

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：	14401
研究種目：	基盤研究 (C)
研究期間：	平成 21 年度 ~ 平成 23 年度
課題番号：	21591081
研究課題名 (和文)	脳虚血急性期におけるグルタミン酸受容体サブタイプによる細胞応答の差異
研究課題名 (英文)	Differential contribution of individual receptor subunits of N-methyl-D-aspartate to ischemic neuronal damage.
研究代表者	佐々木 勉 (SASAKI TSUTOMU)
	大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：	20534879

研究成果の概要 (和文)：転写因子 CREB は、脳内に豊富に発現し、記憶、神経可塑性、細胞生存など幅広い神経機能、或いは病態に関与する。Salt-inducible kinase 2 (SIK2)、CREB-specific coactivator である transducer of regulated CREB activity 1 (TORC1/CRTC1) が神経細胞に豊富に発現し、SIK2 は CREB を介した遺伝子発現を抑制している。大脳皮質神経細胞において、脳虚血時には CaMK1/4 の活性化により、SIK2 が分解され、TORC1-CREB を介した下流の神経保護因子の発現を誘導する新規シグナル経路を世界で始めて同定 (Neuron 誌に報告)。脳虚血時神経細胞においては NMDA 受容体を介した Ca<sup>2+</sup>流入が重要であるが、特に今回我々が明らかとした経路は、脳虚血の内因性保護シグナル、或いは synaptic NMDA 受容体 (主に NR2A-containing NMDA 受容体) を介した神経保護シグナルに関与していた。更に SIK2 遺伝子欠損マウスを作製して検討したところ、SIK2KO マウスでの神経細胞生存促進効果、脳梗塞サイズ縮小を認めた。本研究は、従来の CREB Ser133 の重要性の加え、SIK2 による TORC1-CREB シグナルの重要性も示され、これらを標的とした治療が、脳梗塞、神経変性疾患に対し有効な治療法に繋がりうる可能性を示唆する。

研究成果の概要 (英文)：The cAMP responsive element-binding protein (CREB) functions in a broad array of biological and pathophysiological processes. We found that salt-inducible kinase 2 (SIK2) was abundantly expressed in neurons and suppressed CREB-mediated gene expression after oxygen-glucose deprivation (OGD). OGD induced the degradation of SIK2 protein concomitantly with the dephosphorylation of the CREB-specific coactivator transducer of regulated CREB activity 1 (TORC1), resulting in the activation of CREB and its downstream gene targets. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I/IV are capable of phosphorylating SIK2 at Thr484, resulting in SIK2 degradation in cortical neurons. Neuronal survival after OGD was significantly increased in neurons isolated from sik2(-/-) mice, and ischemic neuronal injury was significantly reduced in the brains of sik2(-/-) mice subjected to transient focal ischemia. These findings suggest that SIK2 plays critical roles in neuronal survival, is modulated by CaMK I/IV, and regulates CREB via TORC1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22年度	800,000	240,000	1,040,000
23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系・神経内科学

キーワード：NMDA 受容体, NR2A, NR2B, TORC1/CRTC1, SIK2, CREB

## 1. 研究開始当初の背景

Ca-グルタミン酸仮説のもと、動物実験で NMDA 型グルタミン酸受容体が有力視され、ヒト臨床応用に向け治験がなされたが、臨床的には有効な結果は得られなかった。その原因として、近年、グルタミン酸受容体のサブタイプの違い、特に NR2subunit の違い(NR2A/NR2B サブユニット)がその後の細胞生/死の決定に深く関与することが示唆されてきていた。サブユニットの違いが、その後の細胞生死に与えるメカニズムとして、PSD-95/nNOS complex への関与、TRP channel などその他のチャネルへの関与の差異、下流のシグナル伝達経路の差異などが考えられていた。そのなかで、本研究にて NR2subunit(NR2A/NR2B subunit)の違いが、転写因子 CREB 活性化に寄与するメカニズムについて検討した。転写因子 CREB は、その Ser133 がリン酸化されることにより、HAT 活性を有する coactivator である CBP/p300 がリクルートされ転写が開始されたため、Ser133 を中心とした研究が行われてきた。しかしながら、CREB Ser133 リン酸化は転写開始には必要であるが十分ではなく、CBP/p300 もその他多くの転写因子の coactivator としても作用する。しかしながら近年、CREB 特異的 coactivators である coactivators named transducer of regulated CREB activity (TORC, 又は CREB Regulated Transcriptional Co-activator (CRTC), with TORC1- 3 isoforms) が同定され、CREB 転写調節機構の解明に新たな局面をむかえた。CREB-CBP が KID-KIX ドメインを介して調節されているのに対して、TORC family は CREB bZIP ドメインを介して行われる。TORC は非刺激下においては主に細胞質にあるが、Ca、cAMP 刺激が入ると、脱リン酸化がおこり、核内に移行し CRE 転写を活性化する。

