

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461390

研究課題名(和文) PACAPの視床下部における病態生理的意義の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological significance of PACAP in hypothalamus

研究代表者

宮田 篤郎 (Miyata, Atsuro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：60183969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)は、視床下部に最も高濃度に局在する。本研究ではPACAPの視床下部因子としての機能の再評価を目的とし、PACAP特異的受容体であるPAC1の遺伝子発現調節の解明とともに、グリコーゲン代謝におけるPACAPの機能解明とPACAPノックアウトマウスを用いて摂食調節についての解析を試みた。その結果、PAC1はERストレスにより発現抑制されること、グリコーゲン代謝を有意に亢進させること、PACAPノックアウトマウスでは摂餌量が有意に減少しており、摂食亢進作用を示すNPYやAgRPの関連性から、摂食調節におけるPACAPの亢進作用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in hypothalamus with highest concentration. To evaluate PACAP function as a hypothalamic factor, we attempted to elucidate the regulatory mechanism of gene expression of PACAP specific receptor, PAC1. Further we tried to evaluate the function of PACAP in appetite control and energy metabolism by using PACAP-knock out (KO) mice. As a result, we found that the expression of PAC1 is negatively regulated by ER stress. As regarding glycogen metabolism, PACAP potentiates not only glycogenolysis but also glycogenesis of astrocytes. In the analysis of PACAP KO mice, their food intake were significantly decreased and the gene expression of PACAP in PACAP KO mice were significantly increased by fasting. During refeeding, the increments of gene expression of NPY and AgRP, orexigenic peptides were cancelled in PACAP KO mice. These suggest orexigenic function of PACAP in appetite control.

研究分野：分子薬理学

キーワード：PACAP 視床下部 摂食

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は、1989年申請者らによりラット下垂体細胞の cyclic AMP 産生刺激活性を指標としてヒツジ視床下部抽出物より単離、構造決定された (Miyata A, Arimura A, et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 567-574, 1989)。PACAP は、内分泌系、神経系、循環器系等において多様な生理活性を示す多機能神経ペプチドとして、特に神経系においては、神経伝達物質としての機能や、神経栄養因子としての強力な神経保護作用が注目され、その方面の研究がかなり精力的に行われてきた。

(2) 申請者らは、PACAP の発見以来、ヒトやマウの遺伝子構造のみならず、その発現調節について TATA エレメントを含む誘導的発現を行う領域と GC ボックスなどを含む構造的発現を行う領域による 2 相性の発現調節を受けることを明らかにして来た。さらに本遺伝子の神経特異的発現調節に神経選択的サイレンサーが重要な役割を担うことを明らかにしてきた (Sugawara H, Miyata A et al. Regul Peptides 123: 9-14, 2004)。また精巣に高発現していることから、精巣特異的発現調節の解明に取り組み、PACAP 遺伝子の精巣特異的エクソンの上流に、精巣特異的発現調節に関与するエレメントとして PARP1 の関与の可能性を示唆した (Tominaga A, Miyata A et al. Genes to Cells. 5(6): 595-606, 2010)。

(3) PACAP の生体のエネルギー代謝における作用として、脳室内投与により、摂食が抑制され、体重が減少することが知られている。一方で、PACAP ノックアウトマウスでは、著明な体重減少を来すことがわかっている。しかしながら PACAP は、視床下部の腹内側核 (VMH) に高濃度に分布し、レプチンの VMN を介した摂食抑制作用に関与すること以外にはまだ不明な点が多い。PACAP によるエネルギー代謝調節作用として、糖代謝とりわけグリコーゲン代謝に注目した。脳内グリコーゲン代謝は主にアストロサイトで行われるが、学習・記憶など高次脳機能の発現に関与することが知られている。一方 PACAP 処理されたアストロサイトのトランスクリプトーム解析を行うと、エネルギー産生、糖代謝に関与する遺伝子群の発現が上昇することから、脳内グリコーゲン代謝に及ぼす PACAP の効果についての検討を試みた。

## 2. 研究の目的

申請者は、視床下部における PACAP の生理学的意義を明らかにするため、具体的には以下の 3 点を明らかにする。

1) PACAP 特異的受容体である PAC1 遺伝子の ER ストレスにおける負の発現調節メカニズムを明らかにする。

2) 脳内のエネルギー代謝における PACAP の

生理的意義を明らかにするため、アストロサイトのグリコーゲン代謝における PACAP の生理的意義を明らかにする。

3) PACAP ノックアウトマウスを用いて、他の摂食調節関連遺伝子との関連性を解析することにより、視床下部における PACAP の摂食調節における生理的役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス初代培養神経細胞及び Neuro2a 細胞において、ヒト PAC1 遺伝子の 5' 上流のプロモーター領域 (-2160~+268) を含むルシフェラーゼレポーターベクターを用いて、負の制御に関わる転写因子の性状解析をおこなった。PAC1 のみならず、トランスグルタミナーゼ 2 の遺伝子発現、蛋白レベルを、RT-PCR、ウエスタンブロットにより検討した。小胞体ストレス阻害薬、トランスグルタミナーゼ 2 活性阻害薬、特異的 siRNA による影響を検討した。

