The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PACAP による精神神経機能調節の機序に関する研究
Author(s)	尾形, 勝弥
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60086
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

【12】

氏　　名	尾　形　勝　弥（おがた かつや）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬学）
学　位　記　番　号	第　２５９６４　号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 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 による精神神経機能調節の機序に関する研究
論文審査委員	（主査） 教　授　橋本　　均 （副査） 教　授　松田　敏夫　　教　授　上島　悦子　　教　授　藤尾　　慈

論　文　内　容　の　要　旨

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、下垂体のアデニル酸シクラーゼの活性化を指標に単離されたvasoactive intestinal polypeptide (VIP) / secretin / glucagon ファミリーに属する生理活性ペプチドであり、その生理作用は、VIP と結合を共有する3つの受容体サブタイプ（VIPよりもPACAPに対し約 1000 倍の親和性を示す PAC1 受容体と、両者に等しく親和性を持つVPAC1, VPAC2受容体）への結合を介して発揮される。本研究室では、PACAPの遺伝子欠損（KO）マウスが、多動、うつ様行動、プレパルス抑制障害などの精神行動異常を示すことを見出すほか、ヒトPACAP 遺伝子の一塩基多型（SNPs）が統合失調症や同患者の海馬記憶障害や海馬縮小と関連することを明らかにしている。ごく最近のNature誌では、PACAP が PTSD (post-traumatic stress disorder) と関連することも報告され、当研究室での結果も含め、これら精神神経機能制御におけるPACAP の重要性が世界的に注目を集めつつある。一方で、精神機能の正常な作動には、神経細胞の発達と成熟、およびその上に成り立つ神経回路構築が適切に行われることが必要であることから、近年、これらの異常が種々の精神疾患や神経変性疾患の原因となることが示唆されている。したがって、神経細胞の発達制御における PACAPの役割を研究することは、上述の精神神経機能制御におけるPACAP の重要性に関し、その作用機序を明らかにするうえで有効なアプローチになると考えられる。

しかし、海馬神経初代培養神経細胞におけるPACAP の機能解析については、グルタミン酸誘発細胞死に対する抑制作用などが示されているものの、神経細胞の形態に及ぼす PACAP の作用はほとんど不明であった。

そこで本研究では、初代培養海馬神経細胞の突起形成とその伸展に対する PACAP の作用や培養後期に認められる神経スパイン形成やその成熟に対する PACAP の作用について、特に、PACAP-KOマウス由来の分散培養系や脳切片を用いた解析を行った。さらに、PAC1 受容体が強く発現している海馬 DG 領域に着目したGeneChip解析により、PACAP-KOマウスの精神神経機能異常に関する分子病態の同定を試みた。

まず、培養7日目までに観察される初代培養海馬細胞の突起形成および突起伸展に対するPACAPの作用について、BDNF を陽性対照として検討したところ、培養 0 日目から 7 日間 10 nM PACAP を処置すると、培養 3 日目以降で総突起長、総突起数、primary neurite 数（細胞体から直接伸びる突起の数）、細胞体サイズのいずれにおいても無処置群と比較して有意に増加することが明らかとなり、またこれら多彩な形態変化促進作用は50 ng/ml BDNFとほぼ同等であることも示された。また、primary neurite 数の増加が消失する培養 3日目以降において、PACAP は突起数を増大させずに総突起長を増加させることを見出した。

次に、培養後期において認められる、神経伝達に関わる種々の受容体に富むシナプス後部構造であり、神経回路の構成や、神経可塑性を反映することが示唆されている樹状突起スパインに対する作用を検討したところ、PACAP によりシナプス後肥厚部に集積する足場タンパク質であるPSD-95 陽性スパイン数の有意な増加が認められた。さらに、PACAP-KO マウス由来の培養神経細胞や海馬切片において、スパイン数の減少やスパイン形態の変化 （未成熟スパインの増加）を見出した。

最後にPACAP-KOマウスの行動異常に関する分子病態の解明を目指し、野生型マウスおよびPACAP欠損マウスの海馬 DG 領域を LCM (Laser Captured Microdissection) 法により単離し、同サンプルから調製したRNAを用いたGeneChip解析を行った。その結果、Rab3b (RAB3B, member RAS oncogene family)、sdf2l1 (stromal cell-derived factor2-like 1)、Hspa5 (heat shock protein 5)、Xbp1 (X-box binding protein 1) が、PACAP欠損マウス由来のサンプルで有意に発現増加する一方、Arpp21 (cyclic AMP-regulated phosphoprotein 21) が同サンプルでは有意に発現減少することが明らかとなった。これら遺伝子群に対し、signal pathway 解析を行った結果、PACAP KO マウスの海馬 DG 領域において小胞体ストレス経路の亢進を示唆する遺伝子群の発現パターンが確認された。また、GeneChip解析に用いたプローブの情報を元に、各個体内での種々遺伝子発現間の相関を解析したところ、Xbp1 と Hspa5 など、小胞体ストレス関連因子及びその活性化に伴い発現する分子シャペロン関連因子において強い発現相関が見られることが明らかになった。すなわち、小胞体ストレス関連因子がそれぞれ独立に発現変動しているというよりは、PACAP-KOマウスではむしろ、これら小胞体ストレスシグナルパスウェイが全般的に活性化されている可能性が考えられた。

以上より、PACAP は 発達ステージに応じて神経細胞の突起数・突起長及びスパイン数の増加を促進する作用を持つことが明らかになり、時期や領域特異的な神経細胞の発達に PACAP シグナルが寄与している可能性が考えられた。また PACAP KO マウスは生後 8 週齢以降において顕著な統合失調症様の行動異常が見られるが、その原因が今回の検討により見出された海馬のスパイン形態異常に起因する可能性が考えられた。さらに、PACAP KO マウスの海馬 DG 領域を用いたアレイ解析により、本マウスの異常行動と関連する遺伝子として小胞体ストレス遺伝子群を同定した。今後、これら PACAP シグナル系が関わる一連の知見が、神経細胞の発達障害や回路構築異常を解決する手がかりとなり、精神疾患・神経変性疾患の克服に役立つ有用な情報となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)の遺伝子欠損マウスが、多動、うつ様行動、感覚情報処理の障害などの精神・神経機能異常を示すこと、またヒトPACAP遺伝子の一塩基多型が統合失調症や同患者の視覚性記憶スコアの低下、海馬体積の減少と関連することを示す結果が臨床遺伝学研究によって明らかにされている。また最近、米国においてPACAPがpost-traumatic stress disorderと関連することが報告されるなど、精神・神経機能調節におけるPACAPの重要性が明らかになりつつある。このような背景のもと、「PACAP による精神神経機能調節の機序に関する研究」と題する本博士論文では、初代培養海馬神経細胞の突起形成とその伸展におけるPACAP の作用をBDNF (brain-derived neurotrophic factor)との比較により検討され、ついで培養後期に認められる神経スパイン形成やその成熟におけるPACAPの作用について、とくに、PACAP欠損マウス由来の分散培養系や脳切片を用いて解析された。さらにPACAP に選択的なPAC1 受容体が強く発現している海馬 DG 領域におけるGeneChip解析により、PACAP欠損マウスの精神・神経機能異常に関する分子病態の同定が試みられた。以上の研究によって、つぎの各成果が得られている。

1. PACAP は、初代培養海馬神経細胞のサイズ増加や軸索伸展など、BDNFと同様の形態変化を起こすこと、またPAC1 受容体を介して総突起長の増加作用を示す一方、これはおもにprimary neuriteを含む突起数の増加に起因することが示された。
2. Primary neurite 数の増加が止まる培養後期において、PACAP は突起数を増大させずに総突起長を増加させるほか、スパイン数も増加させることが示された。
3. PACAP欠損マウス由来の培養神経細胞や海馬切片において、スパイン数の減少やスパイン形態の変化（未成熟スパインの増加）が見出された。
4. PACAP欠損マウスの海馬歯状回において、ER ストレス関連遺伝子の発現上昇が見出された。

これらPACAP シグナル系に関する多層的な研究成果は、神経細胞の成熟・回路構築の仕組みに関する研究の手がかりとなり、精神疾患・神経変性疾患の分子基盤の解明に寄与することが期待されるものであり、博士論文として適切な内容であると判断した。