

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03340

研究課題名(和文) 神経活動依存的に発現する転写因子Npas4を用いた革新的な脳梗塞治療法の開発

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy for ischemic stroke based on the activity-dependent transcription factor Npas4

研究代表者

坪井 昭夫 (Tsuboi, Akio)

大阪大学・大学院生命機能研究科・招へい教授

研究者番号：20163868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管障害は成人の死因の第2位であり、障害の原因としては最も頻度の高いものである。脳虚血性後、神経細胞の多くは死滅し、少数のものが生存する事で脳機能障害を引き起こす。しかし、神経細胞の生と死に關与する遺伝子は未だに解明されていない。我々は虚血に対する神経細胞の耐性の獲得に、神経活動依存的な転写因子Npas4が必須である事を見出した。また、Npas4の下流遺伝子を検索した結果、Npas4の神経保護作用を媒介するRas低分子量G蛋白質ファミリーに属するGemを同定した。Gemは電位依存性Ca²⁺チャネルの膜局在を抑制して過剰なCa²⁺流入を抑制し、興奮毒性による細胞死から保護する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健常脳では、感覚刺激による神経活動に依存して、短時間にダイナミックな遺伝子発現の変動が生じて、神経回路の可塑性を担っている。申請者らは、脳梗塞という病態脳で起こる神経回路の変化を考える上でも、脳梗塞の初期段階における遺伝子発現の変化を知ることが重要であると想定した。本研究により、転写因子Npas4は健常脳と病態脳の双方において、神経回路の再編やその破綻を防ぐのに重要な働きをすることが示された。また、病態脳において、Npas4が低分子量G蛋白質のGemを介して果たす役割が明らかにされ、健常脳と病態脳における神経回路の再編機構の相違点に関して、Npas4の観点から考察することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：Stroke is the second leading cause of death and the most frequent cause of disability in adults. After stroke, most ischemic neurons die and a few neurons live, leading to brain dysfunction; yet, genes involved in both neuronal survival and death remain poorly understood. Here, we found that the activity-dependent transcription factor Npas4 is essential for acquisition of neuronal tolerance to ischemia. Moreover, a systematic search for Npas4-downstream genes identified Gem, which encodes Ras-related small GTPase that mediates neuroprotective effects of Npas4. Gem suppresses the membrane localization of voltage-gated Ca²⁺ channels to inhibit excess Ca²⁺ influx, thereby protecting neurons from excitotoxic death. Our findings suggest that Gem expression via Npas4 promotes neuroprotection and neuroplasticity in injured and healthy brains, respectively.

研究分野：分子生物学、神経科学

キーワード：神経科学 脳・神経 脳神経疾患 脳梗塞モデルマウス 神経細胞死 神経保護 神経可塑性 転写因子

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は、世界で最も一般的な身体障害の原因であり、成人の死亡原因の第2位である¹⁾。また最近、新型コロナウイルス感染症において、脳梗塞にかかるリスクが高まることも取りざたされている。更に脳血管疾患は、認知症と並び、寝たきりなどの要介護者を生む最大の要因である。従って、「脳梗塞により破綻した脳の構造や機能を、どのようにして再構築し、修復するのか？」は、超高齢化社会において極めて重要な問題である。

脳梗塞が起こると、梗塞巣の中心ではニューロンの多くが死滅する。一方、梗塞巣の周辺は“ペナンプラ”と呼ばれ(図1)、ニューロンが生死の境にある領域と考えられ²⁾、臨床医学上、ここでの神経細胞死を防御することが、予後を改善するのに極めて重要である。興味深いことに、ペナンプラで生き残ったニューロンは、一過性にシナプスを減少させた後、逆にシナプスを増加させる^{3,4)}。このように失われた神経細胞や回路を補填するために、残存したニューロン同士が新たにシナプスを形成するが⁵⁾、その生死の境で生に転じる分子機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

近年の研究により、脳梗塞後の梗塞巣の大きさに影響を及ぼす遺伝子、即ち、脳梗塞から脳を守る遺伝子がいくつか報告された⁶⁾。興味深いことに、これら遺伝子の多くは、健常脳における神経回路の再編を促進し、過剰な興奮による神経回路の破綻を防ぐことが分かった。しかしながら、これらの先行研究は、脳梗塞後24時間における梗塞巣の形成過程、もしくは、そこからの回復過程に着目していた。一方、脳梗塞後の初期段階においても、細胞死で消失したニューロンや神経回路を補填するために、残存したニューロン同士が新たにシナプスを再構築するが、神経細胞死を抑制する分子機構については、ほとんど明らかにされていない。

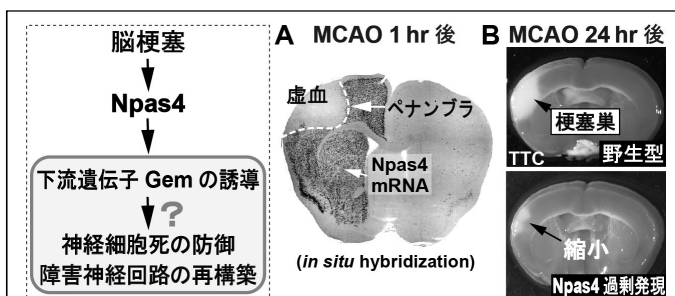


図1 脳梗塞の発症初期に発現が誘導される転写因子 Npas4
 A) Npas4 の発現は、MCAO (middle cerebral artery occlusion) 手術1時間後に虚血部位を囲んで強く誘導された。
 B) Npas4 を過剰発現させたマウスでは、野生型と比べて(上)、MCAO 手術24時間後の梗塞巣(白色)が顕著に縮小した(下)。Npas4 は下流遺伝子を介して、損傷脳におけるニューロンの生存や神経回路の再構築を促進すると推測された。

また、健常脳では、感覚刺激による神経活動に依存して、短時間にダイナミックな遺伝子発現の変動が生じて、神経回路の可塑性を担っている。そこで、我々は、脳梗塞という病態脳で生じるニューロンや神経回路の変化を考える上でも、「脳梗塞の初期段階における遺伝子発現の変化を体系的に解析することが重要である」と考えた。そして、「脳梗塞の発症初期に、神経細胞死を抑制するメカニズムがどのようにして作動するのか？」の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデルマウスを用いた解析: マウスに中大脳動脈閉塞 (MCAO: middle cerebral artery occlusion) の手術を施した。

(2) 試験管内での虚血様負荷を用いた解析: マウス胎児大脳皮質由来の初代培養ニューロンに虚血様負荷 (OGD: oxygen-glucose deprivation) を与えた。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞モデルマウスを用いた解析 1-1) 上述したように、脳梗塞直後に神経細胞が回路を再構築する過程を理解するためには、ペナンプラで発現が

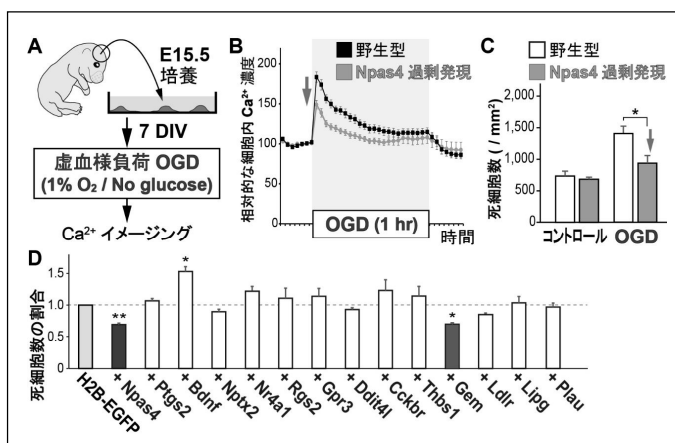


図2 初代培養ニューロンに対する虚血様負荷を用いた Npas4 の下流遺伝子の同定
 A) 初代培養ニューロンと虚血様負荷 (OGD: oxygen-glucose deprivation)。
 B) 培養ニューロンで Npas4 を過剰発現させると、OGD による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が顕著に抑制された (Ca²⁺イメージング)。
 C) 培養ニューロンで Npas4 を過剰発現させると、OGD による細胞死が減少した。
 D) 培養ニューロンで H2B-EGFP (内部コントロール) と 13 個の候補遺伝子をそれぞれ共発現させた結果、Npas4 に加えて、新規遺伝子である Gem の過剰発現が OGD による細胞死を減少させることがわかった。

変動する遺伝子を体系的にスクリーニングする必要があった。そこで我々は、マウスに MCAO 手術を行い、2 時間後に発現が変化する遺伝子を、RNA-Seq 法を用いて網羅的に探索した。その結果、最も顕著に発現が変化するのは転写因子 Npas4 であること、及び、Npas4 の発現は虚血部位を囲むように、脳の広範囲にわたって速やかに誘導され、ニューロンの生存を促進することが明らかになった(図1)⁷⁾。

1-2) また、Npas4 は脳で特異的に発現する転写因子の一つであるが、我々は、脳梗塞後に虚血部位周辺のニューロンで一過性にその発現が誘導されること、並びに、その loss-of-function と gain-of-function の実験により、Npas4 は脳梗塞後の早期において、大脳皮質ニューロンの細胞死を抑制することを明らかにした(図1)⁷⁾。これらの結果は、脳梗塞の発生初期のニューロンでは、細胞死を防ぎ、生存を促すメカニズムが既に発動し始めていることを示唆した。さらに、Npas4 は転写制御因子であるので、脳梗塞後のニューロンにおいて、その下流で働く遺伝子を同定する必要があった。

