



Title	新規生理活性ペプチドprokineticinの中樞神経系における役割に関する研究
Author(s)	小阪田, 正和
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49186
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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	小 ^お 阪 ^{さか} 田 ^だ 正 ^{まさ} 和 ^{かず}
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 1 5 2 3 号
学位授与年月日	平成 19 年 7 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	新規生理活性ペプチド prokineticin の中枢神経系における役割に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 松田 敏夫 (副査) 教授 八木 清仁 教授 馬場 明道 教授 中川 晋作

論文内容の要旨

Prokineticin-1 (PK1) および prokineticin-2 (PK2) は胃腸管収縮ペプチドとして同定された 86 および 81 アミノ酸残基からなる新規生理活性ペプチドである。PK1 は下垂体のほか、視床下部、副腎などの組織に発現し、PK2 は精巣のほか大脳、肺などに発現している。PKs の受容体として二つの G 蛋白質共役型受容体、PKR1 および PKR2 が存在する。PKR1 は脾臓に高い発現が見られ、PKR2 は大脳、小脳、精巣に高い発現が見られるが、両受容体は PK1、PK2 にして高い親和性を示し、両受容体のリガンドとの相互作用は同様であると考えられている。PKs は末梢組織では、PKR1 および PKR2 を発現する副腎皮質血管内皮細胞において、PK1、PK2 が増殖作用、遊走作用および細胞生存作用を示す。一方、中枢神経系では、PK2 が皮質神経細胞において、神経保護作用を示し、PK2 の脳室内投与により熱および機械的刺激による疼痛反応が増強すること、光同調に応じて PK2 の発現変動が見られることから、自発運動活性に影響を与えるアウトプット分子である可能性などが報告されている。また私たちは PKs の脳室内投与が、体温用量依存的に体温下降作用を示し、自発運動に影響を与えることを認めている。これらの成績は、PKs が中枢神経系において何らかの役割を演じていることを示唆しているが、その詳細は不明である。中枢神経系には神経細胞と 4 種のグリア細胞が存在するが、グリア細胞の中でアストロサイトとミクログリアは、神経細胞との積極的な相互作用を通して神経細胞の生存・維持に関わっていると考えられている。これらのグリア細胞は脳傷害時などの病態時に機能変化を示し、神経細胞の維持・修復に重要な役割を演じている。本研究では、病態時に重要な役割をしているアストロサイト、ミクログリアなどのグリア細胞に注目し、PKs の中枢神経系における役割について追究した。

PK1、PK2、PKR1 および PKR2 の脳内での発現は報告されているが、これらが脳内でどのような割合で存在し、またどの細胞種に存在しているのかは不明である。そこでマウス脳内での発現について、また神経細胞、アストロサイトおよびミクログリアといった培養細胞における発現を、定量的 RT-PCR を用い検討した。PK1 が神経細胞に、PK2 がアストロサイトに多く発現していること、これらの発現がミクログリアで少ないことを明らかにした。また、受容体に関しては、PKR1 はアストロサイト、ミクログリアに、PKR2 は神経細胞に多く発現していることを明らかにした。本成績は PKs のリガンド、受容体の発現局在がグリア細胞、神経細胞で明確に異なることを示したもので、PK1、PK2 シグナルが細胞により異なる機能を有している可能性を示すと考えられる。

PK1、PK2 はそれぞれ副腎皮質血管内皮細胞、精巣内血管内皮細胞において細胞増殖作用を示すことが報告されて

いる。しかし、グリア系細胞に対する PKs の作用は不明であることから、PKs のアストロサイトおよびミクログリアに対する作用を解析した。アストロサイトについては、PK2 が細胞増殖作用を有していること、さらにこの作用の細胞内シグナルとして細胞内カルシウムシグナル、ERK シグナルが関与することを見出した。一方ミクログリアに対しては、PK2 が ERK のリン酸化を促進し、作用としては、NO 産生、増殖以外の作用が示唆された。

PK2 の病態時での役割を *in vivo* で追究する目的で、興奮性神経毒であるカイニン酸並びにトリメチルスズ投与による海馬傷害モデルを作成した。カイニン酸 (2.5 mg/kg, i.p.) は海馬アンモン角 (CA) 領域における著明な神経細胞の脱落と、それに伴う早期のミクログリアの活性化、遅発性のアストロサイトの活性化を引き起こす。カイニン酸投与後の海馬での PK1、PK2、PKR1、PKR2 の発現変動について mRNA レベルで検討した。カイニン酸傷害モデルにおいて、PK2 は投与 6 時間後に約 6 倍の有意な一過性の mRNA の発現増加が認められたが、PK1 は有意な有意な変化は認められなかった。PKR2 は投与 6~24 時間後で約 4 倍の有意な発現増加が認められたが、PKR1 は有意な変化は認められなかった。本成績はカイニン酸誘発傷害に対して PKR1 と PKR2 が異なる変動をすることを明らかにし、PKR1、PKR2 の発現レベルが異なる機構により調節されていることが示唆された。さらに免疫組織化学的検討から、カイニン酸 (2.5 mg/kg, i.p.) 並びにトリメチルスズ (3 mg/kg, i.p.) を用いた脳傷害モデルマウスの海馬で、アメボイド型ミクログリアに PK2 が発現誘導されることを見出し、これが傷害時に特異的なものである可能性を示した。

以上、生理活性ペプチド PKs の脳での細胞種における存在を明らかにし、PK2 がアストロサイトの増殖に関わっていること、アストロサイト、ミクログリア、神経細胞の ERK シグナルを活性化すること、さらに脳傷害時に発現変動を示すことを明らかにした。これらの *in vitro*、*in vivo* の成績は、グルタミン酸異常などの脳傷害の病態への PKs の関与を示しており、種々の (アルツハイマー病、パーキンソン病やハンチントン病などの) 神経変性疾患における本ペプチドの役割を示唆する。本ペプチドのミクログリア機能に対する作用の解析からその病態的意義の解明が期待される。

論文審査の結果の要旨

2001 年に胃腸管収縮ペプチドとして発見された 2 つの生理活性ペプチド prokineticin-1 (PK1)、prokineticin-2 (PK2) は中枢神経系にも発現していることが mRNA レベルで示されているが、その役割はほとんど明らかにされていない。

本研究は、中枢神経系における PK1、PK2 (PKs) の病態的意義を追究する目的で、中枢神経系の病態に深く関わっているグリア細胞 (アストロサイト、ミクログリア) に注目し、これらの細胞での PK1、PK2、そしてそれらの受容体 PKR1、PKR2 の存在とそれらの細胞内シグナルについて、また脳傷害モデル動物での PKs の発現変動についての解析を行った。

その結果、PK1、PK2 が神経細胞とグリア細胞で異なる発現をしていること、PK2 がアストロサイトにおいては Ca^{2+} 、MAP キナーゼシグナルを介して細胞増殖作用を示すが、ミクログリアにおいては一酸化窒素産生や細胞増殖作用を示さないことを明らかにした。また、カイニン酸傷害モデルにおいて、PKR1 と PKR2 mRNA が異なる発現変動をすることを見出し、これらの発現が異なる機構により調節されていることを示した。更に、脳での PK2 発現を蛋白レベルで明らかにし、カイニン酸やトリメチルスズを用いた脳傷害モデル海馬での検討から、アメボイド型ミクログリア (活性型ミクログリア) に PK2 が傷害特異的に発現誘導されることを明らかにした。

これらの *in vitro*、*in vivo* での成績は、グルタミン酸異常などの脳傷害病態における PKs の関与を示しており、本研究成果は博士 (薬学) の学位授与に充分値するものである。