様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　１５　日現在

機関番号：　１２１０２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６４６２７４５

研究課題名（和文）虚血脳におけるPACAP神経保護作用効果に関わる分子的因子の同定

研究課題名（英文）Identification of molecular factors related to PACAP neuroprotective effect in ischemic brain

研究代表者

ＲＡＫＷＡＬ　ＲＡＮＤＥＥＰ（RAKWAL, Randeep）

筑波大学・体育系・教授

研究者番号：７０５９０８５０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：　マウス脳梗塞モデルにPACAPを投与し、ischemic core(IC)とischemic penumbra (IP)の部位特異的なオミックス解析を行った結果、IPでは血液凝固シグナル活性化に対してICでは血栓分解シグナル活性化が確認され、さらにIPではPACAPによる2次的脳損傷回避作用が示唆された。
　さらにPACAPによりCRMP2の脱リン酸化がPACAP投与6時間のIPにおいて強く促進されることが明らかとなった。CRMP2は脱リン酸化により活性型となり軸索伸長作用を制御することから、PACAPによるCRMP2の脱リン酸化作用は早期神経保護作用において重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Site-specific omics analysis of ischemic core (IC) and ischemic penumbra (IP) was performed by administering PACAP to a mouse cerebral infarction model. As a result, activation of blood clotting signal was confirmed in IP, and thrombolytic signal activation in IC was confirmed. Furthermore, suppression of excessive release of neuroendocrine hormone by IP administration of PACAP and IP prevented progression of secondary brain injury.
Furthermore, it was revealed that dephosphorylation of CRMP2 which had been confirmed to be altered by PACAP was strongly promoted especially at IP of 6 hours after administration of PACAP. Since it is known that CRMP2 changes to active form by dephosphorylation and controls axon formation and axon elongation action, the dephosphorylation action of CRMP2 by PACAP is important in the molecular mechanism of early neuroprotective action of cerebral infarction was suggested.

研究分野：　分子生物学

キーワード：　PACAP

１．研究開始当初の背景

脳梗塞の患者数は国内で約 120 万人とされ毎年約 ７万人以上が死亡しており日本人の死亡原因の上位の疾患である。脳梗塞はたとえ命が助かったとしても深刻な後遺症が残る可能性が高く、介護が必要となる原因のトップである疾患であることから社会に対するインパクトが極めて大きい。今後の高齢化に伴い患者数が多くなると予測されることから、脳梗塞の予防・治療法の開発は医療費や社会的負荷を軽減するうえでも重要性が高いと考えられる。

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP :Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide)は 27 または 38 アミノ酸残基からなる神経ペプチドで神経保護作用，神経分化誘導作用などが知られている。今までに PACAP による遅発性神経細胞死の抑制(参考文献 1)、さらに脳梗塞モデル動物を用いた実験で、PACAP が星状膠細胞を刺激して MAP キナーゼを介し IL-6 の産生を促進して神経細胞死を抑制していることが明らかになっている(参考文献 2,3)。しかし PACAP の神経保護および再生機構については未だ明らかになっていないことが多い。我々はこれまでに PACAP の神経保護および再生機構を明らかにするための基礎研究としてマウス脳梗塞モデルの DNA マイクロアレイ解析を行い脳虚血に関与する遺伝子発現のプロファイリングを虚血後６時間および 24 時間のサンプルを用いて行っている(参考文献 4)。さらにマウス脳梗塞モデルを用い、脳虚血直後に PACAP 投与し、梗塞側脳半球の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析および 2 次元電気泳動によるプロテオーム解析を行い、その結果 CRMP2 タンパク質が急性期(6 時間)で PACAP 投与により発現が増加していることを見出している(参考文献 5)。CRMP2 はコラプシン反応媒介タンパク質 (collapsin response mediator proteins, CRMPs) として知られており、極性・軸索形成や神経細胞の遊走、シナプス形成、シナプス可塑性、神経疾患といった様々な神経機能と病態に関与することが報告されている(参考文献 6)。CRMP2 の軸索形成や軸索伸長作用の制御に PACAP の関与していることが明らかになれば、PACAP の神経保護および再生機構の解明に向けての研究に大きく貢献するものと考えられる。

