

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09262

研究課題名(和文) PACAPによる神経保護および神経軸索再生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of neuroprotection and neural axon regeneration mechanism by PACAP

研究代表者

RAKWAL RANDEEP (RAKWAL, RANDEEP)

筑波大学・体育系・教授

研究者番号：70590850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：PACAPによる突起伸長作用はPac1受容体を介するPI3K/AKT、MEK/ERKを主要経路によるCRMP2の脱リン酸化が重要であるが、PACAPによるCRMP2脱リン酸化を含めた突起伸長作用の詳細は不明である。GSK-3、CDK5、Rho/ROCKによるCRMP2脱リン酸化がPACAP添加から3時間以内で検出されることから、PACAPによるCRMP2脱リン酸化作用に関与する初期因子を特定することが重要だと考え、オミックス解析を行った。その結果、既知のものを含む多くの神経突起伸長に関与するの重要な調節因子が検出され、CRMP2脱リン酸化に関与する可能性のある因子も確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究により、CRMP2のリン酸化が軸索誘導や軸索再生に関与していることが明らかにされている。本報告では、PC12細胞をモデルとしたPACAPのCRMP2の脱リン酸化による突起伸長作用の分子機構について明らかにすることを目的としてオミックス解析を行い、突起伸長作用に関与する初期因子を同定することができた。CRMP2の脱リン酸化作用がアルツハイマー病や多発性硬化症など、神経変性疾患の治療標的として注目されている。PACAPによるCRMP2のリン酸化抑制を促進するメカニズムについて新たな知見を得ることで、新規治療法の開発などに貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Although dephosphorylation of CRMP2 by Pac1 receptor-mediated PI3K/AKT and MEK/ERK is important for PACAP-induced projection elongation, details of PACAP-induced projection elongation including CRMP2 dephosphorylation by GSK-3, CDK5 and Rho/ROCK are unclear. Since CRMP2 dephosphorylation is detected within 3 hours of PACAP addition, we considered it important to identify initial factors involved in CRMP2 dephosphorylation effect by PACAP and performed high-throughput omics analyses. Many important regulators involved in neurite outgrowth, including known ones, were detected, and factors that may be involved in CRMP2 dephosphorylation were identified. Though this research could not confirm exact role and position of CRMP2 in PACAP mediated cell elongation, it appears that its phosphorylation and de-phosphorylation has a correlation with neurite protrusion elongation through interplay of CDK5, which needs further investigation.

研究分野：オミックス解析

キーワード：PACAP CRMP2 PAC1R

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は PACAP の神経保護および再生機構を明らかにするためにマウス脳梗塞モデル脳虚血直後に PACAP 投与した梗塞側脳半球のオミックス解析を行なった結果、PACAP による脳保護効果と CRMP2 タンパク質が急性期で発現増加していることを見出している[1-4]。CRMP2 は軸索形成の重要な因子であることから PACAP の突起伸長作用を確認するために PC12 細胞(ラット副腎髄質褐色腫)を用いた実験を行ってきた。阻害剤実験の結果から PACAP の PC12 細胞における突起伸長作用は、Pac1 受容体を介した PI3K/AKT および MEK/ERK を主要な経路とした GSK3 β 、CDK5、Rho/ROCK による CRMP2 の脱リン酸化が重要であることを明らかにしている(図.1)[5,6]。CRMP2 がリン酸化されると微小管との結合能が失われ、微小管の不安定化を招くことで軸索の退縮が起きるとされ、リン酸化の度合いが軸索伸長や軸索安定化に関与していると言われている。よって神経保護だけでなく PACAP による軸索伸長や軸索安定作用を明らかにすることは重要だと考えた。

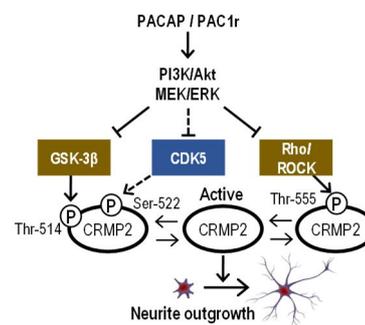


図1 Pac1r を介した PACAP の突起伸長のスキーム
PACAP の突起伸長作用は、Pac1 受容体媒介 PI3K/AKT および MEK/ERK を主経路として、Gsk3b、CDK5、および Rho/ROCK の制御を介した CRMP2 の脱リン酸化に依存する。脱リン酸化された CRMP2 は活性化し、突起の伸長を促進する。

