

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460095

研究課題名(和文) ストレス感受性転写因子NPAS4の機能破綻による精神疾患発症機構の解析

研究課題名(英文) Association of mental disorder and decrease of Npas4

研究代表者

日比 陽子 (HIBI, YOKO)

名古屋大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：70295616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、本研究においてストレス刺激がDNAメチル化亢進を介して、神経シナプス形成に重要な転写因子Npas4発現を低下させることを明らかにした。またNpas4発現低下がGABA作動性神経機能に及ぼす影響について追究し、Npas4遺伝子欠損マウス(Npas4-KOマウス)がPP1の障害を示し、小脳ではGABA受容体サブユニットmRNAレベルが顕著に低下することを示した。また、痙攣誘発剤ペンチレンテトラゾール(PTZ)刺激はNpas4発現を上昇させ、Npas4はHomer1aの転写を誘導した。Npas4-Homer1a経路は、てんかん治療の新しいターゲットとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Neuronal PAS domain 4 (NPAS4) has recently been shown to regulate the development of GABAergic inhibitory synapses. We previously reported that Npas4 mRNA expression levels were reduced in the hippocampus of mice exposed to social isolation or restraint stress. In the present study, we suggested that restraint stress increase the DNA methylation level of Npas4 promoter region. We analyzed the effect of decrease of Npas4 expression on the function of GABA neurons. Npas4-knockout mice were impaired in pre-pulse inhibition. GABA receptors were decreased in the cerebellum of Npas4-knockout mice. The expression level of Npas4 mRNA was significantly increased after the pentylentetrazol (PTZ) treatment. Npas4 increased Homer1a promoter activity. Npas4 function as a molecular switch to initiate homeostatic scaling and the targeting of Npas4-Homer1a signaling may provide new approaches for the treatment of epilepsy.

研究分野：神経科学 行動薬理

キーワード：Neuronal PAS domain 4 遺伝子欠損マウス 精神疾患 脳

### 1. 研究開始当初の背景

ストレスはうつ病や不安障害、心的外傷後ストレス症候群(PTSD)、統合失調症など多くの精神疾患発症との関わりが示唆されている。ストレスは抑制性 GABA 作動性神経の機能を障害し、それによって興奮性神経系の活動が亢進することが精神疾患発症の要因の一つと考えられている。一方、ストレス負荷後の人や動物では海馬、皮質、小脳において左右脳のバランスが崩壊していることが組織学的および電気生理学的解析により示され、脳の左右バランス異常が精神疾患の原因であることが示唆されている。この左右バランス異常は GABA 神経系の異常により興奮性神経系の活動が亢進することによって誘発されることが示唆されているのみで詳細は不明である。ストレスによって GABA 作動性神経系が障害され脳の左右バランスが崩壊する分子メカニズムを解明すれば、その分子を薬効解析の指標として用い、これを標的とした治療薬の開発が可能となる。

我々はこれまでに、(a)幼若期隔離飼育ストレス(精神的ストレス)や拘束ストレス(身体的ストレス)を負荷したマウスで空間学習記憶や情動行動の異常が起こる (Koike et al, *Behav Brain Res*, 2009) と共に、(b)GABA 神経系発達に關与する転写因子 Neuronal PAS domain 4 (NPAS4)の発現が海馬や皮質で顕著に低下していることを見出した (Ibi et al, *J Neurochem*, 2008,; Yun et al, *J Neurochem*, 2010)。さらに Npas4 の発現低下機構を追究し、(c)ストレスによって分泌増加するグルココルチコイド(GC)が GC 受容体 (GR)を介して Npas4 の転写を直接抑制することを明らかにした (Furukawa-Hibi et al, *J Neurochem*, 2012)。また、(d)長期的なストレス負荷により Npas4 プロモーターの DNA メチル化が亢進し、Npas4 の転写が抑制されることも見出した (Furukawa-Hibi et al, 投稿中)。以上の成果から、NPAS4 がストレス応答性に発現が抑制される転写因子であると同定された。NPAS4 は大脳皮質、海馬、線条体などの辺縁系に多く存在し (Mol Cell Biol, 2004; Mol Brain Res, 2004)、神経活動依存的に発現が促進され、BDNF の転写誘導を介して GABA 作動性神経系の成熟に深く関与するとされている (Nature, 2008, J Neurosci, 2011)。我々は(e)NPAS4 は Cdk5 を転写誘導し神経突起伸長を促進することも示している (Yun et al, *J Biol Chem*, 2013)。さらに臨床データからも神経発達障害児の遺伝子解析で Npas4 遺伝子を含む遺伝子領域の欠損が報告されている (Euro J Med Gene, 2012)。以上より、NPAS4 機能不全が GABA 作動性神経系の障害を介して精神疾患発症に関わるという図式が強く示唆される。そこで Npas4 遺伝子欠損(Npas4-KO)マウスの行動解析を行ったところ、環境順化の遅れやプレパルス抑制の障害など GABA 作動性神経系の機能低下と関連する行動異常を示した他、小

