

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670767

研究課題名(和文) ペプチド・タンパクの点鼻投与による神経疾患の予防・治療法の新戦略

研究課題名(英文) New strategy for protecting and therapy of neuronal cell degeneration by intranasal infusion of proteins and neuropeptide

研究代表者

塩田 清二 (SHIODA, SEIJI)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：80102375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いたPACAPによる虚血細胞死抑制と神経再生・新生実験について研究を行った。脳虚血した正常のマウスとPACAP遺伝子欠損マウスにTSG-6を脳室内投与あるいは点鼻投与して細胞死抑制が起きるかどうかを形態学的にしらべた。その結果、PACAPはTSG-6に依存せず細胞死を抑制することを示唆する実験結果がえられた。PACAPは軸索伸張因子であるCRMP2という遺伝子あるいは遺伝子産物を活性化することが分かった。PACAPはげっ歯類のみならず霊長類でも同様の作用機序が存在する可能性が考えられ将来の神経再生・新生の作用機序解明にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied the effect of PACAP on neuroregeneration and neurogenesis in mouse brain ischemia. We injected intraventricularly or intranasally TSG-6 in normal and PACAP gene deficient mice to study whether neuronal cell death was inhibited or not by use of morphological methods. As a result, it appeared that PACAP inhibited neuronal cell death after brain ischemia not depending on TSG-6 so it may be suggested that PACAP affects rescuing neuronal cell death without the effect of TSG-6 pathway. In our another study to search for the gene or gene product which PACAP may affect on protecting cell death in brain ischemia and spinal cord injury that it stimulated to induce CRMP2 protein, which is known as an axon outgrowth factor. It may be suggested that PACAP affects on stimulating CRMP2 protein to stimulate axon outgrowth in rodents as well as primates and humans and in future PACAP may be used for protecting of neuronal cell death after brain ischemia and/or spinal cord injury.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PACAP TSG-6 神経細胞死防御 神経再生 点鼻投与

## 1. 研究の背景

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。申請者はPACAPの脳室内投与のみならず静注によっても遅発性神経細胞死が抑制されることを発表している(Uchida, Shioda ら 1996)。また申請者は脳梗塞モデル動物を用いた実験で、PACAPがMAPキナーゼを介して神経細胞死を抑制し、IL-6の産生を促すことも明らかにしている(Shioda ら '98, '99; PNAS '06)。

ところで、骨髄間葉系幹細胞(MSCs)は中枢神経系疾患(脳梗塞、頭部外傷、認知症など)の防御に効果があることを我々はすでに発表している(Ohtaki ら PNAS 2008)。この細胞からTNF- $\alpha$ -stimulated gene/protein 6(TSG-6)が分泌され、免疫調節を介した神経細胞死抑制作用のあることも本研究の共同研究者の渡邊が明らかにしている。それ加えて我々は末梢神経のとくに交感神経線維が骨髄系幹細胞の機能調節をしていることを明らかにしている(Yamazaki, Shioda, Nakauchi ら. Cell '11)。一方、申請者は神経損傷後のMSCs移植によりPACAPの神経細胞における発現亢進作用も見出している。しかし、PACAP/TSG-6の協関については不明のままである。

## 2. 研究の目的

PACAPとTSG-6(TNF- $\alpha$ -stimulated gene/protein 6)の2種類の神経ペプチド・タンパクを用いて神経細胞死防御、神経再生の促進を目的にマウスの脳梗塞・脳外傷・認知症モデルを用いた実験を行う。またヒトでの臨床応用を目指すために、新規ドラッグデリバリーシステム(DDS)法として点鼻投与法の開発を行う。研究概要としては、上記のモデル動物にPACAP、TSG-6を点鼻投与し、脳実質内への移行効率、移行過程、細胞死抑制・神経再生機構の実体解明を行い、ヒトでの新しい予防・治療法を開発する。

