

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26430069
研究課題名(和文)ATF6ノックアウトマウスを用いたALSの病態解明

研究課題名(英文)The effect of ATF6 deletion on ALS pathology

研究代表者

堀 修 (Hori, Osamu)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60303947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)における小胞体ストレス応答(UPR)の重要性を明らかにする為、UPRのセンサーATF6 を欠損したATF6(-/-)マウスとALSマウスを交配し、表現型の変化を観察した。その結果、ATF6(-/-)×ALSマウスではALSマウスに比べてALS発症時期が有意に早まったが、生存期間については両者で差は認められなかった。更に、前者では後者に比べてより早期から運動神経線維に変異蛋白質の集積を認める一方、ATF6欠損によりミクログリアを介した脳内炎症は減弱することが明らかになった。以上より、時期、細胞特異的なATF6の発現調節がALSの病態制御に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 the pathology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), we crossed ALS (SOD G93A Tg) mice with Atf6^{-/-} mice, the latter of which lack ATF6a, a major sensor in the UPR. Analysis using ALS and ALS/Atf6^{-/-} mice revealed the onset time of ALS was significantly earlier in ALS/Atf6^{-/-} mice, but the life span was not significantly different between two genotypes. Consistent with these results, higher levels of SOD aggregation was observed in ALS/Atf6^{-/-} mice before the onset, while lower levels of activation was observed in Atf6^{-/-} mouse-derived microglia, compared with wild-type mouse-derived microglia. These results suggest the time- and cell type-specific regulation of ATF6 may play the important role in the pathology of ALS.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経変性 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

- (1) 筋萎縮性側索硬化症(ALS)は数か月から数年で運動神経が麻痺し、全身の筋肉が動かなくなる難病である。ALSの原因は不明であるが、その病態形成に細胞内小器官の一つ小胞体の障害、すなわち小胞体ストレスが関与している可能性が示唆されている。
- (2) 小胞体は分泌系蛋白質及び脂質の生合成、Ca 恒常性の維持に関わる細胞内小器官であるが、異常(変異)蛋白質の蓄積、エネルギー枯渇、急激なCa濃度変化などは小胞体ストレスを引き起こす。申請者らはこれまで、脳虚血やグルタミン酸毒性、パーキンソン病などの多くの病態に小胞体ストレスが関与する事、小胞体ストレス応答(UPR)を強化することが神経保護につながることを報告した。更に、ALSのモデルマウス(低コピー型 G93A SOD1 Tg マウス)を用いた検討により、ALS発症以前からUPRの下流遺伝子 GRP78 の発現が増強していることが明らかになった。

2. 研究の目的

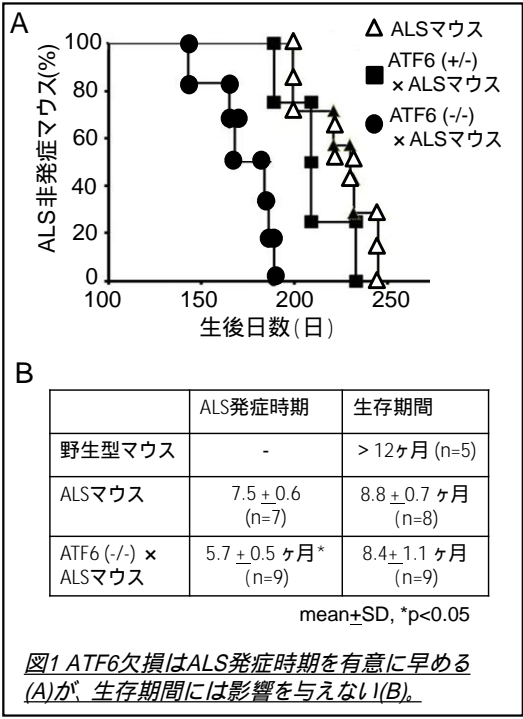
- (1) ALSの病態におけるATF6の重要性：
ALSの病態における小胞体ストレスの関与をin vivoで明らかにする為、UPRのマスター転写因子ATF6のノックアウトマウスとALSマウス(G93A SOD1 Tg マウス)を交配し、得られたATF6(-/-)×ALSマウスのin vivoでの表現型解析を推進する。
- (2) 中枢神経細胞生存及びグリア細胞活性化におけるATF6の機能：
ALSの病態形成に神経細胞のみならず、グリア細胞によるnon-cell autonomousな影響が報告されてきている。培養神経細胞及びグリア細胞を用いて、ATF6欠損が中枢神経細胞の生存及びグリア細胞の活性化に与える影響を検討する。
- (3) 化合物による小胞体ストレス制御：
ケミカルシャペロン 4-フェニル酪酸(4-PBA)などにより小胞体ストレスを制御した場合、上記(1)(2)で認められる表現型がどのようになるか検討する。