２．研究の目的

神経ペプチド PACAP の神経細胞死防御、神経再生の促進作用機序の解明を目的にマウス脳梗塞モデルを用いた実験を行う。本研究ではマウス脳梗塞モデルに PACAP を投与し、ischemic core(不可逆的範囲)と周辺 ischemic penumbra(救済可能範囲)の部位特異的な遺伝子発現およびプロテオーム解析を行い、特に penumbra の PACAP による急性期(6 時間)神経保護作用の分子機序を明確にする。また PACAP による CRMP2 タンパク質の神経軸索再生促進への関与を解析することで、いまだ未知な点が多い PACAP の神経細胞死防御、神経再生の促進作用機序の解明に役立て、ヒトでの新しい神経疾患の予防・治療法開発に貢献したいと考えている。現在までに我々は脳梗塞モデルマウスを用いた脳虚血に関与する遺伝子発現プロファイリング、さらに脳虚血後の PACAP 投与による神経保護効果の解明のために DNA マイクロアレイおよび 2 次元ゲル電気泳動によるオミックス解析を用いた検討を行っている(参考文献 4,5)。しかしこれらの解析は脳全体に対して虚血側半球脳と健康な半球脳との比較であることから、本研究では脳梗塞での ischemic core(IC) と 周 辺 ischemic penumbra(IP)の PACAP による部位特異的で時間的経過も考慮した分子レベルでの詳細なプロファイリングを作成し、特に IP での PACAP による早期神経保護作用の分子機序において重要な働きをする因子を明らかにしたい。

３．研究の方法

（１）平成２６年度

①IC と IP 部位のサンプリング

C57BL/6 マウス雄性個体を全身吸入麻酔にて右内頚動脈から塞栓糸を挿入し、先端を乳大脳動脈分岐部に固定して永久中大脳動脈閉塞モデルを作成した。モデルの作成は TTC 染色にて確認した。脳虚血直後に PACAP、比較として生理食塩水を正常側の大脳半球の脳室内に投与し、投与後 6 時間と 24 時間後に虚血側半球からは IC-pacap と IP-pacap、正常側半球からは IC と IP の反対側となる HC(Contra IC)と HP(Contra IP)をサンプリングし、-80◦C に保存した。

②IC と IP 部位特異的遺伝子解析

Masuo Y ら(参考文献 7,8)による Dye-Swap 法にてアジレント社の Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイキット(4x44K)チップを用い遺伝子発現解析を行った。

（２）平成２７年度

①IC と IP 部位特異的プロテオーム解析

蛍光二次元電気泳動 (two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)法を用いて IC および IP での発現量が異なるタンパク質を探索した。2D-DIGE による解析で得られたタンパク質スポットはゲルより回収し、トリプシン消化処理した後に LS/MS/MS により同定を行った。

②CRMP2 タンパク質のリン酸化解析

CRMP2 のリン酸化あるいは脱リン酸化の確認するために CRMP2 リン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティング解析を行った。PACAP 投与後 6 時間と 24 時間後の IC-pacap と IP-pacap、対照として生理食塩水投与後 6 時間と 24 時間後の IC-saline と IP- saline とした。さらに正常側半球からは IC と IP の反対

側となる HC-pacap と HP-pacap、HC-saline と HP-saline を用いた。

（3）平成２８年度

①IPA による統合的解析

Ingenuity Pathways Analysis(IPA)ソフトウェアを用いて、IC と IP の部位特異的な遺伝子解析とプロテオーム解析から得られた実験データを基に生物学的な機能の解釈やパスウェイ解析を行った。

