

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19999

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答制御による神経細胞死の阻止

研究課題名(英文)Amelioration of neuronal death by control over unfolded protein response

研究代表者

吉川 陽文(Yoshikawa, Akifumi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：30646691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレス応答の主幹転写因子であるATF6 をノックアウト(KO)したマウスで中大脳動脈閉塞(MCAO)を起こすと、野生型マウスと比べて脳血管関門破綻が顕著であり、亜急性期の梗塞巣増大の要因となっていると考えられた。しかし、慢性期の梗塞巣サイズの比較では差がつかなかった。これまでに当教室では多発性硬化症モデルでの検討で、ATF6 KOマウスではミクログリア活性低下により炎症反応を減弱させていることを報告しているが、MCAOモデルでもATF6 KOマウスでは亜急性期のミクログリア活性低下が確認され、慢性期の梗塞巣増大に抑制的に働いていると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Deletion of ATF6 gene, a master transcriptional factor in the unfolded protein response worsened the disruption of blood brain barrier and increased the infarction volume of mice after middle cerebral artery occlusion(MCAO) in the subacute phase. However, there was no significant difference in the infarction volume between wild-type and ATF6 knockout mice in the chronic phase. We already reported that ATF6 deficiency suppresses microglial activation and inflammation of mice in multiple sclerosis model. Deterioration of microglial activation was also observed in ATF6 KO mice after MCAO, which probably affect the infarct size in chronic phase.

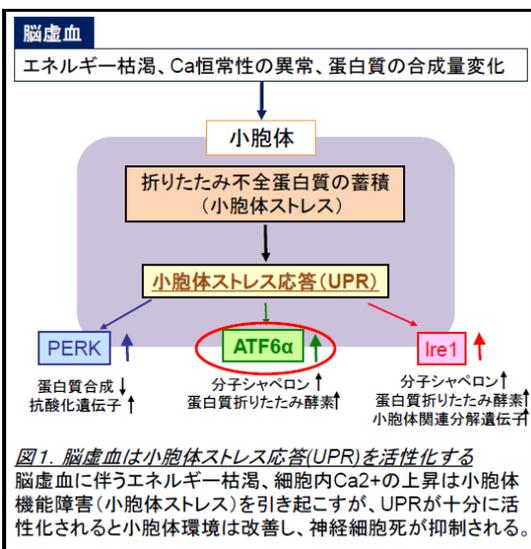
研究分野：脳神経外科

キーワード：小胞体ストレス応答 脳虚血 神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は脳卒中における死亡原因の第一位であり、重い後遺症によるQOL低下や介護負担、高齢化社会での患者増加による医療費増大など、社会的、医療経済的な観点からも早急な治療成績の改善が求められている。近年になり、脳梗塞発症後超急性期の血栓溶解療法や機械的血栓除去療法が著効例を示す報告がみられるが(N Engl J Med 2014, 2015)、時間的制限のある治療のためその恩恵にあずかれる症例はごく少数である。そのため、脳梗塞亜急性期～慢性期にも施行可能な治療法の確立に向けて、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。

小胞体ストレス応答 Unfolded protein response (UPR)とは蛋白質合成・成熟の場である小胞体に、未成熟な折り畳み不全蛋白質が蓄積(小胞体ストレス)した際に惹起される応答で、小胞体環境を整え細胞の恒常性を維持する生体防御反応である。これまでに脳虚血が起きた際に、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ストレスが起こり、同ストレスに対するUPRにより生成される小胞体内分子シャペロンや抗酸化遺伝子が脳虚血で神経保護作用を示すことが報告されてきた(図1、J Neurochem 2004, Neuroscience 2007)。よって、脳虚血後のUPRを制御することは、脳梗塞の新たな治療ターゲットになりうる。



申請者は、これまでにUPRの主幹転写因子であるATF6遺伝子に注目し、マウス脳局所虚血モデル(中大脳動脈閉塞(MCAO)モデル)を用いた実験においてATF6の発現をノックアウトすることにより脳虚血後亜急性期に梗塞巣が増大すること、そのメカニズムとしてアストロサイト活性化能が低下していることを見出した(Yoshikawa et al, J Neurochem 2015)。

2. 研究の目的

本研究において申請者は、ATF6KOマウスを用いたこれまでの解析を発展させ、脳虚血後亜急性期の脳血管関門(BBB)破綻のメカニズム、それに引き続く慢性期の神経細胞死、血管新生・神経再生におけるUPR経路の役割、またUPR活性化物質を投与した際の脳虚血に対する神経細胞保護作用を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス(生後8-10週齢♂(体重20-25g, C57BL/6背景))の中大脳動脈を露出し、血管を直接電気凝固、切断することによりその血管支配領域の脳梗塞を引き起こす方法を用いる(J Clin Invest 2004)。野生型マウスと、ATF6遺伝子をノックアウトしたマウスに施し、比較検討を行う。

- 1) ATF6による神経細胞死抑制・BBB破綻のメカニズム解明: MCAO後のATF6KOマウスにおける神経細胞、血管漏出物質、BBB構成分子の経時的変化。
- 2) ATF6による血管新生・神経再生に関わるメカニズム解明: MCAO後のATF6KOマウスにおける血管新生物質の発現、神経再生におけるUPR経路の関与。
- 3) UPR活性化物質であるタンゲレチンを投与した際の神経細胞保護効果: MCAO後の梗塞巣の大きさ、神経機能、アストロサイト活性化能の評価。

4. 研究成果

ATF6αノックアウト(KO)マウスでは、亜急性期(～3日)にBBB破綻を示す漏出物質であるフィブリノーゲンとIgGの漏出が増大し

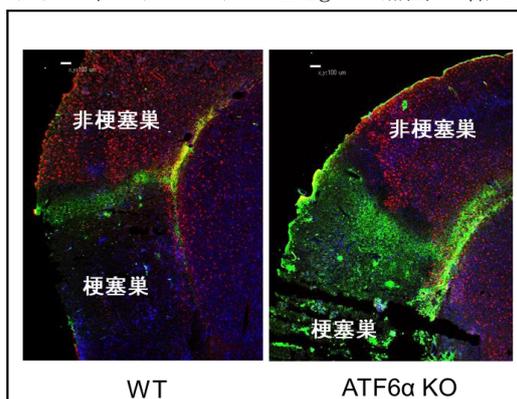


図2 ATF6α KOマウスでは脳血管関門の破綻が基大である。野生型(WT)及びATF6αノックアウト(KO)マウスにMCAOを行い、3日後の脳切片を用いて抗Fib抗体による免疫染色を行った。ATF6α KOマウスでFib漏出の増大(緑色部)を認める。

ていることが確認された(図2)。このことよりATF6α KOマウスではUPRが減弱するためにBBB破綻が顕著になり細胞障害が進み、亜急性期の梗塞巣サイズの増大(図3)に関与していると考えられた。しかし、慢性期(2週間)での梗塞サイズの比較では、梗塞巣が萎縮して瘢痕状になる

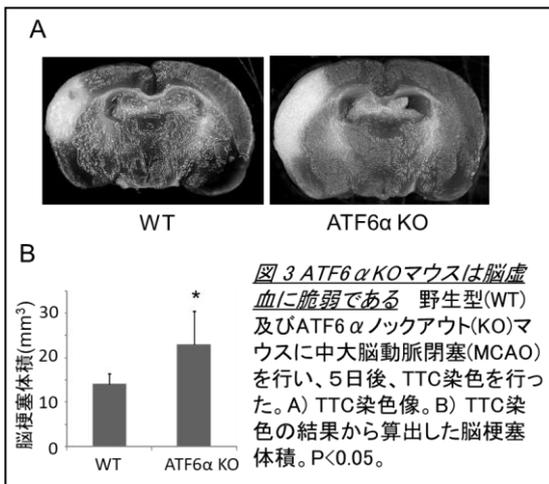


図3 ATF6 α KOマウスは脳虚血に脆弱である 野生型(WT)及びATF6 α ノックアウト(KO)マウスに中大脳動脈閉塞(MCAO)を行い、5日後、TTC染色を行った。A) TTC染色像。B) TTC染色の結果から算出した脳梗塞体積。P<0.05。

ことよりサイズの評価が困難であった。えられたデータの限りでは明らかなサイズ差を認めなかった。

当教室では多発性硬化症モデルにおいて、ATF6 α KO マウスでは慢性期のミクログリアの活性化が低下し、炎症変化を減弱させていることを示している (Ta MH et al, J neurochem 2016)。今回、慢性期の梗塞巣のサイズに差がつかないことにもミクログリア活性の低下が影響していると仮説をたて、検証を行った。すると亜急性期 (5 日) のミクログリア活性が低下していることが確認された (図 4)。

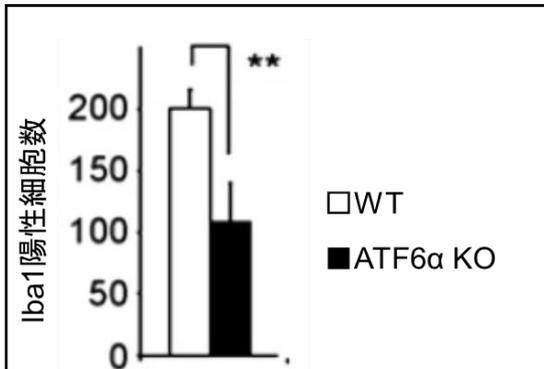


図4 ATF6 α KOマウスではミクログリア活性が低下している 野生型(WT)及びATF6 α ノックアウト(KO)マウスに中大脳動脈閉塞(MCAO)を行い、5日後の脳切片を用いて、ミクログリアの標識抗体であるIba1による免疫染色を行った。ATF6 α KOマウスではミクログリアの活性が低下している。P<0.01。

申請者はこれまでにアストロサイト活性が低下して亜急性期に梗塞巣が増大することを示した。今回の結果を併せて考えると、亜急性期まではアストロサイト活性低下とBBB 破綻により梗塞巣が増大するが、亜急性期以後はミクログリア活性低下により炎症反応が減弱するため、結果として慢性期の梗塞巣サイズに差がつかないと示唆された。

今後、亜急性期以後のアストロサイト活性、BBB 破綻後変化、ミクログリア活性が梗塞巣

サイズにどのような変化をもたらしているか詳細なメカニズムの検討が必要である。

UPR 活性化物質を投与した多数例の比較検討には至らなかったが、少数の検討では明らかな梗塞サイズ変化の差異を認めなかった。

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 4 件)

- ① Takarada-Iemata M, Yoshikawa A, Ta HM, Okitani N, Nishiuchi T, Aida Y, Kamide T, Hattori T, Ishii H, Tamatani T, Le TM, Roboon J, Kitao Y, Matsuyama T, Nakada M, Horii O. N-myc downstream-regulated gene 2 protects blood-brain barrier integrity following cerebral ischemia. *Glia*, 査読有, 2018 Feb 24. DOI: 10.1002/glia.23315.
- ② 田中 慎吾、東馬 康郎、吉川 陽文、木多 眞也、頸動脈ステント留置 1 カ月後に症候性ステント内狭窄を認めた放射線誘発性内頸動脈狭窄症の 1 例、脳卒中、査読有、早期公開、2017 <https://doi.org/10.3995/jstroke.10555>
- ③ 中村 美穂、吉川 陽文、岡島 正樹、蜂谷 聡明、小池 康志、谷口 巧、内減圧術が有効であった小児重症頭部外傷の 1 例、日本救急医学会雑誌、査読有、28 巻、2017、9-15 <https://doi.org/10.1002/jja2.12151>
- ④ 東馬 康郎、吉川 陽文、田中 慎吾、木多 眞也、眼窩内海綿状血管奇形を合併した頭蓋硬膜動静脈瘻の 1 例、脳卒中、査読有、39 巻 5 号、2017、386-390 <https://doi.org/10.3995/jstroke.10479>

[学会発表] (計 6 件)

- ① 吉川 陽文、東馬康郎、会田泰裕、河原庸介：チロシンキナーゼ阻害薬内服中に発症した全身動脈硬化性病変の 1 例 第 43 回日本脳卒中学会学術集会 平成 30 年 3 月 15 日-3 月 18 日
- ② 吉川 陽文、会田泰裕、河原庸介、東馬康郎：線維筋性異形成を背景とした動脈解離による脳底動脈閉塞症の 1 例 第 33 回日本脳神経血管内治療学会学術総会 平成 29 年 11 月 23 日-11 月 25 日
- ③ 吉川 陽文、木村亮堅、河原庸介、東馬康郎：地方中規模病院における脳梗塞急性期における機械的血栓除去療法の現状 第 76 回日本脳神経外科学会総会 平成 29 年 10 月 12 日-10 月 14 日
- ④ 吉川 陽文、東馬康郎、木村亮堅、河原庸介：Interhemispheric transcallosal

approach で摘出した脳室内腫瘍の 1 例
第 8 回 Kanazawa Kyoto Friendship
Conference 平成 29 年 7 月 8 日

- ⑤ 吉川 陽文、田中慎吾、東馬康郎、木多
眞也：若年性脳底動脈閉塞症の 1 例
第 226 回福井脳・神経疾患談話会 平成
29 年 1 月 19 日
- ⑥ 吉川 陽文、堀 修、中田 光俊：Atf6 α
の欠損はマウス脳虚血においてアスト
ログリア活性を抑制し神経死を増大さ
せる
第 75 回 日本脳神経外科学会総会 平成
28 年 9 月 29 日-10 月 1 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 陽文 (YOSHIKAWA AKIFUMI)
金沢大学、医学系、協力研究員
研究者番号：30646691