PACAPおよびTSG-6の今までの投与経路は脳室内あるいは静脈内投与であり、臨床応用するためには新しい研究戦略が必要である。申請者はすでに抗肥満ペプチドの点鼻投与法にて肥満動物の抗肥満作用効果を明らかにしている(Shiodaら'10, '11, '12)。この点鼻投与法は申請者が独自に開発したものであり、独創性・新規性がある。そこで、この点鼻投与法を種々の神経疾患に応用できないかと

申請者は考えた。本研究では、脳梗塞、頭部外傷および認知症のモデル動物を用い、PACAP、TSG-6の点鼻投与を行い、独創的かつ効果的な神経疾患の予防・治療法を開発することも本研究の目的の一つである。上記の物質について、1)投与時間、投与濃度についての検討、2)投与された後の血液脳関門の通過機序の解明、3)脳実質内での細胞死抑制と神経再生の機序を明らかにする目的で本研究を行った。

## 3. 研究方法

本研究は、神経損傷治療の新規DDSの開発を目指し、脳梗塞、神経外傷および認知症のモデル動物を用い、はじめにPACAPおよびTSG-6をターゲットとしたオリゴアンチセンスを用いた血液脳関門の透過性および点鼻投与による神経細胞死抑制・神経再生作用の評価を行った。さらに脳実質内での作用機序の解明をサイトカインネットワークおよびマイクログリアの活性化から行うために動物を用いた研究も行った。最後にそれらの遺伝子網羅的解析を含むオミックス解析を試みPACAP/TSG-6の機構の解明を行い、神経細胞死抑制および神経再生あるいは神経新生についても研究をおこなう。

## 4. 研究成果

(1) PACAP、TSG-6の新規DDS開発に向けて、血液脳関門(BBB)の透過性を調べた。  
1)麻酔したマウスにPACAP、TSG-6を脳室内、静注、点鼻投与し、脳を摘出し、脳内における取り込み部位を分画した。各分画した組織における<sup>131</sup>I-PACAP、<sup>131</sup>I-TSG-6の取り込み量をガンマーカウンターで測定した。さらに血液脳関門の透過率を調べ、他のペプチドとの比較を行い透過率の比較検討を行った。また、点鼻投与法の脳内移行への取り込みの有効性についても動物を用いて評価した。連携研究者の野中博士および研究協力者のBanks博士に血液脳関門透過の評価システムの供与をしてもらい、測定した結果、とくにPACAPについては、脳への移行率は通常のペプチドより数倍(5-6倍程度)高くみられた。PACAPの点鼻投与については、通常の静脈投与と比較して5-10倍くらいの透過性の高いことがアイソトープを用いた実験で実証された。透過性の高さはおそらくこのペプチドに塩基性アミノ酸が多く含有されているために脳血管と親和性が高いことが起因している

ためであると推察された。

(2) PACAP, TSG-6点鼻投与による神経細胞死防御機構を明らかにする。

1) 神経疾患モデルマウスを作成した。申請者はすでに脳梗塞(中大脳動脈結紮)モデルを作成して種々の動物実験を行っているので問題はなくモデル動物は作成された。また脳外傷モデル(インパクト使用)についても研究室でルーチンに行っており、成功率は極めて高く、実際に実験動物モデルを使って実験が行われた。また認知症モデルは、認知症モデル動物として一般的に用いられるSAMP-8マウスを購入し、繁殖維持させて実験を行った。

2) PACAP/TSG-6による神経細胞死抑制効果については、脳損傷部位をTTC染色にて同定し、さらにその体積変換を指標に評価を行った。その結果、とくにPACAPを脳室内および点鼻投与を行った動物個体において有意にTTC染色部位の減少がみとめられた。ただ、点鼻投与個体においては重症度が増加するにしたがって動物の健康状態が悪くなり、点鼻投与実験が困難となった。脳室内投与実験群においてはそのような傾向はみられなかった。

また認知症の評価には、行動学的評価(モリス水迷路実験、Y字迷路試験、能動的および受動的アポイダテスト)を行ってしらべた。行動学試験は連携研究者の渡邊博士の協力を得て行った。実際の研究において、この機能評価の実験を行うには飼育繁殖の計画が後ろにずれ込み、これらの実験を行うことが出来なかった。それはモデル動物を作成すること、また投与実験の条件設定にかなり時間がかかり、点鼻投与実験を行うところまで研究は進んだが、行動評価を行う段階まで時間がなく、最終目的の実験を行うことは出来なかった。とくに老化促進マウスSAMP-8の搬入に時間がかかり、さらに老化して動物行動変化がでてくるまでに6ヶ月くらいの時間を要したために初期の目的である認知症の機能評価を行うまでの時間不足が影響したためである。

(3) 新規ドラッグデリバリーシステム(DDS)法の開発とその応用

PACAPにはアミノ酸27残基からなるPACAP27とアミノ酸38残基からなるPACAP38が存在する。研究者協力者のBanks博士および申請者らは、血液脳関門に存在す

るPeptide Transport System-6(PTS-6)というPACAP27トランスポーターのオリゴアンチセンス(AS)が脳虚血神経細胞死を有意に抑制することを見いだした。このPACAPトランスポーターをターゲットとした創薬展開は極めて独創的であり、PACAPの半減期や血圧降下作用など、これまでのPACAPの臨床応用への問題点を解決することが出来るのではないかと考えられる。しかし、PTS-6がPACAPのみを介しているのかどうかは今まで不明であった。そこで以下の実験を行った。1) PACAP KOマウスを用いたときにPTS-6が脳虚血性神経細胞死を修飾できるかどうか調べた。脳虚血モデルは我々がすでに確立しているモデルを用いて作成した。また、PACAPの遺伝子が欠損した個体においては内在性のリガンドが存在しない条件での実験となり、PTS-6は内在性リガンドであるPACAPが不在のためにその機能を発揮することができず、結果的に脳虚血による脳梗塞部位の減少をPTS-6単独投与で生じることがなかった。

2) 頭部外傷、認知症モデル動物についても、PTS-6 ASが有効かどうか調べ、DDSの神経損傷疾患に対するPACAPの作用との特異性を調べることを目的として実験をおこなった。しかし、問題点として頭部外傷の評価を客観的に行う評価系を構築することが困難であった。インパクトを使用してできるだけ外傷部位を一定領域にすることを試みたが、実際にはなかなか安定して同じ容積をもつ損傷個体を評価できる個体数を安定的に作成することが困難であった。認知症モデル動物においてはSAMPマウスの搬入までに時間がかかったのになかなか動物実験を行うまでに至らなかった。

3) TSG-6については、上記のモデル動物(脳梗塞、認知症)を用いて点鼻法による神経細胞死抑制および神経再生についてしらべた。TSG-6は研究協力者のProckop博士より提供される予定であった。Prockop博士は大腸菌を用いたシステムによりリコンビナントヒトTSG-6の大量調整に成功している。初期の目的としてはリコンビナントのTSG-6が大量にえられるとの予測があったのでこの実験研究を立案した。しかしProckop博士のところでは大量にこのタンパクを製造する技術のところではいろいろな問題が生じた結果、初期の目的である実験研究を行えるほどのペプチドを我々に供給することができなかつ

た。つい最近では彼のところで大量生産するめどがたったとの連絡があり、また我々にこの物質を供給できる体制ができたとの連絡があったので、今後さらにこの研究を継続して行う予定である。

