

令和 3 年 4 月 17 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06465

研究課題名（和文）神経活動依存的な転写因子Npas4が脳梗塞から脳を守るメカニズムの解明

研究課題名（英文）Neural activity-dependent transcription factor Npas4 is required for neuroprotection and survival after stroke

研究代表者

高橋 弘雄 (Hiroo, Takahashi)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：20390685

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞は、極めて発生頻度の高い疾患である。本研究は、脳梗塞の際に活性化する、内在性の神経保護メカニズムに関する解析を行った。研究代表者は、健常な脳で、ニューロンの発達を促進する転写因子Npas4が、脳梗塞後の大脳皮質ニューロンで、強く発現誘導されることを見出した。Npas4欠損マウスやアデノ随伴ウイルスを用いた解析により、Npas4が梗塞巣における細胞死を抑え、予後の運動機能を保つ役割を果たすことを見出した。虚血時のニューロンでは、虚血に伴うCa<sup>2+</sup>流入によりNpas4の発現が誘導され、Npas4は、過剰なCa<sup>2+</sup>流入を防ぐネガティブレギュレーターとして働くことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は発生頻度の高い疾患であり、多くの寝たきりを産んでいる。本研究の成果により、脳梗塞で発現が誘導される転写因子Npas4は、脳梗塞による細胞死を防ぐための、内在性の神経保護メカニズムに必須の因子であることが明らかとなった。今後、Npas4が虚血時のニューロンにおいて細胞死を防ぐメカニズムの詳細を明らかとすれば、その経路を人工的に活性化することも可能となり、新たな脳梗塞の治療や予防に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cerebral infarction is an extremely common disease. This study analyzed the endogenous neuroprotective mechanism activated by cerebral infarction. We found that the transcription factor Npas4, which is known to promote neuronal development in a healthy brain, is strongly induced in cerebral cortical neurons after infarction. Analysis using Npas4-deficient mice and adeno-associated virus revealed that Npas4 plays a role in suppressing cell death in infarct lesions and maintaining prognostic motor function. Npas4 expression was induced by abnormal Ca<sup>2+</sup> influx into ischemic neurons. Npas4 reduces Ca<sup>2+</sup> influx and facilitates cell survival after infarction. These results suggest that Npas4 acts as a negative regulator of Ca<sup>2+</sup> influx in ischemic neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：Npas4 脳梗塞 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は、本邦の死因の4位となる発生頻度の高い疾患である。その多くを占める脳梗塞について、発症後の脳内の変化を研究することは、効果的な治療法の開発のために、極めて重要である。

これまでに研究代表者らは、健常な脳において、神経活動依存的にニューロンの発達を促進する分子メカニズムの研究を行ってきた (J. Neurosci. 32, 2217, 2012; Cell Reports, 8, 843, 2014; J. Neurosci. 36, 8210, 2016)。興味深いことに、健常な脳で、ニューロンの発達を促進する転写因子 **Npas4** は、脳梗塞後の大脳皮質のニューロンで強く発現誘導されることを、研究代表者らは見出した。**Npas4** 欠損マウスで脳梗塞モデルを作製すると、梗塞巣のサイズは顕著に拡大した。そこで本研究では、脳梗塞における転写因子 **Npas4** の役割を明らかとする研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究は、脳梗塞の際に **Npas4** がニューロンの生存を促進するメカニズムの解明を目的とした。内在性の脳を守る分子基盤を明らかとして、新たな治療法に繋がる知見を得ることを目指して研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳梗塞における **Npas4** の機能

初代培養ニューロンに虚血様負荷(1%酸素、グルコース無し)を与える系を用いて、細胞レベルで虚血時の **Npas4** の役割を検討した。虚血ニューロンで起こる異常な  $Ca^{2+}$  流入に関して、 $Ca^{2+}$ インジケータである **Fluo-4** を用いた  $Ca^{2+}$ イメージングにより解析を行った。

