

PACAP 遺伝子欠損マウスの脳機能変化

新谷 紀人

Mice Lacking PACAP: A Minireview Focussing on the Brain Function

Norihito SHINTANI

Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University, Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received June 17, 2004)

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a member of the vasoactive intestinal peptide (VIP)/secretin/ glucagon superfamily and functions as a hormone, neurohormone, and neurotransmitter in the central nervous system as well as in several peripheral tissues. Recently, several groups including ours have independently produced lines of mice lacking PACAP (PACAP^{-/-}). These mutant mice have not only led to a better understanding of the physiologic roles of endogenous PACAP, but have also revealed some unexpected roles of PACAP. In this paper, phenotypic changes in several brain functions in PACAP^{-/-} mice, including light-induced phase-resetting of the circadian activity rhythm, hippocampal long-term potentiation, and psychomotor behaviors, are reviewed based on the results obtained in our laboratory.

Key words—PACAP; neuropeptide; knockout mice; psychomotor behavior; circadian rhythm; long-term potentiation

1. はじめに

PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) は 1989 年にヒツジ視床下部より単離された神経ペプチドであり,¹⁾ 以下のような特徴を有する。1) 1970 年代に同定された VIP (vasoactive intestinal polypeptide) と結合を共有する 3 種類の高親和性受容体 (PAC₁, VPAC₁, VPAC₂) を介してその薬理作用が発揮される。2) 視床下部だけでなく、大脳皮質や海馬などの脳各部位、呼吸器系、消化管、副腎、生殖器など幅広い組織に発現が観察される (Table 1)。3) 膵臓からのインスリン分泌促進や脳海馬における神経可塑性誘導などのホルモン・神経伝達物質様の作用に加え、神経突起進展作用や細胞死抑制作用など神経栄養因子様の作用も有する (Fig. 1)。²⁾ 4) pM レベルの極めて低濃度から脳グリア細胞等の種々の細胞の増殖促進作用を示す一方、nM—μM レベルでは逆に増殖抑制作用を示す。³⁾ 5) PACAP の血中濃度の測定は血中結合蛋白

質の存在により困難であり,⁴⁾ 生体内で機能する PACAP の濃度は不明である。すなわち PACAP には別のシグナル系と複雑な相互作用を示し、発現分布や薬理作用が極めて多様であり、そして生体内における実際の作用濃度や生理機能の予測が困難であるという特徴がある。

筆者らはこのような背景のもと PACAP の遺伝子欠損マウス (PACAP-KO) を作製し,⁵⁾ これまでに示唆されてきた PACAP の作用を *in vivo* で実証するとともに、全く予測されていなかった新規の生理機能についても明らかにした。本稿では、筆者らが PACAP-KO の解析により明らかとしてきた知見のうち、特に脳機能に焦点を当て、体内時計の光同調、⁶⁾ 海馬神経可塑性、⁷⁾ 精神運動機能⁵⁾ の調節における PACAP の役割について概説し、その新規創薬標的分子としての可能性について述べる。

2. 体内時計：位相前進性光同調への関与

哺乳類には、睡眠—覚醒や体温、内分泌などの様々な生命活動を約 24 時間周期のリズムで刻む“リズム発振機構”と、その自律的リズムの位相を前後させて外部環境へと適応させる“同調機構”が備わっている。⁸⁾ 最も強力な同調因子、光による“光同

大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

e-mail: shintani@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成 15 年度近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Table 1. Localization and Relative Abundance of PACAP and Its Receptors (Ref. 2)

	PACAP		PAC ₁ R	VPAC ₁ R	VPAC ₂ R
	mRNA	Fibers	mRNA	mRNA	mRNA
Brain	###	##	##	+	+
Adrenal gland	+	+	+	+	+
Pancreas		+	+	+	+
Liver			+	+	+
Testis	+			+	+
Ovary	+	+	+		+
Kidney				+	+
Lung		+	+	+	+
Intestine	+	+		+	
Stomach			+		+
Spleen					+

PAC₁R, PAC₁ receptor; VPAC₁R, VPAC₁ receptor; VPAC₂R, VPAC₂ receptor.

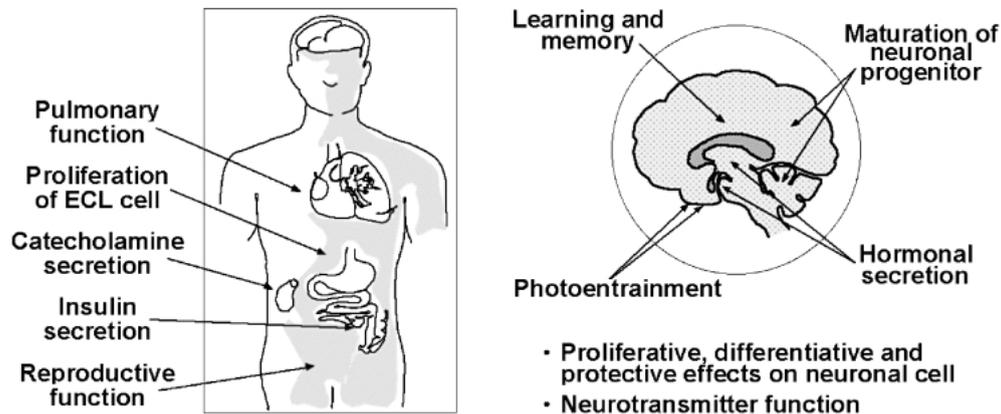


Fig. 1. Suggested Physiological Role of PACAP

調”では、グルタミン酸 (Glu) が主要な神経伝達物質として働くと考えられている。⁹⁾ 1997年、PACAPがGluと協調して光同調を厳密に調節する可能性が示され、PACAPの作用が大きく注目された。¹⁰⁾

筆者らは大阪大学蛋白質研究所、永井博士との共同研究により、PACAP-KOの体内時計機能を解析し、生体内PACAPの本機能における役割を検討した。⁶⁾ まずマウスを恒暗条件下で飼育した際の行動を検討したところ、PACAP-KOは野生型マウスと同様にそれぞれ約12時間づつの活動期と休止期とを繰り返し、またその期間の長さにも変化はなかった。このことからPACAP-KOにおいて体内時計のリズム発振機構はほぼ正常であることが示された。次に恒暗条件下で光パルスを与え、行動リズムの位相変化を検討したところ、PACAP-KOは暗期

の遅い段階での光同調反応 (位相前進を起こす) が大きく障害されているのに対し、暗期の早い段階での光同調反応 (位相後退を起こす) は若干の減少傾向が見られるのみであった。

このような非対称的な位相変化を示す遺伝子改変マウスの報告は、これまでにPACAP⁶⁾及びPACAP受容体¹¹⁾とプロテインキナーゼG¹²⁾のKOマウスのみであることから、本マウスは位相の前進/後退の変換機構を解明するための良い研究ツールとなる可能性がある。また、一般に夜型人間と言われる人々は、リズム位相を前進させることに障害がある可能性が示されていることから、PACAPによるリズム位相調節 (特に位相前進)の研究は、現代病とも言われているリズム障害の治療薬開発に貢献できる可能性がある。

3. 海馬神経可塑性：遺伝子量依存的な変化

海馬の神経結合領域では、高頻度の刺激の後にシグナル伝達が長期に渡って促進すること (long-term potentiation: LTP) が知られており,¹³⁾ これは個体の記憶・学習の神経基盤であることが示唆されている。一方で外来からの PACAP 投与は、アセチルコリンやグルタミン酸と協調して LTP を増強することが示されている。¹⁴⁾

筆者らは神戸大学、松山博士との共同研究により、PACAP-KO の *in vivo* 海馬 LTP を解析し、生体内 PACAP の本機能における役割を検討した。⁷⁾ その結果、単回のテタヌス刺激による LTP 形成が野生型マウスでは 200%であったのに対し、PACAP 欠損ヘテロ接合型マウスでは 150%程度の誘導しか起きなかった。また筆者らが以前作製した、PACAP 受容体のノックダウンマウスにおいても、180%程度の誘導しか起きなかった。⁷⁾ したがって *in vivo* LTP の誘導には一部 PACAP-PAC₁ 受容体シグナルが関与していることが明らかとなり、その関与は PACAP の遺伝子発現量依存的なものであることが明らかとなった。

近年、PACAP が記憶障害を示すショウジョウバエの変異株 *amnesiac* の原因遺伝子 *amn* の哺乳類ホモログであることが示されており、¹⁵⁾ PACAP-KO においても一度形成された記憶が長期間保持されないといった記憶障害が見られている (投稿中)。これらの結果は、PACAP が生物種を越えて記憶・学習機能に関与することを示すものであり、非常に興味深い。またごく最近では、*amn* が担う記憶機能が加齢に伴い障害されることが報告された。¹⁶⁾ PACAP-KO が *amnesiac* と同様の加齢性記憶障害を示すのかどうかは今後の検討が必要であるが、本マウスが痴呆などを改善する脳機能改善薬のスクリーニングに利用できる可能性は大いにある。

4. 精神運動行動：好奇心とジャンプ行動

PACAP-KO は飼育ケージの蓋をとると、ケージ外へ頻繁に逃げ出そうとする。¹⁷⁾ 筆者はこの行動がマウスの探索行動を反映しているのではないかと考え、マウスを広い場所に放った際の行動を解析した (open field test)。その結果、野生型マウスは時間の経過に従って新規環境に馴れて次第に動かなくなるのに対し、PACAP-KO は field 内を盛んに探索し続け、総運動活性、運動時間、垂直方向の運動活

性 (立ち上がり運動やジャンプ行動) が野生型及び PACAP 欠損ヘテロ接合型マウスに比べて大きく亢進するという著しい多動性が認められた。⁵⁾ さらに PACAP-KO では、通常げっ歯類が避けるとされる open field の中央領域や、高架式十字迷路の open arm の領域 (壁で保護されていない領域) に滞在する割合が大きくなっていった。⁵⁾ そしてその他の一連の行動薬理的解析により、PACAP-KO では“通常不安レベルが低下している”、あるいは“好奇心の成分が増加している”可能性が示された。また PACAP-KO では、open field test の際に壁の外側に向かって頻繁にジャンプをする個体が多く見られ、多いものでは 1 時間に 1500 回以上ものジャンプ行動を繰り返した。^{5,18)} 一方でこれらのジャンプ行動は飼育ケージの中では認められず、新規環境への暴露によって誘引される異常行動であることが示された。PACAP-KO の遺伝的バックグラウンドを C57BL/6 から ICR に変えた場合、本マウスで見られる生後の致死性や雌マウスの生殖機能異常は大きく改善されたが、¹⁹⁾ 多動性やジャンプ行動は依然として顕著に認められた (Fig. 2)。これらの結果により、生体内の PACAP が探索行動などの精神行動機能の調節に関与するという、これまでに予測されなかった生理機能が明らかとなった。

新規環境における多動は、脳内ドパミン神経系の過興奮、あるいは脳内グルタミン酸神経系の機能不全に起因することが知られている。そしてこのような機能変化を誘引した薬物投与動物 (アンフェタミン投与やフェンシクリジン投与)、遺伝子改変動物 (ドパミントランスポーターノックアウトマウス²⁰⁾ やグルタミン酸受容体ノックダウンマウス²¹⁾) は、統合失調症や注意欠陥多動症 (ADHD) の動物モデルとして解析が進められている。PACAP-KO の示す多動性は抗精神病薬であるハロペリドールによって抑制されることから、⁵⁾ 本マウスもまた何らかのヒト精神疾患の病態の一部を反映する動物モデルとして、創薬に貢献できる可能性がある。

5. おわりに

2001 年から 2002 年にかけて、筆者らを含めた複数のグループからほぼ同時に PACAP-KO の作成が報告され、^{5,22,23)} 中枢及び末梢組織において PACAP シグナル系の多彩な生理機能が明らかにされた。²⁴⁾ 筆者らはこれまでに、体内時計、⁶⁾ 記憶、⁷⁾

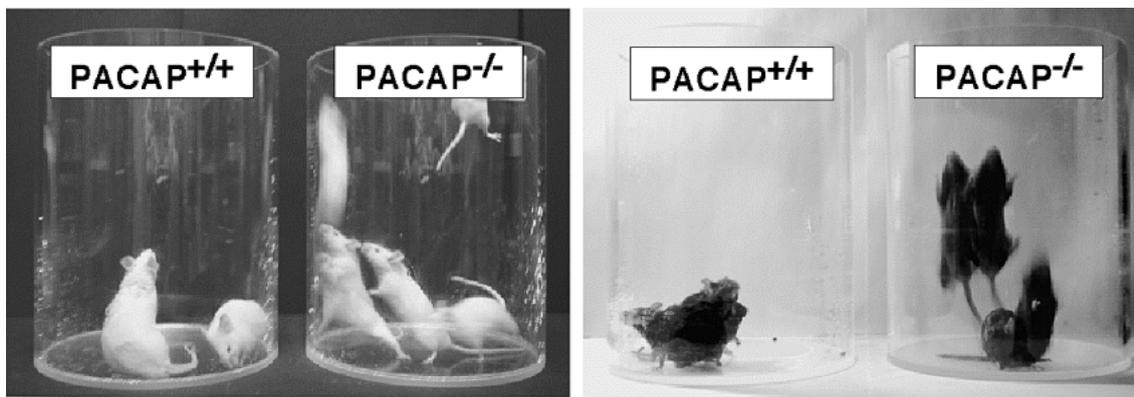


Fig. 2. Mice Lacking PACAP Show Abnormal Jumping Behavior Independent of Genetic Background

Mice lacking PACAP (PACAP^{-/-}) of ICR (left panel) as well as C57BL/6 (right panel) genetic background exhibit hyperactive and explosive jumping behaviors in a novel environment relative to wild-type mice (PACAP^{+/+}). These phenomena were originally reported in Ref. 5. Reprinted with permission from Ref. 28.

精神行動⁵⁾のほかにも、性的機能,²⁵⁾ インスリン分泌,¹⁹⁾ 血小板凝集²⁶⁾などの機能においても PACAP シグナル系が新たな創薬標的として有用となる可能性を示している。しかし薬物標的の有効性の検証には、ヘテロ接合体 KO マウスやアンタゴニストを用いて、表現型発現に対する PACAP の量及び時空間的な寄与様式を解析することや、外来からの PACAP や各受容体選択的アゴニスト投与により、PACAP-KO や各種病態モデル動物の表現型異常が改善できるかどうかを解析する必要がある。

筆者らは現在、PACAP-KO の遺伝的バックグラウンドを ICR にすることで増産体制を確立し、¹⁹⁾ エタノール感受性の低下、²⁷⁾ セロトニン 1A 受容体アゴニストの感受性低下や、統合失調症モデルで認められるような感覚情報処理能力の障害や意欲の低下、注意欠陥多動症モデルで認められるような精神刺激薬による逆説的鎮静作用など、多様な表現型異常を本マウスに見出し (投稿中)、その特性を詳細に検討している。今後、これら障害の認められた高次脳機能単位間の相互作用/ネットワーク構築を明らかにすることで、統合失調症などの複合的脳機能疾患の全体的な理解や、その根治療法の開発にも貢献できると考えている。

謝辞 本総説で述べた研究は、大阪大学大学院薬学研究所の馬場明道教授及び橋本 均助教授の御指導の基に、同研究科神経薬理学分野で行われたものであり、研究室の皆様の御努力によりなされたものです。また学内外の共同研究者の方々にも、多大