4) さらにDDSをより効果的に行うためにナノカプセルあるいはデキストランなどを包摂体として用い、投与後のペプチドあるいはタンパクの変性を防ぐ工夫を行い細胞死防御および神経新生の評価を行うための研究を行った。DDSのシステムは野中博士、Banks博士の協力を得た。実際の包摂体としてはデキストリンを用いて実験をした。デキストリンには種々のものが存在する。ただ比較検討した結果、デキストリンが他の種類のデキストリンに比べてより効果的にPACAPを血中から脳内に輸送することが分かったのでこれを使って研究を行った。その結果、この包摂体を使用するとPACAPのペプチダーゼによる分解をかなり防ぐことができ、かつ脳内にこのペプチドを効率よく輸送することが可能であることがわかった。さらに。我々はナノカプセルにこのペプチドを封入して血液脳関門の通過性についてしらべようと計画したが、肝心のナノカプセルについて共同研究者とも協議をしたが、有効と思われるナノカプセルを手に入れることができなかった。したがって今回はナノカプセルを使った実験は行えなかった。また機会があつて脳内に送達できる種々の担体があれば試してみたいと考えている。今回の研究では、デキストリンを包摂体として用いるとPACAPによる遅発性神経細胞死の抑制を効果的に行えるという実験データを動物実験で明らかにしたことから、将来的にヒトでの臨床応用に向けてこの研究が果たす意義は大きいと考えられる

(4) PACAP/TSG-6 点鼻投与による分子機構解明と細胞死抑制への関与

1) 神経細胞死抑制作用に係る PACAP/TSG-6 の役割を分子レベルで解明する。申請者らは PACAP をマウス虚血脳内に投与すると海馬の神経細胞死が有意に低下し、同時に歯状回における神経新生の起きることを見出している(未発表)。しかし神経細胞死保護機構における PACAP の分子レベルでの実体解明はできていない。マウスに点鼻投与した PACAP がどのような遺伝子産物を誘導するか免疫染色法で

確認し、さらにヒト、マウスに特異的なプライマーにより遺伝子発現の経時変化を調べた。

2) マイクログリアを介した炎症制御作用に係る PACAP/TSG-6 経路の解析を行う。

TSG-6 は脳虚血の際に脳内のマイクログリアの活性化を修飾し神経細胞死を抑制する可能性がある。脳虚血した PACAP KO マウスに、TSG-6 を脳内投与あるいは経血管投与を行なって細胞死抑制がおきるかどうかを TTC 染色により評価した。その結果両ペプチドの脳室内投与により、神経細胞死は有意に抑制され、TTC 染色により梗塞部位の減少が顕著にみられた。なお、最近導入された MRI 装置によっても梗塞容積が減少することも確認された。

マイクログリアの活性化を活性化マーカーの抗体を用い組織学的に検討したところ、両ペプチドの脳室内投与によりマイクログリアの活性化が生じているのが分かった。とくにマイクログリアの Type 2 型の増加が有意にみられたことから、神経細胞死を抑制するサイトカインあるいは神経細胞死抑制因子の発現亢進のある可能性が強く示唆された。さらに IL-6 KO マウスを用いて検討した結果、PACAP/TSG-6 経路に、IL-6 が介在することが IL-6 遺伝子欠損動物を用いた動物実験で明らかになった。

3) TSG-6 の神経修復・再生機構に係る PACAP との関連性を調べる。

PACAP は近年、サイトカイン様の働きをするペプチドとしてペプチドカインとも呼ばれている。そこで、TSG-6 投与後の修復・再生期の過程における PACAP および PAC1-R の遺伝子および遺伝子産物を海馬および側脳室周囲部の組織をマイクロダイセクションにより回収し調べた。その結果、TSG-6 が直接あるいは間接的に神経幹細胞からニューロンへの分化誘導を促進するかどうかを BrdU の取り込み実験および PCNA などの細胞増殖マーカーを用いた動物実験にて明らかになった。

4) PACAP/TSG-6 の神経損傷抑制作用に係る遺伝子およびタンパク質の網羅的解明をおこなう)。

脳虚血半球および正常半球から RNA を調整し、cDNA マイクロアレイ解析(アジレント社製)およびプロテオミックス解析(MALDI/TOFMS; Shimadzu 社製)を行った。cDNA マイクロアレイおよびプロテオミックス解析に関する装置はすでに本学に導入済み

であり稼働している。本解析は連携研究者のラクワル博士の協力・支援を得た。さらにマイクロダイセクション装置(Leica, LMD 7000)を用いて採取した大脳皮質領域の錐体細胞、グリア細胞の MAP キナーゼ活性を In gel assay 法および免疫沈降、gel-shift assay 法、RNase protection assay 法を用いて、PACAP による IL-6 以外のサイトカイン誘導の可能性についても検討した。これらのシステムは連携研究者の荒田博士の支援を受けたとくに PACAP においては MAP キナーゼのうちの ERK の活性化が顕著に観察された。また細胞死を促進すると考えられるアポトーシス促進系の JNK の抑制が見られたことから、このペプチドは神経細胞内のアポトーシス経路を抑制しているという細胞内シグナル伝達機構の存在も明らかになった。

上記 PACAP KO マウスから神経細胞、アストロサイトを単離し、虚血条件下で細胞を灌流し細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を細胞内 Ca 測定装置(Argus 50、浜松フォトニクス)および Cell Key System (モレキュラーデバイス社)を用いて測定した。この研究については Cell Key System の本学への導入が大変遅れたために実験を行うことができなかった。しかし、単離したアストロサイトにおいて虚血状態にした条件下では PACAP 投与による細胞内 Ca 上昇が顕著にみられ、内在性 PACAP がこの細胞の虚血条件下において細胞を活性化していることが分かった。今までの我々の研究で活性化したアストロサイトは IL-6 をはじめ複数のサイトカインの誘導を惹起することから、この実験結果を支持すると考えられる。

## 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8件)

Miyamoto K, Tsumuraya T, Ohtaki H, Dohi K, Satoh K, Xu Z, Tanaka S, Murai N, Watanabe J, Sugiyama K, Aruga T, Shioda S, PACAP38 suppresses cortical damage in mice with traumatic brain injury by enhancing antioxidant activity. J Mol Neurosci、査読有、54(3)巻、2014、370-379

Tsuchida M, Nakamachi T, Sugiyama K, Tsuchikawa D, Watanabe J, Hori M, Yoshikawa A, Imai N, Kagami N, Matkovits A, Atsumi T, Shioda S, PACAP stimulates functional recovery after spinal cord injury through axonal regeneration. J Mol Neurosci、査読有、54(3)巻、2014、380-387

Nakamachi T, Sugiyama K, Watanabe J, Imai N, Kagami N, Hori M, Arata S, Shioda S, Comparison of expression and proliferative effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors on human astrocytoma cell lines. J Mol Neurosci、査読有、54(3)巻、2014、388-394

Hori M, Nakamachi T, Shibato J, Rakwal R, Tsuchida M, Shioda S, Numazawa S, PACAP38 differentially effects genes and CRMP2 protein expression in ischemic core and penumbra regions of permanent middle cerebral artery occlusion model mice brain. Int J Mol Sci、2014、15(9)巻、17014-1734

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、2014、15(12)巻、22492-22517

Muneoka K, Kuwagata M, Ogawa T, Shioda S, Mother/offspring co-administration of the traditional herbal remedy yokukansan during the nursing period influences grooming and cerebellar serotonin levels in a rat model of neurodevelopmental disorders. Cerebellum、査読有、14(2)巻、2015、86-96

Watanabe J, Matsumoto M, Kageyama H, Murai N, Sasaki S, Hirako S, Wada N, Arata S, Shioda S, Ghrelin suppresses proliferation of fetal neural progenitor cells, and induces their differentiation into neurons. Peptides、査読有、69巻、2015、40-46

Tsumuraya T, Ohtaki H, Song D, Sato A, Watanabe J, Hiraizumi Y, Nakamachi T, Xu Z, Dohi K, Hashimoto H, Atsumi T, Shioda S, Human mesenchymal stem/stromal cells suppress spinal inflammation in mice with contribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). J Neuroinflammation.、査読無、12(1)巻、2015、35

[学会発表](計10件)

中町智哉・大滝博和・渡邊潤・松田恒平・塩田清二、PACAP の抗酸化誘導作用と加齢に伴う神経変性との関連、第11回GPCR研究会、2014年05月09日~2014年05月10日、日本科学未来館(東京)

