

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780303

研究課題名(和文)プリオン病の病態における補体因子の役割

研究課題名(英文)Roles of complement factors in the pathogenesis of prion disease

研究代表者

長谷部 理絵 (HASEBE, RIE)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・講師

研究者番号：70431335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病患者および罹患動物の脳では補体因子の沈着が認められるが、病態における役割は不明である。本研究では、プリオン感染神経細胞に補体を反応させると細胞膜の透過性が亢進するものの、細胞死は起こらないことが示唆された。この現象はChandler株と22L株、いずれを感染させた神経細胞でも観察されたが、異常型プリオンタンパク質(PrPSc)の蓄積に与える影響は異なっており、Chandler株に対しては増殖抑制効果、22L株に対しては増殖増強効果が認められた。今後はその他のプリオン株でも補体因子がPrPSc増殖に与える影響を検討し、補体因子の活性化制御によるプリオン病治療の可能性を探る。

研究成果の概要(英文)：Although complement factors have been detected in brains of patients and animals affected by prion diseases, the roles in the pathogenesis still remain unknown. In the current study, reaction of complement factors increased permeability of the plasma membrane of primary-cultured neurons infected with prions, but not cell death. This phenomenon was observed in the neurons infected with either Chandler or 22L strains, however, the effect on propagation of an abnormal form of prion protein (PrPSc) was opposite: inhibition in the Chandler-infected neurons, and acceleration in the 22L-infected neurons. The results of this study would be expanded to the other prion strains in the future, to assess a possibility that regulation of complement pathway could be a therapeutic target of prion diseases.

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：プリオン病 補体因子

1. 研究開始当初の背景

プリオン病には羊のスクレイピー、牛海綿状脳症 (BSE)、人のクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) などがあり、BSE は人の変異型 CJD の原因となることから、人獣共通感染症としても知られている。補体は自然免疫因子であり、病原体の感染や神経変性疾患の脳内で発現することが知られている。プリオン病では、補体因子 C1q、C3 欠損マウスは末梢からのプリオン感染に抵抗性を示すことから、補体はプリオンが中枢神経系に侵入する過程で重要であると考えられている (Klein et al., 2001. Nat Med 7: 488-492; Mabbott et al., 2001. Nat Med 7: 485-487)。一方で、補体因子の神経病態における役割は不明である。人のプリオン病患者の脳では、異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の沈着に一致して補体が検出されるが、補体因子の発現が神経変性の原因か結果かは不明である。しかし、プリオンを脳内に感染させたマウスでは感染初期に補体遺伝子の発現が上昇することが報告されており、補体因子がプリオン病の神経病態に関与している可能性も示唆されている (Dandoy-Dron et al., 1998. J Biol Chem 273: 7691-7697; Skinner et al., BMC Genetics 7: 114)。

申請者は、補体がプリオン持続感染マウス神経芽腫 (N2a) 細胞に作用し、細胞膜の不安定化を起こすことを発見した (Hasebe et al., Virology. 2012. 423: 205-213)。スクレイピー Chandler 株と 22L 株を持続感染させた N2a 細胞を 10% 正常マウス血清 (ほぼ全ての補体因子を含む) 培養液中で培養すると、約 60-70% の細胞が Annexin V 陽性を示した。すなわち、本来細胞内膜に存在するホスファチジルセリンがアポトーシス初期と同じように細胞表面に露出していることが示唆され、補体はプリオン病の神経変性の原因となる可能性が考えられた。しかし、これらの細胞は形態に変化が認められず、開裂型 Caspase-3 が陰性であり、ヨウ化プロピジウム (PI) の細胞内への取り込みが変化しなかったことから、細胞死は起こっていないものと考えられた。また、正常マウス血清を抗補体抗体で前処理し、反応させたところ、Chandler 感染細胞では抗 C1q、C3、C9 抗体により、22L 感染細胞では抗 C3 抗体により Annexin V 陽性細胞数が減少した。C9 は膜傷害性複合体の主要構成因子であるため、免疫染色により膜傷害性複合体を検出したところ、Chandler 感染細胞のみで検出された。以上の結果より、プリオン株により異なる補体因子が反応することが示唆された。

2. 研究の目的

プリオン持続感染 N2a 細胞に補体因子を反応させても細胞死は起こらなかった。しかしながら、N2a 細胞は神経芽腫由来であり、中枢神経系の神経細胞とは性質が異なる。本研究では、初代神経細胞を培養し、プリオン感

染系を確立した後、補体因子を反応させ、神経細胞死が起こるかを検討した。また、補体反応が神経細胞への PrP^{Sc} の蓄積に影響を与えるかを解析した。

3. 研究の方法

・初代培養神経細胞の準備とプリオンの感染

妊娠 16 日目の ICR マウスより胎仔を摘出し、大脳皮質を分離した。酵素処理により細胞を離散させ、神経細胞培養メEDIUMに懸濁し、poly-L-lysine コートしたディッシュに播種した。感染材料としてはスクレイピー Chandler 株および 22L 株感染末期マウスの脳より調整したミクロソームを用いた。陰性対照としては、培養 8 日目の神経細胞にディッシュ 1cm² あたり 5 ng PrPres 相当の PrP^{Sc} を含むミクロソームを接種した。陰性対照としては非感染マウスの脳より調整したミクロソームを、総タンパク質量が感染材料と同じになるように接種した。

・プリオン感染神経細胞への補体因子の添加

6-8 週の雌雄の ICR マウスより心採血により血液を採取し、4 日に 1 晩静置したのちに血清を分離し、正常マウス血清 (NMS) とした。補体を非働化するために 56 30 分処理をした (H-NMS)。NMS または H-NMS を 10% となるように培養液中に添加した。また、NMS より補体因子 C1q、C3、C9 を除去するために、NMS に抗 C1q、C3、C9 抗体を 150 µg/ml となるように添加し、4 3 時間反応させた。抗体に捕捉された補体因子を除去するために Protein G 磁気ビーズを添加し、4 3 時間反応させた。マグネットにより Protein G 磁気ビーズを除去し、10% となるように培養液中に添加した。

・PI の細胞内への取り込みの評価

NMS、H-NMS または抗体前処理 NMS をプリオン感染 24 日後の神経細胞培養液中に添加した後、6、24、48 時間後に PI を加え、37 15 分反応させた。Zeiss 共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) で写真を撮影し、PI 陽性細胞数を計数した。

・PrP^{Sc} 蓄積量の評価

プリオン感染 12、20 日後の神経細胞培養液中に NMS、H-NMS を 10% となるように添加した。血清添加 4 日目に NMS または H-NMS を 10% 含有する培養液に交換した。さらに 4 日間培養し、血清添加 8 日目に細胞を回収した。感染 20 日後の細胞に関しては、さらに 8 日間血清存在下で培養した。20 µg/ml の Proteinase K で 37 30 分処理後に、リンタングステン酸沈殿を行い、SDS サンプルバッファー添加した。SDS-page、抗 PrP 抗体 31C6 (マウス PrP 143-149 を認識) を用いてイムノブロットにより PrP^{Sc} を検出した。LAS3000mini (Fujifilm) により可視化し、Multigage (Fujifilm) により定量した。

4. 研究成果

(1) プリオン感染神経細胞を NMS 処理すると、PI の細胞内への取り込みが増加する (図 1-3)

補体反応がプリオン感染神経細胞に神経変性を起こす可能性を検討するために、ほぼすべての補体因子を含む NMS を培養液中に添加した。感染 16 日後に NMS を添加すると、Chandler および 22L 感染神経細胞ともに、PI の取り込みが 6、24、48 時間と経時的に増加した (図 1)。H-NMS 処理をした細胞における PI の取り込みは、陰性対照の非感染細胞と同程度であった。ところが、感染 24 日目に NMS 処理をすると、PI の取り込みは 6 時間後に最大となり、24、48 時間後には H-NMS 処理細胞および非感染細胞と同程度であった (図 2)。

以上の結果から、NMS 処理によりプリオン感染神経細胞の細胞膜透過性が亢進するが、その反応は可逆的であり、細胞死は起こっていないことが示唆された。

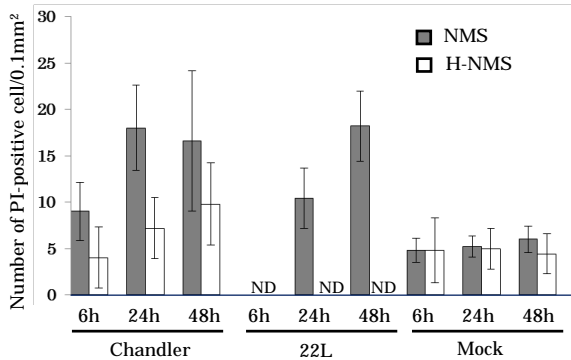


図 1. プリオン感染 16 日後の神経細胞を NMS、H-NMS 処理したときの細胞内への PI の取り込みの経時変化。Mock: 非感染対照。ND: not determined.

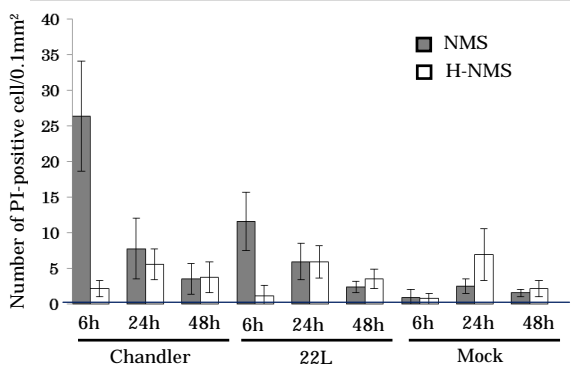
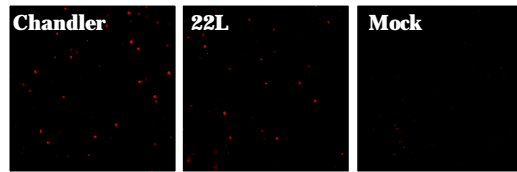


図 2. プリオン感染 24 日後の神経細胞を NMS、H-NMS 処理したときの細胞内への PI の取り込みの経時変化。Mock: 非感染対照。

NMS 処理



H-NMS 処理

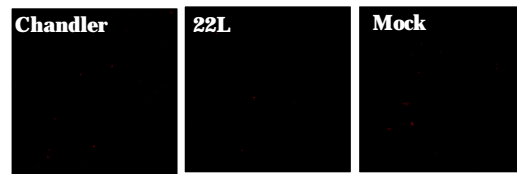


図 3. プリオン感染細胞を NMS、H-NMS 処理したときの細胞内への PI 取り込み。感染 24 日目。NMS および H-NMS 処理 6 時間後。

(2) NMS 処理によるプリオン感染神経細胞の膜透過性の亢進には、プリオン株により異なる補体因子が関与する

プリオン持続感染 N2a 細胞では補体反応により膜の不安定化が起こるが、この現象に関与する補体因子は Chandler 株では C1q、C3 および C9、22L 株では C3 とプリオン株により異なっていた。結果で観察された PI 取り込みの増加が補体因子により誘導されるか、また、N2a 細胞で観察されたプリオン株による補体反応の違いが初代培養神経細胞でも起こるかを検討するために、NMS を抗補体抗体で前処理し、PI 取り込みに与える影響を検討した。NMS または抗体で前処理した NMS を感染 24 日後の神経細胞に添加 6 時間に PI の取り込みを評価した (図 4)。Chandler 感染細胞では、抗 C1q、C3、C9 抗体およびこれらの抗体を混合して NMS の前処理を行ったときに、PI 陽性細胞数が有意に減少した。また、22L 株では前処理時に抗 C3 抗体が含まれるときに PI 陽性細胞数が有意に減少した。

以上の結果から、初代培養神経細胞に NMS を添加したときに起こる細胞膜透過性の亢進は補体反応により誘導されること、また、反応に関与する補体因子はプリオン株により異なることが示唆された。

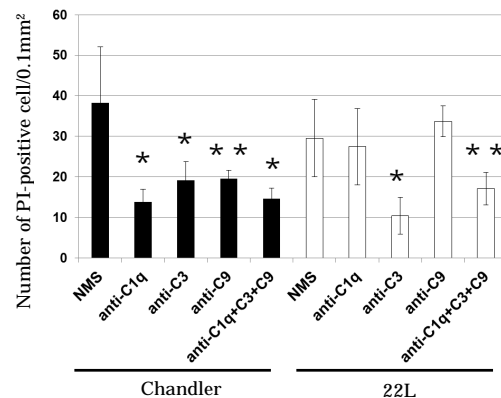


図 4. NMS の抗補体抗体前処理による PI 陽性

細胞数の変化. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ (student's t test)

(3) 補体反応による細胞膜透過性の亢進は、神経細胞における PrP^{Sc} 蓄積量を変化させる

プリオン感染 20 日目の神経細胞の培養液に NMS または H-NMS を添加し、8 および 16 日間培養後、PrP^{Sc} の蓄積量を評価した (図 5 & 6)。Chandler 感染細胞では、NMS 処理後 8 日目には H-NMS 処理細胞と比較して PrP^{Sc} 蓄積量が約 1/1000、16 日後では 1/3.3 であった (図 5)。22L 感染細胞では、NMS と H-NMS 処理細胞の間で PrP^{Sc} 量に差はなかった (図 6)。本実験で用いた大脳皮質由来神経細胞では、Chandler 株と比較して 22L 株の増殖が若干早いことから、PrP^{Sc} 量が補体反応に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、感染 12 日目の神経細胞の培養液に NMS または H-NMS を添加し、8 日間培養後、PrP^{Sc} の蓄積量を評価した (図 7 & 8)。興味深いことに、感染 20 日目とは逆に、Chandler 感染細胞では NMS と H-NMS 処理細胞の間では PrP^{Sc} 量に差がなかった (図 7)。さらに、22L 感染細胞では、NMS 処理により PrP^{Sc} 蓄積量が約 6 倍増加した (図 8)。

以上の結果から、プリオン感染初代培養神経細胞における補体反応は PrP^{Sc} 蓄積量に依存すること、プリオン株により PrP^{Sc} 蓄積量に与える影響が異なることが示唆された。今後は、Obihiro 株、BSE KUS 株など、異なるプリオン株でも補体反応と PrP^{Sc} 蓄積量の関係を解析し、補体反応制御によるプリオン病治療の可能性を検討していく。

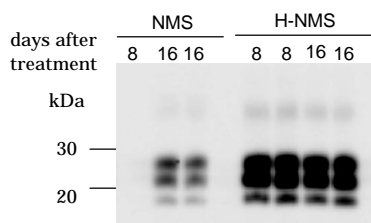


図 5. Chandler 株感染 20 日後の神経細胞を NMS、H-NMS 処理したときの PrP^{Sc} 蓄積量の変化。

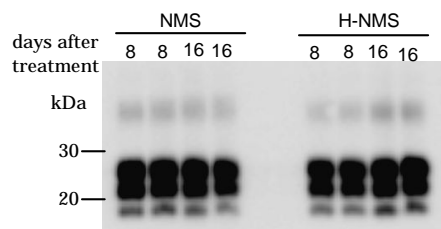


図 6. 22L 株感染 20 日後の神経細胞を NMS、H-NMS 処理したときの PrP^{Sc} 蓄積量の変化。

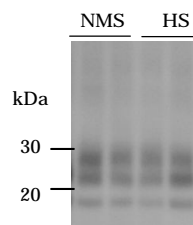


図 7. Chandler 株感染 12 日後の神経細胞を NMS、H-NMS 処理したときの PrP^{Sc} 蓄積量の変化

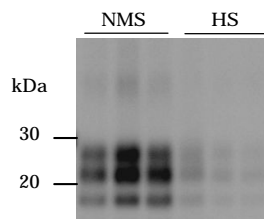


図 8. 22L 株感染 12 日後の神経細胞を NMS、H-NMS 処理したときの PrP^{Sc} 蓄積量の変化。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Yamasaki T, Baron GS, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrP(Sc) during early stage prion infection in Neuro2a cells. *Virology*. 2014. 450-451: 324-335. 査読有.
2. Hirano M, Yoshii K, Sakai M, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H. Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol*. 2014. 95: 849-861. 査読有.
3. Makino Y, Suzuki T, Hasebe R, Kumura T, Maeda A, Takahashi H, Sawa H. Establishment of tracking system for West Nile virus entry and evidence of microtubule involvement in particle transport. *J Virol Methods*. 2014. 195: 250-257. 査読有.
4. Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. *J Virol*. 2013. 87: 13433-13445. 査読有.
5. Ohsawa N, Song CH, Suzuki A, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Therapeutic effect of peripheral administration of an anti-prion protein antibody on mice infected with prions. *Microbiol Immunol*. 2013. 57: 288-297. 査読有.
6. Hasebe R, Raymond GJ, Horiuchi M, Caughey B. Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo.

- Virology. 2012. 423: 205-213. 査読有.
7. Yamasaki T, Suzuki A, Shimizu T, Watarai M, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of intracellular localization of PrP^{Sc} in prion-infected cells using monoclonal antibody that recognizes the region consisting of amino acids 119-127 of mouse PrP. J Gen Virol. 2012. 93: 668-680. 査読有.

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 堀内 基広, 蕪木 洋之, 長谷部 理絵, 山崎 剛士. プリオン感染マウスにおけるミクログリア活性化状態の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10-12 日. 神戸国際会議場 (兵庫県).
2. 藤原 愛, 長谷部 理絵, 山崎 剛士, 鈴木 章夫, 堀内 基広. 大脳皮質由来初代培養神経培養系におけるプリオン感染の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 11 月 10-12 日. 神戸国際会議場 (兵庫県).
3. Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. Expanding Prion Horizons 2013. 2013 年 10 月 16-18 日. Colorado State University (Colorado, USA).
4. 鈴木 章夫, 山崎 剛士, 長谷部 理絵, 堀内 基広. PrP^{Sc} 特異的検出抗体 mAb132 の抗原親和性に対する結合価数の影響. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 2013 年 9 月 20-22 日. 岐阜大学 (岐阜県).
5. 山崎 剛士, 鈴木 章夫, 長谷部 理絵, 堀内 基広. プリオン感染初期における異常型プリオンタンパク質の新規産生と細胞内動態. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 2013 年 9 月 20-22 日. 岐阜大学 (岐阜県).
6. Hasebe R, Kabuki H, Takahashi Y, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Distribution of PrP^{Sc} and microglial activation in brains of CD14 knockout mice infected with prions. Prion 2013. 2013 年 5 月 26-29 日. Fairmont Banff Springs (Alberta, Canada).
7. Horiuchi M, Kabuki H, Hasebe R. Analysis of microglial activation state in brains of prion-infected mice. Prion 2013. 2013 年 5 月 26-29 日. Fairmont Banff Springs (Alberta, Canada).
8. 長谷部 理絵, Byron Caughey, 堀内 基広. 補体反応はプリオン感染神経細胞の膜透過性を亢進させる. 第 155 回日本獣医学会学術集会. 2013 年 3 月 28-30 日. 東京大学駒場キャンパス (東京都).
9. 長谷部 理絵, 蕪木 洋之, 鈴木 章夫, 山崎 剛士, 堀内 基広. プリオン感染 CD14 ノックアウトマウスにおけるミクログリアの活性化と PrP^{Sc} の沈着の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月 12-15 日. 大阪国際会議場 (大阪府).
10. 鈴木 章夫, 山崎 剛士, 長谷部 理絵, 堀内 基広. 抗原への二価結合により付与される mAb132 の PrP^{Sc} 特異性. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 2012 年 11 月 12-15 日. 大阪国際会議場 (大阪府).
11. Hasebe R, Kabuki H, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Distribution of PrP^{Sc} and microglial activation in brains of CD14 knockout mice infected with prions. Asian Pacific Prion Symposium. 2012 年 7 月 29-30 日. パシフィコ横浜 (神奈川県).
12. Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Construction of mAb132-EGFP fusion proteins as a PrP^{Sc}-specific probe. Asian Pacific Prion Symposium. 2012 年 7 月 29-30 日. パシフィコ横浜 (神奈川県).
13. Hasebe R, Sakai K, Song CH, Horiuchi M. Involvement of CD14 in the early neuropathogenesis of prion disease. International Union of Microbiological Societies 2001 Congress. 2011 年 9 月 15 日. 札幌コンベンションセンター (北海道).
14. Sassa Y, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of prion infection in differentiated mouse neurospheres. International Union of Microbiological Societies 2001 Congress. 2011 年 9 月 15 日. 札幌コンベンションセンター (北海道).
15. Sassa Y, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Differentiated mouse neurospheres for analyses of neurodegeneration caused by prion infection. Asiposium. 2011 年 7 月 10-11 日. ホテルマロウド軽井沢 (長野県).
16. Nakamitsu S, Sassa Y, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Involvement of the endosomal Cl⁻/H⁺ antiporter Clc-5 in the formation of PrP-res in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Asian Pacific Prion Symposium. 2011 年 7 月 10-11 日. ホテルマロウド軽井沢 (長野県).
17. Takahashi Y, Song CH, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Immunohistochemical analysis of PrP^{Sc} accumulation and activation of astrocytes and microglia in early stage or prion-infection. Asian Pacific Prion Symposium. 2011 年 7 月 10-11 日. ホテルマロウド軽井沢 (長野県).
18. Hasebe R, Sakai K, Song CH, Horiuchi M. Involvement of CD14 in the early neuropathogenesis of prion disease. Prion 2011. 2011 年 5 月 17-19 日. Fairmont The Queen Elizabeth (ケベック, カナダ).
19. Sassa Y, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Characterization of Prion infection in differentiated mouse neurospheres. Prion 2011. 2011 年 5 月 17-19 日. Fairmont The Queen Elizabeth (ケベック, カナダ).

〔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: なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長谷部 理絵 (HASEBE, Rie)

北海道大学・大学院獣医学研究科・講師

研究者番号: 70431335

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし