

## 神経保護因子としての PACAP

### 1. はじめに

脳卒中や頭部・脊髄外傷などに代表される急性の中性神経系の傷害は、強度の麻痺が残りやすく患者の QOL (クオリティーオブライフ) を著しく低下させる。また、網膜も神経細胞から構成される神経組織であり、失明原因の第一位となっている緑内障は網膜の神経節細胞死により引き起こされる疾患である。これら神経組織はその脆弱性および再生能の低さから、最も治療が困難な組織であると考えられる。本稿では下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PACAP) について、これまで報告されている神経保護作用について概説する。

### 2. PACAP とは

PACAP は羊の視床下部抽出物より 1989 年に発見された神経ペプチドである<sup>1)</sup>。PACAP には 27 または 38 アミノ酸残基からなる PACAP27 と PACAP38 が存在し、ほぼ同等

の作用を示す。PACAP は血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal polypeptide; VIP) / セクレチン / グルカゴンファミリーに属しており、特に VIP は PACAP27 と約 70% の高い相同性を示す。PACAP と VIP は三つの受容体を共有しており、PACAP に対して高い親和性 (VIP の 1000 倍以上) を示す PAC1 受容体 (PAC1R) と、PACAP と VIP に同程度の親和性を示す VPAC1 受容体 (VPAC1R)、VPAC2 受容体 (VPAC2R) が存在する (図 1A)。PACAP は主に神経組織に発現しており、また受容体も神経組織を中心として幅広い分布を示す。PACAP は多様な生理活性を担っており、神経伝達物質、免疫抑制因子、血管拡張因子などとして知られているが、本稿では特に神経保護作用について説明させて頂く。

### 3. 培養細胞に対する PACAP の神経保護作用

PACAP の神経保護作用は複数の受容体が関連する特有のシステムによる。神経/グリア共培養系への LPS 毒性に対して、PACAP は  $10^{-13}$  ~  $10^{-11}$  M (pico M) と  $10^{-9}$  ~  $10^{-7}$  M (nano M) の 2 峰性の神経保護効果を示す。一方、神経細胞のみの培養細胞に対しては nano M 濃度で保護効果を示す。これは、PACAP が神経細胞に対して nano M 濃度で、グリア細胞に対して pico M 濃度で作用し、神経を保護する機構が存在することを意味する (図 1B)。一方、

