

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592681

研究課題名(和文) 緑内障に伴う網膜の免疫反応と PACAP の保護作用

研究課題名(英文) Neuroprotective effect of PACAP against retinal damage in Glaucoma via immunomodulation

研究代表者

關保 (Seki, Tamotsu)

昭和大学・医学部・客員教授

研究者番号：10245855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は神経ペプチド、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)に注目し緑内障に対する治療効果について検討してきた。

緑内障モデルマウスを作成し、PACAPの硝子体内投与を行ったところ、神経細胞死を有意に抑制することが明らかとなった。さらにPACAP投与により、網膜内顆粒層で細胞分裂マーカーのBrdU陽性細胞が有意に増加していた。これらの細胞の多くはマイクログリア/マクロファージであり、神経保護的に活性化していた。以上の本研究の研究成果からPACAPはマイクログリア/マクロファージの増殖と神経保護的な活性化を促進することによって神経保護作用を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on retinal ganglion cell (RGC) death in Glaucoma model mice.

When PACAP was co-administered with NMDA, significantly increased RGC survival at day 7, and a decrease in the number of TUNEL-positive RGCs at day 3 were observed.

The injection of PACAP significantly increased the number of retinal microglia/macrophage (MG/M). PACAP significantly elevated the messenger RNA levels of anti-inflammatory cytokines such as transforming growth factor beta 1 and IL-10 in the injured retina, with the immunoreactivities seen to overlap with markers of MG/M. These results suggest that PACAP enhances the proliferation and/or infiltration of retinal MG/M and modulates their status into an acquired deactivation subtype to favor conditions for neuroprotection.

研究分野：眼科学

キーワード：PACAP 緑内障

1. 研究開始当初の背景

緑内障は網膜神経細胞が進行的に細胞死を起こす疾患であり、重篤化すると失明に至る。現在緑内障に対する治療法は眼圧を下げる対症療法のみであり、網膜神経細胞を保護する根本的な治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド ( Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide : PACAP ) は中枢・末梢神経に存在し、神経成長因子として機能することが知られている。本研究では PACAP の網膜神経保護作用における免疫系の役割を明らかにすることを目的とする。そこで免疫系細胞の対象としてマクロファージ/マイクログリア系細胞に焦点を当てる。マウス緑内障モデルを用いて、PACAP による保護作用とマクロファージ/マイクログリア系細胞および網膜神経節細胞のサイトカインを介した細胞間クロストークとの関連性を解析し、将来ヒトの緑内障に対する新たな医療、治療法につながる基礎研究を目指す。

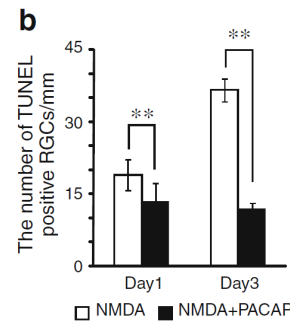
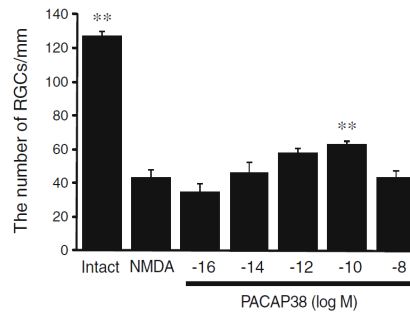
3. 研究の方法

( 1 ) 緑内障モデルマウスは網膜神経節細胞 (RGS) に細胞死を誘導する N-methyl-D: -aspartate acid (NMDA) を硝子体内投与することにより作成した。様々な濃度の PACAP を NMDA と同時に硝子体投与し、細胞死を dUTP end-labeling (TUNEL) 染色によって測定した。内因性 PACAP の神経保護作用を解析するため、PACAP ヘテロノックアウトマウスを用いて同様に緑内障モデルを作成し、その細胞死への影響を解析した。

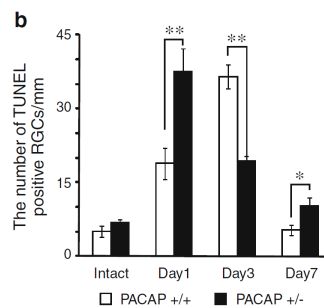
( 2 ) PACAP による神経保護作用のメカニズムを調べるため、緑内障モデルマウスに PACAP を投与後、網膜内の免疫細胞を免疫染色により調べた。また炎症性惹起性および抑制性サイトカインを real time PCR を使用して調べた。

4. 研究成果

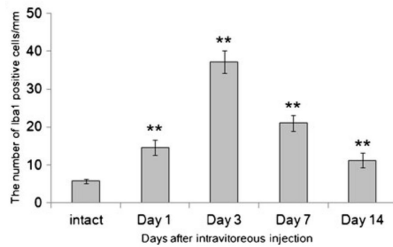
PACAP (  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-14}$ , or  $10^{-16}$  M ) を NMDA と同時投与したところ、 $10^{-10}$  M の PACAP を投与したときに投与7日後で RGS の減少が有意に抑制されることが観察された。このとき TUNEL 陽性の細胞死は投与1, 3日後に有意に抑制されていた。



次に内因性の PACAP の神経保護作用を解析するために、PACAP のヘテロノックアウトマウスを用いて細胞死への影響を解析した。NMDA 投与7日後で RGS の細胞死はノックアウトマウスが野生型のマウスに比べて有意に増加していた。



さらに PACAP による神経保護作用のメカニズムを調べるため、緑内障モデルマウスに PACAP を投与後、網膜内の免疫細胞を免疫染色により調べた。すると NMDA 投与3日後に網膜内で IBA1 陽性のマイクログリア・マクロファージ ( MG/M ) が優位に増加していることが明らかとなった。



このとき、抗炎症性サイトカインである Transforming growth factor beta 1 とIL-10の mRNAの発現上昇が観察された。さらにIL-10 ノックアウトマウスではPACAPによる細胞死抑制作用は観察されなかった。PACAPの特異的受容体であるPAC1Rが網膜の神経顆粒細胞に発現していたことから、PACAPは神経顆粒細胞に作用し、間接的にMG/M の増殖と神経保護的な活性化を促進することによって神経保護作用を有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8件)

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, 59(2), 2016, 270-9. doi: 10.1007/s12031-016-0731-x.

Shioda S, Nakamachi T. PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. *Peptides*, 査読有, 72, 2015, 202-207. Doi: 10.1016/j.peptides.2015.08.006

Wada Y, Nakamachi T, Endo K, Seki T, Ohtaki H, Tsuchikawa D, Hori M, Tsuchida M, Yoshikawa A, Matkovits A, Kagami N, Imai N, Fujisaka S, Usui I, Tobe K, Koide R, Takahashi H, Shioda S. PACAP attenuates NMDA-induced retinal damage in association with modulation of the microglia/macrophage status into an acquired deactivation subtype. *J Mol Neurosci.* 査読有 51,

2013, 493-502. doi: 10.1007/s12031-013-0017-5.

関 保, 真木剛浩、下村直樹、濱畑和男. 東京都大田区における緑内障検診について.

*大田区医学会誌* 査読無, 4, 2013, 58-61. doi:なし

関 保. 糖尿病網膜症について、蒲田医師会雑誌, 査読無, 91, 2013, 36. Doi:なし

関 保. 精密かつ体に優しい画像診断装置OCT. *蒲田医師会学術誌*. 査読無, 2013. doi:なし

Nakamachi T, Matkovits A, Seki T, Shioda S. Distribution and protective function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the retina. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 査読有, 3, 2012, 145. doi: 10.3389/fendo.2012.00145.

関 保, 濱畑和男、下村直樹、初木伊津穂、儘田直久. 大田区における緑内障検診. *大田区医学会誌*. 査読無, 4, 2012, 58-61. doi:なし

[学会発表](計14件)

Nakamachi T, Watanabe J, Seki T, Ohtaki H, Shioda S. Effects of PACAP on the secretions of tear and saliva in mouse. *Neuropeptides 2015*. (招待講演)(国際学会) 2015年09月28日~2015年10月01日. Aberdeen, UK

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 in VIP, PACAP and Related Peptides. (国際学会) 2015年09月21日~2015年09月26日. Cappadocia, Turkey

Nakamachi T, Wada Y, 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 in VIP,

PACAP and Related

Peptides. (国際学会). 2015年09月21日～2015年09月26日. Cappadocia, Turkey

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03月28日～2016年03月30日. 郡山

渡邊潤, 佐々木駿, 中町智哉, 大滝博和, 荒田悟, 本田一穂, 塩田清二. エクリン汗腺におけるPACAPの汗分泌促進作用. 第13回GPCR研究会. 2016年05月13日～2016年05月14日. 東京

