

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23790081

研究課題名（和文）

薬物依存症における転写調節因子 N p a s 4 の役割

研究課題名（英文）

ROLE OF TRANSCRIPTION FACTOR NPAS4 IN DRUG DEPENDENCE

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

薬物依存は持続性で長期断薬後もストレスなどにより容易に再発することから新たな遺伝子・タンパク質発現を伴うシナプスの機能的および構造的変化が関与していると考えられている。我々は種々のストレスによって発現変化を示す遺伝子として Npas4 を同定している。本研究では、薬物依存症における Npas4 の病態生理学的な役割について検討した。その結果、メタンフェタミン連続投与に伴い Npas4 の発現が増加すること、神経突起伸展に Npas4 が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It has been proposed that activity-dependent synaptic plasticity and remodeling of the mesolimbic dopaminergic system play a crucial role in the development of drug dependence. We previously reported that reduced Npas4 mRNA levels might contribute to impairments in memory and emotional behaviors induced by social isolation or restriction stress. In this study, we investigated pathophysiological role of NPAS4 in the drug dependence. Our results suggest that Npas4 plays an important role in the structural and functional plasticity of neurons. In addition, we assume that repeated administration of methamphetamine increases the expression levels of Npas4 in the hippocampus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経精神薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬物依存、転写因子、メタンフェタミン

1. 研究開始当初の背景

薬物依存とは、生体と薬物間の相互作用の結果生じた精神的・身体的状態であり、薬物による精神的効果を体験するため、また時に禁断時の不快を避けるために、連続的または周期的にその薬物を求めようとする強迫的行動あるいはその他の反応を特徴とする状態である。依存性薬物は脳内の報酬回路を活性化して報酬効果を示すことが知られており、中脳腹側被蓋野から側坐核および前頭前

皮質に投射する中脳辺縁系ドーパミン作動性神経系は報酬回路を構成する重要な神経系の一つである。メタンフェタミンなどの覚せい剤は依存誘発作用の強い薬物であり、世界的規模でその乱用が問題となっている (United Nations Office on Drugs and Crime: 2007 World Drug Report)。メタンフェタミンはドーパミントランスポーターの基質であり、ドーパミントランスポーターを介してドーパミン作動性神経に取込まれる。細胞内

に取込まれたメタンフェタミンはシナプス小胞のトランスポーターを阻害し、ドパミントランスポーターを介してドパミンを細胞内から細胞外へ逆輸送することにより細胞外ドパミン量を増加して急性の精神運動興奮を誘発することが知られている (J Neurosci, 1995)。長期的にメタンフェタミンを使用している乱用者は統合失調症の陽性症状に類似した幻覚・妄想などの精神症状を呈する (Biol Psychiatry, 1983)。さらに、メタンフェタミン乱用者では認知障害が長期間にわたり認められることが報告されている (Am. J. Addict, 2000)。

これまでの研究により、依存性薬物の乱用により報酬回路の異常興奮が長期間持続すると、報酬回路に病的な可塑的变化が生じ、「渴望」を伴う依存状態になると考えられている。依存性薬物の乱用が薬物依存につながる分子機構は未だよくわかっていないが、新たな遺伝子・タンパク質発現を伴うシナプスの機能的および構造的変化が関与していると考えられている (Nat Rev Neurosci, 2001)。我々は、薬理作用としては中枢抑制と興奮と全く逆の作用を示すモルヒネとメタンフェタミンによる薬物依存に共通して遺伝子発現変化を示す生体分子を同定するため、モルヒネあるいはメタンフェタミン依存動物の脳内遺伝子発現を網羅的に解析した。

その結果、組織プラスミノーゲン活性化因子 (tPA) および腫瘍壊死因子 (TNF α) を薬物依存関連候補分子として同定している (Nagai T, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2004; Nakajima A, et al. J Neurosci, 2004)。一方、薬物依存は持続性で長期断薬後もストレスなどにより容易に再発することが知られている。我々は、長期隔離飼育および拘束ストレスにより発現変化を示す遺伝子として Npas4 を DNA マイクロアレイ法による網羅的解析から見出した (Ibi et al, J Neurochem, 2008; Yun et al, J Neurochem, 2010)。Npas4 は novel bHLH-PAS factor (NXF) あるいは limbic-enriched PAS (LE-PAS) とも呼ばれる脳特異的転写調節因子であり、大脳皮質、海馬、線条体などの辺縁系に高発現している (Mol Cell Biol, 2004; Mol Brain Res, 2004)。最新の報告では、Npas4 の発現は活動依存的に制御され、特に抑制性シナプスの形成に重要であることが証明されている (Nature, 2008)。神経疾患における Npas4 の役割に関連して、脳虚血 (Eur J Neurosci, 2006) やてんかんモデル動物 (Eur J Neurosci, 2004) で Npas4 の発現が増加していることが報告されている。これらの報告は、Npas4 が依存性薬物による遺伝子発現調節あるいはストレスが引き金となる薬物依存の再発に関与していることを示唆しているが、Npas4 の病態生理的

役割はほとんど分かっていないのが現状である。

2. 研究の目的

上記の観点を踏まえて、本研究の最終目標は、覚せい剤 (メタンフェタミン) 依存症における Npas4 の病態生理学的な役割を明らかにし、新規創薬標的分子を探索することである。

1. メタンフェタミン投与後の Npas4 の発現変化について調べ、その機序を明らかにする。

2. 薬物依存状態では Npas4 がどのような分子の発現調節に関与しているかを調べ、Npas4 の標的遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

メタンフェタミン投与後の Npas4 の発現変化

ICR 系雄性マウスにメタンフェタミン (2 mg/kg) を 1 日 1 回、10 日間連続投与した。脳各部位における Npas4 mRNA およびタンパクは、それぞれ real time-RT PCR 法およびウエスタンブロット法により定量した。ドパミン D1 受容体アンタゴニスト SCH23390 および D2 受容体アンタゴニスト raclopride はメタンフェタミン投与 30 分前に腹腔内投与した。

In vitro 解析

Neuro2A 細胞を分化誘導するためにはリチウムを処置し、形態変化 (突起の長さ) と機能変化 (リン酸化 synapsin I) および Npas4、NeuN のレベルを定量した。また、Npas4 発現ベクターおよび siRNA を処置した Neuro2A 細胞を用いて、リチウム処置による突起伸長がどう変化するかを解析した。また、Cdk5 遺伝子プロモーターへの Npas4 の結合を ChIP assay で調べた。

4. 研究成果

メタンフェタミン投与後の Npas4 の発現変化

メタンフェタミン連続投与により海馬における Npas4 mRNA およびタンパク発現が有意に増加した (図 1)。一方、メタンフェタミン単回投与では有意な変化は認められなかった。メタンフェタミン連続投与による Npas4 発現の増加は海馬に特異的であり、大脳皮質あるいは線条体では変化は認められなかった。さらに、メタンフェタミンによる Npas4 発現の増加は SCH23390 あるいは raclopride の併用投与により抑制された。以上の結果より、メタンフェタミン連続投与に伴う海馬機能の変化に Npas4 の発現増加が関与していることが示唆された。

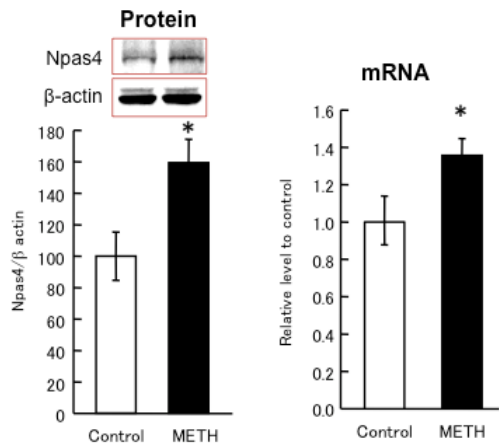


図1.メタンフェタミン投与後のNpas4の発現変化

Neuro2A 細胞の分化誘導による Npas4 およびリン酸化 synapsin I の発現変化

Neuro2A 細胞にリチウムを含む培地を添加すると神経分化が誘導され、神経突起の伸展などの形態学的変化が観察された (図 2A)。Neuro2A 細胞を分化誘導培地で 48 時間処置すると、神経突起の伸展に伴いリン酸化 synapsin I の発現レベルが有意に増加した (図 2B)。一方、synapsin I の発現レベルは分化誘導培地を処置しても有意な変化は認められなかった。次に、分化誘導培地処置による神経突起伸展およびリン酸化 synapsin I の増加が Npas4 の発現変化と関係しているかどうかを調べた結果、分化誘導培地処置は Neuro2A 細胞の Npas4 mRNA 発現レベルを有意に増加させた (図 2C)。