### (2) 脳梗塞における **Npas4** の標的遺伝子の探索

転写因子 **Npas4** は標的遺伝子の発現を調節することにより、ニューロンの生存を促進すると予想される。そこで、野生型と **Npas4** 欠損マウスから調整した培養ニューロンに虚血負荷をかけて、1時間後の細胞から RNA を調整した。遺伝子の発現変化を定量 PCR により解析し、**Npas4** の欠損により虚血時の発現量が変化する遺伝子(**Npas4** の標的遺伝子)の探索を行った。

### (3) **Npas4** 過剰発現による脳梗塞の治療

**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死が顕著に抑制される。そこで、アデノ随伴ウイルスを用いて脳梗塞モデルマウス(中大脳動脈閉塞モデル)に **Npas4** を過剰発現する系を確立し、個体レベルで脳梗塞への治療効果の有無を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 脳梗塞における **Npas4** の機能

初代培養ニューロンに虚血様負荷を与える系を用いて、細胞レベルで虚血時の **Npas4** の役割を検討した。虚血時のニューロンは、エネルギーの不足により膜電位が保てなくなり、異常な  $Ca^{2+}$ 流入を示すことが知られる。そこで、初代培養ニューロンに虚血様負荷を与え、その様子を  $Ca^{2+}$ イメージングにより解析した。虚血様負荷により、初代培養ニューロンで異常な  $Ca^{2+}$ 流入が見られることを確認した。同時に、この処理で **Npas4** の発現が、強く誘導されることが分かった。

そこで、この初代培養ニューロンの系を用いて、虚血様負荷による  $Ca^{2+}$ 流入と、**Npas4** の発現誘導との関係性を検討した。**NMDA** 受容体の阻害剤 **DAP-5** の存在下で虚血様負荷をかけると、培養ニューロンにおける  $Ca^{2+}$ 流入と **Npas4** の発現誘導は、完全に抑制された。電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネルの阻害剤 **Nifedipine** の存在下では、 $Ca^{2+}$ 流入と **Npas4** の発現に対する弱い抑制効果が見られた。これらの知見から、虚血時のニューロンでは、**NMDA** 受容体や電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネルの異常な活性化が起こり、 $Ca^{2+}$ 流入が引き起こされることによって、**Npas4** の発現が誘導されることが明らかとなった。

次に、**Npas4** を初代培養ニューロンに過剰発現させて、虚血ニューロンにおける **Npas4**

の役割を検討した。Npas4 を過剰発現したニューロンでは、虚血に伴う  $Ca^{2+}$  流入が抑えられ、24 時間後の細胞の生存も促進されることが分かった。興味深いことに、Npas4 を過剰発現したニューロンに、Nifedipine の存在下で虚血様負荷をかけても、Nifedipine による細胞生存の促進効果は見られなかった。この結果は、Npas4 と Nifedipine が同じ経路に作用していることを示唆するものである。初代培養ニューロンを、電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルのアゴニストである Bay K8644 で処理すると、過剰な  $Ca^{2+}$  流入に伴う細胞死が引き起こされるが、Npas4 を過剰発現したニューロンでは、Bay K8644 による細胞死が抑えられることが分かった。以上の結果により、虚血時の異常な  $Ca^{2+}$  流入により Npas4 の発現が誘導されると、Npas4 は電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルの過剰な活性化を抑えることで、ニューロンの細胞死を防いでいると考えられる。

## (2) 脳梗塞における Npas4 の標的遺伝子の探索

転写因子 Npas4 は標的遺伝子の発現を調節することにより、虚血ニューロンにおける  $Ca^{2+}$  流入を抑え、細胞の生存を促進すると予想される。そこで、虚血ニューロンにおける Npas4 の標的遺伝子の探索を行った。

