

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500440

研究課題名(和文) ATF6による黒質神経細胞の救済と蛋白質凝集抑制

研究課題名(英文) Roles of ATF6 in MPTP/P-induced neurotoxicity and protein aggregation

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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)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、MPTP/プロベネシド慢性投与マウスを用いて検討した。その結果、MPTP/プロベネシド投与後、UPR 3経路のうち、ATF6及びPERK経路が活性化することが明らかになった。更に、ATF6ノックアウトマウスを用いて同モデルを作製した所、神経変性の増強、ユビキチンの集積、アストロサイトの活性化抑制が認められた。一方、UPR活性化物質タンゲレチンをマウスに投与すると、MPTP/プロベネシド投与後の神経変性は抑制された。以上より、PDモデルマウスにおいてUPRの活性化は神経保護に働くことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence suggests a crucial role for the unfolded protein response (UPR) in Parkinson's disease (PD). In this study, we investigated the relevance of the UPR in a mouse model of chronic MPTP/probenecid (MPTP/P) injection. Enhanced activation of the UPR branches, including ATF6 and PERK, was observed after MPTP/P injections. Deletion of the ATF6 gene accelerated neuronal degeneration and ubiquitin accumulation. Surprisingly, astroglial activation was suppressed, and production of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in astrocytes were reduced in ATF6  $-/-$  mice after MPTP/P injections. In contrast, administration of the UPR-activating reagent tangeretin (IN19) enhanced the expression of UPR-target genes in both dopaminergic neurons and astrocytes, and promoted neuronal survival. These results suggest that the UPR is activated in a mouse PD model, and contributes to the survival of nigrostriatal dopaminergic neurons, in part, through activated astrocytes.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：神経細胞死 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

(1) パーキンソン病(PD)は、黒質神経細胞の変性と細胞内凝集体(LB:レビー小体)の形成を病理学的特徴とする、原因不明、進行性の神経変性疾患である。PDの研究には、主に、MPTP等の神経毒により黒質神経を変性させるモデルと、 $\alpha$ -synuclein等のPD関連遺伝子の解析に基づくモデルが用いられているが、そのいずれにおいても、黒質神経の変性過程に、ミトコンドリア、小胞体、プロテアソーム、リソゾーム等の細胞内小器官の障害が関与することが報告されている。しかし、個々の障害がどの段階でどの様に関わるか、また、互いにどの様な影響を及ぼしているかについては不明な点が多い。

(2) 我々は、これまで、特に小胞体障害に対する応答、すなわち小胞体ストレス応答(UPR: unfolded protein response)とPD病態との関連を明らかにする為に、UPR関連遺伝子、及び化合物の解析を行ってきた。そして、UPRの主幹(マスター)転写因子ATF6のノックアウトマウスにおいて、MPTP急性投与後の黒質神経変性が増大し、ユビキチン(Ub)陽性の蛋白質凝集体が出現することを発見した。

2. 研究の目的

これまでの研究を拡張し、以下の(1)(2)の実験を行う。

(1) 野生型及びATF6ノックアウトマウスを用いて、複数のPDモデル(MPTP/プロベネシド慢性投与モデル、 $\alpha$ -synucleinのトランスジェニックマウス)を作成し、UPRがPDの病態形成に関与する時期、方法、メカニズムを明らかにする。

(2) 我々が開発したUPR活性化物質タンゲレチン(IN19)の神経保護作用についてPDモデルマウスを用いて検証するとともに、その作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 野生型、及びATF6ノックアウトマウスを用いてMPTP/プロベネシド慢性投与モデルを作製した(本モデルはMPTP急性投与モデルに比し、ヒトのPD病態に近いと考えられている)。具体的には、MPTP(20mg/kg BW)皮下投与、プロベネシド(250mg/kg BW)腹腔内投与を、週2回X5週間、計10回投与して作製した。MPTP/プロベネシド投与後の各段階でマウスを灌流固定して脳切片を作製、また、マウスから脳を摘出し、蛋白質或いはRNA抽出を行った。黒質神経の変性、凝集体形成、更にはストレス応答について、抗チロシン脱水素酵素(TH)抗体、抗Ub抗体、抗GRP78抗体、抗GFAP抗体による免疫組織化学、ウエスタンブロット、更に各種プラ

イマーによるRT-qPCRを行い評価した。

(2) PD関連遺伝子 $\alpha$ -synucleinのトランスジェニックマウスをATF6ノックアウトマウスと交配し、黒質神経の変性及び凝集体形成について、抗チロシン脱水素酵素(TH)抗体、抗Ub抗体による免疫染色、ウエスタンブロットを行い評価した。

(3) UPR活性化物質タンゲレチン(IN19)の神経保護作用について、野生型マウスを用いて上記PDモデルを作成し、タンゲレチンの神経保護効果を抗チロシン脱水素酵素(TH)抗体による免疫染色、ウエスタンブロットを行い評価した。

4. 研究成果

(1) まず、野生型マウスを用いてMPTP/プロベネシド慢性投与モデルを作製し、同モデルにおけるUPRの活性化について、RT-qPCR、及び免疫染色を用いて検討した。その結果、UPR3経路のうち、ATF6経路はMPTP/プロベネシド投与後、長期間にわたり活性化される事、逆にPERK経路は同薬物の初回投与後に強く活性化するものの、その後低下することIre1経路は有意な活性化を示さないことが明らかになった。更に、細胞別にUPRの活性化を評価したところ、黒質ドーパミン神経、及び活性化アストロサイトに強いUPRの活性化を認めた。

(2) 次に、野生型、及びATF6ノックアウトマウスを用いてMPTP/プロベネシド慢性投与モデルを作製し、黒質神経の変性、凝集体形成について比較した。その結果、特にア

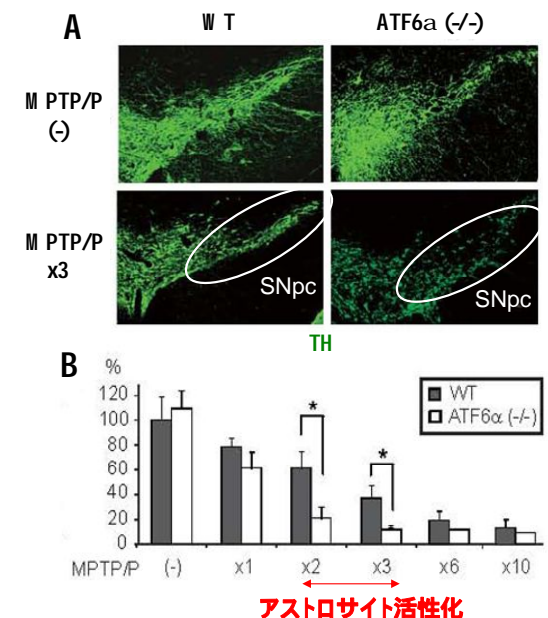
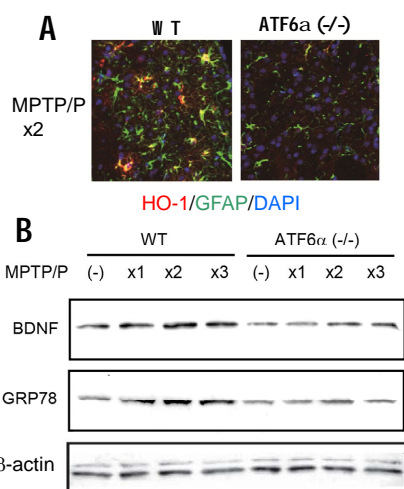


図1 ATF6ノックアウトマウスにおける神経変性の増強  
A.MPTP/プロベネシド3回投与後の黒質緻密層(SNpc)神経細胞におけるTH陽性細胞の変化。B.AでTH陽性細胞数をカウントし、その経時的変化を見たもの。

ストロサイトの活性化が認められる時期に、ATF6 ノックアウトマウスで強い神経変性が起こっていること(図1)。同マウスでユビキチン陽性の蛋白質凝集体を認めることが明らかになった。

(3) 更に、野生型、及び ATF6 ノックアウトマウスにおけるアストロサイトの活性化、アストロサイト由来神経保護因子、抗ストレス遺伝子の発現について免疫組織化学、及びウエスタンブロットを用いて比較した。その結果、MPTP/プロベネシド投与後に誘導されるアストロサイトの活性化がATF6 ノックアウトマウスでは抑制され、アストロサイト由来神経保護因子BDNF、抗ストレス遺伝子であるヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)の発現も同ノックアウトマウスにおいて低下していることが明らかになった(図2)。つまり、UPRのうちATF6経路は、活性化アストロサイトを通じて、神経を保護している可能性が示唆された。



**図1**ATF6ノックアウトマウスにおけるアストロサイト活性化の抑制 A.MPTP/プロベネシド2回投与後の活性化アストロサイトの形態及びBDNF産生(免疫組織化学)。B. MPTP/プロベネシド2回投与後の線条体におけるBDNF、GRP78の発現(ウエスタンブロット)。

(4) 一方、MPTP/プロベネシド投与後のATF6 ノックアウトマウスにおいて認められるユビキチン(Ub)陽性の蛋白質凝集体について解析を進めたところ、同凝集体に $\alpha$ -synucleinはほとんど認められないものの、変性過程のドーパミン作動性神経において特に認められる事が明らかになった。これらは、直接レビー小体の形成にはかかわらないものの、蛋白質の代謝を介して間接的に神経機能(変性)を制御している可能性が示唆された。

(5) PD関連遺伝子 $\alpha$ -synucleinのトランスジェニックマウスをATF6 ノックアウトマウスと交配し、黒質神経の変性及び凝集体形成について検討する実験については、 $\alpha$ -synucleinトランスジェニックマウスで認

められるはずの神経変性及び蛋白質凝集体が生後1年以上経ても観察されなかったため、残念ながら中止とした。 $\alpha$ -synucleinトランスジェニックマウスで表現型が明らかでなかった理由として、以前の報告で用いられていたマウス系統(CH3)と今回の研究で用いたマウス系統(C57/BL6)が異なることが可能性の一つとして挙げられた。

(6) 我々がUPR経路を活性化する化合物として同定したタンゲレチン(IN19)をマウスに経口投与すると、黒質-線条体系に存在する神経細胞及びアストロサイトにおけるUPRは活性化され、神経保護因子BDNFの産生量は増加した。この時、アストロサイトの活性化自身も軽度ながら有意に促進した。更にマウスにタンゲレチンを経口投与しながらMPTP/プロベネシド慢性投与モデルを作製したところ、溶媒投与群に比し、黒質神経細胞の変性は軽減された。これらの事より、UPRの活性化はアストロサイトの活性化を介して黒質線条体系のドーパミン作動性神経の生存に重要な働きをしていること、更に新たな治療標的にな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16件)

- 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 Apr 22;8:133. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00133. eCollection 2014. 査読有
- Gunjima K, Tomiyama R, Takakura K, Yamada T, Hashida K, Nakamura Y, Konishi T, Matsugo S, Hori O. 4-dihydroxybenzalacetone protects against Parkinson's disease-related neurotoxin 6-OHDA through Akt/Nrf2/glutathione pathway. *J Cell Biochem.* 2013 Aug 19. doi: 10.1002/jcb.24643. 査読有
- Hashida K, Kitao Y, Sudo H, Awa Y, Maeda S, Mori K, Takahashi R, Iinuma M, Hori O. ATF6 $\alpha$  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

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

〔学会発表〕(計8件)

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

橋田耕治、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

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。

堀 修：Roles of the unfolded protein response (UPR) in MPTP-induced neurotoxicity 第54回日本神経化学会大会(シンポジウム)、2011年9月28日、山代温泉瑠璃光(石川県)。

堀 修：「MPTP/プロベネシド慢性投与パーキンソン病モデルにおける小胞体ストレス応答の重要性」第84回日本生化学会大会(シンポジウム)、2011年9月22日、国立京都国際会館(京都府)

〔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

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

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

北尾 康子 (KITAO Yasuko)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：00019613