

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460100

研究課題名(和文) シナプス病態に関わるPACAPによるスパイン動態制御機構の解析

研究課題名(英文) Mediation of neuronal maturation and spinogenesis by PACAP signaling in primary hippocampal neurons

研究代表者

早田 敦子 (HAYATA, ATSUKO)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：70390812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：スパイン形成不全は、神経回路に異常を呈する精神疾患の共通基盤である可能性が示されている。本課題では、精神疾患に関わるPACAPによるスパイン動態の制御機構を検討した。初代培養神経細胞においてPACAPによるスパイン密度の増加は、miR-132機能阻害やERKのリン酸化阻害剤により抑制された。また、PACAP欠損マウス由来の培養神経細胞にmiR-132を強制発現した結果、スパイン密度の減少が一部改善された。本成果は、PACAP欠損マウスにおける精神行動異常が、スパイン形成異常に関連することを示唆するものであり、精神行動異常がmiRNAにより制御される機構を明らかにする手がかりになると期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent evidence implicates that abnormalities in dendritic spines are key substrates in the pathogenesis of several neuropsychiatric disorders. In this study, we analyzed the molecular mechanism for the spine maturation and spinogenesis by PACAP signaling. Here, we observed that miR-132 sponge and the MEK1/2 inhibitor U0126 blocked the PACAP-mediated increase in spine maturation and spinogenesis. In contrast, overexpression of miR-132 partly rescued the spine reductions in the PACAP-deficient primary neurons.

These data indicate that PACAP-miRNA132 signaling pathway is critically implicated in spine formation and contribute to understand the molecular mechanisms underlying neuropsychiatric disorders such as schizophrenia.

研究分野：分子神経科学

キーワード：PACAP シナプス病態 精神疾患 樹状突起スパイン

1. 研究開始当初の背景

神経細胞には、興奮性シナプス後部構造である樹状突起スパインが存在し、記憶・学習の基盤となる神経可塑性との関連性が知られている。近年、統合失調症、うつ病などの精神疾患において、樹状突起スパインの形成不全は神経回路に異常を呈する精神疾患の共通基盤である可能性が示されている (Penze, et. al., Nat. Neurosci. Rev., 2011)。その根拠として、一部の統合失調症患者やアルツハイマー型認知症患者の死後脳において、スパイン密度の減少が認められていることや、精神疾患のリスク因子がシナプスやスパインに局在し、興奮性神経伝達を司る NMDA 受容体や関連受容体の発現減少やシナプス可塑性に関与しうることが挙げられる。このように、精神疾患とスパインの機能的関連性を示す知見が蓄積されつつあるが、その分子機構は複雑で未解明な部分が多く、リスク因子とシナプス関連遺伝子の時空間的な発現・局在制御や機能・シグナル制御は明らかではない。また、遺伝的要因だけでなく、慢性ストレスなどの環境要因においても樹状突起スパインの形態異常や NMDA 受容体や関連シグナル伝達系の異常が認められ、シナプス病態を示すことが報告されている (Li, et. al., Biol. Psychiatry, 2011)。さらに近年、多くのタンパク質の発現を制御する microRNA (miRNA) が、スパイン形成や精神行動の異常に関わる因子として注目されている。miRNA の発現異常は、疾患の病因となると考えられ、疾患治療に向けた手がかりになると期待されている。

一方、pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は脳の広い領域に発現し、神経伝達調節因子や神経保護因子様の作用を示すなど、多機能性を特徴とする神経ペプチドである。これまでに我々が行った行動薬理学的検討から、PACAP 欠損マウスは、新奇環境下における多動・頻繁なジャンプ行動に加え、統合失調症等で認められる PPI 障害、認知機能の障害、うつ状態などが認められ、PACAP シグナルの機能変化と精神疾患との関連が強く示唆されている (Hashimoto, et. al., PNAS, 2001; J. Neurochem., 2009)。また、この精神行動異常はドパミン D2 (D2) /セロトニン 2A (5-HT_{2A}) 受容体拮抗薬により改善することや幼若期の豊かな環境飼育下により改善することが見出された (Ishihama, et. al., Behav. Brain Res., 2010)。そこで、統合失調症の新たな治療標的分子やパスウェイを見出すことを目的に、PACAP の分子神経化学的解析を進めた。PACAP 欠損マウスでは、海馬 CA1 野においてスパインの数の異常が見られることを発見し、PACAP 投与が発達過程で神経軸索伸長を促進することや、スパインを増加させることを見出し、PACAP は、神経細胞のシナプス成熟において重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、こ

れらを説明する分子基盤として、新たな治療標的として期待ができる miRNA に着目し、PACAP 投与が miR-132 の発現を誘導するという興味深い結果を得た。miR-132 は成熟脳に豊富に存在し、スパイン形成に関連する p250GAP を標的遺伝子として制御することが報告されている (Wayman, et. al., PNAS, 2008)。

2. 研究の目的

精神疾患に見られる行動異常などの表現型はシナプス機能障害に起因し、シナプスの正常化により治療できる可能性が考えられる。実際にシナプス伝達や神経細胞の興奮性の調節機能を担う受容体などの細胞膜上機能分子の局在を明らかにし、これらがシナプス機能の変化に伴ってどのように変化するかを明らかにすることで、脳、精神疾患の発症やシナプス可塑性のメカニズムの理解を目指す。PACAP は、神経回路構築やスパイン形成に関わる分子であり、シナプス形成や機能を制御しうることがある。そこで前述の先行研究を踏まえて、シナプスの機能障害を反映する PACAP 欠損マウスや、初代培養神経細胞に蛍光観察システムを用いることにより、PACAP シグナルによるスパインの動態や機能を制御する仕組みを理解することを目的とする。また、スパイン上での PACAP シグナルやセロトニン受容体との相互作用の役割を解析し、精神疾患発症・病態の分子基盤の理解や新規創薬ターゲットとしての有用性を探る。

3. 研究の方法

(1) 初代培養神経細胞を用いた PACAP によるスパイン解析

胎生 16 日齢の ICR 系の野生型または PACAP 欠損マウス胚の海馬より初代培養神経細胞を調製した。レンチウイルスを用いて蛍光タンパク質 tdTomato を発現することによりスパインを可視化した後、培養開始 19 日目に PACAP を添加し 21 日目に固定した。成熟スパインの指標として PSD-95 を免疫染色し、総スパイン密度と PSD-95 陽性スパイン密度を解析した。

(2) PACAP による下流シグナル解析、miRNA を介したスパイン解析

PACAP による miR-132 の発現量の増加とスパイン形成・成熟との関連を調べるために、miR-132 を機能阻害する miR-132 sponge をレンチウイルスにて強制発現し、スパイン密度の変化を解析した。さらに、PACAP 添加 24 時間後に total RNA を回収し、miR-132 の標的となる mRNA の発現量を RT-qPCR により解析した。また、スパイン形成に関わる PACAP 受容体の下流シグナルパスウェイを解析するために、PKA 阻害剤 H89、PKC 阻害剤 GF109203X、BDNF 受容体 TrkB のチロシンキナーゼ阻害剤 K252a および ERK1/2 リン酸化阻害剤 U0126 によ

るスパイン密度と miR-132 の発現量への影響を検討した。

(3) PACAP による GPCR のインターナリゼーションの解析

PACAP の特異的受容体である PAC1 が内在的に発現している HEK293T 細胞に, Halo タグ融合 5-HT_{2A}, D2, 代謝型グルタミン酸 2 (mGluR2) 受容体を導入した .24 時間後に膜非透過性蛍光リガンドを用いて細胞膜上に局在している受容体を標識した . さらに, PACAP で刺激し, 30 分間培養した後固定し, 共焦点顕微鏡にて観察を行った . 解析には, 細胞の形状を設定し, 細胞全体の輝度を測定した . 設定した形状を元に, 細胞質中を認識する形状を設定し, 細胞質内の輝度を測定した . インターナリゼーションの割合は, 細胞質内の輝度/細胞全体の輝度として算出した . また, Western blot 法を用いて, 初代培養神経細胞の内在的な受容体に対し, PACAP 添加 30 分後の細胞膜上発現量を測定した .

遺伝子組み換え実験および動物実験は, すべて大阪大学の実験指針を遵守し, 大阪大学の遺伝子組み換え実験委員会と動物実験委員会の承認を得て倫理的に実施した .

4 . 研究成果

(1) 初代培養神経細胞を用いた PACAP によるスパイン形成解析

マウス初代培養海馬神経細胞において, 19 日間の培養後に PACAP を添加し, 2 日後にスパインの数の変化を検討した結果, スパインは, PACAP の濃度依存的に, 新たに形成・成熟することが明らかになった . また, シナプス形成に関わることが知られている miR-132 の発現量は, PACAP により有意に増加するが, miR-132 の標的因子のうち, マウス神経細胞にて発現が認められている 8 つの遺伝子について PACAP による発現変化を解析した . その結果, これまでに明らかであったスパイン形成に関わる RhoGAP ファミリーの p250GAP だけでなく, MeCP2 と DPYSL3 についても, PACAP により有意に発現量の低下が認められた . MeCP2 は, 自閉症症候群と関連した神経発達障害である Rett 症候群の原因因子として知られている .

(2) PACAP による下流シグナル解析, miRNA を介したスパイン解析

PACAP によるスパイン新生は, miR-132 発現抑制作用を持つ miR-132 sponge により抑制され, PACAP による p250GAP の mRNA の発現減少も, miR-132 sponge により部分的に回復することが明らかになった . また, PACAP 受容体の下流シグナルの解析の結果, PACAP による miR-132 発現量の増加, およびスパインの形成と成熟促進は, PKA および PKC シグナル阻害剤では影響を受けず, ERK1/2 リン酸化阻害剤により抑制された .

一方で, PACAP は, 神経保護作用やシナプス形成を促進する BDNF (brain-derived

neurotrophic factor) の発現を誘導することが知られている . PACAP, BDNF とともに, miR-132 を発現誘導するが, PACAP の作用が, BDNF を介するものかどうかについては, まだ不明な点が多い . そこで, 神経細胞の発達過程における PACAP の役割と BDNF との関わりを明らかにすることを目的とし, PACAP による BDNF の発現変動, スパイン形成への影響について検討した . BDNF 受容体 TrkB のチロシンキナーゼ阻害薬 K252a は, PACAP による miR-132 発現に影響を与えなかった . また, PACAP による BDNF 発現は, カルシニューリンに依存的であることが知られている . 培養 5 日目において, カルシニューリン阻害剤は, PACAP による BDNF 発現を抑制したが, 培養 20 日目では抑制しなかった . しかし, カルシニューリン阻害剤は, 培養 20 日目での PACAP による miR-132 発現増加を抑制した . 以上より, 神経細胞の発達後期において, PACAP シグナルは, 少なくとも BDNF の発現増加を介さずに, スパイン形成を促進すること, また両者にカルシニューリン活性が関与することなどが示唆された .

(3) PACAP 欠損マウス由来の初代神経培養細胞を用いた検討

PACAP によるスパイン形成促進作用に miR-132 の関与が示唆されたため, PACAP / miR-132 シグナルは, PACAP 遺伝子欠損マウス由来の初代培養神経細胞におけるスパイン密度の減少にも関与している可能性が考えられる . そこで, miR-132 のレンチウイルスを作製し, PACAP 欠損マウスの初代培養神経細胞に強制発現させた . その結果, PACAP 遺伝子欠損マウス由来の初代培養神経細胞におけるスパイン密度の減少が一部改善されることが明らかになった . このことは, miR-132 の発現減少が PACAP 遺伝子欠損マウスの初代培養海馬神経細胞における総スパイン密度と PSD-95 陽性スパイン密度の低下に関与することを示唆すると共に, PACAP がスパインの形成と成熟に関与することを裏付けるものであると考えられる . 本研究の成果は, PACAP 遺伝子欠損マウスにおける精神行動異常の原因が, スパイン形成異常に関連することを示唆するものであり, 統合失調症に伴う精神行動異常が, miRNA により制御される機構を明らかにする手がかりになると期待される .

(4) PACAP による GPCR のインターナリゼーションの解析

PACAP シグナル機能低下により 5-HT_{2A} 受容体の機能が亢進し, 精神神経機能異常を起こす可能性が想定されている . このことは, 5-HT_{2A} 機能を抑制する内因性の精神機能調節機構に PACAP が関与している可能性を示す . これまでに PACAP により 5-HT_{2A} 受容体がインターナリゼーションを示すことを明らかにしている . 統合失調症などの精神疾患と関連し, 5-HT_{2A} 受容体と結合すること

が報告(Gonzalez-Maeso, et. al., Nature, 2008) されている mGluR2 受容体や D2 受容体においても, PACAP により直接的なインターナリゼーションが引き起こされるか HEK293T 細胞を用いて検討した。その結果, mGluR2 受容体や D2 受容体は, PACAP により直接的な動態制御を受けず, 本作用は, 5-HT_{2A} 受容体選択的であることが明らかになった。

そこで, 初代培養海馬神経細胞を用いて, 細胞膜表面上に存在するタンパク質のピオチン標識および単離を行い, ウエスタンブロット検出した。PACAP 投与時における細胞膜表面の 5-HT_{2A} 受容体の発現量の変動を解析した結果, PACAP 投与 30 分後, PACAP 特異的受容体である PAC1 受容体の細胞膜上の発現量低下が認められたのと共に, 5-HT_{2A} や mGluR2 受容体の発現量の低下が認められた。また, 5-HT_{1A} 受容体の変動は認められなかった。このことは, mGluR2 受容体は PACAP から直接的な影響は受けないものの, 5-HT_{2A} 受容体と結合することによりインターナリゼーションし, 5-HT_{2A} 受容体と共に PACAP により機能制御を受ける可能性を示すものである。これらの結果は, PACAP が実際の神経細胞における内在的な 5-HT_{2A} 受容体の機能調節に関わる可能性を示すものである。

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 13 件)

Shibasaki Y, Hayata-Takano A, Hazama K, Nakazawa T, Shintani N, Kasai A, Nagayasu K, Hashimoto R, Tanida M, Katayama T, Matsuzaki S, Yamada K, Taniike M, Onaka Y, Ago Y, Waschek JA, Köves K, Reglodi D, Tamas A, Matsuda T, Baba A, Hashimoto H.

