

# 脳血管障害の革新的治療法の開発につながる メカノシグナル機構の解明

所属：奈良県立医科大学 医学部 脳神経システム医科学

助成対象者：坪井昭夫

共同研究者：高橋弘雄

## 概要

脳梗塞を含む脳血管障害は、本邦の死因の4位となる極めて発生頻度の高い疾患である。脳梗塞が起こると、酸素や栄養の供給が枯渇し、梗塞巣の内外で多くのニューロンが死滅する。しかしながら、周囲の環境を感知して、細胞の生死を分けるメカノシグナルの分子機構が作動すると考えられるが、その実体は明らかにされていない。一旦、多くのニューロンが失われると、脳機能を回復させるのに効果的な治療法が存在しないのも事実である。そこで本研究では、健常脳や障害脳の神経回路において、細胞接触や神経接続によるメカノシグナルに応じて発現が誘導される遺伝子に着目して、それによって神経回路の再編や修復が活性化される仕組みを解析した。その結果、健常脳の場合には1回膜貫通型糖蛋白質 5T4 が、障害脳の場合には転写因子 Npas4 が、神経回路でのメカノシグナルにおいて重要な役割を果たすことが示唆された。

## Abstract

Cerebrovascular disorder such as cerebral infarction is an extremely frequent disease to become the fourth cause of death in this country. When the cerebral infarction occurs, the supply of oxygen and nourishment is exhausted, leading to death of many neurons around the infarct area. In this case, a molecular mechanism of mechano-signaling which determines either the survival or death of cells may function through sensing the neighboring environment; yet it remains to be clarified. In this study, we searched for the gene whose expression is induced depending on mechano-signaling via the cell-cell contact and connection in neural circuits within both normal and damaged brains, and analyzed how the gene can activate the mechanism for reshaping and restoring the neural circuits. Our results suggest that in the normal brain, the single-pass-transmembrane glycoprotein 5T4 may play an important role in mechano-signaling in the neural circuit, whereas in the damaged brain, the transcription factor Npas4 may do.

## 研究内容

### 【背景・目的】

嗅細胞で受容された匂いの情報は、嗅覚の一次中枢である嗅球に伝達され、その後、嗅皮質に伝えられ処理されることで、匂いとして認識される。嗅球の神経回路においては、抑制性の介在ニューロン（顆粒細胞や傍糸球細胞）が、興奮性の投射ニューロンの活動を調節することにより、匂い情報が処理されている（図1）。嗅球介在ニューロンは、哺乳類では例外的に成体期でも常時新生されているが、その大多数を

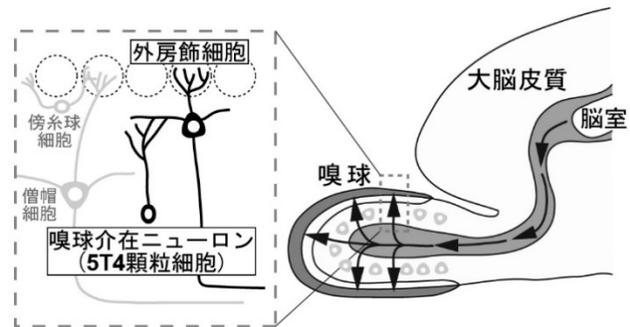


図1 嗅球介在ニューロンの発達

嗅球介在ニューロン(5T4顆粒細胞)は、成体になっても脳室周辺で常に新生され、嗅球へと移動して、既存の神経回路に組み込まれている。5T4顆粒細胞は外房飾細胞と抑制性のシナプスを形成して、神経活動を調節することで、匂いの検出と識別に必須な役割を果たす。

しめる顆粒細胞は、樹状突起の形態や産生される蛋白質の相違により、複数のサブタイプに分類される。しかしながら、嗅球で匂い情報を処理する際に、顆粒細胞の個々のサブタイプがどのような役割を果たしているのかは、ほとんど分かっていなかった。そこで、本研究では、健常脳や障害脳の神経回路において、細胞接触や神経接続によるメカノシグナルに応じて発現が誘導される遺伝子に着目して、それによって神経回路の再編や修復が活性化される仕組みを理解することを目指した。

### 【結果】

#### 1) 健常脳の神経回路においてメカノシグナルに応じて発現する遺伝子

申請者らはこれまでに、一回膜貫通型糖蛋白質 **5T4** が、顆粒細胞の中の特定のサブタイプ（以下、**5T4** 顆粒細胞）において、匂い刺激に応じて産生されて、樹状突起の枝分かれを制御していることを見出した（図1）<sup>1)</sup>。そこで本研究では、**5T4** 顆粒細胞が、嗅球神経回路で匂い情報を処理する際に果たす行動学的な役割を明らかにするために、**5T4** 欠損マウスを用いた嗅覚行動実験を行った<sup>2)</sup>。匂い物質を10倍ずつ希釈してマウスに提示して、探索行動をする匂いの検出感度を調べたところ、**5T4** 欠損マウスでは野生型と比較して、約100倍低下していることが分かった（図2）<sup>2)</sup>。また、2つの匂い分子AとBの識別能について、報酬による条件付け学習行動実験を行った。匂い分子AとBが単独で存在する場合には、野生型と**5T4** 欠損マウスは共に、それぞれを識別できた。しかしながら、匂い分子が共存する場合には、野生型マウスはAとBを識別できたのに対して、**5T4** 欠損マウスはできなかった<sup>2)</sup>。そこでさらに、匂いの識別能に関する別の実験を行った。床敷きの下にエサを埋めて、マウスがエサを見

つけるまでの時間を測定したところ、通常の条件下では、野生型と **5T4** 欠損マウスとの間で顕著な差は見られなかった。ところが、バックグラウンドの匂いとして高濃度の酢酸アミルが存在する条件下で同様な実験を行うと、**5T4** 欠損マウスは野生型と比べて、エサを見つけるまでの時間が有意に長くなった<sup>2)</sup>。これらの結果から、環境中に他の匂いが高濃度で存在する場合には、**5T4** 欠損マウスでは、目的の匂いを嗅ぎ分ける能力が低下しており、従って、「**5T4** 顆粒細胞は匂いの検出と識別という嗅覚行動に必須である」ことが明らかになった<sup>2)</sup>。

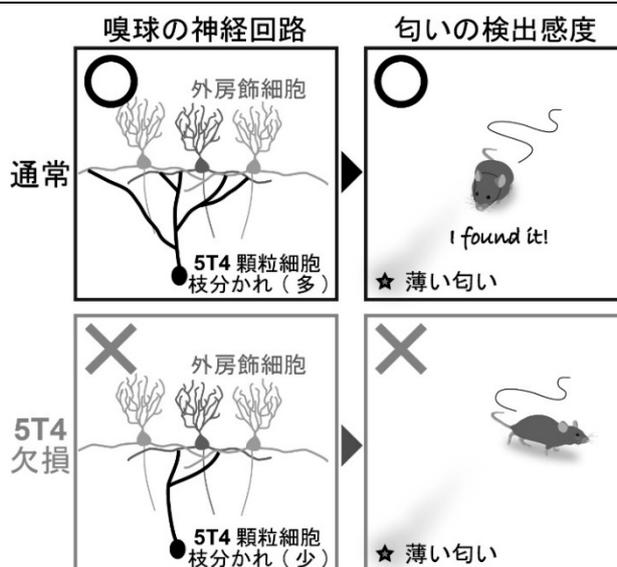


図2 5T4欠損マウスの嗅覚行動の異常  
 (左) 5T4欠損マウスでは、5T4顆粒細胞の樹状突起の枝分かれが減るので、外房飾細胞との神経接続も減少する。  
 (右) 5T4欠損マウスでは、5T4顆粒細胞から外房飾細胞への抑制性の入力が増加するので、匂いの検出感度が低下すると考えられる。

## 2) 障害脳の神経回路においてメカノシグナルに応じて発現する遺伝子

**Npas4** は嗅球の新生介在ニューロンにおいて、神経活動依存的にシナプス形成を促進する機能をもつ転写因子である<sup>3)</sup>。健常時の大脳皮質の興奮性ニューロンでも、**Npas4** は神経栄養因子 **BDNF** の発現を誘導し、神経回路の再編を促進することが知られている<sup>4,5)</sup>。**Npas4** 遺伝子は梗塞巣の周囲において、ニューロン同士の接続を介してメカノシグナル機構が維持されているので、その発現が増加している可能性が推測された。そこで申請者らは、障害脳の神経回路が機能的に再建される際に重要な役割を果たす遺伝子を、**RNA-Seq** 解析を用いて網羅的に探索した。その結果、脳梗塞マウスにおいて、梗塞直後にその発現が変動する 27 個の候補遺伝子が得られた。興味深いことに、転写因子 **Npas4** がそのリストの最上位にあったので更に解析を進めたところ、**Npas4** 欠損マウスは中大脳動脈閉塞手術により、梗塞巣のサイズが顕著に増大し、予後の運動機能も増悪化することを見出した。興味深いことに、**Npas4** は、てんかん後の過剰興奮によるニューロンの細胞死を防ぐ 9 つの **AID** (activity-regulated inhibitor of death) 遺伝子の中の 1 つであることが知られている<sup>6)</sup>。これらの解析から、**Npas4** は梗塞巣周辺で発現が増加することで、ニューロンの細胞死や脳の機能損傷を抑制し、神経細胞を保護している可能性が示唆された (申請者ら、投稿準備中)。

### 【今後】

以上の結果から、脳梗塞に伴う損傷脳の神経回路でのメカノシグナルにおいて、**Npas4** は重要な役割を果たすことが示唆された。今後は、**Npas4** の標的遺伝子を明ら

かにするために、**RNA-Seq** で得られた候補遺伝子に関して、**Npas4** 欠損の脳梗塞マウスにおける発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析する。絞られた候補遺伝子に関しては、野生型や **Npas4** 欠損の脳梗塞マウスにおいて、レンチウイルスを用いた遺伝子の過剰発現、或いは、shRNA による遺伝子の発現抑制を行い、大脳切片の組織学的解析やマウス運動機能の行動学的解析を行い、ニューロンの生存や神経回路の再編に対する効果を明らかにする。

#### 【引用文献】

- 1) Yoshihara, S. *et al.*: **J Neurosci** 32, 2217–2226 (2012).
- 2) Takahashi, H. *et al.*: **J Neurosci** 36, 8210–8227 (2016).
- 3) Yoshihara, S. *et al.*: **Cell Rep** 8, 843–857 (2014).
- 4) Lin, Y. *et al.*: **Nature** 455, 1198–1204 (2008).
- 5) Spiegel, I. *et al.*: **Cell** 157, 1216–1229 (2014).
- 6) Zhang, S. J. *et al.*: **PLoS Genet** 5, e1000604 (2009).

#### 本助成に関わる成果物

##### 【論文発表】

1. Takahashi H, Ogawa Y, Yoshihara S, Asahina R, Kinoshita M, Kitano T, Kitsuki M, Tatsumi K, Okuda M, Tatsumi K, Wanaka A, Hirai H, Stern PL and **Tsuboi A**.  
A subtype of olfactory bulb interneurons is required for odor detection and discrimination behaviors. **Journal of Neuroscience** 36: 8210-8227 (2016).
2. Murai A, Iwata R, Fujimoto S, Aihara S, **Tsuboi A**, Muroyama Y, Saito T, Nishizaki K and Imai T: Distorted coarse axon targeting and reduced dendrite connectivity underlie dysosmia after olfactory axon injury.  
**eNeuro** 3: pii ENEURO.0242-16.2016 (2016).
3. Muroi C, Kashiwagi Y, Rokugawa T, Tonomura M, Obata A, Nevzati E, **Tsuboi A**, Okuchi K, Mishima K, Abe K and Fujioka M: Evaluation of a filament perforation model for mouse subarachnoid hemorrhage using 7.0 Tesla MRI.  
**Journal of Clinical Neuroscience** 28: 141-147 (2016).

##### 【口頭発表】

4. Takahashi H, Yoshihara S, Ogawa Y, Asahina R, Kitano T and **Tsuboi A**.  
A specific subtype of olfactory bulb interneurons is necessary for odor detection and odor-background segregation. **The 17th International Symposium on Olfaction and Taste**, Yokohama, Japan (2016). (Selected talk)

【ポスター発表】

5. **Tsuboi A**, Asahina R, Yoshihara S, Fujioka M and Takahashi H.  
Neural activity-dependent transcription factor plays a crucial role in neuronal protection and survival after ischemic stroke . **2017 Cortical Development Conference: Neural Stem Cells to Neural Circuits**, Chania, Crete, Greece (2017).
6. Takahashi H, Yoshihara S, Ogawa Y, Asahina R, Kinoshita M and **Tsuboi A**.  
A specific subtype of newborn interneurons in the olfactory bulb is required for behaviors on odor detection and discrimination. **Fusion Conference on Neurogenesis: Implications for Lifelong Development and Disease**, Cancun, Mexico (2016).

【その他】