2. 研究の目的

PACAP が CRMP2 のリン酸化抑制を促進するメカニズムについて新たな知見を得ることができれば、神経細胞や神経の損傷修復、神経変性疾患の治療に関与する可能性のある経路を知る上で新たな一歩となるかもしれないと考え、本研究では DNA マイクロアレイとプロテオミクス解析を行い、CRMP2 の脱リン酸化に対する PACAP の突起伸長作用に関与する因子の同定を試みることを目的とした。

3. 研究の方法 [5,6]

(1) 細胞培養

PC12 細胞 (RCB0009) は理研細胞バンクから入手し、5% ウシ胎児血清 (FBS)、10% ウマ血清 (HS)、抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン) を含む RPMI1640 培地を使用し CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で培養した。培養シャーレのコーティングには Cellmatrix Type IV (新田ゼラチン株式会社) を使用した。PC12 細胞を 24 時間培養後に PACAP 10⁻⁷M を添加した。PACAP 添加から 5、10、15、30、60、120 分後に PC12 細胞を回収しマイクロアレイ分析のための RNA 抽出に使用した。同様に PACAP 添加から 15、30、60、および 120 分後の PC12 細胞はプロテオミクス分析のためのタンパク質抽出に使用した。

(2) DNA マイクロアレイ解析

RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、PC12 細胞から Total RNA を抽出した。RNA は分光光度法で収量と純度を測定し、さらにホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動による Total RNA のクオリティーの確認を行った。Total RNA を Dye-swap 法で標識しマイクロアレイスライド (Whole Rat Genome DNA Microarray 4x44K, G4131F) にハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションしたスライドは、Agilent Microarray scanner G2505C を使用してスキャンし、Agilent Feature Extraction ソフトウェア (9.5.3.1) により数値化した。発現変動した遺伝子 (アップレギュレーション: Up (2.0-fold)、ダウンレギュレーション: Down (0.5-fold)) をリスト化し、変動遺伝子リストのパスウェイ (KEGG pathway) は、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 を用いて解析した。

(3) プロテオーム解析

PC12 細胞よりタンパク質抽出し、トリプシン消化処理をした。消化サンプルを TMT 標識し、HLB OASIS カラムで脱塩後、POROS 20 R2 逆相レジンを使用して 5-100% ACN Buffer (pH10) で 12 分画を溶出した。Q-Exactive MS 分析は UHPLC Dionex UltiMate®3000 (Thermo Fisher Scientific) を使用した逆相クロマトグラフィーで分離し、データベース (MaxQuant ソフトウェア、Perseus および R プログラム) でタンパク質同定ならびに相対定量数値化を行った。発現変動したタンパク質 (アップレギュレーション: Up (2.0-fold)、ダウンレギュレーション: Down (0.5-fold)) をリスト化した。

4. 研究成果 [5,6]

(1) DNA マイクロアレイ解析の結果

PACAP によって発現が増加した遺伝子の上位は、初期遺伝子である Egr1,3,4、Fos、Nr4a1,2,3、Junb、Junc、Inhba、Fst で、神経突起伸長に関わる遺伝子として知られているものも多く含まれていた(図 2-A)。Inhba は PACAP 添加後 120 分で無添加に比べ 1000 倍もの発現量増加を示した。インヒピンは、成長・分化因子であると同時にホルモンでも考えられている。インヒ

ピンβサブユニットβAがホモ二量化したものがアクチピンA(ββA)であり、アクチピンAは神経細胞の分化誘導や神経細胞の生存維持などの機能を持つ。アクチピンによる過剰な分化を抑制することが知られているFst(Follistatin)も検出された。アクチピンは強い細胞増殖を促進するため、フォリスタチンは規制なき細胞増殖に対する防御として、細胞分化を制御していると考えられている。図2-Bは、InhbaとFstの発現変化をグラフ化したもので、PACAP添加後120分までにFst、Inhbaともに発現量が時間の経過に比例して増加している。Fstはさらに遅れてアクチピンAを制御すると思われる。次に興味深いのは、オルファン受容体NR4Aサブファミリーとしてよく知られているNr4A1(Nur77)、Nr4A2(Nurr1)、Nr4A3(NOR1)であった。突起伸長効果については、NGFによる突起伸長時にNur77の発現亢進が観察されており、Nur77ノックダウンにより神経突起伸長が抑制される。同様に、NR4A3の強制発現は神経突起を伸長させることが報告されている。NR4A3の発現は分化誘導因子によって上昇し、NR4A3の発現を低下させると細胞の分化が損なわれる。したがって、Nr4A1およびNR4A3は、PACAPの突起伸長効果に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、図2-Bに示すように、Nr4A1とNR4A3の発現量には、かなり大きな差があることがわかる。興味深いことに、造血幹細胞や多能性前駆細胞などの未熟な細胞は、分化した細胞よりもNR4A3の発現量が少なく、成熟した細胞はNr4a1を発現するがNr4a3は発現しない。NR4A3の発現増加は突起形成に重要であり、前述のInhbaとFstの関係のように、120分より後でもNR4A1がNR4A3の強い発現を制御している可能性が示唆された。その他、神経分化に関わるKlf4、Btg2、Irf2、軸索誘導と結合に関わるklf4とHaus1、Rhoキナーゼ阻害に関わるRgs2が発現上昇遺伝子として同定された。

(2) プロテオーム解析の結果

遺伝子と同様に、PACAPによって発現が増加したタンパク質の多くは、初期遺伝子に関連する神経突起伸長に関わるタンパク質(Egr1, 3, 4, Fos, Fosl2, Nr4a1, 2, 3, Junb, Arc)だった(図2-D)。プロテオーム解析ではRhoAに関するものとして幾つか同定された。Gmpを介したRhoAの局所的な不活性化が樹状突起の発達制御に関与していると考えられ、RhoA阻害作用はArhgap29やDepdc1bでも報告されている。また、神経分化に関わるSYT4、軸索誘導・結合に関わるStk11ip、Tctnl、Znrf1、Ank2、Cep192の発現増加が観察された。

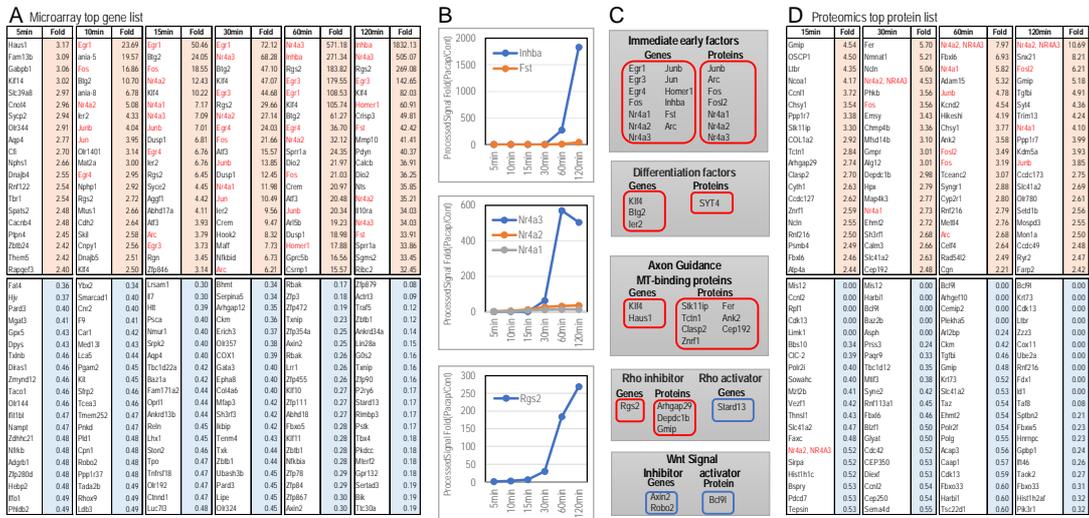


図2 PACAPによって発現が変化した上位20の遺伝子およびタンパク質
 (A) PACAP添加後5、10、15、30、60、および120分でマイクロアレイ解析により発現が変化した上位20遺伝子のリスト
 (B) Inhba, Fst, NR4A1, 2, 3, および Rgs2 遺伝子の発現変化
 (C) 初期因子、分化因子、軸索ガイダンスおよびMT結合タンパク質、Rho阻害剤として分類され、PACAPによって発現が変化した上位20の遺伝子およびタンパク質
 (D) PACAP添加後15、30、60、および120分におけるTMT-LC-MS/MS分析によって得られた、発現が変化した上位20タンパク質のリスト

