

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590299

研究課題名(和文) ストレスによる精神疾患発症における脳特異的転写因子NPAS4の役割

研究課題名(英文) Role of neuronal PAS domain 4 (Npas4) in psychiatric disorder.

研究代表者

日比 陽子 (HIBI, YOKO)

名古屋大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70295616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患の発症要因として、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。我々は、ストレス刺激が神経シナプス形成に重要な転写因子NPAS4の発現を低下させることを見出し、本研究においてNPAS4発現低下メカニズムを追究した。その結果、NPAS4遺伝子プロモーター上に存在するグルココルチコイドレスポンスエレメントにグルココルチコイド受容体が結合することによって直接抑制されることが示唆された。また長期ストレス負荷によってNPAS4プロモーターの転写開始点付近のDNAメチル化レベルが亢進することも明らかとなり、このDNAメチル化亢進もNPAS4転写抑制機構の1つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neuronal PAS domain 4 (NPAS4) has recently been shown to regulate the development of GABAergic inhibitory synapses. We previously reported that Npas4 mRNA expression levels were reduced in the hippocampus of mice exposed to social isolation or restraint stress. In the present study, to investigate the transcriptional regulation of Npas4 by stress, we focused on the effect of glucocorticoids upon Npas4 transcription. Corticosterone treatment reduced Npas4 expression in the frontal cortex and hippocampus. Putative negative glucocorticoid response elements (GREs) were found -2000 to -1000 upstream of the Npas4 transcription initiation site. Npas4 promoter activity was increased by mutation of the negative GRE sequences. Restraint stress increased the binding of GR to Npas4 promoter region in the hippocampus. These results suggest that transcription of Npas4 is down-regulated by stress via the binding of agonist-bound GR to its promoter.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：ストレス Npas4 転写制御 グルココルチコイド プロモーター

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の発症には、遺伝子の脆弱性と共にストレスなどの外的環境も要因とされている。ストレスが精神障害発症のトリガーとなるメカニズムとして、GABA 作動性神経系の障害が一因として示されているが、その分子機構は未だよく分かっていない。また、ストレス負荷後の人や動物では脳の海馬や皮質の左右差が崩壊していることなどから脳の左右差崩壊が精神疾患の原因であることが示唆されている(Neurosci. Res., 2010)。この左右差崩壊は抑制性神経である GABA 神経系の障害により興奮性神経が亢進することによって誘発されることが示唆されているのみで詳細は不明である。ストレスが精神疾患を誘発する分子機構が明らかとなれば、その分子を薬効解析の指標として用いる事が出来、これを標的とした治療薬の開発が可能となる。こうした臨床応用の前段階として、我々は、ストレス負荷マウスを用いた脳内シグナル分子発現変動を調べた。ストレスを負荷したマウスは海馬依存的な空間学習記憶の障害や不安・抑うつ行動の増加など精神疾患様行動を示し、さらに海馬歯状回における新生細胞の生存と神経細胞への分化が障害されていた。このとき海馬の遺伝子発現変化を解析したところ、転写因子 Neuronal PAS domain 4 (NPAS4)の遺伝子発現が顕著に低下していることを見いだした (Ibi et al, J Neurochem 105: 921-932, 2008)。NPAS4 は大脳皮質、海馬、線条体などの辺縁系に高発現しており (Mol Cell Biol, 2004; Mol Brain Res, 2004)、抑制性シナプスの発達を調節していることが知られている(Nature, 2008)。従って、外的要因による NPAS4 発現のダイナミックな増減は、成体脳におけるストレス抵抗性獲得、神経新生や神経ネットワーク形成などに重大な影響を及ぼすことが予想される。ストレスによる海馬の発現抑制は、GABA シナプス形成の障害を引き起こし、この結果、興奮神経系が亢進するため脳の左右バランスが崩壊して精神疾患発症に至るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

我々は、人の育児放棄によるストレスや成長後の強いストレスのモデルとしてマウスを用い、ストレス刺激が GABA シナプス形成に関わる転写因子 NPAS4 の発現を低下することを見いだした。そこで、NPAS4 の発現抑制機構を解明し、臨床の場で検証することで、ストレスによる精神疾患の発症メカニズムを明らかとし、遺伝的脆弱性のある人でもその発症を抑制し、症状を改善する治療薬の開発につなげたい。

