

令和元年6月13日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02475

研究課題名(和文)ニューロン-グリアのクロストーク解析から迫るプリオン病の神経変性機構

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism for neurodegeneration in prion diseases through neuron-glia cross-talk

研究代表者

堀内 基広 (HOROUICHI, 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) 31,700,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病ではミクログリアとアストロサイトが早期から活性化する。グリア細胞の活性化が神経変性に関与することが示唆されているが、その詳細は明らかでない。そこで本研究では、網羅的遺伝子発現解析によりミクログリアとアストロサイトの活性化状態を詳細に解析した。さらに、プリオン感染マウス脳内で神経細胞数の減少が起こる微少領域を同定して、その領域における網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、小胞体ストレス応答により発現が誘導される転写調節因子ATF3が、神経細胞の脱落が生じる視床背外側で神経細胞に発現することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患におけるグリア細胞の活性化状態の比較解析から、神経変性におけるグリア細胞の役割の理解が一層進むと思われる。本研究におけるミクログリアとアストロサイトの遺伝子発現情報は貴重な基礎データとして活用が期待されるため、独自にデータベース化して公開する方向で検討している。また、転写調節因子ATF3が神経変性機構を理解する鍵となる分子となる可能性があるため、ATF3は今後の重要な研究標的であり、その解析が進むことで、神経変性疾患の新たな治療標的となる可能性もある。

研究成果の概要(英文)： Microglia activation and astrogliosis are observed in the early stage of prion diseases. Therefore, glial activation are thought to be involved in the neurodegeneration, however, details of the mechanisms remain to be elucidated. In this study, first we analyzed the activation state of microglia and astrocyte in prion infected mice by RNA-sequencing. We also analyzed brain regions where neuronal loss was progressively observed in prion-infected mice and analyzed gene expression in the small region. Neuron-enriched genes were selected by bioinformatics and further analyses disclosed that expression of stress-induced transcriptional factor, ATF3, was induced in the lateral dorsal part of the thalamus where progressive neuronal loss was observed. The lateral dorsal part of the thalamus is one of the regions where intense glial activation is observed and thus, it is of interest to elucidate if glial activation induces ATF3 induction in prion-infected neurons.

研究分野：獣医衛生学

キーワード：プリオン 神経細胞 ミクログリア アストロサイト RNA-seq ATF3 小胞体ストレス応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン病における神経変性を考える際、1) 神経細胞でプリオンが増殖することで細胞が変性する細胞自律性の神経細胞死 (autonomous neuron death)、2) 神経細胞以外の因子が関与する非細胞自律性の神経細胞死 (non-autonomous neuron death) を区別する必要がある。プリオンの感染に伴い、細胞で異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) が産生され、タンパク質の翻訳異常が生じて小胞体ストレスを誘発する結果、神経変性が生じるとする報告がある (Moreno et al., 2012)。また、PrP^{Sc} の産生に伴うミトコンドリアの機能異常が神経変性に関与することを示唆する報告もある (Siskova et al., 2010)。これらの報告は、神経細胞での PrP^{Sc} の産生が神経細胞死の直接の原因となることを示唆している。

ミクログリアは、プリオン感染後早期から活性化する。免疫抑制剤 FK506 の投与 (Mukherjee et al., 2010)、コロニー刺激因子受容体を介するシグナル伝達経路の阻害 (Gomez-Nicola et al., 2013) により、ミクログリアの活性化が抑制され、プリオン感染マウスの生存期間が延長する。我々は、lipopolysaccharide (LPS) のレセプターとして炎症反応の促進に関与する CD14 分子の欠損により、ミクログリアの活性化状態が炎症制御性の M2-type にシフトし、マウスの生存期間が延長することを報告した (Sakai et al., 2013)。これらの結果は、ミクログリアが、その活性化状態により神経保護的/障害性の両方に作用することを示す。一方、IL-1 β 受容体欠損マウスを用いて、アストロサイトの活性化がプリオン病の病態進行を増悪させることが報告されている (Schultz J et al, 2004)。グリア細胞が、プリオン病の神経変性に深く関わることは明白であるが、活性化したグリア細胞が神経細胞に作用して神経変性が生じる機構は不明な点が多い。プリオン病における神経変性機構に迫るためには、プリオンが感染した神経細胞とグリア細胞の相互作用に焦点をあてた解析が必要である。

2. 研究の目的

プリオン病における神経細胞死は、プリオンが神経細胞で増殖することに加え、活性化したグリア細胞などの神経細胞以外の因子も関与する非細胞自律性の神経細胞死と考えられる。従って、プリオン病における神経変性機構に迫るためには、プリオンが感染した神経細胞と、ミクログリア、アストロサイトとの相互作用を解析する必要がある。

そこで、本研究では、神経細胞 (ニューロン)-グリア細胞のクロストークを研究標的として、プリオン病における神経変性機構の分子機構の解明に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プリオン感染マウスからのグリア細胞の分離

プリオン感染あるいは非感染マウスの脳を酵素処理後、抗ミエリン抗体結合磁性ビーズを用いて、共雑するミエリンを除去する。その後、CD11b (ミクログリアマーカー) あるいは ACSA2 (Astrocyte Cell Surface Antigen 2, アストロサイトマーカー) に対する抗体が結合した磁性ビーズを使用して、各々のグリア細胞を分離した。

(2) 網羅的遺伝子発現解析

細胞を分取後直ちに TRIzol 試薬を用いて total RNA を回収した。次世代シーケンサー Ion Proton により、平均長 150-200 base、1 サンプル当たり計 3-10 G base のデータを取得した。バイオインフォマティクスには Avadis NGS Software および Ingenuity Pathway Analysis を用いた。

(3) プリオン感染初代神経培養細胞の作製

胎生 14 日齢のマウス胚から、大脳皮質、海馬、および視床領域を採材して初代神経細胞を培養し、これにプリオンを接種した。

(4) プリオン感染初代神経培養細胞とグリア細胞の共培養

プリオン感染初代神経培養細胞とグリア細胞が直接接触するよう、分離したアストロサイト、ミクログリア、あるいはその両方を添加して培養した (直接共培養)。液性因子の影響を調べるために、孔径 0.8µm のトランスウェルを介して共培養した (間接共培養)。

(5) グリア細胞がプリオン感染初代神経細胞に及ぼす影響の解析

グリア細胞と共培養したプリオン感染マウス初代神経細胞に生じる変化は、1) 神経細胞の形態変化、2) ストレス応答タンパクの発現、により解析した。

(6) 神経細胞が減少する脳領域の同定と網羅的遺伝子発現解析

プリオンの感染により神経細胞数が減少する脳領域は NeuN を指標とした蛍光抗体法により解析した。その微小領域を実体顕微鏡下で回収し網羅的発現解析を実施した。

4 . 研究成果

(1)プリオン感染マウスのアストロサイトとミクログリアの網羅的遺伝子発現解析

神経細胞 (ニューロン) -グリア細胞のクロストークに焦点をあてた解析を進め、プリオン病における神経変性機構の分子機構の解明に迫ることを目的としている。そこで、プリオン感染マウスから、接種後 60、90、120、および 145 日(dpi)に脳を採材し、アストロサイトとミクログリアを分離して、RNA-seq により網羅的遺伝子発現解析を行った。

ミクログリアとアストロサイトで感染早期 (接種後 60 日) から遺伝子発現変動を調べたところ、ミクログリアでは自然免疫に関する遺伝子の発現が上昇していたが、アストロサイトでは接種後 60 日で既に遺伝子発現変動が認められるものの、自然免疫に関与する因子の遺伝子発現には変化が認められなかったことから、プリオン感染の感染初期における自然免疫応答はミクログリアであることが示唆された(図1)。

また、アストロサイトにおける遺伝子発現の解析から、神経保護に働くアストロサイトでより活性化することが報告されている STAT3 シグナル経路、および神経傷害的なアストロサイトで亢進が報告されている NFκ-b 経路の両方が活性化していることが明らかとなった。STAT3 が調節する遺伝子のうち、神経保護的な作用を有することが報告されている遺伝子、Thbs1, Bcl3, Timp1, Serpina3n の発現が病気の進行とともに上昇していたことから、アストロサイトは神経保護的な機能を発揮し続ける可能性が示唆された。一方で、神経細胞とオリゴデンドロサイトを傷害する A1 タイプと、神経保護的に働く A2 タイプのアストロサイトに特徴的に発現するマーカー遺伝子の発現は、両方の遺伝子発現が上昇しており、どちらか一方に活性化している傾向は認められなかった。

ミクログリアとアストロサイトの RNA-seq のデータを、既に公共のデータベースに登録されているアルツハイマー病モデルマウスおよび LPS 投与マウスのもものと比較したところ、プリオ

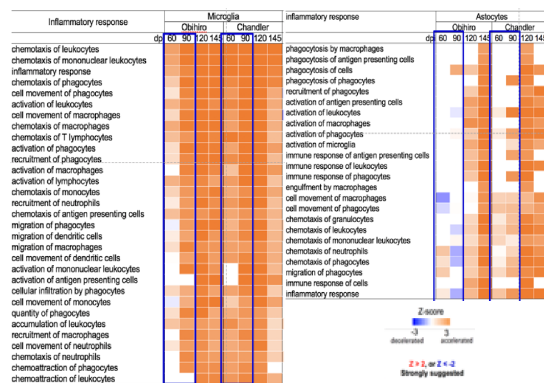


図1. 感染早期の自然免疫応答の主役としてのミクログリア
ミクログリアとアストロサイトで細胞膜に発現あるいは分泌されるタンパク質をコードされる分子を抽出し (Secretome)、そのうちから免疫応答に関与する分子を抽出して発現パターンを比較したところ、感染早期 (接種後60、90日) では免疫応答に関与する機能はミクログリアで亢進が予測されるが、アストロサイトではさほど顕著ではなかった。

ン病におけるミクログリアおよびアストロサイトの活性化は、アルツハイマー病モデルマウスと類似するが、活性化がより亢進した状態にあることが明らかとなった。一方で、LPS 投与マウスの活性化状態とは異なることも明らかとなった。

(2) プリオン感染初代神経培養細胞とグリア細胞の共培養

プリオン感染初代神経培養細胞は、シナプスタンパクの僅かな減少などの軽微な変化を示すが、神経細胞数の減少や小胞体ストレス応答に關与するタンパク質のリン酸化などの変化は認められなかった。

(3) 神経細胞が減少する部位での網羅的遺伝子発現解析

NeuN の発現を指標に、プリオン感染マウスの脳で神経細胞の脱落が生じる場所を同定した。その結果、視床背外側では、接種後 120 日には 30% 程度の神経細胞が脱落していることが示唆された (図 2)。その微小領域の RNA-seq を行い、我々が収集したミクログリア、アストロサイトの RNA-seq の結果および、他の研究者が報告しているオリゴデンドロサイトと血管内皮細胞の RNA-seq のデータを用いて、主に神経細胞で発現する遺伝子群を抽出した。さらに

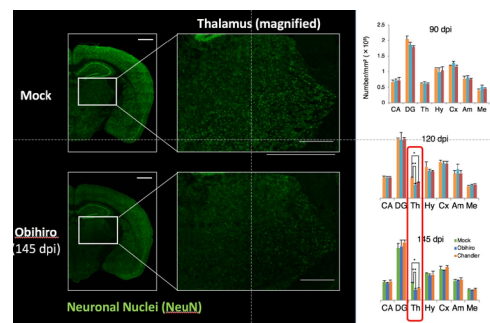


図2. プリオン感染マウスにおける神経細胞が減少する領域の同定
海馬CA領域、海馬齒状回(GD)、視床(Th)、視床株(Hy)、大脳皮質(Cx)、扁桃体(Am)、および延髄(Me)におけるNeuN陽性神経細胞を定量化した。視床では接種後120日から神経細胞の有意な減少が認められた。

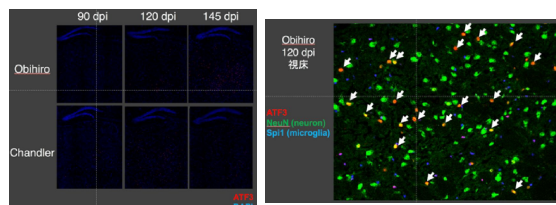


図3. 視床におけるストレス誘導性転写調節因子ATF3の発現誘導
視床におけるATF3の経時的な発現誘導(右)。神経細胞におけるATF3の発現(左)。

解析を進め、視床背外側の神経細胞で、ATF3-Chop-Chac1 経路の活性化を示す結果が得られた。脳凍結切片の蛍光染色により、接種後 90 日頃から、視床背外側の神経細胞でストレス誘導性の転写調節因子 ATF3 の発現が誘導されることが確認できた (図 3)。従っ

て、プリオン感染マウスの神経細胞では、部位特異的に ER ストレスが生じていることを示す結果である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Retrograde Transport by Clathrin-Coated Vesicles is Involved in Intracellular Transport of PrPSc in Persistently Prion-Infected Cells. *Sci Rep*, 8 (1):12241, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-30775-1

Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Flow Cytometric Detection of PrPSc in Neurons and Glial Cells from Prion-Infected Mouse Brains. *J Virol*, 92 (1): e011457-17, 2017. DOI: 10.1128/JVI.01457-17

Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, and Horiuchi M. Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease. *J Gen Virol*, 98: 2615-2627, 2017. DOI: 10.1099/jgv.0.000907

Saijo E, Hughson AG, Raymond GJ, Suzuki A, Horiuchi M, and Caughey B. PrPSc-Specific Antibody Reveals C-Terminal Conformational Differences between Prion Strains. *J Virol*, 90: 4905-4913, 2016. DOI: 10.1128/JVI.00088-165

Tanaka M, Fujiwara A, Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Masujin K, and Horiuchi M. Comparison of abnormal isoform of prion protein in prion-infected cell lines and

primary-cultured neurons by PrP^{Sc}-specific immunostaining. *J Gen Virol*, 97: 2030-2042, 2016. DOI: 10.1099/jgv.0.000514

Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Establishment of a simple cell-based ELISA for the direct detection of abnormal isoform of prion protein from prion-infected cells without cell lysis and proteinase K treatment. *Prion*, 10: 305-318, 2016. DOI: 10.1080/19336896.2016.1189053

Hasebe R, Tanaka M, Suzuki A, Yamasaki T, and Horiuchi M. Complement factors alter the amount of PrP(Sc) in primary-cultured mouse cortical neurons associated with increased membrane permeability. *Virology*, 496: 9-20, 2016. DOI. 10.1016/j.virol.2016.05.014

〔学会発表〕(計 12 件)

Nakayama M, Shan Z, Yamasaki T, Hasebe R, Sawada K, Horiuchi M. Alteration of microglial activation state by mesenchymal stem cells. Prion2018, Santiago de Compostela, Spain, May 22-25, 2018.

Shimakura A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Identification and transcriptome analysis of brain regions vulnerable to neuronal loss in prion infection. Prion2018, Santiago de Compostela, Spain, May 22-25, 2018.

Takamine H, Tanaka M, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Attempt to establish *ex vivo* co-culture system for analyses of the mechanism for neurodegeneration in prion diseases. APPS2018, Tokyo, Japan, Oct 4-5, 2018.

Tanaka M, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Direct effects of PrP^{Sc} on synaptopathy and transcriptional alterations in cultured neurons. APPS2018, Tokyo, Japan, Oct 4-5, 2018.

Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, Horiuchi M. Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease. Prion2017, Edinburgh, UK, May 23-26, 2017.

Tanaka M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Analyses of neuron-autonomous mechanisms for neurodegeneration in prion diseases on neuron-enriched primary cell cultures. APPS2017, Melbourne, Australia, Oct 20-21, 2017.

Kuroda M, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Activation state of glial cells in prion diseases. Joint Symposium between Seoul National University-Hokkaido University "Infection and Immunity" Seoul, Korea Nov 15, 2017.

Tanaka M, Fujiwara A, Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Masujin K, Horiuchi M. Comparison of abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}) in prion-infected cell lines and primary cultured neurons by PrP^{Sc}-specific immunostaining. Prion2016, Tokyo, JAPAN, May 10-13, 2016.

Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Neuron and glial cell type-specific detection of PrP^{Sc} in prion-infected mouse brain by flow cytometry. Prion2016, Tokyo, JAPAN, May 10-13, 2016.

Horiuchi M. Activation state of glial cells in prion diseases, Prion2016, Tokyo, JAPAN, May 10-13, 2016.

Horiuchi M. "Immuno- and cell therapy as possible treatment for prion diseases" "Therapeutic approaches to prion disease and other neurodegenerative conditions associated with protein misfolding" Banbury Center, Cold Spring Harbor, USA, Sept 16-18, 2015

Kuroda M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of activation state of astrocytes with the progression of prion diseases. Prion2015, Fort Collins, Colorado, USA, May, 26-29, 2015.

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：小林 篤志

ローマ字氏名：KOBAYASHI atsuhi

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院獣医学研究院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50431507

(2)研究協力者

研究協力者氏名：黒田 弥乃梨

ローマ字氏名：KURODA, minori

研究協力者氏名：単 智夫

ローマ字氏名：SHAN, zhifu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。