Hori, Nori Imai, Akira Yoshikawa, Tamotsu Seki, Satoru Arata, and Seiji Shioda. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on reactive astrocyte induced by brain damage in mice. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington, DC, 2011. 11)
- ④ 中町智哉・会沢洋一・大滝博和・関 保・和田悦洋・加賀美信幸・荒田 悟・塩田清二。PACAP による涙液分泌促進作用機序の解析第 36 回日本比較内分泌学会 (東京, 2011. 11)
- ⑤ 中町 智哉、会沢 洋一、大滝 博和、関 保、和田 悦洋、加賀美 信幸、荒田 悟、塩田 清二。涙液分泌機能低下を示す PACAP 欠損マウスを用いた涙液分泌機構の解析。第 58 回日本実験動物学会。(東京, 2011. 5)
- ⑥ Seki T, Nakamachi T, Endo K, Shioda S. Investigation Of Neuroprotective Effects Of PACAP Against NMDA-induced Retinal Damage in Mice. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) (Fortlauderdale, FL., 2011. 5)
- ⑦ Nakamachi T, Endo K, Seki T, Kagami N, Nakamura K, Wada Y, Kishimoto K, Farkas J, Arata S, Shioda S: Retinal Protective Effect of Pituitary Adenylate

Cyclase-activating Polypeptide (PACAP) Against NMDA-induced Damage in Mice. 5th International Peptide Symposium (Kyoto, 2010. 12)

- ⑧ 中町智哉、会沢洋一、大滝博和、関 保、遠藤貴美、荒田 悟、新谷紀人、橋本 均、馬場明道、塩田清二：新規ドライアイ疾患モデル動物としての PACAP 遺伝子欠損マウスの評価. 第 57 回日本実験動物学会 (京都, 2010. 5)
- ⑨ Endo K, Nakamachi T, Seki T, Kagami N, Nakamura K, Wada Y, Kishimoto K, Ichihashi Y, Shioda S: Neuroprotective effect of PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) against NMDA-induced retinal damage in mice. Official satellite symposium of the 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010) (GPCR2010) (Kyoto, 2010. 3)
- ⑩ 中町智哉・会沢洋一・大滝博和・養父佐知子・関 保、遠藤貴美、荒田 悟、新谷紀人、橋本 均、馬場明道、塩田清二：PACAP 遺伝子欠損マウスにおける涙液分泌機能異常. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (盛岡, 2010. 3)
- ⑪ 遠藤貴美・中町智哉・関 保・加賀美信幸・中村圭輔・市橋陽子・塩田清二：NMDA 誘導性網膜障害マウスに対する PACAP の保護効果. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (盛岡, 2010. 3)
- ⑫ Itoh H, Seki T, Nakamachi T, Endo K, Shioda S: Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the survival of ganglion cells in the rat retina after intraocular hypertension. Yakushima 2009 (Satellite Symposium of the 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides) Phylogenetic Aspects of Neuropeptides - from Invertebrates to Humans (Yakushima, Kagoshima, 2009. 10)
- ⑬ Nakamachi T, Aizawa Y, Ohtaki H, Yofu S, Seki T, Endo K, Nakamura K, Kagami N, Arata S, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S: Effect of PACAP on tear secretion in mouse. The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides (Kagoshima, 2009. 10)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.showa-u.ac.jp/sch/med/major/anat-1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 保 (SEKI TAMOTSU)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：10245855

(2) 研究分担者

中町 智哉 (NAKAMACHI TOMOYA)

昭和大学・遺伝子組換え実験室・助教

研究者番号：30433840

(3) 連携研究者

塩田 清二 (SHIODA SEIJI)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：80102375