

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15201

研究課題名(和文) イメージング創薬プラットフォームとして応用可能な新規トランスジェニックマウスの創製

研究課題名(英文) Development of a new transgenic mouse model as a platform for the imaging-based drug discovery and development

研究代表者

山田 清文(Yamada, Kiyofumi)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30303639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：初年度は*in vivo*における活動依存的な遺伝子発現の可視化を目的として、NPAS4プロモーター制御下にtTAを発現するNPAS4-tTAマウスを作製した。tet0-ChR2-EYFPマウスをレポーターマウスとしてNPAS4-tTAマウスと交配し、目的とするダブルTgマウスを作製した。2年目は、AAVベクターを用いてCREプロモーター制御下にルシフェラーゼを発現するCRE-Lucシステムを構築し、コカインによる線条体神経の過活動のイメージングに成功した。Npas4標的遺伝子の解析では、キンドリングモデルを用いてNpas4-Homer1aシグナルが神経活動の恒常性維持に重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In 2016, to regulate the expression of target genes in a neuronal activity-dependent manner, we created a new transgenic mice line (NPAS4-tTA mice) in which the expression of tTA gene is regulated under the control of Npas4 promoter. We obtained the double transgenic mice following mating with tet0-ChR2-EYFP transgenic mice as a reporter. The double transgenic mice exhibited a high background expression of EYFP in the brain with or without pentylentetrazole (PTZ) treatment. In 2017, we prepared cyclic AMP response element (CRE)-luciferase expression system using AAV vector. We observed a significant increase in chemiluminescent after cocaine treatment *in vivo* in the brain of mice expressing the CRE-luciferase gene. As to the functional analysis of target genes of Npas4, we demonstrated that Npas4-Homer1a signal played a role in the regulation of homeostatic scaling in the hippocampus.

研究分野：薬理学

キーワード：イメージング創薬 Npas4 トランスジェニックマウス Homer1a キンドリング

1. 研究開始当初の背景

神経精神疾患の発症には遺伝要因と環境要因が複合的に関与しており、環境要因の一つに心理社会的あるいは身体的ストレスがある。これまでに我々は、幼弱期に慢性隔離あるいは拘束ストレスを負荷したマウスでは学習記憶と情動行動に異常が生じ、海馬における神経新生が低下することを明らかにした (Ibi et al., J Neurochem 2008)。また、ストレス誘発性脳機能障害に関連する分子として脳特異的転写調節因子 Npas4 を同定した (Yun et al., J Neurochem 2010)。Npas4 遺伝子はグルココルチコイド (GC) により直接転写抑制を受けるが (Furukawa-Hibi et al., J Neurochem 2012)、ストレスによる Npas4 の発現低下にはプロモーター領域の DNA メチル化、すなわちエピジェネティクスが関与していることも示した (Furukawa-Hibi et al., Neuroreport 2015)。Npas4 は神経細胞の成熟にも関与しており、その標的遺伝子として Cdk5 を同定した (Yun et al., J Biol Chem 2013)。さらに、嗅球介在神経の経験依存的スパイン形成における Npas4 の役割とその分子機構についても共同研究で解明している (Yoshihara et al., Cell Rep 2014)。脳機能における Npas4 の役割を解明するために、コンベンショナルおよびコンディショナル Npas4 遺伝子欠損 (Npas4-KO) マウスの系統的行動解析ならびに神経化学的解析も実施した。Npas4-KO マウスには、学習記憶障害、不安・衝動行動および易痙攣性と GABAA 受容体の発現低下が認められた。また、Npas4 の新規標的遺伝子としてシナプスの恒常性維持に関与する Homer1a 遺伝子を新たに同定した。

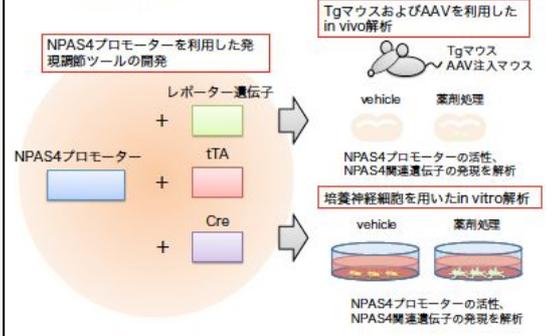
以上より、Npas4 により発現制御を受ける標的遺伝子 (Bdnf, Cdk5, Homer1a など) は新しい神経精神疾患治療薬の有望な標的になり得る。しかし、多くの候補遺伝子 (Nature 2008 では 200 以上の候補遺伝子が報告されている) の中から創薬標的として真に有望な遺伝子を同定するためには、標的候補遺伝子の機能を in vivo で系統的に評価できるシステムの構築が不可欠である。

2. 研究の目的

神経精神疾患はアンメットメディカルニーズの高い疾患であり、有効性の高い新規治療薬の開発が期待されている。これまでに我々は、活動依存的に誘導される脳特異的転写因子 Npas4 がストレスセンサーとして機能し、学習・記憶、不安、癲癇などに関与していることを明らかにしている。したがって、Npas4 により発現制御を受ける標的遺伝子は、新しい神経精神疾患治療薬を開発するための有望な標的候補である。しかし、多くの Npas4 標的遺伝子の中から創薬標的として真に有望な遺伝子をスクリーニングするためには、これら標的候補遺伝子の機能を系統的に in vivo で評価できるシステムの構築が不

可欠である。

NPAS4 promoterを利用した発現調節ツールの開発



本研究では、中枢神経用薬の創薬に応用可能なプラットフォームとしての新規トランスジェニック (Tg) マウスの創製に挑戦する。

3. 研究の方法

本研究では、Npas4 の標的遺伝子の機能を系統的に in vivo で評価できるシステムを構築することを目的として研究を進めた。そこで平成 28 年度には、Npas4-Cre Tg マウスおよび Cre 依存的に目的遺伝子あるいはその shRNA を発現する AAV ベクターライブラリーを構築した。同時に、作製済みの Npas4-tTA: :Chr2(C128S)EYFP マウスを用いて薬効・病態イメージングを実施した。

平成 29 年度には cAMP response element (CRE) または Npas4-Luciferase (Luc) の AAV ベクターを作製し、薬物投与下における Luc 活性を in vivo imaging system (IVIS) により評価した。NPAS4 プロモーター (転写開始点より上流約 2kbp) はクローニング済みである。Npas4-tTA マウスと同様、GC レスポンスエレメントを除いた NPAS4 プロモーター (-1659-16441) を Cre recombinase の発現制御に用いた (Furukawa-Hibi et al., J Neurochem 2012)。Cre recombinase cDNA を NPAS4 プロモーター下流にサブクローニングし、Npas4-Cre を組み込んだベクターを作製した。

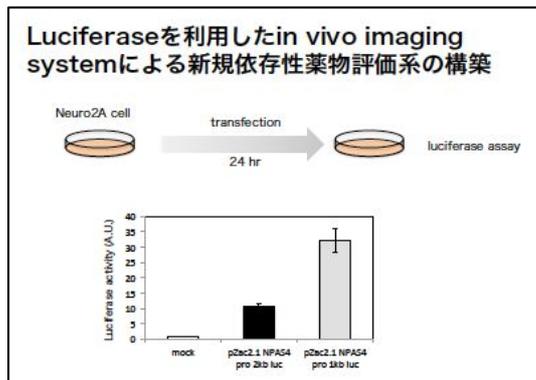
4. 研究成果

平成 28 年度は Npas4-Cre マウスを作製するためのコンストラクトを作製した。クローニング済みの NPAS4 プロモーターの下流に Cre recombinase の cDNA をサブクローニングした。次に、shRNA を発現する AAV ベクターの構築を試みた。AAV ベクターに U6 プロモーター下で shRNA を発現し、さらにレポーターとして EGFP を Ubiquitin C プロモーター制御下で発現するプラスミドを作製した。作製したプラスミドをパッケージングした AAV をマウス脳内に注入し、3 週間後にマウス脳を摘出した。免疫染色により EGFP の発現を確認することができた。

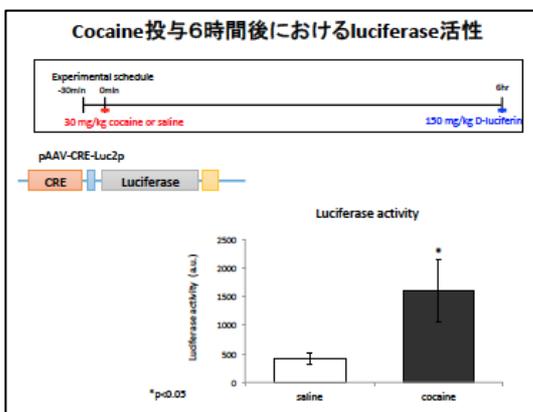
次に、Npas4-tTA: :Chr2(C128S)EYFP マウスを用いて薬効評価に向けたイメージングを

行った。NPAS4 の発現を増加させる PTZ (45 mg/kg) を投与し、24 時間後に EYFP の発現を免疫染色法により解析した。対照群として saline 投与後 24 時間後のマウスについても同様に解析を行った。PTZ を投与した Npas4-tTA::ChR2(C128S)EYFP マウスでは EYFP の発現が認められたが、saline 投与群においても同程度の EYFP の発現が認められ、PTZ 投与群において十分な EYFP の発現の差を得られることができなかった。

in vivo イメージングに有用な Luciferase を Npas4 プロモーター下に組み込んだ AAV ベクターの作製も行った。作製したプラスミドの validation を行うために Neuro2A 細胞に Npas4-Luc または mock vector を導入し、in vitro luciferase assay により発光強度を比較検討した。その結果、Npas4-Luc を発現させた細胞において対照群の 10 倍-32 倍程度の発光強度の上昇が認められた (下図)。



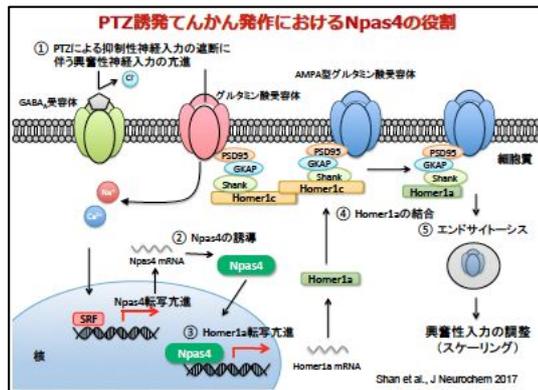
平成 29 年度は Npas4-Luc を利用した薬物評価系の構築を目的とし、IVIS を用いて新規評価系の構築を試みた。IVIS を用いた実験系の妥当性を評価するため、cAMP response element (CRE) の下流に Luc を組み込んだ AAV ベクターを作製した。CRE-Luc をパッケージングした AAV を線条体に注入し、3 週間後に IVIS により薬物依存的な発光強度の変化を測定した (下図)。



Cocaine 30 mg/kg を投与し、6 時間後に luciferase の基質である D-luciferine (15 mg/kg) を腹腔内投与した。基質投与 15 分後に認められる発光強度を IVIS により測定した。対照群として saline 投与マウスについ

ても同様の実験を行った。Cocaine 投与群では saline 投与群に比べ、基質投与後の発光強度が有意に増加した。

Npas4 標的遺伝子の機能解析の研究では Npas4-Homer1a シグナルが神経活動の恒常性維持に関わるシナプス・スケールリングに重要な役割を果たしていることを示した。具体的には、PTZ による痙攣発作後に海馬シナプス膜上の GluA タンパクが減少し、海馬神経の興奮性が低下することを示した、さらに、PTZ キンドリングの形成が Npas4-KO マウスで促進され、海馬に Homer1a 遺伝子を導入することによりレスキューできることを示した (下図)。



本研究により、AAV を利用した中枢神経用薬の創薬に応用可能なプラットフォームとしての in vivo 評価系を構築することができた。しかしながら、in vivo 評価系として十分な発現変化を示す Npas4-Cre Tg マウスの創製には至っていない。現在、Npas4 の発現パターンをより忠実に再現するために、内在性の Npas4 プロモーターを利用した Tg マウスの作製に着手している。今後、内在性 Npas4 プロモーターを利用した新規 Tg マウスの作製・評価を行い、中枢神経用薬の新規評価系を構築することを目指す。

<引用文献>

Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K.: Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. J Neurochem 3: 921-932, 2008.

Yun J, Nagai T, Furukawa-Hibi Y, Kuroda K, Greenberg ME, Yamada K.: Neuronal Per Arnt Sim (PAS) domain protein 4 (NPAS4) regulates neurite outgrowth and phosphorylation of synapsin I. J Biol Chem. 288: 2655-2664, 2013.

Yoshihara S, Takahashi H, Nisimura N, Kinoshita M, Asahina R, Kitsuki M, Tatsumi K, Furukawa-Hibi Y, Hirai H, Nagai T, Yamada K, Tsuboi A.: NPAS4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent dendritic spine development of newborn olfactory bulb interneurons. *Cell Rep.* 8: 843-857, 2014.

Furukawa-Hibi Y, Yun J, Nagai T, Yamada K: Transcriptional suppression of the neuronal PAS domain 4 (NPAS4) gene by stress via the binding of agonist-bound glucocorticoid receptor to its promoter. *J Neurochem.* 123: 866-875, 2012.

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 4 件)

Wulaer B, Nagai T, Sobue A, Itoh N, Kuroda K, Kaibuchi K, Nabeshima T, Yamada K: Repetitive and compulsive-like behaviors lead to cognitive dysfunction in *Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3* mice. *Genes, Brain Behav.*, 2018 Apr 10:e12478. doi: 10.1111/gbb.12478. [Epub ahead of print] (査読有)

Sobue A, Itoh N, Nagai T, Shan W, Hada K, Nakajima A, Murakami Y, Mouri A, Yamamoto Y, Nabeshima T, Saito K, Yamada K: Astroglial major histocompatibility complex class I following immune activation leads to behavioral and neuropathological changes. *Glia*, 2018;00:1-19. doi: 10.1002/glia.23299 (査読有)

Shan W, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Sokabe M, Yamada K: Neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) controls neuronal homeostasis in pentylenetetrazole-induced epilepsy through the induction of Homer1a. *J Neurochem.* 145:19-33, 2018. doi: 10.1111/jnc.14274 (査読有)

Itoh N, Nagai T, Watanabe T, Taki K, Nabeshima T, Kaibuchi K, Yamada K: Valocin-containing protein (VCP) is a novel IQ motif-containing GTPase activating protein 1 (IQGAP1) interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun* 493:1384-1389, 2017.

doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.159. (査読有)

[学会発表](計 3 件)

Wei Shan, Taku Nagai, Motoki Tanaka, Yoko Furukawa-Hibi, Norimichi Itoh, Masahiro Sokabe, Kiyofumi Yamada: Neuron-specific transcription factor controls neuronal homeostasis during pentylenetetrazole-induced epileptogenesis through Homer1a induction. 第二回医薬系 3 部局交流シンポジウム (2017.6.16)

Taku Nagai, Wei Shan, Motoki Tanaka, Toshitaka Nabeshima, Masahiro Sokabe, Kiyofumi Yamada: Npas4 mediates pentylenetetrazole-induced Homer1a expression in the hippocampus. 第 60 回日本神経化学学会大会 (2017.9.6-9)

Taku Nagai, Wei Shan, Motoki Tanaka, Toshitaka Nabeshima, Masahiro Sokabe, Kiyofumi Yamada. Role of Npas4 in pentylenetetrazole-induced epileptic seizure. 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会 (2017.9.28-30)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/pharmacy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 清文 (YAMADA, Kiyofumi)
名古屋大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 30303639

(2) 研究分担者

伊藤 教道 (ITO, Norimichi)
名古屋大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 30726310

(3) 連携研究者

永井 拓 (NAGAI, Taku)
名古屋大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 10377426