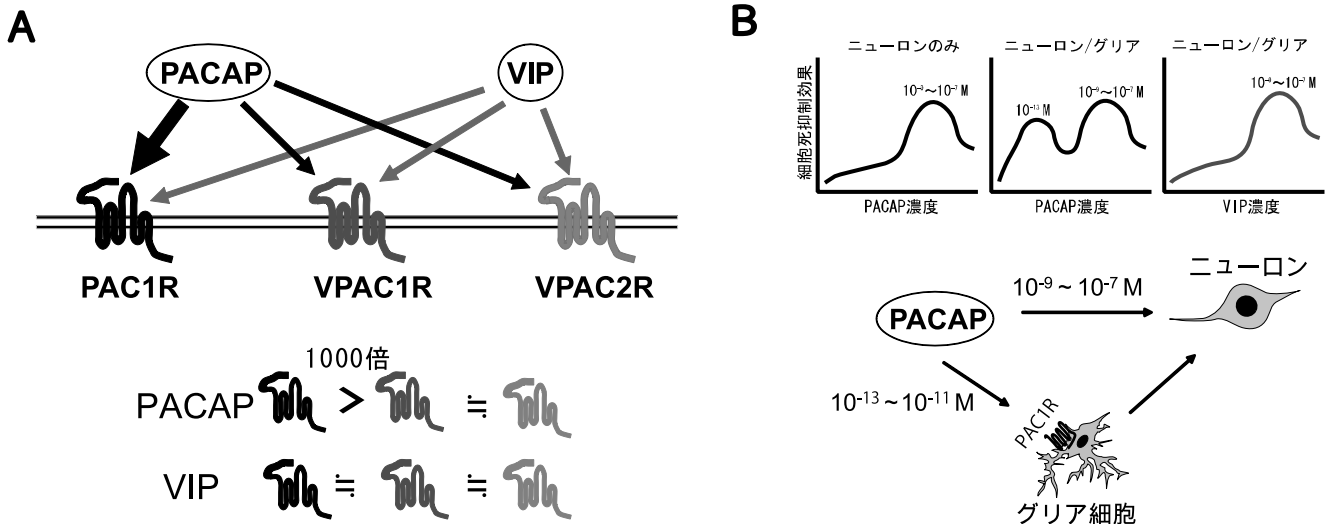


図 1 PACAP と VIP の受容体への親和性と神経保護効果の比較

(A) PACAP と VIP と 3 種の受容体に対する親和性。PACAP は PAC1R に対して他の二つの 1000 倍以上の高い親和性を示す。  
(B) PACAP および VIP による神経保護作用。PACAP はニューロンリッチの培養細胞に対しては  $10^{-9}$  ~  $10^{-7}$  M、ニューロン/グリア共培養系では  $10^{-13}$  ~  $10^{-11}$  M と  $10^{-9}$  ~  $10^{-7}$  M の濃度において 2 峰性の神経保護作用を示すことから、PACAP は pico M ( $10^{-13}$  ~  $10^{-11}$  M) においてはグリア細胞を介して、nano M ( $10^{-9}$  ~  $10^{-7}$  M) では神経細胞に直接作用して神経保護効果を示すと考えられている。

VIPに関しては神経/グリア共培養系に対して nano M 濃度で神経保護効果を発揮する。これは PACAP によるグリア細胞を介する神経保護効果には PAC1R が関与していることを示唆している。また PACAP が pico M という極めて低濃度にて神経保護作用を有する点は特筆すべき点である。

低濃度の PACAP が神経保護作用を示す機構として、我々は機能依存性神経保護タンパク質 (activity-dependent neuroprotective protein; ADNP) に着目している。ADNP は VIP 添加によりアストロサイトから放出されることが明らかになった新規生理活性タンパク質である<sup>2)</sup>。ADNP は PACAP と同様に神経細胞保護作用を有することが知られており、正常なマウス脳組織では一部の神経細胞と多くのアストロサイトに ADNP が発現し、それらの細胞では PAC1R を併せて発現している<sup>3)</sup>。マウス脳由来の神経細胞・グリア細胞共培養系への PACAP 添加により、 $10^{-13}$  M と  $10^{-9}$  M の濃度で ADNP mRNA 発現増加の 2 段階のピークが観察された。PACAP/VIP 受容体の拮抗剤を用いた実験により、PACAP  $10^{-13}$  M 添加時には PAC1R 拮抗剤存在下のみ、PACAP  $10^{-9}$  M 添加時には PAC1R および VPAC1R 拮抗剤存在下において PACAP 誘導性の ADNP mRNA 発現量の増加が抑制された。さらに、MAPK, PKA, IP3/PLC の阻害剤を用いて検討したところ、PACAP  $10^{-13}$  M 添加時には IP3/PLC 阻害剤存在下のみ、PACAP  $10^{-9}$  M 添加時には IP3/PLC 阻害剤に加えて PKA 阻害剤の存在下においても PACAP 誘導性の ADNP mRNA 発現増加が抑制された。以上の結果より PACAP は  $10^{-13}$  M において PAC1R-IP3/PLC 系を、 $10^{-9}$  M においてはそれ以外に

VPAC1R-PKA 系を介して ADNP の遺伝子発現を促進させることが明らかになった<sup>4)</sup> (図 2)。ADNP 以外にも、PACAP はアストロサイトを刺激してサイトカインや神経保護因子の産生を促進することが知られており、またアストロサイトの増殖を誘導するというグリア細胞の調節因子としての側面も併せ持つ<sup>5,6)</sup>。PACAP の神経保護作用を明らかにしていく上で、グリア細胞を介した経路については今後さらなる検証が必要であろう。

#### 4. 神経傷害モデル動物に対する PACAP の神経保護作用

個体レベルにおける PACAP の神経保護作用については、脳虚血モデルでの解析が進んでいる。脳虚血モデルには、脳全体の血流を低下させる全脳虚血モデル、前脳部の血流を低下させる前脳虚血モデル、局所の血流のみを遮断する局所脳虚血モデルが存在する<sup>7)</sup>。全脳虚血は心停止により、前脳虚血は両総頸動脈閉塞・再灌流により作成され、神経組織でも特に虚血傷害に脆弱である海馬 CA1 領域の錐体細胞が再灌流数日後に細胞死を起こす。ラットの前脳虚血モデルにおいて、PACAP の脳室内投与 (0.1~10 pmol/h) および静脈内投与 (160 pmol/h) が海馬の遅発性神経細胞死を抑制することが初めて報告された<sup>8)</sup>。次いで、ラットの全脳虚血モデルにおいても脳室内投与 (1 pmol/h) による神経保護効果が報告された<sup>9)</sup>。PACAP には血液中から脳内へ輸送するトランスポーターが存在しており、モルヒネの 6 倍以上の脳内移行率を示すことから<sup>10)</sup>、PACAP を中枢性に作用させる経路として脳室内投与と経静脈投与が利用可能である。

