

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06463

研究課題名(和文) グリア細胞における小胞体ストレス応答を標的とした緑内障病態制御

研究課題名(英文) Roles of glial endoplasmic reticulum stress response in the pathophysiology of glaucoma

研究代表者

宝田 美佳 (Takarada-Iemata, Mika)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40565412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は、網膜神経節細胞の神経変性により視野異常・欠損をきたす疾患であり、近年は神経変性疾患の一つと考えられているがその病態制御機構には未だ不明な点が多い。神経変性疾患において小胞体ストレス応答の重要性が報告されており、その主要経路の一つであるATF6経路に注目し、緑内障病態におけるその重要性と分子機構の解明に取り組んだ。その結果、視神経傷害後に誘導される小胞体ストレス応答ATF6経路は、神経細胞よりはむしろミュラーグリアの機能調節を通じて神経保護作用を発揮することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患研究において、元来、小胞体ストレス応答は神経細胞における重要性が注目されていた。本研究は、小胞体ストレス応答がグリア細胞の機能に寄与することで神経変性を制御することおよびその分子機構の一端を明らかにした。小胞体ストレスの制御は種々の神経変性疾患において重要であり、本研究で得られた成果は、緑内障をはじめとする神経変性疾患の治療法開発において基盤となる知見の蓄積に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma causes vision loss due to progressive degeneration of retinal ganglion cells, but its pathological basis remains unclear. Glaucoma is considered as a neurodegenerative disease and endoplasmic reticulum stress response has been known as important regulator of neurodegenerative diseases. We focused on the ATF6 pathway, one of the three major axes of endoplasmic reticulum stress response, and elucidated its importance and molecular mechanisms in retinal neurodegeneration. Our results suggest that the ATF6 pathway induced after optic nerve injury plays a neuroprotective role by regulating glial cell function rather than retinal ganglion cells.

研究分野：神経解剖学

キーワード：網膜 神経変性 ミュラーグリア 視神経障害 小胞体ストレス応答 神経栄養因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、視神経細胞（網膜神経節細胞）の障害により視野異常・欠損をきたす疾患であり、失明原因の第1位である。その罹患率は70代で10%を越え、失明は生活の質を著しく損ねるため、超高齢化社会の現代において、緑内障は新規治療法の開発が急がれる疾患の1つである。緑内障の現在行われている治療は眼圧を低下させるアプローチであるが、本邦の患者の7割以上が正常眼圧を示しており、緑内障の病態には未だ不明な点が多く残されている。

近年では、緑内障は神経変性疾患の一つであると考えられている。神経変性疾患では、小胞体ストレスのコントロールが重要であることが永らく提唱されている。小胞体ストレスが惹起されると小胞体ストレス応答が起こり、ATF6、PERK、IRE1の3つの主要経路が活性化し、タンパク質構造を正常化するシャペロンの合成、タンパク質合成の制御、タンパク質の分解、細胞死を介してタンパク質の品質管理を行い細胞内の恒常性維持に寄与することが知られる。我々はこれまでに、主要な小胞体ストレス応答経路の一つであるATF6 α が、パーキンソン病や多発性硬化症の病態を制御することを、ATF6 α 欠損マウスを用いた病態モデルの解析から見出している(Ta et al, J Neurochem. 2016, Hashida et al, PLoS One 2012)。さらに、これら中枢神経系疾患モデルの解析から、ATF6経路の破綻による小胞体ストレス亢進下では、グリア細胞の応答が低下することを明らかにしてきた。このような背景から、神経変性疾患である緑内障においても小胞体ストレス応答がグリア細胞の機能調節を通じて病態の制御に関わるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

神経変性疾患において小胞体ストレス応答は神経細胞死を制御している。小胞体ストレス応答の主要経路の1つであるATF6経路に注目し、緑内障病態における小胞体ストレス応答の重要性と病態制御メカニズムを明らかにする。これまで神経変性疾患では、異常タンパク質蓄積や変性が神経細胞で起こることから、小胞体ストレス応答は神経細胞内で重要と捉えられてきた。本課題では神経細胞の周囲に存在するグリア細胞における小胞体ストレス応答の寄与に特に注目して解析を行う。また、小胞体ストレスを制御する化合物を用いて病態への影響を検証し、緑内障治療薬の標的としての可能性を探る。

3. 研究の方法

本研究では、小胞体ストレスセンサーATF6 α の全身欠損マウス、および細胞特異的欠損マウス（ミューラーグリア・アストロサイト特異的ATF6 α 欠損マウス、神経細胞特異的ATF6 α 欠損マウス、傷害神経細胞特異的ATF6 α 欠損マウス）を用いてマウス緑内障モデルを作製し、ATF6 α がグリア細胞を介して網膜神経節細胞変性を制御する可能性、およびその分子機構を明らかにする。また、小胞体ストレス制御化合物やATF6 α 下流分子による網膜神経節細胞の救済効果を解析し、小胞体ストレス制御の治療標的としての可能性を個体レベルの解析により明らかにする。緑内障モデルとして、緑内障同様に網膜神経節細胞の軸索障害を引き起こすマウス視神経挫滅モデルを用いた。

4. 研究成果

視神経傷害後のマウス網膜において小胞体ストレス応答が惹起されるかをqPCRおよびWestern blotにより解析した。その結果、視神経障害後3日目の網膜において、小胞体ストレスセンサー/転写因子ATF6 α の標的遺伝子GRP94のmRNAおよびタンパク質発現について有意な増加が認められた。また、ATF6 α の標的遺伝子GRP78やGRP94を検出可能なKDEL抗体を用いた免疫組織染色の解析から、正常網膜では神経細胞において高い染色性が認められ、視神経傷害後には網膜神経節細胞およびミューラーグリアの突起において染色性が増強することが明らかになった。このことから、視神経傷害後に小胞体ストレス応答ATF6経路の活性化が誘導されることが示唆された。次に、病態下におけるATF6 α の意義を検証するため、ATF6 α 欠損マウスを用いて視神経障害モデルを作成した。網膜フラットマウントを用いて網膜神経節細胞マーカーの免疫染色を行った結果、視神経傷害後10日目における β -III tubulin陽性網膜神経節細胞の生存率が、ATF6 α の欠損により有意に低下した。このことから、内在性のATF6 α は神経保護作用を有することが示唆された。

ATF6 α 欠損マウスでは、視神経傷害後7日目に認められるミューラーグリア・アストロサイトの活性化マーカーGFAPの発現誘導が有意に減弱していた。また、視神経傷害後3日目に認められる、グリア細胞の活性化に寄与するSTAT3経路活性化を示すリン酸化STAT3の発現についても、野生型マウスと比較して発現誘導に顕著な低下が認められ、ATF6 α 欠損によりグリア細胞活性化が減弱することが示唆された。ミューラーグリアの機能の一つとして、神経栄養因子の発現が挙げられる。視神経傷害後の神経栄養因子の発現について解析したところ、複数の候補の中で特定の神経栄養因子の視神経傷害後の発現誘導がATF6 α 欠損により顕著に減弱することが明らかとなった。すなわち、小胞体ストレスセンサーATF6 α は、視神経傷害時におこるグリア細胞の活性化および神経栄養因子の発現に必要であることが示唆された。

ATF6 α 欠損による小胞体ストレスの亢進下で、グリア細胞の応答減弱と神経変性の亢進が認められ、グリア細胞の応答変化が先行していた。しかし、グリア細胞の小胞体ストレス変化が直接グリア細胞の機能に影響を与えたのか、神経細胞の小胞体ストレス変化により間接的にグリア細胞の応答が変わったのかを明らかにする必要がある。そこでミユラーグリアの初代培養系を用いて、小胞体ストレス負荷による影響を検証した。その結果、Tunicamycin や Thapsigargin による小胞体ストレス誘導剤による小胞体ストレス負荷は、複数のミユラーグリアマーカーおよび上記神経栄養因子の発現を有意に減少させた。さらに、ケミカルシャペロンを用いて小胞体ストレスの負荷を軽減したところ、ミユラーグリアにおける細胞マーカーおよび神経栄養因子の発現減少は濃度依存的に緩和された。すなわち、ミユラーグリアの小胞体ストレス制御がミユラーグリアの応答に重要であることが明らかとなった。

次に、視神経損傷 ATF6 α 欠損マウスで認められた神経生存率の減少が、神経細胞自身の ATF6 α 欠損の結果であるか、グリア細胞の ATF6 α 欠損による応答減弱に起因するものかを細胞特異的遺伝子欠損により検証した。グリア細胞を標的するために Glax-CreERT2 マウス、傷害神経を標的するために ATF3-Cre/mtGFP BAC Tg マウス、神経細胞を標的するために CamkII α -Cre BAC Tg マウスを用い、ATF6^{flox/flox} マウスとの交配により細胞特異的 ATF6 α 欠損マウスを作製した。これら細胞特異的 Cre の標的効果については、Rosa-CAG-LSL-tdTomato(Ai14)マウスとの交配による tdTomato 陽性細胞率、あるいは GFP 陽性細胞率により検証し、いずれの Cre マウスも標的細胞において9割以上の tdTomato あるいは GFP の陽性率が認められた。これらのマウスを用いて ATF6 α の細胞特異的欠損を行った結果、グリア細胞特異的 ATF6 α 欠損により、全身欠損マウスと同様に視神経傷害後の網膜神経節細胞の生存率の有意な低下が認められた。一方で、神経細胞特異的 ATF6 α 欠損および傷害神経細胞特異的 ATF6 α 欠損では網膜神経節細胞の生存率に顕著な減少は認められなかった。さらに、グリア細胞特異的 ATF6 α 欠損マウスではグリア細胞の活性化減弱および神経栄養因子発現の減弱が全身欠損マウスと同様に認められた。したがってグリア細胞の小胞体ストレス応答 ATF6 経路が神経変性を制御することが明らかとなった。

次に視神経傷害後の網膜神経細胞の救済効果について解析を行った。ケミカルシャペロンの腹腔内投与および眼内投与は、Vehicle 投与に対して視神経傷害後の β -III tubulin 陽性網膜神経節細胞数を有意に増加させた。また、上記解析で同定した神経栄養因子の眼内投与も同様に、視神経傷害後の網膜神経細胞の生存率を改善した。これらの結果から、小胞体ストレスの軽減あるいはグリア細胞由来神経栄養因子が視神経傷害後の網膜神経細胞の生存に重要である可能性が示唆された。

これらの結果により、グリア細胞の小胞体ストレス応答 ATF6 経路が活性化グリアの機能に促進的に働き、グリア細胞の機能調節を介して神経細胞の生存に貢献することが明らかとなった。また、ケミカルシャペロンや神経栄養因子が視神経傷害後の網膜神経節細胞の生存率を改善することが示された。本成果は、元来神経細胞内で注目されていた小胞体ストレス応答の1経路が、グリア細胞の機能に寄与し非細胞自律的に神経変性を制御するという点を明らかにした点で重要である。本研究では、緑内障様の個体病態レベルにおいて、小胞体ストレス応答が神経細胞-グリア細胞間相互作用に重要な役割を担う可能性とその分子機構の一端を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takarada-Iemata Mika, Yoshihara Toru, Okitani Nahoko, Iwata Keiko, Hattori Tsuyoshi, Ishii Hiroshi, Roboon Jureepon, Nguyen Dinh Thi, Fan Qiyang, Tamatani Takashi, Nishiuchi Takumi, Asano Masahide, Hori Osamu	4. 巻 743
2. 論文標題 Abnormal social behavior and altered gene expression in mice lacking NDRG2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135563 ~ 135563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takarada-Iemata Mika	4. 巻 96
2. 論文標題 Roles of N-myc downstream-regulated gene 2 in the central nervous system: molecular basis and relevance to pathophysiology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-020-00587-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takarada-Iemata Mika, Westenskow Peter D., Muramatsu Rieko	4. 巻 129
2. 論文標題 Neurovascular interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104506 ~ 104506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.104506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Ishii Hiroshi, Takarada-Iemata Mika, Le Thuong Manh, Shiraishi Yoshitake, Ozaki Noriyuki, Yamamoto Yasuhiko, Sugawara Akira, Okamoto Hiroshi, Higashida Haruhiro, Kitao Yasuko, Hori Osamu	4. 巻 13
2. 論文標題 Deletion of CD38 Suppresses Glial Activation and Neuroinflammation in a Mouse Model of Demyelination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 258 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noda Masao, Hatano Miyako, Hattori Tsuyoshi, Takarada-Iemata Mika, Shinozaki Tomohiro, Sugimoto Hisashi, Ito Makoto, Yoshizaki Tomokazu, Hori Osamu	4. 巻 46
2. 論文標題 Microglial activation in the cochlear nucleus after early hearing loss in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 716 ~ 723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Mika Takarada-Iemata, Yoshiki Koriyama, Osamu Hori
2. 発表標題 The role of glial endoplasmic reticulum stress response in retinal neurodegeneration
3. 学会等名 第63回 日本神経化学学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mika Takarada-Iemata, Thuong Manh Le, Nahoko Okitani, Osamu Hori
2. 発表標題 Pathological role of astrocytes in neurodegeneration of multiple sclerosis
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mika Takarada-Iemata, Yoshiki Koriyama, Nahoko Okitani, Tsuyoshi Hattori, Hiroshi Ishii, Kazutoshi Mori, Ryosuke Takahashi, Osamu Hori
2. 発表標題 Neuroprotective role of glial ATF6 pathway in optic nerve injury
3. 学会等名 Neuro2019 (第62回 日本神経化学学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宝田 美佳、沖谷 なほ子、郡山 恵樹、服部 剛志、石井 宏史、堀 修
2. 発表標題 視神経傷害後の網膜神経節細胞生存における小胞体ストレス応答ATF6経路の役割
3. 学会等名 日本解剖学会第78回中部支部会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mika Takarada-Iemata, Akifumi Yoshikawa, Tsuyoshi Hattori, Hiroshi Ishii, Mitsutoshi Nakada, Osamu Hori
2. 発表標題 Protective role of NDRG2 in blood-brain barrier integrity following ischemia
3. 学会等名 International conference on Neurovascular and Neurodegenerative Diseases (NVND-2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宝田 美佳、堀 修
2. 発表標題 The role of astrocytes in blood-brain barrier function after cerebral ischemia
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宝田 美佳、沖谷 なほ子、吉川陽文、中田光俊、堀 修
2. 発表標題 Protective effects of stress-related molecule in cerebral stroke
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	堀 修 (Hori Osamu)	金沢大学・医学系・教授	
研究協力者	郡山 恵樹 (Koriyama Yoshiki)	鈴鹿医療科学大学・薬学研究科・教授	
研究協力者	服部 剛志 (Hattori Tsuyoshi)	金沢大学・医学系・准教授	
研究協力者	石井 宏史 (Ishii Hiroshi)	金沢大学・医学系・助教	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------