(2) マウス新生児脳から調製した初代培養アストロサイトにおいて、グリコーゲン濃度を経時的にグリコーゲン定量キット (BioVision) を用いて測定した。PACAP 暴露 1 時間後のグリコーゲン含量を、グリコーゲン分解活性として評価した。またそれに対するグリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤 DAB の効果を検討した。PACAP 暴露 9 時間後のグリコーゲン合成活性を評価した。PACAP 暴露 6 時間後のグリコーゲン代謝関連遺伝子の mRNA 発現を RT-qPCR にて検討した。

(3) PACAP ノックアウトマウスの摂食行動に関しては、体重、摂餌量の生育に伴う変化、各組織重量、血中グルコース、トリグリセリド、インシュリン値を計測し、野生型と比較する。さらに他の摂食関連ペプチドとの関連性に関して、AgRP、メラニン凝集ホルモン (MCH)、コルチコトロピン放出ホルモン (CRH)、ニューロペプチド Y (NPY)、プロオピオメラノコルチン (POMC) の視床下部における遺伝子発現を観察する。

## 4. 研究成果

(1) 小胞体ストレスにより PAC1 遺伝子発現が抑制される機序としては、小胞体ストレスによりトランスグルタミナーゼ 2 が核内に移行し活性化され、転写因子 Sp1 を架橋ポリマー化することにより、その転写活性を抑制することにより、PAC1 遺伝子発現が抑制されることが示唆された。PAC1 遺伝子上流に存在する 2 つの Sp1 サイトに点変異を導入し、プロモーター活性を比較検討したところ、-282/-252bp に存在する 2 つの Sp1 サイト両方がこの負の調節に関与することを明らかにした。

(2) PACAP のエネルギー代謝調節作用について、アストロサイトのグリコーゲン代謝に及ぼす PACAP の効果を検討するため、マウス初代培養アストロサイトを PACAP に暴露し、

経時的にそのグリコーゲン濃度を測定すると図3に示すように、1時間後に一過性に減少した後、ゆっくりと上昇することが明らかとなり、PACAPはグリコーゲンの分解及び合成を有意に促進することが明らかとなった。

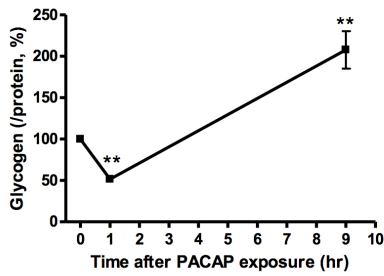


図1 PACAP暴露後グリコーゲンの経時変化

①PACAPによるグリコーゲン分解活性のEC50が0.0084nMと、表1に示すように既存の神経伝達物質であるノルアドレナリンやセロトニンよりも、格段に低濃度で促進した。また相同性の高い vasoactive intestinal polypeptide (VIP)が0.43 nMであることから、PACAP特異的受容体であるPAC1の活性化が関与していることが示唆された。

神経伝達物質	EC <sub>50</sub> (nM)
PACAP	0.0084
VIP	0.43
セクレチン	0.5
ノルアドレナリン	20
セロトニン	100

表1 神経伝達物質のグリコーゲン分解

さらにこの分解活性は、図2に示すように、ホスホリラーゼ阻害剤であるDABにより有意に抑制されることからホスホリラーゼ依存性であることが示唆された。

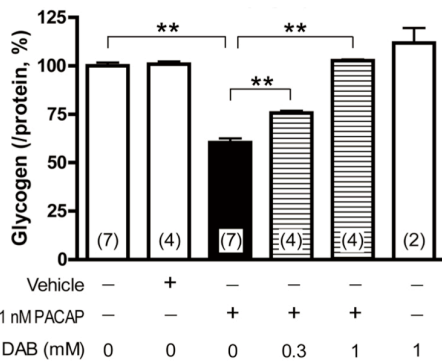


図2 ホスホリラーゼ阻害剤の効果

②9時間後、PACAPは、グリコーゲンを濃度依存的に増加させた。またグリコーゲン代謝に関連する主な遺伝子の発現を検討すると、図3に示すようにグリコーゲン合成に重要とされる足場蛋白である protein targeting to glycoprotein (PTG)の発現を

有意に増加させた。

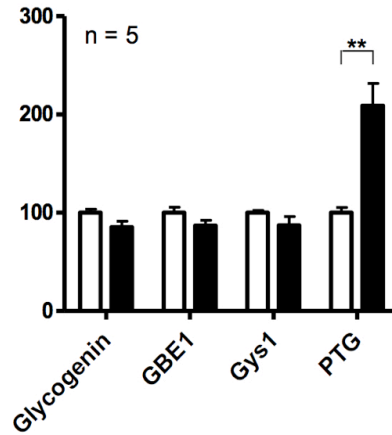


図3 グリコーゲン代謝関連遺伝子の発現

(3) PACAPを脳室内投与或はPVNやVMNの視床下部領域などに注入すると摂食が抑制されることが報告されている。その一方で、PACAPノックアウトマウスでは、やせを呈することが報告されているが、我々の観察においては、体重は野生型とほぼ同じであるが、内臓脂肪が有意に減少していることが明らかとなった。

①図4に示すように、PACAPノックアウトマウスでは、野生型とあまり体重は変わらなかったが、昼間の摂餌量が若干上がるものの、夜間の摂餌量及び総摂餌量は有意に低下し、むしろPACAPは摂食亢進作用を有する事が示唆された。

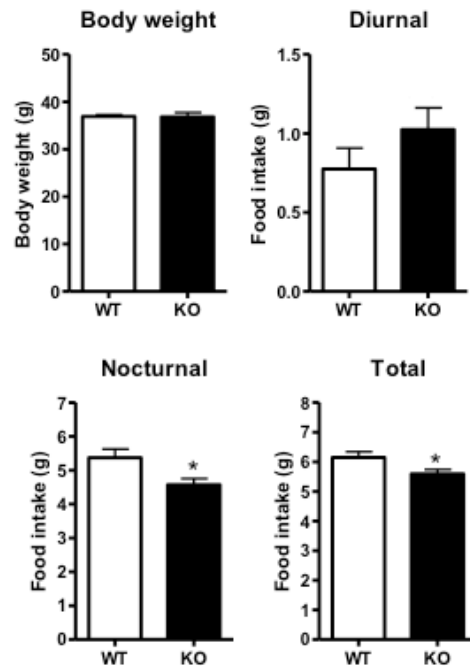


図4 PACAPノックアウトマウスの摂餌量

また、図5に示すように、2日間絶食によって、視床下部のPACAP遺伝子発現は、有意に増加し、再摂餌により元に戻った。

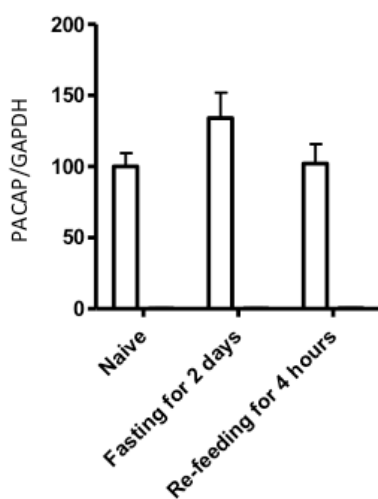


図5 PACAP 遺伝子発現に及ぼす絶食の影響

②PACAP ノックアウトマウスでは、2 日間絶食後 8 時間目における摂食が野生型に比べて有意に減少していたことから、摂食関連遺伝子の発現変動を検討した。

図6に示すように、給餌再開4時間後のPACAP

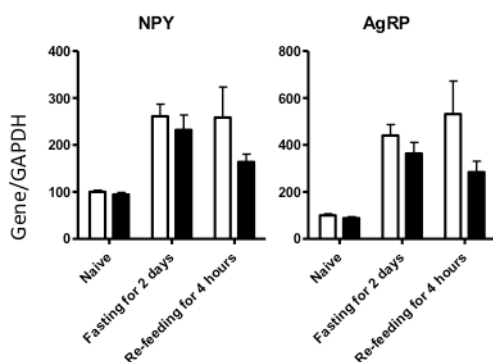


図6 摂食亢進関連遺伝子の発現

ノックアウトマウスの弓状核において、摂食亢進作用を持つ NPY 及び AgRP の遺伝子発現の増加が有意に抑制されていたことから、PACAP による摂食亢進作用を AgRP や NPY が介することが推察される。その一方で、摂食抑制作用を示す POMC ニューロンを PACAP が活性化することが報告されているが、PACAP ノックアウトマウスにおいて、絶食によりその発現は減少するが、再摂餌による変化は観察されなかった。今後、室傍核及び腹内側核の PACAP の摂食亢進作用と摂食抑制作用の相反する作用の調節メカニズムについて、さらに詳細に検討する予定である。

## 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 13 件)

① Ohnou T, Yokai M, Kurihara T, Hasegawa-Moriyama M, Shimizu T, Inoue K, Kambe Y, Kanmura Y, Miyata A: Pituitary

adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor signaling evokes long-lasting nociceptive behaviors through the activation of spinal astrocytes in mice, *J. Pharmacol. Sci.*, 130:194-203, 2016 (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.jphs.2016.01.008.

② Yokai M, Kurihara T, Miyata A: Spinal astrocytic activation contributes to both induction and maintenance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor-induced long-lasting mechanical allodynia in mice, *Molecular Pain*, 12:1-13, 2016 (査読有り)  
DOI: 10.1177/1744806916646383

③ Sugawara H, Tominaga A, Inoue K, Takeda Y, Yamada K, Miyata A: Functional characterization of neural-restrictive silencer element in mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene expression. *J. Mol. Neurosci.* 54(3):526-34, 2014 (査読有り)  
DOI: 10.1007/s12031-014-0348.

④ Miura A, Kambe Y, Inoue K, Tatsukawa H, Kurihara T, Griffin M, Kojima S, Miyata A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 1 receptor (PAC1) gene is suppressed by transglutaminase 2 activation. *J Biol Chem.* 288(45):32720-30, 2013 (査読有り)  
DOI: 10.1074/jbc.M113.452706

[学会発表] (計 22 件)

① Kambe Y, Nakashima Y, Nguyen M. T, Kurihara T, Shintani N, Hashimoto H, Miyata A: Decreased Appetite in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide null mice. 12th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, 9/21-26, 2015 Cappadocia (Turkey)

② Kambe Y, Nakashima Y, Kurihara T, Miyata A: Activation of glycogen metabolism by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in astrocytes. 12th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, 9/21-26, 2015 Cappadocia (Turkey)

③ 神戸悠輝、中島優、新谷紀人、橋本均、宮田篤郎、培養アストロサイトにおける下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによるグリコーゲン代謝の活性化、第 88 回日本薬理学会年會、3/18-20, 2015, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

④ 神戸悠輝、宮田篤郎、下垂体アデニル酸シ

クラーゼ活性化ポリペプチドによる脳内グ  
リコーゲン代謝の活性化：培養アストロサイ  
トを用いた研究、第 67 回日本薬理学会西南  
部会、11/23, 2014. 産業医科大学 (福岡県・  
北九州市)

⑤宮田篤郎、三浦綾子、神戸悠輝、小嶋聡一、  
トランスグルタミナーゼ 2 による PACAP 特異  
的受容体 PAC1 の遺伝子発現抑制メカニズム、  
第 87 回日本薬理学会年会、3/19-21, 2014,  
仙台国際センター (宮城県・仙台市)

⑥Miura A, Kambe Y, Inoue K, Tatsukawa H,  
Kurihara T, Kojima S, Miyata A  
Cross-linking of SP1 by transglutaminase2  
suppresses PAC1 gene expression in  
neuronal cells. 11th International  
Symposium on VIP, PACAP and Related  
Peptides, 8/27-31, 2013, Pecs (HUNGARY)

⑦Miyata A, Yokai M, Ohno T, Hasegawa M,  
Kambe Y, Inoue K, Kamimura Y, Shimizu T,  
Kurihara Y, Acute activation of astrocytes  
in spinal dorsal horn PAC1 receptor is  
involved in PACAP-induced persistent  
aversive behavior. 11th International  
Symposium on VIP, PACAP and Related  
Peptides, 8/27-31, 2013, Pecs (HUNGARY)

⑧Miyata A, Miura A, Kambe Y, Kojima S,  
Cross-linking of SP1 by transglutaminase2  
suppresses PAC1 gene expression in  
neuronal cells. 第 36 回日本分子生物学会  
年会、12/3-6, 2013, 神戸国際会議場 (兵庫  
県・神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮田 篤郎 (MIYATA Atsuro)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  
研究者番号：6 0 1 8 3 9 6 9

### (2) 研究分担者

井上 和彦 (INOUE Kazuhiko)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教  
研究者番号：3 0 3 6 3 6 4 1

神戸 悠輝 (KAMBE Yuki)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教  
研究者番号：6 0 5 4 9 9 1 3

### (3) 連携研究者

勝浦 五郎 (KATSUURA Goro)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任講師  
研究者番号：2 0 4 0 1 2 2 6