3. 研究の方法

本研究では、ストレス負荷によるNPAS4発現抑制メカニズムを解明した。

(1) NPAS4 のプロモーター活性の抑制因子

を同定した(転写制御因子解析)。本研究ではグルココルチコイドに着目し、NPAS4 プロモーター上のグルココルチコイド受容体結合部位の欠失変異導入や部位特異的変異導入が NPAS4 プロモーター活性に及ぼす影響を解析した。

(2) NPAS4 プロモーター活性のエピジェネティック制御を解析した(エピジェネティクス解析)。長期のストレス負荷が NPAS4 プロモーター上の DNA メチル化に及ぼす影響をパイロシーケンシングにより解析した。

(3) NPAS4 遺伝子欠損動物の行動試験や脳機能のバランス異常について解析した(NPAS4 欠損動物の *in vivo* 解析)。

4. 研究成果

平成 23 年度は、NPAS4 の発現をグルココルチコイド(GC)が抑制することを見だし、さらにプロモーターアッセイを用いて NPAS4 プロモーターにおけるグルココルチコイド受容体 (GR) の作用部位を調べた。

3 時間の拘束ストレス負荷時に GR アンタゴニストを腹腔投与したところ、NPAS4 発現低下が抑制されたことからストレス下で増加する GC が NPAS4 発現を抑制することが示唆された。次に、NPAS4 のプロモーター領域をルシフェラーゼ cDNA の上流に組み込んだレポーターアッセイプラスミドを用いて、NPAS4 プロモーター活性を GC が抑制するかどうかについて調べた。レポーターアッセイプラスミド導入後の Neuro2A の培地に GR アンタゴニストを添加すると、濃度依存的に NPAS4 プロモーター活性が上昇したことから、NPAS4 プロモーター活性が GC により抑制されることが明らかとなった。NPAS4 プロモーターには、転写開始点から 1~2kb 上流の付近に GR が結合する配列であるグルココルチコイドレスポンスエレメント(GRE)が集中しており、この領域を段階的に欠失した変異プロモーターでは活性が著しく上昇した。さらに、クロマチン IP アッセイによって NPAS4 プロモーターへの GR の結合も示されたことから、GC による直接的な NPAS4 プロモーター活性抑制が示唆された。

平成 24 年度は、NPAS4 の転写抑制についてさらに詳細に追究するため、この 2kb 上流付近の 5 つの GREs に部位特異的変異導入を行い、GR が結合する部位を特定した。さらに、マウス脳海馬においても拘束ストレス依存的に NPAS4 プロモーターと GR との結合が増大することをクロマチン IP アッセイによって確認し、ストレスがグルココルチコイドを介して NPAS4 プロモーター活性を抑制することを示した。この成果は、Journal of Neurochemistry に掲載された。

平成 25 年度はストレス負荷による Npas4 プロモーターの DNA メチル化亢進についてさらに詳しく解析し、3 週間の拘束ストレスが Npas4 プロモーターの転写開始点付近の CpG アイランドの DNA メチル化を亢進する

ことを明らかにした。この領域に含まれる 2 つの CRE 配列に部位特異的変異を導入すると Npas4 プロモーター活性が低下したことから、これらの CRE 配列が Npas4 プロモーター活性に重要であり、ストレス負荷が誘発する DNA メチル化亢進が CRE 配列を介した Npas4 転写を抑制したことが示唆された。この成果は現在投稿中である。

次に、ストレスによる Npas4 の発現低下が脳神経機能に及ぼす影響を追究するために 13~30 週齢の NPAS4 遺伝子欠損(NPAS4-KO) マウスを用いて、行動量測定、オープンフィールド試験、Y 迷路試験、新奇物体認知試験、恐怖条件付け記憶試験、社会性行動試験、高架式十字迷路試験、プレパルス抑制試験(PPI)の各試験を行った。NPAS4-KO マウスは野生型マウスと比較して多動を示し、高架式十字迷路試験では、不安様行動の減少が示された。また、記憶能力の低下も恐怖記憶試験により示唆された。さらに、PPI の顕著な低下から、NPAS4-KO マウスでは感覚情報処理能力が障害されていることが示唆された。この様なフェノタイプを表す要因の候補として、NPAS4-KO マウスでは野生型マウスと比較して GABA 受容体の発現が低下しているという予備的データを得た。

今後は、抑制性シナプス機能に NPAS4 が及ぼす影響を解析し、脳機能のバランス維持における NPAS4 の役割を追究したい。

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 16 件)

- (1) Miyamoto Y., Ishikawa Y., Iegaki N., Furukawa-Hibi Y., Nabeshima T., Uno K., Nitta A. (他 4 名) : Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 1-12(2014) (査読有)
- (2) Toriumi K., Kondo M., Nagai T., Furukawa-Hibi Y., Mamiya T., Fukushima T., Takeda M., Nitta A., Yamada K., Nabeshima T. (他 7 名) : Deletion of SHATI/NAT8L increases dopamine D1 receptor on the cell surface in the nucleus accumbens, accelerating methamphetamine dependence. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 443-453 (2014) (査読有)
- (3) Narita A., Muramatsu H., Sakaguchi H., Furukawa-Hibi Y., Yamada K. and Kojima S. (他 9 名) : Correlation of CYP2C19 Phenotype with Voriconazole Plasma Concentration in Children. *J. Pediat. Hematol. Onc.* 35(5), e219-223 (2013) (査読有)
- (4) Toriumi K., Ikami M., Furukawa-Hibi Y., Nagai T., Mamiya T., Nitta A., Yamada K. and Nabeshima T. (他 3 名) : SHATI/NAT8L regulates neurite outgrowth via microtubule stabilization. *J. Neurosci. Res.* 91, 1525-1532 (2013) (査読有)
- (5) Yun, J., Nagai T., Furukawa-Hibi Y., Kuroda, K., Kaibuchi, K. and Yamada K.: Neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) regulates neurite outgrowth and phosphorylation of synapsin I. *J. Biol. Chem.* 288, 2655-2664 (2013) (査読有)
- (6) 日比陽子 : アルツハイマー型認知症治療薬について ファルマシア 49(6), 539-543 (2013) (査読無)
- (7) Furukawa-Hibi Y., Yun, J., Nagai T. and 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) (査読有)
- (8) Furukawa-Hibi Y., Nitta, A., Furukawa, S., Nabeshima, T. and Yamada K. (他 3 名) : Absence of SHATI/Nat8l reduces social interaction in mice. *Neurosci. Lett.* 526, 79-84 (2012) (査読有)
- (9) Doisaki, S., Muramatsu, H., Shimada, A., Furukawa-Hibi Y., Yamada K., Tanaka, M., Hama, A., Koike, K. and Kojima, S. (他 16 名) : Somatic mosaicism for oncogenic *NRAS* mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, 120(7), 1485-1488 (2012) (査読有)
- (10) Iriyama, C., Tomita, A., Furukawa-Hibi Y., Yamada K., Kiyoi, H., Naoe, T. (他 2 名) : Using peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation status and genetic mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 419(4), 662-669 (2012) (査読有)
- (11) 日比陽子, 山田清文 : 神経系におけるブチリルコリンエステラーゼの機能 *Clinical Neuroscience* 30(6), 672-674 (2012) (査読有)
- (12) 永井 拓, 尹 在錫, 衣斐大祐, 小池宏幸, 日比陽子, 山田清文 : ストレスにより誘発される脳機能障害とストレス応答性転写因子 Npas4 の機能解析 日本薬理学雑誌 139, 147-151 (2012) (査読無)

- (13) Nakatani, M., Shinohara, Y., Furukawa-Hibi, Y., Miyamoto, Y., Nitta, A. (他 4 名): Periocular injection of in situ hydrogels containing Leu-Ile, an inducer for neurotrophic factors, promotes retinal ganglion cell survival after optic nerve injury *Experimental Eye Research*, 93(6), 873-879 (2011) (査読有)
- (14) Furukawa-Hibi, Y., Alkam T., Nitta, A., Nagai, T. and Yamada, K. (他 6 名): Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice. *Behavioural Brain Research*, 225, 222-229 (2011) (査読有)
- (15) Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Ikeda, T., Nabeshima, T., and Yamada, K. (他 4 名): The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF. *Behavioural Brain Research*, 220, 271-280 (2011) (査読有)
- (16) 日比陽子: ストレスによる精神疾患の発症に DNA メチル化が関与する **ファルマシア** 47(7), 663-664 (2011) (査読有)
- 〔学会発表〕(計 14 件)
- (1) 日比(古川)陽子, 永井 拓, 山田 清文: 長期ストレスは GABA 神経関連転写因子 Npas4 遺伝子の DNA メチル化を亢進する Chronic stress increases DNA methylation of Neuronal PAS domain 4 (Npas4), **第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会**: 沖縄県宜野湾市 沖縄コンベンションセンター (2013 年 10 月 24~26 日)
- (2) 日比(古川)陽子, 横井 順平, 永井 拓, 山田 清文: 脳特異的転写因子 Npas4 欠損マウスにおける異常行動と GABA 作動性神経系マーカーの変化, **第 123 回日本薬理学会近畿部会**: 愛知県名古屋市 愛知県産業労働センター (2013 年 7 月 12 日)
- (3) Yoko Hibi, Jaesuk Yun, Taku Nagai, and Kiyofumi Yamada: Transcriptional suppression of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene by stress via glucocorticoid receptor in the brain, **11th WFSBP**: 京都府京都市 京都国際会館(2013 年 6 月 23~27 日)
- (4) Yoko Hibi, Jaesuk Yun, Taku Nagai, and Kiyofumi Yamada: グルココルチコイド受容体は神経分化関連因子 NPAS4 の転写を直接抑制する Direct transcriptional regulation of neuronal transcription factor Npas4 by glucocorticoid receptor, **第 86 回日本薬理学会**: 福岡県博多市 福岡国際会議場 (2013 年 3 月 21~23 日)
- (5) Yoko Hibi, Jaesuk Yun, Taku Nagai, and Kiyofumi Yamada: Glucocorticoid reduces the gene expression of neuronal PAS domain 4 (Npas4) in the brain, **ASCB2012**: USA サンフランシスコ (2012 年 12 月 15~19 日)
- (6) Yoko Hibi, Jaesuk Yun, Taku Nagai, and Kiyofumi Yamada: Stress regulates the gene expression of neuronal transcription factor Npas4 via glucocorticoid, **第 4 回 GCOE 国際シンポジウム**: 愛知県名古屋市 ウエスティンナゴヤキャッスルホテル (2012 年 11 月 15~16 日)
- (7) Yoko Hibi, Jaesuk Yun, Taku Nagai, and Kiyofumi Yamada: Transcriptional regulation of neuronal PAS domain 4 (NPAS4) by glucocorticoid receptor, **The 11th APSN, The 55th JSN** (日本神経化学会): 兵庫県神戸市 神戸国際会議場 (2012 年 9 月 30~10 月 2 日)
- (8) Yoko Hibi, Jaesuk Yun, Taku Nagai, and Kiyofumi Yamada: Stress regulates the gene expression of neuronal PAS domain 4 (Npas4), via glucocorticoid receptor, **CINP 2012**: スウェーデン ストックホルム (2012 年 6 月 3~7 日)
- (9) 日比 陽子, コン ジェスク, 永井 拓, 山田 清文: グルココルチコイドによる転写因子 NPAS4 の発現抑制機構 Glucocorticoid regulates the expression of neuronal PAS domain 4 (Npas4), **第 7 回統合失調症学会**: 愛知県名古屋市 愛知県産業労働センター (2012 年 3 月 16~17 日)
- (10) 日比(古川)陽子, アルカム・トルソン, 新田淳美, 松山明裕, 永井 拓, 山田 清文: プチリルコリンエステラーゼ阻害剤のアミロイドベータ誘発性認知機能障害改善効果 Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice, **第 85 回日本薬理学会年会**: 京都府京都市 京都国際会館 (2012 年 3 月 14~16 日)
- (11) 日比(古川)陽子, コン ジェスク, 永井 拓, 山田 清文: 神経発達関連転写因子 NPAS4 の発現調節機構の解明, **第 34 回日本分子生物学会年会**: 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 (2011 年 12 月 13~16 日)

- (12) Yoko Hibi, Jaesuk Yun, Taku Nagai and Kiyofumi Yamada: Stress reduces the expression of transcription factor, neuronal PAS domain 4 (NPAS4), **AsCNP2011** : 韓国 ソウル市 (2011年9月23~24日)
- (13) Yoko Hibi, Jaesuk Yun, Taku Nagai, Kiyofumi Yamada: ストレスによる neuronal PAS domain 4 (NPAS4)の転写制御 Transcriptional regulation of neuronal PAS domain 4 (NPAS4) by stress, **Neuroscience 2011** : 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 (2011年9月14~17日)
- (14) 日比(古川)陽子、ユン ジェスク、永井 拓、山田 清文: 神経発達関連転写因子 NPAS4 のストレスによる転写抑制機構の解明, **第 119 回日本薬理学会近畿部会**: 愛知県名古屋市 愛知県産業労働センター (2011年7月8日)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日比陽子 (HIBI YOKO)
名古屋大学・医学部附属病院 特任助教
研究者番号 : 70295616

(2)研究分担者

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
(H23-24)

(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