

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08306

研究課題名(和文) ストレス感受性転写因子NPAS4を標的とした神経精神疾患治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic agents for neuropsychiatric disorders targeting the stress-sensitive transcription factor NPAS4

研究代表者

日比 陽子 (HIBI, YOKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70295616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：NPAS4発現低下による抑制性GABA作動性神経の機能障害が神経の興奮/抑制バランス異常をきたす可能性から、てんかん発作との関連を調べたところ、ベンチレンテトラゾールによる薬剤性けいれん誘発モデルにおいて、Npas4遺伝子欠損マウスは痙攣に対する閾値が低いことが示された。そのメカニズムとして、Npas4がHomer1aを転写し神経興奮を抑制するフィードバックをかけていることが示唆された。また、Npas4プロモーター活性を誘導する化合物探索については、市販の活性化化合物ライブラリーの中から、ヒトおよびマウスのNpas4プロモーター活性を上昇させる化合物を数種類見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経分化関連転写因子Npas4はストレス負荷により発現が低下することが見いだされており、Npas4の発現低下が神経の興奮/抑制バランスを崩すことによっててんかんなどの疾病の要因となる可能性が示された。また、このNpas4発現を誘導する化合物の探索によって、神経疾患や神経損傷の治療薬の開発の可能性にもつながる。

研究成果の概要(英文)：Since dysfunction of suppressive GABAergic nerves due to decreased expression of NPAS4 may cause nerve excitement / suppression imbalance, we investigated the association with seizures. Npas4-knockout mice were shown to have a lower threshold for convulsions. It was suggested that as the mechanism, Npas4 transcripts Homer1a and gives feedback to suppress nerve excitement. Regarding the search for compounds that induce Npas4 promoter activity, we found several compounds that increase Npas4 promoter activity in humans and mice from commercially available active compound libraries.

研究分野：神経薬理学

キーワード：Npas4 ストレス 神経分化

1. 研究開始当初の背景

ストレスはうつ病や不安障害、認知症、心的外傷後ストレス症候群(PTSD)、統合失調症など多くの精神疾患発症との関わりが示唆されている。ストレスは抑制性 GABA 作動性神経の機能を障害し、それによって興奮性神経系の活動が亢進することが精神疾患発症の要因の一つと考えられている。また、脳内の炎症反応亢進もまた精神疾患や認知症を増悪させることが明らかになってきた。ストレスによってこれらの脳のバランスが崩壊する分子メカニズムを解明すれば、その分子を薬効解析の指標として用い、これを標的とした治療薬の開発が可能となる。

我々はこれまでに、(a)幼若期隔離飼育ストレス(精神的ストレス)や拘束ストレス(身体的ストレス)を負荷したマウスで空間学習記憶や情動行動の異常が起こると共に、(b)GABA 神経系発達に關与する転写因子 Neuronal PAS domain 4 (NPAS4)の発現が海馬や皮質で顕著に低下していることを見出した。さらに Npas4 の発現低下機構を追究し、(c)ストレスによって分泌増加するグルココルチコイド(GC)が GC 受容体(GR)を介して Npas4 の転写を直接抑制し、さらに(d)長期的なストレス負荷により Npas4 プロモーターの DNA メチル化が亢進し、Npas4 の転写が抑制されることを明らかにした。以上の成果から、NPAS4 がストレス応答性に発現が抑制される転写因子であると同定された。

NPAS4 は大脳皮質、海馬、線条体などの辺縁系に多く存在し、神経活動依存的に発現が促進され、BDNF の転写誘導を介して GABA 作動性神経系の成熟に深く関与するとされている。我々は(e)NPAS4 が Cdk5 を転写誘導し神経突起伸長を促進することを示した。また、(f)NPAS4 が神経伸長抑制因子を阻害し嗅球介在ニューロンの神経突起スパイン形成にも関わることも示された。臨床データからも神経発達障害児の遺伝子解析で Npas4 遺伝子を含む遺伝子領域の欠損が報告されていることから、Npas4 遺伝子欠損(Npas4-KO)マウスの行動解析を行ったところ、環境順化の遅れやプレパルス抑制の障害など GABA 作動性神経系の機能低下と関連する行動異常の他、小脳の障害と関連の深い運動学習能力の低下も認められ、線条体と小脳における GABA 受容体の発現が顕著に低下していることが示唆された(投稿準備中)。一方、最近 NPAS4 の発現減少が虚血脳でミクログリア活性化などの炎症反応を増大させ神経死を促進するとの報告がなされ(J Cereb Blood Flow Metab, 2016)だが、我々は(g)アミロイド ペプチド(A β)誘発認知機能障害モデルにおいて認知機能を改善させる因子が炎症性ミクログリア活性化を抑制することを示している(Mita et al, Behav.Brain.Res 2015)。炎症反応は脳傷害の他、統合失調症、認知症など様々な精神疾患において病態進行の要因であり、ストレスによる NPAS4 発現減少が炎症反応増悪を経て精神疾患を悪化させるという、もうひとつのメカニズムを示唆している。このことから、転写因子 NPAS4 が GABA 作動性神経系の調節のみならず炎症反応の制御も担う、脳の恒常性を維持する要の重要な因子であることが示唆される。本研究では GABA 作動性神経の発達や脳内炎症亢進における NPAS4 の役割を明らかにしたい(図3)。また、本研究では NPAS4 およびその下流因子をターゲットとする新規精神疾患治療薬の開発のため NPAS4 の発現を誘導する化合物を選定する。

2. 研究の目的

精神疾患の原因は、遺伝的脆弱性に加え心理社会的ストレスなどの環境的要因も重要であるため、その予防法や治療法は十分確立されていない。ストレスが抑制性 GABA 作動性神経の機能を障害することにより生じる神経の興奮/抑制バランス異常や、脳内炎症反応が精神疾患発症の要因の一つと考えられているが、その分子機構は明らかではない。我々はこれまでに GABA 神経の分化・シナプス形成に重要な転写因子 NPAS4 がストレスにより発現低下する機構を明らかにした。近年、NPAS4 は脳内炎症を調節する可能性も示唆され、ストレスと精神疾患をつなぐ要因としてさらに重要性を増している。そこで本研究では、ストレスと精神症状発症の関係を、NPAS4 を鍵として解明し、NPAS4 およびその下流因子をターゲットとした新規精神疾患治療薬の開発を究極の目的とする。それと共に、NPAS4 の発現抑制機構の1つとして見出したプロモーターの DNA メチル化亢進について臨床の場で検証し、精神疾患マーカーとしての可能性を検討する。

3. 研究の方法

ヒトおよび Npas4 プロモーターを用いたアッセイ系により既知の化合物ライブラリーから NPAS4 を誘導する候補化合物を選定する。また候補化合物が NPAS4 を発現誘導するメカニズムについて追究する。さらにストレス負荷モデルおよび認知機能障害モデルマウスに投与し薬効解析を行う。