(3) CRMP2の脱リン酸化に関する遺伝子カテゴリー解析の結果

PACAPによる神経突起伸長経路における特にCRMP2の脱リン酸化機構を調べるために、DNAマイクロアレイ解析で得られた発現量の変動する遺伝子のパスウェイ解析をDAVIDツールで行った。カテゴリー別解析の主な結果を図3-Aおよび図3-Cに示した。発現増加遺伝子カテゴリーとしてcAMPシグナル経路とPI3K-Aktシグナル経路が検出され、cAMPシグナル経路はMEK関連であることから、PACAPによる神経突起の伸長は、主にMEK/ERK経路とPI3K/Akt経路が介在していることが確認できた。一方で発現減少遺伝子カテゴリーとしてはカルシウムシグナル経路が検出された。カルシウムシグナル経路に分類された遺伝子は、Ca²⁺シグナルを減衰させることで血管弛緩を促進する血管収縮性受容体関連が多く含まれていた。EDNRBは最も強力な血管収縮因子で、同様にAGTR1A、AGTR1Bも血管収縮ペプチドangiotensin IIにより活性化される。さらにPTAFRは血小板活性化因子(PAF)受容体で、PAFは血小板や白血球を凝集・活性化するだけでなく、血圧低下や気管収縮などの生物活性を誘導する。

このようにカルシウムシグナル経路に分類された多くの血管収縮関連因子の遺伝子発現減少しているのに対して、発現増加遺伝子カテゴリーに分類されたcGMP-PKGシグナル経路では多くの血管拡張関連因子が含まれていた(図3-B)。強力な血管拡張因子であるアデノシン受容体

ADORA1 のほか、血管拡張因子刺激リタンパク質 VASP、血流低下ペプチドであるブラジキニン受容体 BDKRB2、血管周囲脂肪組織で血管拡張作用を仲介する IRS2、ATP1A1 および ATP2B1 の発現抑制は、血管収縮による高血圧の脱却をもたらす。さらに、VDAC1 の発現低下は肺動脈性肺高血圧症などの心血管疾患につながる可能性が報告されている。RGS2 は、様々な血管収縮物質からのシグナルを伝達する Gαq を負に制御することにより、血管収縮を抑制し、弛緩を促進する役割を担っている。平滑筋細胞では、ノルアドレナリンやエンドセリンなどの血管収縮物質の刺激により Rho が Rho-kinase を活性化し、Rho-kinase 経路を介して血管収縮をもたらす。逆に、Rho-kinase 阻害剤は血管収縮を抑制することが示されている。cGMP-PKG シグナルは Gq/Rho/Rho キナーゼ (ROCK) シグナルを阻害することが報告されている。特に、RGS2 は Gq/Rho/Rho キナーゼ (ROCK) シグナルの抑制に関与していると考えられ、神経突起の伸長を促進すると考えられている。今回の DNA マイクロアレイ解析では、PACAP 添加後 120 分まで RGS2 の発現が増加する傾向にあり、120 分ではコントロールの 300 倍となった (図 3-B) ことから、PACAP による RGS2 の強い発現増加は Rho キナーゼを阻害し、CRMP2 の脱リン酸化や突起の伸長を促す可能性が高いと考えられる。また、多くの血管収縮因子が抑制されていることが確認され、これは Rho-kinase 阻害による可能性が高いことが示唆された。

