

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07532

研究課題名（和文）CGRP-Npas4経路を介したエピジェネティックな恐怖記憶制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Epigenetic Mechanism of Fear Memory Control via the CGRP-Npas4 Pathway

研究代表者

橋川 成美（芳原成美）（Hashikawa-Hobara, Narumi）

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：30511159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：恐怖体験をしたマウスにCGRPを投与すると、怖い記憶を覚えていないことを発見しました。CGRPは痛みを伝える神経に含まれている神経伝達物質の一つですが、CGRPと記憶との関係は明らかになっていませんでした。我々はマウスの脳にCGRPを投与し、記憶における影響を解析した結果、恐怖記憶を和らげる効果がCGRPにはあることが分かりました。このCGRPの作用は、転写調節因子であるNpas4の発現量増加により起こることが明らかとなりました。さらに、CGRPのNpas4の増加は後天的な遺伝子発現制御、つまりエピジェネティックな制御系を介して行われていることも明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティクスは創薬標的としての注目を集めており、本研究成果はCGRPが新たな心的外傷後ストレス(PTSD)の新たな治療ターゲットになり得ることを示唆しています。

研究成果の概要（英文）：We discovered that administering CGRP to mice that had experienced a traumatic event resulted in the mice not recalling the fearful memory. CGRP is one of the neurotransmitters contained in pain-transmitting nerves and exhibits vasodilatory effects. Although CGRP is also abundantly expressed in the brain, its relationship with memory was not previously clear. We analyzed the effects of CGRP administration on spatial memory, short-term memory, and fear memory in mice, and found that CGRP has the effect of alleviating fear memory. This effect of CGRP was found to be due to an increase in the expression of the transcriptional regulator Npas4. Furthermore, it was revealed that the increase in Npas4 induced by CGRP occurs through epigenetic regulatory mechanisms, which are forms of acquired gene expression control. Epigenetics is attracting attention as a drug discovery target, and the results of this study suggest that CGRP could be a potential new therapeutic target for PTSD.

研究分野：薬理学

キーワード：CGRP マウス エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

恐怖記憶制御における CGRP の位置づけ

心的外傷性のストレスは恐怖を呼び起こさせる出来事からなる。例えば、事故や災害、戦争、性的暴力などが心的外傷後ストレス障害 (posttraumatic stress disorder; PTSD) を引き起こす。PTSD に対するアメリカ食品医薬品局 (FDA) が承認する唯一の薬物治療法は、セロトニン選択的再取り込み阻害剤である。しかしながら、この薬物に対する治療効果は相対的に小さく、特に男性の退役軍人においては、治療抵抗性を示す報告もされている (Hertzberg et al., 2000)。カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin-gene related peptide; CGRP) はカプサイシン感受性の知覚神経に含まれる神経ペプチドであり、痛みを感じる時に遊離され、さまざまな生理作用を示す。辛いもの (カプサイシンは CGRP を遊離する) を食べてスッキリ忘れてしまおうとする我々の日常を顧みても CGRP と記憶に関連があることが予想できる。近年では Wu らが CGRP を偏頭核に投与すると恐怖記憶の消去につながることを示している (Wu et al., 2015)。しかし、その詳細なメカニズムはまだ不明であり、CGRP がどのように恐怖記憶に関与するかの細胞内情報伝達系についてもまだ報告が出ていない。

2. 研究の目的

恐怖記憶制御における CGRP の役割とそのメカニズムを明らかにする

申請者はこれまで、CGRP に着目して研究を行ってきた。強力な血管弛緩作用をもち、偏頭痛の治療薬のターゲットとして注目を浴びているタンパク質である。申請者らはこれまでの研究において、CGRP を外的に投与する場合は、投与するタイミングにより恐怖記憶に対する作用が異なってくること、恐怖体験曝露直後に CGRP を投与すると恐怖記憶を忘れることを明らかにした。またこの作用に Neuronal PAS domain (Npas4) の関与が考えられたため、本申請研究の目的は、**CGRP と Npas4 に着目して恐怖記憶制御における分子メカニズムを明らかにすることとした**。Npas4 は転写調節因子であり、うつ様状態といった精神疾患系に関与している報告が次々と発表されている。しかし、CGRP からのシグナル伝達系と Npas4 がどのように制御を受けているのかが、本研究課題の核心をなす学術的な「問い」として存在する。そこで、本研究ではこうした学術的な「問い」に答えるため、以下の3点の解明を目的とする。

