

## 論文内容の要旨

Role of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in intracellular calcium dynamics of neurons and satellite cells in rat superior cervical ganglia

ラット上頸神経節における脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド受容体の発現  
及び反応機構の解明

(Biomedical Research 第 38 巻、第 2 号、平成 29 年 4 月 掲載予定)

いそべ かなこ  
磯部 可奈子

### I. 研究目的

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide : PACAP) には 38 アミノ酸からなる PACAP38 と、その N 末の 27 アミノ酸からなる PACAP27 の 2 種類がある。現在、ホルモン作用の他に、神経伝達物質・調節因子としても働いていると考えられ、中枢神経系においては神経保護作用が報告されている。しかしながら、自律神経系、特に交感神経節に対する研究はほとんどない。交感神経節である上頸神経節(SCG)は、歯科麻酔領域においても疼痛治療の際の標的器官であり、上頸神経節において PACAP の反応性を解明することはきわめて臨床的意義が大きいと考えられる。本研究では、ラット SCG での PACAP 受容体の発現の有無、及び、その反応機構を細胞内  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 変動を指標とし検討することを目的とした。

### II. 研究方法

雄ラット (Wistar 8-12W) を炭酸ガスにて屠殺し、SCG を摘出した。標本を 3~4 分割し、純化コラゲナーゼ 100 U/ml と  $Ca^{2+}$  指示薬 Indo-1/AM  $10 \mu M$  存在下で  $37^\circ C$ 、1 時間反応させた。その後、標本をカバーガラスに固着させ、リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) を用い画像解析を行った。受容体の発現については、 $Ca^{2+}$  指示薬付加前の検体から mRNA を採取し、RT-PCR を行った。また、免疫組織化学法を用いて受容体の局在を確認した。

### III. 研究成績

RT-PCR の結果から、SCG に PACAP の 3 種の受容体 (PAC1、VPAC 1、VPAC2) が発現している事が確認され、このうち PAC1 が優位であった。画像解析では、PACAP38 投与によって最初に衛星細胞、次いで神経細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇することが確認された。これは電子顕微鏡的解析により、神経細胞が密に衛星細胞によって取り囲まれているためではないかと考えられた。細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入を除いた状態では、衛星細胞の反応はほとんど阻害されず、神経細胞は部分的に阻害された。これにより、衛星細胞では細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  動員が優位に働く事が示唆された。これに対し、神経細胞には何らかの  $Ca^{2+}$  流入機構が存在する事が示唆された。細胞内ストアを枯渇させる事で、衛星細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が完全阻害されることから、衛星細胞は  $IP_3$  依存的な経路が優位に働いている可能性が高い。PKA を抑制すると衛星細胞はわずかに反応が阻害されたが、神経細胞は反応が阻害されなかった。VIP と PAC1/VPAC2 アゴニストをそれぞれ SCG に作用させると、衛星細胞のみ反応を認めた。免疫組織化学法では PAC1 受容体の発現を認めた。

#### IV. 考察及び結論

SCG での PACAP38 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$  上昇機構において、衛星細胞と神経細胞の双方で IP3 系が主に働いている事が示唆された。衛星細胞は cAMP 系も協調して働いている事が考えられ、神経細胞では cAMP 依存的な  $Ca^{2+}$  流入経路の存在が示唆された。免疫組織化学法では PAC1 受容体のみの発現を認めたが、これは他の報告でも同様であった。RT-PCR の結果から、3 種の受容体が存在することを確認し、免疫組織化学法による受容体の直接証明はできなかったが、今回の全ての結果をふまえると SCG で PAC1、VPAC1、VPAC2 すべての受容体が存在し衛星細胞と神経細胞でその分布が異なる可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

#### 論文審査担当者

主査 教授 田中 光郎 (口腔保健育成学講座 小児歯科学・障害者歯科学分野)  
副査 教授 齋野 朝幸 (解剖学講座 細胞生物学分野)  
副査 准教授 久慈 昭慶 (口腔保健育成学講座 小児歯科学・障害者歯科学分野)

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP) は 38 アミノ酸からなる PACAP38 とその N 末の 27 アミノ酸からなる PACAP27 の 2 種類がある。PACAP は神経系に於いて様々な効果を発揮しており、ホルモン作用、神経伝達物質・調節因子としての作用、中枢神経系においては神経保護作用などが報告されている。一方、自律神経系、特に交感神経節に対する研究はほとんどなされておらず、歯科の疼痛治療の標的器官である上頸神経節(SCG)に於ける PACAP 受容体の発現の有無、及びその反応機構を解明することは意義のあることと考えられる。

本研究ではラットを用いて、SCG での PACAP 受容体の発現の有無、およびその反応機構を細胞内  $Ca^{2+}$  の変動を指標として、様々な角度から詳細に検討した。その結果、SCG での PACAP38 誘発性の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇機構において、衛星細胞と神経細胞の双方で IP3 系が主に作用している事が示唆された。衛星細胞では cAMP 系も協調して作用しているものと考えられ、神経細胞では cAMP 依存的な  $Ca^{2+}$  流入経路の存在が示唆された。また、RT-PCR の結果から SCG には PACAP の 3 つの受容体がすべて存在するが、衛星細胞と神経細胞とでその分布が異なることが示唆された。

### 試験・試問結果の要旨

本研究の概要説明の後、神経細胞と衛星細胞の相互関連性、PACAP 受容体が 3 つあることの意義、IP3 系、cAMP 系の  $Ca^{2+}$  流入経路の持つ意義などについて質問したが、的確な回答が得られた。また、今後の研究の方向性についても抱負が述べられ、今後、障害者歯科学の研究者、指導者としての活躍が期待できると思われ、学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと判定した。

#### 参考論文

1. 簡易呼吸陽圧発生装置が自発呼吸に及ぼす 岩手医科大学歯学雑誌 平成 27 年 1 月  
影響—呼吸力学パラメータによる分析— 第 39 巻 3 号  
(久慈 昭慶 他 9 名と共著) 98 頁～105 頁

2. P2Y purinoceptors mediate ATP-induced Biomedical Research 平成 28 年 2 月  
changes in intracellular calcium and amylase 第 37 卷 1 号  
release in acinar cells of mouse parotid 37 頁～49 頁  
glands  
(Kasumi MORIGUCHI-MORI 他 7 名と共著)