Neuro2A 細胞の神経突起伸展における Npas4 ノックダウンの影響

分化誘導培地による神経突起伸展と Npas4 発現増加との因果関係を調べるため、RNA 干

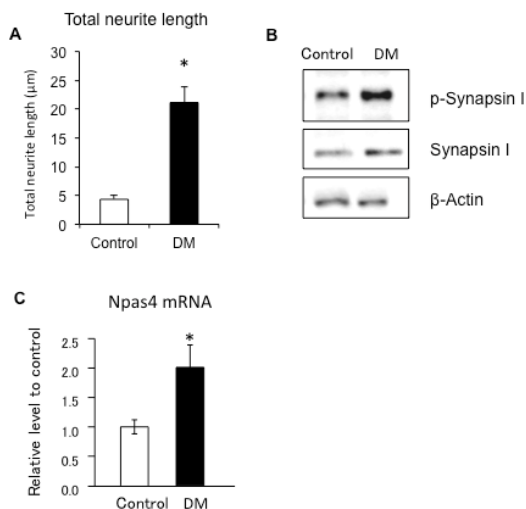


図2. Neuro2A細胞の分化誘導によるNpas4およびリン酸化synapsin Iの発現変化

渉法を用いて Npas4 をノックダウンして分化誘導培地による神経突起伸展が抑制される

かどうかを検討した。Npas4 に特異的な siRNA を導入した Neuro2A 細胞では分化誘導培地処置による神経突起伸展が有意に抑制された (図 3A)。一方、コントロール siRNA を導入した細胞では神経突起伸展は影響を受けなかった。

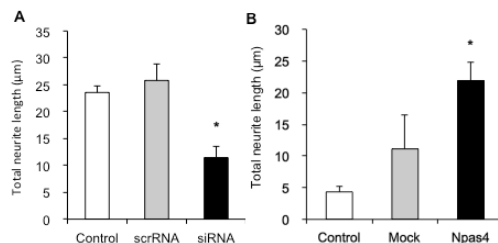


図3. Neuro2A細胞の神経突起伸展におけるNpas4の作用

Neuro2A 細胞の神経突起伸展に対する Npas4 強制発現系の影響

Neuro2A 細胞の神経突起伸展における Npas4 の役割を更に明確にするため、Npas4 過剰発現による影響について調べた。Npas4 遺伝子導入して 72 時間後の細胞に分化誘導培地を 12 時間処置して神経突起の長さを調べた。本実験条件ではコントロール細胞の神経突起伸展は殆ど観察されなかったのに対して、Npas4 過剰発現細胞では神経突起の伸展が促進された (図 3B)。

Neuro2A 細胞の NeuN、Cdk5 およびリン酸化 synapsin I の発現に対する Npas4 強制発現系の影響

神経細胞の成熟に対する Npas4 の役割について明らかにするため、Npas4 強制発現細胞における成熟神経細胞のマーカーである NeuN およびリン酸化 Synapsin I の発現レベルについて検討した。Npas4 遺伝子導入 72 時間後の Neuro2A 細胞からタンパク質を抽出してイムノプロット解析を行った。Npas4 過剰発現細胞ではリン酸化 synapsin I の増加が認められた (図 4C)。また、Npas4 過剰発現細胞では NeuN タンパクおよび Cdk5 タンパクの増加も認められた (図 4A)。一方、コントロール細胞では有意な変化は観察されなかった。

Npas4 過剰発現 Neuro2A 細胞における Cdk5 活性

Npas4 過剰発現と Cdk5 やリン酸化 Synapsin I の発現増加との因果関係を明らかにするため、Npas4 過剰発現が Cdk5 の活性に与える影響についてキナーゼアッセイを行った。コントロール細胞と比較して、Npas4 過剰発現細胞では Cdk5 活性が有意に増加した (図 4B)。

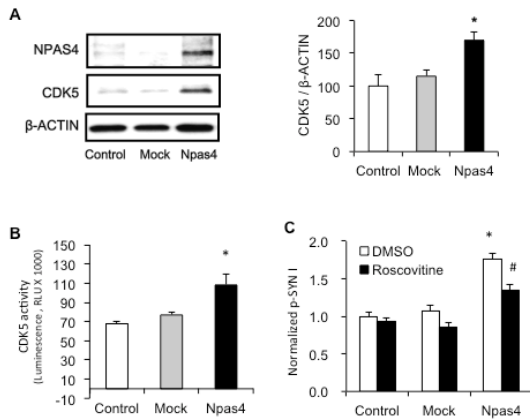


図4. Npas4過剰発現Neuro2A細胞に認められるCdk5とリン酸化Synapsin Iの増加

Npas4 過剰発現 Neuro2A 細胞に認められるリン酸化 Synapsin I の増加に対する Cdk5 の関与

本研究で使用した抗リン酸化 Synapsin I 抗体は Synapsin I の 553 番目のセリン残基を認識し、このリン酸化部位は Cdk5 の基質となることが知られている。そこで、Npas4 遺伝子導入 24 時間および 72 時間後のリン酸化 Synapsin I と Cdk5 タンパクの経時的な発現量について調べた。コントロールまたは Npas4 遺伝子導入 72 時間後におけるリン酸化 Synapsin I と Cdk5 タンパクの発現は正の相関を示した。また、Npas4 過剰発現細胞におけるリン酸化 synapsin I の増加や神経突起伸長は Cdk5 阻害剤である Roscovitine により拮抗された (図 4C)。