一方の局所脳虚血としては中大脳動脈閉塞が代表的モデ

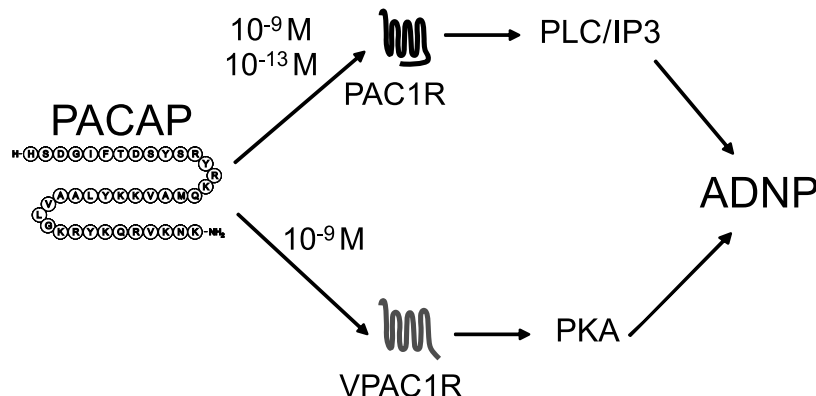


図 2 PACAP による ADNP mRNA の発現調節機構

PACAP は  $10^{-13}$  M においては PAC1R-PLC/IP3 経路を介して、 $10^{-9}$  M においては同経路に加えて VPAC1R/PKA 経路を介して ADNP mRNA の発現を増加させる。

ルであり、閉塞した血管の支配領域の中心部では急性的な壊死（ネクロシス）様の、辺縁部ではアポトーシス様とネクロシス様の両方の神経変性様式が混在して認められる。局所脳虚血モデルはヒトでの脳梗塞疾患とメカニズムが類似していることから、より臨床的な病態を反映しているモデルである。PACAPはラットの中大脳動脈閉塞モデルにおいても静脈内投与（160 pmol/h）および脳室内投与により神経保護作用を示す<sup>11</sup>。一方、VIPにはPACAPほど強い神経保護作用は認められないことから<sup>12</sup>、PACAPによる神経保護作用にはPAC1Rが関与していることが示唆されている。我々は主にマウスを実験動物としてPACAPの神経保護効果を検討している。まずマウスの中大脳動脈閉塞モデルを確立し、PACAPの神経保護効果を検討したところ、1 pmolのPACAP脳室内投与が有意に脳梗塞体積および神経症状を抑制させた。さらに、PACAPの静脈内投与（160 pmol/h）によっても神経保護作用が認められた<sup>13</sup>。これらの結果は、PACAPが急性および遅発性の虚血性神経細胞死に対して、マウスおよびラットのどちらにおいても一貫して保護作用を持つことを示している。

PACAPは網膜に対しても保護作用を示す。網膜には視細胞と神経細胞、およびそれらの細胞を支持するグリア細胞であるミュラー細胞が存在しており、一部の神経細胞およびミュラー細胞にはPAC1Rが発現している。ラットを用いた動物実験により、カイニン酸硝子体投与、視神経切除により誘導される神経節細胞死に対して、1  $\mu$ lのPACAP ( $10^{-11}$ ~ $10^{-10}$  M)の硝子体内投与が神経保護作用を示すことが報告されている。また、ラットの高眼圧モデルにおいてはPACAP  $10^{-15}$  Mと $10^{-11}$  Mの2峰性の神経保護作用を示す。この違いはおそらく神経傷害によるグリア細胞の活性化レベルの違いにより生じていると考えられる。

##### 5. 遺伝子欠損マウスを用いたPACAPの機能解析

PACAPは幅広い神経組織に発現しており、その内因性PACAPの神経保護作用に関しては、これまでにPACAP遺伝子欠損(KO)マウスを用いることで評価されている。我々はPACAPの神経保護機構を解析する為にPACAPKOマウスを用いて脳虚血モデルを作成・評価した。PACAPKOマウスでは野生型に比べて中大脳動脈閉塞後の死亡率と脳梗塞体積および浮腫率が増加しており、神経症状も悪化していた<sup>14</sup>。また、ウエスタンブロッティング法により、PACAPKOマウスでは細胞死シグナルである細胞質中のシトクロムcの増加、およびシトクロムc放出抑制因

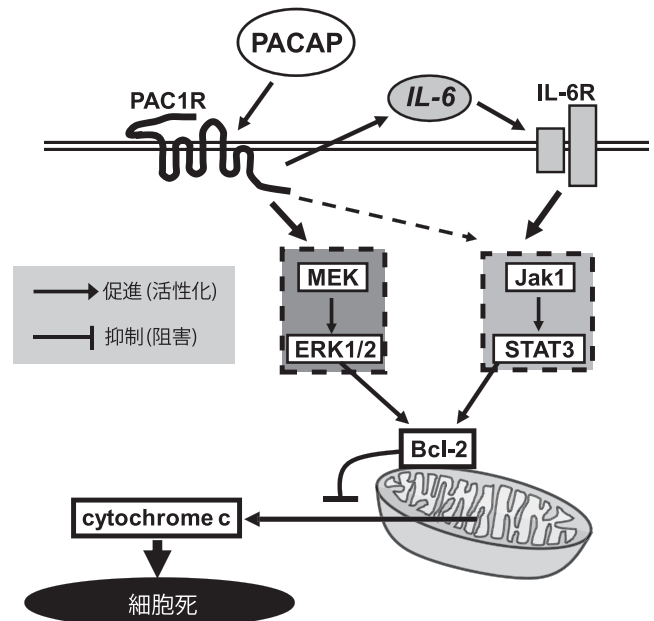


図3 PACAPによるIL-6を介した神経保護機構

PACAPはPAC1R/ERK経路を介する経路とIL-6/STAT3経路を介してBcl-2の発現を上昇させることにより、ミトコンドリアから細胞質へのシトクロムc放出を抑制することにより神経細胞を保護している。

子であるBcl-2の減少が認められた。これらのPACAPKOマウスでの現象はPACAPを投与することにより改善された。以上の結果は、PACAPがミトコンドリアから細胞質へのシトクロムc放出を抑制することにより神経細胞を保護していることを示唆している(図3)<sup>13</sup>。

PACAPはアストロサイトやミュラー細胞からインターロイキン6(IL-6)分泌を促進することが明らかになっている。IL-6は炎症性サイトカインとして知られているが、中枢神経系においては神経保護作用を示す。野生型マウスへのPACAP投与は脳脊髄液中のIL-6レベルおよび脳内IL-6 mRNA発現量を有意に増加させ、これはPAC1RアンタゴニストをPACAPと同時投与することにより抑制された。PACAPの神経細胞保護作用におけるIL-6の役割を明らかにするため、脳虚血後のIL-6 KOマウスおよび野生型マウスにPACAPを投与した。その結果、野生型マウスではPACAP投与群の脳梗塞体積がvehicle投与群と比較して有意に減少したが、IL-6 KOマウスではPACAP投与群とvehicle投与群間の脳梗塞体積に差は認められなかった。さらにPACAPとIL-6に関連したシグナリング経路を明らかにするため、中大脳動脈閉塞後のPACAPKOマウスおよびIL-6 KOマウスの脳内におけるリン酸化(p)

STAT3, pERK, および pAKT レベルをウエスタンブロッティング法により解析した. PACAPKO マウスでは pSTAT-3 および pERK レベルが野生型よりも減少しており, IL-6 KO マウスでは pSTAT3 レベルのみが減少した. これらの結果より, PACAP は IL-6 を介して脳虚血後の神経細胞死を抑制していると考えられる<sup>13)</sup>(図 3).

ヘテロ型 PACAPKO (PACAP<sup>+/-</sup>) マウスを用いて NMDA 硝子体内投与による網膜傷害に対する保護作用を評価した. PACAP<sup>+/-</sup> マウスでは NMDA 投与 1, 3, 7 日後における神経節細胞数が野生型と比較して有意に減少した. 野生型マウスでは細胞死マーカーである TUNEL 陽性細胞数のピークは NMDA 投与後 3 日目であったが, PACAP<sup>+/-</sup> マウスでは 1 日目にピークがシフトした. PACAP<sup>+/-</sup> マウスへの PACAP (10<sup>-10</sup> M) 投与により, NMDA による神経節細胞数の減少および TUNEL 陽性細胞数の増加を抑制した<sup>15)</sup>. さらに我々は PACAP<sup>+/-</sup> マウスを用いて脊髄損傷モデルを作成・評価したところ, PACAP<sup>+/-</sup> マウスでは野生型マウスと比較して脊髄損傷後の運動機能の回復が遅く, 傷害領域の増加および細胞死マーカーの増加が認められた(データ未発表). 以上の結果より, 内因性 PACAP は発現する神経組織において保護作用を示すと考えられる.

## 6. おわりに

高齢化社会となった現在, 脳卒中や緑内障の患者数は増加傾向をたどると推測されており, 神経保護効果も持った薬剤の開発が望まれている. 低濃度で強い神経保護作用を有し, 静脈投与による投薬が可能な PACAP はその候補の一つとなり得るものであり, 新しい神経保護薬として将来役立つことが期待される. また, 内因性 PACAP の発現を増加させる薬剤を開発できれば幅広い神経疾患に対して効果のある薬剤の開発にも繋がると考えられる. その為には PACAP の神経保護機構についての更なる研究が必要であらう.

## 謝辞

本稿に関わる研究に御協力頂きました昭和大学医学部第一解剖学教室の皆様をはじめ多くの共同研究者にこの場を借りて厚く御礼申し上げます.

- 1) Arimura, A. (1992) *Regul. Pept.*, 37, 287-303.
- 2) Gozes, I., Bassan, M., Zamostiano, R., Pinhasov, A., Davidson, A., Giladi, E., Perl, O., Glazner, G.W., & Brenneman, D.E. (1999) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 897, 125-135.
- 3) Nakamachi, T., Ohtaki, H., Yofu, S., Dohi, K., Watanabe, J.,

- Hayashi, D., Matsuno, R., Nonaka, N., Itabashi, K., & Shioda, S. (2008) *Regul. Pept.*, 145, 88-95.
- 4) Nakamachi, T., Li, M., Shioda, S., & Arimura, A. (2006) *Peptides*, 27, 1859-1864.
- 5) Nakamachi, T., Nakamura, K., Oshida, K., Kagami, N., Mori, H., Watanabe, J., Arata, S., Yofu, S., Endo, K., Wada, Y., Hori, M., Tsuchikawa, D., Kato, M., & Shioda, S. (2011) *J. Mol. Neurosci.*, 43, 16-21.
- 6) Nakamachi, T., Farkas, J., Watanabe, J., Ohtaki, H., Dohi, K., Arata, S., & Shioda, S. (2011) *Curr. Pharm. Des.*, 17, 973-984.
- 7) Ohtaki, H., Dohi, K., Nakamachi, T., Yofu, S., Endo, S., & Shioda, S. (2005) *Acta Histochem. Cytochem.*, 38, 99-106.
- 8) Uchida, D., Arimura, A., Somogyvari-Vigh, A., Shioda, S., & Banks, W.A. (1996) *Brain Res.*, 736, 280-286.
- 9) Shioda, S., Ozawa, H., Dohi, K., Mizushima, H., Matsumoto, K., Nakajo, S., Takaki, A., Zhou, C.J., Nakai, Y., & Arimura, A. (1998) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 865, 111-117.
- 10) Banks, W.A., Kastin, A.J., Komaki, G., & Arimura, A. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 267, 690-696.
- 11) Reglodi, D., Somogyvari-Vigh, A., Vigh, S., Kozicz, T., & Arimura, A. (2000) *Stroke*, 31, 1411-1417.
- 12) Tamas, A., Reglodi, D., Szanto, Z., Borsiczky, B., Nemeth, J., & Lengvari, I. (2002) *Neuro Endocrinol. Lett.*, 23, 249-254.
- 13) 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. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 7488-7493.
- 14) Nakamachi, T., Ohtaki, H., Yofu, S., Dohi, K., Watanabe, J., Mori, H., Sato, A., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., & Shioda, S. (2010) *Acta Neurochir. Suppl.*, 106, 43-46.
- 15) Endo, K., Nakamachi, T., Seki, T., Kagami, N., Wada, Y., Nakamura, K., Kishimoto, K., Hori, M., Tsuchikawa, D., Shintani, N., Hashimoto, H., Baba, A., Koide, R., & Shioda, S. (2011) *J. Mol. Neurosci.*, 43, 22-29.

中町 智哉, 塩田 清二  
(昭和大学・遺伝子組換え実験室,  
医学部第一解剖学教室)

PACAP as a neuroprotectant  
Tomoya Nakamachi and Seiji Shioda (Center for Biotechnology, Department of Anatomy, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan)