

論 文 要 旨

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is regulated by alternative splicing of transcriptional repressor REST/NRSF in nerve injury

(PACAP は神経障害時に転写抑制因子 REST/NRSF の
選択的スプライシングによって調節される)

関西医科大学心療内科学講座
(指導： 福 永 幹 彦 教授)
首 藤 由 江

【はじめに】

神経障害性疼痛は治療抵抗性で難治性の疼痛である。その発症機構に関しては既に多くの報告があるが、依然不明な点が多い。これまでに、神経ペプチド Pituitary adenylyl-cyclase activating peptide (PACAP) が神経損傷時に後根神経節 (DRG) にて高発現し、脊髄において神経障害性疼痛の発症と維持に関与していることが報告されている。その他の報告からも PACAP は神経障害性疼痛を構成する重要な因子の1つであることが考えられている。PACAP 遺伝子の発現については、神経特異的転写抑制因子 RE1-silencing transcription factor (REST/NRSF) によって発現が調節されているとの報告や、また *in vitro* において REST/NRSF が PACAP 遺伝子のプロモーター領域上流にある2か所の結合部位 (NRSLE-1, NRSLE-2) を介して転写調節を行っている報告がある。しかしながら、神経損傷時における PACAP 遺伝子の発現調節機構に関しては明らかとなっていなかった。

【研究目的】

神経損傷時における PACAP 遺伝子の発現メカニズムを明らかにするため、REST/NRSF に着目して解析を行った。

【研究方法】

- ① 神経障害性疼痛モデルマウス (L5-SNT) は、既報に従い作製した。慢性疼痛化と DRG での PACAP の高発現が既に確認されている術後7日目に患側の DRG を摘出し、DRG における PACAP、REST/NRSF、アイソフォーム REST4 遺伝子の発現解析をリアルタイム RT-PCR を用いて行った。さらに REST/NRSF から REST4 への選択的スプライシングに関与するタンパク質である nSR100 の遺伝子発現についても同様の解析を行った。
- ② PACAP を発現する神経細胞のモデルとして PC12 細胞を用い、これに REST/NRSF、REST4、nSR100 を強制発現させた。これらの細胞での PACAP 遺伝子の発現についてリアルタイム RT-PCR にて解析を行った。
- ③ REST/NRSF が PACAP 遺伝子上の RE1 を介して PACAP 発現に関与することを解析する目的で、報告のある2か所 (NRSLE-1、NRSLE-2) と *in silico* で推測された新規配列 (RE1-3) に関して、レポーター遺伝子を用いた解析とクロマチン免疫沈降法による解析を行った。
- ④ DRG において、正常時と神経損傷時における REST/NRSF と REST4 タンパク質の発現解析を免疫組織化学法にて行った。

【結果】

- ① L5-SNT モデルマウスの患側 L5-DRG では、PACAP の発現と共に、REST4

と nSR100 の発現が増加した。一方、REST/NRSF については変化を認めなかった。

- ② REST4 と nSR100 を PC12 細胞に強制発現させた場合、PACAP 遺伝子の発現は増加した。一方、REST/NRSF を強制発現させた場合は、PACAP の発現は変化しなかった。
- ③ レポーター遺伝子を用いた解析では、REST/NRSF は新規配列 (RE1-3) に結合し、PACAP 遺伝子の転写を抑制していた。またマウス DRG では正常時に同部位に REST/NRSF が結合し、L5-SNT ではその結合が低下した。
- ④ 神経損傷時では正常時に比べ、REST/NRSF と REST4 タンパク質の発現量の変化に明らかな差は認めないものの、いずれも核から細胞質への局在の変化を認めた。

【考察】

- ・ 神経損傷によって nSR100 の発現が上昇し、REST4 が発現する結果、REST/NRSF の機能が低下し、PACAP 発現が上昇することが示唆された。
- ・ REST/NRSF は、通常は PACAP 遺伝子上にある RE1-3 に結合して転写抑制をしているが、神経損傷時には結合が低下していることが示唆された。
- ・ REST4 は神経幹細胞から神経細胞へ分化する神経新生にかかわるタンパク質であり、PACAP が REST4 の発現に伴って発現していることから、PACAP は神経障害性疼痛における痛みの発症・維持因子であると同時に、神経再生のために発現している可能性が示唆された。