海馬初代培養神経細胞におけるリン酸化 Synapsin I、neurofilament、Tuj1 の発現と神経突起伸長

Neuro2A 細胞で観察された Npas4 によるリン酸化 Synapsin I の増加について海馬由来初代培養神経細胞でも確認した。Npas4 を過剰発現させた神経細胞ではリン酸化 synapsin I の発現増加が観察されたが、コントロールベクターを導入した神経細胞では有意な変化は観察されなかった。次に、神経突起のマーカーである neurofilament と Tuj1 の発現量を野生型と Npas4 遺伝子欠損マウス (Npas4 KO) で比較した。Npas4 KO マウスにおいて、neurofilament と Tuj1 の発現量は野生型マウスに比べて減少していた。また、neurofilament と Tuj1 陽性の神経突起の長さも Npas4 KO マウスで有意に短縮し、神経突起の複雑性も減少していた。さらに、野生型マウス由来神経細胞に KCl を処置すると樹状突起の長さや複雑性が増したが、Npas4 KO マウス由来の神経細胞では有意な変化は観察されなかった。

Cdk5 および NeuN 遺伝子プロモーター領域に対する Npas4 の結合活性

Npas4 が Cdk5 および NeuN 遺伝子プロモーター領域に作用するかどうかを ChIP アッセイにより調べた。分化誘導培地を処置した Neuro2A 細胞において Npas4 タンパクが Cdk5、NeuN および Npas4 遺伝子プロモーター領域に結合することを確認した。また、海馬由来初代培養神経細胞では KCl 処置により Npas4 の発現が誘導され、Npas4 および Cdk5 遺伝子プロモーター領域へ Npas4 タンパクが結合することを同様に確認した。さらに、Npas4 タンパクは Cdk5 のコアクチベーターである p35 遺伝子のプロモーター領域へも結合活性を示した (図 5)。

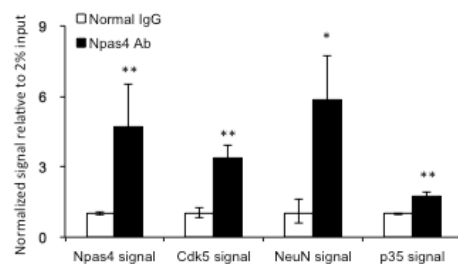


図5. Npas4, Cdk5, NeuNおよびp35遺伝子プロモーター領域に対するNpas4の結合活性

これらの結果から、メタンフェタミン連続投与に伴い Npas4 の発現が増加すること、Npas4 は NeuN および Cdk5 遺伝子の発現制御に関与していることが示唆された。さらに、Npas4 は Cdk5 の誘導を介して synapsin I のリン酸化を亢進することが示唆された。これら Npas4 の発現とそれに続く神経細胞の機能的および構造的変化が薬物依存に伴う神経可塑性に関与していると考えられる。

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 11 件)

1. Nagai, T., Kitahara, Y., Ibi, D., Nabeshima, T., Sawa, A., Yamada, K. Effects of antipsychotics on the behavioral deficits in human dominant-negative DISC1 transgenic mice with neonatal polyI:C treatment. Behav. Brain Res. 225: 305-310, 2011. 査読有
2. Kuroda, K., Yamada, S., Tanaka, M., Iizuka, M., Yano, H., Mori, D., Tsuboi, D., Nishioka, T., Namba, T., Iizuka, Y., Kubota, S., Nagai, T., Ibi, D., Wang, R., Enomoto, A., Isotani-Sakakibara,

