

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500419

研究課題名(和文) ATF6及びATF4による虚血性神経細胞死の阻止

研究課題名(英文) Protective roles of ATF6 and ATF4 in the mouse model of stroke

研究代表者

北尾 康子 (Kitao, Yasuko)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：00019613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後の小胞体ストレス応答(UPR)の重要性を明らかにする為、UPRの主幹転写因子ATF6を欠損したATF6^{-/-}マウスを用いて中大脳動脈閉塞モデルを作製した。その結果、野生型(WT)マウスに比し脳梗塞巣の拡大を認め、その原因として、アストロサイト活性化の低下、及びグリア瘢痕の低形成による組織障害の拡大が示唆された。更に培養アストロサイトを用いた解析から、ATF6^{-/-}アストロサイトではSTAT3-GFAP経路の活性化が低下していることが明らかになった。本研究により、脳虚血後のアストロサイト活性化、グリア瘢痕形成、そして神経保護にUPRが重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To dissect the role of the unfolded protein response (UPR) in brain ischemia, we investigated the relevance of ATF6, a master transcriptional factor in the UPR, after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in mice. Enhanced expression of GRP78, a downstream molecular chaperone of ATF6, was observed in the peri-infarct region of wild-type mice after MCAO. Analysis using wild-type and Atf6^{-/-} mice revealed a larger infarct volume and increased cell death in the peri-ischemic region of Atf6^{-/-} mice 5 days after MCAO. These phenotypes in Atf6^{-/-} mice were associated with reduced levels of astroglial activation/glia scar formation, and a spread of tissue damage into the non-infarct area. Further analysis in mice and cultured astrocytes revealed that STAT3-GFAP signaling was diminished in Atf6^{-/-} astrocytes. These results suggest a critical role of the UPR for regulating astroglial activation and neuronal survival after brain ischemia.

研究分野：神経解剖学

キーワード：脳虚血

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳血管障害(脳卒中)は日本人死因の第3位を占め、また、後遺症や再発の危険も多いことから、その対策は超高齢社会を向かえた我が国にとって重要かつ急務の課題である。現在、脳梗塞の治療としては組織型プラスミノゲンアクティベーター(t-PA)による血栓溶解療法が行われているが、適応が発症後3時間以内の症例に限られ、また出血の危険も伴うことから、未だ一般的な治療法とは言い難い。また、多くのグループが細胞内ストレス制御を基盤にした新規の神経保護物質の開発に取り組んでいるが、未だ新たな治療薬の開発には至っていない。

(2) 我々は、これまで虚血ストレスがエネルギー枯渇や細胞内Ca²⁺の上昇を介して重篤な小胞体障害(小胞体ストレス)を引き起こすこと、また、同ストレスに対する防御系Unfolded protein response (UPR)に属する小胞体内分子シャペロンORP150や抗酸化遺伝子ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)が、脳虚血を含む複数の病態で神経保護作用を示すことを報告してきた。更に申請者らは、独自に構築した細胞スクリーニング系を用いて4種類の小胞体ストレス制御化合物を同定し、その中の一種、UPR活性化物質タンゲレチンが神経保護作用を有することを発見した。

2. 研究の目的

我々は、以下の3つの目的をもって本研究を推進した。

(1) ATF6による神経細胞死抑制のメカニズム解明: 我々は既に、UPRの主幹転写因子ATF6のノックアウト(KO)マウスでは、野生型(WT)マウスに比べて脳梗塞巣が増大することを見出しており(Fig.1)本研究によりそのメカニズムを明らかにする。具体的には中大脳動脈閉塞(MCAO)後のWT及びATF6ノックアウトマウスにおける細胞内ストレス、グリア活性化、炎症の状態について評価する。更に、WT及びATF6ノックアウトマウスからアストロサイトを単離培養し、ATF6の発現がグリアの活性化(形態変化、ストレス応答、炎症物質産生)に直接与える影響について検討する。

(2) ATF4による神経細胞死抑制: ATF6と同様、UPRの主幹転写因子ATF4のノックアウトマウスについて、同様の神経保護結果が得られるか否かMCAOモデルを用いて検討する。

(3) 小胞体ストレス制御物質4-PBA、及びタンゲレチンによる神経保護作用、グリア細胞活性化作用、炎症制御作用: 神経系細胞株(SH-SY5Y細胞)、培養アストロサイトを4-PBA 或いはタンゲレチンで処理し検討す

る。

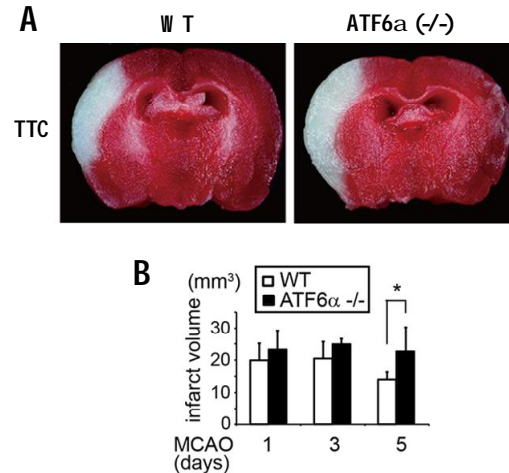


図1 ATF6ノックアウトマウスにおける脳梗塞巣の拡大
A.WT及びATF6ノックアウトマウスを用いて中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルを作製し、5日後にTTC染色を行った。B.TTC染色を基に脳梗塞体積を計算し、その経時的変化を見た。

3. 研究の方法

(1) ATF6による神経細胞死抑制のメカニズム解明: 野生型及びATF6ノックアウトマウスにおける脳虚血後の変化(細胞内ストレス、グリア活性化、炎症)を以下の方法で検討する。MCAOは生後8-10週齢(体重20-25g, C57BL/6背景)マウスを用い、中大脳動脈を電気凝固し作製した。MCAOを施行後、12時間、1, 3, 5日後に脳切片を作製し、3-ニトロチロシン(酸化ストレス)、GRP78、ORP150(小胞体ストレス)、iNOS、TNF α 、IL-6(炎症)、GFAP、Iba1(活性型グリア)、NeuN(神経細胞)、CD31(血管内皮)に対する免疫染色を行った。また、MCAO施行後、上記時間経過後に大脳皮質及び線条体より蛋白質及びRNAを抽出し、上記分子に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロット、或いは特異的プライマーを用いたqPCRを行った。更に、生後1日以内の野生型及びATF6ノックアウトマウスからアストロサイトを単離培養し、ATF6の発現がグリアの活性化に直接与える影響について、GFAP、p-STAP3に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより検討した。

(2) ATF4による神経細胞死抑制: 野生型及びATF4ノックアウトマウスを用いてMCAO作製し、その後1, 3, 5日の段階で、脳切片を作製し、TTC染色を行い、ImageJ(Version 1.42, Wayne Rasband, National Institutes of health)を用いて脳梗塞体積を算出し評価した。

(3) 小胞体ストレス制御物質4-PBA、及びタンゲレチンによる神経保護作用、グリア細胞活性化作用、炎症制御作用: 神経系細胞株

(SH-SY5Y 細胞)、培養アストロサイトを小胞体ストレス制御化合物 4-PBA、又はタンゲレチンで処理し、各種ストレスに対する抵抗性を MTT アッセイで、アストロサイト活性化に対する影響を GFAP、p-STAT3 に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロットにて検討した。

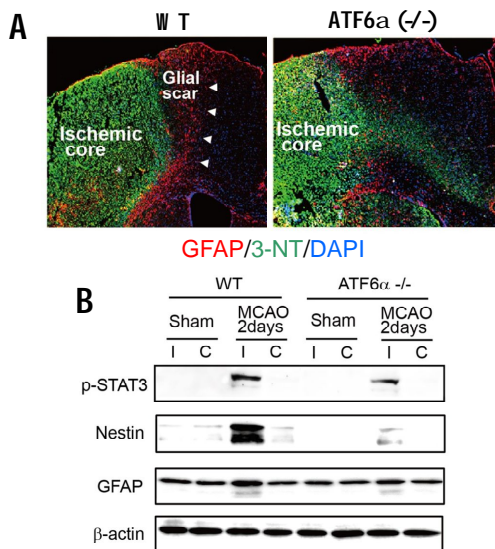


図2 ATF6ノックアウトマウスにおけるグリア瘢痕低形成と組織障害の拡大 A. MCAO後3日におけるグリア瘢痕(GFAP)形成と組織障害(3-NT)の程度を免疫組織化学により評価した。B. MCAO後2日におけるアストロサイト活性化をウエスタンブロットで評価した。

4. 研究の成果

(1) マウス脳梗塞モデル(中大脳動脈閉塞モデル)を作製すると、梗塞巣周囲の生存領域に小胞体ストレス応答(UPR)の増強が認められる。本研究では主幹転写因子 ATF6 を欠損したマウス(ATF6 KO マウス)を用いて脳梗塞モデルを作製し、野生型(WT)マウスと比較検討した。その結果、脳虚血後5日の段階で、WTマウスに比しATF6 KOマウスに脳梗塞巣の拡大を認めた(Fig.1)。更にその原因として、ATF6 KOマウスにおけるアストロサイト活性化の低下、及びグリア瘢痕の低形成が、梗塞巣周囲部での組織障害、及び細胞死をもたらしている可能性が示唆された(Fig.2)。興味深いことに、ATF6 KOマウスではIL-6やLIFなど、アストロサイト活性化を誘導する液性因子の発現量には明らかな低下は認めず、アストロサイトの活性化に重要なシグナル分子STAT3の活性化低下を認めた。

(2) 上記結果のメカニズムを解析する為、WT及びATF6 KOマウスからアストロサイトを単離培養し、STAT3のリン酸化、GFAPの発現を指標に活性化の程度を比較した。その結果、ATF6 KOアストロサイトに於いて、STAT3-GFAP経路の活性化が有意に低下していること、小胞体ストレスを軽減するケミカルシャペロン4-PBA処理によりそれらが回復すること、

逆に、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンやタプシガルギン処理により増悪する事が明らかになった(Fig.3)。以上より、ATF6は小胞体ストレスを制御することでアストロサイトの活性化を促進している可能性が示唆された。小胞体ストレス下でSTAT3活性が低下する原因として、小胞体ストレスによる内在世のチロシンフォスファターゼTC-PTPの発現増強が考えられた。

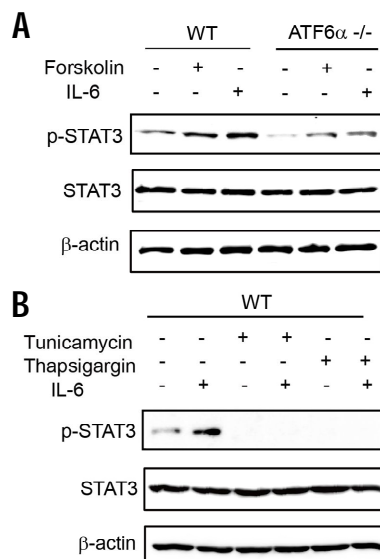


図3 ATF6ノックアウトマウス由来アストロサイトにおける活性化抑制 A. 培養アストロサイトをForskolinまたはIL-6で刺激し、活性化の状態をウエスタンブロットで評価した。B. Aと同様の実験を小胞体ストレス誘導剤の条件下で行った。

(3) ATF4 ノックアウトマウスについてはホモ接合体の発達障害が強く、脳虚血実験(中動脈平湖す)を行うことができなかった。ヘテロ接合体は野生型と脳梗塞の大きさに有意な差は認めなかった。

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11件)

Yoshikawa A, Kamide T, Hashida K, Ta HM, Inahata Y, Takarada-Iemata M, Hattori T, Mori K, Takahashi R, Matsuyama T, Hayashi Y, Kitao Y, Hori Q. Deletion of Atf6a impairs astroglial activation and enhances neuronal death after brain ischemia in mice. J Neurochem. 2014. doi: 10.1111/jnc.12981 査読有

Hieda Y, Anraku M, Choshi T, Tomida H,

Fujioka H, Hatae N, Hori O, Hirose J, Hibino S. Antioxidant effects of the highly-substituted carbazole alkaloids and their related carbazoles. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014. 24(15):3530-3. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.05.050. 査読有

Lopatina O, Yoshihara T, Nishimura T, Zhong J, Akther S, Fakhrul AA, Liang M, Higashida C, Sumi K, Furuhashi K, Inahata Y, Huang JJ, Koizumi K, Yokoyama S, Tsuji T, Petugina Y, Sumarokov A, Salmina AB, Hashida K, Kitao Y, Hori O, Asano M, Kitamura Y, Kozaka T, Shiba K, Zhong F, Xie MJ, Sato M, Ishihara K, Higashida H. Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Front Behav Neurosci*. 2014. 8:133. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00133. 査読有

Takarada-Iemata M, Kezuka D, Takeichi T, Ikawa M, Hattori T, Kitao Y, Hori O. Deletion of N-myc downstream-regulated gene 2 attenuates reactive astrogliosis and inflammatory response in a mouse model of cortical stab injury. *J Neurochem*. 2014. 130(3):374-87. doi: 10.1111/jnc.12729. 査読有

Gunjima K, Tomiyama R, Takakura K, Yamada T, Hashida K, Nakamura Y, Konishi T, Matsugo S, Hori O. 3,4-dihydroxybenzalacetone protects against Parkinson's disease-related neurotoxin 6-OHDA through Akt/Nrf2/glutathione pathway. *J Cell Biochem*. 2014. 115(1):151-60. doi: 10.1002/jcb.24643. 査読有

Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*. 2013. 12(4):487-96. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.009. 査読有

Liu HX, Lopatina O, Higashida C, Fujimoto H, Akther S, Inzhutova A, Liang M, Zhong J, Tsuji T, Yoshihara T, Sumi K, Ishiyama M, Ma WJ, Ozaki M,

Yagitani S, Yokoyama S, Mukaida N, Sakurai T, Hori O, Yoshioka K, Hirao A, Kato Y, Ishihara K, Kato I, Okamoto H, Cherepanov SM, Salmina AB, Hirai H, Asano M, Brown DA, Nagano I, Higashida H. Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. *Nat Commun*. 2013. 4:1346. doi: 10.1038/ncomms2336 査読有

Higashida C, Islam MS, Kamimura S, Inoue T, Jin D, Zhang J, Hashii M, Liang M, Zhong J, Hori O, Fukunaga K, Okamoto H, Graeff R, Lee HC, Higashida H. Dopamine-induced regulation and deregulation of the catabolism of cyclic ADP-ribose, an intrinsic mTOR signal inhibitor, during development in the rodent striatum. *Messenger*. 2013, 2, 33-43 査読有

Hashida K, Kitao Y, Sudo H, Awa Y, Maeda S, Mori K, Takahashi R, Iinuma M, Hori O. ATF6 α promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One*. 2012;7(10):e47950. doi: 10.1371/journal.pone.0047950. 査読有

Nürnberg S, Miller I, Duvigneau JC, Kavanagh ET, Gupta S, Hartl RT, Hori O, Gesslbauer B, Samali A, Kungl A, Redl H, Kozlov AV. Impairment of endoplasmic reticulum in liver as an early consequence of the systemic inflammatory response in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012. 303(12):G1373-83. doi: 10.1152/ajpgi.00056.2012. 査読有

Kamide T, Kitao Y, Takeichi T, Okada A, Mohri H, Schmidt AM, Kawano T, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Hamada J, Hori O. RAGE mediates vascular injury and inflammation after global cerebral ischemia. *Neurochem Int*. 2012. 60(3):220-8. 査読有

[学会発表](計7件)

毛塚大、宝田 美佳、北尾康子、堀 修、：「Deletion of ATF6 enhances kainic acid-induced neuronal death in mice」第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会(ポスター)、2015年03月21日~2015年03月22日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市

堀 修、北尾康子：「Deletion of ATF6 reduces astroglial activation and enhances neuronal damage after brain ischemia in mice」第119回日本解剖学会・全国学術集会(口頭発表)、2014年03月29日、自治医科大学キャンパス、栃木県下

野市

堀 修、吉川 陽文、上出 智也、森 和俊、高橋 良輔、松山 知弘、北尾 康子：

「ATF6alpha の欠損は脳虚血後のアストロサイト活性化を抑制し、神経細胞死を増大させる」第 36 回日本生物学的精神医学会第 57 回日本神経化学会大会 合同年会(シンポジウム)、2014 年 9 月 29 日、奈良県文化会館、奈良県奈良市

堀 修、北尾 康子：「The effect of endoplasmic reticulum (ER) stress on STAT3-dependent astroglial activation after stroke」第 87 回日本生化学会(シンポジウム)、2014 年 10 月 17 日、京都国際会議場、京都府京都市

堀 修：「マウスパーキンソン病モデル(MPTPP/P 慢性投与モデル)における小胞体ストレス応答の重要性」第 118 回日本解剖学会・全国学術集会、2013 年 03 月 29 日～2013 年 03 月 30 日、サンポートホール高松、香川県高松市

橋田耕治、宝田美佳、北尾康子、堀 修：「マウスパーキンソン病モデル(MPTPP/P 慢性投与モデル)における小胞体ストレス応答の重要性」第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

堀 修：「中枢神経系における小胞体ストレス応答の重要性」第 24 回日本脳循環代謝学会(招待講演)、2012 年 11 月 08 日～2012 年 11 月 09 日、リーガロイヤルホテル広島、広島県広島市

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40565412

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://med03.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北尾 康子 (KITA0 Yasuko)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：00019613

(2) 研究分担者

堀 修 (HORI Osamu)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60303947

(3) 連携研究者

宝田 美佳 (TAKARADA Mika)