

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 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度 ～2012 年度

課題番号：22500390

研究課題名（和文）マウスモデルを用いた中枢性呼吸疾患発症機構の研究

研究課題名（英文） Analysis of the central respiratory disorder in PACAP-deficient mice

研究代表者

荒田 悟 (ARATA SATORU)

昭和大学・遺伝子組換え実験室・准教授

研究者番号：20159502

研究成果の概要（和文）：

我々は周産期に死亡するモデルマウスについて、中枢性の呼吸障害について検討している。これまで、生後 24 時間以内に死亡するマウスを用いて、呼吸中枢の神経回路に関わる遺伝子を複数明らかにしてきた。本研究では生後 2 週間頃に突然死を起こす、乳幼児突然死症候群（SIDS）に似た表現型を示す下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド（PACAP）の欠損（KO）マウスについて検討を行ったので報告する。

①我々は呼吸機能の発達がマウス系統により異なり、C57BL/6 では呼吸馴化が遅いことを報告している。PACAP KO マウスにおいて、C57BL/6 背景は突然死の頻度が高いことが確認した。②PACAP KO マウスの出生時は、無呼吸が頻回見られる不規則なパターンを示した。この呼吸異常は呼吸中枢に依存していることが分かった。③新生マウスは、高二酸化炭素及び低酸素に対して応答性を持つようになるが、PACAP KO マウスは低酸素に対する応答性が野生型に比べて低下していた。④低酸素応答性の低下は、呼吸中枢レベルに起因することを示した（呼吸中枢における O₂ 化学受容体の存在を示唆した）。⑤PACAP KO マウスの生後 7 日目に低酸素の負荷を与えると容易に呼吸停止を起こしたことから、PACAP KO マウスの突然死の原因が中枢性の呼吸異常（恐らく、低酸素応答の低下）であることが示唆された。⑥免疫組織学的検討から、O₂ 化学受容体は新生マウスの延髄の腹側呼吸ニューロングループ（VRG）のアドレナリン/カテコールアミン作動性の神経領域に存在する可能性を示した。

以上のことから、SIDS の一つのモデルとして PACAP KO マウスを提唱するとともに、呼吸馴化期における低酸素環境が死亡原因となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide expressed widely in nervous tissues. PACAP knockout (-/-) mice display a sudden infant death syndrome (SIDS)-like phenotype, although the underlying physiological mechanism to explain this remains unclear. Here, we report on the presence of abnormal respiratory activity in PACAP -/- mice under hypoxic conditions, which provides a basis for the SIDS-like phenotype. PACAP -/- mice display a lowered baseline respiratory activity compared with wild-type animals, and an abnormal response to hypoxia. Histological and real time PCR analyses indicated that the catecholaminergic system in the medulla was impaired in PACAP -/- mice, suggesting that endogenous PACAP affects respiratory centers in the medulla via its action on the catecholaminergic system. We propose that disruption of this system may be involved in the sudden infant death-like phenotype of PACAP -/- mice. Thus, disorders of the catecholaminergic system involved with O₂ sensing could be implicated in underlying neuronal mechanisms responsible for SIDS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：乳幼児突然死症候群（SIDS）、呼吸中枢障害マウスモデル、
Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)

1. 研究開始当初の背景

ホメオボックス遺伝子 *Tlx3* の KO マウス、*Phox2b* KO マウス、*DSCAM* KO マウス等の研究より、呼吸中枢の神経回路形成に関わる遺伝子と中枢性低換気症候群などの呼吸疾患との関わりが徐々に明らかになってきた。また、これらのモデルマウス実験において系統による表現型の違いなども明らかになり、呼吸馴化と系統差など基本的な検討も必要となっている。一方、これまで検討されているモデルマウスはほとんどが 24 時間以内に死亡するモデルであり、生後 6 カ月から 1 年で突然死を起こすヒト SIDS と表現型が異なっている。我々は *C57BL/6-PACAP* KO マウスは、出生 2 週間頃に突然死を起こすことを観察しており、また *PACAP* KO マウスの呼吸障害の可能性も報告されていた (Cummings et al. 2004)。そこで、我々はこれまでの呼吸機能の解析手法を用いて詳細に検討することにした。

2. 研究の目的

乳幼児突然死症候群 (SIDS) は、本国では 4000 人に 1 人の割合で報告されているが、その原因の特定は難しい。危険因子として、うつぶせ寝、喫煙、温度などの環境的因子が提唱されているが、遺伝的要因も少なくないと考えられている。しかし、原因遺伝子の特定に至っていない。