3. 研究の方法

- (1) ALSマウス、ATF6(-/-)×ALSマウスの表現型について、以下の方法で解析を進めた。つまり、体重変化を指標にしたALS発症時期の同定、生存時間の算出を行った。更に、発症前(生後5か月)、発症後(生後8か月)の各段階でマウスを選

流固定、又は蛋白質・RNA 通出を行い、免疫組織化学、ウエスタンブロット・RT-qPCRにて、変異型SOD, Ub, GFAP(アストロサイトのマーカー蛋白質)、Iba1(ミクログリアのマーカー蛋白質)、MBP(髄鞘のマーカー蛋白質)、SMI32(神経線維のマーカー蛋白質)等の検出を行った。

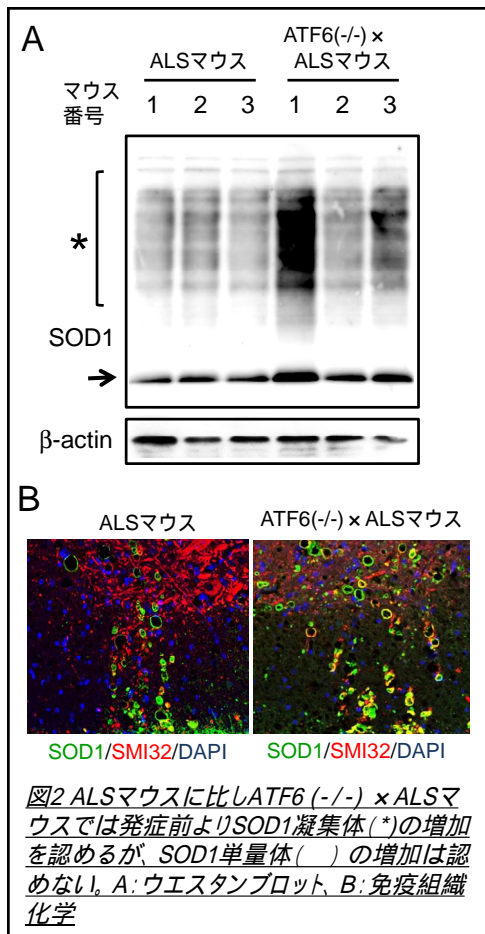
- (2) 野生型(WT)又はATF6(-/-)胎児由来初代神経細胞、或いは生直マウス由来初代ミクログリア、初代アストロサイトの培養を行う。これらの細胞におけるストレス抵抗性、炎症刺激に対する応答性、グリア細胞活性化能などを、免疫細胞化学、RT-qPCR、ウエスタンブロットなどを用いて検討する。また、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン及びタブシガルギン、小胞体ストレス制御作用のあるケミカルシャペロン 4-PBA 処理による効果を明らかにし、ATF6欠損の影響が直接的なものか、小胞体ストレス増強を介した間接的なものかを判断する。



4. 研究成果

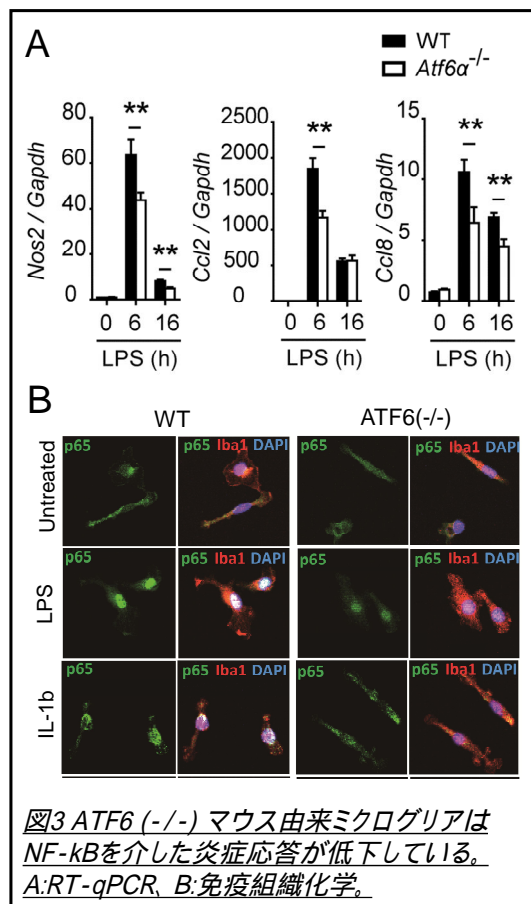
- (1) ATF6(-/-)×ALSマウスにおいては、ALSマウスに比し早期からALSを発症する一方、生存期間については両マウスで有意な差は認めなかった(図1)。その原因を明らかにする為、発症前(生後5か月)及び発症後(生後8か月)における変異型SODの発現を比較した。発症前の各マウスにおける脊髄サンプルを用いたウエ

スタンプロットの結果から、ALS マウスに
比し ATF6 (-/-) × ALS マウスでは多
くの SOD 多量体 (凝集体) が認められ
ることが明らかになった (図 2A)。更
に、免疫組織化学によりそれら SOD
の沈着は運動神経軸索で強く認めら
れることが判明した。一方、発症後
においてはこのような差は認められ
なかった。



(2) ALS の発症時期は ALS マウスと
ATF6 (-/-) × ALS マウスで有意に異なっ
ていた一方、生存期間については両マウスで
有意な差は認めなかった。GRP78 の発現
は ALS 発症に先んじて運動神経で上昇し、
その後、活性化したグリア細胞でも認めら
れたことから、我々は、この理由として、
ALS 病態後期で ATF6 欠損により脳内炎症
が抑制されているのではないかという考え
に至った。これの仮説に基づき、我々はま
ず、野生型及び ATF6 (-/-) マウス由来の培養
グリアを用いてその活性化、炎症応答につ

いて検討した。その結果、いずれについ
ても ATF6 (-/-) マウス由来のマイクログリアで
減弱していることが明らかになった (図 3)。
更に細胞内炎症シグナルである NF- κ B の
活性化が、マウス由来のグリア細胞で低下
していることが確認された。以上の事から、
ATF6 は ALS の病態形成に急性期と慢性期
で異なった役割を有し、時期特異的、細胞
特異的な ATF6 の発現調節が ALS の病態
制御に重要である可能性が示唆された。



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 13 件)

Takano K, Ishida N, Kawabe K, Moriyama M, Hibino S, Choshi T, Hori O, Nakamura Y. A dibenzoylmethane derivative inhibits lipopolysaccharide-induced NO production in mouse microglial cell line BV-2. Neurochem Int. 2017 in press. 査読有
Hattori T, Kaji M, Ishii H, Jurepon R,

Takarada-Iemata M, Minh Ta H, Manh Le T, Konno A, Hirai H, Shiraishi Y, Ozaki N, Yamamoto Y, Okamoto H, Yokoyama S, Higashida H, Kitao Y, Hori O. CD38 positively regulates postnatal development of astrocytes cell-autonomously and oligodendrocytes non-cell-autonomously. *Glia*. 2017 Mar 13. doi: 10.1002/glia.23139. 査読有
Higashida H, Kamimura SY, Inoue T, Hori O, Islam MS, Lopatina O, Tsuji C. Cyclic ADP-ribose as an endogenous inhibitor of the mTOR pathway downstream of dopamine receptors in the mouse striatum. *J Neural Transm (Vienna)*. 2016 Dec 26. doi:10.1007/s00702-016-1666-7. 査読有
Ta HM, Le TM, Ishii H, Takarada-Iemata M, Hattori T, Hashida K, Yamamoto Y, Mori K, Takahashi R, Kitao Y, Hori O. Atf6a deficiency suppresses microglial activation and ameliorates pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem*. 2016 Jun 22. doi: 10.1111/jnc.13714. 査読有
Le TM, Hashida K, Ta HM, Takarada-Iemata M, Kokame K, Kitao Y, Hori O. Deletion of Herpud1 Enhances Heme Oxygenase-1 Expression in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*. 2016;2016:6163934. doi: 10.1155/2016/6163934. Epub 2016 Feb 23. 査読有
Kezuka D, Takarada-Iemata M, Hattori T, Mori K, Takahashi R, Kitao Y, Hori O. Deletion of Atf6a enhances kainate-induced neuronal death in mice. *Neurochem Int*. 2016 Jan;92:67-74. Epub 2015 Dec 25. 査読有
Kitao Y, Ageta-Ishihara N, Takahashi R, Kinoshita M, Hori O. Transgenic supplementation of SIRT1 fails to alleviate acute loss of nigrostriatal dopamine neurons and gliosis in a mouse model of MPTP-induced parkinsonism. *F1000Res*. 2015 May 27;4:130. 査読有
Koyama Y, Hattori T, Nishida T, Hori O, Tohyama M. Alterations in dendrite and spine morphology of cortical pyramidal neurons in DISC1-binding zinc finger protein (DBZ) knockout mice. *Front Neuroanat*. 2015 Apr 30;9:52. 査読有
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 O. 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, Fakhrol 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

[学会発表](計 11 件)

石井宏史、堀 修:「くも膜下出血マウスモデルにおける早期脳損傷病態」第 122 回日本解剖学会・全国学術集会(口頭発表) 2017 年 3 月 28 日~3 月 30 日、長崎大学キャンパス、長崎県長崎市

Roobon Jureepon, Tsuyoshi Hattori, Osamu Hori:「A role of CD38 in Cuprizone-induced Demyelination」第 122 回日本解剖学会・全国学術集会(ポスター) 2017 年 3 月 28 日~3 月 30 日、長崎大学キャンパス、長崎県長崎市

Le Manh Thuong, Ta Minh Hieu, Osamu Hori:「Deletion of Herp Enhances Heme Oxygenase-1 Expression in a Mouse Model of Parkinson's Disease」第 122 回日本解剖学会・全国学術集会(ポスター) 2017 年 3 月 28 日~3 月 30 日、長崎大学キャン

パス、長崎県長崎市
Ta Minh Hieu, Osamu Hori : 「Atf6a deficiency suppresses microglial activation and ameliorates pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis」第 59 回 日本神経化学会大会/第 38 回日本生物学的精神医学会 (ポスター) 2016 年 9 月 8 日~9 月 10 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市
堀 修 : 「小胞体ストレス応答による生体内恒常性維持: 臓器連関の新展開」第 38 回日本分子生物学会 第 88 回日本生化学会 (シンポジウム) 2015 年 12 月 4 日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市
宝田美佳, 郡山恵樹, 森和俊, 高橋良輔, 北尾康子, 堀 修 : 「視神経傷害後の網膜神経節細胞変性における ATF6alpha の保護的な役割」第 59 回 日本神経化学会大会/第 38 回日本生物学的精神医学会 (ポスター) 2015 年 9 月 8 日~9 月 10 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市
宝田美佳, 郡山恵樹, 森和俊, 高橋良輔, 北尾康子, 堀 修 : 「マウス視神経傷害モデルにおける ATF6 の神経保護効果」第 38 回日本神経科学大会 (ポスター) 2015 年 7 月 30 日、神戸国際展示場、兵庫県神戸市
服部剛志, 宝田美佳, 堀 修 : 「自閉症関連因子 CD38 のグリア細胞発達における役割」第 38 回日本神経科学大会 (ポスター) 2015 年 7 月 30 日、神戸国際展示場、兵庫県神戸市
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 : 「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、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

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔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

堀 修 (HORI Osamu)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号 : 60303947

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

宝田 美佳 (TAKARADA Mika)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号 : 40565412

(4) 研究協力者

()