

Npas4関連因子を用いた脳梗塞の新規予防・治療法の開発

プロジェクト 責任者

1. 大阪大学大学院医学系研究科、2. 大阪大学大学院薬学研究科

教授 片山 泰一¹、招へい教授 坪井 昭夫²

プロジェクト概要

脳血管疾患は、本邦死因の4位となる発生頻度の高い疾患です。しかし、脳血管疾患の多くを占める脳梗塞(脳虚血)により脳が損傷した場合、失われた神経細胞や回路を補填するのに有効な治療法は未だに確立されていません。また、脳血管疾患は認知症と並び、要介護者を生む最大の要因です。そこで、「脳梗塞により破綻した脳の構造や機能を、どのようにして再構築し、修復するのか？」は、超高齢化社会において極めて重要な問題です。

これまでに、脳梗塞の発症初期において転写因子Npas4の発現が、梗塞部位の周囲の神経細胞で著しく誘導され、神経細胞の生死に重要な役割を果たすことは示唆されていましたが、Npas4の下流で細胞の生死を制御する遺伝子については、ほとんど究明されていませんでした。

私共は、マウスを通常のホームケージから移し、遊具などを加えた刺激の多い、新規のケージ(刺激の豊富な環境)で40日間飼育した後に、脳梗塞手術を行うと、驚くべきことに神経細胞死が、コントロールと比べて顕著に減少することを見出しました。これは、マウスを刺激の豊富な環境にさらすことで、大脳皮質ニューロンにおいてNpas4の発現が著しく増加したことに依ると考えられました。さらに、*in vitro* 脳虚血様負荷モデルを用いて、Npas4の下流因子を系統的に検索した結果、神経細胞死の抑制(神経保護)に関与する低分子量Gタンパク質に属するGemを同定しました。また、マウスの脳であらかじめGemを一過性に発現させると、脳梗塞後の神経細胞死が顕著に減少したことから(図1)、Npas4により誘導されるGemは、L型電位依存性Ca²⁺チャネルの局在を阻害することで、細胞内へCa²⁺流入を減少させ、神経細胞死を抑制することがわかりました。

ヒトの大脳皮質オルガノイド培養に対して、脳虚血様負荷を与えた際にも、Gemのオーソログ遺伝子の発現が誘導されることから、脳梗塞治療の新たな創薬ターゲットとして期待されます(Takahashi *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **118**: e2018850118, 2021)。

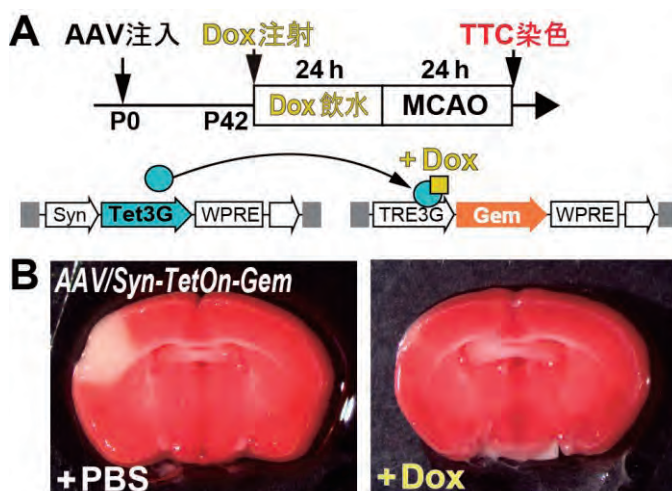


図1. マウス脳で予めGemを一過性に発現させると脳梗塞後の神経細胞死が著しく減少した

A) 脳梗塞手術前に、アデノ随伴ウイルスAAV/Syn-Tet3Gシステムを用いて、Gem遺伝子を過剰発現させた実験の模式図。生後0日目(P0)の仔マウスの脳室に、2種類のアデノ随伴ウイルス(AAV/Syn-Tet3GとAAV/TRE3G-Gem)を同時に注入した。42日後にマウスをPBS(phosphate-buffered saline)またはDox(doxycycline)で処理した後に、脳梗塞手術を行った。その24時間後にTTC染色を行い、梗塞巣のサイズを測定した。

B) マウスの脳であらかじめGem遺伝子を一過性に発現させると、脳梗塞後の神経細胞死が著しく減少することがわかった。

対象疾患のほかに特許情報：脳血管障害、特許出願準備中
技術の特徴、市場性、開発における課題：標的化合物の探索
希望する企業連携の内容：共同研究
企業とアカデミアの役割分担：製品開発、及び、その基盤研究

Novel therapeutic strategy for cerebral stroke using Npas4-related factors

Principal Investigator

1. Graduate school of medicine, The University of Osaka
 2. Graduate school of pharmaceutical sciences, The University of Osaka
- Professor Taiichi KATAYAMA¹, Guest Professor Akio TSUBOI²**

Project Outline

Cerebrovascular diseases are the fourth leading cause of death in Japan, with a high incidence. However, when the brain is damaged by cerebral stroke (ischemia), which accounts for the majority of cerebrovascular diseases, an effective treatment to replace the lost neurons and circuits has not yet been established. In addition, cerebrovascular diseases, along with dementia, are the biggest causes of people requiring nursing care. Therefore, "how to reconstruct and repair the brain structure and functions that have been disrupted by cerebral infarction?" is an extremely important question in our super-aging society.

It has been suggested that the expression of the transcription factor *Npas4* is strongly induced in neurons surrounding the infarct foci in the early stage after stroke and regulates the survival and death of neurons; yet the genes acting downstream of *Npas4* remain unknown.

We found that when mice were transferred from a home cage to expose them for a short time into a new cage containing play equipment (an enriched environment), and then subjected to stroke surgery, neuronal death in the mice was surprisingly reduced. This appeared to be because exposure of the mice to the enriched environment caused a marked increase of *Npas4* expression in cortical neurons. Furthermore, based on an *in vitro* ischemia-like stress model, we systematically searched for genes downstream of *Npas4* to successfully identify *Gem*, which encodes a Ras-like small GTPase directly involved in neuroprotection. In addition, when *Gem* was transiently expressed in the mouse brain, neuronal death after stroke was markedly reduced (**Fig. 1**). This reveals that *Gem*, downstream of *Npas4*, plays an important role in suppression of neuronal death (neuroprotection) via mis-localization of L-type voltage-gated Ca^{2+} channel.

Since an orthologue of *Gem* is also induced in human cortical organoids by ischemic-like stress, *Gem* is expected to be a novel drug target for the therapy of stroke (Takahashi *et al.*, **Proc Natl Acad Sci USA**, 118: e2018850118, 2021).

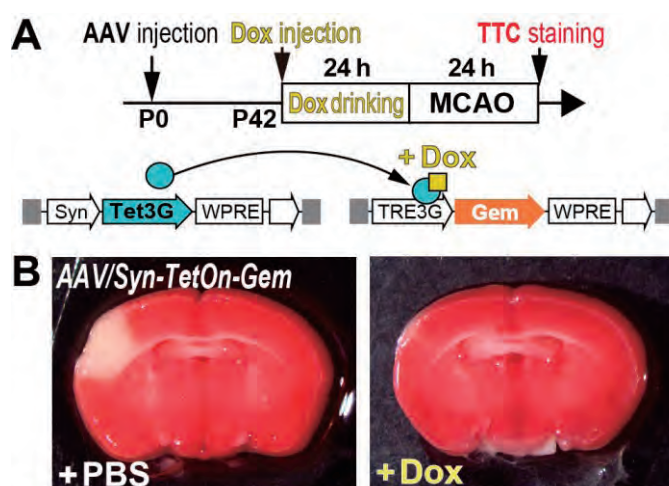


Figure 1. Transient expression of *Gem* in the mouse brain markedly reduced neuronal death after stroke.

(A) Schematic diagram of the experiment in which *Gem* was overexpressed using the adeno-associated virus AAV/Syn-TetOn system before stroke surgery. Two viruses (AAV/Syn-Tet3G and AAV/TRE3G-*Gem*) were simultaneously injected into the ventricles of pup mice at postnatal day 0 (P0). Forty-two days later, mice were treated with either PBS (phosphate-buffered saline) or Dox (doxycycline) and then subjected to stroke surgery. Twenty-four hours later, TTC staining was performed to measure the size of the infarct foci.

(B) Transient expression of *Gem* in the mouse brain markedly reduced neuronal cell death after stroke.

Patent information in addition to target diseases: cerebrovascular disorders, preparing patent application
 Characteristics of the technology, marketability, and issues in development: Search for target compounds
 Desired nature of corporate collaboration: Joint research
 Division of roles between companies and academia: Product development and basic research