

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：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791695

研究課題名（和文） PACAPによる涙液分泌促進機構の解析

研究課題名（英文） Mechanism of PACAP-induced tear secretion

研究代表者 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

研究成果の概要（和文）：

申請者はこれまでに PACAP 遺伝子欠損(KO)マウスがドライアイ様症状を呈することを見出した。本研究課題において、マウス涙腺組織では PACAP およびその特異的受容体 (PAC1R) が発現しており、PACAP の点眼投与により有意な涙液量の増加が認められた。さらに PACAP は PAC1R を介して cAMP/PKA 経路を活性化させ、さらにアクアポリン 5 のリン酸化を誘導することにより涙液分泌を促進していることが明らかになった。以上の結果から、PACAP が涙液分泌促進効果を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The dry eye syndrome is one of the most common eye ailments caused by volume reduction or the altered quality of tears, however, an effective treatment has yet to be established. Our study was started based on the finding of a new phenotype in PACAP null mice, which show dry eye-like symptoms, corneal keratinization and tear reduction. PACAP and its receptor were expressed in mouse lacrimal glands, and PACAP eye drops stimulated tear secretion via an adenylate cyclase/cAMP/PKA cascade. PACAP stimulated aquaporin 5 translocation from the cytosol to the membrane in lacrimal acinar cells to induce tear secretion. These results suggest a possible role of PACAP as an endogenous regulator of tear secretion, and PACAP is a good candidate for an eye-drop medicine for the dry eye syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：眼薬理学、ドライアイ、涙腺

1. 研究開始当初の背景

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (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。我々は PACAP 遺伝子欠損マウスの涙液分泌量が減少すること、さらに PACAP 点眼が涙液分泌

量増加を誘導する現象を見出した。しかしながら、PACAP による涙液分泌促進機構に関してはこれまでにわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では PACAP 点眼をドライアイ治療薬として臨床応用へと繋げるため、PACAP 点眼による涙液分泌促進機構の解析とその安全性を評価することを目的とする。さらに、涙液分泌組織である涙腺における PACAP および PACAP 受容体の発現を解析し、PACAP の涙液分泌作用機序に関して明らかにする。

3. 研究の方法

1) PACAP 点眼有効濃度・投与間隔と安全性

①PACAP 点眼有効濃度の検討
涙液分泌における PACAP 点眼の最適濃度を明らかにするため、 10^{-14}M から 10^{-6}M の PACAP 溶液を試験溶液とし、8-10 週齢の c57BL/6 マウスの両眼に点眼し、綿糸法により涙液量を測定した。点眼開始後 15 分置きに 3 時間後まで経時的に涙液分泌量を測定した。

②PACAP 点眼投与後の安全性試験
PACAP の点眼投与を行い、眼球での充血、虹彩散大・収縮などの副作用について検証した。血管新生への影響に関しては *in vitro* 血管新生キットによる評価も合わせて行った。PACAP 点眼後の角膜および涙腺組織を摘出し、定法に従い組織標本を作成して病理学的な毒性評価を行った。

2) 涙腺における PACAP および PAC1R の発現局在

①Reverse Transcriptase(RT)-PCR 法
涙腺から RNA をフェノール・クロロホルム抽出法により単離し、PACAP または PAC1R 特異的プライマーを用いて RT-PCR 法により mRNA の存在を確認した。

②組織学的解析
マウス涙腺凍結切片を用いて PACAP および PAC1R 特異的抗体による免疫染色を行い、陽性反応を観察した。細胞種を同定するために、NeuN 抗体 (神経細胞マーカー) と 2 重免疫染色を行った。

3) PACAP の涙液分泌促進シグナルの解明

①PACAP 誘導性シグナルの解析
PAC1R の下流シグナルとして知られている、cAMP/PKA 経路に着目し、PACAP 点眼後の涙腺におけるシグナル伝達経路をウエスタンブロッティング法、EILSA 法により解析した。

②インヒビター前投与実験

PAC1R のアンタゴニストである PACAP6-38、またはアデニル酸シクラーゼインヒビターである SQ22536 前処理による

PACAP の涙液分泌増加作用への影響を評価した。

4) 水輸送チャネル (アクアポリン; AQP) に関する解析

①PACAP による AQP 発現量への影響
涙腺に発現していることが知られている AQP4 と 5 に関して、野生型と PACAPKO マウスの涙腺を用いて免疫組織学的手法により分布局在を観察し、ウエスタンブロッティング法によりタンパクレベルでの発現を比較した。同様の実験を PACAP 点眼前後の涙腺組織においても行った。

②PACAP による AQP5 リン酸化への影響
近年、AQP5 分子はリン酸化されることにより細胞質から膜へと移動し、水分泌を促進することが報告されている (Chae YK et al. PloS One 2008, Woo J et al. BBRC 2008)。そこで、PACAP 点眼前後の涙腺組織から抽出したタンパク質をリン酸化抗体により免疫沈降し、回収したタンパク質を用いて抗 AQP5 抗体によるウエスタンブロッティング解析を行った。さらに、涙腺組織を膜画分と細胞質画分に分離し、各分画における AQP5 発現量を定量・比較した。

4. 研究成果

1) PACAP の涙液分泌促進に関する最適濃度を検討する為、マウスに対して PACAP 10^{-14}M から 10^{-6}M 濃度の点眼試験を行った。その結果、 10^{-10}M および 10^{-8}M 濃度において点眼開始 15 分後から有意な涙液分泌促進効果が認められた (図 1)。実体顕微鏡下の観察により、眼球の充血および虹彩散大・収縮などは認められなかった。また、PACAP による血管新生促進効果を評価したが、有意差は認められなかった。PACAP 点眼後の角膜および涙腺組織には病理組織学的な変化は認められなかった。

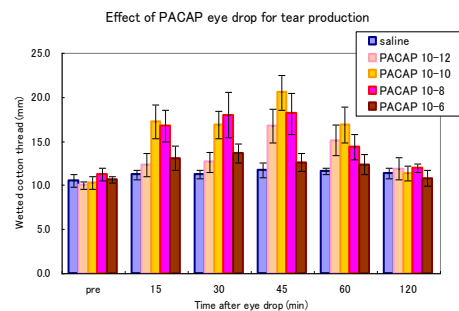


図 1 PACAP 点眼による涙液分泌促進効果

2) RT-PCR 法によりマウス涙腺組織において PACAP および PAC1R mRNA が検出された。免疫染色により PACAP 免疫陽性反応は涙腺組織内の神経細胞体に、PAC1R 免疫陽性反応

は涙腺腺房細胞基底部と導管に認められた (図 2)。

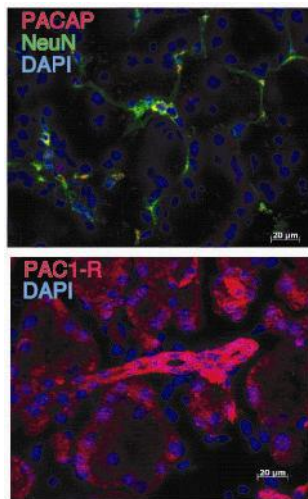


図 2 マウス涙腺における PACAP および PAC1R の免疫陽性反応

3) PACAP 点眼後の涙腺組織では cAMP 濃度が有意に上昇し、PKA のリン酸化も促進された (図 3A, B)。PAC1R のアンタゴニストである PACAP6-38、またはアデニル酸シクラーゼインヒビターである SQ22536 の前処理は、PACAP による PKA のリン酸化を抑制し、さらに PACAP による涙液分泌促進効果を抑制した (図 3C, D)。

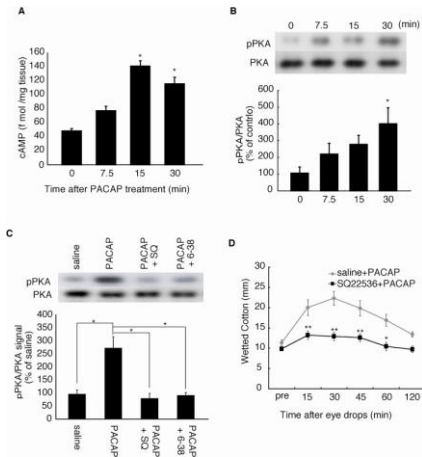


図 3 PACAP 涙液分泌促進機構における cAMP/PKA 経路の役割

4) 野生型の涙腺組織において、AQP5 免疫陽性反応は腺腔側に、AQP4 免疫陽性反応は基底側に認められた。PACAP 遺伝子欠損マウスでは AQP5 の発現が低下しており、特に膜画分で顕著であった。AQP4 の発現は変化が認められなかった。野生型マウスにおいて、PACAP 点眼 30 分後の涙腺組織では、リン酸化 AQP5 が増加しており、AQP5 の膜画分に

おける発現が増加した。これらの反応は PACAP6-38 または SQ22536 の前処理により抑制された (図 4 A, B)。

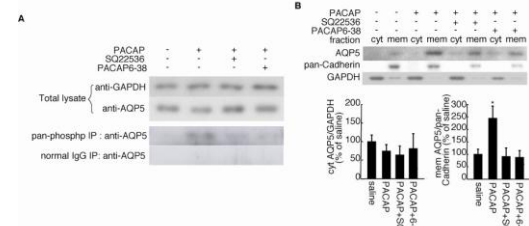


図 4 PACAP 点眼によるリン酸化 AQP5 および細胞膜画分における AQP5 発現の増加

以上の結果から、PACAP は PAC1R/cAMP/PKA 経路を介して AQP5 の細胞膜へのトランスロケーションを誘導し、涙液分泌を促進することが示唆された。

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 9 件)

① Nakamachi T, Tsuchida M, Kagami N, Yofu S, Wada Y, Hori M, Tsuchikawa D, Yoshikawa A, Imai N, Nakamura K, Arata S and Shioda S. IL-6 and PACAP receptor expression and localization after global brain ischemia in mice. *J Mol Neurosci* (in press)

② Tsuchikawa D, Nakamachi T, Tsuchida M, Wada Y, Hori M, Jozsef F, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Shintani N, Hashimoto H, Atsumi T, and Shioda S. Neuroprotective Effect of Endogenous PACAP on Spinal Cord Injury. *J Mol Neurosci* (in press)

③ 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*, 17 (10); 973-84, 2011

④ 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 (1); 16-21, 2011

⑤ 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

⑥ Endo K, Nakamachi T, Seki T, Kagami N, Wada Y, Nakamura K, Kishimoto K, Hori M, Tsuchikawa D, Shintani 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

⑦ Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Mori H, Sato A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shioda S: Endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is involved in suppression of edema in the ischemic brain. *Acta Neurochir Suppl*, 106 43-6, 2010

⑧ Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M and Shioda S: Regulation of Oxidative Stress by Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Mediated by PACAP Receptor. *J Mol Neurosci*, 42 (3); 397-403, 2010

⑨ Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A and Shioda S: Cardioprotective Effect of Endogenous Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide on Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Mice. *Circ J*, 74 (6); 1183-90, 2010

[学会発表] (計 14 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. 3)

② Tomoya Nakamachi, Farkas Jozsef, Nobuyuki Kagami, Yoshihiro Wada, Motohide Hori, Daisuke Tsuchikawa, Masashi Tsuchida, Akira Yoshikawa, Nori Imai, Azusa Hata, Satoru Arata, and Seiji Shioda. PACAP receptor expression and its function in mouse reactive astrocytes. GPCR satellite symposium. (Eilat, Israel, 2011. 12) .

③ 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) .

④ 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)

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。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)

⑥ Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Kenji Dohi, Nobuyuki Kagami, Satoru Arata and Seiji Shioda. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor expression on reactive astrocyte after brain ischemia in mice. The XVth International Symposium of Brain Edema and Cellular Injury (Brain Edema 2011). (Tokyo, 2011. 11)

⑦ 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)

⑧ 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)

⑨ 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。第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 (横浜, 2011. 3) (シンポジスト)

⑩ 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)

昭和大学・医学部・教授
研究者番号：80102375

⑪中町智哉：マウスにおける PACAP の涙液分泌促進効果. 第 35 回日本比較内分泌学会大会（静岡, 2010. 11）

⑫Nakamachi T, Kagami N, Yofu S, Endo K, Nakamura K, Wada Y, Hori M, Arata S, Shioda S: Distribution of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) and PAC1 receptor in intact and ischemic mouse brain. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, CA, 2010. 10)

⑬Shioda S, Nakamachi T, Ohtaki H, Arata S: Deficient of learning and memory in aged PACAP-deficient mice. 7th Joint meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference (Pécs, Hungary, 2010. 6)

⑭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）

〔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

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

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

関 保（SEKI TAMOTSU）

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：10245855

塩田 清二（SHIODA SEIJI）