徐枝芳・大滝博和・渡邊潤・宮本和幸・村井謙允・中町智哉・平泉裕・沼澤聡・塩田清二、Expression and localization of PACAP specific receptor PAC1R in mouse bone marrow.、第11回GPCR研究会、2014年05月09日~2014年05月10日、日本科学未来館(東

京)

徐枝芳・大滝博和・渡邊潤・宮本和幸・村井謙允・中町智哉・平泉裕・沼澤聡・塩田清二、Expression and localization of PACAP specific receptor (PAC1R) in bone marrow of mice.、第 35 回日本炎症・再生医学会、2014 年 07 月 02 日～2014 年 07 月 05 日、万国津梁館(沖縄)

Nakamachi T, Ohtaki H, Watanabe J, Seki T, Shioda S、PACAP stimulates tear secretion through AQP5 signal in mouse.、20th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP2014)、2014 年 09 月 07 日～2014 年 09 月 10 日、Kyoto Garden Palace(Kyoto)

Xu Z, Ohtaki H, Watanabe J, Hiraizumi Y, Numazawa S, Shioda S、PACAP type 1 receptor expression in hematopoietic stem/progenitor cells of mouse bone marrow with special reference to sympathetic innervation.20th International Symposium on Regulatory Peptides、2014 年 09 月 07 日～2014 年 09 月 10 日、Kyoto Garden Palace(Kyoto)

Xu Z, Ohtaki H, Watanabe J, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S、The role of neuropeptide PACAP in the crosstalk between central nervous system and hematopoiesis.The 11th China-Japan Joint Seminar Histochemistry and Cytochemistry、2014 年 09 月 28 日～2014 年 09 月 29 日、長野県松本市中央公民館(松本)

中町智哉・大滝博和・渡邊潤・関保・塩田清二、マウスの涙液分泌調節機構における PACAP の役割、日本動物学会第 85 回大会、2014 年 09 月 11 日～2014 年 09 月 13 日、東北大学川内北キャンパス(宮城)

Ohtaki H, Tsumuraya T, Sato A, Xu Z, Miyamoto K, Watanabe J, Nakamachi T, Hashimoto H, Shioda S、Suppression of spinal cord injury on human mesenchymal stem/progenitor cells (MSCs) mediated by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP).12th International Congress of Neuroimmunology、2014 年 11 月 09 日～2014 年 11 月 13 日、Mainz, Germany

Ohtaki H, Tsumuraya T, Sato A, Xu Z, Watanabe J, Matsumoto M, Murai N, Nakamachi T, Hiraizumi Y, Hashimoto H, Shioda S、Implantation of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) from bone marrow suppresses spinal cord injury mediated by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP).、44th Annual meeting Society for Neuroscience、2014 年 11 月 15 日～2014 年 11 月 19 日、Washington, DC

Xu Z, Tanaka S, Ohtaki H, Watanabe J, Hiraizumi Y, Numazawa S, Shioda S、PACAP receptor expression of hematopoietic stem/progenitor cells in mouse bone marrow

with special reference to sympathetic innervation.、44th Annual meeting Society for Neuroscience、2014 年 11 月 15 日～2014 年 11 月 19 日、Washington, DC

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩田 清二 (Shioda, Seiji)

昭和大学・医学部・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

大滝 博和 (Ohtaki, Hirokazu)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20349062

中町 智哉 (Nakamachi, Tomoya)

富山大学・大学院理工学研究部・助教

研究者番号：30433840

### (3) 連携研究者

渡邊 潤 (Waranabe, Jun)

昭和大学・遺伝子組換え実験室・助教

研究者番号：50649069

野中 直子 (Nonaka, Naoko)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：20307052

荒田 悟 (Arata, Satoru)

昭和大学・遺伝子組換え実験室・准教授

研究者番号：20159502

ラクワル ランデエブ (Rakwal, Randeep)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：70590850