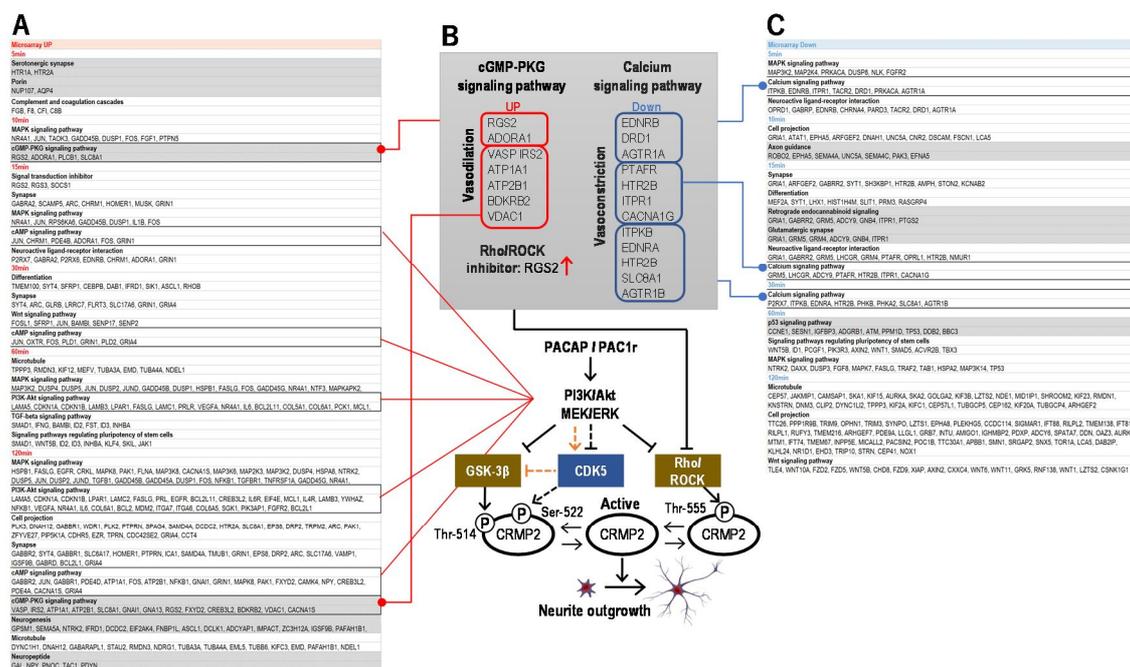


図3 DNAマイクロアレイ解析により得られたPACAPにより発現が変化した遺伝子 (2.0倍以上、0.5倍以下) のDAVIDツールを用いたカテゴリー解析
 B)に示されるPACAPのPac1rを介した神経突起伸長効果に関与すると考えられるカテゴリーは黒線で囲った
 (A) PACAP によって発現増加した遺伝子のカテゴリー
 (B) cGMP-PKG およびカルシウムシグナル伝達経路に分類される血管拡張および血管収縮機能を持つ遺伝子が Rho/ROCK 阻害に関与の可能性がある
 (C) PACAP によって発現減少した遺伝子のカテゴリー

(4) まとめ

オミックス解析により、PACAP による神経突起伸長の初期段階で重要な多くの因子が検出され、Rho/ROCK 阻害に関与する RGS2 が PACAP による CRMP2 脱リン酸化に重要である可能性が示唆された。今後の研究では、CRMP2 の脱リン酸化と RGS2 の突起伸長効果が調査される予定である。CDK5 の CRMP2 脱リン酸化は、今回の結果からは議論が難しかったが、プロテオーム解析では Axin2 が検出され、図 3-B のオレンジ色 (点線) の矢印で示されているように、Cdk5 が GSK-3β を抑制する可能性があることが示唆された。Axin は Cdk5 によってリン酸化され、このリン酸化により Axin と GSK-3β との相互作用が促進される。GSK-3β は Cdk5 によって負に制御されており、これはニューロンの極性化と軸索の発達に重要であることが報告されている。したがって、CDK5 による Axin2 のリン酸化が GSK-3β 活性の阻害につながるかどうかを確認することは興味深いと考えられ、CDK5 による GSK-3β 媒介 CRMP2 脱リン酸化の可能性を明らかにしていく予定である。PACAP による Pac1r 活性化はタウの蓄積を防ぎ、マウスの認知能力を向上させるため、アルツハイマー病およびその他のタウオパチーに対する潜在的な治療アプローチが示されている[7]。現在、Pac1r-KO マウスの脳組織における CRMP2 の脱リン酸化とオミックス解析を行っており、PACAP による Pac1r を介した CRMP2 の脱リン酸化を含めた神経突起伸長・再生メカニズムを明らかにすることで疾患のリスクを低減する早期予防法の開発に貢献したいと考えている。

参考文献

[1] 基盤研究 (C): 虚血脳における PACAP 神経保護作用効果に関わる分子的因子の同定: 2014-2016 年度

- [2] Hori M, Shibato J, Nakamachi T, Rakwal R, Ogawa T, Shioda S, Numazawa S. Two-color Dye-swap DNA Microarray approach toward confident gene expression profiling in PMCAO mouse model for ischemia-related and PACAP38-influenced genes. *Genom Data*. 2015 Jan 22;3:148-54.
- [3] Hori M, Nakamachi T, Shibato J, Rakwal R, Shioda S, Numazawa S. Unraveling the Specific Ischemic Core and Penumbra Transcriptome in the Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion Mouse Model Brain Treated with the Neuropeptide PACAP38. *Microarrays (Basel)*. 2015 Jan 21;4(1):2-24.
- [4] 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*. 2014 Sep 23;15(9):17014-34.
- [5] Shibato J, Takenoya F, Hirabayashi T, Kimura A, Yamashita M, Takasaki I, Rakwal R, Shioda S. Molecular Mechanism for PACAP 38-Induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells. *Neural Plast*. 2021 Aug 7;2021:2522454. doi: 10.1155/2021/2522454. eCollection 2021.
- [6] Shibato J, Takenoya F, Yamashita M, Gupta R, Min CW, Kim ST, Kimura A, Takasaki I, Hori M, Shioda S, Rakwal R. OMICS Analyses Unraveling Related Gene and Protein-Driven Molecular Mechanisms Underlying PACAP 38-Induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 20;24(4):4169.
- [7] Schaler, A.W.; Runyan, A.M.; Clelland, C.L.; Sydney, E.J.; Fowler, S.L.; Figueroa, H.Y.; Shioda, S.; Santa-Maria, I.; Duff, K.E.; Myeku, N. PAC1 receptor-mediated clearance of tau in postsynaptic compartments attenuates tau pathology in mouse brain. *Science Translational Medicine* 2021, 13(595), eaba7394

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibato Junko, Takenoya Fumiko, Hirabayashi Takahiro, Kimura Ai, Yamashita Michio, Takasaki Ichiro, Rakwal Randeep, Shioda Seiji	4. 巻 2021
2. 論文標題 Molecular Mechanism for PACAP 38-Induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neural Plasticity	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/2522454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibato Junko, Takenoya Fumiko, Yamashita Michio, Gupta Ravi, Min Cheol Woo, Kim Sun Tae, Kimura Ai, Takasaki Ichiro, Hori Motohide, Shioda Seiji, Rakwal Randeep	4. 巻 24
2. 論文標題 OMICS Analyses Unraveling Related Gene and Protein-Driven Molecular Mechanisms Underlying PACAP 38-Induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4169~4169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24044169	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rakwal Randeep
2. 発表標題 Molecular Mechanisms Underlying PACAP 38 Induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells: Towards OMICS
3. 学会等名 VPAC ISBAP 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 道生、柴藤 淳子、Rakwal Randeep、平林 敬浩、千葉 義彦、高崎 一郎、塩田 清二、竹ノ谷 文子
2. 発表標題 神経ペプチドPACAPによるPC12細胞を用いた神経突起伸長作用の分子制御機構について
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下 道生、竹ノ谷 文子、柴藤 淳子、Rakwal Randeep、平林 敬浩、千葉 義彦、塩田 清二
2. 発表標題 PC12細胞におけるPACAPの突起伸長の分子制御機構解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柴藤 淳子 (SHIBATO JUNKO) (10611121)	湘南医療大学・臨床医学研究所・研究員 (32728)	
研究分担者	塩田 清二 (SHIODA SEIJI) (80102375)	湘南医療大学・薬学部医療薬学科・教授 (32728)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
韓国	Pusan National University		