な御協力をいただきました。ここに心から感謝を申し上げます。また本研究の一部は、文部科学省科学研究費助成金によって行われたものであり、併せて感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Miyata A., Arimura A., Dahl R. R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M. D., Coy D. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 567-574 (1989).
- 2) Vaudry D., Gonzalez B. J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H., *Pharmacol. Rev.*, **52**, 269-324 (2000).
- 3) Hashimoto H., Kunugi A., Arakawa N., Shintani N., Fujita T., Kasai A., Kawaguchi C., Morita Y., Hirose M., Sakai Y., Baba A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 337-343 (2003).
- 4) Tams J. W., Johnsen A. H., Fahrenkrug J., *Biochem. J.*, **341**, 271-276 (1999).
- 5) Hashimoto H., Shintani N., Tanaka K., Mori W., Hirose M., Matsuda T., Sakaue M., Miyazaki J., Niwa H., Tashiro F., Yamamoto K., Koga K., Tomimoto S., Kunugi A., Suetake S., Baba A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 13355-13360 (2001).
- 6) Kawaguchi C., Tanaka K., Isojima Y., Shintani N., Hashimoto H., Baba A., Nagai K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 169-175 (2003).
- 7) Matsuyama S., Matsumoto A., Hashimoto H., Shintani N., Baba A., *Neuroreport*, **14**,

- 2095–2098 (2003).
- 8) Akiyama M., Moriya T., Shibata S., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **112**, 243–250 (1998).
 - 9) Hannibal J., *Cell Tissue Res.*, **309**, 73–88 (2002).
 - 10) Chen D., Buchanan G. F., Ding J. M., Hannibal J., Gillette M. U., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 13468–13473 (1999).
 - 11) Hannibal J., Jamen F., Nielsen H. S., Journot L., Brabet P., Fahrenkrug J., *J. Neurosci.*, **21**, 4883–4890 (2001).
 - 12) Oster H., Werner C., Magnone M. C., Mayser H., Feil R., Seeliger M. W., Hofmann F., Albrecht U., *Curr. Biol.*, **13**, 725–733 (2003).
 - 13) Tully T., *Nat. Neurosci.*, **1**, 543–545 (1998).
 - 14) Roberto M., Scuri R., Brunelli M., *Learn. Mem.*, **8**, 265–271 (2001).
 - 15) Feany M. B., Quinn W. G., *Science*, **268**, 869–873 (1995).
 - 16) Tamura T., Chiang A. S., Ito N., Liu H. P., Horiuchi J., Tully T., Saitoe M., *Neuron*, **40**, 1003–1011 (2003).
 - 17) Shintani N., Hashimoto H., Baba A., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **123**, 274–280 (2004).
 - 18) Hashimoto H., Shintani N., Baba A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 427–432 (2002).
 - 19) Shintani N., Tomimoto S., Hashimoto H., Kawaguchi C., Baba A., *Life Sci.*, **74**, 337–343 (2003).
 - 20) Gainetdinov R. R., Wetsel W. C., Jones S. R., Levin E. D., Jaber M., Caron M. G., *Science*, **283**, 397–401 (1999).
 - 21) Mohn A. R., Gainetdinov R. R., Caron M. G., Koller B. H., *Cell*, **98**, 427–436 (1999).
 - 22) Gray S. L., Cummings K. J., Jirik F. R., Sherwood N. M., *Mol. Endocrinol.*, **15**, 1739–1747 (2001).
 - 23) Hamelink C., Tjurmina O., Damadzic R., Young W. S., Weihe E., Lee H. W., Eiden L. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 461–466 (2002).
 - 24) Hashimoto H., Shintani N., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **122**, 427–435 (2003).
 - 25) Shintani N., Mori W., Hashimoto H., Imai M., Tanaka K., Tomimoto S., Hirose M., Kawaguchi C., Baba A., *Regul. Pept.*, **109**, 45–48 (2002).
 - 26) Freson K., Hashimoto H., Thys C., Wittevrongel C., Danloy S., Morita Y., Shintani N., Tomiyama Y., Vermeylen J., Hoylaerts M. F., Baba A., Van Geet C., *J. Clin. Invest.*, **113**, 905–912 (2004).
 - 27) Tanaka K., Hashimoto H., Shintani N., Yamamoto A., Baba A., *Regul. Pept.* (in press).
 - 28) Baba A., Shintani N., Matsuda T., Jisedai Genome Souyaku ed. by Sugiyama Y., Nakayama-Shoten Co., Ltd., Japan, 2003, pp. 45–63.