福井大学リポジトリ
UNIVERSITY OF FUKUI REPOSITORY

アストロサイト特異的小胞体ストレスセンサーによる神経保護作用の解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2013-01-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 千原, 一泰, CHIHARA, Kazuyasu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/7144

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年　６月　９日現在

機関番号：13401
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2009～2010
課題番号：21700410
研究課題名（和文）アストロサイト特異的小胞体ストレスセンサーによる神経保護作用の解析
研究課題名（英文）Functional analysis of ER stress sensor OASIS on the neuronal protection from the toxicity of kainic acid.
研究代表者
千原　一泰（CHIHARA KAZUYASU）
福井大学・医学部・講師
研究者番号：00314948

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレスはアルツハイマー病をはじめとする種々の神経変性疾患の病因のひとつに挙げられている。グリア細胞に特異的に発現する小胞体ストレスセンサーOASIS のノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ、カイニン酸投与による神経細胞死が顕著に亢進する。本研究において OASIS による神経細胞保護作用を解析した結果、OASIS がアストロサイトにおける脳由来神経栄養因子（BDNF）の発現と分泌に重要な役割を担っている事を示唆するデータが得られた。

研究成果の概要（英文）：Accumulated evidence clearly indicates that ER stress is involved in the development of neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease. We have investigated the functions of ER stress sensor OASIS, which is specifically expressed in astrocyte. Recently, we established *OASIS*-/- mouse which shows the increased vulnerability of hippocampal pyramidal neurons to the toxicity of kainic acid. In this study, we found that OASIS expressed in astrocyte plays important roles on the expression and secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to protect the neurons from the toxicity of kainic acid.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	2,100,000	630,000	2,730,000
２０１０年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学
キーワード：グリア細胞、小胞体ストレス応答

１．研究開始当初の背景

(1) 小胞体でおこるタンパク質の折り畳みが、細胞内外からの各種ストレスにより撹乱される状態を小胞体ストレスという。小胞体膜上には小胞体に異常タンパク質が蓄積したことを感知するストレスセンサーが発現しており、これまで IRE1,PERK,ATF6 などの分子が同定されてきた。これらの分子はユビキタスに発現しており、小胞体ストレスに応答して細胞の自己防御システムを活性化する起点として機能すると考えられている。

(2) 申請者らはアストロサイトに特異的に

発現する新規小胞体ストレスセンサーの同定に成功し、その機能解析を行ってきた。その結果、OASIS が小胞体ストレスに応答して小胞体膜上で切断され、その断片が核内に移行し、転写因子として分子シャペロンの発現を誘導することを明らかにした。さらに、凍結により損傷を与えた大脳皮質において OASIS の発現量が分子シャペロンの発現と共に上昇することを見出している。しかし、OASIS の発現量が損傷を受けた神経に対し、どのような影響を与えるのか明らかとなっていなかった。

(3) そこで、最近作製した OASIS ノックアウトマウスにカイニン酸を投与することにより、OASIS の発現が神経細胞の損傷にどのような影響を与えるのか検討した。その結果、カイニン酸を投与した OASIS ノックアウトマウスではアストロサイトの増殖能が顕著に低下していた。カイニン酸の投与により神経が障害を受けると、アストロサイトが増殖し、神経保護因子を分泌することが知られている。それゆえ、OASIS はアストロサイトの細胞増殖や神経保護因子の分泌に深く関与している可能性が示唆された。

２．研究の目的

本研究ではカイニン酸を投与した OASIS ノックアウトマウスで見られる神経細胞の脆弱性を分子レベルで解明することを最終目標として、アストロサイトにおける OASIS の機能を生化学的および細胞生物学的な手法を用いて、以下の点に焦点を絞り解析を行った。

(1) 「OASIS がアストロサイトの増殖に及ぼす影響」OASIS ノックアウトマウスではアストロサイトの細胞増殖能が著しく低下していた。そこで OASIS がアストロサイトの増殖に対して重要な役割を担っている事を明らかにする。

(2) 「OASIS が神経保護因子の発現や分泌に及ぼす影響」カイニン酸を投与した OASIS ノックアウトマウスでは海馬 CA1 領域における神経細胞死が野生型に比べて顕著に亢進していた。アストロサイトにおける OASIS の欠損が神経保護因子の発現や分泌にどのような影響を与えるのか明らかにする。

(3) 「アストロサイトにおける OASIS 活性制御メカニズム」カイニン酸の投与がどのようにしてアストロサイトに発現する OASIS を活性化するのか不明である。神経細胞とアストロサイトの共培養による実験系を用いて明らかにする。

３．研究の方法

(1) 野生型マウスおよび OASIS ノックアウトマウスより、初代培養アストロサイトを培養し、小胞体ストレス誘導剤を添加したときに見られる細胞増殖能を解析した。

(2) 野生型マウスおよび OASIS ノックアウトマウスにカイニン酸を投与し、海馬における脳由来神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor(BDNF)やグルタミントランスポーターGLT1 および GLAST の mRNA 発現レベルを RT-PCR により検討した。

(3) 初代培養アストロサイトやラットグリオーマ細胞株 C6 を小胞体ストレス誘導剤で処理し、BDNF mRNA の発現レベルが上昇するか否か、RT-PCR により検討した。

(4) 小胞体ストレスが負荷されたアストロサイトにおける BDNF mRNA の転写に必要なプロモーター領域を、ルシフェラーゼアッセイにより解析した。

(5) 小胞体ストレスが負荷された状態のアストロサイトにおける BDNF 産生をタンパク質レベルでモニタリングするアッセイ系の開発を試みた。

４．研究成果

(1) OASIS が欠損すると初代培養アストロサイトは小胞体ストレスに脆弱となり、ストレス負荷時における細胞増殖能が低下した。それゆえ、OASIS の活性化は小胞体ストレス状態におけるアストロサイトの増殖や生存を助け、アストロサイトによる神経保護作用を増強させている可能性を見出した。

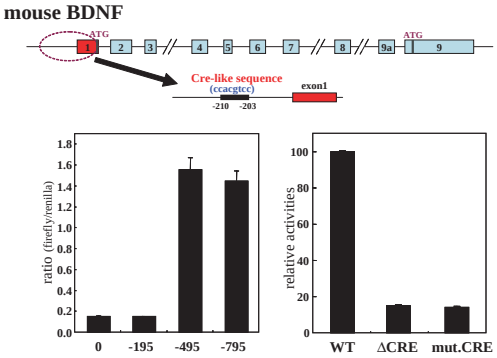
(2) カイニン酸の投与は海馬において glial cell line-derived neurotrophic factor や brain-derived neurotrophic factor(BDNF)の発現レベルを上昇させることが知られている。これらの神経栄養因子の発現レベルをカイニン酸を投与した OASIS ノックアウトマウスで調べたところ、BDNF mRNA の発現レベルが野生型マウスに比べ有意に減少していた。しかし、カイニン酸により過剰に放出されたグルタミンを細胞内に取り込むグルタミントランスポーターである GLT1 や GLAST の発現レベルは野生型と OASIS ノックアウト

マウスで差が認められなかった。それゆえ、OASIS は選択性を持って BDNF mRNA の発現レベルの調節に関与していると考えられた。

(3) OASIS はアストロサイト特異的に発現する小胞体ストレスセンサーであり、その発現は海馬神経細胞には殆ど認められない。つまり、OASIS の発現による神経保護作用はアストロサイトの増殖や機能を増強することでもたらされている可能性が高い。そこで、初代培養アストロサイトを野生型マウスおよび OASIS ノックアウトマウスの海馬より培養し、小胞体ストレスの負荷により BDNF mRNA レベルが上昇するか否か検討した。その結果、OASIS の欠損は小胞体ストレスによる BDNF mRNA の産生を低下させた。同様の現象が、ラットグリオーマ細胞株 C6 における OASIS の発現を siRNA により抑制した場合でも認められた。

(4) BDNF のプロモーター領域をルシフェラーゼアッセイにより解析したところ、Exon1 に含まれる翻訳開始点の上流 496bp が小胞体ストレスによる BDNF の転写に必要な事を明らかにした。更に、この領域に存在する CRE-like 配列に OASIS が作用して BDNF の転写を誘導していることを明らかにした（図１）。

図１：BDNF プロモーターの解析



(5) 以上の研究により、OASIS の発現は小胞体ストレス状態に置かれたアストロサイトにおいて、BDNF mRNA の産生を増強させる作用を持つと考えられる。しかし、OASIS の発現がタンパク質レベルにおける BDNF の産生や分泌にどのような影響を持つのか明らかにする必要がある。そこで、培養上清に産生された BDNF を免疫沈降により濃縮し、アストロサイトの BDNF 分泌量をモニタリングするシステムを新たに開発した。このシステムを用いれば小胞体ストレス負荷時における BDNF の産生をタンパク質レベルで解析することが可能となり、小胞体ストレスが BDNF の産生に及ぼす影響を詳細に解析できると期待している。

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３件）

①Hino, S., Kondo, S., Yoshinaga, K., Saito, A., Murakami, T., Kanemoto, S., Sekiya, H., Chihara, K., Aikawa, Y., Hara, H., Kudo, T., Sekimoto, T., Funamoto, T., Chosa, E., and Imaizumi, K.
Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis.
J. Bone Miner. Metab., 28(2), 131-138, 2010
査読有り

② Murakami, T., Saito, A., Hino, S., Kondo,S., Kanemoto, S., Chihara, K., Sekiya, H., Tsumagari, K., Ochiai, K., Yoshinaga, K., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Kou, I., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ikawa, M., Okabe, M., Wanaka, A., and Imaizumi, K.
Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer *OASIS* is involved in bone formation.
Nat. Cell Biol., 11(10), 1205-1211, 2009
査読有り

③Chihara, K., Saito, A., Murakami, T., Hino, S., Aoki, Y., Sekiya, H., Aikawa, Y., Wanaka, A., and Imaizumi, K.
Increased vulnerability of hippocampal pyramidal neurons to the toxicity of kainic acid in *OASIS*-deficient mice.
J. Neurochem., 110(3), 956-965, 2009
査読有り

〔学会発表〕（計６件）

①扇和弘、中島謙治、シュクラ ウパサナ、千原一泰、藤枝重治、定清直
アダプター蛋白質3BP2の点突然変異によるB細胞シグナル伝達への影響
第 83 回日本生化学会大会第 33 回日本分子生物学会年会合同年会、 2010 年 12 月 8 日、兵庫県

②中島謙治、竹内健司、千原一泰、堀田博、定清直
エネルギーセンサーAMPKの活性化によるC型肝炎ウイルス複製の抑制
第 83 回日本生化学会大会第 33 回日本分子生物学会年会合同年会、 2010 年 12 月 7 日、兵

庫県

③中島謙治、竹内健司、千原一泰、堀田博、定清直
エネルギーセンサーAMPKの活性化によるC型肝炎ウイルス複製の抑制
第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日、徳島県

④扇和弘、羽溪朋子、Upasana Shukla、千原一泰、藤枝重治、定清直
アダプター蛋白質の点突然変異によるB細胞シグナル伝達の増強
日本生化学会北陸支部第28回大会、2010年5月29日、福井県

⑤Saito, A., Chihara, K., Murakami, T., Wanaka, A., and Imaizumi, K.
Increased vulnerability of pyramidal neurons to the toxicity of kainic acid in the hippocampi of OASIS-deficient mice.
Society of Neuroscience 2009、2009年10月19日、シカゴ

⑥千原一泰、齋藤敦、村上智彦、青木悠里、和中明生、今泉和則
小胞体ストレスセンサーOASISの欠損がカイニン酸による神経細胞死へ与える影響
第32回日本神経科学大会、2009年9月17日、愛知県

〔図書〕（計1件）
千原一泰、定清直、関節リウマチ治療におけるSyk阻害薬の可能性を探る、分子リウマチ治療（先端医学社）、3(4)、pp186-189、2010
査読なし

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.u-fukui.ac.jp/biseibutu/

６．研究組織
(1)研究代表者
千原　一泰（CHIHARA KAZUYASU）
福井大学・医学部・講師
研究者番号：00314948