(2) 試験管内での虚血様負荷を用いた解析

2-1) 脳梗塞に伴う血流の低下により、神経細胞の膜電位は上昇し、異常な細胞内への Ca^{2+} 流入が誘発される。虚血によるニューロンの異常な脱分極は、広汎性脱分極 (spreading depolarizations) と呼ばれ、虚血部位のみならず、周囲のニューロンに伝搬する⁸⁾。Npas4 の発現は、広汎性脱分極により誘導されることが示されていたが⁹⁾、その役割は殆ど明らかにされていなかった。

2-2) そこで、我々は初代培養ニューロンにおいて Npas4 を過剰発現させた後に、OGD 処理を行うと、細胞内への Ca^{2+} 流入が減少し、細胞死が抑制されることを見出した(図2)⁷⁾。また、この虚血様負荷系を用いて、Npas4 の下流遺伝子を系統的に検索した結果、低分子量 G 蛋白質に属する Gem を同定した(図2)⁷⁾。Gem は Npas4 の下流で神経細胞死の抑制に重要な役割を果たすことが示唆された。

2-3) Gem は、低分子量 G タンパク質の5つのファミリーの中の Ras ファミリーに属し、互いに相同性の高い Rem1/2, Rad, Gem/Kir と共に RGK サブファミリーを形成している。我々は、初代培養ニューロンで Gem を過剰発現させると、L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネル (L-VGCC: L-type voltage-gated calcium channel) の細胞質膜への局在が減少することを見出した(図3)⁷⁾。従って、Gem は L-VGCC の細胞質膜への局在を阻害し、細胞内への Ca^{2+} 流入を減少させることにより、細胞死を抑制することが示唆された。

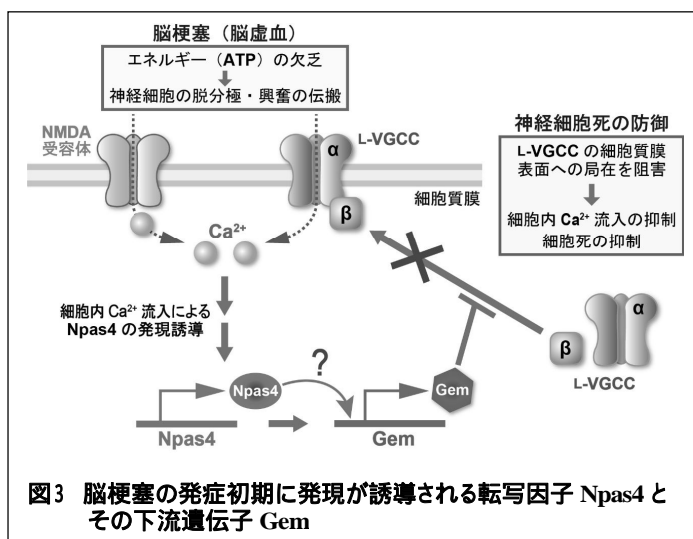


図3 脳梗塞の発症初期に発現が誘導される転写因子 Npas4 とその下流遺伝子 Gem

(3) 本研究の意義

3-1) 本研究により、脳梗塞後の神経細胞死の抑制には、Npas4 を介した Gem の発現が重要であることが明らかになった。さらに、Npas4 や Gem は、ヒト大脳皮質オルガノイドにおいても虚血様負荷により、それらのヒトオソログ遺伝子の発現が誘導されることから、脳梗塞治療の新たな創薬ターゲットとして期待される⁷⁾。

3-2) 現在の脳梗塞治療法は、t-PA (tissue-plasminogen activator: 組織プラスミノゲン活性化因子) を用いた血栓溶解療法など、「血流を速やかに回復して既存の神経回路を守る」という点に重点を置いたもので、出血傾向を有する患者さんには適用できない。本研究での Npas4 や Gem を用いた新規治療法は、出血傾向のある患者さんにも適用できると期待される。

< 参考文献 >

1. Feigin, V.L., Norrving, B., Mensah, G.A., *et al.*: *Circ Res* 120, 439-48 (2017).
2. Lo, E.H.: *Nat Med* 14, 497-500 (2008).
3. Li, P., Murphy, T.H.: *J Neurosci* 28, 11970-9 (2008).
4. Wu, F., Catano, M., Echeverry, R., *et al.*: *J Neurosci* 34, 14219-32 (2014).
5. Silasi, G., Murphy, T.H.: *Neuron* 83, 1354-68 (2014).
6. Pfisterer, U., Khodosevich, K.: *Cell Death & Disease* 8, e2643 (2017).
7. Takahashi, H., Asahina, R., Fujioka, M., *et al.*: *Proc Natl Acad Sci USA* 118, e2018850118 (2021).
8. Dreier, J.P., Reiffurth, C.: *Neuron* 86, 902-22, (2015).
9. Yoshida, K., Xu, M., Natsubori, A., *et al.*: *Neurosci Res* 98, 1-8 (2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9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 3件）

1. 著者名 Takahashi H, Yamamoto T, Tsuboi A	4. 巻 186
2. 論文標題 Molecular mechanisms underlying activity-dependent ischemic tolerance in the brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 3-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.10.005	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 坪井昭夫	4. 巻 37
2. 論文標題 脳梗塞の発症初期に発現する転写因子Npas4が神経細胞死を防ぐ分子機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 1057-1059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Takahashi H, Asahina R, Fujioka M, Matsui TK, Kato S, Mori E, Hioki H, Yamamoto T, Kobayashi K, Tsuboi A	4. 巻 118
2. 論文標題 Ras-like Gem GTPase induced by Npas4 promotes neuronal tolerance for ischemic stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 e2018850118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2018850118	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 坪井昭夫、高橋弘雄	4. 巻 39
2. 論文標題 刺激の豊かな環境で過ごしたマウスは脳梗塞にかかっても軽症ですむ？	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3042-3045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 坪井昭夫	4. 巻 35
2. 論文標題 脳梗塞時に神経細胞死を防御する機構の解明とその革新的な治療法への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 1315 1319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Tsuboi Akio	4. 巻 13
2. 論文標題 LRR-Containing Oncofetal Trophoblast Glycoprotein 5T4 Shapes Neural Circuits in Olfactory and Visual Systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 581018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2020.581018	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 坪井昭夫	4. 巻 3
2. 論文標題 脳梗塞時に脳を守る潜在的な適応機構の解明とその革新的な治療法への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 1028 1032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 高橋 弘雄、坪井 昭夫	4. 巻 26
2. 論文標題 総説 嗅球における特定の介在ニューロンの機能的な役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 3~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18965/tasteandsmell.26.1_3	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 坪井 昭夫、高橋 弘雄	4. 巻 45
2. 論文標題 内在性の神経回路再編機構の理解に基づく革新的な脳梗塞治療法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 152-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Akio Tsuboi, Hiroo Takahashi
2. 発表標題 Ras-like Gem GTPase induced by Npas4 promotes activity-dependent tolerance for ischemic stroke
3. 学会等名 Cortical Development Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 H. Takahashi, A. Tsuboi
2. 発表標題 Ras-like Gem GTPase induced by Npas4 promotes activity-dependent neuronal tolerance for ischemic stroke
3. 学会等名 8th Annual BRAIN Initiative Meeting: Open Science, New Tool (on-line) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋弘雄, 尾嶋大喜, 坪井昭夫, 山本融
2. 発表標題 Time-dependent neuroprotective mechanism for ischemic stroke
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 (NEURO2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akio Tsuboi, Hiroo Takahashi
2. 発表標題 Npas4-induced expression of Gem GTPase promotes activity-dependent neuronal tolerance for ischemic stroke
3. 学会等名 7th Annual BRAIN Initiative Investigators Meeting (on-line) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahashi H, Matsui TK, Mori E, Yamamoto T, Tsuboi A
2. 発表標題 Ras-like Gem GTPase induced by Npas4 promotes activity-dependent tolerance for ischemic stroke
3. 学会等名 第44回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuboi A, Matsui TK, Mori E, Yamamoto T, Takahashi H.
2. 発表標題 Ras-like GTPase induced by Npas4 promotes activity-dependent tolerance for ischemic stroke
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会大会 (on-line開催) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi H, Matsui TK, Mori E, Yamamoto T, Tsuboi A.
2. 発表標題 Ras-like GTPase induced by Npas4 promotes activity-dependent tolerance for ischemic stroke
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会 (on-line開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuboi A, Takahashi H
2. 発表標題 Activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke
3. 学会等名 29th Annual Meeting of the European Chemoreception Research Organization (ECRO2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi H, Asahina R, Yamamoto T, Tsuboi A
2. 発表標題 Sensory activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuboi A, Takahashi H
2. 発表標題 Activity-dependent transcription factor Npas4 plays a crucial role in neuronal survival after ischemic stroke
3. 学会等名 Keystone Symposia on Neurodegenerative Diseases: New Insights and Therapeutic Opportunities (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脳梗塞の予防又は治療剤	発明者 坪井昭夫、高橋弘雄	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-239562	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

大阪大学大学院生命機能研究科 坪井研究室
http://tsuboi-lab.osaka1univ2fbs3.jp/

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
研究分担者	高橋 弘雄 (Takahashi Hiroo) (20390685)	香川大学・医学部・講師 (16201)	
研究分担者	森 英一朗 (Mori Eiichiro) (70803659)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

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
---------	---------