これまでに研究代表者らは、脳梗塞モデルマウスを用いた RNA-seq 解析により、脳梗塞の発症直後に発現が変動する遺伝子の網羅的同定を行っている。そこで、脳梗塞により発現が変動する遺伝子の中から、Npas4 の標的遺伝子のスクリーニングを行った。野生型と Npas4 欠損マウスから調整した培養ニューロンに虚血負荷をかけて、Npas4 の欠損により発現が変化する遺伝子を定量 PCR により解析した。RNA-seq 解析で得られた 200 遺伝子について検討した結果、Npas4 の欠損により発現が減少する 12 遺伝子と、逆に発現が増加する 3 遺伝子を同定した。これら計 15 遺伝子は、虚血ニューロンにおける Npas4 の標的候補遺伝子と考えられる。今後は、これら 15 遺伝子を初代培養ニューロンに過剰発現させて、虚血ニューロンにおける細胞保護作用の有無を検討していく予定である。

## (3) Npas4 過剰発現による脳梗塞の治療

初代培養ニューロンを用いた上記(1)の解析により、Npas4 は虚血ニューロンの細胞死を防ぐ効果があることが明らかとなった。そこで、そこで、アデノ随伴ウイルスを用いて脳梗塞モデルマウスに Npas4 を過剰発現させる系を確立し、個体レベルで脳梗塞への治療効果を検討した。

まず、Npas4 を大脳皮質ニューロンで広く過剰発現させるため、アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入系を確立した。Npas4 をニューロン特異的に強く発現させるため、Synapsin と TetON プロモーターを組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを作製した。また、ニューロンへの感染効率を高めるため、改良された血清型(PHP.eB および PHP.S) を用いて、ウイルスを産生した。新生仔の脳室にアデノ随伴ウイルスを注入し、大脳皮質に漏れたウイルスが広く感染する手法を用いた。これらの工夫により、任意のドキシサイクリンの投与時に、Npas4 を大脳皮質のニューロンで広く過剰発現させることが可能となった。

そこで、ドキシサイクリンの投与により、Npas4 を大脳皮質ニューロンで過剰発現させたマウスを用いて、脳梗塞マウスモデルを作製した。その結果、ドキシサイクリン非投与群(コントロール群)と比較して、ドキシサイクリンの投与群(Npas4 過剰発現群)では、脳梗塞の発症 24 時間後の梗塞巣の大きさが、顕著に減少することが分かった。以上の結果により、Npas4 の発現は、マウスの個体レベルにおいても、脳梗塞に伴う細胞死を顕著に抑える効果があることが分かった。

(1)(2)(3)の解析から、脳梗塞に伴って働く内在性の神経保護メカニズムにおいて、Npas4 が中心的な役割を果たすことが示唆された。今後、Npas4 やその標的遺伝子も含めて、その神経保護メカニズムの研究を進めることにより、脳梗塞の新たな予防や治療法に繋がると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Y, Takahashi H*, Stern PL, Kirita T, Tsuboi A*	4. 巻 13
2. 論文標題 Expression of Oncofetal Antigen 5T4 in Murine Taste Papillae.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2019.00343.	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 該当する

1. 著者名 Takahashi H, Yoshihara S and Tsuboi A.	4. 巻 11
2. 論文標題 The functional role of olfactory bulb granule cell subtypes derived from embryonic and postnatal neurogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 Article 229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2018.00229.	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 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 22-24
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高橋弘雄
2. 発表標題 Ras-like Gem GTPase induced by Npas4 promotes activity-dependent tolerance for ischemic stroke
3. 学会等名 NEURO2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋弘雄
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 NEURO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋弘雄
2. 発表標題 嗅球における介在ニューロンのサブタイプの機能的な役割
3. 学会等名 2018年度日本味と匂学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Razib Hossain, 多田 篤史, 黒川 直弘, 長澤 研, 琢磨 和晃, 尾嶋 大喜, 高橋 弘雄, 岸本泰司, 山本 融
2. 発表標題 MDGAファミリー分子群の欠失が引き起こすE/I バランス偏移に伴う認知・行動異常の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔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			
英国	Div. Mol. Clin. Cancer Sciences	University of Manchester		