

脳の神経細胞死防御と神経再生について

塩田清二¹、中町 智哉¹、大滝 博和¹、野中 直子²、William A. Banks³、Darwin Prockop⁴

¹ 昭和大学・医学部・第一解剖、² 歯学部・口腔解剖、³ セントルイス大学・医学部・老人医学部門・内科学、⁴ チューレン大学・医学部・遺伝子治療センター

虚血性の脳組織破壊により、脳機能の回復はきわめて困難になる。脳の神経細胞は生体内で高度に分化した細胞であり、虚血に対して非常に脆弱である。脳は容易にエネルギー不全に陥る器官であり、不可逆性障害を受けた神経細胞はネクロシス（壊死）をおこし、一方、軽度の虚血負荷はアポトーシス（遅発性神経細胞死）をおこすと考えられている。ネクロシスとアポトーシスの概念は、もともと形態学的観察に基づいている（1）。ネクロシスの場合は、細胞膜と細胞内小器官の障害、エネルギー産生の障害、細胞内浸透圧の破綻、細胞融解という過程をたどる。その結果、生体内に有害な物質が遊離して炎症が惹起される。一方、アポトーシスの場合は、核全体の縮小と凝縮が顕著にみられ、細胞の縮小と空胞化、細胞表面の微絨毛の消失などにより細胞の断片化（アポトーシス小体）が生じる。アポトーシス小体は、周囲の小膠細胞やマクロファージによって貪食される。

Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) は1989年有村らによって発見された38または27アミノ酸残基からなる神経ペプチドである（2、3、4）。PACAP前駆体の遺伝子配列は、哺乳類から魚類にいたる脊椎動物および下等な原口類でも高度に保存されている。系統進化の過程においてもPACAPの生理機能の重要性は大変高いと考えられている。これまでにPACAPの神経細胞保護作用に関する報告は多数報告されている（3、5）が、内因性PACAPの機能についてはよく知られていない。そこで我々は、中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデル実験を行い、内因性PACAPの神経保護作用についての検討を行った（6）。PACAP遺伝子欠損（KO）マウスでは野生型に比べて中大脳動脈閉塞後の死亡率、脳梗塞体積、脳浮腫率が増加し、神経症状も悪化した。また、ウエスタンブロットティング法により、PACAP KOマウスでは細胞死シグナルである細胞質中のcytochrome-cの増加、およびcytochrome-c放出抑制因子であるBcl-2の減少が認められた。これらの現象は、PACAP38の脳室内投与により改善された。以上の結果から、PACAPがBcl-2/cytochrome-c経路を介して神経細胞を保護していると考えられる。次に我々は、PACAP27の脳から血管への能動的輸送を担うpeptide transport system-6（PTS-6）に対するオリゴヌクレオチドアンチセンスを設計し、投与実験を行った（7）。アンチセンスの静脈内投与は脳内へのPACAP27取り込みを4倍に増加させ、中大脳動脈閉塞直後における静脈内投与により脳梗塞体積を有意に減少させた。内因性PACAPは神経保護因子として機能することが強く示唆された（7）。

超微量（pM, nMオーダー）のPACAPを脳室内および静脈内投与すると、遅発性神経細胞死は著明に抑制されることが明らかになった。さらに、再灌流1日後からPACAPを脳室内および静脈内投与しても神経細胞死を有意に抑制することが明らかになった。また、PACAPによる虚血性神経細胞死抑制作用として、PACAPが星状膠細胞を刺激してIL-6の産生・分泌を促進し、遅発性神経細胞死を抑制していることが、IL-6 KOマウスを用いた実験で明らかになった。PACAPは、神経細胞に直接あるいは星状膠細胞を介して間接的に作用し、虚血性神経細胞死を防御することが明らかになった（6）。

脳虚血の診断に関しては画像解析法が急速に進歩し、虚血を解除して血流を再開させる手段に関しても、低体温療法やサイトカイン分泌抑制法などの有効な方法が開発されつつある。しかし、脳虚血による脳組織の破壊の予防あるいはその修復という観点からみればまだ十分な状態とはいえず、多くの解決すべき問題点を抱

