

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23249079

研究課題名(和文) 神経損傷防御の基盤研究とトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文) Basic and translational research for protection of neurodegeneration.

研究代表者

塩田 清二 (SHIODA, SEIJI)

星薬科大学・付置研究所・教授

研究者番号：80102375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,700,000円

研究成果の概要(和文)：PACAPはVIP/glucagon/secretinファミリーに属するペプチドであり3種類の受容体を持ち、神経系のみならず末梢臓器においてもPACAPは重要な機能を持つ。我々はすでにPACAPが遅発性神経細胞死を防御することをげっ歯類の脳・脊髄において証明した。我々は、PACAPがCRMP2という軸索伸長因子の発現を亢進させて運動機能を回復することが脊損モデル動物を使った研究で明らかにした。さらに我々は霊長類のマーマセットを用いて脳虚血後のPACAPの神経再生・新生の実験を現在行っている。ヒトにおいてPACAPは脳梗塞や脳虚血に対して有効な治療法として臨床応用される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：PACAP is expressed in neural tissues and is known to exert pleiotropic effects on the nervous system. Although its mechanisms of action are slowly being unraveled. This research was tried to demonstrate the neuroprotective effects, mechanisms, and therapeutic potential of PACAP using stroke and spinal injury model in mice. It appeared that PACAP inhibited delayed neuronal cells in brain and spinal cord and we found that PACAP affected on brain and spinal injury not only to inhibit neuronal cell death through MAPK signaling pathway but also it stimulated to activate and synthesize protein named CRMP2 which has been already reported to activate axonal cell growth in rodents utilizing high-throughput omics approaches. Moreover, we tried to make clear the functional significance of PACAP in primate, so we used common marmoset and we built up stroke model in them and we are now trying to test whether PACAP inhibits neural degeneration in humans in future.

研究分野：緊急医学

キーワード：PACAP 神経細胞死防御 ヒト骨髄間葉系幹細胞 神経損傷の防御 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide)は、神経細胞死を微量で抑制することが成体および個体発生過程の中樞神経系で明らかになっている。PACAPによる神経細胞死抑制には、直接神経細胞に作用する系とグリア細胞から種々のサイトカイン分泌を介した系の存在を我々は証明したが、近年、それらに加えPACAPが活性酸素抑制作用があることを我々は見出すなどその多様な作用機序の全容はいまだ不明であるといつてよい。一方、我々はPACAPによる神経幹細胞からグリア細胞への分化誘導をはじめて報告したが、神経への分化過程は不明である。PACAPは「神経細胞の保護」および「神経修復・再生の促進」の二つの作用を有する神経ペプチドである。PACAPの神経損傷疾患治療という臨床応用の達成のためにはPACAPの画期的なドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発やPACAP遺伝子の発現を増加する物質の探索を行う必要がある。さらにヒトへのトランスレーショナルリサーチのためには複雑な高次脳構造を有する霊長類による基盤研究を行うことは欠かすことができない。

2. 研究の目的

PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide)は「神経細胞の保護」および「神経修復・再生の促進」の二つの作用を有する神経ペプチドであり、神経損傷疾患の治療戦略に重要な役割を果たすと考えられる。当該研究は(1)PACAPによる神経細胞死防御の分子基盤の全容解明、(2)PACAPによる再生医学への展開研究、(3)新規ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発とその応用、(4)ヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSCs)のPACAP遺伝子誘導の分子機構の解明と細胞死抑制への関与、(5)霊長類を用いた神経損傷に与えるPACAPの有用性の評価の5つの研究戦略を掲げ、PACAPの神経損

