

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06714

研究課題名(和文) ATBF1ノックアウトマウスを用いた神経細胞死とAPPの細胞内運送機構の解明

研究課題名(英文) Effect of ATBF1 on the neuronal death and APP trafficking using ATBF1 KO mouse

研究代表者

鄭 且均 (Jung, Cha-Gyun)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00464579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ATBF1ノックアウト(KO)マウスを用いて神経細胞死におけるATBF1の機能を調べた。妊娠19日目の野生型およびATBF1 KOマウスの脳切片を用いてTUNEL assay、活性化caspase3染色を行った結果、ATBF1 KOマウス脳における神経細胞死は野生型と比べて差は見られなかった。しかし、妊娠19日目の野生型およびATBF1 KOマウスの脳から神経細胞を分離・培養し、A β 刺激するとATBF1 KOマウス由来の神経細胞は野生型と比べ神経細胞死が抑制された。ATBF1はBcl2発現を調節するSmad2,3,4と結合しBcl2の発現を抑制することで神経細胞死が抑制された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we determined the functional role of ATBF1 in neuronal death using ATBF1 knockout mouse. The density of TUNEL positive and activated caspase3 positive cells was comparable between brains of wild-type and knockout mice at E19. However, cultured cortical neurons isolated from ATBF1 KO mice protected against neuronal death induced by A β 42 compared with wild-type mice. Moreover, ATBF1 binds to Smad2,3,4 for down-regulating Bcl2 (pro-apoptotic factor) expression, thereby inhibiting neuronal death. Our findings suggest that ATBF1 may be a suitable target for therapeutic intervention of AD.

研究分野：アルツハイマー病、神経科学

キーワード：アルツハイマー病 ATBF1 APP代謝 A β 産生 神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) 病態を促進させる鍵分子であるアミロイド (A) は AD の原因遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から 2 つのプロテアーゼ (及びセクレターゼ) で順次切断されることにより産生される。また、APP が代謝・細胞内運送の異常を起こすことで A 産生が制御され、AD の発症に深く関わっていることが報告されている。特に、APP の細胞質ドメインは APP 結合蛋白質と相互作用し APP の代謝・細胞内運送などに重要な役割を果たしている。例えば、CDK5 や GSK-3、CDK1/CDK2 などは APP の細胞質ドメインをリン酸化することで、X11 や X11L、Fe65 などは APP の細胞質ドメインと結合することで APP の代謝・機能・輸送等を制御し、A 産生に影響することが報告されている。従って、A により引き起こされた神経細胞死のメカニズム解明や、APP の代謝及び細胞内輸送を制御する結合タンパク質の発見とそのタンパク質の機能解析は AD の発症機構の解明と創薬ターゲットを開発する上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

AD の原因遺伝子である APP が、細胞内輸送の異常を起こすことで A 産生が制御され、AD の発症に深く関わっている。APP の細胞内輸送機構を明らかにすることは AD の発症原因解明に重要である。最近、我々は ATBF1 が AD 脳で過剰発現することや、A は ATBF1 の発現を増加させ、神経細胞死を誘導すること、APP と結合し APP を安定化させることで、A の産生を増加させることを明らかにした。本研究では、ATBF1 ノックアウト (KO) マウスを用いて神経細胞死及び APP 細胞内運送における ATBF1 の機能を動物レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 妊娠 19 日目の野生型および ATBF1 KO マウスの脳切片を用いて TUNEL assay、活性化 caspase3 染色を行った。

(2) 妊娠 19 日目の野生型および ATBF1 KO マウスの脳から神経細胞を分離・培養し、A 刺激による神経細胞死の解析を行った。

(3) 妊娠 19 日目の野生型および ATBF1 KO マウスの脳から神経細胞を分離・培養し、A 刺激前後の mRNA を抽出して発現が変動する遺伝子を cDNA microarray 法を用いて調べた後、変動した遺伝子の発現を real-time PCR で確認した。

(4) ATBF1 のターゲット遺伝子である Bcl2 遺伝子の発現を real-time PCR、免疫沈降、Bcl2 promoter assay などで調べた。

(5) AD モデルマウスである APP-KI マウスと ATBF1 ヘテロマウスの交配マウスの作成。

4. 研究成果

(1) 妊娠 19 日目の野生型および ATBF1 KO マウスの脳切片を用いて TUNEL assay、活性化 caspase3 染色を行った結果、ATBF1 KO マウス脳における神経細胞死は野生型と比べて差は見られなかった。

(2) 妊娠 19 日目の野生型および ATBF1 KO マウスの脳から神経細胞を分離・培養し、A 刺激すると、ATBF1 KO マウス由来の神経細胞は野生型と比べ神経細胞死が抑制された。

(3) 妊娠 19 日目の野生型および ATBF1 KO マウスの脳から神経細胞を分離・培養し、A 刺激前後の mRNA を抽出して発現が変動する遺伝子を cDNA microarray 法を用いて調べた結果、ATBF1 KO マウス脳由来の神経細胞では神経細胞死に関連する Bcl2 ファミリーの遺伝子群の発現が減少された。

(4) ATBF1 は Bcl2 発現を調節する Smad2, 3, 4 と結合することで Bcl2 の発現を抑制することが分かった。

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 10 件)

(1) Ueda Y, Misumi S, Suzuki M, Ogawa S, Nishigaki R, Ishida A, Jung CG, Hida H. Disorganization of Oligodendrocyte Development in the Layer II/III of the

Sensorimotor Cortex Causes Motor Coordination Dysfunction in a Model of White Matter Injury in Neonatal Rats. *Neurochem Res*, Jan;43(1):127-137, 2018. 査読有。doi: 10.1007/s11064-017-2352-3.

(2) Ishida A, Imamura A, Ueda Y, Shimizu T, Marumoto R, Jung CG, Hida H. A novel biosensor with high signal-to-noise ratio for real-time measurement of dopamine levels in vivo. *J Neurosci Res*, 96(5):817-827. 2018. 査読有。doi: 10.1002/jnr.24193.

(3) Misumi S, Ueda Y, Nishigaki R, Suzuki M, Ishida A, Jung CG, Hida H. Dysfunction in motor coordination in neonatal white matter injury model without apparent neuron loss. *Cell Transplant*, 25(7):1381-93. 2016. 査読有。doi: 10.3727/096368915X689893.

(4) Kawaguchi M, Hara N, Bilim V, Koike H, Suzuki M, Kim TS, Gao N, Dong Y, Zhang S, Fujinawa Y, Yamamoto O, Ito H, Tomita Y, Naruse Y, Sakamaki A, Ishii Y, Tsuneyama K, Inoue M, Itoh J, Yasuda M, Sakata N, Jung CG, Kanazawa S, Akatsu H, Minato H, Nojima T, Asai K, Miura Y. A diagnostic marker for superficial urothelial bladder carcinoma: lack of nuclear ATBF1 (ZFHX3) by immunohistochemistry suggests malignant progression. *BMC Cancer*. 18;16(1):805, 2016. 査読有。doi:10.1186/s12885-016-2845-5.

(5) Uhm KO, Kim MJ, Kawaguchi M, Akatsu H, Miura Y, Misumi S, Hida H, Choi EK, Kim YS, Michikawa M, Jung CG. ATBF1 is a novel amyloid- protein precursor protein (A PP) binding protein that affects A PP expression. *J Alzheimers Dis*, 43: 243-257, 2015. Co-responding author. 査読有。doi: 10.3233/JAD-140612.

(6) Jung CG, Uhm KO, Horike H, Kim MJ, Misumi S, Ishida A, Ued Y, Choi EK, Kim YS, Michikawa M, Hida H. Auraptene increases

the production of amyloid-beta via c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of -secretase. *J Alzheimers Dis*, 43: 1215-28, 2015. 査読有。doi: 10.3233/JAD-141692.

(7) Ishida A, Misumi S, Ueda Y, Shimizu Y, Jung CG, Tamakoshi K, Ishida K, Hida H. Early constraint-induced movement therapy promotes functional recovery and neuronal plasticity in a subcortical hemorrhage model rat. *Behav Brain Res.*, 284:158-166, 2015. 査読有。doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.022.

(8) Jin JK, Jang BG, Choi EK, Jung CG, Akatsu H, Kim JI, Carp RI, Kim YS. Phosphatidylinositol-Glycan-Phospholipase D is Involved in Neurodegeneration in Prion Disease. *PLoS One*, 13; 10(4):e0122120, 2015. 査読有。doi: 10.1371/journal.pone.0122120.

(9) Hosono T, Nishitsuji K, Nakamura T, Jung CG, Kontani M, Tokuda H, Kawashima H, Kiso Y, Suzuki T, Michikawa M. Arachidonic Acid Diet Attenuates A Deposition in Tg2576 Mice. *Brain Res*, 10;1613:92-9, 2015. 査読有。doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.005.

(10) Hosono T, Mouri A, Nishitsuji K, Jung CG, Kontani M, Tokuda H, Kawashima H, Shibata H, Suzuki T, Nabeshima T, Michikawa M. Arachidonic or docosahexaenoic acid diet prevents memory impairment in Tg2576 mice. *J Alzheimers Dis*, 28;48(1):149-62, 2015. 査読有。doi: 10.3233/JAD-150341.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 鄭 且均、川口 誠、赤津裕康、道川 誠。ATBF1 is novel APP binding protein that affects APP level.第36回日本認知症学会、2017年11月25日、金沢。

(2) Han SS, Choi HS, Park JH, Kim HJ, Jun YC, Kim YS, Jung CG, Chi EK. Cellular prion

protein inhibits cell death via regulation of ATBF1 and its related signaling pathway. 第24回基礎医学学術大会、2016年、Inchon, Korea.

(3) Han SS, Choi HS, Park JH, Kim HJ, Jun YC, Kim YS, Jung CG, Chi EK. Protection of ATBF1-mediated neuronal cell death by cellular prion protein. 韓国老人科学学術団体連合学術大会、2016年、ソウル、韓国。

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鄭 且均 (Jung Cha-Gyun)
名古屋市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00464579

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし