



Title	PACAP-Prostaglandin D2シグナルによる中枢機能制御に関する分子薬理学的研究
Author(s)	畠中, 道賢
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57960
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	はた 畑 中 道 賢
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学 位 記 番 号	第 23758 号
学位授与年月日	平成22年3月23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	PACAP-Prostaglandin D ₂ シグナルによる中枢機能制御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 藤尾 慈 教 授 堤 康央

論文内容の要旨

生体は、自身をめまぐるしく変化する地球環境（明暗環境）に効率よく適応させる為、外界の光情報を利用している。光情報を利用した生体の機能調節には、孔収縮反応、活動量の抑制（夜行性動物特有の性質）、交感神経系の活性化、光による概日リズム調節が含まれ、これらは、光情報を視覚情報以外の情報として利用することから非視覚光受容反応（non-visual photoreponse; NVP）と呼ばれる。これらNVPのそれぞれの生理的役割は以下のように考えられている。瞳孔収縮は網膜に入る外部環境の光量を直接調節する反応であり、夜行性動物特有の性質である活動量の抑制は光からの回避行動である。また、交感神経系の活性化はコルチコステロン分泌や血圧を調節し、概日リズム調節は生体の概日リズムを外界の明暗周期に同調させる機能である。

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)は、VIP/セクレチン/グルカゴンファミリーに属し、シヨウジョウバエからヒトに至るまで高度に保存された神経ペプチドである。PACAPおよびその受容体は特に中枢神経系に強度な発現が認められ、神経伝達物質・神経調節因子として種々の中枢機能制御等に関わるほか、神経栄養因子として各種神経細胞の障害保護や神経分化促進作用を示すことが明らかにされている。PACAPの神経伝達物質・神経調節因子としての機能は、外界光情報の脳内伝達に関して多く検討されており、特に、上述の概日リズム中枢、視交叉上核(Suprachiasmatic nucleus, SCN)の機能調節に関する役割が解析されてきた。

当研究室では、PACAP遺伝子欠損(PACAP-KO)マウスを作製・解析し、本マウスが光による概日リズム調節において位相前進特異的な障害を示すことから、PACAP-KOマウスは光同調の位相前進/後退制御の分子基盤を明らかにする上で極めて興味深い表現型を呈する動物モデルになることが示された。そこで当研究室では、Laser Capture Microdissection法とGene Chip解析を組み合わせた手法によりSCN特異的遺伝子発現プロファイリングを行い、PACAP-KOマウスの示す位相前進性光同調の特異的障害に関わる分子基盤の候補分子として、Lipocalin-type prostaglandin D₂ synthase(L-Pgds)を同定した。

L-Pgdsは脳内の主要なprostaglandin(PG) D₂の合成酵素であり、PGH₂からPGD₂への異性化反応を触媒する酵素の一つである。中枢神経系では、主に脳の膜、神経細胞、オリゴデンドロサイトで産生され、大脳皮質、海馬、視床、視床下部等の領域に発現する。さらにPGD₂は脳内で最も豊富に存在するPGであり、睡眠調節や疼痛調節を担うことが報告されている。しかし、NVPや概日リズム調節におけるL-Pgds-PGD₂の役割は報告されていない。PGD₂には2つのサブタイプの受容体が存在する。一方は、D prostanoïd receptor (DP)であり、中枢神経系において脳膜、脊髄等に発現し、睡眠調節および疼痛制御に関与することが知られている。もう一方は、ケモアトラクタント受容体と相同性の高いオーファン受容体として同定され、2002年にPGD₂が内因性リガンドであることが発見されたChemoattractant receptor homologous-molecule expressed on Th2 cells (CRTH2)である。本受容体は、免疫系の細胞に多く発現しており、アレルギー反応に促進的に働くことが示唆されているが、中枢神経系における発現分布やその機能は全く報告されていない。

そこで本研究では、まずNVPのなかでPACAPの関与がまだ不明であった光による交感神経活性化におけるPACAPの役割を明らかにする為、PACAP-KOマウスを用いてNVPの生理学的解析および組織学的解析を行った。その結果、PACAP-KOマウスにおいて暗期の光照射による腎臓交感神経活動の活性化が消失していること、SCNにおける最初期遺伝子c-fosの発現誘導が障害されていることを見出した。本結果から、PACAPが光情報伝達経路を介した交感神経活性化に促進的に関わる可能性が示された。

次に、概日リズム調節におけるL-PGDSシグナルの役割を明らかにする為、L-PGDS-KOマウスを用いた行動薬理学的解析を行った。その結果、L-PGDS-KOマウスは明暗環境への適応することができ、恒暗条件における活動リズムの周期が野生型マウスと同程度であるのに対して、恒明条件下における活動リズムの周期が野生型マウスと比較して有意に延長していること、L-PGDS-KOマウスにおいて新規明暗環境への適応反応(時差ぼけを模倣した実験系)が野生型マウスと比較して遅延していることが明らかになった。新規明暗環境への適応反応はNVPのなかで、光による概日リズム調節と活動量の抑制が協調的に機能することで表出すると考えられている。そこで、L-PGDS-KOマウスの光による概日リズム調節と活動量の抑制を調べたところ、L-PGDS-KOマウスにおいて光による概日リズムの位相前進のみが特異的に障害されていた。また、光による概日リズム調節におけるPGD₂受容体の関与を調べたところ、CRTH2が光による概日リズムの位相前進に特異的に関与することが明らかになった。これら結果から、L-PGDSが概日リズムの振動系および出力系に関与せず、光環境への前進性適応反応(入力系)に特異的かつ促進的に関わること、L-PGDS-PGD₂-CRTH2シグナルが、NVPなかで特に光による概日リズムの位相前進に深く関与することが示唆された。

最後に、CRTH2が中枢神経系で機能することを想定し、ラット副腎髓質クロム親和性細胞由来の神経系細胞株であるPC12細胞を用いてPGD₂およびその代謝物15d-PGJ₂によるNGF誘発突起伸展の増強作用および細胞内シグナル活性化におけるCRTH2の関与を検討した。その結果、15d-PGJ₂によるNGF誘発突起伸展の増強作用とmitogen-activated protein kinaseの活性化がCRTH2選択的アンタゴニスト(CAY10471)によって抑制されることを見出した。本結果から、PC12細胞において15d-PGJ₂によるNGF誘発突起伸展作用の増強作用にCRTH2-p38シグナルの活性化が関与する可能性が示された。

以上、本研究成果は、これまで見出されていたPACAPのNVPへの関与を実証したこととどまらず、特にNVPの位相前進に特異的にL-PGDS-PGD₂-CRTH2シグナル系が関与することを示したものであり、CRTH2の中枢神経系での生理的意義と作用機構の一端を初めて示したものである。

論文審査の結果の要旨

博士学位申請者 畑中道賢の学位論文の概要と評価を示す。本論文のテーマは、非視覚光受容反応における神経ペプチドPACAPの機能的役割の追及である。この課題の中で、光による交感神経活性化、光による概日リズム調節、PC12細胞系での突起進展の3つの実験系について、検討し、以下の成果を得た。まず、光による交感神経制御について、PACAPが中枢上位部位での制御系であること、次に、概日リズム調節については、マウスの行動位相における光による制御機構に関わる新規因子として、プロスタグランジンD₂ (PGD₂) -CRTH2受容体系シグナルを同定した。さらに、PC12細胞系ではCRTH2-p38MAP キナーゼ系が、NGFによる突起進展を促進することを新た

に、PC12細胞系ではCRTH2-p38MAP キナーゼ系が、NGFによる突起進展を促進することを新たに見出した。これらの知見の中で、特に、これまで明らかにしてきたPACAP欠損マウスの光による行動位相障害の関与因子としてのPGD₂合成酵素の分子機構について、PGD₂受容体のDP、CRTH2のノックアウトマウスの行動解析、組織化学的検討から、PGD₂がその2型受容体、CRTH2を介して光による位相前進に関与することを明らかにしたことは特筆すべきことである。さらに、PGD₂合成酵素のノックアウトマウスの検討により、PGD₂-CRTH2シグナルが、PACAPの下流シグナルだけでなく、より広義の光位相前進シグナルであることを明らかにすることで、その普遍性を実証したといえる。これらの知見は、PGD₂-CRTH2シグナル系の中枢での生理的役割を初めて明らかにしたものであり、極めて高く評価される。

以上の成果は、薬学博士の授与に十分に値するものであると判断する。