PACAP KO マウスは、生後 2 週間頃に突然死の頻度が高くなるが、この時期はヒトの 6 カ月から 1 歳頃の発達段階に相当する。そこで我々は、この KO マウスが SIDS の一つのモデルとなる可能性があるのではないかと考え、これまでの呼吸解析の手法を用いて明らかにすることにした。

3. 研究の方法

(1) *PACAP* KO マウス

C57BL/6-PACAP KO マウスは、大阪大学・馬場博士より供与を受け、本学で維持・繁殖したものをを用いた (Hashimoto et al. PNAS 2001)。実験には、ヘテロマウス同士の交配により得られた新生マウス (P0~P7) を使用した。

(2) *in vivo* 呼吸解析

全身性プレチスモグラフィにより、新生マウスの呼吸パターン、呼吸頻度、分時換気量等を測定した。呼吸馴化は、P0 から P7 までの新生マウスにより検討した。また、低酸素応答、及び高二酸化炭素応答の検討は、チャンバー内の空気を 5%O₂/95%N₂、8%CO₂/air に各々置換して解析した。

(3) *in vitro* 呼吸解析

新生マウス (P0) の摘出脳幹脊髄標本を用いて、中枢性の呼吸機能 (C4 活性：横隔膜応答) を調べた。低酸素応答は、還流液を 5%CO₂/95%O₂ から 5%CO₂/95%N₂ に置換し、高二酸化炭素応答は 2%CO₂/98%O₂ から 8%CO₂/92%O₂ に置換して測定した。

(4) 呼吸中枢における遺伝子発現解析

新生マウス延髄部分の遺伝子発現について、定量 PCR 法、及び免疫組織化学的法により解析した。

4. 研究成果

(1) *PACAP* KO マウスの致死性

マウスの呼吸馴化は系統により異なり、*C57BL/6* マウスは ICR や Balb/c マウスに比べて遅いことを既に報告している (Arata et al. 2010)。*C57BL/6* 背景の *PACAP* KO マウスは、メンデル比で産まれてくるが、離乳時までの約 9 割が死亡した (多くは生後 2 週間頃に突然死)。ICR 背景ではほぼ生き残ることが知られている。

(2) *in vivo* 呼吸解析

全身性プレチスモグラフィの解析から、PACAP KO マウスの新生期 (P0~P4) は無呼吸の頻度が多く、不規則な呼吸であった。野生型では P7 でほぼ成体に近い呼吸 (呼吸頻度約 300 回/分、分時換気量 2ml/min) となったが、KO マウスでは、呼吸頻度、分時換気量ともに半分程度であった (Fig.1)。

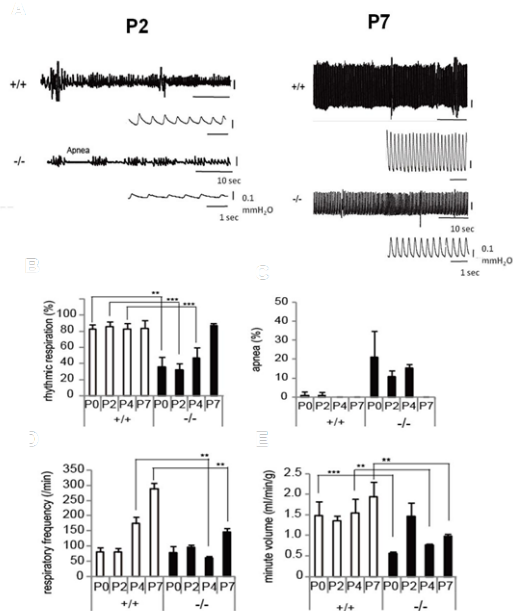


Fig. 1. Respiratory abnormalities in PACAP-deficient mice. Respiration activities of unrestrained, unanesthetized wild-type and PACAP^{-/-} mice were measured by plethysmography. (A) Recordings correspond to spontaneous respiration in wild-type and PACAP^{-/-} littermates. (B) Ratio of rhythmic respirations that continued rhythmic respiration for $\leq 5s$ was quantified as percentage (rhythmic vs arrhythmic). (C) Frequency of apnea that continued without respiration for >1s was quantified as percentage (apnea vs no apnea). Respiratory frequency (D) and minute volume (E) were calculated for each genotypic at described postnatal stage, respectively.

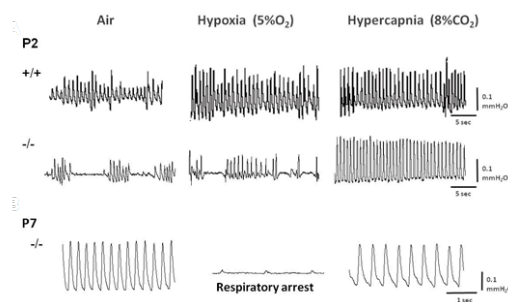


Fig. 2. Abnormal ventilatory response to hypoxia in PACAP-deficient mice. Respiration activities under either hypoxic (5% O₂) or hypercapnic (8% CO₂) conditions were compared to that in air by plethysmography. (A) Recordings corresponding to spontaneous respiration in wild-type and PACAP^{-/-} littermates at P2. (B) Respiratory arrest under hypoxic conditions at P7 in PACAP-deficient mice.

次に、高二酸化炭素、及び低酸素に対する応答性を調べた。野生型マウスの P2 では、既に Hypercapnia, Hypoxia に対して応答性が確認された。KO マウスは Hypercapnia の

応答は確認されたが、Hypoxia の応答は認められなかった。特筆すべきこととして、KO マウスの P7 では Hypoxia により呼吸停止が引き起された (Fig.2)。

(3) *in vitro* 呼吸解析

P0 の摘出脳幹脊髄標本を用いて、呼吸中枢機能を調べた。その結果、KO マウスは野生型に比べて C4 活性が著しく低下していることが分かった。次に、Hypercapnia 応答について調べた結果、野生型、ヘテロ型、及び KO マウスはともに 8%CO₂ への置換により C4 活性の増加が認められた (Fig.3)。

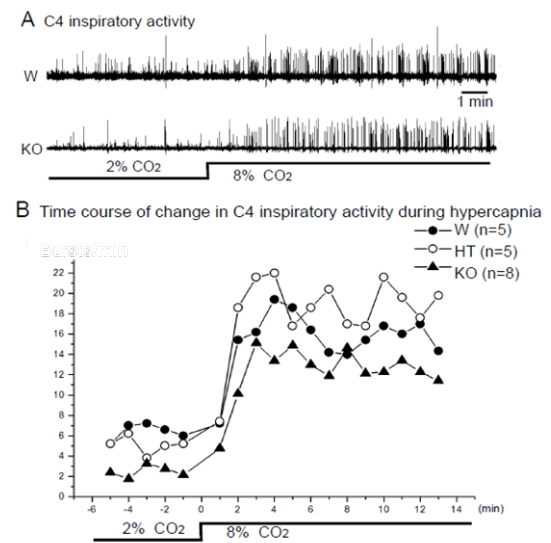


Fig. 3. Responses to hypercapnea of *in vitro* medulla-spinal cord preparations from P0 wild-type, PACAP^{+/+} and PACAP^{-/-} mice. (A) Raw traces of C4 inspiratory activity in response to 8% CO₂ solution in genotype: wild type and PACAP^{-/-}. (B) Time course of change in C4 burst rate during hypercapnia for each genotype.

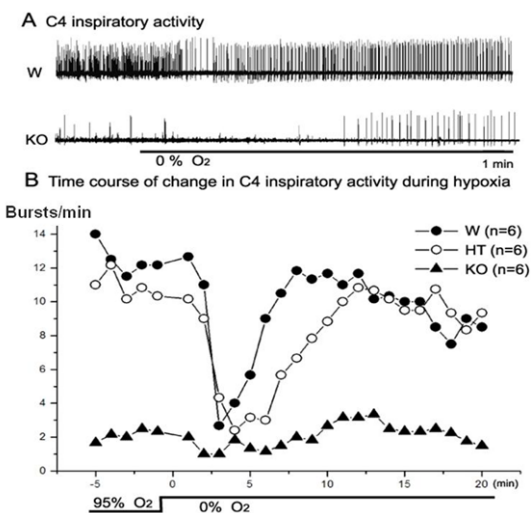


Fig. 4. Responses to hypoxia of *in vitro* medulla-spinal cord preparations from P0 wild-type, PACAP^{+/+} and PACAP^{-/-} mice. (A) Raw traces of C4 inspiratory activity in response to 5% O₂ solution in genotype: wild type and PACAP^{-/-}. (B) Time course of change in C4 burst rate during hypoxia for each genotype.

一方、Hypoxia 応答は、野生型では 0%O₂ への置換後一旦 C4 活性は抑制されるがその後 C4 活性は元のレベルに戻るパターンを示す。ヘテロマウス、KO マウスも同様な C4 活性の抑制を示すが、その後の応答性の回復は容量依存的に遅くなることが分かった (Fig.4)。

(4) 呼吸中枢における遺伝子発現

In vivo, in vitro 呼吸解析の結果から PACAP KO マウスの突然死は、呼吸中枢における低酸素応答の低下に因ることが示唆された。そこで呼吸中枢における遺伝子発現解析を行った。その結果、延髄において PACAP 及び PACAP 特異的受容体 (PAC1) が発現すること、カテコールアミン合成酵素の TH は PACAP KO マウスで有意に低下していることが分かった。組織学的解析から、KO マウスでは、活性化 TH 陽性細胞が呼吸中枢の存在する腹外側呼吸ニューロングループ (RVG) の A1/C1 領域で減少していることが分かった (Fig.5)。

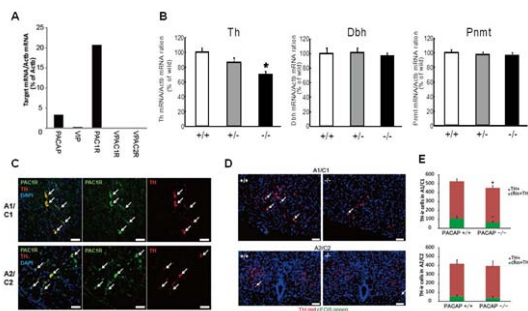


Fig. 5. PACAP/PAC1R and TH expression in brain stem at P0. (A) mRNA levels of PACAP and VIP and their receptors in the brain stem were quantified by real time PCR. (B) TH, DBH, PNMT gene expression levels in PACAP^{+/+}, ^{+/-}, and ^{-/-} mice were determined by real-time PCR (C) Co-localization of TH and PAC1R in A1/C1 and A2/C2 region was observed by double immunostaining. PAC1R- immunopositivity (green) and TH- immunopositivity (red) is shown merged with DAPI nuclear staining (blue). (D) Typical images of TH and cFOS- immunopositivity in A1/C1 and A2/C2 region of PACAP^{+/+} and ^{-/-} mice. TH- immunopositivity (red) and cFOS- immunopositivity (green) are merged with DAPI nuclear staining (blue). (E) Number of TH- positive cells and TH- and cFOS- double positive cells in A1/C1 and A2/C2 regions of PACAP^{+/+} and ^{-/-} mice. Green bars indicate the number of TH- and cFOS- double positive cells, and red bars indicate the number of cells positive for TH only. The number of double positive cells (green bars) and total TH- positive cells (red + green bars) were compared between PACAP^{+/+} and ^{-/-} mice (n=8). Note significant decrease in A1/C1 regions of PACAP^{-/-} mice (**P*<0.05).

以上のことから、PACAP KO マウスは中枢性呼吸障害を示し、特に低酸素応答が低下していることが明らかになった。さらに P7 の KO マウスが低酸素により呼吸停止を誘導したことから、生後 2 週間頃に起こる突然死の原因として中枢の低酸素応答の関与が示唆された。また、今回の研究では酸素応答の化学受容体の同定には至っていないが、呼吸中枢 (RVG) のアドレナリン/カテコールアミン作動性細胞 (A1/C1) との関連が示唆さ

れた。

一方、アフリカ系アメリカ人の SIDS において PACAP の SNP が報告されている (Cummings et al, Acta Paediatrica 2009)。今回、PACAP KO マウスが SIDS の一つのモデルとなる可能性を示せたことから、今後ヒト SIDS 発症機構の解析に役立てればと思う。

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, Nakamura K, Oshida K, Kagami N, Mori H, Watanabe J, Arata S, Yofu S, Endo K, Wada Y, Hori M, Tsuchikawa D, Kato M, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates proliferation of reactive astrocytes in vitro. *J Mol Neurosci.*, 43,16-21, 2011
- ② Nakamachi T, Farkas J, Watanabe J, Ohtaki H, Dohi K, Arata S, Shioda S. Role of PACAP in neural stem/progenitor cell and astrocyte - from neural development to neural repair. *Curr Pharm Des.* 2011;17(10):973-84.
- ③ Obama T, Nagaoka S, Akagi K, Kato R, Horiuchi N, Horai Y, Aiuchi T, Arata S, Yamaguchi T, Watanabe M, Itabe H. Dietary cholesterol reduces plasma triacylglycerol in apolipoprotein E-null mice: suppression of lipin-1 and -2 in the glycerol-3-phosphate pathway. *PLoS One* ; 6:e22917. 2011
- ④ Miyazaki T, Taketomi Y, Takimoto M, Lei XF, Arita S, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Ohata H, Ota H, Murakami M, Miyazaki A. m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation.* 124 (23): 2522-32, 2011
- ⑤ Onimaru H and Dutschmann M. Calcium imaging of neuronal activity in the most rostral parafacial respiratory group of the newborn rat. *The Journal of Physiological Sciences*, 62:71-77, 2012.
- ⑥ Onimaru H, Ikeda K and Kawakami K. Postsynaptic mechanisms of CO₂ responses in parafacial respiratory neurons of newborn rats. *J Physiol.*, 590: 1615-1624, 2012
- ⑦ Nakamachi T, Tsuchida M, Kagami N, Yofu S, Wada Y, Hori M, Tsuchikawa D, Yoshikawa A, Imai N, Nakamura K, Arata S, Shioda S. IL-6 and

PACAP receptor expression and localization after global brain ischemia in mice. J Mol Neurosci. 48(3):518-25, 2012

- ⑧ Arata S, Nakamachi T, Onimaru H, Hashimoto H, Shioda S. Impaired response to hypoxia in the respiratory center is a major cause of neonatal death of the PACAP-knockout mouse. Eur J Neurosci., 37(3):407-16, 2013

[学会発表] (計 8 件)

- ① 荒田 悟、中町智哉、鬼丸 洋、荒田晶子、塩田清二 新生マウス呼吸馴化における低酸素および高二酸化炭素環境に対する応答性第 57 回日本実験動物学会総会 (京都、2010 年 5 月)
- ② 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総会 (京都、2010 年 5 月)
- ③ 島あずさ、中町智哉、荒田 悟、塩田清二 C57BL/6 マウス飼育における環境エンリッチメントの導入・繁殖と発育への影響 第 57 回日本実験動物学会総会 (京都、2010 年 5 月)
- ④ 小野美樹、高見正道、須澤徹夫、宮内知彦、林 竜平、荒田 悟、細野知彦、馬場一美、中村雅典、榎宏太郎、西田幸二、大隅典子、上條竜太郎 顎顔面口腔組織における神経堤由来細胞の分布解析とそれを用いた骨芽細胞様細胞の分化誘導 第 47 回日本口腔組織培養学会 (高知、2010 11 月)
- ⑤ 中町智哉、荒田 悟、鬼丸 洋、塩田 清二 PACAP 遺伝子欠損マウスにおける呼吸機能異常 Abnormality of respiratory function in PACAP knockout mouse 第 88 回日本生理学会 / 第 116 回日本解剖学会・学術集会合同大会 (横浜、2011 年 3 月)
- ⑥ 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クアポリン 5 の役割. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. (甲府 2012 年 3 月)
- ⑦ 荒田 悟、中町智哉、鬼丸 洋、橋本 均、塩田清二 PACAP 欠損マウスにおける中枢性呼吸異常 第 9 回 GPCR 研究会 (東京、2012 年 5 月)
- ⑧ 荒田 悟、中町智哉、鬼丸 洋、塩田 清二 PACAP KO マウスにおける中枢性呼吸異常の解析 第 59 回日本実験動物学会総会 (別府、2012 年 5 月)

[図書] (計 3 件)

- ① Nakamachi T, Farkas J, Watanabe J, Ohtaki H, Dohi K, Arata S, Shioda S. Role of PACAP in neural stem/progenitor cell and astrocyte - from neural development to neural repair. Curr Pharm Des. 2011;17(10):973-84.
- ② Arata S, Amano K, Yamakawa K, Arata A. Central respiratory failure in a mouse model depends on the genetic background of the host. Adv Exp Med Biol. 2010, 669:21-24.
- ③ Amano K, Fujii M, Arata S, Ogawa M, Yamakawa K, and Arata A. Loss of Pre-Inspiratory Neuron Synchronicity in Mice with DSCAM Deficiency. Adv Exp Med Biol. 2010, 669:15-19.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒田 悟 (ARATA SATORU)
昭和大学・遺伝子組換え実験室・准教授
研究者番号：20159602

(2) 研究分担者

鬼丸 洋 (ONIMARU HIROSHI)
昭和大学・医学部・准教授
研究者番号：30177258

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