

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780294

研究課題名(和文)プリオン病の病態機序におけるアストロサイトの役割に関する研究

研究課題名(英文)The role of astrocytes on the pathogenesis of prion diseases

研究代表者

佐々 悠木子(SASSA, YUKIKO)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20582464

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)：プリオン病は、中枢神経系における異常型プリオンタンパク質の蓄積、神経細胞の変性、アストロサイトおよびミクログリアの増生を特徴とする。プリオン感染動物では臨床症状が発現する以前から、脳内でアストロサイトが活性化することが知られている。このアストロサイトの活性化が神経細胞に対して保護と傷害のいずれの作用を示すかを解き明かすことは、プリオン病の病態機序解明へとつながる。そこで、アストロサイトに注目し、異常型プリオンタンパク質のアストロサイトにおける動態を検索した。その結果、異常型プリオンタンパク質はアストロサイトにおいて主にリソソームに存在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of abnormal prion protein, degeneration of neurons, astrogliosis and microglial activation are characteristics of prion diseases. By assessing prion-infected mouse brains, astrocyte activation tend to appear earlier than microbial activation. To analyze the effects of activated astrocytes on neurons are important for understanding the pathogenesis of prion diseases. Then, the astrocytes are focused, especially the localization of abnormal prion protein in astrocytes were analyzed. As a result, the abnormal prion protein were mainly found to be in lysosome in astrocytes.

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：中枢神経系疾患

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、中枢神経系における異常型プリオンタンパク質の蓄積、神経細胞の変性、アストロサイトおよびミクログリアの増生を特徴とする、致死性の神経変性疾患であり、有効な治療法は無い。プリオン病の病原体はプリオンと呼ばれ、宿主が生来保有する正常型プリオン蛋白質(PrP^C)が構造変換して生じる異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})で構成されている。プリオンの感染性はPrP^{Sc}にあるが、脳でのPrP^{Sc}の蓄積から神経細胞の変性に至るまでの機構は明らかになっていない。現在までのところ、プリオン病の治療には、PrP^{Sc}の産生を阻害する治療法が一定の効果を上げている(Doh-ura K, 2004; Song CH, 2008)が、劇的な改善をもたらすものではない。プリオン病の効果的な治療法の開発には、プリオン病での神経変性機構の全体像を明らかにし、治療法の標的となるプロセスに参与する細胞および分子群を知る必要がある。

プリオン感染動物では臨床症状が発現する以前から、脳内でアストロサイトが活性化することが知られている。アストロサイトは、「支持細胞」として、血液脳関門の形成、神経伝達物質(グルタミン酸など)の取り込み処理、神経細胞への栄養供給(L-セリンやピルビン酸)、神経栄養因子の供給など、脳機能の維持管理に重要な役割を果たしていることが知られている。プリオン病において早期よりアストロサイトが活性化し、病末期にかけて顕著に増生することは明らかになったものの、アストロサイトの活性化や増生が神経細胞に保護的に作用するのか、あるいは傷害的に作用するかは明らかになっていない。アストロサイトが活性化することにより、神経栄養因子の供給が亢進したり、アストロサイトの増生により、神経細胞に足場を提供したり、神経細胞に対して保護的に作用する可能性が考えられる。一方で、アストロサイトの過剰な活性化は神経細胞に害となる可能性が、アルツハイマー病などの多くの神経変性疾患および加齢性変化で強く示唆されている(Johnstone M, 1999; Wang P, 2008)。プリオン病においても、アストロサイトが活性化したために、サイトカインやケモカインなどの分泌が亢進し、神経細胞に悪影響をおよぼす可能性が考えられる。プリオン病で認められるアストロサイトの活性化が、神経細胞に対して保護と傷害のいずれの作用を示すかを解き明かすことが、プリオン病の病態機序解明の「鍵」となると考えられる。

2. 研究の目的

プリオン病では、アストロサイトがミクログリアよりも早期から活性化することから、アストロサイトがプリオン病の病態機序に積極的に参与する可能性が考えられる。プリオン病でのアストロサイトの活性化が神経細胞

に与える影響を解析し、プリオン病の病態機序にアストロサイトが果たす役割を明らかにするために、

- (1) アストロサイトにおける PrP^{Sc} の動態を明らかにする。
- (2) 今後の *in vitro* での解析に必要な、初代培養の神経細胞の純培養の手法について検討する。

3. 研究の方法

- (1) マウス胎子由来のニューロスフェアモデルにプリオンを感染させ、間接蛍光抗体法にて多重染色することで、GFAP陽性のアストロサイトにおいて、どの細胞内小器官と共局在を示すかを検討する。プリオンの株は、マウス馴化スクレイピーである帯広株、チャンドラー株、22L株、およびマウス馴化牛海綿状脳症であるKUS株を用いた。細胞内小器官のマーカーとして、ERCマーカーのRab11a、後期エンドソームマーカーのRab7およびRab9、前期エンドソームマーカーのRab5、ゴルジマーカーのTgn38およびGiantin、リサイクルおよび後期エンドソームとゴルジ複合体のマーカーであるFlotillin、前期エンドソームからリソソームまでのマーカーであるLamp1とCathepsinDを用いた。

- (2) 神経細胞の純培養系の検討

材料となる動物：マウス胎子と新生子を検討する。

培養用培地：Neurobasal, NeurobasalA, DMEM/F12およびB27やN2 supplementなどの添加物について検討する。

精製方法：グリア細胞の混入を防ぐための神経細胞の精製方法として、密度勾配遠心、パンディング、細胞分裂阻害剤添加の方法を検討する。

4. 研究成果

- (1) PrP^{Sc}はFlotillin、CathepsinDおよびLamp1と主に共局在しており、Tgn38およびGiantinとは共局在を示さず、Rab5aとRab11aとはいくらか共局在を示した。これらより、PrP^{Sc}はアストロサイトにおいて主にリソソームに存在することが明らかになった。
- (2) マウス新生子を用いて、NeurobasalA にB27を添加し、神経細胞をパンディング法で回収した場合に、神経細胞へのダメージが少なく、グリアの混入も少ないことが分かった。しかしながら、少数ではあるが、アストロサイトの混入は避けられなかった。アストロサイトの突起は神経細胞の突起に寄り添うように存在し、アストロサイトに寄り添われた神経細胞はそうでない神経細胞と比較して形態が美しく保持されており、特に長期間の培養において顕著にその傾向がみとめられた。わずかではあるが、アストロサイトが混入することで、神経細胞の状態の評

価が混乱するため、神経細胞の純培養のさらなる技術的な改善が必要であることが明らかになった。

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 5 件)

- 1) Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T.: Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol*, doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.009, 2014, 査読有
- 2) Omatsu T, Tsuchiaka S, Hirata T, Shiroma Y, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Furuya T, Nagai M, Ochiai H, Tamaki S, Mizutani T. Detection of enterovirus genome sequence from diarrheal feces of goat. *Virus Genes*, 48 (3):550-552, 2014, 査読有
- 3) Furuya T, Sassa Y, Omatsu T, Nagai M, Fukushima R, Shibutani M, Yamaguchi T, Uematsu Y, Shirota K, Mizutani T. Existence of feline morbillivirus infection in Japanese cat populations. *Arch Virol.*, 159 (2), 371-3, 2014, 査読有
- 4) Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T. Detection of bovine group a rotavirus using rapid antigen detection kits, rt-PCR and next-generation DNA sequencing. *J Vet Med Sci*, 75 (12): 161-5, 2013, 査読有
- 5) Sassa Y, Horie M, Fujino K, Nishiura N, Okazaki S, Furuya T, Nagai M, Omatsu T, Kojima A, Mizugami M, Ueda K, Iki H, Ebisawa K, Tomonaga K, Mizutani T.: Molecular epidemiology of avian bornavirus from pet birds in Japan.: *Virus Genes.*: 47 (1): 173-7: 2013, 査読有