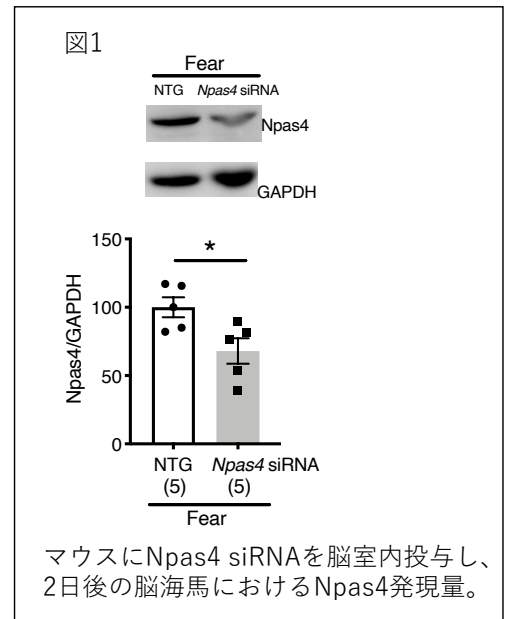
- ① CGRP投与によりNpas4の増加が恐怖記憶消去に関わっていることを示す。
- ② CGRP-Npas4経路のエピジェネティックな転写制御を明らかにする。
- ③ ヒトでの臨床試験を視野に入れたCGRPの鼻腔内投与法の確立。

これまで CGRP と恐怖記憶の関連研究についてはいくつか報告がある。しかしその詳細なメカニズムはまだ不明であり、CGRP がどのようにして恐怖記憶に関与するかの細胞内情報伝達系を解明すれば、世界初であり、治療薬開発に向けたインパクトも大きい。今回は CGRP と Npas4 のつながりに、Npas4 のプロモーター領域のヒストンアセチル化、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) に焦点をあて、エピジェネティックな面から明らかにしていく。

3. 研究の方法

1. CGRP-Npas4 経路の恐怖記憶関与を解析

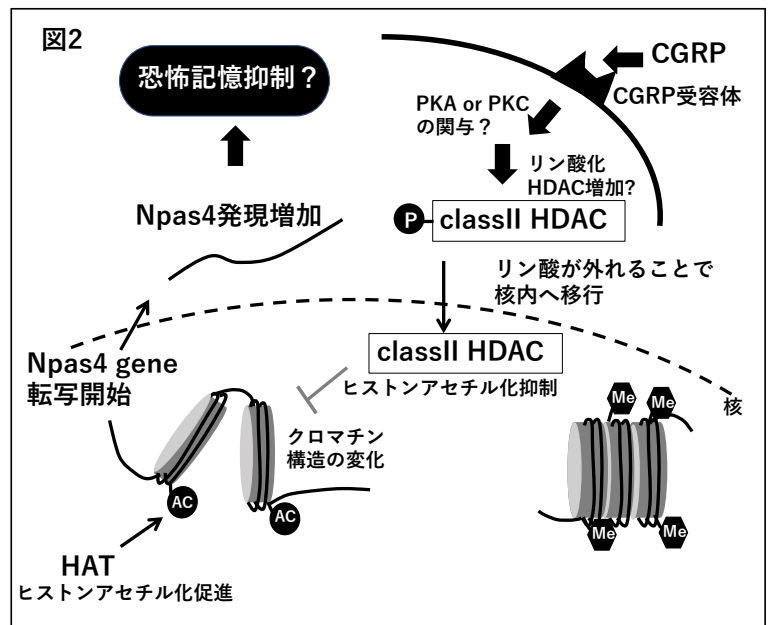
CGRP による恐怖記憶消去に Npas4 の増加が関与していることを明らかにするために、Npas4 siRNA をマウスに投与し、行動の変化を観察する。さらに、海馬培養細胞を用いて、CGRP 投与による Npas4 の発現量に変化が見られるかどうかを調べることで、海馬依存性であるかどうかを明らかにする。申請者は既に Npas4 siRNA をマウスの脳室内に投与することで、海馬の Npas4 発現量が有意に減少することを見出している(図 1)。今後、CGRP の共投与により行動の変化を確認する。また、脳定位固定装置を用いて、より特異的な脳部位に CGRP あるいは薬液を投与し、Npas4 と CGRP の脳における役割を明らかにする。仮にマウスにおける Npas4 ノックダウンがうまくいかない場合においても、海馬培養細胞を使うことによって、CGRP の Npas4 への海馬における影響を模倣することができると思われる。



マウスにNpas4 siRNAを脳室内投与し、2日後の脳海馬におけるNpas4発現量。

2. CGRP-Npas4 経路のエピジェネティックな調節機構解明

CGRP 投与による Npas4 のプロモーター領域のヒストンアセチル化の変化を解析するため、クロマチン免疫沈降アッセイ (ChIP) を行う。申請者らは Npas4 のプロモーター部位に HDAC がリクルートされているかどうか、CGRP 投与したマウスの海馬を用いて、ChIP 法により明らかにする。HDAC は classI と classII に分類されており、核内に存在するものを classI、脱リン酸化により核内へ移行するものを classII としている。classII は普段リン酸化され細胞質内に存在しているため、PKA や PKC の制御を受ける可能性が高い。CGRP は PKA や PKC を活性化させることがすでに知ら

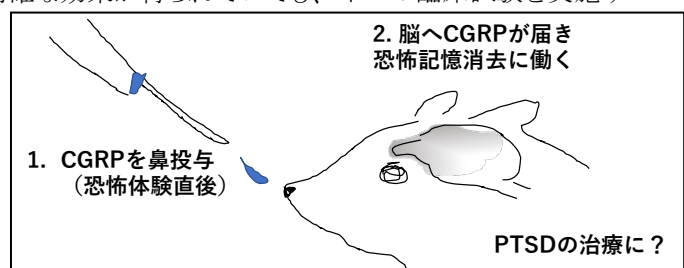


れているため、classII の HDAC の関与が期待できる。そのため、CGRP 投与により classII の HDAC リン酸化量が増えていると予想し、western blotting により解析を行う(図2)。これにより CGRP の Npas4 増加にエピジェネティックな調節が関与しているかどうかを決定することが可能となる。

3. ヒトでの臨床試験を視野に入れた CGRP の鼻腔内投与法の確立

CGRP は 37 個のアミノ酸からなるペプチドであり、非常に分解されやすく、臨床応用を考えた時、静脈内投与を行っても脳に届く前に代謝されて分解されることが予想される。PTSD の患者に CGRP を脳室内投与することは、非現実的であり、例え明確な効果が得られていても、ヒトへの臨床試験を実施することは不可能である。そこで、本研究においては鼻腔内投与方に着目し、これを利用

した CGRP のヒトへの投与を目指した基盤技術の構築を進める。具体的には、CGRP をマウスに鼻腔内投与することで、脳室内投与と同程度の結果が得られるかどうか、受動的

