

学位論文（博士）

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによる
外分泌促進および神経突起伸長作用の
分子機構制御の機能形態学的解析

Analysis of molecular mechanism for exocrine secretion and neurite outgrowth by
Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide

2023年3月

星薬科大学大学院 薬学研究科

薬学専攻 治療薬学領域

運動科学

D902 山下 道生

目次

論文目録	1
略語リスト	4
序論	6
試薬および方法	9
第一章	19
第二章	31
総括	50
結論	52
謝辞	53
参考文献	54

論文目録

本論文は、学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- 1) Yamashita, M., Takenoya, F., Hirabayashi, T., Shibato, J., Rakwal, R., Takasaki, I., Harvey, B. J., Chiba, Y., Shioda, S. Effect of PACAP on sweat secretion by immortalized human sweat gland cells. *Peptides*. 146:170647 (2021).

(第一章に使用)

- 2) Shibato, J., Takenoya, F., Hirabayashi, T., Kimura, A., Yamashita, M., Takasaki, I., Rakwal, R., Shioda, S. Molecular mechanism for PACAP 38-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Neural Plasticity*. 2021:2522454 (2021).

(第二章に使用)

参考論文

- 1) Chiba, Y., Ueda, C., Kohno, N., Yamashita, M., Miyakawa, Y., Ando, Y., Suto, W., Hirabayashi T., Takenoya F., Takasaki I., Kamei J., Sakai H., Shioda S. Attenuation of relaxing response induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in bronchial smooth muscle of experimental asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 319(5): L786(2020).
- 2) Hirabayashi, T., Shibato, J., Kimura, A., Yamashita, M., Takenoya, F., Shioda, S. Potential therapeutic role of Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide for dry eye disease. *Int J Mol Sci.* 23(2):664(2022).
- 3) Hirabayashi, T., Yamashita, M., Wada, N., Takenoya, F., Ikeda, H., Kamei, J., Ryushi, T., Yamamoto, N., Shioda, S. Analgesic effect of mineral cream containing natural spa minerals for use on the skin. *Biomed Res.* 39(4):215(2018).
- 4) Matsuyama, K., Fujikawa, K., Matsuki-Fukushima, M., Shibato, J., Kimura, A., Yamashita, M., Takenoya, F., Rakwal, R., Shioda, S., Nonaka, N. Ontogenetic development of the water channel protein AQP5 in mouse salivary gland tissue. Submitted.

- 5) 竹ノ谷文子, 柴藤淳子, 福本勘太, 木村愛, 山下道生, 平林敬浩, 千葉義彦, 塩田清二. さくら花びらの主成分であるベンズアルデヒドの生理作用—さくら花びらの主成分の機能解析—. 日本アロマセラピー学会誌. 19(1): 021(2020).
- 6) 平林敬浩, 柴藤淳子, 木村愛, 山下道生, 竹ノ谷文子, 塩田清二. レモングラス精油の抗菌・抗真菌・抗ウイルス作用—レモングラス精油の抗菌作用—. 日本アロマセラピー学会誌. 20(1): 013(2021).
- 7) 竹ノ谷文子, 平林敬浩, 山下道生, 和田匡史, 山本憲志, 塩田清二. スポーツアロマセラピーの現状と今後の課題—スポーツアロマの発展を目指して—. 日本アロマセラピー学会誌. 20(1): 024(2021).
- 8) 竹ノ谷文子, 山下道生, 柴藤淳子, 木村愛, 千葉義彦, 平林敬浩, 塩田清二. ペパーミントおよびジンジャー精油暴露におけるラット視床下部摂食調節ニューロンの組織学的観察. 日本アロマセラピー学会誌. in press
- 9) 平林敬浩, 山下道生, 木村愛, 柴藤淳子, 山田啓司, 竹ノ谷文子, 塩田清二. 植物由来芳香成分が脳神経系に与える作用の評価法. 日本アロマセラピー学会誌. in press

略語リスト

本論文では、以下の略語を用いた。

AC	Adenylate cyclase
ACh	Acetylcholine
ANP	Atrial natriuretic peptides
AQP5	Aquaporin-5
BSA	Bovine serum albumin
CaCC	Calcium-dependent chloride channel
CDK5	Cyclin-dependent kinase 5
CRAC	Calcium release-activated calcium channel
CRMP2	Collapsin response mediator protein 2
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal growth factor
FBS	Fetal bovine serum
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
NA	Noradrenaline
NANC	Non-adrenergic non-cholinergic
NGF	Nerve growth factor
PACAP	Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PBS	Phosphate buffered saline
PMCAO	Permanent middle cerebral artery occlusion

PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
ROCK	Rho-associated protein kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SGZ	Subgranular zone
SOCE	Store-operated Ca ²⁺ entry
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloroacetic acid
VIP	Vasoactive intestinal polypeptide

序論

Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) は、1989 年 Miyata, Arimura らによって、ヒツジ脳の視床下部から下垂体前葉細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化する作用を指標に単離・同定された生理活性ペプチドである(1, 2)。PACAP は 27 または 38 アミノ酸残基からなるポリペプチドであり PACAP27 と PACAP38 が存在し、ほぼ同等の生理作用を示す。また、PACAP は Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)/Secretin/Glucagon ファミリーに属しており、VIP と PACAP27 は約 70% の高い相同性を示す。PACAP と VIP は 3 種類の GPCR 受容体である PAC₁ 受容体(-R)、VPAC₁-R、VPAC₂-R を共有しているが、PACAP は特に PAC₁-R との親和性が他の 2 つ比較して 1000 倍以上高いとされている。また、PACAP 及び PACAP 受容体の組織分布の解析や、*in vitro*, *in vivo* での生理・薬理学的研究から、PACAP の様々な生理的役割が明らかとなっており、PACAP はホルモン作用に加え、神経伝達物質としても働いていると考えられている。PACAP の機能として膵臓ランゲルハンス島 B 細胞での glucose 依存的な insulin 分泌促進作用、痛覚調節作用、免疫抑制作用、虚血性神経細胞死に対する保護作用、神経再生作用など、多くの生理作用があることが報告されている(3-8)。また、近年の研究では PACAP が涙腺や汗腺、唾液腺などの組織に作用して外分泌腺の分泌を促進する作用が報告されている。Matoba らのグループは PACAP 受容体の一つである PAC₁-R が耳下腺と顎下腺の 2 つの大唾液腺の導管部や腺房細胞(ピラー細胞)に多く存在することを発見し、PACAP をマウス鼻腔内に投与することで、唾液分泌を有意に増加させることを報告している(9)。さらにこの PACAP による唾液分泌促進効果は、抗コリン作用をもつ atropine の添加によっては阻害されなかったことから、PACAP はコリン作動系以外の新たな唾液分泌機構を経て唾液分泌を促進していることが明らかにされた(9)。また近年、Nakamachi らのグループは、

PACAP 遺伝子欠損マウスが角膜乾燥症(ドライアイ)様の角膜損傷を起こすことを発見した。さらに、PACAP の新たな機能として涙液分泌促進作用が明らかとなり、その作用機序として PACAP は、涙腺の PAC₁-R に作用し、cAMP/PKA 経路の活性化を介して Aquaporin-5 (AQP5) をリン酸化し、AQP5 の細胞質から細胞膜への移行を促進させることで涙液を分泌させることが明らかとなった。これらの報告により PACAP はドライアイの治療薬開発の一助となることが期待された(10)。一方、マウスの汗腺に関する報告では、Sasaki らが免疫組織学的解析より、ヒトとマウスの両者の汗腺組織付近の神経節に PACAP が存在することおよび汗腺分泌細胞の腺房に PAC₁-R が発現することを明らかにした(11)。また、同グループはマウスを用いた実験にて、PAC₁-R の特異的な阻害薬が PACAP の汗分泌促進効果を抑制することを報告した(11)。

一方、PACAP には外分泌作用のほかにも、中枢および末梢神経系における神経細胞の分化・生存維持や神経内分泌系の活性化、神経のシナプス可塑性の調節、神経前駆細胞の分化誘導、さらには神経再生など多くの作用が報告されている。Matsumoto らの研究グループは、脳虚血後に亢進する成体マウス海馬歯状回顆粒細胞下層 (Subgranular zone: SGZ) における神経新生に、内在性の PACAP が関与することを PACAP 遺伝子欠損マウスを用いた実験から明らかにしている(12)。また、PACAP の脳室内投与により、外因性 PACAP が成体マウスの神経幹細胞に作用し、神経細胞への分化を促進することで神経新生に寄与することが報告された。また、Tsuchida らは、脊髄損傷モデルマウスを用いた実験で PACAP を脊髄の損傷部位に投与することで、脊髄損傷によって失われた行動量を増加させること、さらに脊髄において軸索伸長が起こることから、PACAP には脊髄損傷治癒効果があることを発見した。また、PACAP の遺伝子欠損マウスを用いた脊髄損傷モデルの実験では、PACAP による脊髄治癒効果が減弱したことから、内因性の PACAP も脊髄損傷の治癒に関与していることが示唆された(13)。一方、

Ravni らの研究グループは、*in vitro* の神経系類縁細胞であるラット副腎褐色細胞腫 (PC12 cell) においても、PACAP が Trk 受容体リガンドファミリーである Nerve growth factor (NGF) と同様にニューロン様への分化および生存に機能することを報告した(14)。これらの研究結果により、PACAP による神経再生・新生作用は、*in vivo* 実験系における中枢・末梢神経の細胞保護や再生作用だけでなく、*in vitro* の神経系細胞の PC12 細胞においても見出され、PACAP が神経再生・新生機能を持つことが明らかとなった。

このように、PACAP には生体において外分泌促進作用および神経再生・新生作用などの様々な機能が報告されている。しかしながら、PACAP による汗分泌促進作用や神経再生・新生作用のメカニズムの詳細はほとんど解明されていない。そこで、本研究では PACAP の生理的機能の解明に迫ることを目的に、不死化ヒト汗腺細胞および PC12 細胞を用いて PACAP による汗分泌と神経突起伸長作用の詳細な細胞内シグナル伝達機構の解析を行った。

試薬および方法

本論文では以下の試薬および実験方法を用いて研究を遂行した。

- ・ 不死化ヒト汗腺細胞培養 (NCL-SG3 cell)

The Royal College of Surgeons in Ireland の Dr. Brian Harvey から供与して頂いた不死化ヒト汗腺細胞 (NCL-SG3 cell) を用いた(15)。培地は 5% Fetal bovine serum (FBS) (FUJIFILM Wako, Japan)、抗生物質 (0.4 units/mL Penicillin と 0.4 µg/mL Streptomycin) (FUJIFILM Wako)、0.002% Epidermal growth factor (EGF) (FUJIFILM Wako)、1% ITS 液体培養サプリメント (Sigma-Aldrich, USA)、0.001% Hydrocortisone (FUJIFILM Wako) を Williams Medium E (Sigma-Aldrich) を用いて調整し、37 °Cで 5% CO₂ インキュベーターに入れ培養した。

- ・ 汗分泌関連遺伝子の発現

培養した NCL-SG3 細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて QIAGEN 社のプロトコールに従って RNA を精製した。精製した RNA から Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, USA) を使用し、Agilent 社のプロトコールに従って cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて Emerald AMP Master MIX (TaKaRa, Japan) のプロトコールに従い RT-PCR を行った。PCR は 95 °Cで 5 分間の初期変性で行い、最終サイクル延長は 72 °Cで 10 分間行った。使用したプライマーとサイクリング条件を以下に示した (Table 1.)。PCR に用いたプライマーの配列は Table 1.の通りであり、電気泳動には 1.6% agarose gel を使用した。電気泳動後に ethidium bromide (EtBr) を使用し染色し ChemiDoc XRS+イメージングシステム (BIO-RAD, USA) で撮影した。

- ・ 総可溶性タンパク質の抽出

培養した NCL-SG3 細胞の培地を除き、細胞を溶解するための 1 ml の LB-TT 抽出溶液 [7 M (w/v) urea, 42 g; 2 M (w/v) thiourea, 15.2 g; 4% (w/v) CHAPS, 4.0 g; 18 mM (w/v) Tris-HCl (pH 8.0), 1.8 mL; 14 mM (w/v) Trizma base, 169.5 mg; 0.2% (v/v) Triton X -100; 0.2 mL 50 mM (w/v) DTT, 771.5 mg; 1% (v/v) pH 3-10 ampholyte, cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Switzerland) の総量 100 ml] を用いてタンパク質を回収した。回収したタンパク質を ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Millipore, USA) を使用して精製した。精製後に LB-TT 抽出液を用いて再溶解し、タンパク質の濃度を、Pierce™ 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて Bovine serum albumin (BSA) を標準として、分光光度計 (DeNovix DS-11) (DeNovix, USA) にて測定した。

- ・ AQP5 のイムノブロッティング

回収したタンパク質に 2× Sample buffer (12.5 mM Tris-HCl buffer, 4% SDS, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol を精製水で調製した) を加え、95 °C で 5 分間処理した。処理した試料を e・パジェル HR 10~20% (ATTO, Japan) と EzRUN MOPS (ATTO) を用いて電気泳動した。泳動したタンパク質を MIXED MW プロトコールに従い、PVDF メンブレン (Trans-Blot Turbo Midi PVDF, 0.2 μm, BIO-RAD) に Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO-RAD) 25 V, 2.5 A, 7 分を使用して転写した。メンブレンへのタンパク質の転写に続いて、25 ml のブロッキング溶液中で 1 時間、室温でゆっくりと振盪しながらインキュベートした。ブロッキング溶液は、5.0 g skim milk (BD Life Science, USA) を 100 ml の 0.2%

Tween20 を含む TBS (TBS-T) に溶解して調製した。そのあと、TBS-T で洗浄し、10 ml の一次抗体溶液 [3 μ L Rabbit anti-AQP5 antibody (Abcam, UK)] を室温で 60 分反応させた。その後 10 ml TBS-T で洗浄し、10 ml の二次抗体溶液 [1 μ L ECL Anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody (Cytiva, UK)] にて室温 60 分間、反応させた。再び TBS-T で 5 回洗浄し、画像/バンドの展開のために、Luminol/Enhancer および Peroxide Reagent を 1:1 の比率で混合し (Clarity Western ECL Substrate, BIO-RAD)、メンブレン上に添加後、室温で 2 分間インキュベートした。キムワイプペーパータオルで膜の一端に触れて過剰な溶液を排出し、シグナル (交差反応タンパク質バンド) を ChemiDoc XRS+イメージングシステム (BIO-RAD) で撮影した。

- ・ 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

96well プレートに培養した NCL-SG3 細胞にカルシウムインジケータである Kit-II-Fluo-4 (Dojindo, Japan) を Dojindo のプロトコールに従いの 37 °C で 1 時間インキュベートし、細胞内に Fluo-4 を取り込ませた。これを蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE, Japan) にセットし、種々の濃度の PACAP38 (Phoenix Pharmahandel, Germany) を用いて 470 nm で励起させ 3 分間観察した。観察したものを BZ-X analyzer (KEYENCE) を用いて蛍光強度の変化を測定し、5 個の細胞の蛍光強度の平均を用いて各濃度の細胞内 Ca^{2+} 濃度とした。

- ・ 阻害薬を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の測定

96well プレートに培養した NCL-SG3 細胞に Kit-II-Fluo-4 (Dojindo) を 37 °C で 1 時間インキュベートし、細胞内に Fluo-4 を取り込ませた。これを蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE) にセットし、 10^{-9} M PACAP38 と 10^{-6} M PACAP6-38 (PAC₁-R, VPAC₁-R antagonist) (PEPTIDE

INSTITUTE, Japan), VIP6-28 (VPAC₁-R, VPAC₂-R antagonist) (Merck, USA), PA-8 (PAC₁-R selective antagonist) (富山大学高崎先生より供与) を同時に添加した際の蛍光強度にて細胞内 Ca²⁺濃度の変化を経時的に 3 分間観察した(16-18)。観察したものを BZ-X analyzer (KEYENCE) を用いて蛍光強度の変化を測定し、10 個の細胞の蛍光強度の平均を用いて各濃度の細胞内 Ca²⁺濃度とした。

- ・ AQP5 の細胞内局在の免疫細胞学的染色

12well ディッシュにカバーガラス (Matsunami Glass, Japan) を敷き、インキュベーター内で一晚 NCL-SG3 細胞を培養した。培養後に PACAP38 を 10⁻⁹ M になるように添加し、添加前、添加後 15 分、30 分および 60 分インキュベートした細胞の培地を除去した後に PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde (PFA) (Merck) を用いて固定した。固定後のサンプルを PBS で洗浄した後に 1% BSA (Sigma-Aldrich), 0.1% TritonX-100 を含む PBS 溶液でブロッキングし、rabbit anti-AQP5 antibody (1:200, Merck Millipore, USA) を 4 °C で一晚反応させた。その後 PBS で洗浄し、2 次抗体 Alexa Flour 594 Donkey anti-rabbit IgG (1:1,000, Invitrogen, USA) にて室温 60 分間反応させた。再び PBS で洗浄した後に DAPI (1:10,000, Invitrogen) で 3 分間室温にて核染色を行い、PBS で洗浄し VECTASHIELD Vibrance Antifade Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES, USA) を用いて封入した。乾燥後、共焦点レーザー顕微鏡 A1R/ Ti-2E (Nikon, Japan) を用いて断面的に撮影した。撮影した細胞から 5 個の細胞を選び、細胞内 AQP5 蛍光強度を核を含まない様に ImageJ ソフトウェア (NIH Image, USA) にて各 3 回ずつ測定することで、AQP5 の局在変化の観察を行った。測定した蛍光強度を最大蛍光強度で補正し、細胞膜と細胞質に分け計測し PACAP38 添加時の AQP5 の細胞膜存在変化量の比を計測した(19)。

- PC12 細胞培養

PC12 細胞 (RCB0009) は、理研セルバンク (Riken BRC, Japan) から入手した。培地には、5% FBS (Gibco, USA), 10% horse serum (HS) (Sigma-Aldrich)、および抗生物質 (Penicillin-Streptomycin) (Sigma-Aldrich) を RPMI 培地 1640 (ATCC modification) (Thermo Fisher) にて調整し、37 °Cで 5% CO₂ インキュベーターに入れ培養した。培養ディッシュのコーティングには Cellmatrix Type IV (新田ゼラチン, Japan) を用いた。

- Total RNA 抽出と RT-PCR

RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて 10 cm ディッシュで培養した PC12 細胞から全 RNA を抽出した。AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent technologies) を用いて cDNA を合成した後、EmeraldAmp PCR Master (TaKaRa) にて RT-PCR を行った。PCR は 95 °Cで 5 分間の初期変性で行い、最終サイクル延長は 72 °Cで 10 分間行った。使用したプライマーとサイクリング条件を以下に示した (Table 2.)。PCR 産物を 1.6% agarose gel で分離し、泳動後に EtBr を使用し染色し ChemiDoc XRS+イメージングシステム (BIO-RAD) で撮影した

- 神経突起伸長の測定

PC12 細胞を 96 well プレートに $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ cells/well に調整し、約 6 時間後に PACAP38 (Phoenix Pharmaceuticals) を細胞培養液に 37 °Cで添加した。プレートへの完全な接着を確認した後、終濃度が 10^{-7} M、 10^{-8} M および 10^{-9} M になるように PACAP38 を添加した。PACAP38 添加 17、72 および 144 時間後、経時的に光学顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE) を用いて細胞を位相差像として観察した。画像からの神経突起伸長が 20 μ m 以上の細胞を突

起伸長細胞としてカウントした。細胞は、ImageJ ソフトウェア (NIH image) を使用してカウントした。神経突起伸長の割合は画像当たりの 20 μm 以上の細胞数を、画像当たりの総細胞数で割ることによって算出した。最後に、条件ごとに調べたすべての結果を平均して ($n = 6$)、条件ごとの神経突起伸長細胞の数を計算した。

- ・ 免疫細胞学的染色

PC12 細胞をカバーガラスチャンバー (Iwaki, Japan) に播種し、接着確認後、PACAP38 を 10^{-7} M の最終濃度になるように添加し、3 日間培養した。培地を除去した後、細胞を PBS で洗浄し、4% PFA 溶液で固定した。再度洗浄後、0.1% Triton-X100 を含む PBS 溶液で 10 分間処理した。PBS で処理・洗浄後、3% BSA (Sigma-Aldrich) と 0.1% Tween 20 を含む PBS 溶液でブロッキングし、mouse anti- α -Tubulin antibody (1:1,000, Abcam) を 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。次いで、細胞を PBS で洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG (1:1,000, Invitrogen) にて室温で 60 分間処理した。再度 PBS で洗浄後、Alexa Fluor 488 rabbit anti-Neu-N antibody (1:50, Abcam) を 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。PBS で洗浄し、核染色を DAPI (1:10,000, Thermo Fisher Scientific) を用いて室温で 3 分間行い、細胞を最後に PBS で洗浄し、VECTASHIELD Vibrance Antifade Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES) にて封入した。乾燥後、細胞を蛍光顕微鏡 (BZ-X 710) で観察した。

- ・ 受容体阻害薬を用いた神経突起伸長の測定

PC12 細胞を 96 well プレートで $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ cells/well に調整し、24 時間培養した。培養した細胞に PA-8, VIP6-28 を添加し 37 $^{\circ}\text{C}$ で 5% CO_2 インキュベーターにて 1 時間インキュベートした。インキュベーション後に 10^{-7} M PACAP38 を添加し、阻害薬の添加の有無にかか

わらず細胞を観察した。BZ-X710 光学顕微鏡 (KEYENCE) を用いて全細胞数をカウントし、細長い突起 (20 μm 以上) を有する細胞数をカウントした。

- ・ 細胞内シグナルの阻害薬

PC12 細胞を 96 well プレートに $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ cells/well に調整して 24 時間培養し、5 μM CHIR99021 (GSK-3 β 阻害薬, FUJIFILM Wako), 5 μM LY294002 (PI3K 阻害薬, FUJIFILM Wako), 2.5 μM H89 (PKA 阻害薬, Cayman, USA), 2.5 μM U0126 (MEK1, MEK2 阻害薬, FUJIFILM Wako), 2.5 μM GF109203X (PKC 阻害薬, FUJIFILM Wako), 10 μM Y27632 (ROCK 阻害薬, FUJIFILM Wako) および 5 μM purvalanol A (CDK 阻害薬, FUJIFILM Wako) を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 5% CO_2 インキュベーターにて 1 時間培養した。インキュベート後に終濃度 10^{-7} M になるように PACAP38 を添加した。3 日間培養後、細胞を光学顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE) で観察し、全細胞数と突起 (20 μm 以上、20 μm 以下) を生じた細胞数をカウントした。

- ・ 総可溶性タンパク質の抽出

タンパク質を抽出するために、PC12 細胞を PBS で 2 回洗浄した後、1 ml の LB-TT 抽出液を 10 cm ディッシュに素早く加え、直ちに室温で 1 分間混合した。タンパク質濃度は、Pierce™ 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) で BSA を標準として使用し、分光光度計 DeNovix DS-11 (DeNovix) で測定した。

- ・ 分離されたタンパク質の二次元ゲル電気泳動とイムノブロットニング

二次元ゲル電気泳動は ATTO テクニカルマニュアルに従って行った。一次元電気泳動は、

5 μg のタンパク質サンプルを IEF 用アガロースプレキャストゲル (pH 5~8, ϕ 2.5 mm \times 75 mm; ATTO) および WSE-1500 ディスクラン-R (ATTO) を使用して、300 V の定電圧で 210 分間行った。一次元電気泳動終了後、アガロースプレキャストゲルを固定液 (0.25% TCA) で 3 分間固定した。ゲルを蒸留水で 1 分間 3 回洗浄し、新しい蒸留水と交換し、室温で 2 時間穏やかに振とうした。蒸留水を捨て、ゲルを SDS 平衡溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1.6% SDS, 0.02% bromophenol blue, 8% glycerol、および 20 mM DTT] 中で 10 分間穏やかに振盪した後、二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動は、e⁻パジエル 5~20% 2 次元用 (ウエルなし) (ATTO) と WSE-1150 PageRunAce (ATTO) を使用して泳動を行った。泳動したタンパク質を MIXED MW プロトコールに従って PVDF メンブレン (Trans-Blot Turbo Midi PVDF, 0.2 μm , BIO-RAD) に Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO-RAD) 25 V, 2.5 A, 7 分を使用して転写した。メンブレンへのタンパク質の転写に続き、25 ml のブロッキング溶液中で 1 時間、室温でゆっくりと振盪しながらインキュベートした。ブロッキング溶液は、5.0 g skim milk (BD Life Science) を 100 ml の TBS-T に溶解して調製した。メンブレンを TBS-T で 5 分間洗浄し、10 ml の一次抗体溶液 [2 μl rabbit anti-CRMP2 antibody (Abcam), 3 μl mouse anti-CRMP2 phospho T555 antibody (Abcam), 3 μl rabbit anti-CRMP2 phospho S522 antibody (Abcam)、および 3 μl rabbit anti-CRMP2 phospho T514 antibody (Abcam)] を 1 時間静かに振盪した。次にメンブレンを 25 ml の TBS-T で 5 回洗浄した。洗浄後、メンブレンを 10 ml の二次抗体溶液 (0.5 μl , anti-rabbit IgG, HRP-linked whole Ab donkey, Cytiva) を加えて 1 時間、室温でゆっくりと振盪した。TBS-T による洗浄を 5 回繰り返したのちに、バンド撮像のために Luminol/Enhancer および Peroxide を 1:1 の比率で混合し (Clarity Western ECL Substrate、BIO-RAD) を、メンブレン上に添加後、室温で 2 分間インキュベートした。キムワイブペーパータオルで膜の一端に触れて過剰な溶液を排出し、シグナル (交差反応タンパク質バンド) を

ChemiDoc XRS+イメージングシステム (BIO-RAD) で可視化した。

- ・ 統計学的解析

データは平均±SEM として表示した。Tukey-Kramer の有意差検定を使用して、実験の統計的有意性を評価した。 $P < 0.05$ の値は、統計的有意性を示すとした。

Table 1. Primer sequences for RT-PCR (*Mus musculus*)

Gene name	Accession No.	Nucleotide sequence (5'-3')	Nucleotide sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>Aquaporin-5</i>	NM_001651	TCTGGGACAGACCTCAGAGGATT	CATGCATCCTCACCAGAAATAA	235
<i>PAC1-R (Adcyap1r1)</i>	NM_001118	CCTCCTTGTTTTGGTACTGGTC	GGTCACACCCAAAATCAGATG	293
<i>VPAC1-R (Vipr1)</i>	NM_001251882	GGTCCGGACACTCCTAGAGAAC	GGTCACACCAGTGTTGTTTGAG	251
<i>VPAC2-R (Vipr2)</i>	NM_001308259	CCAGATACTGTTTGAGCTGTGC	AAATCGAGTCAATGACAACACG	445

Table 2. Primer sequences for RT-PCR (*Rattus norvegicus*)

Gene name	Accession No.	Nucleotide sequence (5'-3')	Nucleotide sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>PACAP (Adcyap1)</i>	NM_016989	CTGTTGGTCTACGGGATAAT	CTACAAGTACGCTATTTCGGC	498
<i>RAC1-R (Adcyap1r1)</i>	NM_001270579	TTGCAAGATGTCAGAACTATCCA	GAAGTAACGGTTCACCTTCCAG	259
<i>VPAC1 (Vipr1)</i>	NM_012685	AAATGGTCTTCGAACTTGTCGT	GGAGTGTGTCCTATGAAAAGC	373
<i>VPAC2 (Vipr2)</i>	NM_017238	CACTAGTGATGGGTGGTCGG	GCCAGTAGAAGTTCGCCATG	399
<i>GAPDH</i>	NM_017008	CCTGTGACTTCAACAGCAACTC	GGCCTCTCTTGTCTCAGTA	213
<i>Actb</i>	NM_031144	TGACGGTCAGGTCATCACTATC	GGCAGTAATCTCCTTCTGCATC	229

第一章 PACAP の汗腺における汗分泌促進作用の細胞内シグナル伝達機構の解析

第一節 緒言

汗は皮膚から分泌される外分泌液であり、体温調節や皮膚の水分量調節を行うために不可欠な体液である(20)。これらは汗腺組織であるエクリン腺、アポクリン腺から分泌され、汗分泌機能の 90%はエクリン腺によって行われ、その成分は 99%が水、残りは無機物質である。汗分泌は、体温の上昇やストレスなどによって促進され、生体における恒常性の維持に寄与している。汗分泌機構の異常によって、汗が多量に出る多汗症や汗が分泌することができない無汗症などの発汗異常症が起こることが知られている。発汗異常症は高熱や熱中症だけでなく、掻痒感や紅斑などの重篤な皮膚状態を生じ、患者の QOL を著しく低下させることが知られている(21, 22)。この疾患は、神経系疾患やその他の基礎疾患、自律神経失調症が原因の 1 つだと考えられているが、詳細な原因は明らかではない(23)。また、多汗症の治療には抗コリン薬や外科的治療などの治療法が行われているが、無汗症における明確な治療法は確立されていない(24-28)。

これまで研究で、汗腺における汗分泌の調節には、神経伝達物質である Acetylcholine (ACh), Noradrenaline (NA) やペプチドなど Non-noradrenergic, non-cholinergic transmitter (NANC) の PACAP, VIP および Atrial natriuretic peptide (ANP) などの関与が報告されている。汗分泌作用に関与する代表的な神経伝達物質である ACh や NA は汗腺細胞に発現しているムスカリン M_3 -R とアドレナリン α_1 -R に作用し、細胞内の Ca^{2+} を上昇させることで、汗腺における主な水チャネルである AQP5 の細胞質から細胞膜へのトランスロケーションが亢進することで汗分泌を促進すると考えられている。しかし、NANC による細胞内シグナル伝達機構はほとんど

ど明らかでない(29)。

そこで本研究では、PACAP による汗分泌促進作用の詳細な細胞内シグナル伝達機構を解明するために、ヒト汗腺由来不死化細胞である NCL-SG3 細胞を用い、PACAP による汗分泌促進作用機序の解明を目的として実験を行った。

第二節 実験結果

まず、NCL-SG3 細胞の PACAP38 による反応性を調べる前に、PACAP 受容体とエクリン汗腺による汗分泌に関与している水チャネルである AQP5 の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。RT-PCR 法を用いて NCL-SG3 細胞における汗分泌関連遺伝子の発現を調べたところ、PAC₁-R と VPAC₁-R が発現していた (Fig.1A)。また、汗分泌に関連する水チャネルである AQP5 はタンパク質の発現も認められた (Fig.1B, C)。イムノブロットティングでは 26 kDa に AQP5 のバンドが確認された (Fig.1C)。

続いて PACAP による発汗作用の細胞内シグナル伝達機構を明らかにする目的で、NCL-SG3 細胞に種々の濃度の PACAP38 を添加したときの細胞内 Ca²⁺濃度の経時的变化を観察した。PACAP38 添加により経時的に細胞内 Ca²⁺濃度が増加し、40 秒程度で最大値になり徐々に初期状態に戻る一過性の反応が認められた (Fig. 2A)。また、PACAP38 添加時の細胞内 Ca²⁺濃度の最大値の平均は 10⁻⁹ M PACAP38 添加時に最大値を示した (Fig. 2B)。そのため、今後の実験に用いる PACAP38 の濃度は 10⁻⁹ M とした。

PACAP38 添加により、細胞内の Ca²⁺濃度が上昇することが確認されたため、細胞内 Ca²⁺濃度上昇に関与する受容体を明らかにするために、各 PACAP-Rs の阻害薬と PACAP38 を同時添加した際の細胞内 Ca²⁺濃度の変化を観察した。PACAP38 と VIP6-28 (VPAC₁-R, VPAC₂-R antagonist) を同時に添加した場合は細胞内 Ca²⁺濃度の増加が認められた。しかし、PACAP38 と PACAP6-38 (PAC₁-R, VPAC₁-R antagonist) 及び PA-8 (PAC₁-R selective antagonist) の同時添加では細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が認められなかった (Fig. 3A)。また、PACAP38 と各種阻害薬を同時添加した際の細胞内 Ca²⁺濃度の最大値は、PA-8, PACAP6-38 群では有意な差が認められたが、VIP6-28 群とでは差は見られなかった (Fig. 3B)。これらの

結果から、NCL-SG3 細胞の PACAP38 添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇には、 $\text{PAC}_1\text{-R}$ が関与していることが明らかになった。

PACAP38 が $\text{PAC}_1\text{-R}$ を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことが明らかになったため、PACAP38 が AQP5 の細胞内局在変化に与える影響を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。汗腺における汗分泌に大きく関与すると考えられている水チャネルである AQP5 は細胞膜に移行することで、その機能を示すことが報告されている(30)。PACAP38 添加前は、AQP5 が NCL-SG3 細胞において細胞質内に広く分布し、多くの AQP5 陽性小胞が確認された (Fig. 4A)。AQP5 は PACAP38 添加後、15 分で細胞膜に移行し始め、30 分で多くが細胞膜に移行した (Fig. 4B, C)。また、添加 60 分後には添加前と同様に細胞質内に広く分布していることが確認された (Fig. 4D)。AQP5 の細胞膜局在の比率は 10^{-9} M PACAP38 によって増加し、添加後 30 分で最大値に達し、添加前と比較して AQP5 の細胞膜の局在は有意に上昇した (Fig. 5)。

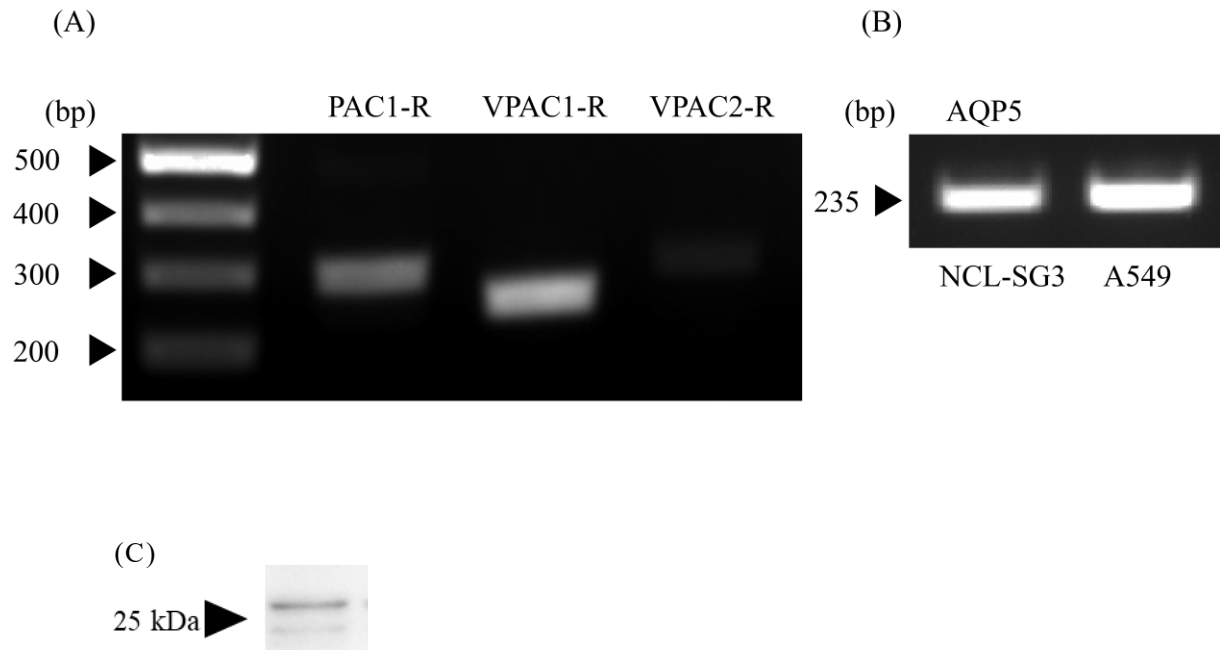


Fig. 1. PACAP receptor and aquaporin-5 (AQP5) expression in NCL-SG3 cells.

Reverse transcriptase PCR analysis to detect (A) PAC₁-R, VPAC₁-R, VPAC₂-R and (B) AQP5 mRNA in NCL-SG3 cells. A human adeno carcinoma cell line A549 was used as a positive control for AQP5. Primer sequences are given in Table 1. (C) Immunoblotting analysis shows AQP5 protein was expressed (approximately 26 kDa in size) in NCL-SG3 cells.

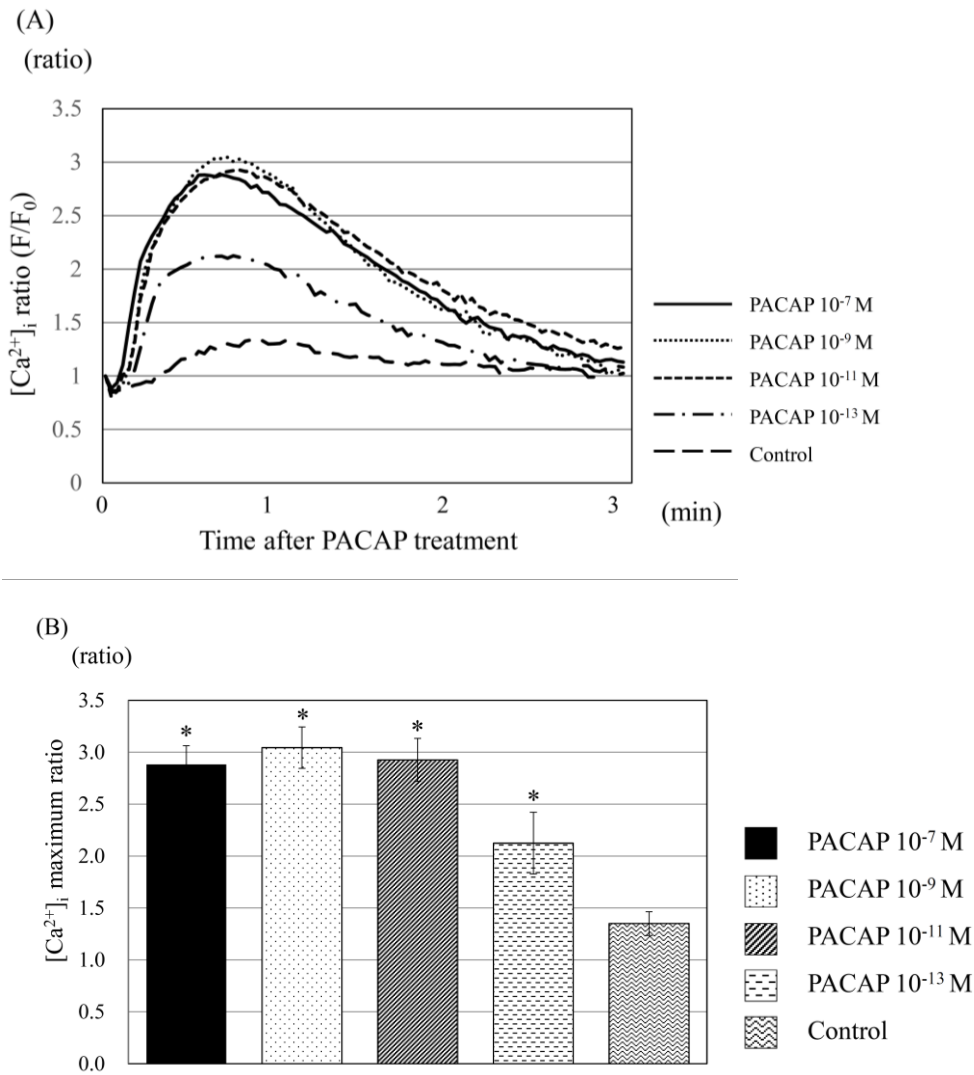


Fig. 2. PACAP38 increases the cytosolic Ca²⁺ concentration in NCL-SG3 cells.

(A) Time course of the Ca²⁺ flux response to PACAP38 treatment at concentrations of 10⁻¹³ - 10⁻⁷ M. The ratio represents fluorescence intensities at specific time-points divided by the fluorescence intensity at 0 sec (n = 10). (B) Maximum [Ca²⁺]_i ratios in response to 10⁻¹³-10⁻⁷ M PACAP38 treatment (n = 5). Results are presented as means ± SEM from five individual cells. **P* < 0.05 versus Control.

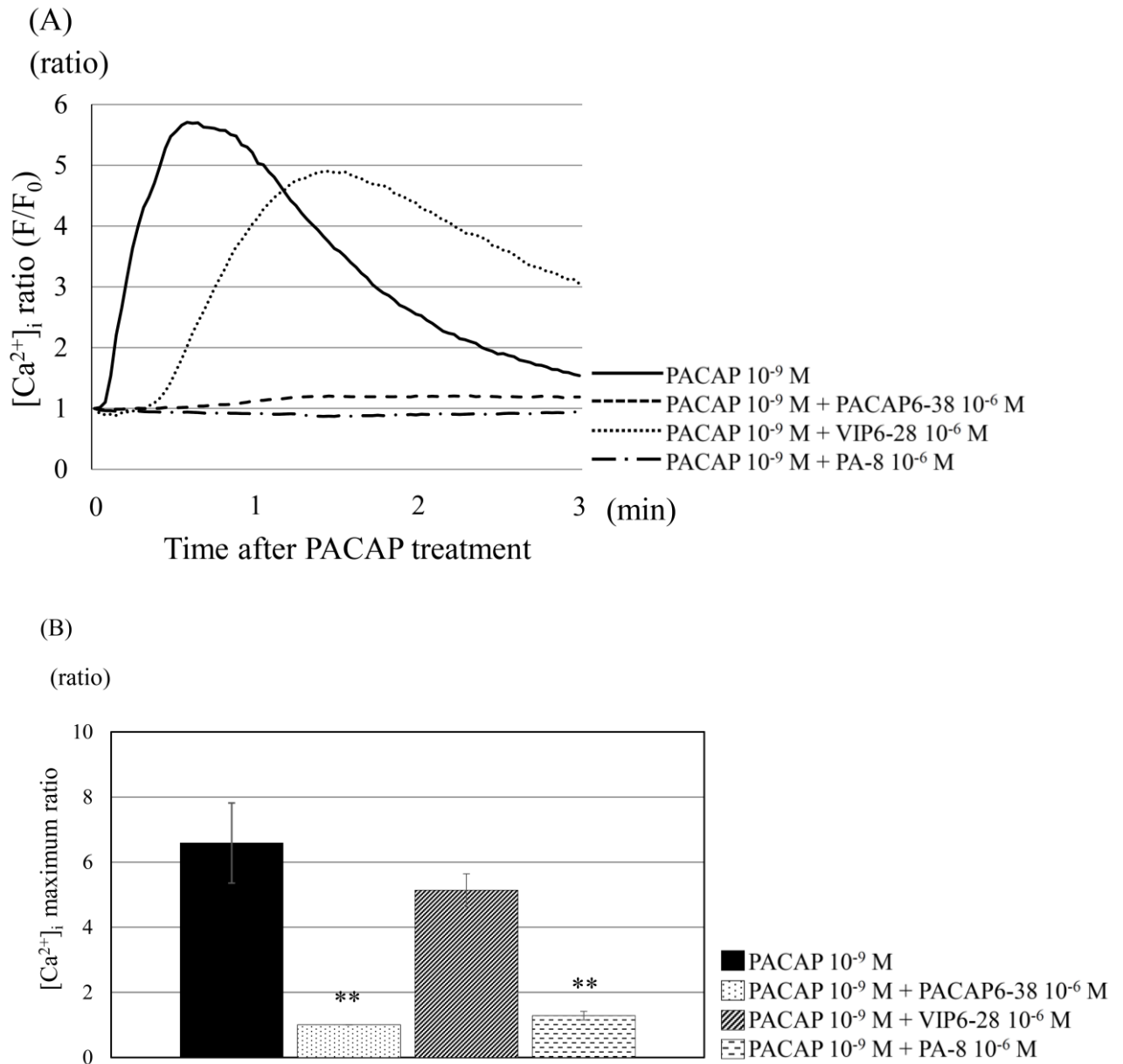


Fig. 3. PACAP38 increases cytosol Ca^{2+} levels via an action on $\text{PAC}_1\text{-R}$.

(A) Time course of the Ca^{2+} flux in response to 10^{-9} M PACAP38 and PACAP-R antagonist treatment. The ratio represents fluorescence intensities at specific time-points divided by the fluorescence intensity at 0 min ($n = 10$). (B) Maximum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ratios in response to 10^{-9} M PACAP38 and PACAP-R inhibitor treatment ($n = 10$). Results are presented as means \pm SEM from ten individual cells. $**P < 0.01$ versus 10^{-9} M PACAP38 treatment only.

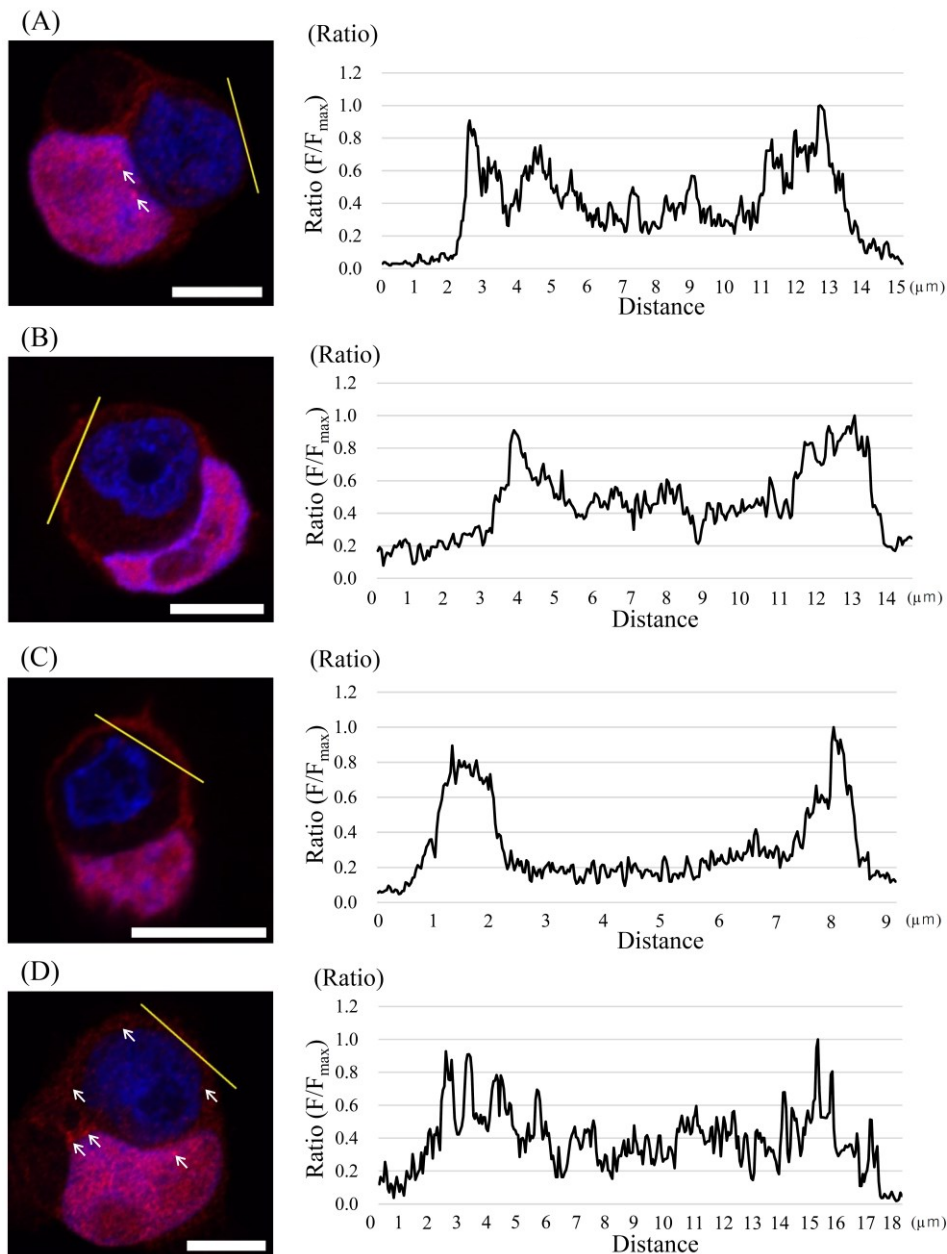


Fig. 4. Translocation of aquaporin-5 induced by PACAP38 treatment.

PC12 cells were immunostained with AQP5 (red) and counter stained with DAPI (nuclei). Representative confocal micrographs of NCL-SG3 cells transfected with (A) no treatment, (B) 15 min after 10^{-9} M PACAP38 treatment, (C) 30 min after 10^{-9} M PACAP38 treatment, (D) 60 min after 10^{-9} M PACAP38 treatment; fluorescence intensity profiles along each yellow line are shown. The white arrows highlight AQP5-immunoreactive vesicles in the cytoplasm of NCL-SG3 cells. Scale bar = 10 μ m.

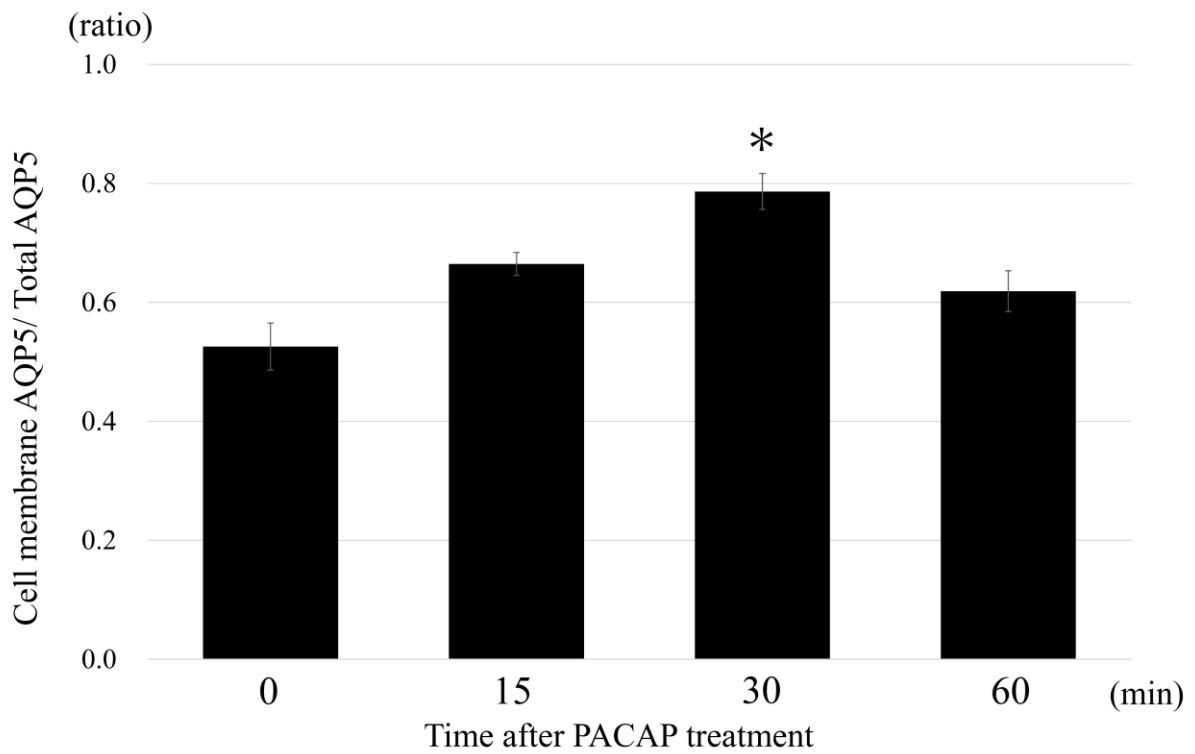


Fig. 5. PACAP38 treatment promotes the translocation of aquaporin-5 from cytosol to cell membrane.

The AQP5 distribution expressed as a function of the membrane ratio calculated from fluorescence intensity profiles in response to 10^{-9} M PACAP38 treatment: three profiles were taken per cell and five cells per group. Results are presented as means \pm SEM from five individual cells membrane ratio. * $P < 0.05$ versus 0 min.

第三節 考察

神経ペプチド PACAP が涙腺や汗腺など外分泌腺に作用し、涙液や汗を分泌することが報告されている(9, 11)。また、涙腺における涙液分泌促進機構は PAC₁-R/AC/cAMP/PKA 経路を介し AQP5 のリン酸化が起こることで、AQP5 が細胞膜に移動し涙液分泌が促進することが明らかになっている(10)。しかし、汗腺における汗分泌促進機構はいまだに明らかになっていない。そのため、本研究では不死化ヒト汗腺細胞である NCL-SG3 細胞を用いて、PACAP による汗分泌促進作用の機序を検討した。

その結果、NCL-SG3 細胞に PACAP38 を添加することにより細胞内 Ca²⁺濃度が一過性に上昇することが確認された。PACAP38 と PACAP6-38, PA-8 を同時に添加した場合には、細胞内 Ca²⁺濃度の変化は認められなかった。しかし、VIP6-28 の同時添加群では細胞内 Ca²⁺濃度の増加が認められた。これらの結果から、PACAP38 による NCL-SG3 細胞の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇には PAC₁-R が関与していることが考えられ、既報で動物個体を用いた研究においても PACAP38 による発汗作用は PAC₁-R を介している報告と同様の結果であった(11)。

エクリン汗腺が発汗作用を示す機構は明らかになっていない部分が多く、様々なシグナル伝達物質を介していると考えられている。それには、VIP による細胞内 cAMP 上昇や ACh による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇により惹起されるものが報告されている(31-34)。一般的に外部刺激による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇には、ストア作動性 Ca²⁺流入 (Store-operated Ca²⁺ entry: SOCE) 機構が関与していると言われている(35)。SOCE 機構は細胞膜に存在する GPCR への刺激により Phospholipase C の活性化や IP₃ の生成により、小胞体膜に存在する Ca²⁺チャネルを開口し細胞質に Ca²⁺が放出されることによって細胞膜の Ca²⁺チャネルを開口させる(36)。小胞体内 Ca²⁺濃度が減少することにより、EF ハンドモチーフより Ca²⁺が解離することで、小胞体膜にある

Stromal interaction molecule 1 (STIM 1) 及び STMI 2 が活性化される。これらの作用により、細胞膜に存在している ORAI calcium release-activated calcium modulator 1 (ORAI 1) や ORAI 2, ORAI 3 にて構成されている Calcium release-activated calcium (CRAC) channel が活性化され、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する(37)。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、Calcium-dependent chloride channel (CaCC) を介して様々な器官で体液分泌を促進することが報告されている(38, 39)。汗腺でも CaCC の一つである Anoctamin (ANO1 または TMEM16A) による Cl^- の流入が汗分泌に作用する可能性がヒト汗腺細胞において報告されている(40)。

本研究では、PACAP38 の添加により AQP5 細胞内局在の経時的な細胞膜移行が観察された。AQP5 は水チャネルファミリーの一つであり、唾液腺や涙腺など様々な外分泌腺に発現し、ヒトの外分泌作用に大きく関与している(41, 42)。特に汗腺における汗分泌には AQP5 が関与していると考えられているが、AQP5 の活性化には多くの経路があり明らかになっていない部分も多い(43, 44)。マウス唾液腺において AQP5 活性化の経路の一つとして、外部の刺激により AQP5 が細胞膜に移行することで水チャネルとして機能することが報告されている(45-47)。細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することで活性化される ANO1 は、免疫染色法においてマウス汗腺の頂端部で AQP5 と共局在し、AQP5 の細胞膜移行に関与している(30)。また、マウス唾液腺において細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって活性化される Calcium ionophore である A23187 が、AQP5 を細胞膜移行に関与する報告もある(45)。これらの報告から、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が AQP5 の細胞膜移行を促進しており、本研究においても PACAP38 が細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して AQP5 の細胞膜移行に関与していると考えられる。しかし、AQP5 の膜移行は解明されていないことも多く Ca^{2+} 以外の因子が関与している可能性もある。今後は AQP5 の活性化経路に関しても検討していく必要があると考える。

本章では PACAP が PAC₁-R を介して、細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させることで水チャネルである AQP5 を細胞質から細胞膜から移行させることが示唆された。

第二章 PC12 細胞における PACAP による神経突起伸長メカニズムの解析

第一節 緒言

一般に、中枢神経系に属する脳や脊髄は、一度損傷すると回復が難しい。脳梗塞や交通事故、転倒による脊髄損傷などが原因となるさまざまな障害では、神経自体が損傷を受けている。この神経損傷から生じる機能低下を回復する治療法はまだ十分に確立されているとはいえない。これまで、Shioda らの研究グループは、脳虚血モデルである中大脳動脈永久閉塞 (Permanent middle cerebral artery occlusion: PMCAO) のマウスモデルを用いた虚血性刺激による神経細胞死を PACAP38 の脳室内投与により抑制できることを発見し、DNA マイクロアレイ解析とプロテオミクス解析から PACAP38 の脳室内投与後の神経細胞死抑制作用の責任分子として Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) を同定した(48, 49)。

CRMP2 は、1995 年にアフリカツメガエル卵母細胞発現系を使用して同定された CRMP 62 と高い相同性を持つ、多機能アダプタータンパク質/微小管関連タンパク質であり、脳と脊髄で強く発現している(50-52)。特に、CRMP2 は神経の損傷と神経細胞死、神経障害、および脳虚血に関連する神経細胞の極性と突起伸長の決定に重要であることが報告されている(53-59)。これらの研究は、CRMP2 の軸索伸長機能が PACAP による神経伸長促進作用の分子メカニズムと関与している可能性を示した。CRMP2 は培養海馬細胞において神経突起形成を誘導し、その作用は Glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) によるリン酸化により不活性化されることが報告されている(60, 61)。さらに、GSK-3 β 以外にも、CRMP2 は、Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) や Rho-associated protein kinase (ROCK) などを介してリン酸化されることにより、チューブリン結合能を低下させると報告されている(62, 63)。これまでの研究では、軸索誘導およ

び成長円錐における CRMP2 リン酸化の関与も明らかにされている(64, 65)。しかし、PACAP による樹状突起や軸索の伸長を制御するメカニズムはほとんど明らかになっておらず、CRMP2 のリン酸化が神経突起の伸長にどのように関与しているかは不明である。

そこで本研究では、NGF によってニューロン様に分化することが知られている培養不死化細胞である PC12 細胞モデルを用いて、PACAP38 の神経突起伸長作用の分子メカニズムの解明を目的として、PACAP38 と CRMP2 の生化学的解析を行った(66)。

第二節 実験結果

まず、PC12 細胞における PACAP 受容体遺伝子発現の有無を確認するために RT-PCR 法を用いて遺伝子発現を調べた。PCR45 サイクルの RT-PCR 法では PACAP, PAC₁-R, VPAC₁-R, および VPAC₂-R mRNA の発現を検出した。ただし、PCR サイクルを 36 サイクルに短縮すると PAC₁-R の単一バンドのみが観察された (Fig. 6)。これは、PAC₁-R が PC12 細胞における主要な PACAP-R である可能性を示唆している。

次に PC12 細胞が伸長突起を示す最適な PACAP38 濃度を調べるため、様々な濃度の PACAP38 を PC12 細胞に添加し、細胞の変化を観察した。各種濃度の PACAP38 の添加により、突起伸長が促進されることが明らかになった (Fig. 7)。さらに、PACAP38 で PC12 細胞の突起伸長細胞の比率を経時的に測定すると、 10^{-7} M PACAP38 添加群は、コントロール群に比べて有意に突起伸長細胞数が増加し、 10^{-8} M および 10^{-9} M PACAP38 添加群と比較しても突起伸長作用が強く認められた (Fig. 8)。そのため、今後の実験においては PACAP38 の添加濃度は 10^{-7} M で行った。次に免疫染色法を使用して、PACAP38 による PC12 細胞の突起を観察した。PACAP38 を添加した PC12 細胞では、神経細胞核に特異的に局在する NeuN が細胞核に発現し、細胞体と突起に α -tubulin の強い発現が確認された。このことから、PACAP38 によって促進された突起伸長が神経突起であることが示唆された (Fig. 9)。

PC12 細胞における PACAP38 の作用に関与する受容体を同定するために、PA-8 (PAC₁-R selective antagonist) と VIP6-28 (VPAC₁-R, VPAC₂-R antagonist) を用いた実験を行った。PACAP38 の神経突起伸長効果は、PA-8 の存在下で有意に抑制されたが、VIP6-28 の存在下では PACAP38 による神経突起伸長作用の抑制は認められなかった。このことから、PACAP38 の突起伸長作用は PAC₁-R を介していることが明らかになった (Fig. 10)。

次に PACAP38 による神経突起伸長作用が直接的に CRMP2 に作用するのか、それとも GSK-3 β を介して CRMP2 に作用するのかを明らかにするために、GSK-3 β 阻害薬および活性化剤の存在下で神経突起伸長を観察した。GSK-3 β の阻害薬である CHIR99021 の添加は、PACAP38 によって誘導される神経突起伸長を促進したが、GSK-3 β の上流の phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) の阻害薬であり、GSK-3 β の活性化因子である LY294002 の添加は、PACAP38 による神経突起伸長を抑制した。また、CHIR99021 または LY294002 のみを添加した場合は 20 μ m 未満の神経突起伸長が観察された。さらに、CHIR99021 のみを添加した場合はほとんどの神経突起伸長が 20 μ m を超えていたが、LY294002 を添加すると 20 μ m を超える神経突起伸長はほとんど認められなかった。これらの結果から、PACAP38 の神経突起伸長効果は GSK-3 β を介することが示唆された (Fig. 11)。

本研究結果から、PACAP38 による PC12 神経突起伸長作用は GSK-3 β 経路を介すると考えられる。これまでの研究では、PACAP/PAC₁-R からの主なシグナル伝達カスケードは PI3K/AKT 経路、cAMP/PKA 経路、cAMP/ERK 経路や PLC/PKC 経路を介することが示されている(67)。また、CRMP2 は、PI3-K/AKT/GSK-3 β シグナル伝達経路によって調節されることが知られている(60)。GSK-3 β は、AKT 経路に加えて、cAMP/PKA 経路、cAMP/ERK 経路、および PLC/PKC 経路にも関与しており、これらの経路によっても調節されている(60, 67-69)。そのため、PACAP38 とこれらの経路の関係を明らかにするために、阻害薬を用いた実験を行った。その結果、LY294002 (PI3K 阻害薬) と U0126 (MEK/ERK 阻害薬) の添加により、神経突起伸長に対する PACAP38 の作用がほぼ完全に抑制されることが確認された (Fig. 12, 13)。したがって、この実験条件下では、AKT 経路と cAMP/ERK 経路が、PC12 細胞における PACAP38 の神経突起伸長効果の主要な経路であることが確認された。

これまでの研究から、GSK-3 β 以外にも CDK5 および RhoA が CRMP2 の活性を調節するこ

とが報告されている。Sema3A は CDK5 と GSK-3 β を活性化し、CDK5 は CRMP-2 の Ser-522 をリン酸化する (65, 70)。RhoA に関しては、RhoA の活性化は一次ニューロンの神経突起伸長を抑制し、Myelin associated glycoprotein は Rho キナーゼ依存性のメカニズムによって軸索新生を阻害する(64, 66, 71, 72)。そのため、CDK5 と Rho/ROCK 経路の阻害薬で実験を行い、PACAP38 による神経突起伸長作用がこれらの経路を介するか否かを検証した。その結果、Rho/ROCK 阻害薬である Y27632 を添加すると PACAP38 の突起伸長作用が促進されることが確認された。また、Y27632 のみを添加した場合、20 μm 以下の突起を持つ PC12 細胞が多く観察されたが、突起伸長は 20 μm 以上はほとんど確認できなかった。したがって、Y27632 単独による Rho/ROCK 経路の抑制では突起伸長効果は生じないことが示唆された。一方、CDK5 阻害薬である purvalanol A の添加は、PACAP38 の突出伸長効果をわずかに抑制した。これらの結果から、PACAP38 による突起伸長作用は CDK5 経路と Rho/ROCK 経路の両方に関与しているが、CDK5 は CRMP2 をリン酸化するのではなく、PACAP38 が CDK5 を介して突起伸長を促進していることが示唆された (Fig. 12. 13)。

これまでの阻害薬を用いた実験結果から、PACAP38 による神経突起伸長の主な経路は AKT 経路と cAMP/ERK 経路であり、Rho/ROCK 阻害が PACAP38 による神経突起伸長作用をさらに促進すると考えられる (考察 Fig.15 を参照)。しかし、CDK5 については、CDK5 による CRMP2 リン酸化が CRMP2 の不活性化に作用するのであれば、purvalanol A の添加により PACAP38 添加による神経突起伸長作用が増大されるはずであるが、本実験では神経突起伸長作用が抑制された。CDK5 を介した CRMP2 の Ser-522 リン酸化の除去は、マウス海馬の海馬ニューロンの樹状突起スパインの密度を低下させると報告されている(73)。さらに視神経における CDK5 による CRMP2 の Ser-522 リン酸化阻害することで神経損傷後の軸索の安定化と再生を促進することが報告されている(74)。Sema3 は、CDK5/FAK 経路を介して成人の新生児ニ

ューロンの樹状突起の成長を仲介することが報告されている(75)。PC12 細胞における PACAP38 による神経突起伸長作用には、CDK5 活性化が必要である可能性が示唆された (Fig. 14)。

CRMP2 のリン酸化と脱リン酸化は神経突起伸長に重要であるが、PACAP38 における CRMP2 のリン酸化・脱リン酸化作用と神経突起伸長との関係は明らかになっていない。特に CRMP2 は多くのリン酸化部位を持っているが、どのリン酸化部位が神経突起伸長に関与するか、また PACAP38 による神経突起伸長に重要なのかを明らかにするために二次元ゲル電気泳動解析実験を行った (Fig. 14)。二次元ゲル電気泳動解析の結果から、CRMP2 抗体で 4 つのスポットが検出された (Fig. 14)。Thr-514-, Ser-522-および Thr-555-phospho CRMP2 抗体を使用して交差反応したリン酸化スポットを確認したところ、スポット 2 は Ser-522 および Thr-555 であることが示され、スポット 3 は Thr-514 および Ser-522 であることが明らかになった。スポット 4 は Thr-514 であることが確認された。PACAP38 の添加によりスポット 2, 3, および 4 の存在量は、コントロールと比較して減少した。神経突起伸長の増加を促進する PACAP38 と CHIR99021 の添加により、スポット 2 が減少し、スポット 3 と 4 は消失し確認できなくなった。神経突起伸長の促進を示した PACAP38 + Y27632 群でスポット 4 のスポットは認められなかった。さらに、神経突起伸長作用が確認できなかった PACAP38 + LY294002 群と PACAP38 + U0126 群の場合は、PACAP38 添加によるスポット 3 と 4 の減少作用は抑制された。突起伸長がわずかに抑制された PACAP38 + H89 群、PACAP38 + GF109203X 群、および PACAP38 + purvalanol A 群でスポット 4 が減少した。以上の結果から、PACAP38 による神経突起伸長促進にはスポット 3 とスポット 4 の減少、すなわち CRMP2 の Thr-514 脱リン酸化が必須であると考えられた。ただし、CHIR99021 の単体を添加することにより PACAP38 添加と同様にスポット 3 と 4 は消失したが、20 μm 以上の神経突起伸長は確認できなかった。現時点では、この観察結果を理由づけ

て説明することはできないが、20 μm 以上の神経突起伸長には、スポット 1 とスポット 2, 3, および 4 の比率も重要であると考えられた。また、CRMP2 におけるリン酸化 CRMP2 の比率が低いほど、20 μm 以上の神経突起の伸長が促進されることが示唆された。

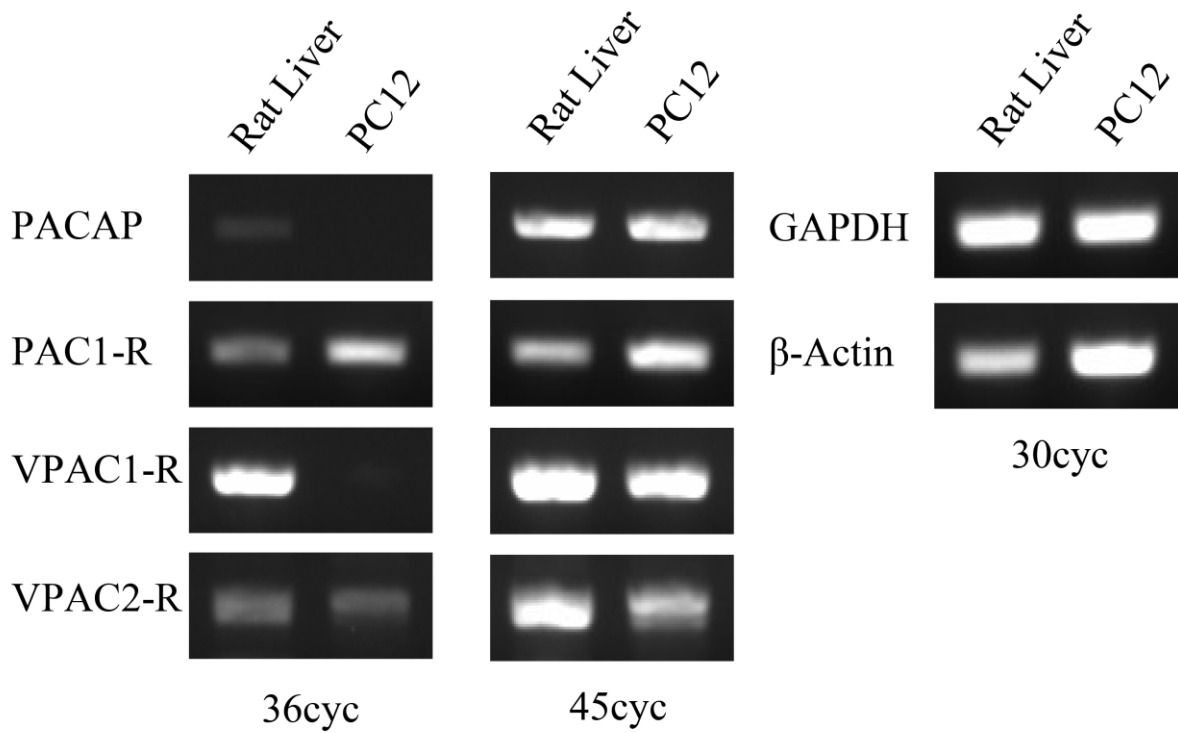


Fig. 6. Expression of PACAP and PACAP-Rs in PC12 cells.

Reverse transcriptase PCR analysis to detect PACAP, PAC₁-R, VPAC₁-R, VPAC₂-R, GAPDH and β -Actin mRNA in PC12 cells. Primer sequences are given in Table 2.

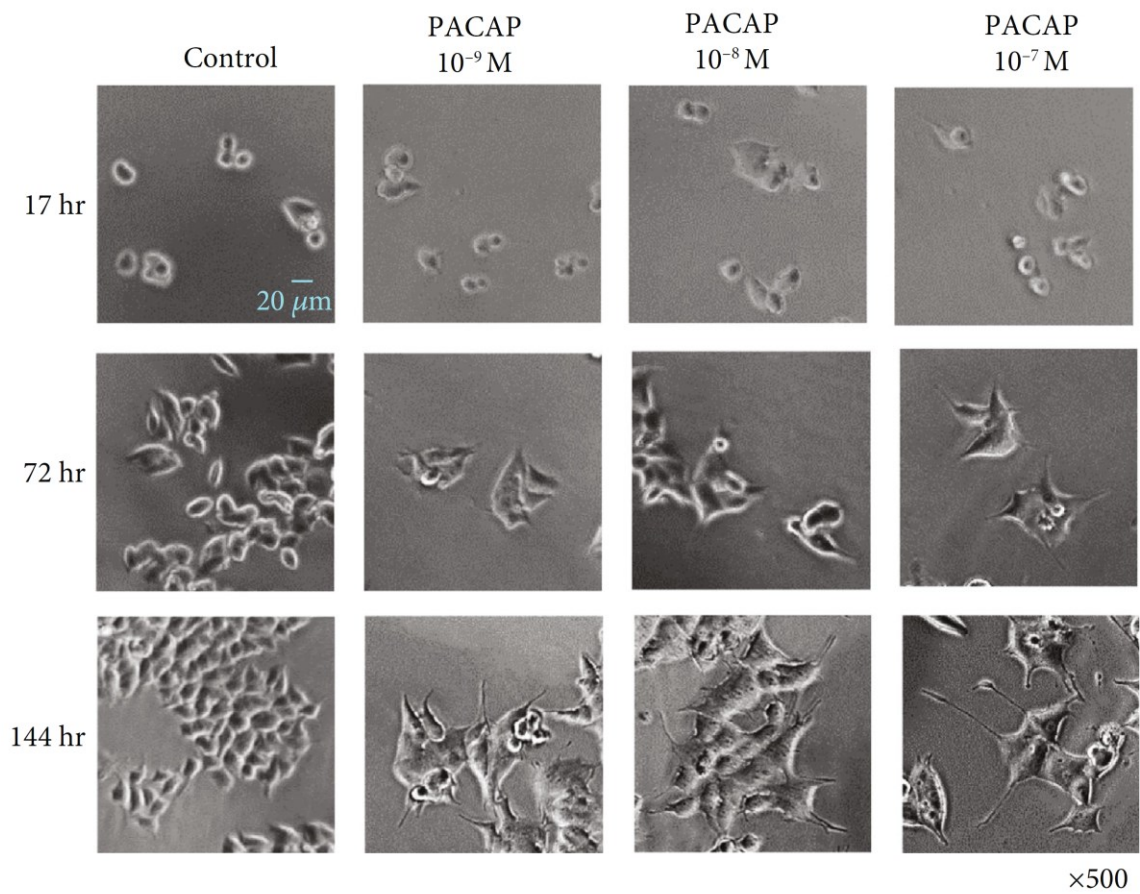


Fig. 7. The PACAP38 concentration-dependent changes in the PC12 cell neurite outgrowth.

Experiments were repeated six times (n = 6).

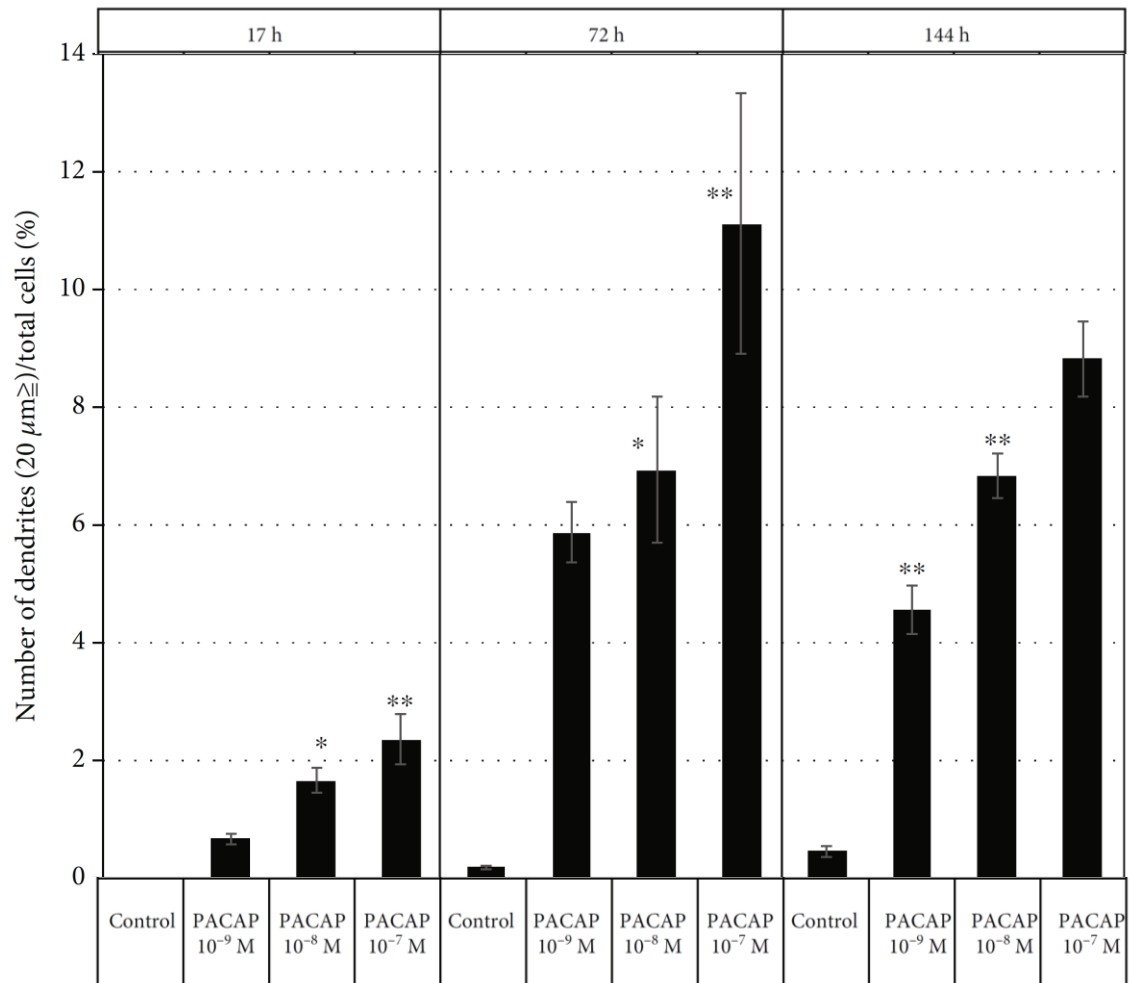


Fig. 8. Change in the number of protrusions under different PACAP38 concentrations in the PC12 cells.

Control: no PACAP (n = 6); PACAP: PACAP38 concentrations added as indicated (n = 6). * $P < 0.05$ versus Control, ** $P < 0.01$ versus Control (Tukey test). Experiments were repeated six times (n = 6). Data are presented as the means \pm SEM.

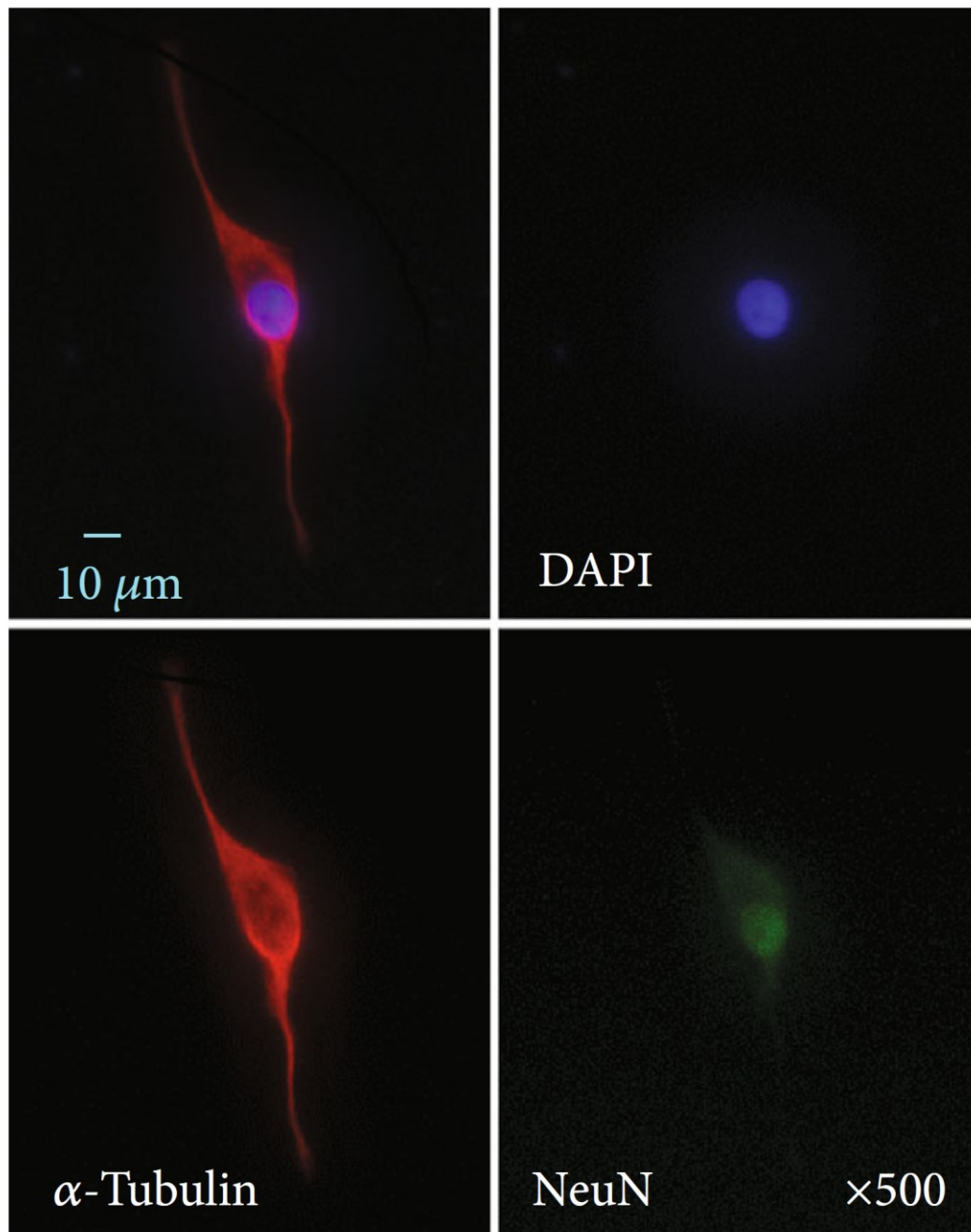


Fig. 9. Immunostaining with α -tubulin and NeuN in PC12 cells.

PC12 cells were immunostained with α -tubulin (red) and NeuN (green) and counter stained with DAPI (nuclei). Experiments were repeated six times (n = 6).

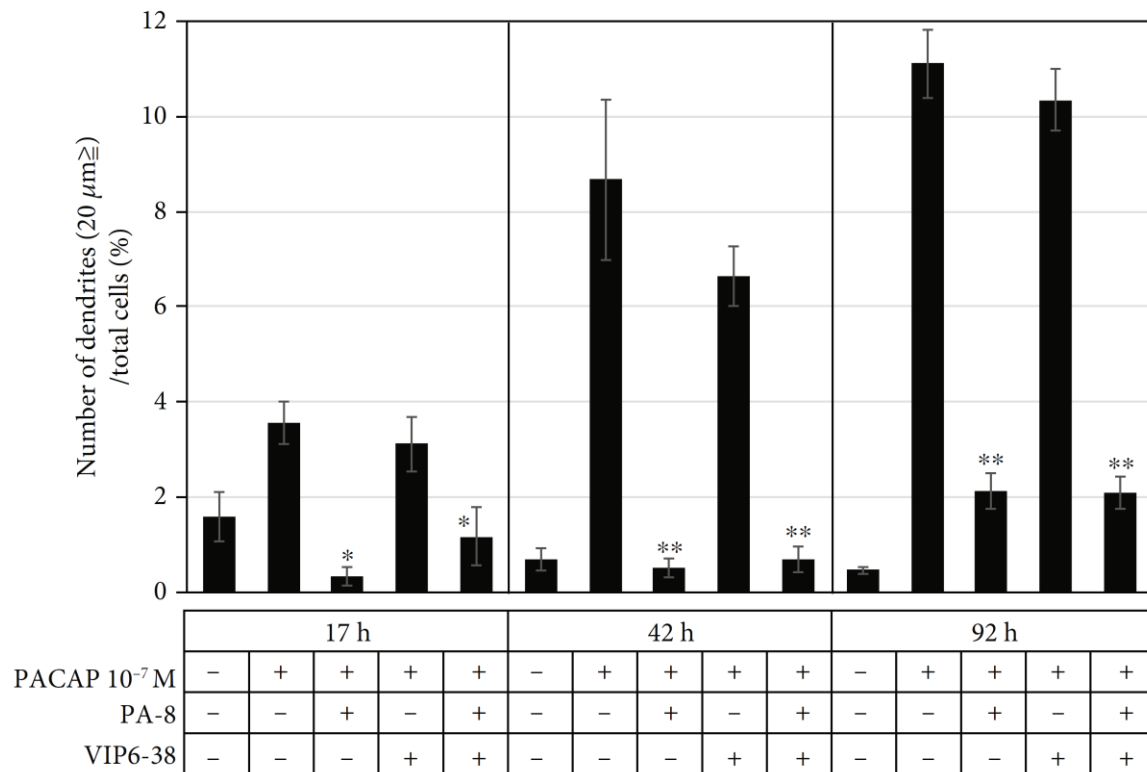


Fig. 10. Effects of the PACAP receptor antagonist, PA-8 and VIP6-38, on neurite outgrowth in PC12 cells.

**P < 0.05 versus 10⁻⁷ M PACAP38 ; **P < 0.01 versus 10⁻⁷ M PACAP38 (Tukey test).*

Experiments were repeated six times (n = 6). Data are presented as the means ± SEM from six dishes.

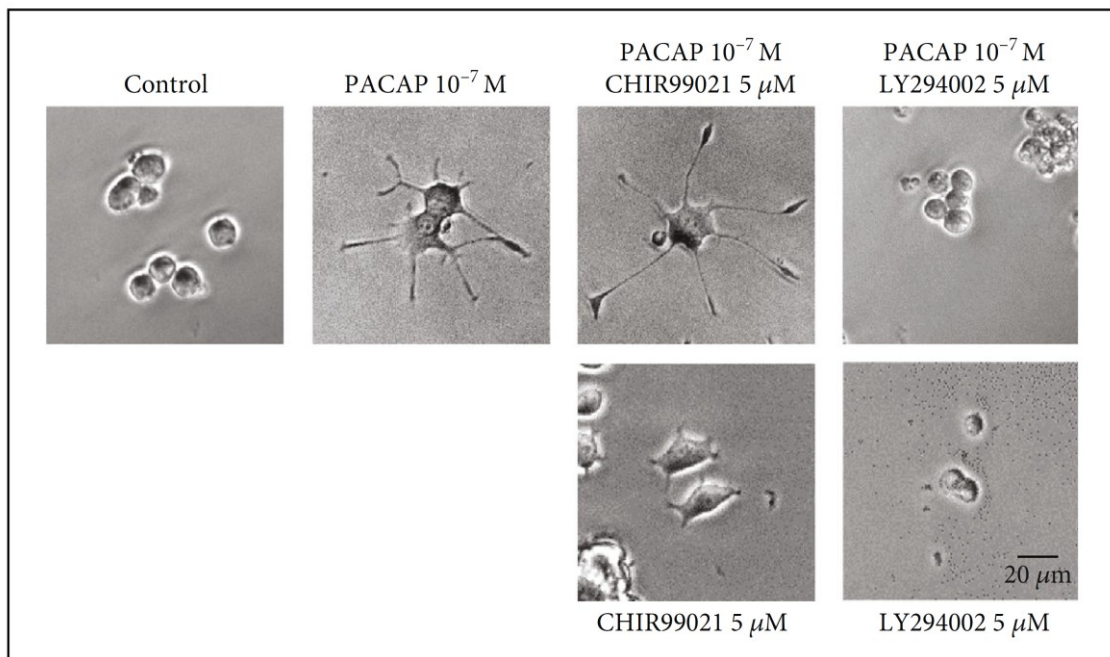


Fig.11. Effects of GSK-3 β inhibitor (CHIR99021) and activator (LY294002) on the changes in neurite outgrowth in the PC12 cells induced by PACAP38.

Control: PACAP free; CHIR99021: GSK-3 β inhibitor; LY294002: PI3K inhibitor (GSK-3 β activator). Treatment with PACAP38 was done for 72 h.

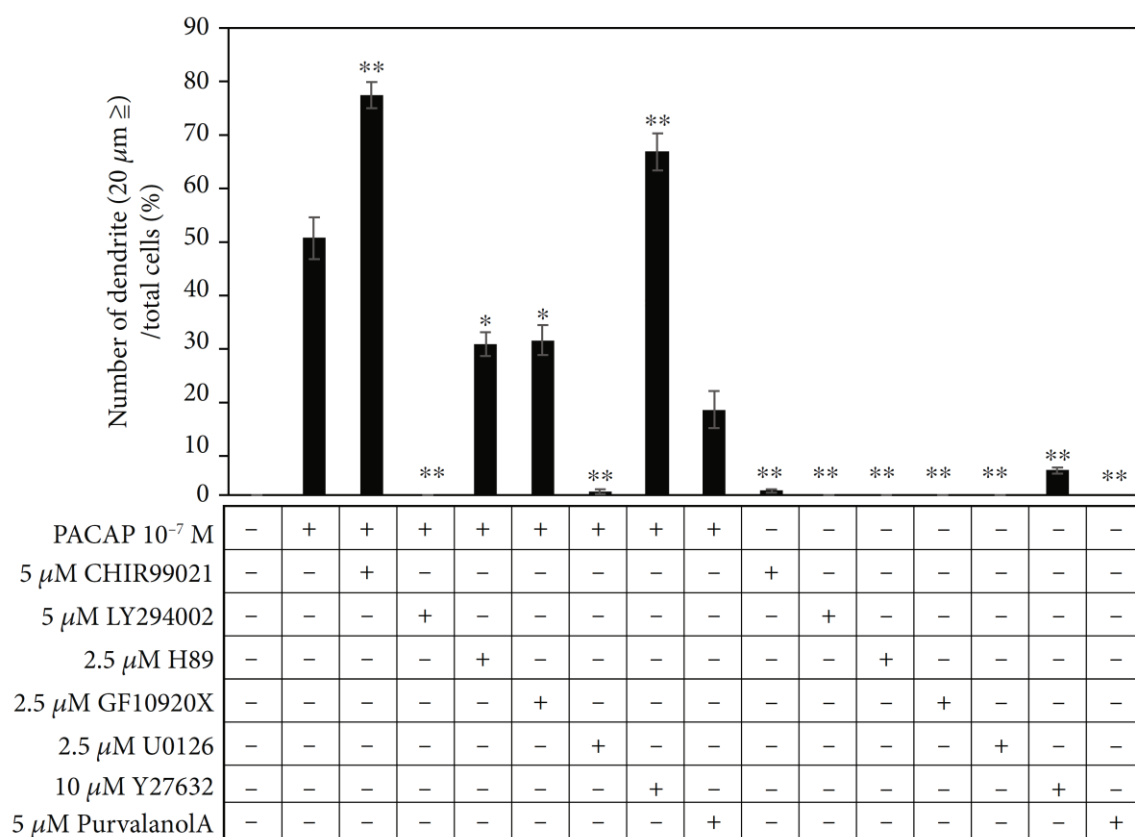


Fig. 12. Effects of inhibition of various signaling pathways on the protrusion extension ($\geq 20 \mu\text{m}$) induced by PACAP38.

* $P < 0.05$ versus 10^{-7} M PACAP38; ** $P < 0.01$ versus 10^{-7} M PACAP38 (Tukey test). PACAP free; CHIR99021: GSK-3 β inhibitor; LY294002: PI3K inhibitor; H89: PKA inhibitor; U0126: MEK/ERK inhibitor; GF109203X: PKC inhibitor; purvalanol A: CDK5 inhibitor; Y27632: ROCK inhibitor. Data are presented as the means \pm SEM from six dishes.

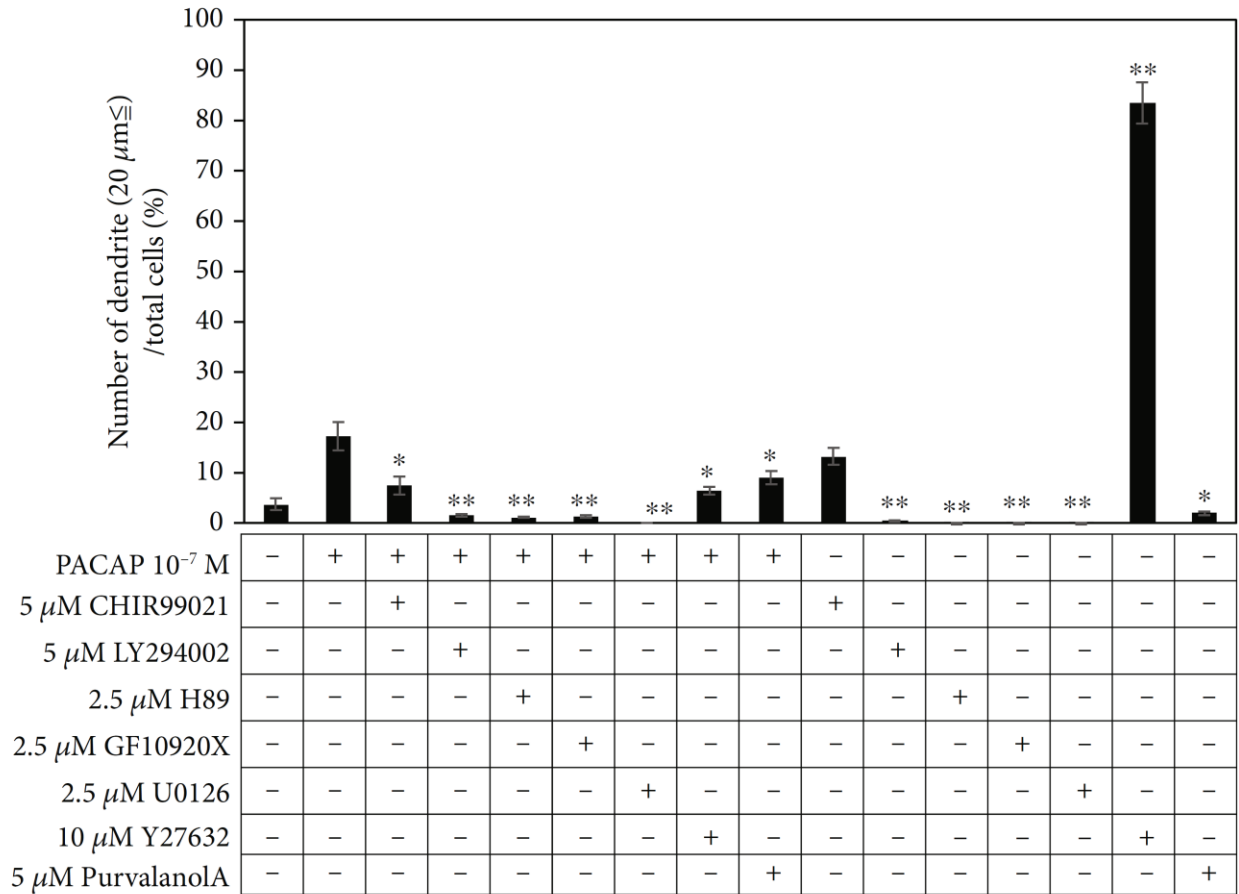


Fig. 13. Effects of inhibition of various signaling pathways on the protrusion extension ($\leq 20 \mu\text{m}$) induced by PACAP38.

* $P < 0.05$ versus 10^{-7} M PACAP38; ** $P < 0.01$ versus 10^{-7} M PACAP38 (Tukey test).

Control: PACAP free; CHIR99021: GSK-3 β inhibitor; LY294002: PI3K inhibitor; H89: PKA inhibitor; U0126: MEK/ERK inhibitor; GF109203X: PKC inhibitor; purvalanol A: CDK5 inhibitor and Y27632: ROCK inhibitor. Data are presented as the means \pm SEM from six dishes.

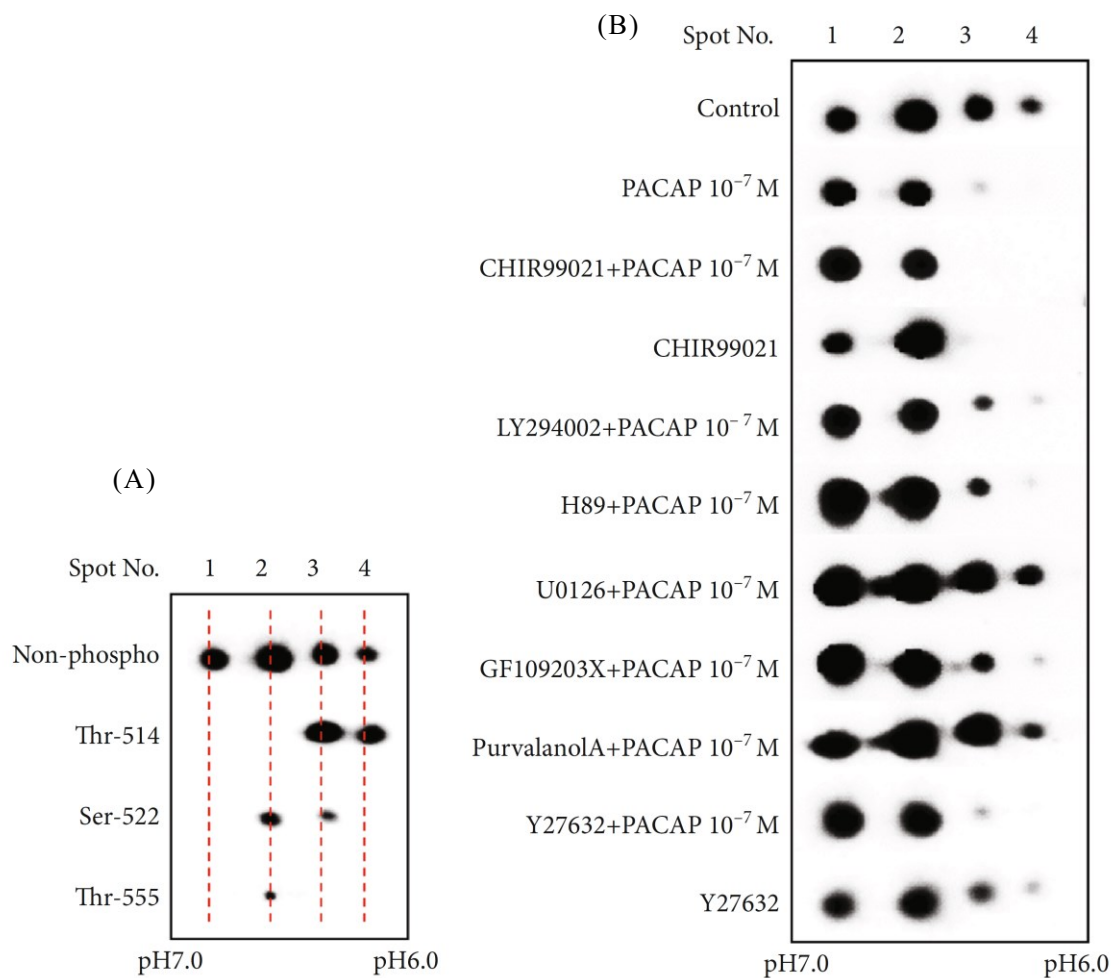


Fig. 14. The 2-D gel electrophoresis analysis of the phosphorylation of CRMP2 induced by PACAP38.

(A) Antibody used: non-phospho: anti-CRMP2 (ab129082); Thr-514: anti-CRMP2 phospho Thr-514 (ab85934); Ser-522: anti-CRMP2 phospho Ser-522 (CK6200); Thr-555: anti-CRMP2 phospho Thr-555 (CK6200). (B) Antibody used: anti-CRMP2 (ab129082); control: PACAP free; CHIR99021: GSK-3 β inhibitor; LY294002: PI3K inhibitor; H89: PKA inhibitor; U0126: MEK/ERK inhibitor; GF109203X: PKC inhibitor; purvalanol A: CDK5 inhibitor; Y27632: ROCK inhibitor.

第三節 考察

神経ペプチド PACAP は、神経突起伸長作用に関与することが知られているが、その作用機序は解明されていない。そこで、神経様培養不死化細胞である PC12 細胞を用いて作用機序の解明を行った。これまでの研究から CRMP2 が PACAP38 による突起伸長作用に関与しているという可能性は示唆されていたが、どのシグナル経路が重要であるかは不明であった。本研究における阻害薬を用いた実験の結果から、PAC₁-R を介した AKT 経路と cAMP/ERK 経路が、PACAP38 による突起伸長作用の主要な経路であることが確認された。さらに、PACAP38 は CRMP2 の脱リン酸化を促進することにより、神経突起の伸長を促進することが明らかになった。CRMP2 の脱リン酸化は、主に Rho/ROCK, CDK5 および GSK-3 β が関与していると報告されている(62, 63)。しかし、今回の研究では、PACAP38 による神経突起伸長効果は、GSK-3 β と Rho/ROCK の抑制による CRMP2 の脱リン酸化によってさらに促進されるが、CDK5 阻害によって PACAP38 による神経突起伸長効果は抑制されることが示された。CDK5 は CRMP2 の Ser-522 のリン酸化に関与するとされているが、PC12 細胞において CDK5 を阻害しても二次元電気泳動による Ser-522 のスポットは減少せず、Thr-514 のスポット 3 のリン酸化とスポット 4 のリン酸化が増加した。CDK5 の阻害は、Ser-9 脱リン酸化と GSK-3 β の *in vivo* 活性化に寄与している(76, 77)。CDK5 活性は、軸索および神経突起の成長にも関連していることが知られている(78)。さらに、CDK5 遺伝子欠損マウスは、軸索伸長に異常を示すことが報告されている(79, 80)。これらの研究から、CDK5 阻害による GSK-3 β 活性化と Thr-514 リン酸化 CRMP2 の増加は、PACAP38 による神経突起伸長作用にも重要である可能性が示唆された。

本研究の結果から PACAP38 が、PAC₁-R を介して、PI3K/AKT 経路、AC/cAMP 経路および PLC/PKC 経路から GSK-3 β に作用することで CRMP2 の脱リン酸化を促進することで神経

突起伸長作用を示すことが明らかになった。また、PACAP38 は、GSK-3 β 以外にも RhoA/ROCK 経路や CDK5 が CRMP2 のリン酸化に関与することで PC12 細胞における神経突起伸長を調節することが明らかになった (Fig. 15)。我々は、さらなる研究の必要性を認識し、現在、DNA マイクロアレイとショットガン (LC-MS/MS) プロテオミクス分析を使用して、PACAP38 による CRMP2 媒介性神経突起伸長の分子メカニズムをさらに詳しく研究しており、PACAP38 による PC12 細胞の神経突起伸長機構についての全容解明を目指している。将来、神経損傷による軸索伸長の予防や治療法の開発につながり、神経再生・新生の創薬展開ができるのではないかと考えている。

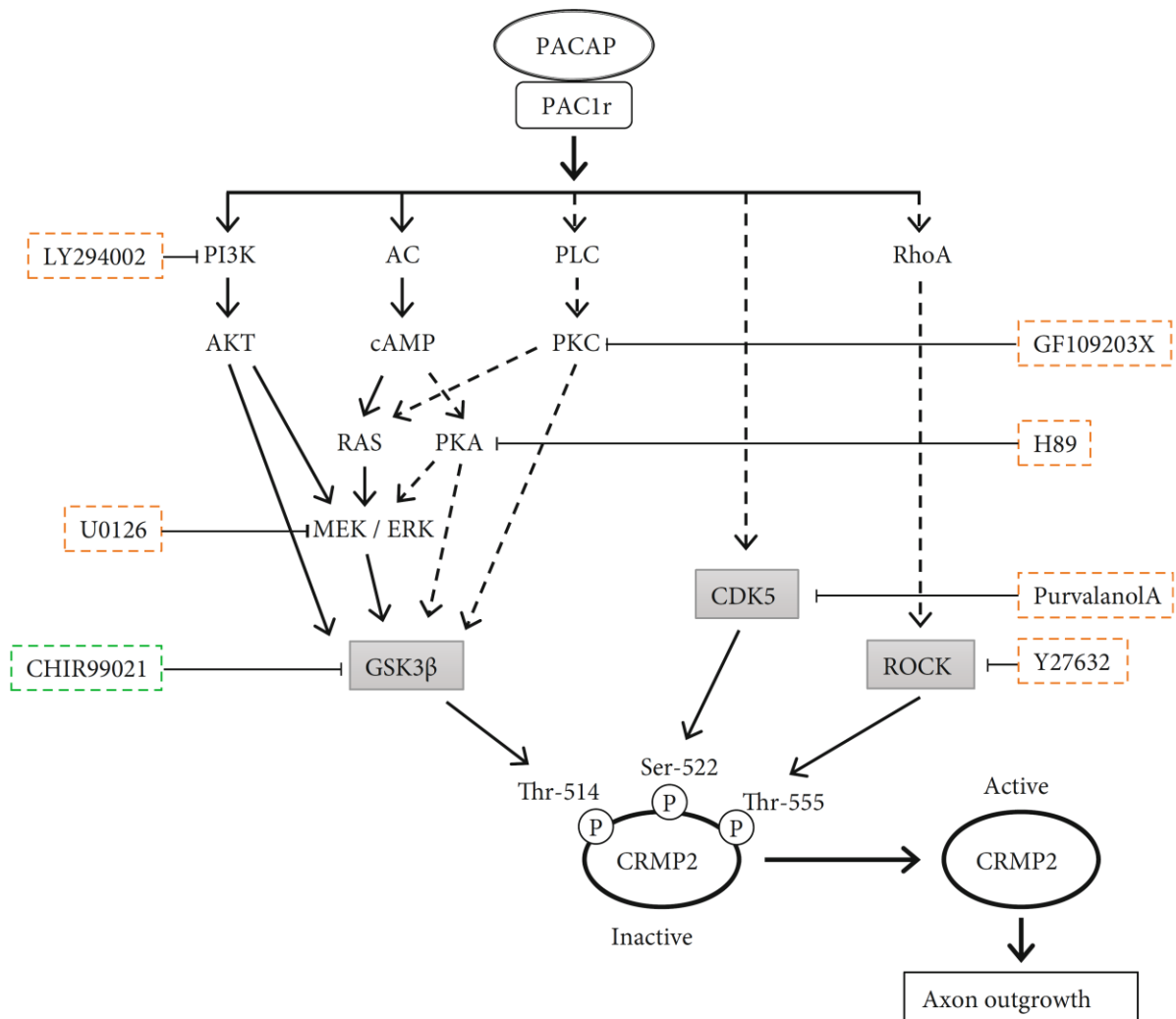


Fig. 15. Pathways involved in the protrusion extension induced by PACAP38 in PC12 cells.

→: pathways involved in process extension by PACAP

⇨: pathways that are less involved in PACAP-induced protrusion extension.

総括

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は、外分泌促進や神経再生などの様々な作用を持つことが報告されてきた。しかし、これらの作用の細胞内シグナル伝達機構を明らかにした研究は少なく、そのほとんどは明らかになっていない。

第一章では、不死化ヒト汗腺細胞 (NCL-SG3 細胞) を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定と細胞内 AQP5 局在観察にて解析を行った。その結果、PACAP38 は NCL-SG3 細胞の $\text{PAC}_1\text{-R}$ を活性化することで細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる作用が認められた。さらに PACAP38 添加により細胞質内に小胞として存在した AQP5 が一過性に細胞膜へ移行することが明らかになった。これらのことから、PACAP38 は汗腺において、 $\text{PAC}_1\text{-R}$ を介して細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させることで、AQP5 の膜移行を促進し汗分泌量を増加させること考えられる。

第二章では、神経系細胞であるラット副腎褐色細胞腫 (PC12 細胞) を用いて、PACAP38 の神経突起伸長作用のメカニズムについての解析を行った。PACAP38 による PC12 細胞の突起伸長作用は $\text{PAC}_1\text{-R}$ を介することで亢進されることが明らかになった。また、PACAP38 添加により発生した細胞突起は $\alpha\text{-Tubulin}$ と NeuN の発現から神経突起であることが考えられる。また、PI3K/AKT 経路の阻害薬である LY294002 を添加すると PACAP38 添加による神経突起の伸長作用を抑制することが明らかになり、GSK-3 β の阻害薬を使用することで PACAP38 による神経突起伸長作用の増強が確認された。また、PI3K/AKT 経路以外の GSK-3 β 抑制機構の阻害薬では PACAP38 による突起伸長作用を完全には阻害できなかった。GSK-3 β 以外の CRMP2 調節機構である RhoA/ROCK では PACAP38 の伸長作用を増大させた。一方、CDK5 の阻害薬では PACAP38 の作用をわずかに減弱させた。CRMP2 のリン酸化と活性化の関係は本研究では明らかにできなかった。しかし、PACAP38 が $\text{PAC}_1\text{-R}$ を介し、PI3K/AKT 経路を経

て GSK-3 β を抑制することで、CRMP2 の脱リン酸化が亢進し神経突起の伸長が促進されることが明らかになった。

これらの結果から、PACAP38 は外分泌腺や神経組織において種々の機能を持つことが明らかになった。汗腺において汗分泌機構に関与することが明らかになり、汗分泌量の減少は皮膚が乾燥した状態が続く皮膚乾燥症となり、かゆみを伴う炎症や皮膚のバリア機能の低下など様々な症状が現れ、最終的には体温調節ができなくなるドライスキン症候群に関与している。今後、PACAP による汗分泌促進機構の詳細が解明され、投与量や投与方法などを検討するなどのトランスレーショナルな研究を進めることにより、ドライスキンを始めとした多くの乾燥症疾患の予防・治療の創薬に繋がると考える。また、神経細胞においても PACAP38 の CRMP2 のリン酸化阻害効果による神経突起伸長作用は、脊椎損傷や脳梗塞による脳虚血後の神経再生に効果的であると考えられる。近年、CRMP2 リン酸化の阻害は、アルツハイマー病、脊髄損傷、筋萎縮性側索硬化症、視神経損傷などのさまざまな疾患に有効であることが報告されている(74, 81-83)。CRMP2 のリン酸化を阻止する PACAP の研究は、神経再生・新生についての新たな治療・改善薬の開発に繋がり、新薬開発への道が開かれる可能性が考えられる。

結論

不死化ヒト汗腺細胞において PACAP38 は PAC₁-R を介し細胞内 Ca²⁺濃度上昇を経て AQP5 を細胞膜へ移行することを明らかにした。

PC12 細胞において PACAP38 が PAC₁-R を活性化することで、PI3K/AKT 経路を介し GSK-3 β を抑制することで CRMP2 の脱リン酸化を促進し神経突起伸長を示すことを明らかにした。

謝辞

本研究に際し、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました、星薬科大学大学院 運動科学 竹ノ谷 文子 准教授に謹んで心より感謝いたしますと共に、謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、終始懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、星薬科大学大学院 分子生物学 千葉義彦 教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、数々のご協力を頂きました、湘南医療大学 薬学部 塩田清二 教授、平林敬浩 研究員、柴藤淳子 研究員、木村愛 研究員、筑波大学 体育系 Rakwal Randeep 教授、富山大学 学術研究部工学系 高崎一朗 准教授に厚く御礼申し上げます。

また、不死化ヒト汗腺細胞を提供いただいた、アイルランド王立大学 外科学 Brian J. Harvey 教授、共焦点レーザー顕微鏡による撮影にご助力いただきました株式会社ニコン 武部明 様にも厚く御礼申し上げます。

本研究に際しご協力いただきました星薬科大学 運動科学研究室の皆様には大変お世話になり、深く感謝申し上げます。

最後に、研究生活から学校生活に至るまで、あらゆる支援をしていただきました両親、そしてこれまで私を支えていただきました、数多くの先輩、友人、後輩、全ての方々に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., Coy, D.H. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun.*164(1),567(1989).
- 2) Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N., Arimura, A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun.*170(2),643(1990).
- 3) Arimura, A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol.*48(5),301(1998).
- 4) Farkas, O., Tamas, A., Zsombok, A., Reglodi, D., Pal, J., Buki, A., Lengvari, I., Povlishock, J.T., Doczi, T. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. *Regul Pept.*123(1-3),69(2004).
- 5) Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Shioda, S. Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci.*36(1-3),16(2008).
- 6) Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K., Hashimoto, H., Galas, L., Vaudry, H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev.*61(3),283(2009).
- 7) Tsuchikawa, D., Nakamachi, T., Tsuchida, M., Wada, Y., Hori, M., Farkas, J., Yoshikawa, A., Kagami, N., Imai, N., Shintani, N., Hashimoto, H., Atsumi, T., Shioda, S. Neuroprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating

- polypeptide on spinal cord injury. *J Mol Neurosci*.48(3),508(2012).
- 8) Nakamachi, T., Farkas, J., Watanabe, J., Ohtaki, H., Dohi, K., Arata, S., Shioda, S. Role of PACAP in neural stem/progenitor cell and astrocyte: from neural development to neural repair. *Curr Pharm Des*.17(10),973(2011).
 - 9) Matoba, Y., Nonaka, N., Takagi, Y., Imamura, E., Narukawa, M., Nakamachi, T., Shioda, S., Banks, W.A., Nakamura, M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhances saliva secretion via direct binding to PACAP receptors of major salivary glands in mice. *Anat Rec (Hoboken)*.299(9),1293(2016).
 - 10) Nakamachi, T., Ohtaki, H., Seki, T., Yofu, S., Kagami, N., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., Mark, L., Lanekoff, I., Kiss, P., Farkas, J., Reglodi, D., Shioda, S. PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. *Nat Commun*.(7)12034(2016).
 - 11) Sasaki, S., Watanabe, J., Ohtaki, H., Matsumoto, M., Murai, N., Nakamachi, T., Hannibal, J., Fahrenkrug, J., Hashimoto, H., Watanabe, H., Sueki, H., Honda, K., Miyazaki, A., Shioda, S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion. *Br J Dermatol*.176(2),413(2017).
 - 12) Matsumoto, M., Nakamachi, T., Watanabe, J., Sugiyama, K., Ohtaki, H., Murai, N., Sasaki, S., Xu, Z., Hashimoto, H., Seki, T., Miyazaki, A., Shioda, S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is involved in adult mouse hippocampal neurogenesis after stroke. *J Mol Neurosci*.59(2),270(2016).
 - 13) Tsuchida, M., Nakamachi, T., Sugiyama, K., Tsuchikawa, D., Watanabe, J., Hori, M., Yoshikawa, A., Imai, N., Kagami, N., Matkovits, A., Atsumi, T., Shioda, S. PACAP stimulates functional recovery after spinal cord injury through axonal regeneration. *J*

- Mol Neurosci.54(3),380(2014).
- 14) Ravni, A., Bourgault, S., Lebon, A., Chan, P., Galas, L., Fournier, A., Vaudry, H., Gonzalez, B., Eiden, L.E., Vaudry, D. The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. J Neurochem.98(2),321(2006).
 - 15) Lee, C.M., Dessi, J. NCL-SG3: a human eccrine sweat gland cell line that retains the capacity for transepithelial ion transport. J Cell Sci.92,241(1989).
 - 16) Robberecht, P., Gourlet, P., De Neef, P., Woussen-Colle, M., C., Vandermeers-Piret, M., C., Vandermeers, A., Christophe, J. Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. Eur J Biochem.207(1),239(1992).
 - 17) Fishbeind, V., A., Coy, H., Hocart, S., J., Jiang, N.-Y., Mrozinski, J., E. Jr, Mantey, S., A., Jensen, R., T. A chimeric VIP-PACAP analogue but not VIP pseudopeptides function as VIP receptor antagonists. Peptides.15(1),95(1994).
 - 18) Takasaki, I., Watanabe, A., Yokai, M., Watanabe, Y., Hayakawa, D., Nagashima, R., Fukuchi, M., Okada, T., Toyooka, N., Miyata, A., Gouda, H., Kurihara, T. In silico screening identified novel small-molecule antagonists of PAC1 receptor. J Pharmacol Exp Ther.365(1),1(2018).
 - 19) Kitchen, P., Oberg, F., Sjöhamn, J., Hedfalk, K., Bill, R.M., Conner, A.C., Conner, M.T., Tornroth-Horsefield, S. Plasma membrane abundance of human aquaporin 5 is dynamically regulated by multiple pathways. PLoS One.10(11),e0143027(2015).
 - 20) Sato, K., Kang, W., H., Saga, K., Sato, K., T. Biology of sweat glands and their

- disorders. I. Normal sweat gland function. *J Am Acad Dermatol.*20(4),537(1989).
- 21) Lofgren, S.M., Warshaw, E.M. Dyshidrosis: epidemiology, clinical characteristics, and therapy. *Dermatitis.*17(4),165(2006).
- 22) Suma, A., Murota, H., Kitaba, S., Yamaoka, T., Kato, K., Matsui, S., Takahashi, A., Yokomi, A., Katayama, I. Idiopathic pure sudomotor failure responding to oral antihistamine with sweating activities. *Acta Derm Venereol.*94(6),723(2014).
- 23) Sato, K., Kang, W., H., Saga, K., Sato, K., T. Biology of sweat glands and their disorders. II. Disorders of sweat gland function. *J Am Acad Dermatol.*20(1),713(1989).
- 24) Naumann, M., Hofmann, U., Bergmann, I., Hamm, H., Toyka, V., K., Reiners, K. Focal hyperhidrosis: Effective treatment with intracutaneous botulinum toxin. *Arch Dermatol.*134(3),301(1998).
- 25) Baumgartner, F.J., Bertin, S., Konecny, J. Superiority of thoracoscopic sympathectomy over medical management for the palmoplantar subset of severe hyperhidrosis. *Ann Vasc Surg.*23(1),1(2009).
- 26) Hornberger, J., Grimes, K., Naumann, M., Glaser, D.A., Lowe, N.J., Naver, H., Ahn, S., Stolman, L.P. Recognition, diagnosis, and treatment of primary focal hyperhidrosis. *J Am Acad Dermatol.*51(2),274(2004).
- 27) Doolabh, N., Horswell, S., Williams, M., Huber, L., Prince, S., Meyer, D.M., Mack, M.J. Thoracoscopic sympathectomy for hyperhidrosis: indications and results. *Ann Thorac Surg.*77(2),410; discussion 4(2004).
- 28) Shimizu, H., Tamada, Y., Shimizu, J., Ohshima, Y., Matsumoto, Y., Sugeno, J. Effectiveness of iontophoresis with alternating current (AC) in the treatment of patients

- with palmoplantar hyperhidrosis. *J Dermatol.*30(6),444(2003).
- 29) Hu, Y., Converse, C., Lyons, M.C., Hsu, W.H. Neural control of sweat secretion: a review. *Br J Dermatol.*178(6),1246(2018).
- 30) Inoue, R., Sohara, E., Rai, T., Satoh, T., Yokozeki, H., Sasaki, S., Uchida, S. Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. *J Dermatol Sci.*70(1),26(2013).
- 31) Sato, K., Sato, F. Effect of VIP on sweat secretion and cAMP accumulation in isolated simian eccrine glands. *Am J Physiol.*253(2),935(1987).
- 32) Klar, J., Hisatsune, C., Baig, S.M., Tariq, M., Johansson, A.C., Rasool, M., Malik, N.A., Ameer, A., Sugiura, K., Feuk, L., Mikoshiba, K., Dahl, N. Abolished InsP3R2 function inhibits sweat secretion in both humans and mice. *J Clin Invest.*124(11),4773(2014).
- 33) Sato, K., Sato, F. Role of calcium in cholinergic and adrenergic mechanisms of eccrine sweat secretion. *Am J Physiol.*241(3),C113(1981).
- 34) Ring, A., Mork, A.C., Roomans, G.M. Calcium-activated chloride fluxes in cultured NCL-SG3 sweat gland cells. *Cell Biol Int.*19(4),265(1995).
- 35) Prakriya, M., Lewis, R.S. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.*95(4),1383(2015).
- 36) Alzayady, K.J., Wang, L., Chandrasekhar, R., Wagner, L.E. 2nd, Van Petegem, F., Yule, D.I. Defining the stoichiometry of inositol 1,4,5-trisphosphate binding required to initiate Ca²⁺ release. *Sci Signal.*9(422),ra35(2016).
- 37) Feske, S. CRAC channelopathies. *Pflugers Arch.*460(2),417(2010).
- 38) Ertongur-Fauth, T., Hochheimer, A., Buescher, J.M., Rapprich, S., Krohn, M. A novel

- TMEM16A splice variant lacking the dimerization domain contributes to calcium-activated chloride secretion in human sweat gland epithelial cells. *Exp Dermatol.*23(11),825(2014).
- 39) Servetnyk, Z., Roomans, G.M. Chloride transport in NCL-SG3 sweat gland cells: channels involved. *Exp Mol Pathol.*83(1),47(2007).
- 40) Concepcion, A.R., Vaeth, M., Wagner, L.E., 2nd, Eckstein, M., Hecht, L., Yang, J., Crottes, D., Seidl, M., Shin, H.P., Weidinger, C., Cameron, S., Turvey, S.E., Issekutz, T., Meyts, I., Lacruz, R.S., Cuk, M., Yule, D.I., Feske, S. Store-operated Ca²⁺ entry regulates Ca²⁺-activated chloride channels and eccrine sweat gland function. *J Clin Invest.*126(11),4303(2016).
- 41) Direito, I., Madeira, A., Brito, M.A., Soveral, G. Aquaporin-5: from structure to function and dysfunction in cancer. *Cell Mol Life Sci.*73(8),1623(2016).
- 42) Verkman, A.S., Mitra, A.K. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol.*278(1),F13(2000).
- 43) Inoue, R. New findings on the mechanism of perspiration including aquaporin-5 water channel. *Curr Probl Dermatol.*51,11(2016).
- 44) Nejsum, L.N., Kwon, T.H., Jensen, U.B., Fumagalli, O., Frokiaer, J., Krane, C.M., Menon, A.G., King, L.S., Agre, P.C., Nielsen, S. Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands. *Proc Natl Acad Sci U S A.*99(1),511(2002).
- 45) Ishikawa, Y., Yuan, Z., Inoue, N., Skowronski, M.T., Nakae, Y., Shono, M., Cho, G., Yasui, M., Agre, P., Nielsen, S. Identification of AQP5 in lipid rafts and its translocation to apical membranes by activation of M3 mAChRs in interlobular ducts of

- rat parotid gland. *Am J Physiol Cell Physiol.*289(5),C1303(2005).
- 46) Ishikawa, Y., Cho, G., Yuan, Z., Inoue, N., Nakae, Y. Aquaporin-5 water channel in lipid rafts of rat parotid glands. *Biochim Biophys Acta.*1758(8),1053(2006).
- 47) Ishikawa, Y., Eguchi, T., Skowronski, M.T., Ishida, H. Acetylcholine acts on M3 muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin5 water channel via cytosolic Ca²⁺ elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun.*245(3),835(1998).
- 48) Hori, M., Nakamachi, T., Shibato, J., Rakwal, R., Tsuchida, M., Shioda, S., Numazawa, S. PACAP38 differentially effects genes and CRMP2 protein expression in ischemic core and penumbra regions of permanent middle cerebral artery occlusion model mice brain. *Int J Mol Sci.*15(9),17014(2014).
- 49) Hori, M., Nakamachi, T., Rakwal, R., Shibato, J., Ogawa, T., Aiuchi, T., Tsuruyama, T., Tamaki, K., Shioda, S. Transcriptomics and proteomics analyses of the PACAP38 influenced ischemic brain in permanent middle cerebral artery occlusion model mice. *J Neuroinflammation.*9,256(2012).
- 50) Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., Strittmatter, S.M. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature.*376(6540),509(1995).
- 51) Wang, L.H., Strittmatter, S.M. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci.*16(19),6197(1996).
- 52) Quinn, C.C., Gray, G.E., Hockfield, S. A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *J Neurobiol.*41(1),158(1999).

- 53) Gu, Y., Ihara, Y. Evidence that collapsin response mediator protein-2 is involved in the dynamics of microtubules. *J Biol Chem.*275(24),17917(2000).
- 54) Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., Kaibuchi, K. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci.*4(8),781(2001).
- 55) Arimura, N., Menager, C., Fukata, Y., Kaibuchi, K. Role of CRMP-2 in neuronal polarity. *J Neurobiol.*58(1),34(2004).
- 56) Chung, M.A., Lee, J.E., Lee, J.Y., Ko, M.J., Lee, S.T., Kim, H.J. Alteration of collapsin response mediator protein-2 expression in focal ischemic rat brain. *Neuroreport.*16(15),1647(2005).
- 57) Zhang, Z., Ottens, A.K., Sadasivan, S., Kobeissy, F.H., Fang, T., Hayes, R.L., Wang, K.K. Calpain-mediated collapsin response mediator protein-1, -2, and -4 proteolysis after neurotoxic and traumatic brain injury. *J Neurotrauma.*24(3),460(2007).
- 58) Uchida, Y., Ohshima, T., Yamashita, N., Ogawara, M., Sasaki, Y., Nakamura, F., Goshima, Y. Semaphorin3A signaling mediated by Fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 at tyrosine 32. *J Biol Chem.*284(40),27393(2009).
- 59) Gellert, M., Venz, S., Mitlohner, J., Cott, C., Hanschmann, E.M., Lillig, C.H. Identification of a dithiol-disulfide switch in collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) that is toggled in a model of neuronal differentiation. *J Biol Chem.*288(49),35117(2013).
- 60) Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., Kaibuchi, K. GSK-

- 3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity.
Cell.120(1),137(2005).
- 61) Zhang, W., Smith, A., Liu, J.P., Cheung, N.S., Zhou, S., Liu, K., Li, Q.T., Duan, W.
GSK3beta modulates PACAP-induced neuritogenesis in PC12 cells by acting
downstream of Rap1 in a caveolae-dependent manner. Cell Signal.21(2),237(2009).
- 62) Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Menager, C., Nakamura, N., Amano, M.,
Iwamatsu, A., Goshima, Y., Kaibuchi, K. Phosphorylation of collapsin response
mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for
growth cone collapse. J Biol Chem.275(31),23973(2000).
- 63) Cole, A.R., Causeret, F., Yadirgi, G., Hastie, C.J., McLauchlan, H., McManus, E.J.,
Hernandez, F., Eickholt, B.J., Nikolic, M., Sutherland, C. Distinct priming kinases
contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen
synthase kinase-3 in vivo. J Biol Chem.281(24),16591(2006).
- 64) Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A.,
Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., Morone, N., Usukura, J., Kaibuchi, K.
Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. Mol Cell
Biol.25(22),9973(2005).
- 65) Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F.,
Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., Kolattukudy, P., Honnorat, J., Goshima, Y.
Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta
phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism
underlying axon guidance and Alzheimer's disease. Genes Cells.10(2),165(2005).

- 66) Greene, L.A., Tischler, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*.73(7),2424(1976).
- 67) Manecka, D.-L., Boukhzar, L., Falluel-Morel, A., Lihrmann, I., Anouar, Y. In: Reglodi D, and Tamas A eds. *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*. Cham: Springer International Publishing; 2016:549.
- 68) Juhaszova, M., Zorov, D.B., Yaniv, Y., Nuss, H.B., Wang, S., Sollott, S.J. Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection. *Circ Res*.104(11),1240(2009).
- 69) Duda, P., Hajka, D., Wojcicka, O., Rakus, D., Gizak, A. GSK3beta: A master player in depressive disorder pathogenesis and treatment responsiveness. *Cells*.9(3),727(2020).
- 70) Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi, R.Z., Leung, T., Lim, L., Hall, C. Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J Neurosci*.24(41),8994(2004).
- 71) Sun, Y., Lim, Y., Li, F., Liu, S., Lu, J.J., Haberberger, R., Zhong, J.H., Zhou, X.F. ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA. *PLoS One*.7(4),e35883(2012).
- 72) Mimura, F., Yamagishi, S., Arimura, N., Fujitani, M., Kubo, T., Kaibuchi, K., Yamashita, T. Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*.281(23),15970(2006).
- 73) Jin, X., Sasamoto, K., Nagai, J., Yamazaki, Y., Saito, K., Goshima, Y., Inoue, T., Ohshima, T. Phosphorylation of CRMP2 by Cdk5 regulates dendritic spine development

- of cortical neuron in the mouse hippocampus. *Neural Plast.*2016,6790743(2016).
- 74) Kondo, S., Takahashi, K., Kinoshita, Y., Nagai, J., Wakatsuki, S., Araki, T., Goshima, Y., Ohshima, T. Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation at serine 522 promotes axonal regeneration after optic nerve injury. *Sci Rep.*9(1),7188(2019).
- 75) Ng, T., Ryu, J.R., Sohn, J.H., Tan, T., Song, H., Ming, G.L., Goh, E.L. Class 3 semaphorin mediates dendrite growth in adult newborn neurons through Cdk5/FAK pathway. *PLoS One.*8(6),e65572(2013).
- 76) Morfini, G., Szebenyi, G., Brown, H., Pant, H.C., Pigino, G., DeBoer, S., Beffert, U., Brady, S.T. A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J.*23(11),2235(2004).
- 77) Fang, W.Q., Ip, J.P., Li, R., Ng, Y.P., Lin, S.C., Chen, Y., Fu, A.K., Ip, N.Y. Cdk5-mediated phosphorylation of axin directs axon formation during cerebral cortex development. *J Neurosci.*31(38),13613(2011).
- 78) Fu, W.Y., Wang, J.H., Ip, N.Y. Expression of Cdk5 and its activators in NT2 cells during neuronal differentiation. *J Neurochem.*81(3),646(2002).
- 79) Paglini, G., Caceres, A. The role of the Cdk5--p35 kinase in neuronal development. *Eur J Biochem.*268(6),1528(2001).
- 80) Smith, D.S., Tsai, L.H. Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport? *Trends Cell Biol.*12(1),28(2002).
- 81) Williamson, R., van Aalten, L., Mann, D.M., Platt, B., Plattner, F., Bedford, L., Mayer, J., Howlett, D., Usardi, A., Sutherland, C., Cole, A.R. CRMP2 hyperphosphorylation is characteristic of Alzheimer's disease and not a feature common to other

- neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.*27(3),615(2011).
- 82) Nagai, J., Owada, K., Kitamura, Y., Goshima, Y., Ohshima, T. Inhibition of CRMP2 phosphorylation repairs CNS by regulating neurotrophic and inhibitory responses. *Exp Neurol.*277,283(2016).
- 83) Numata-Uematsu, Y., Wakatsuki, S., Nagano, S., Shibata, M., Sakai, K., Ichinohe, N., Mikoshiba, K., Ohshima, T., Yamashita, N., Goshima, Y., Araki, T. Inhibition of collapsin response mediator protein-2 phosphorylation ameliorates motor phenotype of ALS model mice expressing SOD1G93A. *Neurosci Res.*139,63(2019).