脳の障害と関連の深い運動学習能力の低下も認められた。また、Npas4-KO マウスでは、線条体と小脳における GABA 受容体の発現が顕著に低下しているという予備的データを得ており、さらに、長期拘束ストレス負荷マウスにおける Npas4 発現抑制レベルに左右差がある可能性を示唆するデータも得ている。以上のことより、NPAS4 は脳のホメオスタシスを維持する要の転写因子であり、ストレスによる NPAS4 の発現減少は Cdk5 や BDNF などの発現低下を介して GABA 作動性神経系の機能異常を引き起こし精神疾患発症に至るのではないかと考えられる。

### 2. 研究の目的

我々は、人の育児放棄によるストレスや成長後の強いストレスのモデルとしてマウスを用い、ストレス刺激が GABA シナプス形成に關わる転写因子 NPAS4 の発現を低下することを見いだした。そこで、NPAS4 の発現抑制機構を解明することで、ストレスによる精神疾患の発症メカニズムを明らかとする。また、NPAS4 の発現を誘導する化合物を探索することで、遺伝的脆弱性のある人でもその発症を抑制し、症状を改善する治療薬の開発につなげたい。

### 3. 研究の方法

本研究では、Npas4発現低下がGABA作動性神経機能に及ぼす影響を調べた。また、長期のストレス負荷によるNpas4発現低下機構について解析した。さらに、Npas4発現を回復させることで、ストレス等による脳の器質的変性を防ぐことができるのではないかと考え、新しい精神疾患治療薬の可能性を秘めたNpas4発現誘導化合物の探索を開始した。

(1)全身性 Npas4-KO マウスの精神疾患様行動発現を調べ、GABA 神経系および興奮性神経系の発達について組織学的解析や神経伝達物質量の測定を行った。また、脳の異常興奮によるてんかんのモデルであるペンチレンテトラゾール(PTZ)誘発痙攣に対する Npas4 発現低下の影響を調べた。

(2)連日 6 時間の拘束ストレスを長期間負荷した野生型マウスの海馬における NPAS4 プロモーター活性低下のメカニズムを解析するため、長期のストレス負荷が NPAS4 プロモーター上の DNA メチル化レベルに及ぼす影響をパイロシーケンシングにより解析した。

(3) Npas4-flox マウスの各部位に Cre 発現ウイルスを感染させて、部位特異的に Npas4 遺伝子を欠損したマウスの作製を試みた。

(4)ヒト及びマウスの Npas4 のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプロモーターアッセイ用プラスミドを構築した。これらのプラスミドと神経芽細胞腫由来の株細胞を用いたプロモーターアッセイ系を確立し、市販の活性化化合物ライブラリを材料として Npas4 を発現誘導させる化合物の探索を行った。

#### 4. 研究成果

NPAS4 は、GABA 作動性抑制性神経の発達やシナプス形成との関連が報告される転写因子である。NPAS4 がストレスにより発現低下することから、この転写因子がストレス・GABA 神経系障害・精神症状発症の関心の鍵であると考えられる。そこで、NPAS4 の発現減少と GABA 作動性神経系の機能異常との関連を調べた。

##### 【1】Npas4 発現低下が GABA 作動性神経機能に及ぼす影響

(平成 26 年度) 全身性 NPAS4 遺伝子欠損 (NPAS-KO) マウス脳内の GABA 作動性神経関連分子の発現解析および NPAS4-KO マウスの精神疾患様行動発現解析をおこなった。13~26 週齢の NPAS4-KO マウスおよび野生型マウス (C57BL/6) から脳の各部位 (前頭前皮質、側坐核、線条体、海馬、小脳) を採取し、GABAA 受容体サブユニット、GABAB 受容体サブユニットおよび GABA 作動性神経関連分子の mRNA 発現レベルを real time RT-PCR 法により解析した。GABA 作動性神経関連分子の発現は、NPAS4-KO マウスの線条体において GABAA 3, 5, 3 サブユニットおよび GABAB R1, R2 サブユニット mRNA 量が野生型マウスに比べて有意に低下した。Npas4-KO マウスの小脳では 2, 3, 1 を除く全ての GABA 受容体サブユニット mRNA レベルが顕著に低下した。このような低下は、マウスの週齢数が大きいほど顕著に観察された。また行動試験として、行動量測定、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、Y 字型迷路試験、新奇物体認識試験、恐怖条件付け試験、社会的行動試験、PPI 試験およびロータロッド試験を行ったところ、Npas4-KO マウスは多動、不安関連行動の減少、恐怖記憶の低下と共に、PPI の障害を示した。また、協調運動や運動学習能力の低下も認められた。

