

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

研究成果の概要（和文）：

DNA マイクロアレイ法を用いて、プリオン感染早期から発現が変動する宿主遺伝子の探索を行い、発現がプリオン感染早期から上昇する遺伝子の病態機序への関与を解析した。その結果、LPS レセプターとして知られる Cd14 分子が病態進行に関与すること、神経保護作用を有するケモカインとして知られる Cxcl10 が病気の進行に抑制的に働くことを明らかにした。また、ミクログリアの活性化が病態進行に抑制的に働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To identify host genes whose expression is up-regulated in the early stage of prion-infection, DNA microarray analysis was carried out and involvement of the genes in pathobiology of prion diseases was analyzed. The results showed that Cd14 molecule, known as receptor for LPS, influences the progression of the disease, whereas, Cxc110, known as chemokine with neuroprotective effect, plays a role in antagonizing the disease progression. In addition, microglial activation was suggested to have a protective effect on the disease progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
総計	29,300,000	8,790,000	38,090,000

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. 研究開始当初の背景

プリオン病の神経変性機序については、これまで、PrP^{Sc}の蓄積が神経変性の主な原因と考えられてきた。しかし、PrP^{Sc}の蓄積と神経変性の関係について、単純に PrP^{Sc}の

存在だけでは説明できないことを示唆する結果も報告されている。例えば、プリオン感染脳に PrP 遺伝子欠損(PrP^{0/0})マウスの神経細胞を移植した実験では、PrP^{Sc}が周囲に存在するにもかかわらず PrP^{0/0}マウス由来の移

植神経細胞は細胞死に至らない(Brandner et al., Nature 379: 339-343, 1996)。PrP^C は glycosyl-phosphatidyl-inositol(GPI) 結合型膜蛋白質として細胞表面に発現する。GPI アンカーを欠損する変異 PrP を発現したトランスジェニック(Tg)マウスにプリオンを接種すると、脳の細胞外におびたしい PrP^{Sc} プラークの沈着が生ずるが、神経組織の変性は軽微のままマウスは生残する(Chesebro et al., Science 308: 1435-1439, 2005)。これらの結果から、神経変性機序は“PrP^{Sc} の存在=神経変性の原因”だけでは説明できない。

プリオン病の神経変性機序は依然として良くわかっていない。プリオン病における神経変性機序を考える上で、アストロサイト、稀突起膠細胞(オリゴデンドロサイト)、ミクログリアなど、神経細胞のみならず神経組織を構築する細胞群の関与も考慮する必要がある。しかし、病末期の神経病変は、病気の進行に伴い神経が変性した結末である。神経変性機序を解析するためには、PrP^{Sc} が PrP^C と会合して、PrP^{Sc} が細胞内で産生されるプリオン感染初期の過程と神経変性を注視する必要がある。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現の網羅的解析

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した。マウス順化 Obihiro 株、Chandler 株感染マウスを、プリオン接種後 60、74、および 90 日目に安楽殺し脳を採材した。陰性対照として、正常マウス脳乳剤を接種したマウスを用いた。実

体顕微鏡下で、視床背外側、扁桃核、視床下部および延髄前庭核の領域を採材した。Total RNA を回収し、GeneChip Mouse430_2 (Affymetrix) を使用して DNA マイクロアレイ解析を実施した。

(2) 遺伝子欠損マウスを用いた病態解析

DNA マイクロアレイ解析の結果から、感染早期から発現が上昇する Cxcl10、Cd14、Cd44 分子に着目し、これらの遺伝子の欠損マウスを用いて、プリオン感染実験を行い、病態を詳細に解析した。

(3) PrP^{Sc}/マーカー分子の蛍光二重染色法の確立

プリオン感染後早期で PrP^{Sc} の増殖が始まる細胞を同定するために、感染後早期(プリオン接種後 60 日まで)のマウス脳の凍結切片を用いて、PrP^{Sc} と細胞マーカーの蛍光二重染色法の確立を行った。

4. 研究成果

(1) プリオン感染マウスの脳局所における遺伝子発現の網羅的解析

プリオン Obihiro 株あるいは Chandler 株を接種後、60、74、90 日に延髄前庭核、視床等を採取して DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を実施した。その結果から、Ccl5、Ccl9、Cxcl10、Cxcl13、Fcgr1、Tlr2、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。

文献的にミクログリアで発現する遺伝子を選択したところ、モノサイト/マクロファージの M1-type の活性化のマーカーとなるケモカイン等(Ccl5、Ccl9、Cxcl10、Fcgr1、Tlr2)などの発現が優勢であった。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(図1)。

(2) Cxcl10 および Cd14 分子のプリオン病病態への関与

感染後早期から発現に変化が認められた遺伝子のうち、Cd14、Cd44、Cxcl10 の3種の分子に着目し、これらの分子の病態機序への関与について検討するために、当該遺伝子の欠損マウスを用いて感染試験を行った。Cd14 は LPS のレセプターであり、LPS 刺激によるミクログリアの活性化は神経軸索の Wallerian 変性後の炎症性反応を亢進させ、神経変性の誘因となることが知られている。また、Cxcl10 はウイルス性脳炎において神経保護作用を発揮することが知られている。これら遺伝子の欠損マウスに Chandler 株および Obihiro 株を接種したとこ

る、Cxcl10 欠損マウスでは、Chandler 株で潜伏期が有意に短縮した。Obihiro 株接種マウスでは潜伏期が短縮する傾向は認められたものの、有意な差ではなかった。Cd14 欠損(Cd14^{-/-})マウスでは、野生型マウスと比較して、両株ともに有意に潜伏期が延長した(表 1)。従って、Cxcl10 は病気の進行に抑制的に働くこと、Cd14 は病態を促進する方向に作用すると考えられた。

一方、Cd44 欠損マウスでは、Chandler 株および Obihiro 株接種マウスともに、潜伏期の有意な延長あるいは短縮は認められなかった(表 1)。

Gene symbol	Obihiro(dpi)			Chandler(dpi)		
	60	74	90	60	74	90
Aif1	0.6	0.7	1.0	1.1	1.4	1.1
C1qb	1.0	1.3	1.4	1.8	2.5	2.6
Ccl5	N	N	3.3	N	1.3	3.2
Ccl6	N	N	0.8	N	2.8	2.7
Ccl9	N	0.9	0.9	1.9	2.3	2.4
Cd14	N	0.6	0.9	1.0	1.6	2.1
Cd44	N	N	N	N	1.1	1.6
Cd68	N	0.8	1.2	N	1.6	2.6
Ctsh	N	N	0.6	N	1.0	1.3
Ctss	0.6	0.9	1.3	1.4	1.3	1.8
Fcgr1	N	1.3	1.1	N	1.2	1.5
Fcgr2b	N	N	1.2	N	N	1.7
Fcgr3	0.7	0.9	1.2	1.1	1.4	1.8
Cxcl10	N	3.1	1.3	N	1.8	1.6
Cxcl13	N	1.0	2.7	2.5	3.3	3.1
Cxcl16	N	N	N	N	N	1.6
Tlr2	N	0.9	N	N	1.8	1.5
Gfap	0.7	1.3	1.3	1.6	2.2	2.4

図 1. プリオン感染に伴う遺伝子発現の変化
Obihiro株およびChandler株接種マウスの前庭核付近における遺伝子発現の変化を、接種後60、74、90日の時点で、DNAマイクロアレイにより解析した。数字は非感染マウス脳乳剤を接種したマウスと比較した場合の、遺伝子発現量の変化(上昇、2の累乗)を示す。Nは変化が認められなかったことを示す。Gfap以外の遺伝子は文献的にミクログリアでの発現が報告されている遺伝子。

表 1. Cd14, Cd44, Cxcl10欠損マウスでの潜伏期

プリオン株	マウス	n	潜伏期(日)	P	
				Log-rank	Wilcoxon
Obihiro	WT	12	157.9 ± 7.1	-	-
	Cxcl10 ^{-/-}	11	152.1 ± 3.6	<0.05*	<0.05*
	Cd14 ^{-/-}	11	172.3 ± 4.8	<0.01*	<0.01*
	Cd44 ^{-/-}	5	158.0 ± 1.4	-	-
Chandler	WT	9	153.8 ± 5.9	-	-
	Cxcl10 ^{-/-}	11	149.1 ± 7.9	-	-
	Cd14 ^{-/-}	10	161.7 ± 3.7	<0.001*	<0.001*
	Cd44 ^{-/-}	6	147.8 ± 5.9	-	-

(3) Cd14^{-/-}マウスにおけるプリオン病の病態解析

病末期では Cd14^{-/-}マウスと野生型マウスの間で PrP^{Sc} の蓄積量に差は認められなかつ

たが、接種後 120 日の時点では、Obihiro 株、Chandler 株接種 Cd14^{-/-}での PrP^{Sc} 蓄積量は野生型マウスの 70-80%程度であった(図 2)。

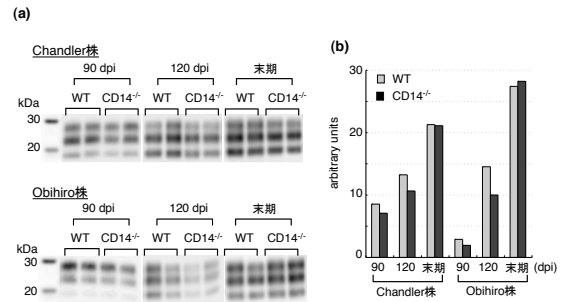


図2 Cd14^{-/-}マウスにおけるPrP^{Sc}の蓄積
(a) ウェスタンブロット法によるPrP^{Sc}の検出。プリオンを接種後、90 dpi、120 dpi、および病末期のマウスの脳からPrP^{Sc}をウェスタンブロット法により検出した。(b) PrP^{Sc}の定量解析。WT: 野生型マウス

Cd14 は LPS レセプターとして知られており、マクロファージ系の細胞に発現し、自然免疫系の調節に関与する。そこで、プリオン感染 Cd14^{-/-}マウスと野生型マウスで、ミクログリアの活性化状態を比較検討した。ミクログリアの活性化マーカーである Iba-1 陽性ミクログリアは、接種後 90 日から Cd14^{-/-}マウスでより活性化している傾向が認められた(図 3a)。また、ミクログリアの数も接種後 120 日で Cd14^{-/-}マウスで多かった(図 3b)。

また、活性化マクロファージのマーカー分子であり、ミクログリアでも活性化に伴い発現が上昇することが知られている Cd11b、Cd45、F4/80、および Cd68 の発現を免疫組織化学により解析した結果、プリオン感染野生型マウスに比べ Cd14^{-/-}で発現が亢進していた(結果は示さず)。

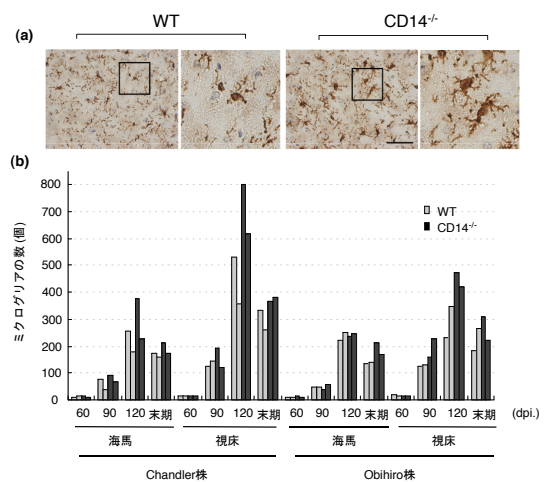


図3 プリオン感染WTおよびCd14^{-/-}マウスにおけるミクログリアの増生
(a) Iba1陽性ミクログリア。Chandler株を接種したWTとCd14^{-/-}マウスの接種後90日の視床における免疫組織化学像を示した。スケールバーは50 μmを表す。(b) Iba1陽性ミクログリアの定量解析。Chandler株あるいはObihiro株を接種後、90日、120日、および末期における海馬と視床でのミクログリアの増生をImage Jにより定量解析した。各時点で、WT、Cd14^{-/-}マウスともに各2匹のマウスを解析し、2匹の結果を併記した。

(4) PrP^{Sc}/マーカー分子の蛍光二重染色法の確立

当教室で樹立した抗 PrP モノクローナル抗体 mAb132 は、PrP 分子の最もアミロイド原性が高い領域を認識する。蛍光抗体法の染色条件を精査した結果、この mAb132 がプリオン持続感染細胞およびプリオン感染動物組織の凍結切片で、PrP^C の検出を最小限度にとどめ、特異的に PrP^{Sc} を検出可能なことを見出した。この方法を応用することで、プリオン感染早期で、PrP^{Sc} の増殖が始まる脳内の細胞と増殖がおこる細胞内小器官の解析が可能になることから、凍結切片上で、PrP^{Sc} とマーカー分子の蛍光二重染色法を検討し、その条件を確立した。

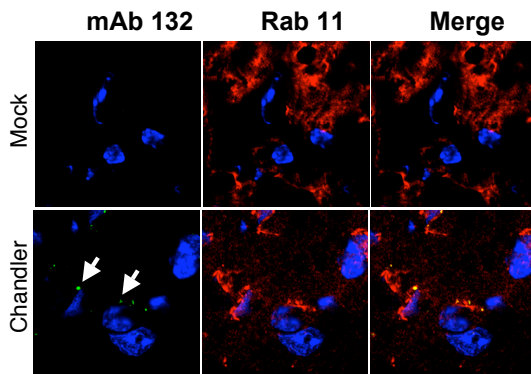


図4 凍結切片上でのPrP^{Sc}とマーカー分子の蛍光二重染色
Chandler株接種後60日のマウスの視床の凍結切片をmAb132とリサイクリングエンドソームマーカーであるRab11に対する抗体で二重染色を行った。矢頭はPrP^{Sc}の染色像を示す。このPrP^{Sc}染色像は非感染マウス(Mock)では認められない

(1) ~ (3) で述べた結果は、Cd14 分子がプリオン病の病態を進める方向に関与すること、Cxcl10 は病気の進行に抑制的に働くことを示唆する結果である。また、ミクログリアの活性化により炎症性サイトカインが放出され、これが各種神経変性疾患の病態を増悪させるという仮説があるが、本研究の成果は、この仮説とは逆に、ミクログリアの活性化はプリオン病の病気の進行に抑制的に作用することを示唆している。この成果は、これまで報告のない新知見であり、プリオン病の神経病変形成機構および病態機序を理解する上で、重要な知見である。

また(4)で述べた技術の確立により、プリオン感染早期から、プリオンの増殖がおこる細胞とその細胞内小器官の解析が可能となったことから、今後、より詳細に病変形成機序を解析するための重要な技術となる。

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24件)

- ① Nakamitsu, S., Kurokawa, A., Yamasaki, T., Uryu, M., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. *J. Gen. Virol.*, 91:563-569, 2010 (査読有)
- ② Watanabe, Y., Hiraoka, W., Igarashi, M., Ito, K., Shimoyama, Y., Horiuchi, M., Yamamori, T., Yasui, H., Kuwabara, M., Inagaki, F., Inanami, O. A novel copper(II) coordination at His186 in full-length murine prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 394(3):522-528, 2010 (査読有)
- ③ Sakata, H., Horiuchi, M., Takahashi, I., and Kinjo, M. Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 11: 87-95, 2010 (査読有)
- ④ Horiuchi, M., Karino, A., Furuoka, H., Ishiguro, N., Kimura, K., and Shinagawa, M. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. *Virology*, 394: 200-207, 2009 (査読有)
- ⑤ Song, C.-H., Honmou, O., Nakamura, K., Hamada, H., Furuoka, H., Hasebe, R., and Horiuchi, M. The effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prion. *J. Virol.*, 83: 5918-5927, 2009 (査読有)
- ⑥ Shindoh, R., Kim, C.-L., Song, C.-H., Hasebe, R., and Horiuchi, M. 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)
- ⑦ Song, C.-H., Furuoka, H., Kim, C.-L., Ogino, M., Suzuki, A., Hasebe, R., and Horiuchi, M. 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50件)

- ① Horiuchi, M. Intracellular localization of abnormal isoform of prion protein. "Prion and Virus Infections" BSJ & ABA Joint Symposium, Oct. 30, 2009, Tokushima, Japan.
- ② Song, C.-H., Honmou, O., Furuoka, H., Hasebe, R., and Horiuchi, M. Identification

of chemotactic factors for migration of mesenchymal stem cell to brain lesions of mice infected with prions. Prion2009 Sept. 23-25, 2009, Porto Carras, Greece.

- ③ Horiuchi, M., Yamasaki, T. Intracellular localization of disease-specific prion protein. "Symposium on emerging and reemerging infectious diseases." Feb. 17, 2009, Tokyo, Japan.
- ④ 堀内 基広 異常型プリオン蛋白の細胞内局在 大阪大学蛋白質研究所セミナー2009「蛋白質立体構造を基盤とするプリオン現象の解明と制御」、2009年7月13日、大阪
- ⑤ Furuoka, H., Horiuchi, M., and Sata T. Pathology in guinea pig infected with bovine spongiform encephalopathy. Prion2008, Oct. 6-8, 2008. Madrid, Spain.
- ⑥ Horiuchi, M. Prion propagation and its inhibition. "The 14th International Symposium for Zoonosis Control." Oct. 31, 2007, Sapporo, Japan.
- ⑦ 堀内 基広 プリオンの増殖とその抑制 第55回日本ウイルス学会 2007年10月22日、札幌

[図書] (計1件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀内 基広 (MOTOHIRO HORIUCHI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：30219216

(2)研究分担者

稲波 修 (INANAMI OSAMU)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：10193559

木村 和弘 (KIMURA KAZUHIRO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：30192561

落合 謙爾 (OCHIAI KENJI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：80214162

長谷部 理絵 (HASEBE RIE)
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号：70431335

瓜生 匡秀 (URYU MASAhide)
(株)応用医学研究所・研究員
研究者番号：00399990

宋 昌絃 (SON CHANG-HYUN)
北海道大学・大学院獣医学研究科・博士研究員
研究者番号：70547786

大島 正伸 (OOSHIMA MASANOBU)
金沢大学・がん研究所・教授
研究者番号：40324610
(H20→21；連携研究者)

古岡 秀文 (FURUOKA HIDEFUMI)
帯広畜産大学・畜産学部・教授
研究者番号：60238665
(H20→21；連携研究者)