

| | | | |
|---|---|-----|------|
| 京都大学 | 博士 (医学) | 氏 名 | 堀 元英 |
| 論文題目 | An omics based assessment of PACAP38 in permanent middle cerebral artery occlusion model mice (マウス永久中大脳動脈閉塞モデルによる脳虚血に影響を与えるPACAP38のオミックス解析) | | |
| (論文内容の要旨) 【背景】 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)は27または38アミノ酸残基からなる神経ペプチドである。PACAPは神経保護・再生作用を持つということが知られているが、どのような機構で作用するかは未だ不明な点が多い。そこで本研究ではマウス脳梗塞モデルにPACAPを脳室内投与し、オミックス解析を用いてPACAPの神経保護・再生機構を検討した。 【方法】 C57BL/6マウス雄性個体を全身吸入麻酔下にて右内頸動脈から塞栓糸を挿入し、先端を中大脳動脈分岐部に固定して永久中大脳動脈閉塞モデルを作成した。モデル作成の成功はTTC染色にて確認した。脳虚血直後にPACAPあるいは生理食塩水を正常側大脳半球の脳室内に投与した。投与6時間後と24時間後に虚血側半球を取り出し、抽出したRNAを用いて、DNAマイクロアレイと二次元電気泳動を用いたトランスクリプトーム解析を行った。 【結果・考察】 DNAマイクロアレイでは、虚血生食群において免疫系と炎症系に関連する遺伝子の発現量が著明に増加した。なかでも、Mmp8は虚血脳組織で神経保護作用を担うことが知られているが、Mmp8は虚血後6時間および24時間生食群で著明に発現量が増加した。そのため脳虚血では、Mmp8によるアポトーシス抑制が働いていることが示唆された。しかし虚血PACAP群では、Mmp8の発現量は健常時とほとんど変化がないため、PACAPの神経保護作用にMmp8の関与は低いと考えられた。また、PACAPの神経保護作用は、脳虚血により神経細胞とアストロサイトから分泌されるIL-6依存性経路を介することが分かっているが、虚血6時間PACAP群ではIL-6の発現が、健常時の4.3倍に増加した。また、抗炎症作用を持つIL-22が虚血6時間PACAP群で強く発現していたが、IL-22の産生を制御している分子の一つにCRTAM(MHC class I 制御T細胞関連分子)がある。虚血6時間PACAP群ではCRTAMが健常時の4.2倍に増加した。このため虚血脳組織では、PACAPがCRTAMを介して脳内に侵入したT細胞を活性化させ、炎症抑制と神経保護に寄与したものと考えられた。また、二次元電気泳動において虚血6時間PACAP群では分子量約60kDa、等電点PH5.5のスポットの増強が観察された。このタンパク質はMALDI-TOF-MSによりCRMP2(collapsing response mediator protein2)と同定された。CRMP2は神経細胞の分化と軸索伸長に必要なタンパク質であるので、免疫染色によりCRMP2の組織発現を検討した。健常領域においてCRMP2は、神経細胞の細胞質に局在するが、虚血6時間PACAP群では可逆的虚血領域の神経細胞で著明に増強したが、虚血中心部では逆に減弱していた。よってPACAPはCRMP2の発現を可逆的虚血領域で増強させ、神経保護効果を示すと考えられた。 【結語】 PACAPの持つ神経保護作用はCRTAMの作用により神経組織へ浸潤したT細胞を活性化させ、急性期の炎症反応を制御しているものと考えられた。また、PACAPはCRMP2を介して虚血脳組織での軸索再生を促進している可能性が示唆された。 | | | |

(論文審査の結果の要旨)

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)は神経細胞において様々な生理学的機能を持つということが知られているが、神経保護作用などの機構については未だ不明な点が多い。本研究ではマウス脳梗塞モデルにPACAPを脳室内投与し、PACAPの神経細胞に与える影響についてオミックス解析にて検討した。C57BL/6マウス雄性個体を用い、総頸動脈から7-0ナイロン糸を挿入することによって永久中大脳動脈閉塞モデルを作成した。脳虚血直後にPACAPを正常側大脳半球の脳室内に投与し、6時間後と24時間後に両側半球を取り出した。同様の方法を生理食塩水投与群でもオミックス解析にて結果を比較した。その結果トランスクリプトーム解析では、虚血後6時間PACAP投与群で*Il-6*の発現増強を確認し、Gamma aminobutyric acid receptor gene (*Gabra6*)、MHC class I restricted T cell associated molecule (*Crtam*)などの発現増強も観察された。また二次元電気泳動において虚血後6時間PACAP群では特異的なスポットの増強を観察し、MALDI-TOF-MSによりCollapsin response mediator protein 2 (CRMP2)が同定された。そこで免疫染色によりCRMP2の脳内局在を調べたところ、虚血後6時間PACAP群では、可逆的虚血領域で発現の増強を認めたので、PACAPがCRMP2の軸索伸長効果を誘導する可能性が示唆された。しかし虚血後24時間PACAP群では対照群との有意な差は見られず、PACAPの作用は虚血後早期に働くことが考えられた。

以上の研究は脳梗塞の病態解明に貢献し、治療の研究の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成24年12月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降