(平成 29 年度) GABA 神経発達に関わる Npas4 発現低下と脳機能異常の関連を調べるため、神経の異常発火を誘導するペンチレンテトラゾール投与によるてんかんモデルを用いて解析を行った。ペンチレンテトラゾール投与は、内在性 Npas4 の発現を増大させた。低濃度のペンチレンテトラゾールをマウスに連日投与すると、次第に痙攣が誘発されるようになる。Npas4-KO マウスはペンチレンテトラゾールによる痙攣が野生型よりも早い時期に誘発され、ペンチレンテトラゾール誘発痙攣への閾値が低下していることが明らかとなった。てんかんに関連する遺伝子のうち Npas4 の転写ターゲット候補を探索したところ、Homer1a が見出された。Homer1a は、神経興奮により発現が増加し、興奮を抑制する方向に機能する蛋白質である。プロモーターアッセイにより、Npas4 が Homer1a を転写することが示された。これにより、Npas4 は神経興奮によって誘導されると、神経興奮を

抑制する方向に機能する Homer1a の転写を促進し、神経興奮を抑制する働きがあることが示唆された。この成果は、Journal of Neurochemistry に掲載された。

##### 【2】長期ストレス負荷による Npas4 の転写抑制機構の解析

(平成 27 年度) ストレス負荷による Npas4 プロモーターの DNA メチル化亢進についてさらに詳しく解析した。マウス Npas4 プロモーター領域には、転写開始点付近と 1.5~2kb 上流の 2 カ所に CpG アイランドが存在する。3 週間の拘束ストレスにより、Npas4 プロモーターの転写開始点付近の CpG アイランドの DNA メチル化が亢進した。マウス神経芽細胞腫由来細胞 Neuro2a 細胞に、DNA メチル化抑制剤である 5-Aza-dC を添加すると、内在性 Npas4 プロモーターの DNA メチル化レベルは低下し、同時に Npas4 の転写が増大したことから Npas4 が DNA メチル化亢進による転写調節を受けていることが示唆された。Npas4 プロモーター領域の転写開始点付近の CpG アイランドには 2 つの CRE 配列が存在する。これらの CRE 配列に部位特異的変異を導入すると Npas4 プロモーター活性が低下したことから、転写開始点付近の CpG アイランドに含まれる CRE 配列が Npas4 プロモーター活性に重要であり、ストレス負荷が誘発する DNA メチル化亢進が CRE 配列を介した Npas4 転写を抑制したことが示唆された。この成果は、Neuroreport に掲載された。

##### 【3】Npas4 発現誘導化合物の探索

(平成 27 年度) ストレス負荷で低下する Npas4 の発現を上昇させることは脳の神経分化を促進し精神疾患の治療に結びつくのではないかと考え、Npas4 プロモーター活性を誘導する化合物を探索することを目的としてヒトおよびマウス Npas4 プロモーターをクロニングしてルシフェラーゼ遺伝子と融合されたプロモーターアッセイプラスミドを構築し、プロモーターアッセイ系を確立した。

(平成 28 年度) Npas4 プロモーターアッセイ系を用い、ファイザー社の活性化化合物ライブラリを材料として Npas4 プロモーター活性を誘導する化合物探索をおこなった。その結果、ヒトおよびマウス Npas4 プロモーター活性を共に上昇させる化合物を見出した。この化合物は濃度依存的に Npas4 プロモーター活性を上昇させた。

(平成 29 年度) 引き続き活性化化合物ライブラリの中から、Npas4 プロモーター活性を上昇させる化合物を探索し、さらに数種類の候補化合物を見出した。

今後の研究では、野生型マウスにこれらの化合物を投与し、内在性 Npas4 の転写を増大させるかどうかを確認し、さらにストレス負荷マウスの Npas4 発現低下が候補化合物投与によって抑制されるかどうかを追究する予

定である。

#### 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 10 件)

- (1) Shan, W., Nagai, T., Tanaka, M., Itoh, N., Furukawa-Hibi, Y., Nabeshima, T., Sokabe, M., Yamada, K.: Npas4 controls neuronal homeostasis in pentylenetetrazole-induced epilepsy through the induction of Homer1a *Journal of Neurochemistry* 145(1):19-33. (2018) (査読有)  
doi: 10.1111/jnc.14274.
- (2) Sumi, K., Uno, K., Noike, H., Tomohiro, T., Hatanaka, Y., Furukawa-Hibi, Y., Nabeshima, T., Miyamoto, Y., Nitta, A.: Behavioral impairment in SHATI/NAT8L knockout mice via dysfunction of myelination development *Scientific Reports* 7(1) 16872 (2017) (査読有)  
doi: 10.1038/s41598-017-17151-1.
- (3) Uno K., Kikuchi Y., Uehara T., Matsuoka T., Sumiyoshi T., Furukawa-Hibi Y., Nabeshima T., Miyamoto Y., Nitta A.: Decreased DNA methylation in the Shati/1 Nat8l promoter in both patients with schizophrenia and a methamphetamine-induced murine model of schizophrenia *PLoS One*. 11(6):e0157959 (2016) (査読有)
- (4) Sakaguchi H, Muramatsu H, Okuno Y, Makishima H, Xu Y, Furukawa-Hibi Y, Wang X, Narita A, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Yoshida N, Hama A, Takahashi Y, Yamada K, Miyano S, Ogawa S, Maciejewski JP, Kojima S.: Aberrant DNA methylation is associated with a poor outcome in juvenile myelomonocytic leukemia. *PLoS One*. 10(12):e0145394 (2015) (査読有)  
doi: 10.1371/journal.pone.0145394.
- (5) Mita T., Furukawa-Hibi Y., Takeuchi H., Hattori H., Yamada K., Hibi H., Ueda M., Yamamoto A.: Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 293: 189-197 (2015) (査読有)
- (6) Furukawa-Hibi Y., Nagai T., Yun J., Yamada K.: Stress increases DNA methylation of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene. *NeuroReport* 26(14): 827-832 (2015) (査読有)  
doi:10.1097/WNR.0000000000000430.
- (7) Sumi K., Uno K., Matsumura S., Miyamoto Y., Furukawa-Hibi Y., Muramatsu S., Nabeshima T., Nitta A.: Induction of neuronal axon outgrowth by Shati/Nat8l via energy metabolism in mice cultured neurons *NeuroReport* 26(13): 740-746 (2015) (査読有)  
doi:10.1097/WNR.0000000000000416.
- (8) Yoshihara S., Takahashi H., Nishimura N., Kinoshita M., Asahina R., Kitsuki M., Tatsumi K., Furukawa-Hibi Y., Hirai H., Nagai T., Yamada K., Tsuboi A.: Npas4 Regulates Mdm2 and thus Dcx in Experience-Dependent Dendritic Spine Development of Newborn Olfactory Bulb Interneurons. *Cell Reports* 8(3): 843-857 (2014) (査読有)  
doi:10.1016/j.celrep.2014.06.056
- (9) Miyamoto Y., Ishikawa Y., Iegaki N., Sumi K., Fu K., Sato K., Furukawa-Hibi Y., Muramatsu S., Nabeshima T., Uno K., Nitta A.: Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17(8) 1283-94 (2014) (査読有)  
doi: 10.1017/S146114571400011X.
- (10) Toriumi K., Kondo M., Nagai T., Hashimoto R., Ohi K., Song Z., Tanaka J., Mouri A., Koseki T., Yamamori H., Furukawa-Hibi Y., Mamiya T., Fukushima T., Takeda M., Nitta A., Yamada K., Nabeshima T.: Deletion of SHATI/NAT8L increases dopamine D1 receptor on the cell surface in the nucleus accumbens, accelerating methamphetamine dependence. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 443-453 (2014) (査読有)  
doi: 10.1017/S1461145713001302.

[学会発表](計 3 件)

- (1) 吉原誠一、高橋弘雄、西村信城、木下雅仁、朝比奈諒、日比陽子、永井拓、山田

清文、坪井昭夫

Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. シンポジウム 69 「神経発達制御機構研究の新たな潮流」

第 92 回日本生理学会年会、神戸ポートピア (2015). 2015/3/21-23

- (2) 吉原誠一、高橋弘雄、西村信城、木下雅仁、朝比奈諒、**日比陽子**、永井拓、山田清文、坪井昭夫

Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. 公募ワークショップ 1W6 「神経系の機能とその破綻」

第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (2014). 2014/11/25-27

- (3) 吉原誠一、高橋弘雄、西村信城、木下雅仁、朝比奈諒、**日比陽子**、永井拓、山田清文、坪井昭夫 (Selected in oral presentations)

Transcription factor Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneurons. 第 37 回日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜 (2014). 2014/9/11-13)

## 6 . 研究組織

- (1)研究代表者

日比 陽子 (HIBI YOKO)

名古屋大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：70295616