4. 研究成果

NPAS4 は、GABA 作動性抑制性神経の発達やシナプス形成との関連が報告される転写因子である。全身性 NPAS4 遺伝子欠損 (NPAS-KO) マウスが多動、不安関連行動の減少、恐怖記憶の低下、PPI の障害の他、協調運動や運動学習能力の低下を示し、Npas4-KO マウスの脳各部位において GABA 受容体の mRNA レベルが顕著に低下している。また、Npas4 はストレス負荷により、グルココルチコイド受容体活性化や Npas4 プロモーターの転写開始点付近の CpG アイランドの DNA メチル化亢進を介して発現低下することから、この転写因子がストレス・GABA 神経系障害・精神症状発症の関心の鍵であると考えられる。そこで本研究では、Npas4 発現低下による精神疾患様行動発現との関わりを解析し、さらに Npas4 の発現上昇によるストレス負荷が要因となる精神疾患の発症抑制や治療の可能性を探り、Npas4 プロモーター活性を上昇させる化合物を探索し治療に繋げることを目的としている。今回、薬剤性けいれん誘発モデルを用いて全身性 Npas4-KO マウスが痙攣に対する閾値が低いことと、Npas4 は Homer1a 転写を介して神経興奮を低下させることを明らかにした。また Npas4 プロモーターをクローニングしてルシフェラーゼ遺伝子と繋いだプロモーターアッセイ系を確立し、Npas4 プロモーター活性を誘導する化合物探索をおこなった。その結果、市販の活性化化合物ライブラリの中から、ヒトおよびマウスの Npas4 プロモーター活性を上昇させる化合物を数種類見出した。Npas4 は KCL 刺激による神経興奮で発現が上昇することが知られているが、今回見出された化合物による Npas4 転写上昇は、KCL によるものより顕著に高く、その作用機序は異なると推察される。平成 30 年、他施設への異動があり研究環境が変わった。Npas4 プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子と繋いだプロモーターアッセイ系を用いて市販の活性化化合物ライブラリの中から Npas4 プロモーター活性を誘導する化合物探索を行い、数種類見出された Npas4 プロモーター活性上昇化合物の中から、最もプロモーター活性上昇度が強い化合物について、薬効から Npas4 活性上昇に至る経路を調査するなど検討を行った。令和 1 年より新型コロナウイルス流行により大学・病院・動物飼育施設等への立ち入りが制限されたことは実験遂行の障害となった。Npas4 発現誘導薬物の探索により見出された数種類の化合物についてさらに解析を深め、細胞内シグナル伝達経路の解析を行い Npas4 転写上昇のメカニズムを明らかにする目標に対しては、プロモーターアッセイデータの整理と、候補薬物の個体投与への条件を検討した。認知機能障害における Npas4 の役割の解析を目的としてマウスの A 誘発性認知機能障害モデルにて脳内炎症亢進や認知機能障害発現に NPAS4 の有無が及ぼす影響を解析する目標については、炎症反応をとらえるための炎症性サイトカイン関連の ELISA キット等の準備を行った。NPAS4 が GABA 作動性神経の活性に関わりが深いため、臨床現場で認知症サポートチームに入ったことをきっかけに、ベンゾジアゼピン系薬剤 (GABA 受容体に作用する) とせん妄発現の関連に NPAS4 が影響する可能性に注目し、せん妄のリスク因子や使用薬物に関するカルテ調査に取り組み始めた。さらに、NPAS4 が神経の分化や機能調節に関わりが深いことから、末梢神経傷害からの機能回復に影響する可能性にもアプローチしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomita N, Hotta Y, Naiki-Ito A, Sanagawa A, Kataoka T, Furukawa-Hibi Y, Takahashi S, Kimura K.	4. 巻 149
2. 論文標題 Protective effects of tadalafil on damaged podocytes in an adriamycin-induced nephrotic syndrome model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.03.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Y, Nakatochi M, Kunimoto S, Okada T, Aleksic B, Toyama M, Shiino T, Morikawa M, Yamauchi A, Yoshimi A, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Ohara M, Kubota C, Yamada K, Ando M, Ozaki N.	4. 巻 19
2. 論文標題 Methylation analysis for postpartum depression : a case control study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Psychiatry.	6. 最初と最後の頁 190-199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12888-019-2172-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shan W, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Sokabe M, Yamada K.	4. 巻 145
2. 論文標題 Neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) controls neuronal homeostasis in pentylenetetrazole-induced epilepsy through the induction of Homer 1a.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Neurochem.	6. 最初と最後の頁 19-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14274.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tajima H, Izumi T, Miyachi S, Matsubara N, Ito M, Imai T, Nishihori M, Shintai K, Okamoto S, Araki Y, Kumakura Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Wakabayashi T.	4. 巻 80
2. 論文標題 Association between CYP2C19 genotype and the additional effect of cilostazol to clopidogrel resistance in neuroendovascular therapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci.	6. 最初と最後の頁 207-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18999/nagjms.80.2.207.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------