

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401	
研究種目：若手研究(B)	
研究期間：2011 ～ 2012	
課題番号：23790295	
研究課題名（和文）	オプトジェネティクスを用いた神経回路構築における PACAP 遺伝子の役割
研究課題名（英文）	PACAP plays significant roles in dendritic spine morphology using optogenetics.
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

研究成果の概要（和文）：

PACAP 欠損マウスにおいて、精神行動異常とスパイン形態異常を見出し、PACAP シグナルが精神疾患と強く相関しシナプス病態に関与することを示唆した。PACAP により miR-132 が発現上昇し、その標的分子でスパイン形成への関与が報告されている p250GAP mRNA およびタンパク質の減少が認められた。

また、PACAP により、5-HT_{2A} 受容体の細胞内局在化が生じることを見出した。PACAP シグナルのうち、おもに PAC1 の PKC を介するシグナル系が 5HT_{2A} 受容体の制御に関することも示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we showed that the number of PSD-95-labeled synaptic puncta was decreased in primary cultured hippocampal neurons prepared from PACAP^{-/-} mice while it was increased by PACAP in the neurons from wild-type mice, and PACAP increased miR-132 expression and decreased mRNA and protein expression levels of p250GAP which is involved in dendritic spine formation and targeted by miR-132.

PACAP induced 5-HT_{2A} receptor internalization in a dose- and time-dependent manner. VIP did not induce 5-HT_{2A} receptor internalization, suggesting that PAC1 is involved in the PACAP-induced 5-HT_{2A} receptor internalization. In addition, we observed that pretreatment with the protein kinase C (PKC) inhibitor sphingosine inhibited the 5-HT_{2A} receptor internalization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：受容体・シグナル情報伝達系・PACAP・神経細胞・樹状突起スパイン・精神疾患

1. 研究開始当初の背景

統合失調症、自閉症、うつ病などの精神疾患は、未だその病態メカニズムには不明な点が多いが、近年、病態に共通する機構として、神経細胞上のシナプス機能障害が注目されている。シナプス機能障害が認知・行動異常の表現型の直接的な原因であると考えられている。

PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) は神経伝達物質・神経調整因子としての働きが知られている神経ペプチドである。これまでの行動薬理学的検討から、PACAP 欠損マウスは、新奇環境下における多動や頻繁なジャンプ行動に加え、統合失調症等で認められるプレパルスインヒビション障害、認知機能障害、うつ状態

など精神行動異常が認められ、PACAP シグナルの機能変化と精神疾患との関連が強く示唆されている。

PACAP は統合失調症の脆弱因子の1つである DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) の機能を即時的に調節することが明らかになっており、シナプス関連タンパク質である DISC1・Kalirin-7・PSD-95 複合体の解離、その後の Rac1 活性化が本制御に重要である事が報告された。

また、PACAP 欠損マウスは、一過的な樹状突起スパイン肥大化を引き起こすことが報告されているセロトニン 2A/2C 受容体作動薬 DOI に野生型よりも低濃度から反応すること、精神行動異常が、ドパミン D2/セロトニン 2A 受容体 (5-HT2R) 拮抗薬により改善することから 5-HT2 受容体亢進が考えられる。

これらの結果は、PACAP が神経ネットワーク構築や樹状突起スパイン成熟に関わる分子およびシナプス形成を制御している可能性を示すものである。

2. 研究の目的

本研究では、Halo-tag や蛍光イメージングシステムなどのオプトジェネティック的手法を用いて、統合失調症などの精神疾患の脆弱因子の1つと考えられる PACAP について、神経ネットワーク構築、樹状突起スパインの機能制御・形態学的発達における役割を解析する。

また、行動薬理学的手法により明らかになった PACAP 欠損マウスにおける 5-HT2 受容体亢進について、PACAP シグナルとセロトニン受容体との相互作用や、そのメカニズムの解明を行う。

これらの解明により、精神疾患発症・病態の分子メカニズムの理解と PACAP の新規創薬ターゲットとしての有用性を目指す。

3. 研究の方法

(1) PACAP によるスパイン形態・シグナル伝達の解析

初代培養系における検討では、胎生 16.5 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。培養 21 日目に固定し、神経細胞マーカー MAP2 およびポストシナプティックマーカー PSD-95 に対する免疫組織により、PSD-95 陽性樹状突起スパイン数を計測した。また、8 週齢の ICR 系の雄性野生型または PACAP 欠損マウスの海馬 CA1 領域を含む切片をゴルジ染色し、錐体細胞のスパインの数および形態を計測して比較した。

初代培養海馬神経細胞の totalRNA は、播種から 19 日後に終濃度 10nM または 100nM の PACAP を添加し、24 時間後に細胞から

RNA を抽出した。

動物実験はすべて大阪大学動物実験指針を遵守し、大阪大学動物実験委員会の承認を得て倫理的に実施した。

(2) PACAP 欠損マウスにおけるセロトニン 5-HT2A 受容体亢進に関する分子メカニズム解析

PACAP の特異的受容体である PAC1 が内在的に発現している HEK293T 細胞に、Halo タグ (以下 Halo) 5-HT2A を導入した。24 時間後に膜非透過性蛍光リガンドを用いて細胞膜上に局在している Halo-5-HT2A を標識した。さらに、PACAP で刺激し、30 分間培養した後固定し、共焦点顕微鏡にて観察を行った。解析は正確な細胞の形状の ROI を設定し、細胞全体の蛍光量 (A) を測定した。設定した ROI を元に、目視によって細胞膜の内側まで ROI を縮め、細胞質中を認識する ROI を設定し、インターナリゼーションしている蛍光量 (B) を測定した。インターナリゼーションの割合は、インターナリゼーションしている蛍光量 (B) / 細胞全体の蛍光量 (A) として算出した。また、タイムラプス撮影を行い、PACAP による Halo-5-HT2A インターナリゼーションの経時的変化を観察した。

4. 研究成果

(1) PACAP によるスパイン形態・シグナル伝達の解析

PACAP 欠損マウス胚由来の培養神経細胞では、野生型マウスに比べて、PSD-95 陽性スパイン数が減少している傾向が見られた。さらに、脳切片を用いた検討では、PACAP 欠損マウスの海馬 CA1 領域において、野生型と比較して、スパイン数の減少とともに異常な形態を示すスパインの増加傾向が認められ、特に頸部を持たない隆起型 (Stubby 型) が増加していた。

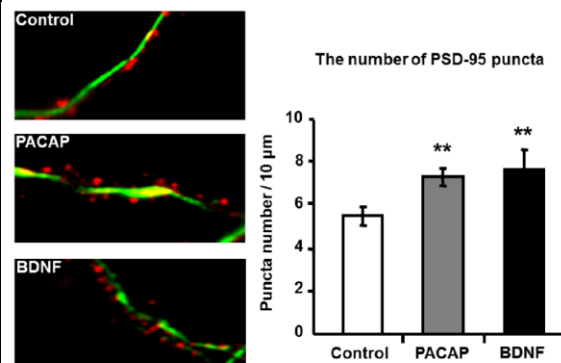


図1 PACAP投与における成熟スパイン数の増加

初代培養神経細胞における PACAP 投与により、培養 21 日目でのスパインの数および体積の増加が認められた。このスパイン増加は、脳由来神経栄養因子 (BDNF) に匹敵するものであった (図 1)。

スパイン形成促進作用の分子機構解析として、神経機能や神経細胞の形態調節に関わる5種類のmicroRNAに着目し、PACAPによる発現変動を解析した。結果、PACAPによりmiR-132のみ発現上昇が認められ、その標的分子であり、スパイン形成に関わることが報告されているp250GAP mRNAおよびタンパク質の減少が認められた(図2)。

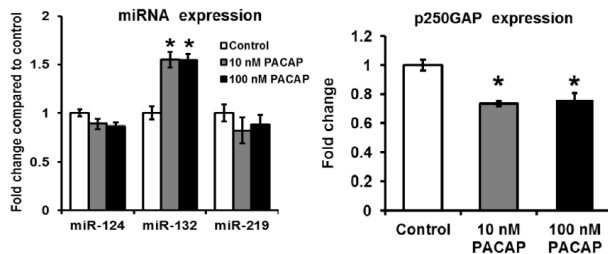


図2 PACAP投与におけるmiR-132の増加とp250GAPの減少

今後、PACAP シグナルを起点とした脳領域特異的なスパイン形成異常に関わる分子機構を詳細に解析することにより、精神疾患の発症機構の解明、PACAP シグナルを標的とした新規創薬候補分子の同定に繋がることが期待される。

(2) PACAP 欠損マウスにおけるセロトニン5-HT2A受容体亢進に関する分子メカニズム解析

5-HT2A 作動薬により PACAP 欠損マウスにて過感受性が見られる大脳皮質や他の脳部位において5-HT2A発現量を検討したところ、有意な発現量の変化は認められなかった。

しかし、5-HT2ARはGPCRであるため、細胞膜上での局在に変動が見られる可能性があることから、5-HT2ARのHalo-tag融合蛋白質を作製し、細胞膜非透過型蛍光リガンドを用いて、細胞膜上での動態をHEK293T細胞にて検討を行った。その結果、PACAP投与により5-HT2ARの細胞膜上から細胞内への移動が起こるインターナリゼーションが生じることが明らかになった。PACAPにより生じる5-HT2A受容体のインターナリゼーションは、PACAPと70%以上の相同性を持つVIPやクラスAのGPCRであるRhodopsinでは、有意な変化を示さなかった。また、他のセロトニン受容体である5-HT1A、5-HT2C受容体を解析した結果、PACAPシグナルは各セロトニン受容体の内部局在割合にも有意な変化を生じないことから、PACAPシグナルが5-HT2A受容体に直接的に関与する可能性が示された(図3)。

さらに、PACAPシグナルのうち、おもにPAC1のPKCを介するシグナル系が5-HT2A受容体の制御に関することも示唆された。

以上の検討から、PACAP-PAC1による特異的な5-HT2A受容体の動態制御は、セロトニン機能制御の可能性と新規創薬ターゲット

トとしての有用性を示すものと考えられる。

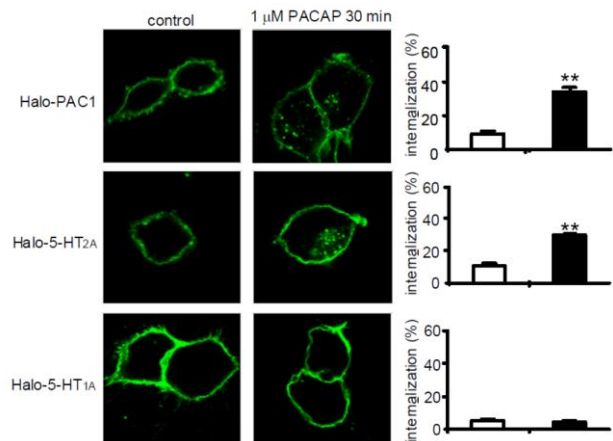


図3 PACAPによる5-HT2A受容体の細胞内局在化

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4件)

Tajiri M, Hayata-Takano A, Seiriki K, Ogata K, Hazama K, Shintani N, Baba A, Hashimoto H.

Serotonin 5-HT(7) Receptor Blockade Reverses Behavioral Abnormalities in PACAP-Deficient Mice and Receptor Activation Promotes Neurite Extension in Primary Embryonic Hippocampal Neurons: Therapeutic Implications for Psychiatric Disorders. 48(3), 473-81 (2012) 査読有

Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R and Baba A

PACAP is Implicated in the Stress Axes. Current Pharmaceutical Design 17, 985-989 (2011) 査読有
DOI: 10.2174/138161211795589382

Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, 他

PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. Stress 14(4), 368-375 (2011) 査読有
DOI: 10.3109/10253890.2010.544345

早田 敦子、橋本 均

セロトニンシグナルと発達障害 脳 21, 14(2), 83-87, (2011) 査読なし

[学会発表] (計8件)

勢力 薫

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) plays significant

roles in dendritic spine morphology
NEURO2013, 2013年6月20日 京都国際会館

狭間 啓佑
慢性的な社会的敗北ストレスに対する
PACAP ヘテロ接合型変異マウスの頑強性
第86回日本薬理学会年会 2013年3月23日
福岡国際会議場

早田 敦子
Halo タグシステムを用いた PACAP シグナルによる受容体動態の解析
第85回日本生化学会大会 2012年12月16日
福岡国際会議場

円丁 直樹
PACAP によるセロトニン 2A 受容体の内部局在化の解析
第122回日本薬理学会近畿部会 2012年11月16日
大阪千里ライフサイエンスセンター

早田 敦子
Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) plays a critical role in mental function and neuronal morphology.
28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology 2012年6月6日
Stockholm, Sweden

早田 敦子
セロトニン7受容体を介した精神機能調節：
PACAP 欠損マウスの精神行動変化および培養神経細胞への作用
第48回日本生化学会大会 2011年9月23日
京都国際会館

尾形 勝弥
PACAP による樹状突起スパインの形態調節
第54回日本神経化学会大会 2011年9月27日
石川県加賀市

勢力 薫
樹状突起スパインの形成・成熟における PACAP の作用
日本薬学会薬理系薬学部会 2011年8月31日
東京 北里大学

[その他]
ホームページ等

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) 研究代表者
早田 敦子 (HAYATA ATSUKO)
大阪大学・連合小児発達学研究科・助教
研究者番号：70390812