The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PACAP-PAC1受容体シグナルの中枢神経調節機能に関する分子薬理学的研究
Author(s)	新谷, 紀人
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46534
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　新谷紀人（しんたに のりひと）

博士の専攻分野の名称　博　士（薬　学）

学　位　記　番　号　第　20545　号

学位授与年月日　平成18年3月24日

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学　位　論　文　名　**PACAP-PAC1受容体シグナルの中枢神経調節機能に関する分子薬理学的研究**

論　文　審　査　委　員　（主査）
教　授　馬場　明道

（副査）
教　授　松田　敏夫　　教　授　山口　明人　　教　授　岡部　　勝

論　文　内　容　の　要　旨

1989年に単離された神経ペプチドPACAP（pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide）は、脳をはじめ中枢・末梢神経系に幅広く分布し、神経伝達物質・モジュレーターとして、極めて多彩な生理機能に関与することが示唆されている。PACAPの作用はVIP（vasoactive intestinal polypeptide）と結合を共有する3つの受容体サブタイプへの結合を介して発揮され、このうちVPAC受容体（VPAC1、VPAC2）はPACAPとVIPの両方に同程度に高い親和性を示すのに対し、PAC1受容体（PAC1R）はPACAPにのみ高親和性を示す。一方で、PAC1受容体の発現は、VPAC受容体と比較して神経系に限局することから、中枢神経系でのPACAPの機能評価には、PACAPとPAC1Rの両側面からの研究アプローチが有効である。そこで本研究では、PACAPの生理・病態的重要性を明らかにする目的で、PACAPおよびPAC1Rに着目し、以下の3つの検討を行った。

第一に、遺伝子改変によりPAC1RのN末細胞外領域をエピトープ標識したHA-PAC1Rを作製し、抗エピトープ抗体を用いた蛋白質レベルでの検討を行った。HA-PAC1Rが受容体結合やシグナル伝達に関してPAC1と同等の機能を有すること、N糖鎖付加型受容体として、細胞形質膜のみならず小胞体などの内膜系にも豊富に存在することを見出した。またHA-PAC1Rの恒常的発現細胞株を用いた検討から、PACAPの長時間処置によりシグナル系の脱感作、および細胞表面からの受容体蛋白の消失（sequestration）が惹起されることを明らかにした。以上の結果から、特異的抗体がないために解析不可能であったPAC1R蛋白の細胞内動態が初めて明らかとなった。

第二に、PACAPの遺伝子ノックアウトマウス（PACAP−/−）を作製し、その表現型解析を通じて、本マウスにおける特に顕著な3つの表現型異常を見出した。

1）生後早期の生存率低下：PACAP−/−はメンデルの遺伝の法則に従って誕生するが、生後7日から14日で半数近くが死亡すること、死亡前日に体重減少を示すことを見出した。またこの生存率低下は、マウスの遺伝的背景をC57BL/6からICRに変更することで改善される傾向が見られたが、膵β細胞特異的PACAP過剰発現マウス（末梢血中のPACAPが増加すると考えられるマウス）との掛け合わせでは何ら変化がみられなかった。以上により、中枢神経系のPACAPの生後早期の生存維持における重要性が示唆された。

2）精神運動機能の異常：離乳後まで生存したPACAP−/−は、新規環境に慣れにくく多動を示すこと、頻繁なジャンプ行動を示すことを見出した。これらの異常はICRを遺伝的背景に有するPACAP−/−（ICR：PACAP−/−）でも顕著に認められたことから、PACAP−/−において最も際立った表現型異常であると考えられた。また好奇心や不

安を評価する試験からは、好奇心の成分が亢進している可能性が示された。一方 PACAP−/−の多動性は、抗精神病薬でドパミン D_2 受容体遮断性のハロペリドールやリスペリドンによって劇的に抑制されたが、脳内のモノアミンおよび代謝物の含量については、大脳皮質および線状体でセロトニン（5-HT）代謝物の 5-HIAA がわずかに低下しているのみであった。以上の結果は、PACAP が精神運動機能に関与するという、これまで予測されていなかった PACAP の生理機能を提示するものである。また PACAP の欠損は、特産の神経系というよりはむしろ広範な神経系に影響を与え、異常行動の発現を惹起することが示唆された。