えている。超微量の PACAP の静脈投与により、虚血による海馬の神経細胞死は顕著に抑制され、しかも虚血-再灌流後 1 日目から投与を開始しても有効であることが明らかになった。これらの結果は、PACAP の臨床応用に大きな希望をもたせる知見といえる。

ところで、神経幹細胞は自己増殖能を持ち、神経・グリア細胞へと分化する多分化能を有する細胞である。この細胞は成体内でも存在していることから、再生医学・医療の分野で脚光を浴びている。しかし、その自己増殖や分化を誘導する内在性因子や分子機構に関しては不明な点が多い。我々は、胎生 14.5 日のマウス終脳由来の神経幹細胞を bFGF 存在下で単層培養することにより増殖させ、PACAP 添加による細胞分化誘導作用をしらべた (8, 9)。PACAP を神経幹細胞に作用させると、Nestin (神経幹細胞マーカー) 陽性細胞数が減少し、GFAP (アストロサイトマーカー) 陽性細胞が顕著に増加した。しかし MAP-2 (神経細胞マーカー) および Gal-C (オリゴデンドロサイトマーカー) 陽性細胞数にはほとんど変化がみられなかった。PACAP による神経幹細胞のアストロサイトへの分化誘導作用は、PACAP 特異的な受容体 (PAC1-R) を介する。PAC1R は 7 回膜貫通型の G 蛋白共役型受容体であり、cAMP/PKA 経路を活性化させる Gs 系と、PLC/IP3/PKC 経路を活性化する Gq 系の 2 種類が知られている (3, 4)。PAC1R のシグナル伝達系路をしらべたところ、cAMP アナログである 8Br-cAMP や db-cAMP 添加では分化誘導作用がみられず、cAMP 依存性 PKA 阻害剤である Rp-cAMP 処理は PACAP の作用へ影響を与えなかった。一方、PLC/IP3 阻害剤である U73122、Ca²⁺ の細胞内キレーターである BAPTA-AM、および PKC 特異的阻害剤である chelerythrine は PACAP の作用を抑制し、リン脂質依存性 PKC 活性化剤である PMA 添加によりアストロサイトへの分化が促進された (9)。以上の実験観察結果から、PACAP は Gq 系路を介して神経幹細胞をアストロサイトに分化誘導させることが明らかとなり、PACAP およびその誘導体を用いた研究は、神経再生と神経細胞死防御への新たな道を開くと考えられる。

我々は、PACAP が培養神経幹細胞をアストロサイトへと分化誘導することを明らかにしたが、生体内で PACAP が神経幹細胞のアストロサイトへの分化に対してどのような作用を持つかを次にしらべた。マウスの個体発生過程における脳内の PAC1-R の分布・局在を免疫組織化学的に観察した。胎生 14 日マウス脳において PAC1-R の免疫陽性反応は神経幹細胞のマーカーである nestin、ラジアルグリアのマーカーである vimentin の免疫陽性反応と重なった。GFAP 陽性細胞は胎生 16 日から側脳室周囲に出現し、胎生期から生後にかけて側脳室周囲と海馬周辺に強い免疫陽性反応が観察された。PAC1-R が神経幹細胞およびラジアルグリアに発現し、その領域から GFAP 陽性のアストロサイトが出現することから、PACAP が神経幹細胞に作用してラジアルグリアやアストロサイトへと分化誘導させる可能性が考えられる。そこで胎生 13.5 日のマウス胎仔の脳室に高濃度 (100 pmol) の PACAP を注入し、1 日後にその終脳を摘出し細胞を培養皿に播種した後、免疫染色による細胞同定を行った。その結果、PACAP 投与群では GLAST (ラジアルグリアのマーカー) 陽性細胞の比率が増加した。以上の実験結果から、PACAP は *in vivo* においても神経幹細胞からラジアルグリアを介してアストロサイトへの分化誘導に関与している可能性が考えられる。

骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) は移植後の MSCs のサイトカインなどの産生および内在性の神経・グリア細胞に対するそれらの促進作用により神経損傷後の再生のツールとして注目されている。しかし、それらの作用による神経細胞死保護と再生作用は十分に区別されていない。本研究では、ヒト MSCs (hMSCs) の神経細胞保護作用とその機構をしらべた (10)。hMSCs (2x10⁵ 個) は前脳虚血 1 日後のマウス海馬歯状回に投与した。hMSCs は投与後一週間で 1% 以下に低下したが、hMSCs を投与した動物は投与 3 日後の神経麻痺および海馬 CA1 領域の神経細胞死が有意に抑制された。マイクロアレイによる解析結果から、hMSCs は脳虚血により変化する遺伝子を調節している可能性が考えられる。とくに、hMSCs 移植後に低下する遺

伝子の 10% は炎症や免疫応答に関与する遺伝子であることが明らかになった。生化学的解析により MSCs はマクログリア (MG) を活性化することが明らかとなった。しかし、その MG は神経保護的な IGF-1 の産生を増加しており、MHC class II の発現をしており、抗原提示細胞へと変化していた。さらに、そのような細胞は抗炎症に関与する Yml を産生しており hMSCs がマクログリアの活性化様式の調節により神経細胞死を抑制する機構の存在することがはじめて明らかになった (10)。最近の研究により PACAP およびその受容体が hMSCs に存在することが分かり、PACAP は骨髄幹細胞の細胞増殖や分化誘導にも関与している可能性もある。

以上のことから、虚血性神経細胞死防御に PACAP は大変重要な機能をもっていることが明らかとなり、さらに神経幹細胞に作用してグリア細胞の分化誘導を行っていることも分かってきた。さらに骨髄幹細胞を有することにより神経再生の起きることも明らかとなり、近い将来脳や脊髄の再生治療への道も開けると考えられる。

(参考文献)

- 1) Kudo Y, Ohtaki H, Dohi K, Yin L, Nakamachi T, Endo S, Yofu S, Miyaoka H, Shioda S. 2006 Neuronal damage in rat brain and spinal cord after cardiac arrest with massive hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 34: 2820-2826
- 2) Arimura A, Shioda S. 1995 Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Endocrinol* 16: 53-88.
- 3) Shioda S and Waschek JA. VIP & PACAP Receptors. In: Structure and Function of GPCRs in the Nervous System. *Oxford University Press* (Oxford, UK) 2002. Chapter 26 p. 530-50
- 4) Shioda S, Zhou CJ, Ohtaki H, Yada T. PACAP Receptor Signaling In: Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide; Kluwer Academic Publications (Massachusetts, USA) 2002 Chapter 5 p. 95-124
- 5) Shioda S, Ozawa H, Dohi K, Mizushima H, Matsumoto K, Nakajo S, Takaki A, Zhou CJ, Nakai Y, Arimura A. 1998 PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway. *Ann NY Acad Sci* 65: 111-117.
- 6) Ohtaki H, Nakamachi T, Aizawa Y, Dohi K, Hodoyama K, Yofu S, Takaki A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Arimura A, Shioda S. 2006 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases neuronal cell death after focal ischemia associated with interleukin-6 (IL-6) . *Proc Natl Acad Sci* 103: 7486-7493
- 7) Dogrukol-Ak D, Kumar VB, Ryerse JS, Verma S, Nonaka N, Niehoff MI, Edwards JC, Nakamachi T, Ohtaki H, Shioda S, Banks WA. 2009 Delivery of the neuroprotectant Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide to brain: identification and inhibition of brain-to blood efflux transporter. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 411-422 Cover
- 8) Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S. 2007 Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides* 28:1713-1719
- 9) Watanabe J, Ohba M, Ohno F, Kikuyama S, Nakamura M, Nakaya K, Arimura A, Shioda S, Nakajo S. 2006 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced differentiation of embryonic neural stem cells into astrocytes is mediated via the beta isoform of protein kinase C. *J Neurosci Res*. 84:1645-1655.
- 10) Ohtaki H, Ylostalo J, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop D. 2008 Human stem/progenitor cells from bone marrow (hMSCs) decrease neuronal death in global ischemia by modulation of the immune responses. *Proc Natl Acad Sci* 105: 14638-14643