

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2006～2009

課題番号：18208026

研究課題名(和文) プリオン病初期病変形成機序の解析

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism on the formation of early pathological lesion of prion diseases

研究代表者

堀内 基広 (HORIUCHI MOTOHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：30219216

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：プリオン、DNA マイクロアレイ、神経変性、ミクログリア

1. 研究計画の概要

プリオン病の有効な治療法はなく、その確立が希求されている。プリオン感染における神経変性機序の解析は病変形成機序の理解につながり、ひいてはプリオン病の予防・治療法の開発に重要な知見を提供する。本研究では、プリオン病の予防・治療法、および診断法の開発に貢献するために、プリオン病における神経変性機序の解析を目的とする。プリオン病の臨床期中期～病末期では神経変性の初期過程から末期過程までが混在しているため、神経変性を引き起こす変化と、神経変性後の代償性変化を区別することが難しい。そこで、プリオン感染の初期過程を解析の標的として、病変形成・神経変性に伴い変動する宿主因子を網羅的解析により特定する。そのような宿主因子の神経変性への関与を細胞レベル、組織レベルおよび動物レベルで検証する。これらの解析、検証を通じて、PrP^{Sc}の存在だけでは説明できない神経変性機構を、組織レベルおよび細胞レベルで明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) プリオン株による病態進行の相違

プリオン Obihiro 株、Chandler 株感染マウスの脳の局所におけるプリオンの増殖を解析した。その結果、Obihiro 株および Chandler 株感染マウスは接種後約 150 日で病末期に陥るが、視床背外側、延髄前庭核におけるプリオン増殖(PrP^{Sc}の蓄積)が、Chandler 株感染マウスで早くから起こること、しかし、病末期では差がなくなることが明らかとなった。

プリオン増殖の時間的な違いと一致して、

Chandler 株感染マウスのこれらの部位では、Obihiro 株感染マウスと比較して、ミクログリアのマーカとなる Aif1、アストロサイトのマーカ分子である Gfap がより早期から認められた。従って、同様の時間経過で動物が病末期に陥る場合でも、プリオン株により増殖のダイナミクスは異なり、それに対する宿主応答も異なることが明らかとなった。

(2) 網羅的遺伝子発現解析

感染早期から PrP^{Sc}の沈着が認められる延髄前庭核、視床背外側、扁桃体を用いた DNA マイクロアレイ解析の結果から、cxcl10、cxcl13、CD14、CD44、CD52、CD68などのケモカインあるいは免疫系に関連する遺伝子の発現が感染早期から上昇することが判明した。

(3) ミクログリア関連遺伝子の発現変動

ミクログリアで発現することが報告されている遺伝子のうち、Cc15、Cc19、Cxcl10、cxcl16、Fcgr1、Fcgr3、Tlr2 は M1-type のモノサイト/マクロファージの活性化の指標となる分子である。M2-type の活性化の指標となる分子(Cd14、Fcgr2b)も発現上昇が認められているが、M1-type の反応が亢進している傾向にあると考えられた。

(4) 遺伝子欠損マウスを用いた病態解析

プリオン感染の早期から遺伝子の発現変動が認められた遺伝子の中で神経保護作用が報告されている cxcl10 に着目し、cxcl10 遺伝子欠損マウスを用いて感染実験を行った。その結果、cxcl10 遺伝子欠損マウス

では野生型マウス比べ潜伏期が短くなることから、cxcl10 はプリオンの病態進行を抑える働きがあることが示唆された。

ミクログリアの活性化に関連する分子と考えられる Cd14 の遺伝子欠損マウスを用いて感染実験を実施した。その結果、Cd14 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、異常型プリオン蛋白質の蓄積が遅れ、潜伏期が有意に延長したことから、Cd14 分子を介するシグナル伝達は病気の進行に促進的に働くことが示唆された。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進行している。

(理由)

感染早期 (60dpi) から中期 (90dpi) で、PrP^{Sc} が早期から蓄積する脳局所での DNA マイクロアレイ解析が終了しており、その結果をもとに、Cd14, cxcl10, Cd44 など、複数の因子に標的を絞り、遺伝子欠損マウスを用いたプリオン感染実験が進行している。プリオン感染マウスにおける病態を詳細に解析から、これらの因子と病変形成の関係が明らかになることが期待される。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 遺伝子欠損マウスを用いた病態解析

現在解析を進めている因子 (Cd14, cxcl10, Cd44) については、遺伝子欠損マウスと野生型マウスでの病態を詳細に比較する。また、感染後早期から特徴的な遺伝子発現変化を示す Cd68, 補体系の分子の欠損マウスを用いた解析を行う。

(2) ミクログリア活性化と病変形成の解析

遺伝子発現の網羅的解析の結果は、ミクログリアが感染早期から活性化していることを示唆しているため、磁性ビーズ法を用いてミクログリアを単離して、ミクログリア内での遺伝子発現変化を詳細に解析する。

特に、Cd14 分子は自然免疫に関連し、炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られているので、Cd14 分子の刺激が誘導する応答について詳細に解析する。

(3) ex vivo 実験系での神経変性の解析

プリオンの増殖により神経変性が生じることは周知であるが、培養神経細胞を用いた解析では、プリオン増殖による神経変性を再現できていない。神経変性は神経細胞におけるプリオン増殖のみならず、これに対する宿主応答の結果生じると考えられる。そこで、遺伝子発現解析から同定された各種宿主因子をプリオン感染神経細胞培養系に添加し、神経変性が生じる条件を探索する。

5. 代表的な研究成果

(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 20 件)

- ① Song, C.-H., Honmou, O., Nakamura, K., Hamada, H., Furuoka, H., Hasebe, R., and Horiuchi, M (CA: corresponding author). The effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prion. *J. Virol.*, 2009. in press (査読有)
- ② Shindoh, R., Kim, C.-L., Song, C.-H., Hasebe, R., and Horiuchi, M (CA). The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. *J. Virol.*, 83: 3852-3860, 2009. (査読有)
- ③ Song, C.-H., Furuoka, H., Kim, C.-L., Ogino, M., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi, M (CA). Effect of intraventricular infusion of anti-prion protein monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice. *J. Gen. Virol.*, 89: 1533-1544, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 34 件)

- ① Horiuchi, M., Yamasaki, T. Intracellular localization of disease-specific prion protein. *Symposium on emerging and reemerging infectious diseases.* 2009, 2/17, (Tokyo Japan)
- ② Horiuchi, M. Prion propagation and its inhibition. *The 14th International Symposium for Zoonosis Control.* 2007, 10/31, (Sapporo, Japan)

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ヒトプリオン病を処置するための組成物

発明者: 堀内基広、本望修、地子徳幸

出願人: 国立大学法人 北海道大学、北海道、NCメディカルリサーチ株式会社

番号: 特願 2006-82037

出願日: 平成 18 年 3 月 24 日

国内外の別: 国内