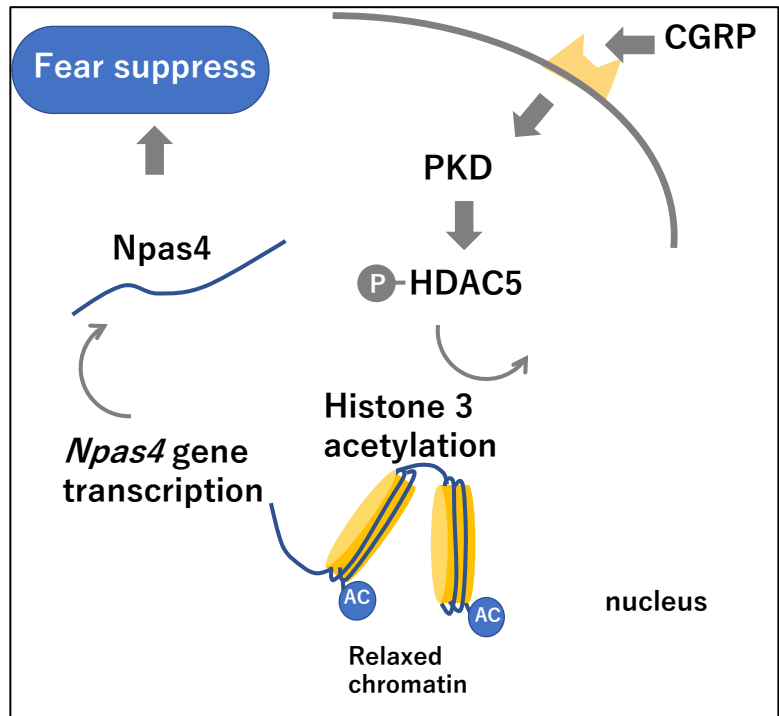


回避試験あるいは恐怖条件付け文脈学習試験を用いて検証する。

4. 研究成果

CGRP はリン酸化 HDAC5 の増加により Npas4 転写を活性化させ、恐怖記憶を抑制する

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) をマウスに脳室内投与すると、恐怖記憶を忘れることを明らかにした。その分子メカニズムとして、転写調節因子である Npas4 が脳海馬において増加していること、Npas4 をノックダウンすることで恐怖記憶保持の抑制が起こることを明らかにした。さらに、CGRP-Npas4 経路のエピジェネティックな調節機構を解明するため、ヒストンアセチル化に着目した。その結果、CGRP はリン酸化 HDAC5 の増加を引き起こし、ヒストンアセチル化を促進させ、Npas4 転写を活性化し、Npas4 発現増加を引き起こすことを免疫クロマチン法により明らかにした。これらの結果は論文番号 1 に報告した。



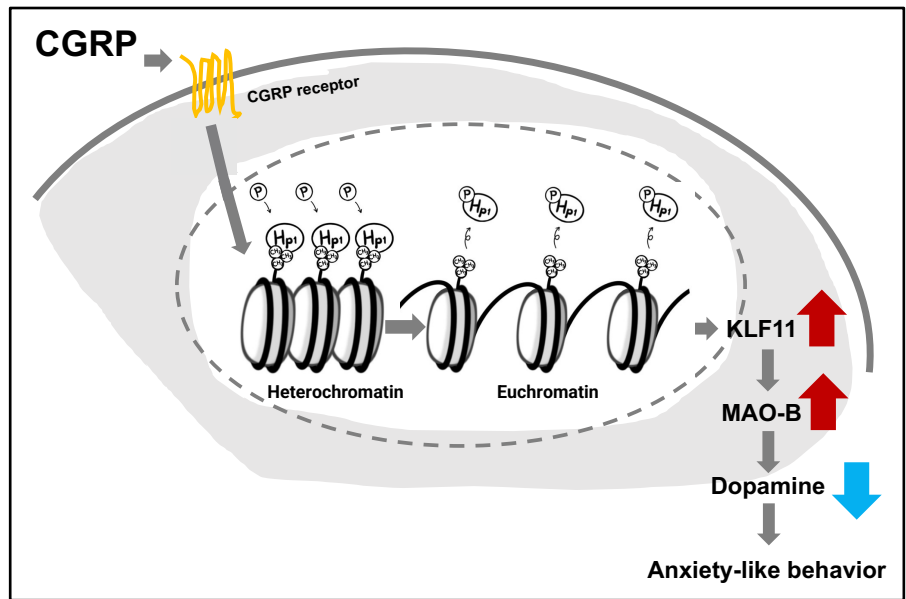
CGRP の鼻腔内投与により、脳室内投与と同様の恐怖記憶の抑制効果が得られた

マウスへ鼻腔内投与を行うことにより、どのくらいの CGRP が中枢に移行するかをまず検証した。その結果、投与 30 分後の脳脊髄液で約 2 倍、海馬においてもおおよそ 2 倍程度の CGRP 量を ELISA にて確認することができた。また、鼻腔内投与により脳へ移行した CGRP が生理機能を果たしているかを確認するため、光嫌悪性試験を行った結果、CGRP を脳室内投与した時と同様に光嫌悪を示す行動が CGRP 鼻腔内投与により顕著に観察することができた。恐怖記憶に対する影響は、脳室内投与よりは効果は減弱するものの、恐怖を与えた直後に CGRP を鼻投与することで、恐怖記憶の抑制効果が見られた。また、脳室内投与と同様にリン酸化 HDAC5 が増加し、Npas4 の転写を活性化させること、さらにそれは CGRP 受容体拮抗薬である BIBN4096 の投与により Npas4 の増加が抑制されること、恐怖記憶の保持抑制効果がキャンセルされることを明らかにした。これらの結果は論文番号 2 に報告した。

CGRP が起こす不安様行動の詳細な分子メカニズムを明らかにした

CGRP が起こす不安様行動について検証を行った。CGRP を海馬に脳固定装置を用いて投与すると、脳室内投与と同様に不安様行動を引き起こす。このとき、脳海馬内のドーパミン量が、ドーパミン代謝酵素の MAOB 増加を伴って起こることを明らかにした。その作用機序に転写調節因子の Kruppel 様転写因子ファミリーの KLF11 が CGRP により増加し、ヒストンクロマチンタンパク質である HP1 γ のリン酸化が増加することで、結果的に MAOB の転写促進が活性化されることを明らかにした。CGRP 海馬投与による不安様行動は MAOB 阻害薬であるセリギリンや MAOBsiRNA による MAOB のノックダウンでも抑制された。これらの結果より、CGRP による不安様行動は MAOB を介したドーパミン減少により、エピジェネティ

ックな調節を受けていることが明らかとなった。これらの結果は論文番号 3 に報告した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Hashikawa-Hobara Narumi, Yoneyama Yoshikazu, Fujiwara Kyoushiro, Hashikawa Naoya	4. 巻 12
2. 論文標題 Intranasal calcitonin gene-related peptide administration impairs fear memory retention in mice through the PKD/p-HDAC5/Npas4 pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05518-y	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 Hashikawa-Hobara Narumi, Mishima Shuta, Okujima Chihiro, Shitanishi Youdai, Hashikawa Naoya	4. 巻 11
2. 論文標題 Npas4 impairs fear memory via phosphorylated HDAC5 induced by CGRP administration in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86556-w	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 Hashikawa-Hobara Narumi, Fujiwara Kyoshiro, Hashikawa Naoya	4. 巻 7
2. 論文標題 CGRP causes anxiety via HP1 -KLF11-MAOB pathway and dopamine in the dorsal hippocampus	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-024-05937-9	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米山佳和、橋川成美、橋川直也、三宅里奈、森永由美
2. 発表標題 Effects of intranasal administration of CGRP on contextual fear memory
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原享志朗、渡邊杏香、橋川直也、橋川成美
2. 発表標題 Calcitonin gene-related peptide as an anxiety regulator in the mouse hippocampus: Mechanisms for transcriptional regulation of monoamine oxidase B by calcitonin gene-related peptide administration
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原享志朗、橋川直也、橋川成美
2. 発表標題 CGRPはMAOBをエピジェネティックに調節し不安を引き起こす
3. 学会等名 日本薬理学会第147回関東部会
4. 発表年 2023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
研究 分 担 者	橋川 直也 (Hashikawa Naoya) (60434982)	岡山理科大学・理学部・准教授 (35302)	

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
---------	---------