

令和元年5月21日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08269

研究課題名(和文) 統合失調症脆弱因子PACAPによるmiRNAを介した精神行動の制御機構の解析

研究課題名(英文) PACAP induces spine morphogenesis and synaptic function via miRNA upregulation.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、精神疾患に関わるPACAPが初代培養海馬神経細胞において、記憶や学習に関わるNMDA受容体のサブユニットの細胞膜上の発現量や活性化を促進し、プレシナプスと隣接するPSD-95陽性の成熟スパインを増加させるなど、神経細胞の機能的なシナプスを増加させる作用を示すことを明らかにした。一方でPACAP欠損マウスでは、この機能的なシナプスが有意に減少しており、レンチウイルスを用いてPACAP欠損マウスの海馬CA1領域にmiR-132を過剰発現させた結果、有意なスパイン密度の増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの成果は、統合失調症様の精神行動異常を示すPACAP欠損マウスにおける海馬CA1でのスパインの数の低下が、特定のmiRNAにより改善することを示唆するものであり、統合失調症の病態メカニズムにつながるものであると考えられる。本研究は統合失調症の治療にむけた創薬のための基礎データを提供できるという点からも重要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that PACAP significantly increased the number of PSD-95-positive spines with juxtapositioned synaptophysin-positive presynaptic terminals. We also showed that PACAP significantly increased the biotinylated NR1 and NR2B in the primary cultured hippocampal neurons, suggesting that surface expression of the NMDA receptor is increased by PACAP. On the other hand, we found that the density of PSD-95-positive spines with juxtapositioned synaptophysin-positive presynaptic terminals was significantly low in the primary cultured hippocampal neurons from PACAP deficient mice compared with WT mice. Furthermore, viral miR-132 overexpression reversed the reduction in the CA1 region of hippocampal spinal density in the PACAP deficient mice. These results indicate that PACAP signaling plays a critical role in spine morphogenesis possibly via miR-132.

研究分野：神経分子薬理学

キーワード：PACAP 統合失調症 miRNA 樹状突起スパイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、全人口の約 1 %が罹患し、幻覚などの陽性症状、感情鈍麻などの陰性症状、認知機能障害などの症状を示す深刻な精神疾患である。この精神疾患は、多くの関連遺伝子が複雑に絡み合う多遺伝子疾患であると考えられているが、その分子病態は依然として不明な点が多い。Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、神経伝達物質・神経調節因子としての機能が知られる神経ペプチドである。近年の臨床研究により、PACAP 遺伝子座では統合失調症患者における海馬体積の減少や視覚性記憶障害と関連する一塩基多型が存在すること (Hashimoto, Mol. Psychiatry, 2007) や、受容体の 1 つである VIP2 受容体遺伝子のコピー数変異が、統合失調症の発症原因である可能性 (Vacic, Nature, 2011) が報告され、PACAP シグナルが統合失調症と密接に関連することが示唆されている。しかし、これら臨床研究で得られた知見を説明できる PACAP の統合失調症に関わる分子メカニズムは、いまだに明らかではない。

一方、がんをはじめとする様々な多遺伝子疾患と microRNA (miRNA) との関連性が強く示唆されている。多くのタンパク質の発現を緻密に制御する miRNA の発現異常は疾患の病因となると考えられ、miRNA を適切に制御することが可能になれば、疾患治療に向けた手がかりになると期待される。近年、統合失調症ゲノムワイド関連研究 (GWAS) コンソーシアムが行った大規模 GWAS では、統合失調症に miRNA が関与するという報告がなされた (Nature Genetics, 2011)。このように miRNA が脳高次機能のみならず、統合失調症に関わるという知見が蓄積されつつあるが、その多くが miRNA の標的遺伝子の解析研究であり、疾患に伴う精神行動異常が miRNA により制御される仕組みや、miRNA 自身の発現制御の分子機構については、依然として理解が進んでいない。

### 2. 研究の目的

PACAP は、以前の検討により miRNA の 1 つである miR-132 の発現を増加させること、また、神経回路や神経細胞の情報伝達の間である樹状突起スパインの形成に関わることが想定されており、シナプスの機能を制御しうる可能性がある。統合失調症などの精神疾患に見られる精神行動異常などの表現型は、シナプスの機能障害に起因し、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。そこで本研究では、PACAP が機能的なシナプス形成を調整しうるのか、また、PACAP により発現上昇する miR-132 をマウス脳内へ強制発現し、マウス個体レベルにおいて、樹状突起スパインや精神行動に与える影響を検討することにより、統合失調症の精神行動異常に関わる分子メカニズムの理解を推進することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 初代培養神経細胞を用いた PACAP による樹状突起スパイン解析

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。PACAP を添加した 2 日後である培養開始後 21 日目において細胞を固定し、成熟スパインの指標である PSD-95 とプレシナプスの指標である Synaptophysin の抗体を用いて二重免疫細胞染色を行い、共同在する樹状突起スパインの数を計測した。また、ビオチンにより初代培養神経細胞の細胞膜表面に存在するたんぱく質を単離し、PACAP による膜上蛋白質の発現量の変化をウエスタンブロット法により定量した。さらに、4-AP と Bicuculine を用いたシナプス刺激実験を行い、PACAP の有無による変化を ERK のリン酸化を指標にウエスタンブロット法にて定量した。

#### (2) レンチウイルスを用いたマウス海馬の CA1 領域への miRNA の強制発現

蛍光蛋白質 Venus を付加した miR-132 をレンチウイルスにて作製した。作製したレンチウイルスを野生型および PACAP 欠損マウス脳海馬 CA1 領域の両側に導入し、2 週間後に脳を採取し、RT-PCR や樹状突起スパインの数を計測し、Venus のみが発現するレンチウイルスを投与したマウスを対照群として、比較検討した。

遺伝子組み換え実験および動物の飼育や実験等は、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 によるスパイン解析

培養開始後 19 日目の初代培養海馬神経細胞に 1, 10, 100 nM PACAP を

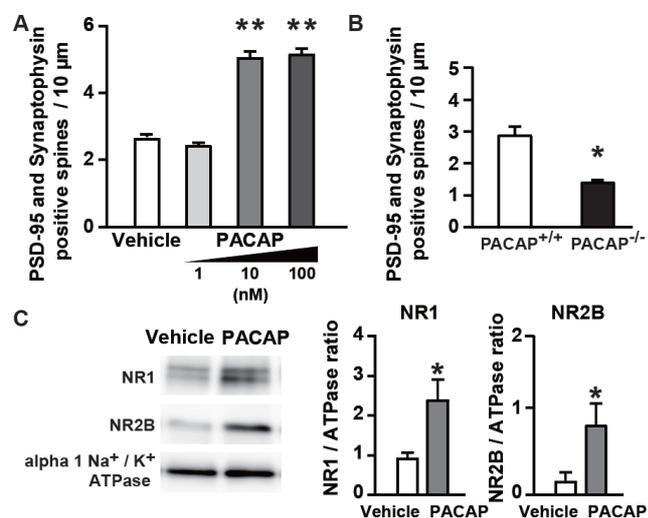


図1 初代培養神経細胞においてPACAPは機能的なスパイン形成を促進する  
A, B) シナプトフィジンとPSD-95による免疫染色画像と解析結果  
C) ビオチン化した細胞膜上発現受容体のウエスタンブロットと定量結果

添加し、2日後の培養開始後21日目に固定し、免疫細胞染色法により解析した結果、PSD-95陽性の成熟スパインと隣接する Synaptophysin 陽性プレシナプスの数が10 nM以上の濃度において有意に増加することが明らかになった(図1A)。その一方で、PACAP欠損マウス由来の初代培養海馬神経細胞では、この隣接するプレシナプスと成熟スパインの数が有意に減少していた(図1B)。このプレシナプスとスパインの隣接は、結合した機能的なシナプスと考えられる。そこで実際に、PACAPが機能的なシナプス形成を促進しているかを検討するために、ビオチンを用いた培養神経細胞膜表面に存在する蛋白質を単離し、発現量を検討した結果、PACAPは、NMDA受容体のサブユニットであるNR1およびNR2Bの細胞膜表面の発現量を増加させることが明らかになり、PACAPによりポストシナプスの細胞膜上のNMDR受容体が増加した可能性が考えられる(図1C)。また、ナトリウムチャネル阻害剤である4-APとGABA<sub>A</sub>受容体阻害剤であるBicucullineの投与によりシナプス刺激実験を行い、ERKのリン酸化を指標にウエスタンブロットによりNMDA受容体を介したシナプス活性を定量した結果、PACAP添加した細胞では刺激5分後のERKのリン酸化が上昇していることが見いだされた。これらの結果は、神経細胞においてPACAPが機能的なシナプス形成を促進することを示唆している。

(2) レンチウイルスを用いたマウス海馬のCA1領域へのmiRNAの強制発現

蛍光蛋白質 Venus を付加した miR-132 (miR-132-Venus) をレンチウイルスにて作製し、野生型および PACAP 欠損マウス脳の花馬 CA1 領域の両側に導入し(図 2A)、2 週間後に脳を採取した。RT-PCR や樹状突起スパインの数を計測し、Venus のみが発現するレンチウイルスを投与したマウスを対照群として、比較検討した。RT-PCR の結果、miR-132-Venus を投与したマウスでは CA1 領域にて有意な miR-132 発現量の増加が認められ、脳に豊富に存在する別の miRNA である miR-124 の発現量には差が認められなかった。次に、脳切片を作成し、CA1 領域にて Venus の蛍光が認められることを確認し(図 2A)、Venus 陽性の樹状突起スパインの数を計測した結果、PACAP 欠損マウスにおいて、減少していた樹状突起スパインの数が野生型マウスと同程度まで回復していることが明らかになった(図 2B)。この結果は、統合失調症様の精神行動異常を示す PACAP 欠損マウスにおける海馬 CA1 でのスパインの数の低下が特定の miRNA により改善することを示唆するものであり、統合失調症の病態メカニズムにつながるものだと考えられる。

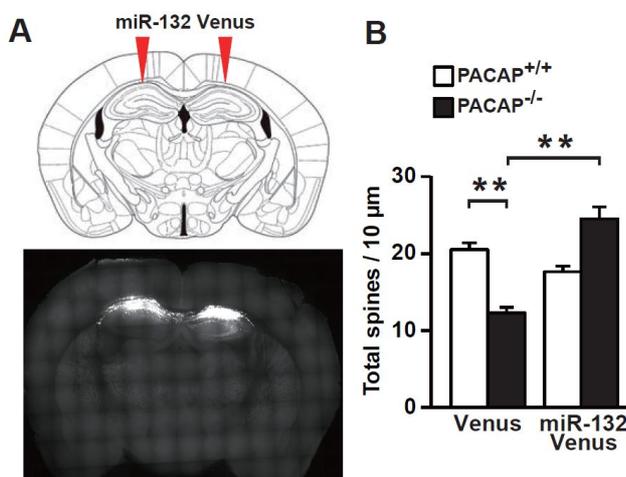


図2 miR-132発現はPACAP欠損マウスのスパイン密度を増加させた  
A) 海馬CA1領域にmiR-132をレンチウイルスにて導入した  
B) miR-132を強制発現した樹状突起スパインの解析結果

Hayata-takano, J. Neurosci. 2019より一部改変

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計16件)

Hayata-Takano A, Kano T, Kijima H, Seiriki K, Ogata K, Ago Y, Nakazawa T, Shintani Y, Higashino K, Nagayasu K, Shintani N, Kasai A, Waschek JA, Hashimoto H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates dendritic spine maturation and morphogenesis via microRNA-132 upregulation. *Journal of Neuroscience*, 2019, In press, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2468-18.2019. 査読有

Seiriki K, Kasai A, Nakazawa T, Niu M, Naka Y, Tanuma M, Igarashi H, Yamaura K, Hayata-Takano A, Ago Y, Hashimoto H. FAST, block-face serial microscopy tomography, for whole-brain imaging at subcellular resolution. *Nature protocol* 2019, In press, doi: 10.1038/s41596-019-0148-4. 査読有

Shintani Y, Hayata-Takano A, Moriguchi K, Nakazawa T, Ago Y, Kasai A, Seiriki K, Shintani N, Hashimoto H.  $\beta$ -Arrestin1 and 2 differentially regulate PACAP-induced PAC1 receptor signaling and trafficking. *Plos One*, 2019, 13(5):e0196946. doi: 10.1371/journal.pone.0196946. 査読有

Ago Y, Hayata-Takano A, Kawanai T, Yamauchi R, Takeuchi S, Cushman JD, Rajbhandari AK, Fanselow MS, Hashimoto H, Waschek JA. Impaired extinction of cued fear memory and abnormal dendritic morphology in the prelimbic and infralimbic cortices in VPAC2 receptor (VIPR2)-deficient mice. *Neurobiol Learn Mem*.2017, 145:222-231. doi: 10.1016/j.nlm.2017.10.010. 査読有

Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue KI, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Waschek JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H. High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents

and primates. *Neuron*. 2017, 94(6):1085-1100.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2017.05.017. 査読有

早田 敦子, 吾郷 由希夫, 橋本 均 分子から迫る神経薬理学 神経ペプチド PACAP およびその受容体をターゲットとした臨床応用 *Clinical Neuroscience*, 2017, 35(10)1150-1151 査読無

早田 敦子, 吾郷由希夫, 橋本 均 分子から迫る神経薬理学 神経ペプチド PACAP およびその受容体の発現分布と生理的作用 *Clinical Neuroscience*, 2017, 35(9) 1034-1036 査読無

早田 敦子, 吾郷 由希夫, 橋本 均 分子から迫る神経薬理学 神経ペプチド PACAP およびその受容体の種類と構造 *Clinical Neuroscience*, 2017, 35(8) 912-913 査読無

〔学会発表〕(計 29 件)

吾郷 由希夫 2019 年  
ゲノムコピー数変異に着目した統合失調症の創薬研究 日本薬学会第 139 年会

早田 敦子 2018 年  
マウス新生仔へのプロスタグランジン D2 受容体 DP1 作動薬による神経細胞の形態や行動への影響 日本神経精神薬理学会

吾郷 由希夫 2018 年  
Role of the VPAC2 receptor overactivation implicated in schizophrenia susceptibility. *Oral Neuroscience* 2018

新谷 勇介 2018 年  
An interaction between PAC1 receptor and serotonin 2A receptor involved in receptor trafficking and signal transduction. WCP2018

新谷 勇介 2018 年  
PACAP-provoked PAC1 receptor signaling and internalization through two isoform of  $\beta$ -arrestins dependent mechanisms. International GPCR symposium

早田 敦子 2018 年  
Involvement of miR-132 in PACAP-dependent morphological changes of dendritic spines. CINP2018

吾郷 由希夫 2017 年  
Modeling VIPR2 linkages to schizophrenia in mice. The 13th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides

新谷 勇介 2017 年  
 $\beta$ -アレステチンを介する PACAP-PAC1 シグナルの解析 第 131 回 日本薬理学会 近畿部会

加茂 俊彦 2016 年  
miRNA を介した PACAP による樹状突起スパイン形成機構 第 45 回日本神経精神薬理学会

早田 敦子 2016 年  
神経細胞の成熟における PACAP と BDNF の役割 第 59 回日本神経化学学会大会

〔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 付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) 研究協力者

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

中澤 敬信 (NAKAZAWA, Takanobu)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号： 00447335