## 2. 研究の目的

本研究において、in vitro, in vivo 脳虚血モデルを用いて、中枢神経系における NR2subunit の違い(NR2A/NR2B サブユニット)が、CREB 活性化機構、とりわけ SIK-TORC1 カスケードの調節機構に与える影響の差異を明らかとし、それらのメカニズムに基づいて、新たな治療法を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

In vitro 虚血モデル(Oxygen glucose deprivation:OGD)、虚血耐性モデル、in vivo 脳梗塞モデル(マウス中大脳動脈閉塞モデル)を作製し、ウエスタンブロッティング、免疫組織化学、ルシフェラーゼアッセイ、real-time

PCR 法により、CREB,SIK,TORC/CRTC family, CaMK family の動態を中心に検討した。更に SIK2 遺伝子欠損マウスを作製し、SIK2-CRTC1 シグナルの重要性について詳細な検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 虚血耐性時においては、NR2A subunit のうちとりわけ NR2A subunit 活性化が関与している。: In vitro において虚血耐性現象を検討する系(45分非致死刺激(OGD)→24時間後に3時間の致死刺激(OGD))を確立し、NR2A,NR2B の関与を検討した。NVP-AAM077 による NR2A 選択的阻害は虚血耐性を消失させ、Bicuculline + 4-aminopridine による NR2A 活性化は虚血耐性を誘導した。又、NR2A の下流シグナルとして、CREB 活性を CRE-luc reporter を用いた luciferase assay を施行し検討したところ、CREB が虚血耐性誘導に必要かつ十分であり、その神経保護効果も CREB 依存的な BDNF 発現誘導であることも示した。

(2) OGD(oxygen glucose deprivation: in vitro ischemia model) 負荷時における CREB Ser133 リン酸化と CRE 転写活性: CREB Ser133 リン酸化は OGD 後 3-6 時間をピークとして 12 時間後にはコントロールまで低下、一方で CRE 転写活性上昇は 12 時間後まで持続していた。OGD 後の Gal4-fusion full-length CREB (TORC-activatable) と bZIP-less CREB (TORC-silent) の動態を調べると、GAL4-bZIP-less CREB は Gal4-fusion full-length CREB に比して有意に OGD 後の活性が低下していた。他方、cyclosporine A (CsA)、FK 506 による calcineurin 抑制は pCREB 亢進傾向であるのに対して CRE 転写活性は有意に抑制、また低濃度 Staurosporine (10nM) は pCREB 有意に抑制するが、CRE 転写活性は著明に亢進。このことは、大脳皮質神経細胞において、pCREB とは独立した CREB bZIP ドメインを介した転写調節機構が存在することを意味する。

(3) OGD 再酸素化後に TORC1 Ser167 の脱リン酸化が起こる。: 初代大脳皮質神経細胞では、TORC1 が高発現しており、コントロール状態では TORC1 は細胞質にあり、OGD により TORC1 Ser167 脱リン酸化され核内に移行する。Adeno-Dominant-negative TORC1(TORC1 N 末端 56 残基)は、OGD 後の CRE 活性を有意に低下させ、神経細胞死を増悪させた。野生型 adeno-TORC1、adeno-TORC1 S167A mutant は CRE 転写活性を上昇させ、OGD 後の神経細胞障害を有意に改善した。また、TORC1 強制発現は

CRE 依存性に、下流の brain-derived neurotrophic factor (BDNF), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (Pparg1a: its product is known as PGC-1 $\alpha$ )発現を誘導した。

(4) SIK2 抑制は神経細胞保護効果を有する。: TORC family は SIK family 又は AMPK によりリン酸化される<sup>8)</sup>。SIK family のうち、SIK2 が mRNA、蛋白レベルで両者とも、大脳皮質、海馬にて、コントロール状態にて高発現していた。次に OGD 後の TORC1 の調節に関与するキナーゼを検討した。上記キナーゼのうち OGD 再酸化早期時相より、SIK2 蛋白レベルが低下し、これは TORC1 Ser167 脱リン酸化、活性化と経時変化が一致するため、SIK2 が TORC1-CREB 活性調節において、重要なであると考えた。我々はまず、神経細胞における SIK2 の TORC1 調節における重要性を検討するため、small kinase-inhibitor-library を用いて、より SIK2 を選択的に阻害する薬物をスクリーニングした。その結果 AMPK 阻害剤として知られる Compound C が低濃度でより SIK2 を阻害することが判った (IC<sub>50</sub>: 0.3  $\mu$ M)。Compound C 0.3-0.5  $\mu$ M では、OGD 後の CRE 活性を有意に上昇させ、神経細胞保護効果を示した。又、Dominant-active SIK2(S587A)は OGD 後の神経細胞障害を増悪、kinase-defective SIK2 (K49M) は神経細胞死を改善した。また、内因性 SIK2 を SIK2 特異的 micro-RNAi 投与にて阻害すると、OGD の CRE 活性上昇並びに細胞保護効果を認めた。

(5) 大脳皮質神経細胞において、CaMK I/IV は TORC1 活性を調節する上流キナーゼである。: さらに TORC1 調節機構を検討するため、各種キナーゼ阻害剤を用いて GAL4-TORC1 活性を検討。その結果 CaMK II/IV 阻害剤である、KN93 が TORC1 活性を有意に抑制し、CaMK の中で、DA-CaMK I、DA-CaMK IV が TORC1 活性を有意に上昇させた。一方で DN- CaMK I、DN-CaMK IV は有意に OGD 後の転写活性を抑制した。また、CaMK IV 特異的 microRNA による内因性 CaMK IV 阻害は上記を裏づけた。このことより、神経細胞においては CaMK I/IV が SIK2 の negative regulator であることが示された。

(6) Synaptic NMDA 受容体活性化は、CaMK I/IV -SIK2 シグナルを介して TORC1 活性を上昇させる。: 神経細胞への Ca 流入経路として、NMDA 受容体の重要性は以前より指摘されていたが、AP5(NMDA receptor antagonist), NVP-AM0077(relatively NR2A antagonist), Ro25-6981(NR2B antagonist), CNQX, nifedipine(L-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker)などを

用いて検討したところ、AP5, NVP-AM0077 にて有意に OGD 後の TORC1 活性を抑制した。一方で bicuculline (Bic) + 4-aminopyridine (4-AP)にて NR2A-containing NMDAR を刺激したところ<sup>2)</sup>、SIK2 分解、TORC1 活性化を引き起こした。又、DN- CaMK I/IV は Bic + 4-AP による TORC1 活性化を阻害した。

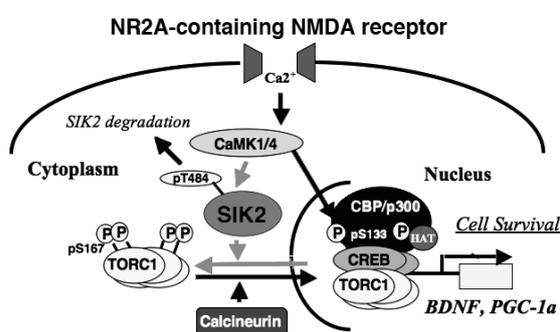
(7) CaMK I/IV は SIK2 The 484 をリン酸化し、SIK2 の不安定化をもたらす分解を促進する。: OGD 後の SIK2 蛋白量の低下はプロテアソーム阻害剤である lactacystin により抑制されるため、UPS を介した SIK2 の分解であることが示された。CaMK I/IV は SIK2 蛋白を減少させるが、新たに CaMK-motif R/K-X-X-S/T として GQRRHT<sup>484</sup>LSEVT の Thr484 が、CaMK I/IV によりリン酸化され SIK2 を負に調節することを示した。この Thr484 は線虫から哺乳類に至るまで保存されており、非常に重要な調節部位であることが示唆された。