②論文作成

DNA マイクロアレイ解析データを IPA により解析し、PACAP による IC と IP の部位特異的な遺伝子発現変化やプロテオミクス解析から得られた結果などのデータを比較検討し論文作成を行った。

４．研究成果

（1）マイクロアレイ解析

PACAP 投与により 1.5 倍以上（および 0.75 倍以下）の発現変化があった遺伝子は、IC-pacap 6 時間では 683、IP-pacap 6 時間で 591、IC-pacap 24 時間では 3903、IP-pacap 24 時間で 2618 同定された。同定されたそれぞれの上位遺伝子を表 1 に示す。IP-pacap 6 時間では T 細胞活性化(CD28)、抗菌・抗炎症(IFNB1)、細胞周期(HIST1H1D)の遺伝子、IC-pacap 6 時間では抗菌・免疫・治癒(LTF, CAMP)作用遺伝子や赤血球安定化(Ahsp)に関与する遺伝子があった。さらに IP-pacap 24 時間ではドーパミン受容体(DRD2)や炎症系(Cxcl3)などの遺伝子、IC-pacap 24 時間では炎症系(IL6 など)の遺伝子が含まれていた。

表1. PACAP投与により発現変動した遺伝子

IP-pacap 6h	
Symbol	Fold Change
IFNB1	8.96
CTC1	4.26
DNAJB13	3.10
CUL7	3.06
GLI3	3.02
HIST1H1D	-3.85
CD28	-3.70
ANKRD22	-3.45
CACNA1S	-3.33
AOC1	-3.13

IC-pacap 6h	
Symbol	Fold Change
CAMP	20.84
Ahsp	13.97
CNTNAP4	5.00
LTF	3.59
Ngp	3.32
IHH	-4.17
KLK3	-4.00
CHMP4C	-3.70
MAB21L3	-3.70
DRD4	-3.45

IP-pacap 24h	
Symbol	Fold Change
Cxcl3	108.04
CXCL3	63.99
IFNB1	52.15
CXCL2	46.85
IL6	36.21
SERPINA9	-12.50
DRD2	-7.69
FZD5	-7.69
DACH1	-7.14
Ceacam10	-6.67

IC-pacap 24h	
Symbol	Fold Change
IL6	226.83
CCL4	97.13
CXCL2	91.49
CXCL3	84.97
S100A8	56.74
SOSTDC1	-100.00
TTR	-25.00
OTX2	-20.00
XIST	-16.67
KL	-11.11

（2）IPA 解析

IPA 解析における IC-pacap 6 時間および IP-pacap 6 時間の Canonical Pathway の結果を表 2 に示した。

表2. PACAP投与6時間におけるパスウェイ解析

Canonical Pathway解析	
IP-pacap 6時間	IC-pacap 6時間
トロンビンシグナル ▲	線溶系シグナル ▲
IL-1シグナル ▼	
CD28シグナル(Th細胞) ▼	Gα12/ 13シグナル ▼
ドーパミン受容体シグナル ▼	LXR / RXR活性化 ▼
プロラクチンシグナル ▼	白血球浸潤シグナル ▼
GNRHシグナル ▼	シナプス長期抑圧 ▲
成長ホルモンシグナル ▼	
カルシウムシグナル ▲	
精液運動（走化性） ▲	

PACAP 投与 6 時間において興味深いのは IP では血液凝固に関与するトロンビンシグナル伝達が活性化するのに対して IC では PLAT(plasmin) の発現量が増加し、F II(prothrombin)と serpinF2 の発現量が低下することによる血栓分解を含む線溶系シグナル伝達が活性化することである。脳梗塞急性期の治療法としてまず行われるのは血栓溶解療法である。発症 3 時間以内の超急性期では脳血流改善のために血栓溶解薬 t-PA が投与されるが、副作用として出血リスクが問題となっている。今回の結果から PACAP は IC では血栓溶解、IP では血液凝固に関連する遺伝子の発現が確認できたことから、PACAP による血栓溶解作用は出血リスクが少ない可能性が示唆された。

