

神経恒常性維持機構の解明と創薬研究への応用

名古屋大学医学部附属病院薬剤部

永井 拓

1. 目的

脳は興奮系と抑制系のバランスが保たれることにより正常な機能を維持しているが、興奮性神経が亢進したり、抑制性神経が減弱した場合には、脳が激しく興奮する。この異常な興奮は、神経細胞の機能に大規模な変化をもたらして神経回路網の安定性に悪影響を及ぼす。ペンチレンテトラゾール (PTZ) は強力なけいれん惹起物質であるが、けいれんを誘発しない少量を繰り返しマウスに投与していくと、やがてけいれん発作の重篤化をきたす。これはキンドリングとよばれ、てんかんのモデルとして考えられている。一方、脳は情報蓄積の基礎となるシナプス入力相対的なウェイトを維持したまま、神経細胞の機能を許容限度内にコントロールする能力を備えている。興奮の度合いが上昇した場合には全ての興奮性シナプスの強度を下げ、神経細胞が自身を調整 (スケールリング) することが知られているが、このスケールリング現象の基盤となる仕組みと、その生体内での働きは不明な点が多い。Npas4 はシナプス可塑性を引き起こす電気刺激や学習・記憶課題によって特定の脳領域に特異的な発現誘導パターンを示すことから、シナプスや神経回路の長期可塑的变化への関与が示唆されている¹⁾。興奮性シナプスのシナプス後部には厚く複雑なシナプス後肥厚部があり、様々な足場タンパク質を含む。主な足場タンパク質には PSD-95、GKAP、Shank などがあり、これらの足場タンパク質は AMPA 型グルタミン酸受容体と複合体を形成している。Homer1a は AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスを促進することが知られているが²⁾、これら興奮性シナプスを構成する分子が Npas4 によってどのような制御を受けているのかについては不明である。我々は、隔離飼育や拘束ストレスによる脳機能障害に Npas4 が関与していること^{3,4)}、Npas4 の転写制御機構にはグルココルチコイド受容体複合体および Npas4 プロモーターのメチル化が関与していることを示した^{5,6)}。近年では、Npas4 による神経突起進展や神経活動依存的なシナプス形成を制御機構していることを報告している^{7,8)}。本研究課題では、Npas4 に着目して神経恒常性維持機構の解明とてんかん創薬研究への応用を目指した。

2. 方法

実験動物：実験には 8 週齢の雄性 C57BL/6 マウス (日本 SLC) を使用した。Npas4 遺伝子欠損マウス (Npas4-KO) は、Michael E. Greenberg 博士 (Harvard Medical School) より供与された。マウスは 12 時間の明暗サイクルを伴う標準的な飼育環境 (室温 23±1°C、湿度 50±5%) で飼育し、餌および水は自由摂取とした。なお、本研究は名古屋大学組織換え DNA 実験安全委員会および動物実験委員会の承認を受け、倫理的配慮のもとに行った。

PTZ 誘発けいれんモデルおよびけいれんスコア：PTZ (Sigma) は、滅菌生理食塩水に溶解した。野生型および Npas4-KO マウスを無作為に生理食塩水群または PTZ 群に割り付けた。PTZ の単回投与群は 45 mg/kg の用量を腹腔内投与した。反復投与群は 25 mg/kg の用量を 48 時間毎に腹腔内投与した。PTZ 投与後、直ちにマウスを観察用のチャンバーに入れ、けいれんの程度を 20 分間観察した。けいれんの程度は Ferraro の方法⁹⁾ に従い 5 段階にスコア化した。

リアルタイム PCR：マウスの脳を摘出し、氷冷したガラスシャーレ上で海馬を分画した。RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用した。RNA (0.5 µg) を PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio) を使用して逆転写反応を行なった後、PCR 装置を用いて mRNA 量を計測した。

In situ hybridization：DIG RNA Labeling Kit and DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche) を用いて行なった。プローブは、マウス Npas4 (NM_153553, 945-1903 bp) の PCR 産物を pSPT18 ベクターに挿入して作成した。凍結脳切片 (10 µm) を 4% paraformaldehyde (PFA) で固定し、Proteinase K (5 µg/ml) およびアセチル化処理した後、DIG 標識したプローブを加えて 50°C で一晩反応させた。翌日、サンプルを Alkaline Phosphatase 標識した抗 DIG 抗体で反応させた後に、NBT/BCIP 試薬を用いてシグナルを可視化した。

免疫組織染色：灌流固定した脳を 20 µm に薄切し、0.3% Triton X-100/PBS 溶液で処理した。5% 正常ロバ血清を含む 0.2% Triton-X 100/PBS でブロッキングを行い、一次抗体を 4°C で 24 時間インキュベートした。翌日、蛍光標識した二次抗体を室温で 1 時間反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡を使用して観察した。

イムノブロッティング：摘出した海馬組織を組織溶解溶液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、1% sodium deoxycholate、2 mM EDTA、complete protease inhibitor cocktail (Roche)、phosSTOP phosphatase inhibitors (Roche)] でホモジナイズし、遠心分離 (20,000 × g、4°C、20 分) した上清をサンプルとした。細胞膜タンパク質の抽出には Membrane Protein Extraction Kit (BioVision) を使用した。SDS-PAGE にてタンパク質を分離した後、polyvinylidene fluoride membrane に転写し、一次抗体と HRP 標識した二次抗体を反応させた。ECL Plus Western blotting detection reagents (GE Healthcare) およびイメージングシステム (Atto Instruments) を使用してバンドを可視化した。

電気生理学的解析：PTZ (45 mg/kg) または生理食塩水を投与したマウスの海馬からスライス標本を作製した。連合交連投射繊維を刺激するため CA3 透明層に刺激電極を設置した。140 mM K gluconate、10 mM KCl、2 mM MgCl₂、0.2 mM EGTA、10 mM HEPES、3 mM Mg-ATP、0.3 mM Na-GTP (pH 7.2) を充填したガラスピペット (6-8 MΩ) を CA3 錐体細胞にパッチクランプし、AMPA 受容体依存性微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を記録した。

アデノ随伴ウイルス：マウス Homer1a および Homer1c の cDNA を pAAV-CAGGS-EGFP-P2A-MCS plasmid に挿入し、プラスミドベクターを作製した。ウイルス液は HEK293FT 細胞を用いて調製し、qPCR 法により力価を測定した。調製した AAV をマウス海馬に微量注入し、3 週間後に実験に使用した。

統計解析：結果は全て平均値±標準誤差で表示した。一元配置、二元配置または三元配置分散分析を行い、F 値に有意差が検出された場合には Tukey の多重比較検定を実施した。二群間の解析には Student の t 検定を使用した。いずれの検定においても $p < 0.05$ で有意差ありと判断した。

3. 結果および考察

けいれん発作を惹起しない低用量の PTZ (GABA_A 受容体拮抗薬) を反復投与するとキンドリングが形成され、この現象はてんかんの動物モデルとして幅広く研究に使用されている^{10,11)}。はじめに、低用量 (25mg/kg) と高用量 (45 mg/kg) の PTZ を C57BL/6 マウスに投与してけいれん域値を調べた。低用量の PTZ を投与したマウスではほとんどけいれんが観察されなかったが、高用量の PTZ を投与したマウスでは、ほぼ全てのマウスにけいれんが観察された。したがって、キンドリングマウスの作製には低用量の PTZ (25mg/kg) を 48 時間毎に投与することにした。C57BL/6 マウスに低用量 PTZ を 16 回投与すると安定したキンドリング状態が観察された。この時、PTZ 最終 1 時間後のマウス海馬において Npas4 mRNA の発現を調べたところ、生理食塩水を投与したコントロール群に比べて有意な発現増加が観察された。一方、低用量 PTZ 単回投与では Npas4 mRNA の発現はコントロール群と同程度であった。これらの結果は、キンドリングを呈したマウスでは、活動依存的に Npas4 が誘導されることを示している。

次に、Npas4 がけいれんの感度またはてんかんに関与しているかどうかを調べる目的で、野生型および Npas4-KO マウスを用いて PTZ 誘発性のけいれん発作とキンドリングの形成について調べた。高用量 PTZ 誘発性けいれん発作は野生型および Npas4-KO マウスで観察され、両群間に有意な差は認められなかった。一方、キンドリングの形成に関して、Npas4-KO マウスは野生型マウスと比べて速やかにキンドリングが形成した ($p < 0.01$)。この行動実験の結果を支持して、神経活動マーカーである cFos mRNA の発現も PTZ を投与した Npas4-KO マウスで顕著に増加し、野生型よりも高値を示した ($p < 0.01$)。したがって、Npas4 はキンドリングの形成に対して抑制的に作用することが示唆された。

けいれん発作後の Npas4 の動態変化を調べるために、PTZ (45 mg/kg) を単回投与した C57BL/6 マウスの海馬における Npas4 mRNA およびタンパク質の発現変化を調べた。Npas4 mRNA の発現は PTZ 投与 30 分後および 1 時間後で増加し ($p < 0.01$)、投与 2 時間後にはコントロールマウスと同等の値に低下した。PTZ 投与 1 時間後における Npas4 mRNA の発現増加は、ヒトや動物モデルでてんかんと関連性が報告されている^{12,13)} 海馬の CA 領域および歯状回で観察された。Npas4 タンパク質の発現は PTZ 投与後 2 時間後で高値を示し、投与後 4 時間以内にはコントロールレベルまで低下した。免疫組織染色法でも PTZ を投与したマウスの海馬全体で Npas4 陽性細胞が増加することを確認した。

PTZ 誘発性により誘導された Npas4 がホメオスタシスシグナルを制御すると想定し、下流に存在する Npas4 の標的遺伝子を調べた。過去の報告において、ChIP シーケンシングスクリーニングやマイクロアレイ解析により Npas4 の標的候補遺伝子が多数同定されている^{8,14)}。Npas4 標的遺伝子の中でも Homer1a は、てんかん誘発性刺激により発現が増加し¹⁵⁾、興奮性シナプスのホメオスタシスに関与することが報告されていること^{16,17)} から、以下の研究では Homer1a に着目して実験を行なった。PTZ (45 mg/kg) を投与した野生型マウスの海馬では、Homer1a の mRNA およびタンパク質が顕著に増加し、Npas4-KO マウスでは PTZ 誘発性 Homer1a の発現誘導が減弱した ($p < 0.01$)。PTZ を投与した野生型マウスの海馬では、同一細胞内に Npas4 タンパク質と Homer1a mRNA が共局在することを確認した。一方、他の Homer1 アイソタイプである Homer1c に関しては野生型および Npas4-KO マウスに PTZ を投与しても有意な変化は認められなかった。これらの結果は、けいれん発作後に Npas4 が海馬で Homer1a を特異的に発現誘導することを示している。

シナプススケールは神経可塑性を担う重要な基盤であり、神経ネットワークの異常な興奮や抑制による神経の破綻を保護するホメオスタシス機構である¹⁸⁾。我々は、この機構が Npas4 を介したてんかん発作後のホメオスタシスに関与しているのではないかと考え、興奮性シナプス伝達に関与する AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA1 サブユニットの細胞膜における発現を調べた。野生型マウスに PTZ (45 mg/kg) を投与し、24 時間後に海馬から細胞膜分画を調製して AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA1 サブユニットの発現をイムノブロット法で調べた結果、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して PTZ 投与群では AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA1 サブユニットの発現が有意に低下した。この時、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA1 サブユニットの総発現量はコントロール群と PTZ 投与群との間に有意な差は認められなかった。一方、PTZ を投与した Npas4-KO マウスでは AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA1 サブユニットの細胞膜発現が野生型マウスに比べて有意に減弱していた。したがって、PTZ 投与後には Npas4 を介して AMPA 型グルタミン酸受容体が細胞膜から細胞内へと局在が変化することが示唆された。

細胞膜表面に発現する AMPA 型グルタミン酸受容体の減少が、興奮性シナプス伝達に影響するのかどうかを調べた。PTZ 投与 24 時間後に電気生理学的解析を行った結果、PTZ 投与した野生型マウスの海馬 CA3 領域では連合交連投射繊維の刺激に伴う微小興奮性シナプス後電流の振幅が減少した ($p < 0.01$)。一方、Npas4-KO

マウスにおいて、PTZ を投与しても微小興奮性シナプス後電流の振幅に有意な変化は認められなかった。これらの結果から、Npas4 は、神経細胞の異常な興奮により誘導される AMPA 受容体のエンドサイトーシスを促進し、興奮性神経伝達を低下させることが示唆された。

最後に Npas4-KO マウスで観察される PTZ 誘発性キンドリングの形成促進が Homer1a の遺伝子導入により回復するかどうかを調べた。Homer1a を発現させる AAV を Npas4-KO マウスの海馬に微量注入し、免疫染色により Homer1a が海馬に発現すること、Homer1a の遺伝子導入により AMPA 型グルタミン酸受容体 GluA1 サブユニットの細胞膜での発現が低下することを確認した。EGFP のみを遺伝子導入した Npas4-KO マウスでは野生型マウスよりもキンドリングが速やかに形成され、Homer1a を遺伝子導入した Npas4-KO マウスでは野生型マウスと同程度にまで回復した。一方、Homer1c を遺伝子導入した Npas4-KO マウスでは、EGFP のみを遺伝子導入した Npas4-KO マウスと同様にキンドリング形成が促進した。したがって、Npas4-Homer1a 経路の活性化がてんかんの治療標的になり得ることを示唆した。

4. まとめ

本研究ではPTZ投与により抑制性神経入力が増減され、それに伴い興奮性神経入力が増減すると、Npas4 が海馬で誘導されることを示した。また、Npas4 は Homer1a の発現を促進することで AMPA 受容体のエンドサイトーシスを促進し、興奮性神経伝達を低下させることを見出した。以上の結果から、Npas4-Homer1a 経路は、神経細胞の異常な興奮を抑制するネガティブフィードバック機構（神経恒常性維持機構）を担っていると考えられる（図1）。

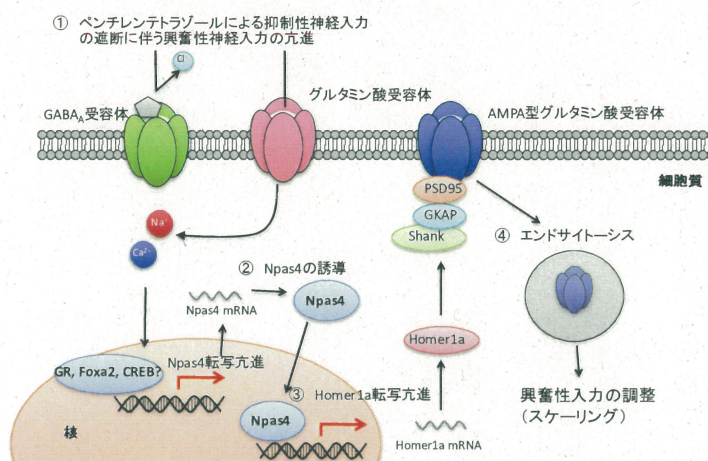


図1. Npas4による神経恒常性維持機構モデル

5. 謝辞

本研究をご支援いただきました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

1. Sun X. and Lin Y. (2016) Npas4: Linking Neuronal Activity to Memory. Trends Neurosci. 39, 264-275.
2. de Bartolomeis A et al. (2014) Glutamatergic postsynaptic density protein dysfunctions in synaptic plasticity and dendritic spines morphology: relevance to schizophrenia and other behavioral disorders pathophysiology, and implications for novel therapeutic approaches. Mol Neurobiol. 49, 484-511.
3. Ibi D. et al. (2008) Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. 105, 921-932.
4. Yun J. et al. (2010) Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. J Neurochem. 114, 1840-1851.
5. Furukawa-Hibi Y. et al. (2012) Transcriptional suppression of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene by stress via the binding of agonist-bound glucocorticoid receptor to its promoter. J Neurochem. 123, 866-875.
6. Furukawa-Hibi Y. et al. (2015) Stress increases DNA methylation of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene. Neuroreport. 26, 827-832.
7. Yun J. et al. (2013) Neuronal Per Arnt Sim (PAS) domain protein 4 (NPAS4) regulates neurite outgrowth and phosphorylation of synapsin I. J Biol Chem. 288, 2655-2664.
8. Yoshihara S. et al. (2014) Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent dendritic spine development of newborn olfactory bulb interneurons. Cell Rep. 8, 843-857.
9. Ferraro T.N. et al. (1999) Mapping loci for pentylentetrazol-induced seizure susceptibility in mice. J. Neurosci. 19, 6733-6739.
10. Morimoto K. et al. (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. Prog. Neurobiol. 73, 1-60.
11. Dhir A. (2012) Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 9, Unit9.37.
12. Cavus I. et al. (2008) Decreased hippocampal volume on MRI is associated with increased extracellular glutamate in epilepsy patients. Epilepsia 49, 1358-1366.
13. Gelinas J.N. et al. (2016) Interictal epileptiform discharges induce hippocampal-cortical coupling in temporal lobe epilepsy. Nat. Med. 22, 641-648.
14. Lin Y. et al. (2008) Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. Nature 455, 1198-1204.
15. Cavarsan C.F. et al. (2012) Pilocarpine-induced status epilepticus increases Homer1a and changes mGluR5 expression. Epilepsy Res. 101, 253-260.
16. Diering G.H. et al. (2017) Homer1a drives homeostatic scaling-down of excitatory synapses during sleep. Science 355, 511-515.
17. Hu J.H. et al. (2010) Homeostatic scaling requires group I mGluR activation mediated by Homer1a. Neuron 68, 1128-1142.
18. Turrigiano G.G. et al. (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. Cell 135, 422-435.