(8) *sik2* knockout mice における神経細胞保護効果: 上記結果より、SIK2 は CREB-TORC1 を介して神経保護効果を調節していることが示されたが、さらに *in vivo* における SIK2 の重要性を調べるために SIK2 ノックアウトマウス(*sik2*<sup>-/-</sup> mice)を作製した。まず *sik2*<sup>-/-</sup> mice、WT mice より、各々初代大脳皮質神経細胞培養を行い検討した。*sik2*<sup>-/-</sup> mice は WT に比して、OGD 後の CRE 転写活性、TORC1 活性の上昇並びに、OGD 後の神経細胞死の軽減、下流の PGC-1 $\alpha$ , BDNF, TrkB などの有意な上昇を認めた。

(9) *sik2* knockout mice において中大脳動脈閉塞モデルを作成すると、梗塞サイズが縮小する。: SIK2 の *in vivo* における神経保護効果への影響を検討するために、*sik2*<sup>-/-</sup> mice、WT mice に 60 分間の一過性中大脳動脈閉塞モデルを作製した。*sik2*<sup>-/-</sup> mice においては、虚血後の TORC1 Ser167 レベルが WT に比して有意に減少し、梗塞サイズも有意に小さかった。また、*sik2*<sup>-/-</sup> mice は WT に比して、大脳皮質ペナンプナ領域における PGC-1 $\alpha$ , BDNF の有意な上昇並びに、TNF- $\alpha$  の有意な低下を認めた。

この様に、本研究の遂行により、世界に先駆けて SIK2、TORC1 が神経細胞に豊富に発現し、脳虚血時には CaMK1/4 の活性化により、SIK2 が分解され、TORC1-CREB を介して下流の神経保護因子の発現誘導する新規シグナル経路を同定 (Sasaki et al. *Neuron* 2011 69(1):106-19) し得た意義は大きい。ショウジョウバエの SIK2 をノックダウンすると、活

性酸素に対するストレス耐性が獲得されるが、我々が作製した SIK2 遺伝子欠損マウスにおいても、神経細胞生存促進、脳梗塞サイズの縮小を認めた (Neuron 2011 69(1):106-19)。脳虚血時神経細胞においては NMDA 受容体を介した Ca<sup>2+</sup>流入が重要であるが、とりわけ NMDA NR2A サブタイプを介し(NMDA NR2A 活性化は細胞保護、他方 NR2B 活性化は細胞死に繋がる)、CaMK1/4-TORC1-CREB シグナルは、シナプス刺激時の内因性保護に寄与する経路(*J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 Aug;30(8):1441-9, *Neuron* 2011 69(1):106-19)に關与する。本研究課題の成果をもとに、今後更に、SIK、TORC/CRTC を標的とした低分子化合物を模索し、神経疾患への応用を目指す。



(Sasaki et al. *Neuron* 2011 69(1):106-19)

##### 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 6 件)

- 1) Sasaki T, Takemori H, Yagita Y, Terasaki Y, Uebi T, Horike N, Takagi H, Susumu T, Teraoka H, Kusano K, Hatano O, Oyama N, Sugiyama Y, Sakoda S, Kitagawa K. *SIK2 is a new key regulator for neuronal survival after ischemia through TORC1-CREB* *Neuron* (2011) Jan 13;69(1):106-19 (査読有)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.004>,

- 2) Kumagai A, Horike N, Satoh Y, Uebi T, Sasaki T, Itoh Y, Hirata Y, Uchio-Yamada K, Kitagawa K, Uesato S, Kawahara H, Takemori H, Nagaoka Y

*A Potent Inhibitor of SIK2, 3, 3', 7-Trihydroxy-4'-Methoxyflavon (4'-O-Methylfisetin), Promotes Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells.*

*PLoS ONE*(2011) 6:e26148 (査読有)

DOI:10.1371/journal.pone.0026148

- 3) Oyama N, Yagita Y, Kawamura M, Sugiyama Y, Terasaki Y, Omura-Matsua E, Sasaki T, Kitagawa K. *Cilostazol, not aspirin, reduces ischemic brain injury via endothelial protection in spontaneously hypertensive rats.*

*Stroke* (2011) Sep;42(9):2571-7 (査読有)

DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.609834

- 4) Sugiyama Y, Yagita Y, Oyama N, Terasaki Y, Omura-Matsua E, Sasaki T, Kitagawa K. *Granulocyte colony-stimulating factor enhances arteriogenesis and ameliorates cerebral damage in a mouse model of ischemic stroke.*

*Stroke* (2011) Mar;42(3):770-5 (査読有)

DOI:10.1161/STROKEAHA.110.597799

- 5) Horike N, Kumagai A, Shimono Y, Onishi T, Itoh Y, Sasaki T, Kitagawa K, Hatano O, Takagi H, Susumu T, Teraoka H, Kusano K, Nagaoka Y, Kawahara H, Takemori H.

*Downregulation of SIK2 expression promotes the melanogenic program in mice* *Pigment Cell Melanoma Res* (2010) Dec; 23(6):809-19 (査読有)

DOI:10.1111/j.1755-148X.2010.00760.x

- 6) Terasaki Y, Sasaki T, Yagita Y, Okazaki S, Sugiyama Y, Oyama N, Omura-ME, Sakoda S, Kitagawa K.

*Activation of NR2A receptors induces ischemic tolerance through CREB signaling.* *J Cereb Blood Flow Metab* (2010) 30:1441-1449 (査読有)

DOI:10.1038/jcbfm.2010.18

[学会発表] (計 10 件)

- ① 佐々木 勉; 脳虚血後 CREB-CRE 制御機構における bZIP ドメインの重要性、第 51 回日本神経学会総会:平成 22 年 5 月 23 日(東京)
- ② 佐々木 勉; A role for SIK2-TORC1 cascade in neuronal survival after ischemia、Neuro2010:平成 22 年 9 月 3 日(神戸)
- ③ Sasaki T et al. Implication of TORC1-CREB cascade in neuronal survival、Brain 2011: May/27/2011, Barcelona(Spain)
- ④ 佐々木 勉; 塩誘導性キナーゼ(SIK2)による TORC1-CREB 経路を介する神経保護効果:第 52 回日本神経学会総会、平成 23 年 5 月 19 日(名古屋)
- ⑤ 佐々木 勉; 神経細胞におけるニコチンによる CREB 調節機構の検討、第 23 回日本脳循環代謝学会総会:平成 23 年 11 月 5 日(東京)
- ⑥ 佐々木 勉; 脳虚血後 CaMK による CRTC1-CREB 制御機構に関する検討、第 23 回日本脳循環代謝学会総会:平成

23年11月5日(東京)

- ⑦ 佐々木 勉 ; 脳虚血後 SIK2-TORC1-CREB 経路の動態、第 36 回日本脳卒中学会総会 (Stroke2011): 平成 23 年 8 月 1 日(京都)
- ⑧ 佐々木 勉 ; 脳虚血時における SIK-TORC1 経路の意義、9th Future Forum Japan Symposium (招待講演)、平成 23 年 7 月 8 日(神戸)
- ⑨ 北川 一夫、佐々木 勉 ; 脳虚血時における内因性保護シグナルの検討、第 53 回日本神経学会総会 (招待講演)、平成 24 年 5 月 23 日 (東京)
- ⑩ 佐々木 勉 ; 脳虚血耐性時における塩誘導キナーゼ(SIK)-CRTC 経路の意義、第 53 回日本神経学会総会、平成 24 年 5 月 25 日(東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://fsmed.med.osaka-u.ac.jp/jpn/activities/results/2011/002.html>,

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/2112#more-2112>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 勉 (SASAKI TSUTOMU)  
大阪大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 2 0 5 3 4 8 7 9

### (2) 研究分担者

北川 一夫 (KITAGAWA KAZUO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 7 0 3 0 1 2 5 7

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :