

### 成熟期および幼若期にイボテン酸を経口投与した際の 海馬での網羅的遺伝子発現変動解析

#### 幼若期 [NTG019HC]:

- ・ 生物学的に発現増加: 136 ps; 減少: 137 ps
- ・ 市販のインフォマティクス (IPA) による検索: 該当するシグナルネットワークなし

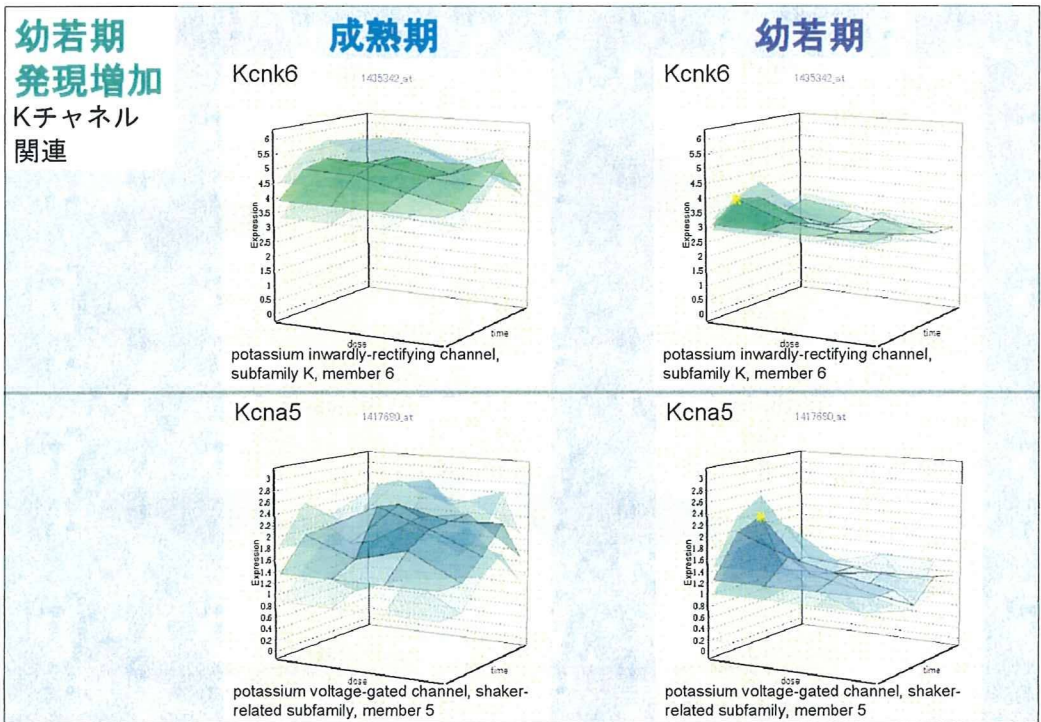
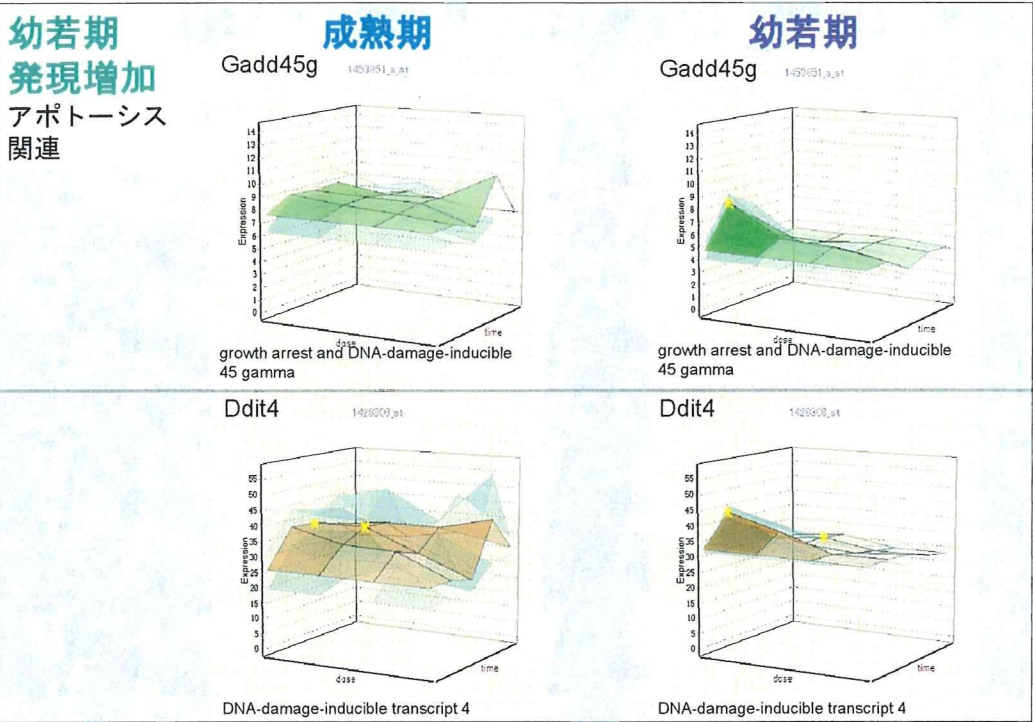
→ 海馬において機能未知の遺伝子・シグナルネットワークが多い可能性

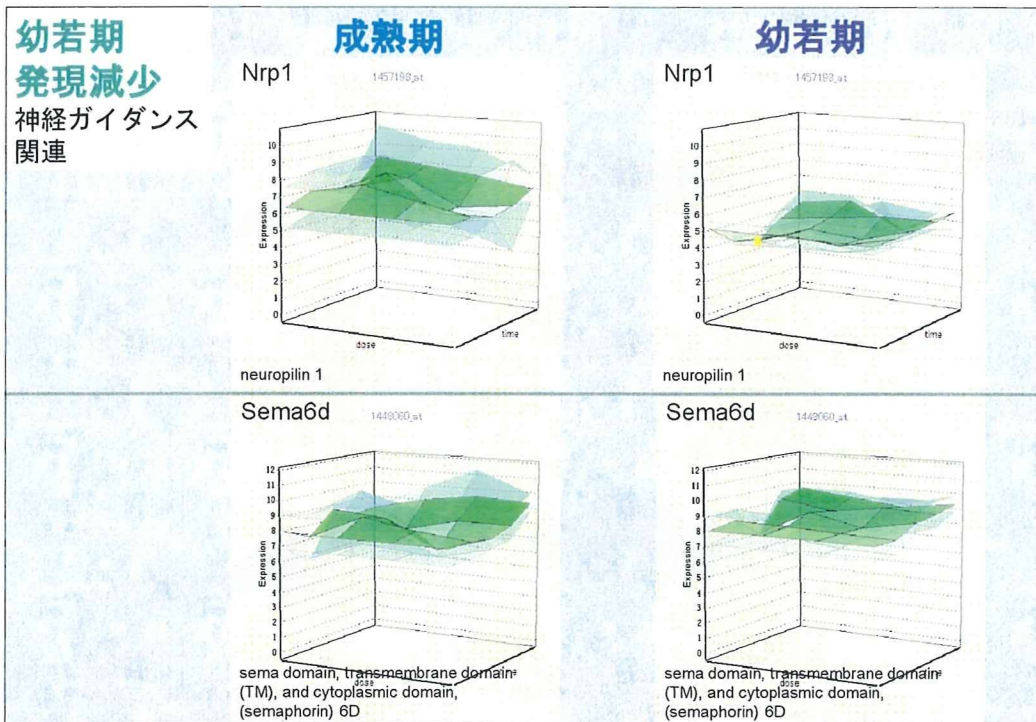
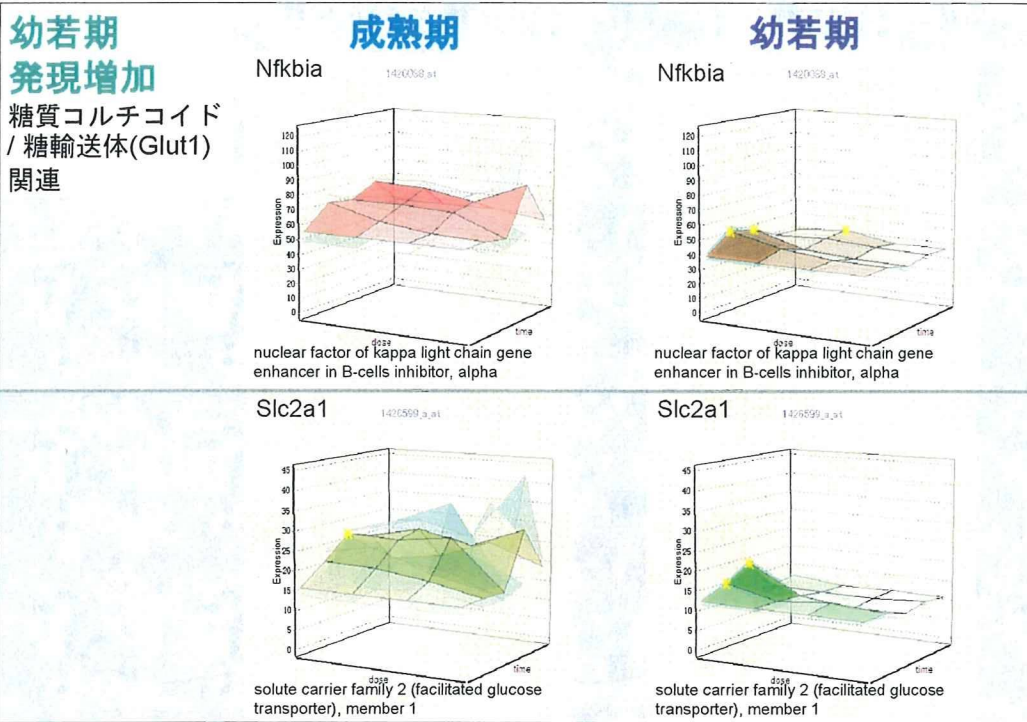
#### 増加:

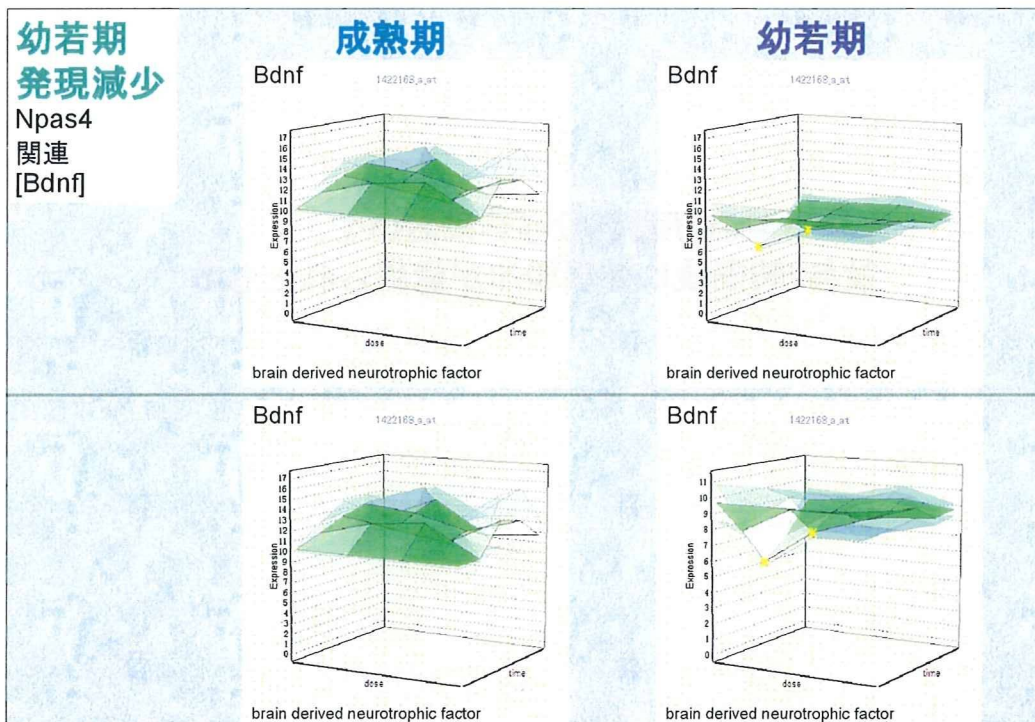
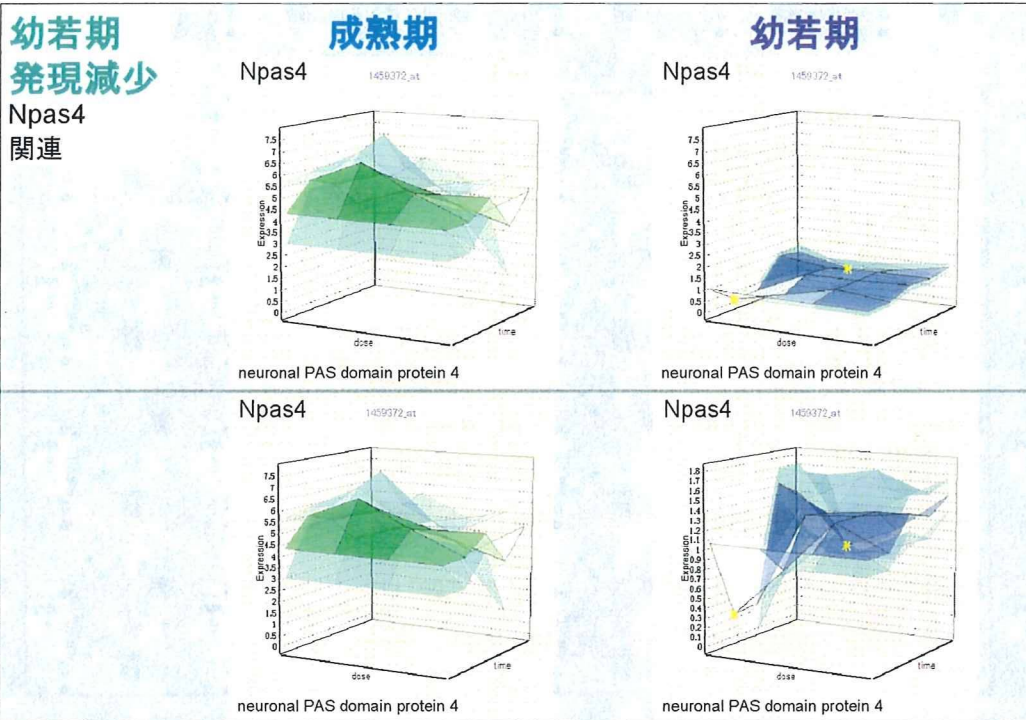
- ・ 細胞障害に関係するシグナルとして、アポトーシス (Gadd45g, Ddit4, Trp53inp1)、膜の過分極 (Kcnk6, Kcne11等)、糖質コルチコイド (Nfkb1a, Sgk1)、インスリン非依存性の糖取込み (Glut1=S1c2a1)
- ・ 海馬での機能が不明であるが投与初期 (2時間後) に、Gタンパク質共役受容体 Gpr146

#### 減少:

- ・ 神経関連遺伝子では、GABA-A (Gabra4, Gabra2) およびニューロペプチドY受容体 (Npy1r)
- ・ 細胞障害に関係するシグナルとして、neuropilin・semaphorin分子を介する神経ガイダンス (Nrp1, Sema6a, Sema6d)、Npas4分子を介するシナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持 (Npas4, Bdnf)





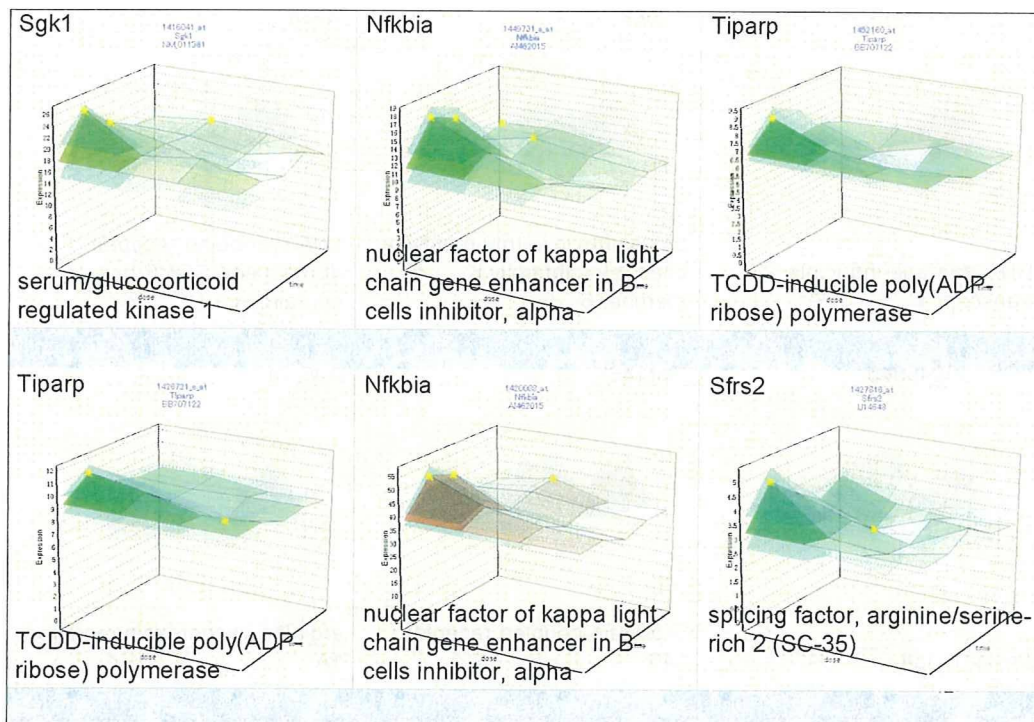
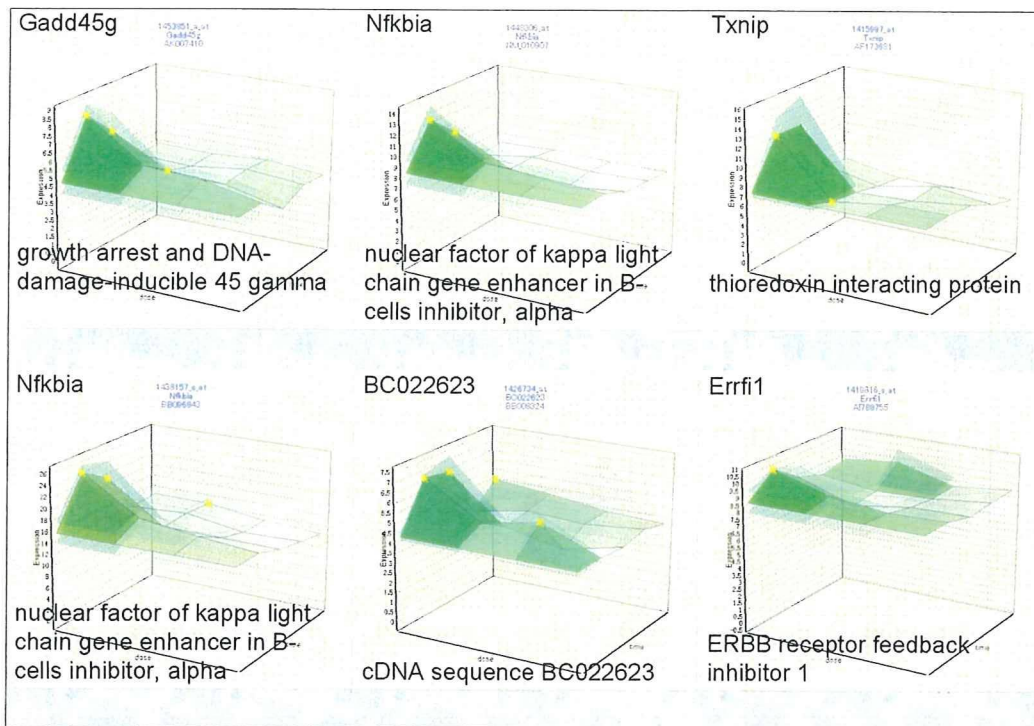


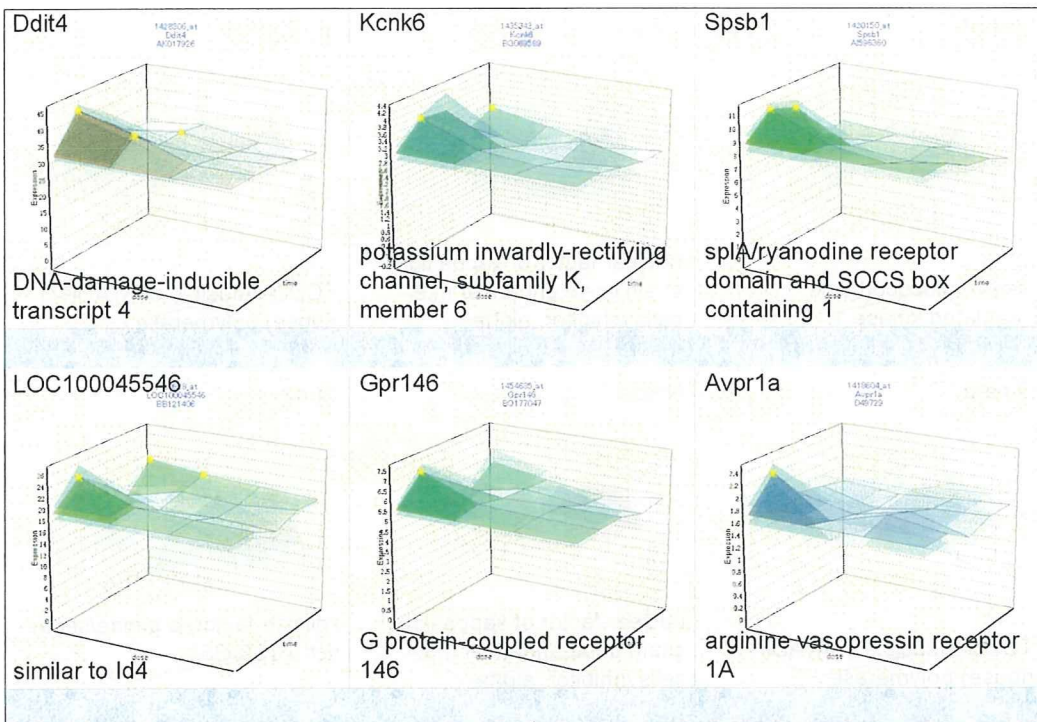
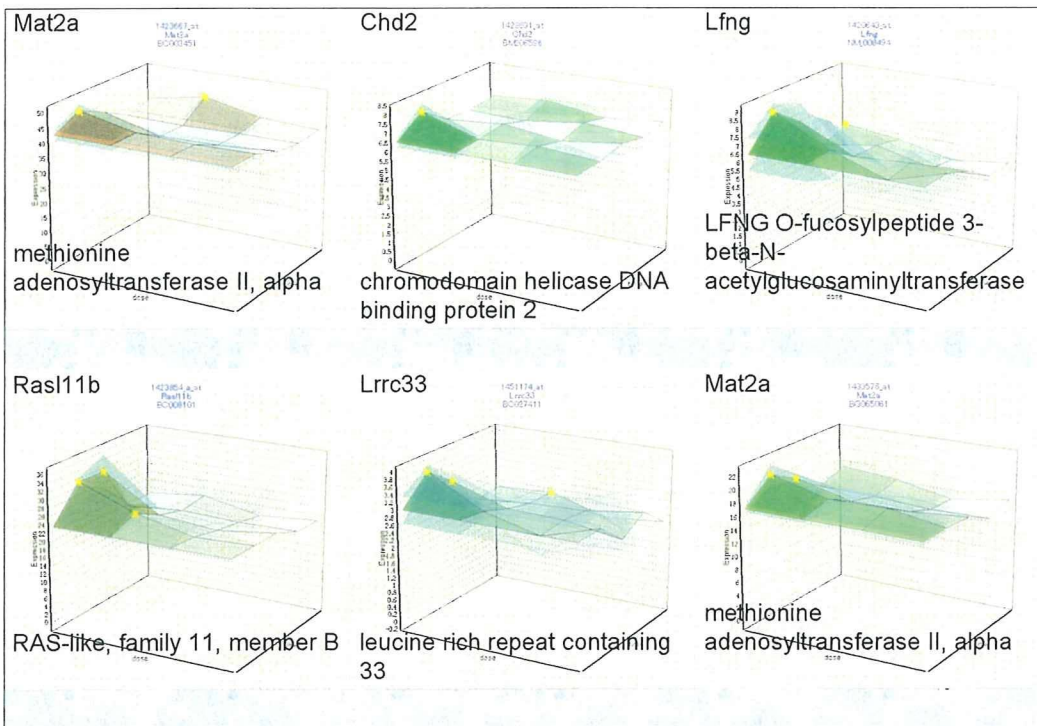
## 成熟期および幼若期にイボテン酸を経口投与した際の 海馬での網羅的遺伝子発現変動解析

### 幼若期 [NTG019HC]:

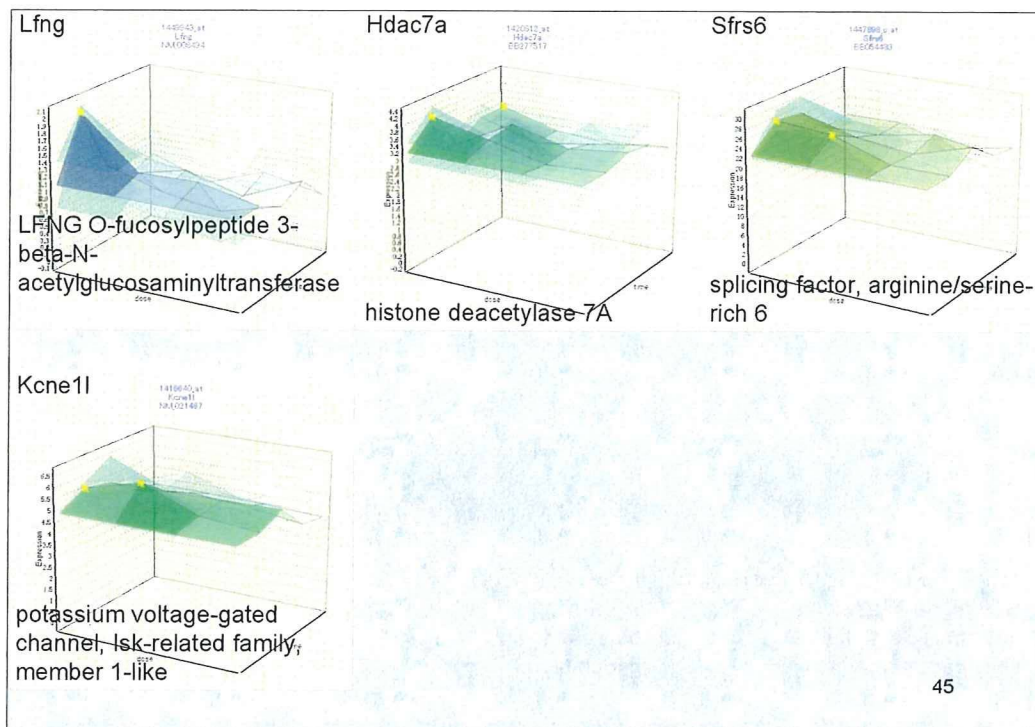
- ・ 生物学的に発現増加: 136 ps; 減少: 137 ps
  - ・ 市販のインフォマティクス (IPA) による検索: 該当するシグナルネットワークなし  
→海馬において機能未知の遺伝子・シグナルネットワークが多い可能性
- 増加:**
- ・ 細胞障害に関係するシグナルとして、**アポトーシス** (Gadd45g、Ddit4、Trp53inp1)、**膜の過分極** (Kcnk6、Kcne11等)、**糖質コルチコイド** (Nfkbia、Sgk1)、**インスリン非依存性の糖取込み** (Glut1=Slc2a1)
  - ・ 海馬での機能が不明であるが投与初期 (2時間後) に、Gタンパク質共役受容体Gpr146
- 減少:**
- ・ 神経関連遺伝子では、**GABA-A** (Gabra4、Gabra2) および**ニューロペプチドY受容体** (Npy1r)
  - ・ 細胞障害に関係するシグナルとして、neuropilin・semaphorin分子を介する**神経ガイダンス** (Nrp1、Sema6a、Sema6d)、**Npas4**分子を介する**シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持** (Npas4、Bdnf)

幼若期暴露投与群において、  
投与2時間後に発現増加が認められたもの

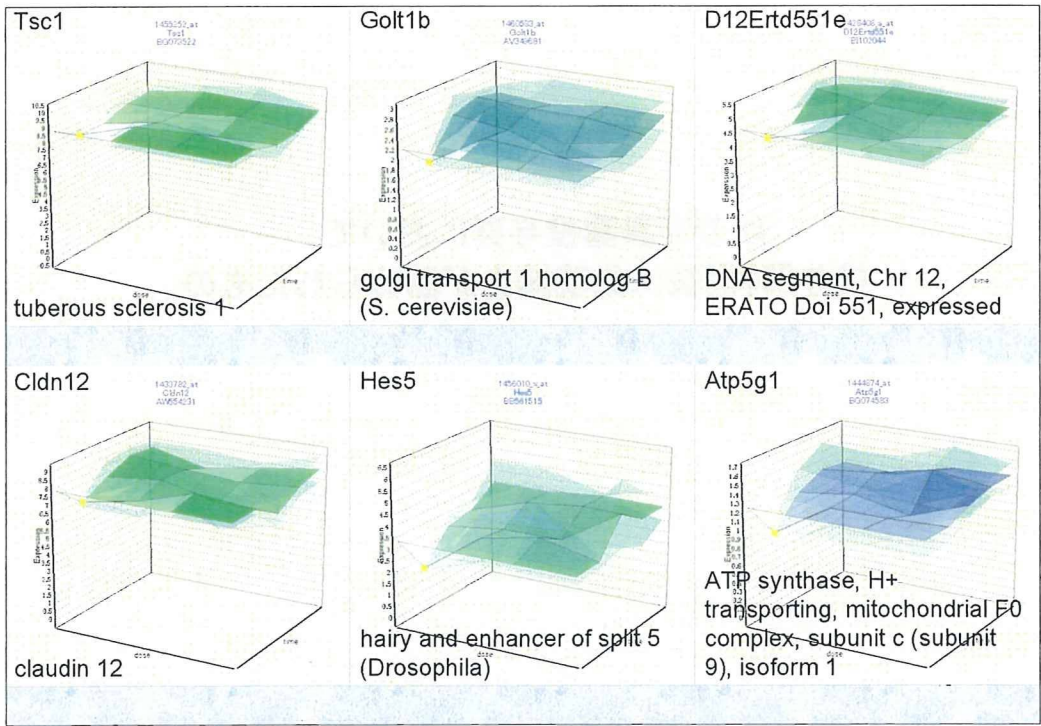
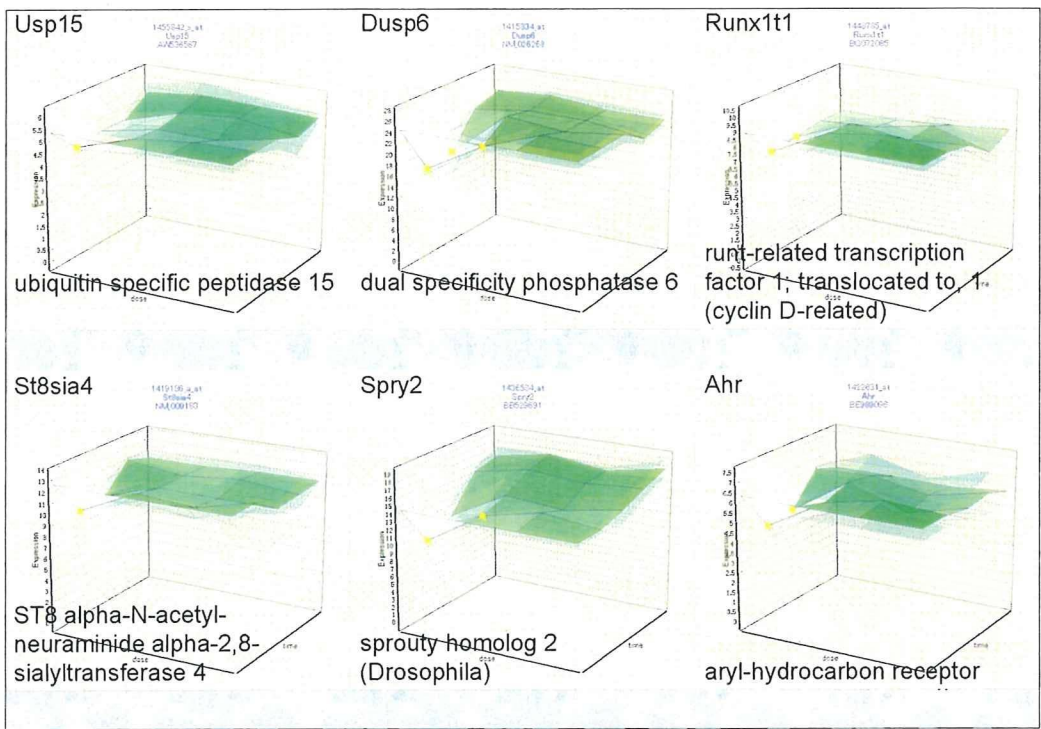


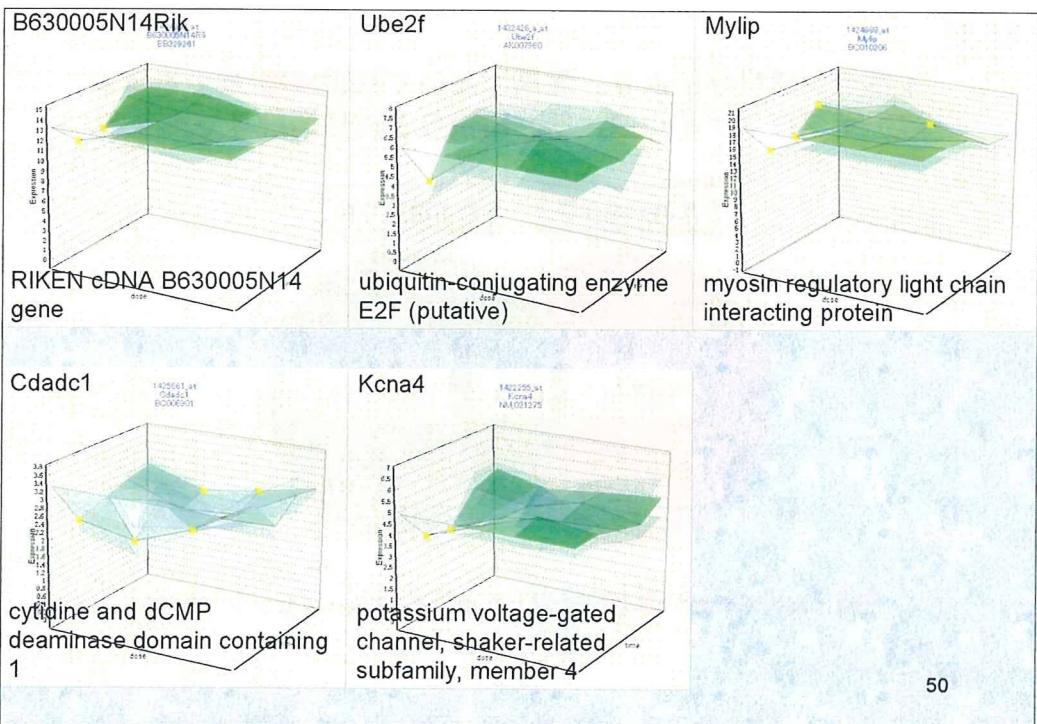
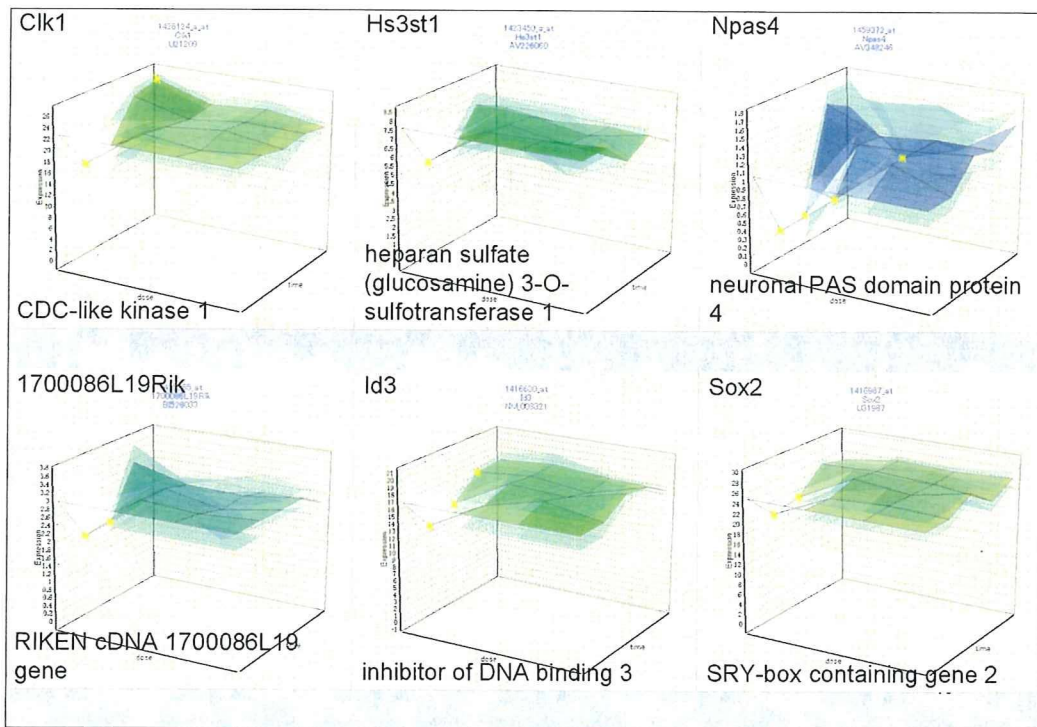






幼若期暴露投与群において、  
 投与2時間後に発現減少が認められたもの





## 解析のストラテジー

イボテン酸投与により、幼若期投与群で認められた  
遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク

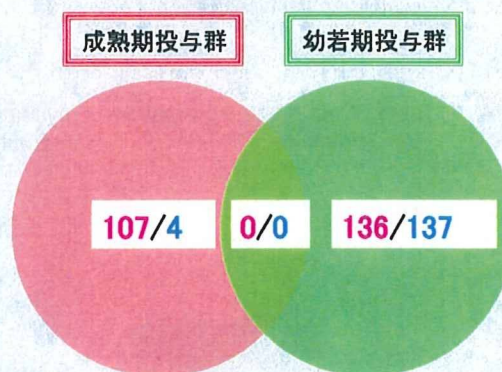
=

成熟期投与群では変動が認められず、幼若期投与群で変動する  
シグナルである可能性が高い

51

## 結果

イボテン酸投与により、海馬において発現増加/減少を示す  
遺伝子プロファイルは、幼若期投与と成熟期投与で異なる



海馬において発現が増加/減少した遺伝子(プローブセット: PS)数

52

## 解析のストラテジー

イボテン酸投与により、幼若期投与群で認められた  
遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク

=

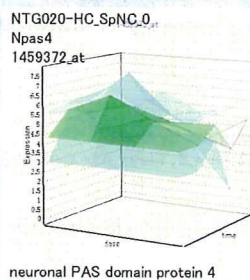
成熟期投与群では変動が認められず、幼若期投与群で変動する  
シグナルである可能性が高い

→遅発性の行動異常に関連する可能性のあるシグナル：  
アポトーシス、膜の過分極、糖質コルチコイド、GABA-A受容体  
を介したシグナル、  
neuropilin・semaphorin分子を介する神経ガイダンス、  
Npas4分子を介するシナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持

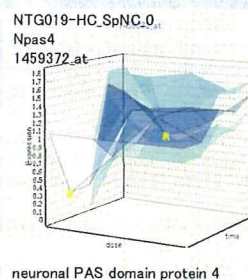
53

シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持に働く「マスタースイッチ」である  
転写因子Npas4遺伝子の発現は、イボテン酸を幼若期に投与した際に減少する

成熟期投与群



幼若期投与群



*Nature*. 2008 October 30; 455(7217): 1198–1204. doi:10.1038/nature07319.

Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development  
by Npas4

Yingxi Lin<sup>1</sup>, Brenda L. Bloodgood<sup>1</sup>, Jessica L. Hauser<sup>1,†</sup>, Ariya D. Lapan<sup>2</sup>, Alex C.  
Koon<sup>1,†</sup>, Tae-Kyung Kim<sup>1</sup>, Linda S. Hu<sup>1</sup>, Athar N. Malik<sup>1,3</sup>, and Michael E. Greenberg<sup>1</sup>

54

転写因子Npas4は、シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持に働く「マスタースイッチ」:

Npas4は200個以上の活動依存的遺伝子の発現を制御しており、この働きにより、GABA介在性シナプスの数を制御する

Editor's Summary  
30 October 2008

### Balance of mind

A fine balance between the numbers of excitatory and inhibitory synapses must be maintained for neuronal circuits to function. The intracellular molecular signalling pathways involved in activity-dependent formation of synapses, particularly inhibitory ones, are largely unknown. A new study has identified the transcription factor **Npas4** as a 'master switch' acting in brain cells to maintain the homeostatic balance between synaptic excitation and inhibition, a balance that is thought to be disrupted in neurologic disorders such as **autism, epilepsy and schizophrenia**. Npas4 acts by regulating the expression of **more than 200 activity-dependent genes**, which in turn control the number of **GABA-mediated synapses** that form excitatory neurons

Article:  
Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4  
Yingxi Lin, Brenda L. Bloodgood, Jessica L. Hauser, Ariya D. Lapan, Alex C. Koon, Tae-Kyung Kim, Linda S. Hu, Athar N. Malik & Michael E. Greenberg  
doi:10.1038/nature07319

### Npas4のMedline検索結果 [Npas4 = (bHLH-PAS factor) NXF]

Results: 11

3. Characterization of functional heterodimer partners in brain for a bHLH-PAS factor NXF.

Ooe N, Saito K, Kaneko H.

Biochim Biophys Acta. 2009 Mar;1789(3):192-7.

4. Functional characterization of basic helix-loop-helix-PAS type transcription factor NXF in vivo: putative involvement in an "on demand" neuroprotection system.

Ooe N, Motonaga K, Kobayashi K, Saito K, Kaneko H.

J Biol Chem. 2009 Jan 9;284(2):1057-63. Epub 2008 Nov 10.

5. Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4.

Lin Y, Bloodgood BL, Hauser JL, Lapan AD, Koon AC, Kim TK, Hu LS, Malik AN, Greenberg ME.

Nature. 2008 Oct 30;455(7217):1198-204. Epub 2008 Sep 24.

9. Characterization of Drosophila and Caenorhabditis elegans NXF-like-factors, putative homologs of mammalian NXF.

Ooe N, Saito K, Oeda K, Nakatuka I, Kaneko H.

Gene. 2007 Oct 1;400(1-2):122-30. Epub 2007 Jun 14.

10. Npas4, a novel helix-loop-helix PAS domain protein, is regulated in response to cerebral ischemia.

Shamloo M, Soriano L, von Schack D, Rickhag M, Chin DJ, Gonzalez-Zulueta M, Gido G, Urfer R, Wieloch T, Nikolich K.

Eur J Neurosci. 2006 Nov;24(10):2705-20.

11. Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression.

Ooe N, Saito K, Mikami N, Nakatuka I, Kaneko H.

Mol Cell Biol. 2004 Jan;24(2):608-16.

Table 1 Representatives of bHLH-PAS protein family members

- (1) response to environmental pollutants  
AhR (aryl hydrocarbon receptor)  
AhRR (AhR repressor)
- (2) response to low oxygen  
HIF (hypoxia inducible factor) 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$
- (3) neural development  
SIM (single-minded) 1, SIM2
- (4) circadian rhythm  
per (period) 1, 2, 3  
clock  
BMAL (brain muscle ARNT-like) 1, 2
- (5) general partner  
Arnt (AhR nuclear translocator) 1, Arnt2

57

目的：化学物質による遅発性の情動認知行動毒性の分子基盤を明らかにする

## まとめ

1) イボテン酸(1 mg/kg)経口投与により、幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり、情動認知行動異常が誘発される

2) イボテン酸投与後、経時的に採取した、成熟期および幼若期の海馬サンプルを用いた網羅的遺伝子発現変動解析:

2-A) 成熟期および幼若期投与群の間で発現変動を示す遺伝子プロファイルがかなり異なる

2-B) 遅発行動異常を示した幼若期投与群のみに変動が認められた遺伝子の中で細胞障害に関連するシグナル:

アポトーシス、膜の過分極、糖質コルチコイド、GABA-A受容体を介したシグナル、neuropilin・semaphorin分子を介する神経ガイダンスならびに、Npas4分子を介するシナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持

58

★Npas4分子：

シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持を司るマスター遺伝子

→これまで、化学物質による遅発性神経毒性との関連は示唆されていない

→この分子を遅発性影響誘発に関与する候補遺伝子として見いだしたことは、新規性の高い発見と考える

## 今 後

- ・特にNpas4分子に着目した検討により、遅発性神経毒性誘発の分子機序に迫れる可能性が高いものとする
- ・引き続き、モデル中枢作用性物質を用いて同様な検討を行う予定

59

## 期待される成果

化学物質暴露による遅発性の  
情動・認知行動毒性発現の評価系確立と包括的予測が可能となる

・化学物質暴露に起因し、遅発的に顕在化する情動・認知行動毒性に関する、化学物質のスクリーニング系を含む体系的ガイドラインの作成に大きく貢献する。

・子どもへの化学物質暴露による遅発性の情動・認知行動毒性の予測が可能となることで、現在注目される注意欠陥多動障害、学習障害等への具体的対応策提示が期待できる。

60



## 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による遅発性中枢毒性発現機序の解明に関する研究

研究分担者 熊ノ郷 淳

大阪大学微生物病研究所 教授

ドーパミンニューロンの障害は情動、認知行動も含めた重大な発達障害をもたらすことが知られているが、免疫・神経クロストークを担うセマフォリン分子群に属する Sema4D タンパク添加がドーパミンニューロンに対する神経保護作用を有することを見出した。また Sema4D 欠損マウスの神経学的行動解析から、Sema4D 欠損下の motor behavior の亢進異常を見出し、発達期における Sema4D の重要性も明らかにしている。

### A. 研究目的

セマフォリンの有する神経ガイダンスや神経保護作用が種々の要因でかく乱された際の遅発性中枢毒性発現機序を解明することを目的としている。

### B. 研究方法

免疫・神経クロストークを担うセマフォリン分子群の神経ガイダンス及び神経保護作用への中枢作動性物質の影響と遅発性中枢毒性発現機序をセマフォリン遺伝子欠損マウスを用いて解析した。ミトコンドリア毒としては 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)及びドーパミン神経障害で農薬でもある rotenone を用い、in vitro と in vivo 双方の系でドーパミン作動ニューロンへのこれら薬剤の影響を検討した。また Sema4D の欠損下での神経学的行動解析を行った。動物実験は施設内の動物取り扱い指針に従って行った。

### C. 研究結果

MPTP のドーパミン神経障害を観察する培養系を確立するとともに、免疫・神経クロストークを担うセマフォリン分子群に属する Sema4D タンパク添加がドーパミンニューロンに対する神経保護作用を有することを確認した。また Sema4D の発達期における行動様式決定における重要性を明らかにした。

### D. E. 考察及び結論

神経ガイダンス因子の神経保護作用と発達期における行動様式における役割が明らかになった。今後神経細胞に対する作用メカニズムを詳細に検討していく必要がある。

### F. 研究発表

#### 1,2. 論文発表及び学会発表

1) Kataoka T, Kumanogoh A, Bandara G, Metcalfe D,

and Gilfillan A. CD72 negatively regulates KIT-mediated responses in human mast cells. *J. Immunol.* 184: 2468-2465, 2010.

2) Okuno T, Nakatsuji Y, Moriya M, Takamatsu H, Nojima S, Takegahara N, Toyofuku T, Nakagawa Y, Sujin Kang, Friedel RH, Sakoda S, Kikutani K and Kumanogoh A. Involvement of Semaphorin-4D-Plexin-B1 interactions in the CNS for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 184: 1499-1506, 2010. .

3) Nawabi H, Briançon-Marjollet A, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, Okuno T, Kumanogoh A, Bozonl M, Takeshima K, Yoshida Y, Moret F, Abouid I K, and Castellani V. A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Gen Dev.* 24:396-410, 2010.

4) Takamatsu H, Okuno T, and Kumanogoh A. Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors. *Cell Mol Immunol.* 7:83-8. 2010.

5) Takegahara N and Kumanogoh A. Involvement of semaphorins in neurological diseases. *Clinical Exp. Neuroimmunol.* 1:33-45, 2010.

6) Yukawa K, Tanaka T, Yoshida K, Takeuchi N, Ito T, Takamatsu H, Kikutani H, Kumanogoh A. A induces cell morphological changes through B-type plexin-mediated signaling. *Int J Mol Med.* 25:225-30. 2010.

7) Yukawa K, Tanaka T, Takeuchi N, Iso H, Li L, Kohsaka A, Waki H, Miyajima M, Maeda M, Kikutani H, Kumanogoh A. Semaphorin 4D/CD100 deficiency leads to superior performance in mouse motor behavior. *Can J Neurol Sci.* 36:349-55. 2009.

8) Inui M, Kikuchi Y, Aoki N, Endo S, Maeda T, Sugahara-Tobinai A, Fujimura S, Nakamura A, Kumanogoh A, Colonna M, Takai T. Signal adaptor DAP10 associates with MDL-1 and triggers osteoclastogenesis in cooperation with DAP12. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:4816-21. 2009.

6) Mizui M, Kumanogoh A, Kikutani H. Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules. *J Clin Immunol.* 29:1-11. 2009.

G. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

出願番号：特願 2009-254108

出願日：平成 21 年 11 月 5 日

発明の名称：自己免疫疾患又はアレルギー治療剤とそのスクリーニング方法

発明者：熊ノ郷 淳

出願人：国立大学法人大阪大学

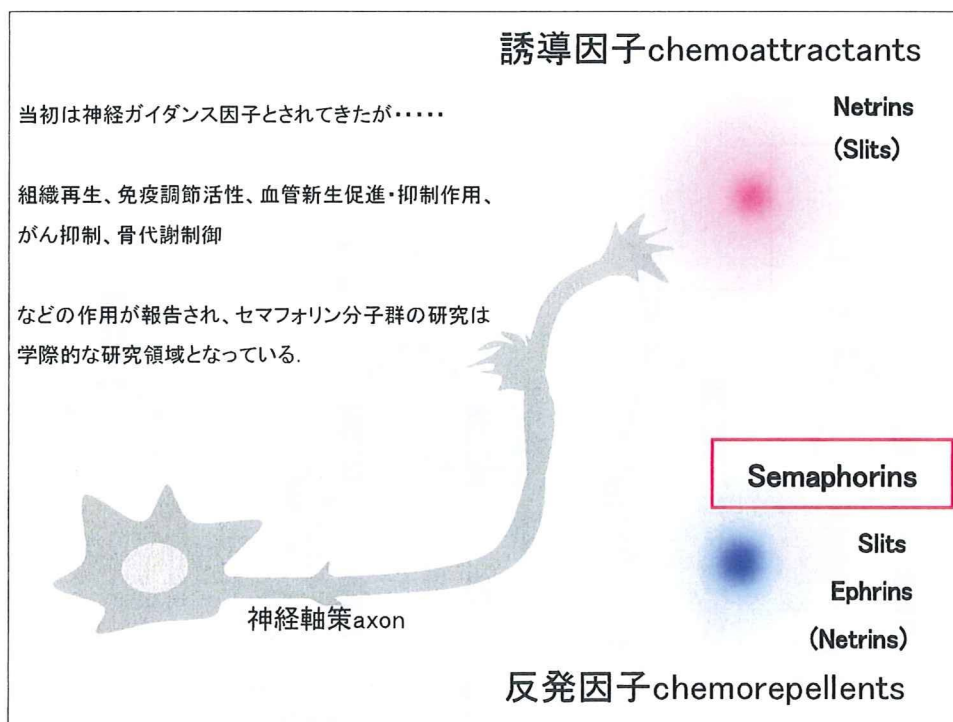
3. その他

なし

# 神経ガイダンス及び神経保護作用かく乱による 遅発性中枢毒性発現機序の解明

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 感染症態分野

熊ノ郷 淳



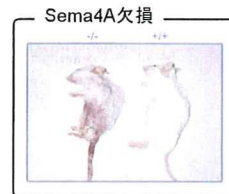
## セマフォリンは疾患の鍵分子である

### クラス3型

Sema3A欠損: 心臓の交感神経分布異常→突然死の原因 (*Nat Med*, 2007)、アトピー性皮膚炎  
Sema3B, Sema3F: 肺がんのがん抑制遺伝子の一つ

### クラス4型

Sema4A欠損: アトピー性皮膚炎 (*Immunity* 2005), 多発性硬化症  
Sema4D欠損: 免疫不全症 (*Immunity* 2000)

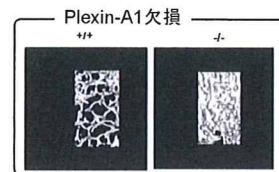


### クラス7型

Sema7A欠損: 神経走行異常、接触性皮膚炎抵抗性 (*Nature* 2003, *Nature* 2007)

### セマフォリン受容体

Plexin-A1欠損: 骨代謝異常 (*Nat Cell Biol* 2006)  
統合失調症



### セマフォリンシグナル

Crmpl欠損: 統合失調症様症状 (*J Neurosci* 2006)