また IP-pacap 6 時間ではその他に IL-1 シグナル、CD28 シグナル(Th 細胞)、ドーパミン受容体シグナル抑制による抗炎症作用および 2 次的脳損傷の回避の可能性が示唆された。さらに成長ホルモン・プロラクチン・性腺刺激ホルモン放出ホルモンシグナル抑制が確認できたが、これら視床下部–下垂体–副腎系の神経内分泌ホルモンの過剰放出は 2 次的脳損傷の危険性が高くなることから、PACAP による内分泌ホルモン抑制作用は脳保護の効果につながると考えられる。

IC-pacap 6 時間では Gα12/ 13 シグナル、LXR / RXR 活性化シグナル、白血球浸潤シグナルがいずれも抑制、さらにシナプス長期抑圧が促進する結果が得られた。これらの結果から PACAP による血管平滑筋収縮による血圧降下の抑制や抗炎症などの他、シナプス可塑性への関与も示唆された。

IC-pacap と IP-pacap で共通だったのはカルシウムシグナルと精液運動であった。カルシウムシグナルについては発現変動した遺伝子を考慮すると IP-pacap、IC-pacap 共に細胞内の Ca2＋濃度上昇による血管収縮が引き起こす血圧上昇作用が主なものと考えられる。さらに精液運動であるが、これは細胞走化性や遊走の促進作用と考えられるが、詳細については不明のため今後検討が必要である。

脳梗塞の急性期治療において IC における血栓溶解と IP における脳保護作用を備えた治療が回復のための最善の策であるが、今回の結果から PACAP が脳梗塞急性期治療に有効であることが示唆された。今後はさらに生物機能やパスウェイ解析を進め PACAP の脳保護作用に関与する因子を多く同定し、メカニズム解明に役立てていきたい。

（3）CRMP2 のリン酸化

CRMP2 リン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティング解析の結果を図 1 に示す。虚血脳では PACAP 投与後 6 時間と 24 時間のいずれにおいてもリン酸化 CRMP2 の減少が確認できた。しかし正常側半球の健康な領域では PACAP 投与によるリン酸化 CRMP2 の減少は確認されなかった。CRMP2 は軸索形成などの神経機能に関与するが、これまでの研究からリン酸化の状態は不活性型といわれている（参考文献 9)。今回の結果は PACAP が CRMP2 の脱リン酸化を促進することで CRMP2 を活性化させている可能性を示すものである。CRMP2 の脱リン酸化は IP 部位において特に強く促進されていることから PACAP がペナンブラにおける神経保護および神経再生に関与していることが示唆された。CRMP2 は Rho キナーゼや Cdk5、GSK-3β などによりリン酸化される（参考文献 9,10)。逆に、ニューロトロフィン-3 や脳由来神経成長因子（BDNF）により GSK-3β が阻害され、CRMP2 のリン酸化が抑制される（参考文献 11)。今回の IPA 解析 Canonical Pathway の結果において IP-pacap で CDK5 シグナル抑制、IC-pacap で RhoA シグナル抑制が確認できていることから PACAP による Rho および Cdk5 シグナル抑制を介した CRMP2 脱リン酸化による軸索形成作用が示唆された。

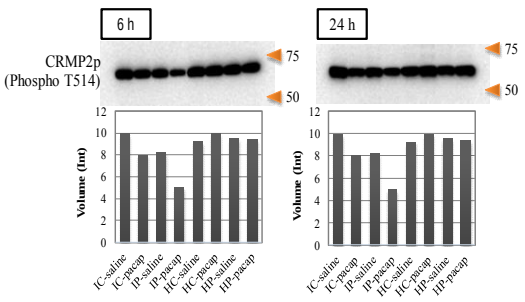

図1. PACAP投与によるリン酸化CRMP2の変動

（4）2D-DIGE 解析

2D-DIGE 解析により IP-pacap 6 時間では Neurofilament medium polypeptide、Plakoglobin の増加、IP-pacap 24 時間では 14-3-3 protein の減少、さらに IC-pacap 24 時間では Neurofilament medium polypeptide の増加と Plakoglobin の減少が確認できた。Neurofilament medium polypeptide は軸索径の成長、Plakoglobin は細胞接着、14-3-3 protein はリン酸化された多様な酵素タンパク質に結合し，その活性を制御する分子として知られている。今後 IPA 解析の結果と合わせて同定されたこれら因子について神経保護作用への関与を含め検討していく予定である。

〈参考文献〉

1. Uchida D, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Shioda S, Banks WA. Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. Brain Res. 1996 Oct 14;736(1-2):280-6.
2. Shioda S, Yada T, Nakajo S, Nakai Y, Arimura A. PACAP increases cytosolic calcium in vasopressin neurons: synergism with noradrenaline. Ann N Y Acad Sci. 1998 Dec 11;865:427-30.
3. Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 May 9;103(19):7488-93. Epub 2006 May 1.
4. Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Nakamura K, Wada Y, Tsuchikawa D, Yoshikawa A, Tamaki K, Shioda S. Unraveling the ischemic brain transcriptome in a permanent middle cerebral artery occlusion mouse model by DNA microarray analysis. Dis Model Mech. 2012 Mar;5(2):270-83. doi: 10.1242/dmm.008276. Epub 2011 Oct 20.
5. Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Ogawa T, Aiuchi T, Tsuruyama T, Tamaki K, Shioda S. Transcriptomics and proteomics analyses of the PACAP38 influenced ischemic brain in permanent middle cerebral artery occlusion model mice. J Neuroinflammation. 2012 Nov 23;9:256. doi: 10.1186/1742-2094-9-256. Erratum in: J Neuroinflammation. 2013;10:18.
6. Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Ménager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. Nat Neurosci. 2001 Aug;4(8):781-2.
7. Masuo Y, Shibato J, Rakwal R. ADHD animal model characterization: transcriptomics and proteomics analyses. Methods Mol Biol. 2012;829:505-30. doi: 10.1007/978-1-61779-458-2_32.
8. Masuo Y, Imai T, Shibato J, Hirano M, Jones OA, Maguire ML, Satoh K, Kikuchi S, Rakwal R. Omic analyses unravels global molecular changes in the brain and liver of a rat model for chronic Sake (Japanese alcoholic beverage) intake. Electrophoresis.

2009 Apr;30(8):1259-75.
9. Arimura N1, Ménager C, Kawano Y, Yoshimura T, Kawabata S, Hattori A, Fukata Y, Amano M, Goshima Y, Inagaki M, Morone N, Usukura J, Kaibuchi K, Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. Mol Cell Biol. 2005 Nov;25(22):9973-84.
10. **有村奈利子、木村俊秀、藤井佳代、貝淵弘三　Rho キナーゼによる** CRMP-2 **のリン酸化とその活性制御について　脳** 21：2004
11. Takeshi Yoshimura, Yoji Kawano, Nariko Arimura, Saeko Kawabata, Akira Kikuchi, Kozo Kaibuchi. GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. Cell: 2005, 120(1);137-49

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

① 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. 2015;3:148-54.
doi: 10.1016/j.gdata.2015.01.007

② Hori M, Nakamachi T, Shibato J, Rakwal R, Shioda S, Numazawa S. Unraveling the Specific Ischemic Core and Penumbra Transcriptome in the Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion Mouse Model Brain Treated with the Neuropeptide PACAP38.
Microarrays (Basel). 2015;4(1):2-24.
doi: 10.3390/microarrays4010002

③ 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):17014-34.
doi: 10.3390/ijms150917014

６．研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

柴藤　淳子 (SHIBATO, Junko)
星薬科大学・先端生命科学研究所・
客員助教
研究者番号：10611121

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

(3)研究協力者

堀　元英 (HORI, Motohide)