傷防御の分子機構の全容解明とPACAPを用いたヒトへのトランスレーショナルな研究を行う。

3. 研究の方法

研究の全体構想に記した5つの研究戦略に沿って実験観察を行う。H23~H24年度にかけて(1)PACAPによる神経細胞死防御の分子基盤の全容解明を網羅的手法と分子生物・生化学的手法により明らかにする。並行して、(2)PACAPによる再生医学への展開研究として神経幹細胞からニューロン・グリアへの分化誘導機構の基盤研究を進める。H24年度の半ばよりPTS-6のオリゴアンチセンス(AS)を用いたPACAP27の(3)新規DDS法の開発研究を開始する。本研究によりPACAP半減期や血圧降下作用などこれまでのPACAPの臨床応用への懸念を解決することが出来るのではないかと考える。H25年~最終年度に、(4)hMSCsのPACAP誘導作用と作用機序の解明、(5)霊長類を用いた脳梗塞の評価研究を行う。細胞から個体レベルまで脳内のPACAPについて研究を行なう戦略により、ヒトへのトランスレーショナルリサーチにつながる基礎研究を行う。

4. 研究成果

PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide)は、神経細胞の保護および神経修復・再生の二つの作用を有する神経ペプチドであり、神経損傷疾患の治療戦略に重要な役割を果たす。PACAPのヒトへのトランスレーショナルリサーチに向けて、PACAPにより誘導される collapsin response mediator protein 2 (CRMP2)の研究を行い、更にマウセットを用いた虚血モデル実験を行った。

我々は、マウスの中大脳動脈閉塞による脳虚血後にPACAPを脳室内投与することにより、CRMP2タンパク質の発現が投与6時間後で上昇し、CRMP2陽性反応が梗塞周囲のペナンプ

ラ領域の神経細胞に強く認められることを発表した。CRMP2は軸索形成に重要な因子であることから、運動機能や軸索新生を評価するためにマウスの脊髄損傷モデルを用いた機能解析を行った。PACAP10⁻¹²M添加群では生理的食塩水添加群と比較して損傷後14日目において有意な運動機能の回復が認められた。損傷後の脊髄においてCRMP2 mRNA発現量は、投与後7日目まで増加傾向を示し、14日目まで有意差がみられた。CRMP2免疫陽性反応は脊髄の大型及び小型の神経細胞に多くみられ、傷害後では傷害部と正常部の境界領域において強い陽性反応が観察された。大脳皮質への順行性トレーサー投与実験により、PACAP添加群では損傷領域近傍に新生・再生軸索が多数観察された。PACAPはCRMP2発現量を上昇させ、損傷後の軸索再生を誘導することにより運動機能の回復を促進する可能性が考えられた。

また、人臨床への応用を行うためのトランスレーショナルな研究として、マーマセットを用いて中大脳動脈閉塞モデルを作出し、PACAPを静脈内持続投与する実験を行ってきた。現在までにPACAPが若干の血圧低下作用を示すこと、血糖値に作用するなどの現象を確認している。脳梗塞や運動機能の解析については現段階ではまだ有意差は得られておらず、個体数の増加または実験条件の再検討が必要であると考え、虚血モデルをふくめて現在さらに研究を行っている。

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 11件)

Xu Z, Ohtaki H, Watanabe J, Miyamoto K, Murai N, Sasaki S, Matsumoto M, Hashimoto H, Hiraizumi Y, Numazawa S, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. Sci Rep. 査読有、6巻、2016、22373

Matsumoto M, Nakamachi T, Watanabe J, Sugiyama K, Ohtaki H, Murai N, Sasaki S, Xu Z, Hashimoto H, Seki T, Miyazaki A, Shioda S. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Is Involved in Adult Mouse Hippocampal Neurogenesis After Stroke. J Mol Neurosci. 査読有、6巻、2016、1-10

Ardianto C, Yonemochi N, Yamamoto S, Yang L, Takenoya F, Shioda S, Nagase H, Ikeda H, Kamei J. Opioid systems in the lateral hypothalamus regulate feeding behavior through orexin and GABA neurons. Neuroscience. 査読有、320巻、2016、183-193

Amakawa Y, Sakata Y, Hoki Y, Arata S, Shioda S, Fukagawa T, Sasaki H, Sado T. A new Xist allele driven by a constitutively active promoter is dominated by Xist locus environment and exhibits the parent-of-origin effects. Development. 査読有、142巻、2015、4299-4308

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. 査読有、22巻、2015、148-154

Shioda S, Nakamachi T. PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. Peptides. 査読有、72巻、2015、202-207

Kubo H, Shibato J, Saito T, Ogawa T, Rakwal R, Shioda S. Unraveling the Rat Intestine, Spleen and Liver Genome-Wide Transcriptome after the Oral Administration of Lavender Oil by a Two-Color Dye-Swap DNA Microarray Approach. PLoS One. 査読有、10巻、2015、e0129951

Muneoka K, Kuwagata M, Ogawa T, Shioda S. Distinct effects of the serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors milnacipran and venlafaxine on rat pineal monoamines. Neuroreport. 査読有、26巻、2015、510-514

Karki P, Kurihara T, Nakamachi T, Watanabe J, Asada T, Oyoshi T, Shioda S, Yoshimura M, Arita K, Miyata A.

Attenuation of inflammatory and neuropathic pain behaviors in mice through activation of free fatty acid receptor GPR40.

Mol Pain. 査読有、11 巻、2015、6

Takenoya F, Wang L, Kageyama H, Hirako S, Wada N, Hashimoto H, Ueta Y, Sakagami J, Nonaka N, Shioda S.

Neuropeptide W-Induced Hypophagia is Mediated Through Corticotropin-Releasing Hormone-Containing Neurons.

J Mol Neurosci. 査読有、56 巻、2015、789-798

Yoshikawa A, Nakamachi T, Shibato J, Rakwal R, Shioda S.

Comprehensive analysis of neonatal versus adult unilateral decortication in a mouse model using behavioral, neuroanatomical, and DNA microarray approaches.

Int J Mol Sci. 査読有、15 巻、2015、22492-22517

[学会発表] (計 17 件)

中町智哉, 渡邊 潤, 塩田清二

マウスにおける PACAP の唾液分泌促進作用
第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会
2016 年 3 月 28 日 - 30 日 (郡山)

Nakamachi T, Matsuda K, Shioda S.

Impairment of memory and learning and hippocampal oxidative damage in aged PACAP deficient mouse.

CompBiol 2015.

2015 年 12 月 11 日 - 13 日 (広島)

Nakamachi T, Watanabe J, Seki T, Ohtaki H, Shioda S.

Effects of PACAP on the secretions of tear and saliva in mouse.

Neuropeptide 2015.

2015 年 9 月 28 日 - 10 月 1 日 (アバディーン、イギリス)

Watanabe J, Ohtaki H, Nakamachi T, Matsumoto M, Sasaki S, Murai N, Arata S, Shioda S.

Crucial role of PACAP in neural progenitor cells during development and after degeneration.

Neuropeptide 2015.

2015 年 9 月 28 日 - 10 月 1 日 (アバディーン、イギリス)

Nakamachi T, Wada N, Endo K, Seki T, Shioda S.

PACAP attenuates retinal damage in association with modulation of the microglia/macrophage status and cytokines expression.

12th international symposium on VIP/PACAP and related peptides.

2015 年 9 月 21 - 26 日 (カッパドキア、トルコ)

Shioda S, Takenoya F, Hori M, Shibato J, Nakamachi T, Rakwal R.

Neuroprotective effect of PACAP on spinal cord injury through CRMP2 protein.

12th international symposium on VIP/PACAP and related peptides.

2015 年 9 月 21 - 26 日 (カッパドキア、トルコ)

Watanabe J, Ohtaki H, Nakamachi T, Sasaki S, Matsumoto M, Murai N, Seki T, Arata S, Shioda S.

Involvement of PACAP in differentiation of neural progenitor cells via radial glia.

12th international symposium on VIP/PACAP and related peptides.

2015 年 9 月 21 - 26 日 (カッパドキア、トルコ)

Nakamachi T, Ohtaki H, Watanabe J, Shioda S.

PACAP contribute proliferation of hippocampal neural stem/progenitor cells after global ischemia in mice.

12th international symposium on VIP/PACAP and related peptides.

2015 年 9 月 21 - 26 日 (カッパドキア、トルコ)

PACAP 遺伝子欠損マウスにおける加齢に伴う学習記憶障害

中町智哉, 松田恒平, 塩田清二

日本動物学会第 86 回大会

2015 年 9 月 17 日 - 19 日 (新潟)

Hirako S, Kageyama H, Takaenoya F, Wada N, Okabe M, Shioda S.

Effect of intranasal GALP on obesity and hepatic lipid metabolism in obese mice.

12th Asian Congress of Nutrition.

2015 年 5 月 14 日 - 18 日 (横浜)

平子哲史・竹ノ谷文子・和田亘弘・塩田清二
GALP による自律神経系を介した脂質代謝調節機構
第 12 回 GPCR 研究会
2015 年 5 月 15 日-16 日 (東京)

PACAP の唾液および汗分泌促進作用
中町智哉, 渡邊 潤, 佐々木駿, 塩田清二
第 12 回 GPCR 研究会
2015 年 5 月 15 - 16 日 (東京)

Hirako S, Takaenoya F, Wada N, Kageyama H,
Shioda S.
Effect of GALP on lipid metabolism in the
liver.
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2015 年 3 月 21 日-23 日 (神戸)

Wada N, Hirako S, Sato K, Ohtsuka M, Iizuka
Y, Kim H, Matsumoto A, Yasunaga G, Shioda
S.
Whale meat extract improves learning
memory in Alzheimer's disease model
mouse.
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2015 年 3 月 21 日-23 日 (神戸)

Takaenoya F, Hirako S, Wada N, Kageyama H,
Shioda S.
Neuropeptide W-induced hypophagia is
mediated through corticotropin-releasing
hormone-containing neurons.
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2015 年 3 月 21 日-23 日 (神戸)

平子哲史・竹ノ谷文子・影山晴秋・和田亘弘・
塩田清二
抗肥満ペプチド GALP によるエネルギー代謝
調節機構
第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会
2015 年 2 月 13 日-14 日 (京都)

平子哲史・金賢珠・飯塚譲・松本明世・和田
亘弘・竹ノ谷文子・所英樹・塩田清二
鯨抽出タンパク質および鯨油摂取による肝
臓脂質蓄積抑制作用
第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会
2015 年 2 月 13 日-14 日 (京都)

[図書] (計 2 件)
塩田清二、竹ノ谷文子、亀井淳三 他
Biophilia
特集 未病・健康一病気にならないための
衣・食・住そしてココロ
2016 年 総数 83

藤英胤 (編集)、塩田清二、竹ノ谷文子 他
メジカルビュー社
アンチエイジング医学の基礎と臨床
2015 年 総数 447

[産業財産権]
○出願状況 (計 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 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

塩田 清二 (Shioda, Seiji)
星薬科大学・先端生命科学研究所・教授
研究者番号: 80102375

(2) 研究分担者

土肥 謙二 (Dohi, Kenji)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20301509

中町 智哉 (Nakamachi, Tomoya)
富山大学・理工学研究部・助教
研究者番号: 30433840

宮田 篤郎 (Miyata, Atsurou)
鹿児島大学・医学部・教授
研究者番号: 60183969

RAKWAL RANDEEP (Dohi, Kenji)
筑波大学・体育系・教授
研究者番号: 70590850

大滝 博和 (Hirokazu, Otaki)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号: 20349062

池田 聡 (Satoshi, Ikeda)
鹿児島大学・医学部・講師
研究者番号：00343369

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：