Atomoxetine reverses locomotor hyperactivity, impaired novel object recognition, and prepulse inhibition impairment in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience*, 297, 95-104, 2015. 査読有
DOI:10.1016/j.neuroscience.2015.03.062

Hayata-Takano A, Hazama K, Moriguchi K, Ago Y, Encho N, Nakazawa T, Nagayasu K, Kasai A, Onaka Y, Shintani N, Baba A, Hashimoto H.

PACAP シグナルによる精神神経機能調節におけるセロトニン 2A 受容体シグナルの関与

日本神経精神薬理学雑誌, 35(2), 55-56, 2015, 査読無

Schulze W, Hayata-Takano A, Kamo T, Nakazawa T, Nagayasu K, Kasai A, Seiriki K, Shintani N, Ago Y, Farfan C, Hashimoto R, Baba A, Hashimoto H.
Simultaneous neuron- and astrocyte-specific fluorescent marking
Biochem. Biophys. Res. Commun., 459(1), 81-85, 2015 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2015.02.073

Ogata K, Shintani N, Hayata-Takano A, Kamo T, Higashi S, Seiriki K, Momosaki H, Vaudry D, Vaudry H, Galas L, Kasai A, Nagayasu K, Nakazawa T, Hashimoto R, Ago Y, Matsuda T, Baba A, Hashimoto H.
PACAP Enhances Axon Outgrowth in Cultured Hippocampal Neurons to a Comparable Extent as BDNF
Plos One, 10(3), e0120526, 2014 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0120526

Hazama K, Hayata-Takano A, Uetsuki K, Kasai A, Encho N, Shintani N, Nagayasu K, Hashimoto R, Reglodi D, Miyakawa T, Nakazawa T, Baba A, Hashimoto H.
Increased Behavioral and Neuronal Responses to a Hallucinogenic Drug in PACAP Heterozygous Mutant Mice
Plos One, 9(2), e89153, 2014 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0089153

Tanida M, Hayata-Takano A, Shintani N, Yamamoto N, Kurata Y, Shibamoto T, Morgan DA, Rahmouni K, Hashimoto H.
Central PACAP mediates the sympathetic effects of leptin in a tissue-specific manner
Neuroscience, 238, 297-304, 2014 査読有
DOI:10.1016/j.neuroscience.2013.02.016

Ago Y, Hiramatsu N, Ishihama T, Hazama K, Hayata-Takano A, Shibasaki Y, Shintani N, Hashimoto H, Kawasaki T, Onoe H, Chaki S, Nakazawa A, Baba A, Takuma K, Matsuda T.

The selective metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist MGS0028 reverses psychomotor abnormalities and recognition memory deficits in mice lacking the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
Behav. Pharmacol., 24, 74-77, 2013 査読有
DOI:10.1097/FBP.0b013e32835cf3e5

[学会発表](計 20 件)

加茂 俊彦

miRNA を介した PACAP による樹状突起スパイン形成機構

2015 年 9 月 24 日, 東京, タワーホール船堀
橋本 均

Roles of PACAP in depression-like behavior

12th International Symposium on VIP/PACAP and Related Peptide

2015 年 9 月 23 日, トルコ, カッパドキア

吾郷 由希夫

Overactivation of the VPAC2 receptor during postnatal brain maturation induces changes in synaptic proteins and selective alterations in prepulse inhibition in mice

12th International Symposium on VIP/PACAP and Related Peptide

2015 年 9 月 22 日, トルコ, カッパドキア

早田 敦子

PACAP-PAC1 signaling pathway regulates internalization of serotonin 2A receptor in a PKC and barrestin2 dependent manner

29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology

2014 年 6 月 22 日, カナダ, バンクーバー

森口 啓太

A crosstalk between PACAP and serotonin 2A signaling

20th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEG2014)

2014 年 9 月 7 日, 京都, 京都ガーデンパレス

早田 敦子

PACAP induces internalization of serotonin 2A receptor in a protein kinase C-dependent manner

AsCNP2013, 2013 年 9 月 12 日, 中国, 北京

早田 敦子

Analysis of PACAP signaling-mediated receptor internalization using the HaloTag system

The 11th international symposium on VIP, PACAP and related peptide, 2013 年 8 月 30 日, ハンガリー, ペーチ

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学・大学院連合小児発達学研究所 附属
子どものこころの分子統御機構研究センター

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kokoro/group.htm>

大阪大学・大学院薬学研究科・神経薬理学部門
<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早田 敦子 (HAYATA, Atsuko)

大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・
助教

研究者番号: 70390812

(3) 連携研究者

橋本 均 (HASHIMOTO, Hitoshi)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 30240849