

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03119

研究課題名(和文)プリオン病の神経変性機構におけるストレス誘導性転写調節因子ATF3の役割

研究課題名(英文) Role of stress-induced transcription factor ATF3 on neurodegeneration of prion diseases

研究代表者

堀内 基広 (HORIUCHI, MOTOHIRO)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：30219216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ストレス誘導性の転写調節因子ATF3のプリオン病の病態機序への関与を調べた。プリオン感染マウスでは、神経細胞死が顕著に生じる視床と橋核で、有意にATF3陽性細胞が増加すること、およびその80%が神経細胞であったが、これらの領域ではアポトーシスは生じていなかった。視床におけるGPx4の量はプリオン感染により減少する傾向が認められ、ATF3陽性神経細胞では脂質の過酸化マーカーである4-HNEの蓄積が少なかった。従って、視床の神経細胞ではフェロトーシスにより神経細胞死が生じること、および、ATF3の発現誘導は、フェロトーシスを抑制する方向に作用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

難治性神経変性疾患の一つであるプリオン病における神経細胞死に、脂質の過酸化が誘因となるフェロトーシスが関与する可能性を世界で初めて見いだしたことは、学術的に大きな意義がある。また、フェロトーシスの抑制が神経細胞死の抑制につながる可能性があり、治療法開発戦略の新たな治療標的となる点でも社会的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the role of stress-inducible activating transcription factor 3 (ATF3) in the pathobiology of prion diseases. ATF3-positive cells were significantly increased in the thalamus and pontine nucleus of prion-infected mice, where neuronal cell death is well-observed, and around 80% of ATF-3 positive cells were identified as neurons. Apoptosis were not observed in the thalamus, where pronounced neuronal cell death occurred. The amount of GPx4 in the thalamus tended to decrease with prion infection. The 4-HNE, a marker of lipid peroxidation, was less accumulated in ATF3-positive neurons than ATF3-negative neurons. These results suggested that neurons in the thalamus die of ferroptosis and that induction of ATF3 expression may mitigate lipid peroxidation in the neurons and suppress ferroptosis.

研究分野：獣衛生学、微生物学

キーワード：プリオン ATF3 神経細胞死 フェロトーシス

1. 研究開始当初の背景

プリオン病の研究分野における未解決の課題として、1) 感染因子プリオンの性状、2) プリオン病における神経変性機構、3) 治療法の開発、が挙げられる。このうち、感染因子プリオンの性状は、大腸菌で発現させた組み換えプリオンタンパク質に感染性を付与できることから、感染因子は「ゲノムとしての核酸をもたず、タンパク質から構成される」ことが最終証明された。一方、神経変性機構は依然不明であり、有効な治療法も確立されていない。

アルツハイマー病、ハンチントン病、前頭側頭型認知症およびプリオン病などの難治性神経変性疾患の患者数は増加の一途をたどると予想され、我が国では、2035年までに65歳以上の高齢者の12.5%、470万人が認知症を患うと推定されている。患者はもとより、介護者のQuality of Lifeの低下、社会経済の負担が著しいことから、有効な治療法の開発は急務である。治療の標的を見出すためにも、神経変性機構の解明は重要な研究課題である。ヒトの難治性神経変性疾患の病態を正確に再現できる動物モデルが少ない中で、プリオン感染マウスは、ヒトの神経病態と同様の神経変性を再現する。従って、プリオン感染マウスは、プリオン病の神経変性機構の解明に極めて有用なモデルであり、そこから得られた知見は、他の神経変性疾患の病態解明にも有益な情報となる。

プリオン病では、脳組織で小胞体ストレスが生じる結果、Unfolding protein response (UPR)の一つであるPERK (double stranded RNA- activated protein kinase-like ER kinase) が活性化して、翻訳開始因子のeIF2 α (eukaryotic initiation factor-2 α) をリン酸化することにより、細胞全体の翻訳レベルが低下、すなわちタンパク質生産レベルが低下し、神経変性に至ることが示唆されている (Moreno et al., Nature 2012; Sci Transl Med, 2013)。プリオンが脳内で増殖してから神経細胞死が起こるまでの間に、シナプス機能の障害、ユビキチン・プロテアソーム系の阻害、小胞体ストレスあるいは酸化ストレスが生じることが報告されているが (Hughes & Halliday, Pathogens, 2017)、これらの現象と神経細胞死との因果関係は十分に理解されていない。我々は、PrP^{Sc}の増殖が神経細胞に与える影響を、初代培養神経細胞を用いて解析してきたが、PrP^{Sc}の増殖だけではUPRなどの顕著な変化は生じなかった (Tanaka et al, PLoS One, 2020)。従って、小胞体ストレス等の病的変化が生じるには、PrP^{Sc}の増殖に加えて、初代神経細胞の培養系には存在せず、脳組織に存在するミクログリアやアストロサイト等が産生する因子などによる外的刺激が必要と考えられる。

2. 研究の目的

プリオン病、アルツハイマー病など、タンパク質の異常凝集を伴う難治性の神経変性疾患では、小胞体ストレス、酸化ストレスなどに対するストレス応答が生じ、最終的には細胞機能が破綻して神経細胞死が生じる。神経細胞で生じる一連のストレス応答が明らかになれば、ストレス応答の制御による神経保護を標的とした治療法開発の道が開ける。研究代表者のグループは、独自に実施してきた脳内微小領域の網羅的遺伝子発現解析と免疫組織学的解析から、神経細胞の脱落が起こる領域の神経細胞でATF3が発現誘導される現象を発見した。そこで、プリオン病の神経変性機構の解明を目指して、ストレス誘導性の転写調節因子ATF3の神経細胞死への関与を解析する。プリオン病を含め、難治性神経変性疾患で神経細胞におけるATF3発現誘導の病態生理学的意義を解析した例はなく、本研究は、前例がない新規の神経変性機構の発見に繋がる可能性がある。研究代表者のグループの究極の目標は、プリオン病における神経変性機構の全容解明と治療法開発への貢献であり、本研究の目的は、この目標を達成する過程で、独自のアプローチから発見したストレス誘導性の転写調節因子ATF3の神経細胞死・神経変性機構への関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ATF3の発現誘導の詳細な解析

脳の矢状断および冠状断の凍結切片を作成し、ATF3とNeuN陽性神経細胞を脳領域ごとに詳細に計測し、病態進行とともに、ATF3発現と神経脱落が生じる領域を同定する。また、ミクログリア (Spi1)、アストロサイト (Sox9)、および神経細胞 (NeuN) の核を染色するマーカー分子とATF3の多重染色を実施して、ATF3が発現誘導される細胞種を解析した。

(2) ATF3の組織的ノックダウンの試み

静脈投与でも血液脳関門を通過して、脳全体の細胞に遺伝子導入できるAAVベクターrAAV-PHP.eBを使用し、ATF3遺伝子に対するguide RNAとSyn1プロモーターでSaCas9 (Staphylococcus aureusに由来する小型Cas9)を発現するCRISPRノックアウトコンストラクトを構築し、rAAV-PHP.eBにパッケージングした。これを初代培養神経細胞に導入し、想定される部位でゲノム編集が生じているかを確認した。

(3) ATF3 により転写調節を受ける因子の解析と ATF3 が発現した神経細胞の解析

ATF3 により発現誘導されることが報告されている、Chac1 および Chop の発現を蛍光多重染色および RNA scope を用いる in situ hybridization により解析した。また、腫瘍細胞で ATF3 の発現が脂質の過酸化が関与する細胞死であるフェルトーシスに関与することが報告されたことから (Ratan, Cell Chemical Biology, 2020) プリオン感染に伴う ATF3 の発現誘導とフェルトーシスの関係を解析した。神経細胞の減少が認められる視床背外側を解析の標的として、神経細胞およびアストロサイトでの脂質の過酸化を 4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)の染色を指標に解析し、グルタチオンおよびグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx4) の量を生化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) ATF3 の発現誘導の詳細な解析

プリオン感染マウスにおける ATF3 陽性細胞の定量解析、ATF3 神経細胞の割合、および出現部位を解析するために、プリオン感染マウスの脳凍結切片を、NeuN (神経細胞マーカー) と ATF3 に対する抗体を用いて蛍光多重染色を実施した。ATF3 陽性細胞の出現が顕著な視床だが、ATF3 陽性細胞の75%以上が NeuN 陽性の神経細胞であり、15%程度が Sp1 陽性のミクログリアであった。また視床背外側以外では橋核でも病態の進行に伴い NeuN 陽性細胞が減少し、ATF3 陽性細胞が増加することを見いだした (図1)。

網羅的遺伝子解析の結果から、グルタチオンの代謝に関与する Chac1 が神経細胞特異的に発現誘導されることを示していることから、ATF3 が Chac1 の発現調整を行っている可能性を検討した。RNA-scope を用いて ATF3 陽性細胞で Chac1 の発現が確認できた。Chac1 は、グルタチオンをシステインルグリシンに分解し、結果として制御された細胞死の一つであるフェルトーシスを誘発する主要な因子の一つである。この結果から、何らかの刺激により ATF3 の発現誘導が起こり、Chac1 の発現を経て、神経細胞がフェルトーシスを起こすという新たな仮説を着想するに至った (図2)。

(2) ATF3 の組織的ノックダウンの試み

Sny1 プロモーター下で神経細胞特異的に SaCas9 (Staphylococcus aureus に由来する小型 Cas9) を発現し、ATF3 に対する guide RNA を発現するアデノ随伴ウイルスベクター rAAV-PHP.eB-AFT1, rAAV-PHP.eB-AFT2 を作成した。陰性対象として、オフターゲット効果がないとされる guide RNA を発現する rAAV-PHP.eB-NC1, rAAV-PHP.eB-NC2, および Sny1 プロモーター下で EGFP を発現する rAAV-PHP.eB-EGFP を作成した。rAAV-PHP.eB-EGFP を初代培養神経細胞に感染させ、神経細胞特異的に EGFP が発現すること、および同ウイルスベクターを脳定位接種法により接種して接種部位の神経細胞で EGFP が発現することを確認した。しかし、初代培養神経細胞では予定していたゲノム編集は生じていなかった。

(3) ATF3 陽性神経細胞の解析および ATF3 により転写調節を受ける因子の解析

顕著な神経細胞死およびお ATF3 の発現誘導が認められる視床背外側では、TUNEL 陽性となるアポトーシスは生じていなかった。一方、過酸化脂質のマーカーである 4-HNE の蓄積とグル

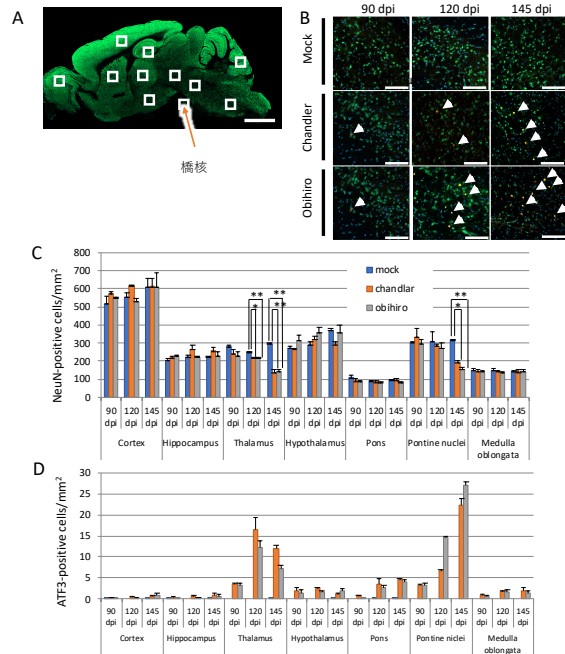


図1. プリオン感染マウス脳内における ATF3 の発現 (A)検索部位。(B)橋核における ATF3 の発現誘導。90, 120, 145 dpi (days post inoculation) における ATF 3 陽性細胞(矢印)。(C) NeuN 陽性神経細胞数。各脳領域における NeuN 陽性神経細胞の経時的変化を示した。視床 (Thalamus) および橋核 (Pontine nuclei) で NeuN で有意に減少した。(D) 各脳領域における ATF3 陽性細胞数。病気の進行に伴い、視床 (Thalamus) および橋核 (Pontine nuclei) で顕著に ATF3 陽性細胞が増加。

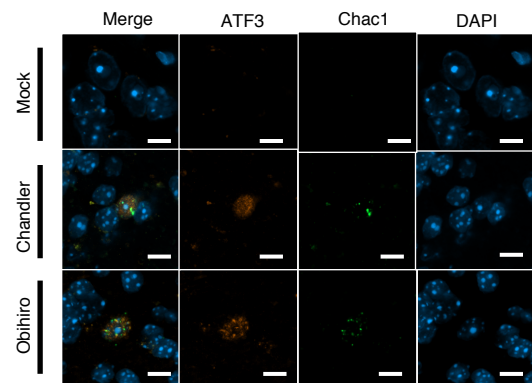


図2. ATF3 と Chac1 の共発現。プリオン Chandler 株および Obihiro 感染マウス (接種後 145 日) の視床から、Chac1 mRNA (緑) と ATF3 mRNA (青) を RNA Scope の 2 重染色により検出した。核は DAPI で染色した。左は、ATF3, Chac1, および DAPI の重ね合わせ像。スケールバー: 10 μm。

タチオンペルオキシダーゼ (GPx4) の発現を解析したところ、ATF3 陽性神経細胞は陰性の神経細胞よりも 4-HNE の蓄積が少なくなっていた (図 3)。また、視床における GPx4 の量はプリオン感染により減少する傾向が認められた。従って、視床の神経細胞ではフェロトーシスにより神経細胞死が生じている可能性、および、ATF3 の発現誘導は、神経細胞内の脂質過酸化を抑制し、フェロトーシスを抑制する方向に作用する可能性が示唆された。

また、プリオン感染マウスの視床の網羅的遺伝子発現解析の結果から、神経細胞保護的に作用するとの報告がある、**endothelin converting enzyme-like 1** および **galanin** の発現上昇を新たに見いだした。

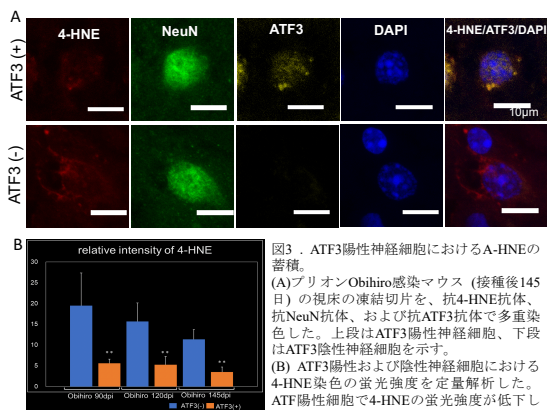


図3. ATF3陽性神経細胞におけるA-HNEの蓄積。
 (A)プリオンObihiro感染マウス (接種後145日)の視床の凍結切片を、抗4-HNE抗体、抗NeuN抗体、および抗ATF3抗体で多重染色した。上段はATF3陽性神経細胞、下段はATF3陰性神経細胞を示す。
 (B) ATF3陽性および陰性神経細胞における4-HNE染色の蛍光強度を定量解析した。ATF3陽性細胞で4-HNEの蛍光強度が低下していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Matsuura Yuichi, Miyazawa Kohtarō, Horiuchi Motohiro, Suzuki Akio, Yokoyama Mayumi, Imamura Morikazu, Ikeda Keigo, Iwamaru Yoshifumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Extended application of the rapid post mortem test kit for bovine spongiform encephalopathy to chronic wasting disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 SUZUKI Akio, SAWADA Kazuhei, ERDENEBAT Temuulen, YAMASAKI Takeshi, TOBIUME Minoru, SUGA Kinuyo, HORIUCHI Motohiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Monitoring of chronic wasting disease using real-time quaking-induced conversion assay in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1735 ~ 1739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Imoto Daigo, Yamamoto Izumi, Matsunaga Hirokazu, Yonekura Toya, Lee Ming-Liang, Kato Kan X., Yamasaki Takeshi, Xu Shucheng, Ishimoto Taiga, Yamagata Satoshi, Otsuguro Ken-ichi, Horiuchi Motohiro, Iijima Norifumi, Kimura Kazuhiro, Toda Chitoku	4. 巻 54
2. 論文標題 Refeeding activates neurons in the dorsomedial hypothalamus to inhibit food intake and promote positive valence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101366 ~ 101366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Byambajav Zolzaya, Bulgan Erdenebat, Hirai Yuji, Nakayama Momoko, Tanaka Misaki, Nitta Yurika, Suzuki Akio, Umemura Takashi, Altankhuu Bold, Tsagaan Alimaa, Vanaabaatar Batbaatar, Janchivdorj Erdenebaatar, Purevdorj Nyam-Osor, Ayushjav Narantuya, Yamasaki Takeshi, Horiuchi Motohiro	4. 巻 100
2. 論文標題 Research Note: Antimicrobial resistance of Campylobacter species isolated from chickens near Ulaanbaatar city, Mongolia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 100916 ~ 100916
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psj.2020.11.079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Misaki, Yamasaki Takeshi, Hasebe Rie, Suzuki Akio, Horiuchi Motohiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Enhanced phosphorylation of PERK in primary cultured neurons as an autonomous neuronal response to prion infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Akio, Sawada Kazuhei, Yamasaki Takeshi, Denkers Nathaniel D, Mathiason Candace K, Hoover Edward A, Horiuchi Motohiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Involvement of N- and C-terminal region of recombinant cervid prion protein in its reactivity to CWD and atypical BSE prions in real-time quaking-induced conversion reaction in the presence of high concentrations of tissue homogenates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Prion	6. 最初と最後の頁 283 - 295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336896.2020.1858694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Akio, Yamasaki Takeshi, Hasebe Rie, Horiuchi Motohiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Enhancement of binding avidity by bivalent binding enables PrPSc-specific detection by anti-PrP monoclonal antibody 132	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0217944	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 Hagiwara, K., Yuko Sato, Y., Yamakawa, Y., Hara, H., Tobiume, M., Okemoto-Nakamura, Y., Sata, T., Horiuchi, M., Shibata, H., Ono, F.	4. 巻 14
2. 論文標題 Tracking and clarifying differential traits of the classical- and atypical L-type bovine spongiform encephalopathy prions after transmission from cattle to cynomolgus monkeys	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0216807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216807	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 Sakaguchi S, Shintani S, Kamio K, Sekiya A, Kato S, Muroi Y, Horiuchi M, Furuoka H.	4. 巻 40
2. 論文標題 Selective neuronal vulnerability is involved in cerebellar lesions of Guinea pigs infected with bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions: Immunohistochemical and electron microscopic investigations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 167-179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12613	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 Sawada, K, Suzuki A, Yamasaki T, Iwamaru Y, Maatsuura Y, Miyazawa K, Masujin K, Atarashi R, Horiuchi M.	4. 巻 81
2. 論文標題 Estimation of prion infectivity in tissues of cattle infected with atypical BSE by real time-quaking induced conversion assay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Vet. Med. Sci.	6. 最初と最後の頁 846-850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0003	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10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 上森 望未、田中 美咲、Temuulen ERDENEBAT, 小松 勇介、鈴木 章夫、堀内 基広
2. 発表標題 プリオン22L株のグルタミン酸作動性神経細胞における易増殖性
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星加 恭、能瀬 絵菜、小松 勇介、堀内 基広、古岡 秀文
2. 発表標題 プリオン感染動物で見られるシナプス脱落についての比較病理学的検討
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki A, Sawada K, Erdenebat T, Yamasaki T, Tobiume M, Suga, K Horiuchi M
2. 発表標題 Monitoring of chronic wasting disease using real-time quaking conversion assay in Japan
3. 学会等名 14th Asian Society of Conservation Medicine (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Erndenebat T, Uwamori N, Tanaka M, Komatsu Y, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M.
2. 発表標題 GABA-negative neuron-prone propagation of prion 22L strain
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 美咲、山崎 剛士、長谷部 理絵、鈴木 章夫、堀内 基広
2. 発表標題 プリオン感染初代培養神経細胞における神経細胞自律的变化の解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木章夫, 澤田和平, 山崎剛士, 堀内基広
2. 発表標題 高濃度脳組織乳剤存在下でのreal-time quaking-induced conversion反応における全長組換えシカプリオンタンパク質固有の反応性
3. 学会等名 第163回日本獣医学会
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Horiuchi M, Suzuki A, Yamasaki T
2 . 発表標題 PrPSc-specific staining and transcriptome analyses, towards understanding mechanisms of prion propagation and neurodegeneration
3 . 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tanaka M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M
2 . 発表標題 Direct effects of generating PrPSc and consequences in neuron-enriched primary cultures
3 . 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Matsuura Y, Miyazawa K, Iwamaru Y, Horiuchi M
2 . 発表標題 Characterization of gene expression profiles in brains of mice infected with typical and atypical BSEs
3 . 学会等名 Prion2019
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Suzuki A, Sawada K, Yamasaki T, Horiuchi M
2 . 発表標題 Analysis of the unique reactivity of rCerPrP in real-time quaking-induced conversion reaction
3 . 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院獣医学研究院 獣医衛生学教室 ホームページ
https://vethygiene.vetmed.hokudai.ac.jp

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	鈴木 章夫 (Suzuki Akio)		
研究協力者	星加 恭 (Hoshika Kyo)		

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1件

国際研究集会 Asian Pacific Prion Symposium 2021 Online	開催年 2021年～2021年
---	--------------------

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		
米国	コロラド州立大学		