

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14335

研究課題名(和文) 成体神経新生を利用した脳血管障害の新規治療法の創出

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy for ischemic stroke based on understanding adult neurogenesis

研究代表者

坪井 昭夫 (Tsuboi, Akio)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20163868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、中大脳動脈閉塞手術を用いて脳梗塞モデルマウスを作製し、梗塞2時間後の大脳皮質における梗塞巣との境界領域で発現が変化する遺伝子を、RNAシーケンシングによりスクリーニングした。そして、梗塞巣の境界領域で発現が増加する27個の遺伝子をISHにより、絞り込んだ。これらの中でも、神経活動依存的な転写因子Npas4は大脳皮質における興奮性ニューロンで顕著に発現誘導され、梗塞巣の境界領域に沿うような発現パターンを示した。更に詳細に解析した結果、Npas4やその関連因子は、健常時のみならず障害時においても、ニューロンの発達や生存を促進することで、神経回路の再建に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We explored cerebral infarction using a model mouse with an operation of middle cerebral artery occlusion (MCAO) and screened the genes which expressions were altered between the normal and infarct sides in the cerebral cortex two hours after MCAO by RNA sequencing. We narrowed down 27 genes whose expressions were increased in the border of the infarct site compared with the control by ISH. Among these, the neural activity-dependent transcription factor Npas4 showed conspicuous expression in excitatory neurons of the cerebral cortex and the expression pattern that go along the border of the infarct site. Further analyses suggested that Npas4 and its regulating genes play crucial roles in rebuilding the neural circuitry via promoting the neuronal development and survival in the healthy and diseased brain, respectively.

研究分野：神経科学、分子生物学

キーワード：神経科学 脳・神経 脳神経疾患 再生医学 成体神経新生 脳梗塞モデルマウス ニューロン生存 神経回路形成

1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、海馬歯状回と側脳室の2ヶ所において例外的に、生涯を通して神経新生が生じていることが明らかにされた。匂いの情報を処理する嗅球の介在ニューロンは、側脳室で常時新生され、RMS (rostral migratory stream) を通って嗅球へ移動し、既存の神経回路に組み込まれている(図1)。

これまでの研究で、以下のことが明らかにされた。

- i) 影山龍一郎博士らは、嗅球の神経回路は、既存の古い介在ニューロンが新生されたものと置き換わることにより、再構築されていることを明らかにしたり。
- ii) 森 憲作博士らは、成体で新生される介在ニューロンの神経回路は、匂い経験に依存して再編されるという可塑性を持つことを明らかにした²⁾。
- iii) Timothy H. Murphy 博士らは、脳梗塞巣の周囲で生き残ったニューロンでは、樹状突起の形態がダイナミックに変化することを報告した³⁾。
- iv) 澤本和延博士らは、脳梗塞モデルマウスを用いた実験から、脳室周囲で生まれた新生ニューロンが、梗塞時には本来の目的地の嗅球ではなく、損傷部位に向けて血管に沿って移動し、そこでシナプスを形成して神経回路を修復する性質を持つことを報告した⁴⁾(図1)。

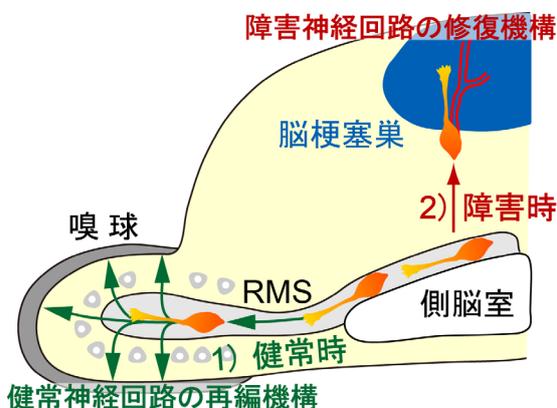


図1 新生ニューロンを用いた脳梗塞の治療法の開発
1) 健常脳の側脳室で新生されたニューロンは、rostral migratory stream (RMS) を通って前方へ移動して、嗅球の神経回路に編入される。2) 障害脳では、新生ニューロンの一部が血管に沿って梗塞巣へ移動して、神経回路を修復する性質を持つ。この際に内在性の修復機構を、人為的に活性化できれば、脳梗塞の新規治療法の開発につながる。

しかしながら、このような損傷部位への新生ニューロンの移動は限定的であり、神経回路に組み込まれて機能するはずのニューロンの数も不十分であるため、脳機能の回復には至っていない。

2. 研究の目的

脳血管障害は、本邦の死亡原因の4位となる極めて発生頻度の高い疾患であるが、虚血などにより脳組織が損傷した際に、失われた神経細胞や神経回路を修復するため

の有効な治療法は未だに確立されていない。

一方、匂いの情報処理を行う嗅球の介在ニューロンは、神経細胞としては例外的に、成体の脳においても常時新生され、既存の神経回路に組み込まれている。申請者らはこれまでに、嗅球における新生ニューロンの樹状突起の発達を神経活動依存的に制御する因子として、1回膜貫通型糖蛋白質5T4と転写因子Npas4を同定した⁵⁻⁷⁾(図2)。

本研究では、申請者らが見出した「健常脳での新生ニューロンによる神経回路の再編機構」を、「損傷脳における神経回路の修復機構」に応用することにより、脳梗塞に対する新規治療法の開発を目指した。

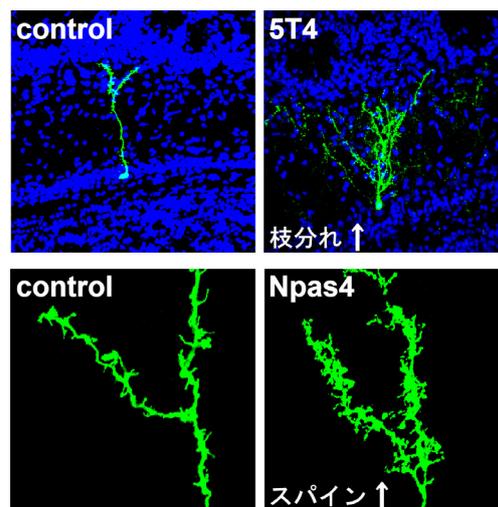


図2 5T4・Npas4 遺伝子の過剰発現による嗅球介在ニューロンの発達促進

5T4・Npas4 遺伝子をレンチウイルスを用いて、嗅球介在ニューロンで過剰発現させると、その樹状突起の枝分れやスパイン形成が促進される。

3. 研究の方法

- (1) 中大脳動脈閉塞 (MCAO: middle cerebral artery occlusion) の手術により、脳梗塞マウスを作製する(図3)。

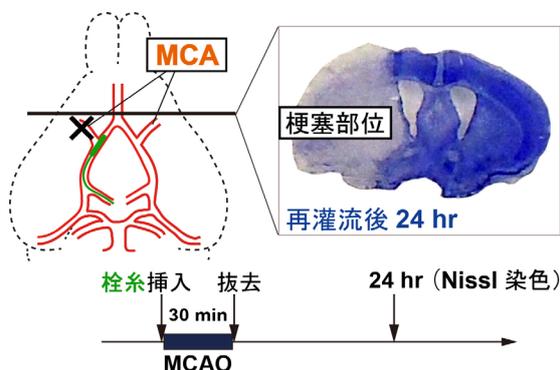


図3 脳梗塞モデルマウスの作製

中大脳動脈閉塞 (MCAO: middle cerebral artery occlusion) の方法を示す。マウスの頸部から栓糸(緑)を血管に挿入し、片側の中大脳動脈 (MCA) を30分間閉塞した後、栓糸を抜いて再灌流する。核および粗面小胞体を染めるNissl染色を行うと、再灌流24時間後のマウスでは、MCAの支配領域である線条体や大脳皮質の一部で、虚血により細胞が死滅することで、梗塞領域が白く抜ける。

- (2) MCAO 手術直後に、大脳皮質での梗塞巣の境界領域から RNA を調製して、RNA シークエンシング (RNA-Seq) 解析を行う。
- (3) *5T4* や *Npas4* 遺伝子などを予め導入することにより、MCAO 手術後のニューロンの生存や発達に対する効果を、個々のニューロンや神経回路のレベルで検討する。また、梗塞後の運動機能の回復に対する効果について、行動実験により個体レベルで解析する。

4. 研究成果

- (1) 研究協力者の藤岡は、ラットを用いて血管内栓子挿入法による虚血・再灌流 (MCAO) の手術を行い、脳梗塞を発症させ、MRI で撮像することで、同一個体の脳を経時的に評価することに成功している⁸⁾。そこで、申請者らは、MCAO の手術を繰返し行い、脳梗塞モデルマウスを作製することが可能になった。そこで次に、アデノ随伴ウイルスなどを用いて、*5T4*・*Npas4* などの新生ニューロンの発達促進分子を、脳梗塞マウスの側脳室や梗塞部位に遺伝子導入することで、神経回路の修復過程を解析して、脳梗塞治療法に応用する。
- (2) 申請者らは、MCAO 手術の 2 時間後に、大脳皮質での梗塞巣の境界領域から RNA を調製して、RNA-Seq 解析を行った。その結果、健常時に神経樹状突起のスパイン形成を促進する転写因子 *Npas4* が、梗塞側で一過性に発現することを見出した(未発表データ)。梗塞後の発現上昇は、*Npas4* が梗塞周囲におけるニューロンの生存や、神経回路の再編に関与することを強く示唆している。
- (3) 申請者らは最近、胎児の大脳皮質から初代培養したニューロンに虚血様の負荷をかけると、細胞死が顕著に増加することを見出した(未発表データ)。興味深いことに、初代培養ニューロンに虚血様の負荷をかけた際にも、上記の転写因子 *Npas4* が顕著に発現することを見出した(未発表データ)。そこで、初代培養ニューロンに *Npas4* を強制発現した後に、虚血様の負荷をかけると細胞死が減少し、逆に、*Npas4* をノックアウトした初代培養ニューロンに、虚血様の負荷をかけると細胞死がより増加することが分かった(未発表データ)。これらの結果は、*Npas4* は虚血時の神経細胞の生存に必須な因子であることを示唆している。

そこで、今後の研究では、脳梗塞モデルマウスを用いて、上述した現象が *in vivo* でも再現されるかどうかを検討する。再現性を確認できた場合には、*Npas4* は転写因子であるため、それが制御する下流の遺伝子を同定し、それが脳梗塞の予防・治療法の開発に役立つ可能性を検証する。

参考文献

1. Imayoshi, I. *et al.* : *Nat Neurosci* 11, 1153-61 (2008).
2. Yamaguchi, M. & Mori, K. : *PNAS* 102, 9697-9702 (2005).
3. Li, P. & Murphy, T.H. : *J Neurosci* 28, 11970-79 (2008).
4. Kojima, T. *et al.* : *Stem Cells* 28, 545-54 (2010).
5. Yoshihara, S. *et al.* : *J Neurosci* 32, 2217-26 (2012).
6. Yoshihara, S. *et al.* : *Cell Reports* 8, 843-57 (2014).
7. Takahashi, H. *et al.* : *J Neurosci* 36, 8210-27 (2016).
8. Fujioka, M. *et al.* : *Ann Neurol* 54, 732-47 (2003).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

(欧文論文、査読有)

- ① Takahashi H, Yoshihara S, Tsuboi A: The functional role of olfactory bulb granule cell subtypes derived from embryonic and postnatal neurogenesis. **Frontiers in Molecular Neuroscience** in press (2018).
- ② Takahashi H, Tsuboi A: Olfactory avoidance test (Mouse). **Bio-Protocol** 7: e2153 (2017).
- ③ Takahashi H, Tsuboi A: Olfactory habituation-dishabituation test (Mouse). **Bio-Protocol** 7: e2154 (2017).
- ④ Yoshihara S, Takahashi H, Tsuboi A: Molecular mechanisms regulating the dendritic development of newborn olfactory bulb interneurons in a sensory experience-dependent manner. **Frontiers in Neuroscience** 9: e514 (2016).
- ⑤ Muroi C, Kashiwagi Y, Rokugawa T, Tonomura M, Obata A, Nevzati E, Tsuboi A, Okuchi K, Mishima K, Abe K, Fujioka M: Evaluation of a filament perforation model for mouse subarachnoid hemorrhage using 7.0 Tesla MRI. **The Journal of Clinical Neuroscience** 28: 141-147 (2016).
- ⑥ Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itohara S, Kawasaki T, Tsuboi A, Matsumura H: Supersensitive odor discrimination is controlled in part by initial transient interactions between the most sensitive dorsal olfactory receptors and G-proteins. **Receptors & Clinical Investigation** 3: e1117 (2016).
- ⑦ Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itohara S, Kizumi M, Hamana H, Tsuboi A, Hirono J: Supersensitive detection and discrimination of enantiomers by dorsal olfactory receptors: evidence for hierarchical odour coding. **Scientific Reports** 5: 14073 (2015).

(和文総説)

- ⑧ 高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅球介在ニューロンのサブタイプが匂いの検出と識別という嗅覚行動に必須な役割を果たす. **AROMA RESEARCH** 第17巻 第4号 pp.336-337 (2016).
- ⑨ 吉原誠一, 坪井昭夫: 転写因子 Npas4 による神経活動依存的なシナプス形成の制御機構. **生化学** 第88巻 第2号 pp.220-224 (2016).
- ⑩ 高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅覚系における CO₂ センシングの分子機構. **におい・かおり環境学会誌** 第46巻 第3号 pp.209-217 (2015).

[学会発表] (計 21 件)

(国際学会・シンポジウム)

- ① **Tsuboi A**, Asahina R, Fujioka M, **Takahashi H**: Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke. **The 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience**, Nara, Japan (2018).
- ② **Takahashi H**, **Yoshihara S**, Ogawa Y, Asahina R, Kitano T, **Tsuboi A**: A specific subtype of olfactory bulb interneurons is necessary for odor detection and odor-background segregation. **The 17th International Symposium on Olfaction and Taste**, Yokohama, Japan (2016).
- ③ **Tsuboi A**, **Yoshihara S**, Ogawa Y, Asahina R, Kinoshita M, **Takahashi H**: A specific subtype of interneurons in the olfactory bulb is required for controlling odor detection and discrimination. **Current Trends in Biomedicine 2015: Development and Adult Neurogenesis in the Central Nervous System**, Baeza, Spain (2015).

(国際学会・一般講演)

- ④ **Takahashi H**, Asahina R, **Yoshihara S**, **Tsuboi A**: Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke. **Keystone Symposia: State of the Brain - Genetic Dissection of Brain Circuits and Behavior in Health and Disease**, Keystone, Colorado, USA (2018).
- ⑤ **Tsuboi A**, Asahina R, **Yoshihara S**, Fujioka M, **Takahashi H**: Neural activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal protection and survival after ischemic stroke. **2017 Cortical Development Conference: Neural Stem Cells to Neural Circuits**, Chania, Crete, Greece (2017).
- ⑥ **Takahashi H**, Asahina R, Kitano T, **Yoshihara S**, **Tsuboi A**: Neural activity-

induced transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke. **Keystone Symposia: Neurogenesis during Development and in the Adult Brain**, Olympic Valley, USA (2017).

- ⑦ **Takahashi H**, **Yoshihara S**, Ogawa Y, Asahina R, Kinoshita M, **Tsuboi A**: A specific subtype of newborn interneurons in the olfactory bulb is required for behaviors on odor detection and discrimination. **Fusion Conference on Neurogenesis: Implications for Lifelong Development and Disease**, Cancun, Mexico (2016).
- ⑧ **Tsuboi A**, **Takahashi H**, **Yoshihara S**, Ogawa Y, Stern PL: A specific subtype of newborn interneurons in the olfactory bulb is required for controlling odor detection and discrimination. **2015 Bridging Biomedical Worlds Symposium: From Neural Circuitry to Neurotechnology**, Tokyo, Japan (2015).

(国内学会・一般講演)

- ⑨ **Takahashi H**, Asahina R, **Yoshihara S**, **Tsuboi A**: Neural activity-dependent transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke. **第40回日本分子生物学会大会**, 神戸ポートアイランド (2017).
- ⑩ **Takahashi H**, Asahina R, **Yoshihara S**, Fujioka M, **Tsuboi A**: Neural activity-dependent transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke. **第40回日本神経科学学会大会**, 幕張メッセ (2017).
- ⑪ 高橋弘雄, 高橋佑佳, 桐田忠昭, 坪井昭夫: Oncofetal trophoblast glycoprotein 5T4 is involved in the maintenance of mouse taste bud cells. **第51回日本味と匂学会大会**, 神戸国際会議場 (2017).
- ⑫ 高橋佑佳, 高橋弘雄, 坪井昭夫, 桐田忠昭: 癌胎児性抗原 5T4 はマウス味蕾幹細胞の維持を制御している. **第71回日本口腔科学学会学術集会**, 松山市 (2017).
- ⑬ **Takahashi H**, Asahina R, Kitano T, **Yoshihara S**, **Tsuboi A**: Neural activity-induced transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke. **第39回日本分子生物学会大会**, パシフィコ横浜 (2016).
- ⑭ **Takahashi H**, **Yoshihara S**, Ogawa Y, Asahina R, Kitano T, **Tsuboi A**: A specific subtype of newborn olfactory bulb interneurons is required for behaviors on odor detection and discrimination. **第39回日本神経科学学会大会**, パシフィコ横浜 (2016).
- ⑮ 朝比奈諒, 高橋弘雄, 吉原誠一, 坪井昭夫: 脳梗塞時に発現する神経活動依存的遺伝子 Npas4 の解析. **第121回日本解剖学会総会全国学術集会**, 福島県郡山市 (2016).
- ⑯ 高橋弘雄, 吉原誠一, 小川陽一, 木下雅

- 仁, 朝比奈諒, **坪井昭夫**: 特定のサブタイプの嗅球介在ニューロンは匂いの検出と識別行動に必須である. **第38回日本分子生物学会年会**, 神戸ポートピア (2015).
- ⑱ **吉原誠二**, **高橋弘雄**, 木下雅仁, 北野達郎, 朝比奈諒, **坪井昭夫**: 感覚入力依存的に嗅球介在ニューロンのシナプス形成を制御するNpas4に関するマイクロRNAの解析. **第38回日本分子生物学会年会**, 神戸ポートピア (2015).
- ⑲ **Takahashi H**, **Yoshihara S**, Ogawa Y, Kinoshita M, Asahina R, **Tsuboi A**: A specific subset of newborn granule cells in the olfactory bulb are required for maintaining odor-detection thresholds and acquiring two-odor discrimination tasks. **第38回日本神経科学学会大会**, 神戸ポートピア (2015).
- ⑳ **Yoshihara S**, **Takahashi H**, Kinoshita M, Asahina R, **Tsuboi A**: MicroRNAs downstream of Npas4 that regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **第38回日本神経科学学会大会**, 神戸ポートピア (2015).
- ㉑ **高橋弘雄**, **吉原誠二**, 小川陽一, 朝比奈諒, 玉田喜規, **坪井昭夫**: 5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein regulates the sensory experience-dependent dendritic development of olfactory bulb interneurons. **第92回日本生理学会大会**, 神戸ポートピア (2015).
- ㉒ **吉原誠二**, **高橋弘雄**, 西村信城, 木下雅仁, 朝比奈諒, 日比陽子, 永井拓, 山田清文, **坪井昭夫**: Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. **第92回日本生理学会大会**, 神戸ポートピア (2015).

[図書] (計2件)

- ① **Tsuboi A**, Sakano H: Odorant receptor gene regulation. *In: HANDBOOK OF OLFACTION & GUSTATION, THIRD EDITION* (editor, Doty RL), **Wiley-Blackwell**, Chapter 6, pp.123-132 (2015).
- ② **Takahashi H**, **Yoshihara S**, Asahina R, Tamada Y, **Tsuboi A**: Characterization of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb using postnatal electroporation. *In: Electroporation Methods in Neuroscience* (editor, Saito T), **Springer Protocols**, Vol. 104, pp.93-103 (2015).

[その他]

(新聞・テレビ報道)

- ① **坪井昭夫**: 嗅覚に関わる遺伝子発見 - 脳内物質に着目 奈良県立医大朝日新聞 (全国版) 2016年9月15日
- ② **坪井昭夫**: においかぎ分け遺伝子 - 県立医大チームが発見 読売新聞 (関西版) 2016年8月12日

- ③ **坪井昭夫**: におい感じる能力 - 特殊なたんぱく質関与 奈良県立医科大学のグループらが発見

NHK NEWS WEB 2016年8月5日

- ④ **坪井昭夫**: におい検出の仕組み解明 - 感度調節の役割? 「嗅覚障害の治療に」 県立医科大グループ発表 奈良新聞 2016年8月3日

(ホームページ)

<http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab1/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
坪井 昭夫 (TSUBOI, Akio)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20163868
- (2) 研究分担者
高橋 弘雄 (TAKAHASHI, Hiroo)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20390685
- 吉原 誠一 (YOSHIHARA, Seiichi)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 90360669
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
藤岡 政行 (FUJIOKA, Masayuki)