Shun Sasaki, Jun Watanabe, Hirokazu Ohtaki, Akira Miyazaki, Seiji Shioda, Hirohiko Sueki. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine sweat secretion. 日本研究皮膚科学会 第40回年次学術大会・総会. 2015年12月11日～2015年12月13日. 岡山

中町智哉, 渡邊潤, 佐々木駿, 塩田清二. PACAPの唾液および汗分泌促進作用. 第12回GPCR研究会. 2015年05月15日～2015年05月16日. 東京

Tamotsu Seki, Tomoya Nakamachi, Jozsef Farkas, Jun Watanabe, Sachiko Izumi, Seiji Shioda. Role of PACAP for impairment of cornea epithelial wound healing. 2014年10月01日～2014年10月04日. Nice, France

Nakamachi T, Kagami N, Hori M, Yoshikawa A, Sugiyama K, Imai N, Seki T, Arata S, Shioda S. Expression and localization of IL-6 and PACAP receptor in mouse brain after global ischemia. Society for Neuroscience's 43rd annual meeting. 2013年11月09日～2013年11月13日. San Diego, CA, USA.

中町智哉, 和田悦洋, 関保, 加賀美信幸, 今井ノリ, 荒田悟, 塩田清二. 緑内障モデルマウスを用いたPACAPの網膜保護機構の検討～マイクログリア/マクロファージの関与～. 第60回日本実験動物学会総会. 2013年05月15日～2013年05月17日. つくば市、

茨木

中町智哉・和田悦洋・遠藤貴美・中村圭輔・堀元英・土川大介・吉川輝・土田将史・加賀美信幸・今井ノリ・関保・小出良平・塩田清二. 神経ペプチドPACAPの網膜保護効果における網膜局所免疫環境の変化についての検討 - 網膜保護効果へのマイクログリア/マクロファージとTGF-βの寄与 - 第9回GPCR研究会. 2012年05月11日～2012年05月12日. 東京

T. Nakamachi, Y. Aizawa, H. Ohtaki, S. Yofu, Y. Wada, T. Seki, S. Arata, N. Shintani, H. Hashimoto, A. Baba and Seiji Shioda. PACAP stimulates tear secretion in mouse. 19th International Symposium on Regulatory Peptides. 2012年08月20日～2012年08月23日.

Copenhagen, Denmark

Nakamachi T, Wada Y, Seki T, Tsuchikawa D, Hori M, Tsuchida M, Yoshikawa A, Matkovits A, Kagami N, Imai N, Arata S and Shioda S. PACAP suppresses retinal neuronal damage through modulation of the activation state of retinal microglia/macrophage. The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. 2012年10月13日～2012年10月17日. New Orleans, LA.

中町智哉, Farkas Jozsef, 和田悦洋, 関保, Matkovits Attila, 加賀美信幸, 土田将史, 吉川輝, 杉山公一, 今井ノリ, 荒田悟, 塩田清二. マウスにおけるPACAPの角膜傷害治癒効果の検討. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2013年03月28日～2013年03月30日. 香川, サポートホール高松

{ 図書 } (計 5 件)

Watanabe J, Seki T, Shioda S. PACAP and neural development. In: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide; PACAP, (Eds. Reglodi D and Tamas A). New York: Springer Nature (New York) 2016. in press.

Nakamachi T. Chapter 18A. "Secretin" In:

Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology (Eds. Takei Y, Ando H, Tsutsui K). Elsevier (USA). 2015. P. 142-143.

Nakamachi T. Chapter 18D. "Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide-Related Peptide" In: Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology (Eds. Takei Y, Ando H, Tsutsui K). Elsevier (USA). 2015. P. 148-149.

Watanaeb J. Chapter 18E. "Vasoactive intestinal peptide". In: Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology (Eds. Takei Y, Ando H, Tsutsui K). Elsevier (USA). 2015. P. 150-152.

Watanaeb J. Chapter 18F. Peptide histidine isoleucine/methionine. In: Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology (Eds. Takei Y, Ando H, Tsutsui K) Elsevier (USA). 2015. P. 153-154.

〔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  
特になし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

関 保 (SEKI, Tamotsu)  
昭和大学・医学部・客員教授  
研究者番号：1 0 2 4 5 8 5 5

### (2)研究分担者

中町 智哉 (NAKAMACHI, Tomoya)  
富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・  
助教  
研究者番号：3 0 4 3 3 8 4 0

渡邊 潤 (WATANABE, Jun)

昭和大学・遺伝子組換え実験室・助教  
研究者番号：5 0 6 4 9 0 6 9