- M., Asai, N., Kimura, K., Kiyonari, H., Abe, T., Mizoguchi, A., Sokabe, M., Takahashi, M., Yamada, K., Kaibuchi, K. Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the DISC1 gene in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 20: 4666-4683, 2011. 査読有
3. Koseki, T., Mouri, A., Mamiya, T., Aoyama, Y., Toriumi, K., Suzuki, S., Nakajima, A., Yamada, T., Nagai, T., Nabeshima, T. Exposure to enriched environments during adolescence prevents abnormal behaviours associated with histone deacetylation in phencyclidine-treated mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18: 1-13, 2011. 査読有
 4. Toriumi, K., Mouri, A., Narusawa, S., Aoyama, Y., Ikawa, N., Lu, L., Nagai, T., Mamiya, T., Kim, H.C., Nabeshima, T. Prenatal NMDA receptor antagonism impaired proliferation of neuronal progenitor, leading to fewer glutamatergic neurons in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 37, 1387-1396, 2012. 査読有
 5. Takuma, K., Mizoguchi, H., Funatsu, Y., Hoshina, Y., Himeno, Y., Fukuzaki, E., Kitahara, Y., Arai, S., Ibi, D., Kamei, H., Matsuda, T., Koike, K., Inoue, M., Nagai, T., Yamada, K. Combination of chronic stress and ovariectomy causes conditioned fear memory deficits and hippocampal cholinergic neuronal loss in mice. *Neuroscience*, 207, 261-273, 2012. 査読有
 6. Takuma, K., Mizoguchi, H., Funatsu, Y., Kitahara, Y., Ibi, D., Kamei, H., Matsuda, T., Koike, K., Inoue, M., Nagai, T., Yamada, K. Placental extract improves hippocampal neuronal loss and fear memory impairment resulting from chronic restraint stress in ovariectomized mice. *J. Pharmacol. Sci.*, 120, 89-97, 2012. 査読有
 7. 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. 査読有
 8. Nagai, T., Yu, J., Kitahara, Y., Nabeshima T., Yamada, K. D-serine ameliorates neonatal polyI:C treatment-induced emotional and cognitive impairments in adult mice. *J. Pharmacol. Sci.*, 120, 213-227, 2012. 査読有
 9. Zhang, L., Nagai, T., Yamada, K., Ibi, D., Ichihara, S., Subramanian, K., Huang, Z., Mohideen, S.S., Naito, H., Ichihara G. Effects of sub-acute and sub-chronic inhalation of 1-bromopropane on neurogenesis in adult rats. *Toxicology*. 304C, 76-82, 2012. 査読有
 10. Yun, J., Nagai, T., Furukawa-Hibi, Y., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Greenberg, M.E., 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
 11. Ibi, D., Nagai, T., Nakajima, A., Mizoguchi, H., Kawase, T., Tsuboi, D., Kano, S.I., Sato, Y., Hayakawa, M., Lange, U.C., Adams, D.J., Surani, M.A., Satoh, T., Sawa, A., Kaibuchi, K., Nabeshima, T., Yamada, K. Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *Glia*. 61, 679-693 2013. 査読有
- [学会発表] (計 6 件)
1. 永井拓, 尹錫在, 日比陽子, 山田清文. 神経精神発達に対する幼若期ストレスの影響. (シンポジウム 生活環境が作り出す脳機能の多様性. 座長 永井拓, 古屋敷智之). 第 54 回日本神経化学学会大会 (加賀, 瑠璃光), (2011.9.26-28).
 2. 永井拓. プロテアーゼを介した薬物依存形成の神経化学的機序. (シンポジウム ニコチン/アルコール依存の病態とその解明). 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会 (東京, 京王プラザホテル), (2011.10.27-29).
 3. 永井拓. 周産期における異常免疫応答と神経発達障害. (シンポジウムストレスによる脳機能障害の分子基盤). 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会 (東京, 京王プラザホテル), (2011.10.27-29).
 4. 尹錫在, 永井拓, 日比陽子, 黒田啓介, 貝淵弘三, 山田清文. Npas4 regulates neurite outgrowth and phosphorylation of synapsinI. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会 (東京, 京王プラザホテル),

- (2011. 10. 27-29).
5. 永井拓. 精神疾患モデル動物を用いた神経精神薬理学的研究 (特別講演). 第 16 回日本神経麻酔・集中治療研究会 (岡山, 岡山コンベンションセンター/岡山大学), (2012. 4. 13-14).
 6. 永井拓, ドパミン作動性およびグルタミン酸作動性神経伝達の変調と障害に関する神経精神薬理学的研究 (日本神経精神薬理学会 2012 年 第 1 回学術奨励賞受賞講演). 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会 (宇都宮, 栃木県総合文化センター/宇都宮東武ホテルグランデ), (2012. 10. 18-20).

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/pharmacy/02/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
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
- (2) 研究分担者なし
- (3) 連携研究者なし