3）雌性マウスの性的機能の異常：交配に供したマウスのうち出産に至る割合（妊孕率）が野生型では 90%近いのに対し、PACAP−/−では 30%、ICR：PACAP−/−では 50%に低下することを見出した。性周期や交配頻度の解析から、この表現型異常は交配時の行動異常や偽妊娠反応の異常に起因することが示唆された。しかし PACAP−/−の全てが不妊ではないことから、PACAP は雌性マウスの生殖機能に必須ではないものの、不妊のリスクファクターとして働くものと考えられた。

最後に、PACAP および PAC1R の遺伝子改変動物を用いて、PACAP の海馬依存性記憶における役割を解析した。まず PACAP 欠損ヘテロ接合型マウスと、PAC1R exon 2 欠損ホモ接合型マウス（PAC1R の発現が 10 分の 1 に減少したマウス）の *in vivo* 海馬 LTP の解析では、強度のテタヌス刺激では野生型と同様に 200%まで誘導されるのに対し、弱いテタヌス刺激では誘導・維持レベル共に有意に減弱することを見出した。一方 ICR：PACAP−/−の海馬 LTP 解析では、LTP の誘導は正常だが、その後の維持が 10 分以上持続せず、刺激の 2 時間後には 120%まで減弱することを見出した。また行動薬理学手法でマウスの記憶機能を多角的に解析したところ、このような LTP 障害を有する他の遺伝子改変マウスと同様に、PACAP−/−では海馬依存的長期記憶の保持過程に障害を認めた。なお扁桃体依存性の記憶は正常であった。また PACAP−/−の記憶障害は、抗精神病薬のリスペリドン、5-HT_2 受容体括抗薬のリタンセリンや、PACAP の脳室内急性投与で改善されることから、記憶異常の原因として、5-HT_2 受容体の機能異常や、即時的な PACAP 欠損が関与することを明らかにした。

本研究で申請者は、エピトープ標識法や遺伝子欠損マウスの作製などの遺伝子改変手法を利用することで、種々の生理機能における PACAP-PAC1 受容体シグナルの重要性を示唆した。また以上の知見は、いずれも PACAP-PAC1 受容体シグナルの創薬標的としての有用性を強く示唆するものであり、今後の臨床応用研究に大きく貢献するものである。

論文審査の結果の要旨

神経ペプチド PACAP（pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide）は、脳をはじめ中枢・末梢神経系に幅広く分布し、神経伝達物質・モジュレーターとして、極めて多彩な生理機能に関与することが示唆されている。

本研究では PACAP の生理・病態的重要性を明らかにする目的で、PACAP およびその特異的受容体 PAC1R に着目し、以下の 3 つの検討を行った。

第一に、遺伝子改変により PAC1R の N 末細胞外領域をエピトープ標識した HA-PAC1R を作製し、抗エピトープ抗体を用いた蛋白質レベルでの検討を行い、これまで解析不可能であった PAC1R 蛋白の細胞内動態を初めて明らかにした。

第二に、PACAP の遺伝子ノックアウトマウス（PACAP−/−）を作製し、その表現型解析を通じて、本マウスにおける特に顕著な 3 つの表現型異常 1）生後早期の生存率低下、2）精神運動機能の異常、3）雌性マウスの性的機能の異常、を見出した。

最後に PACAP および PAC1R の遺伝子改変動物を用いて、PACAP の海馬依存性記憶における役割を解析し、PACAP 欠損ヘテロ接合型マウスと、PAC1R exon 2 欠損ホモ接合型マウスの in vivo 海馬 LTP が有意に減弱すること、一方 PACAP−/−の海馬 LTP の維持が低下していること、また、PACAP−/−では海馬依存的長期記憶の保持過程に障害を認めた。更にその薬物応答性も明らかにした。

本研究は、エピトープ標識法や遺伝子欠損マウスの作製などの遺伝子改変手法を利用することで、種々の生理機能

における PACAP-PAC1 受容体シグナルの重要性を明らかにし、その創薬標的としての有用性を強く示唆するものである。

以上の知見は博士（薬学）の学位に充分に値するものと判断する。