

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22687

研究課題名（和文）内在性の神経回路編成機構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 reshaping neuronal circuits in an activity-dependent manner

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：脳血管障害は本邦の死因の4位となる発生頻度の高い疾患であり、その多くを占める脳梗塞に関して発症初期の脳内変化を研究する事は、効果的な治療法を開発するのに極めて重要である。我々は、健全な脳において、刺激による神経活動依存的にニューロンの発達を促進する転写因子Npas4（Cell Rep, 8, 2014）が、脳虚血後の大脳皮質において、梗塞巣の拡大を防ぎ、予後の運動機能を改善する機能を持つ事を明らかにした（PNAS, 118, 2021）。本研究により、Npas4が低分子G蛋白質Gemを介して、ニューロンの細胞死を抑制する機構が解明されると共に、Gemが革新的な治療法の標的となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子Npas4は健全脳と病態脳の双方において、神経回路の再編を促進し、その破綻を抑制するのに重要な働きをする事が示唆されていた。本研究により、病態脳における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なり、健全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事が可能になった。

現在の脳梗塞治療法はt-PA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には適用できない。Npas4下流のGemを標的とした新規治療薬は、出血傾向のある患者にも適用できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cerebrovascular diseases are the fourth most frequent cause of death in Japan. It is extremely important to study neuronal changes in the brain during the early stages of cerebral stroke, which accounts for a large proportion of these diseases, in order to develop effective therapies. We demonstrated that the transcription factor Npas4 (Cell Rep, 8, 2014), which promotes neuronal development in a stimulation-dependent manner in the healthy brain, also functions in the cerebral cortex after cerebral ischemia to prevent the expansion of infarct foci and to improve prognostic motor function (PNAS, 118, 2021). This study elucidates the mechanism by which Npas4 promotes neuroprotection from cell death via the small G-protein Gem, which is expected to result in a target for innovative therapeutics.

研究分野：神経科学、分子生物学

キーワード：神経科学 神経可塑性 脳神経疾患 脳梗塞モデルマウス 神経活動依存性 神経保護 転写因子 低分子量Gタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は、本邦死因の4位となる発生頻度の高い疾患である。しかし、脳血管疾患の多くを占める、脳梗塞により脳が損傷した場合、失われた神経細胞や回路を補填するのに有効な治療法は、未だに確立されていない。また脳血管疾患は、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(図1)。一方、梗塞巣の周辺は“ペナンブラ”と呼ばれ、ニューロンが生死の境にある領域と考えられ、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<sup>1)</sup>。興味深いことに、ペナンブ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<sup>2,3)</sup>。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<sup>4)</sup>が、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<sup>5)</sup>。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。

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、「脳梗塞の発生初期に、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) の手術を行った。

(2) 試験管内での虚血様負荷を用いた解析: マウス胎児の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。

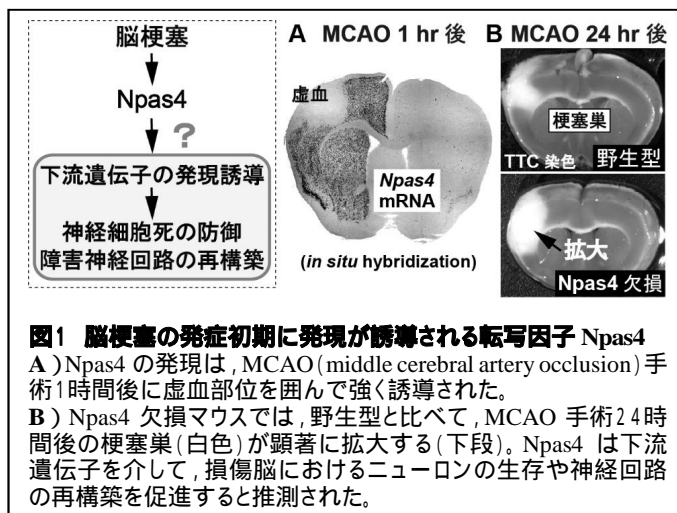
## 4. 研究成果

(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、ペナンブラで発現が

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ものは転写因子 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)<sup>6)</sup>。

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)<sup>6)</sup>。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



脳梗塞に伴う血流の低下により、ニューロンの膜電位は上昇し、異常な細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  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”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<sup>7)</sup>。Npas4 は広汎性脱分極により発現誘導されることが示唆されているが<sup>8)</sup>、その役割は明らかにされていない。そこで、我々は、マウス初代培養ニューロンに OGD 処理を行い、以下の点を明らかにした(図2)。

2-1) 虚血様負荷を与えた初代培養ニューロンにおいても、Npas4 の発現が誘導され、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの阻害剤であるニフェジピン投与により、細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を抑制すると、その発現は減少した<sup>6)</sup>。従って、Npas4 は虚血に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル伝達により発現が誘導されると考えられた。

2-2) Npas4 欠損マウス由来の培養ニューロンに虚血様負荷を与えると、細胞死が顕著に増加した<sup>6)</sup>。また、野生型マウス由来の培養ニューロンで、Npas4 を過剰発現させた後に虚血様負荷を与えると、細胞死が減少した(図2)。

2-3) Npas4 を過剰発現させた培養ニューロンでは、虚血様負荷による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が抑えられたので<sup>6)</sup>、Npas4 は細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を阻害することにより、細胞死を抑制することが示唆された(図2)。

2-4) 初代培養ニューロンで、Npas4 下流の候補遺伝子 13 個をそれぞれ発現させたものに対して、脳虚血様負荷を 10 分間与え、24 時間後にヨウ化プロビジウム染色を用いて死細胞数を調べた<sup>6)</sup>。その結果、Npas4 に加えて、Ras 低分子量 G タンパク質ファミリーに属する Gem の遺伝子発現が虚血様負荷後の神経細胞死を減少させることがわかった(図3)<sup>6)</sup>。

### (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<sup>6)</sup>。

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、発症から治療までに有効な期間が5時間以内と制限されており、また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、発症から治療までに有効な期間がより長く、出血傾向のある患者さんにも適用できると期待される。

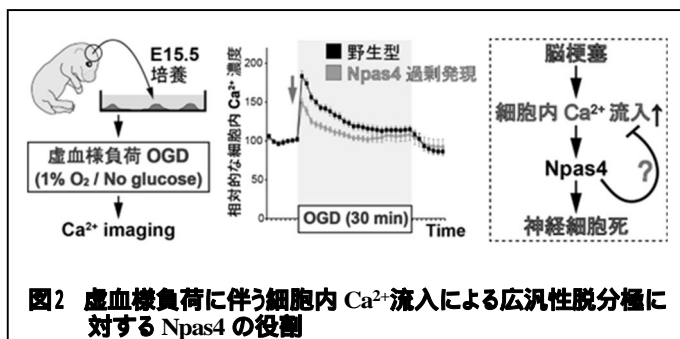


図2 虚血様負荷に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入による広汎性脱分極に対する Npas4 の役割

胎生 15.5 日目のマウス脳から培養した大脳皮質ニューロン(左図)に Npas4 を過剰発現させると、虚血様負荷 OGD (oxygen-glucose deprivation) に起因する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が顕著に抑制された(中央の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング図)。

虚血によるニューロンにおける異常な脱分極は“広汎性脱分極”と呼ばれ、虚血部位のみならず周囲のニューロンへ伝搬されるが、Npas4 の発現は虚血時の細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を抑制することにより、神経細胞死を抑制することが示唆された(右図)。

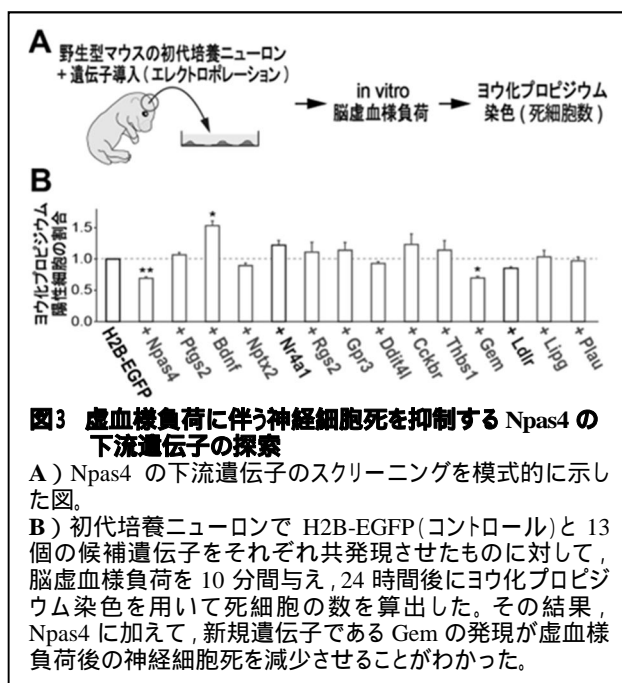


図3 虚血様負荷に伴う神経細胞死を抑制する Npas4 の下流遺伝子の探索

A) Npas4 の下流遺伝子のスクリーニングを模式的に示した図。

B) 初代培養ニューロンで H2B-EGFP (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ものに対して、脳虚血様負荷を 10 分間与え、24 時間後にヨウ化プロビジウム染色を用いて死細胞の数を算出した。その結果、Npas4 に加えて、新規遺伝子である Gem の発現が虚血様負荷後の神経細胞死を減少させることがわかった。

### < 引用文献 >

1. Lo, E.H.: Nat Med 14, 497-500 (2008).
2. Li, P., Murphy, T.H.: J Neurosci 28, 11970-9 (2008).
3. Wu, F., Catano, M., Echeverry, R., et al.: J Neurosci 34, 14219-32 (2014).
4. Silasi, G., Murphy, T.H.: Neuron 83, 1354-68 (2014).
5. Pfisterer, U., Khodosevich, K.: Cell Death & Disease 8, e2643 (2017).
6. Takahashi, H., Asahina, R., Fujioka, M., et al.: Proc Natl Acad Sci USA 118, e2018850118 (2021).
7. Dreier, J.P., Reiffurth, C.: Neuron 86, 902-22, (2015).
8. 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8件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 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, Takeshi K. Matsui, Eiichiro Mori, Satoru Yamamoto, 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 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 Tsuboi LAB <a href="http://tsuboi-lab.osaka1univ2fbs3.jp/">http://tsuboi-lab.osaka1univ2fbs3.jp/</a>
--



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