[学会発表](計 10 件)

- 1) Sassa Y, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. A decreased expression of pre-synaptic markers in neurons in differentiated neurospheres infected with BSE-derived prion strain. Prion 2012 conference, *アムステルダム, オランダ*, 2012

- 2) 濱田雄行, 高木香津子, 佐々悠木子, 伊藤博, 那波明宏, オンコリティックアデノウイルス感染キャリアー細胞による癌遺伝子治療の安全性試験, 第66回日本産婦人科学会総会, 東京都千代田区, 東京国際フォーラム, 2014年4月18日-20日
- 3) 佐々悠木子, 堀江真行, 鈴木研太, 加藤真樹, 香川紘子, 鈴木和彦, 渋谷淳, Chanathip Thammakarn, 竹原一明, 古谷哲也, 長井誠, 大松勉, 朝長啓造, 岡ノ谷一夫, 水谷哲也, 日本のジュウシマツ由来の新しい遺伝子型のトリボルナウイルスの解析, 第7回日本ボルナウイルス研究会, 京都市左京区, 京都大学ウイルス研究所セミナー室, 日本, 2014
- 4) 佐々悠木子, Uong Bui Nghia, 大場真巳, 古谷哲也, 長井誠, 大松勉, 今井邦俊, 小川晴子, 水谷哲也, 北海道の野鳥におけるボルナウイルスの浸潤状況, 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市, 日本, 2013
- 5) 古谷哲也, 佐々悠木子, 大松勉, 長井誠, 福島隆治, 渋谷淳, 山口智宏, 植松洋介, 依田欣二, 日本におけるネコモルビリウイルスの検出, 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市, 岐阜大学, 日本, 2013
- 6) 古谷哲也, 佐々悠木子, 大松勉, 長井誠, 福島隆治, 渋谷淳, 山口智宏, 植松洋介, 依田欣二, 日本におけるネコモルビリウイルスの検出, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 神戸国際会議場, 日本, 2013
- 7) 大松勉, 酒井宏治, 前田健, 片山幸枝, 荻原克郎, 下田宙, 鈴木和夫, 遠藤大二, 永田典代, 佐々悠木子, 長井誠, 古谷哲也, 森川茂, 水谷哲也, 野生イノシシから分離された新規ラプトウイルスの系統解析, 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市, 日本, 2013
- 8) 土赤忍, 大松勉, 平田哲兵, 城間康, 片山幸枝, 大場真巳, 佐々悠木子, 長井誠, 古谷哲也, 玉城史朗, 水谷哲也, ヤギの下痢便から検出された新規エンテロウイルスの次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析, 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜市, 日本, 2013
- 9) 鈴木基史, 佐々悠木子, 鈴木和彦, 成田洋平, 荒木洋一, 濱田雄行, 小林正行, 岸本海織, 高島一昭, 山根義久, 水谷哲也, 伊藤博, 犬のがん遺伝子治療におけるオンコリティックアデノウイルス感染キャリアー細胞の体内動態, 第33回動物臨床医学会年次大会, 大阪府大阪市, 大阪国際会議場, 2012年11月16日-18日
- 10) 佐々悠木子, 岡崎祥子, 堀江真行, 水谷哲也, 藤野寛, 古谷哲也, 長井誠, 小嶋篤史, 水上昌也, 上田謙吾, 海老沢和荘, 伊木治子, 朝長啓造, 日本の愛玩鳥におけるトリボルナウイルスの浸潤状況, 第154回日本獣医学会学術集会, 盛岡市,

2012

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々 悠木子 (SASSA, Yukiko)
東京農工大学・農学研究院・助教
研究者番号：20582464

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：