

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670121

研究課題名(和文) 過剰免疫反応による精神疾患発症機構のリアルタイムイメージング解析

研究課題名(英文) Real-time imaging of the mechanism underlying neuroinflammation-induced neuropsychiatric disorders

研究代表者

山田 清文 (Yamada, Kiyofumi)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30303639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、インターフェロン誘導性膜タンパク質interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) が周産期の自然免疫応答誘発性の神経発達障害に関与していることを明らかにしている。本研究では、IFITM3の新規結合タンパク質としてRabGDIを同定した。さらにIFITM3を過剰発現させると細胞内小胞サイズが大きくなり、IFITM3はRabGDIとの相互作用により、Rab5を活性化して小胞の融合とmulti-vesicular body (MVB)の形成を促進することが示唆された。

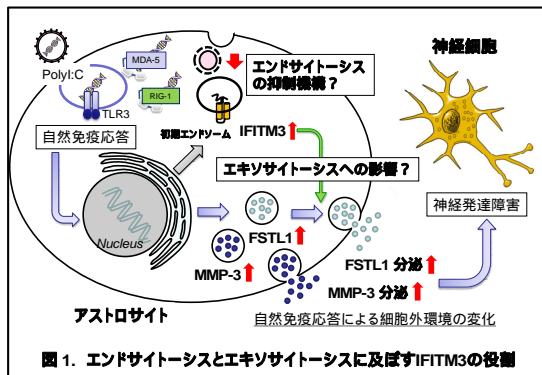
研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) in astrocytes plays a crucial role in neurodevelopmental impairment in polyIC-treated mouse model of perinatal neuroinflammation. In this study, RabGDI was identified as a novel binding protein of IFITM3. Furthermore, we observed that overexpression of IFITM3 in COS7 cells resulted in an increase in the size of intracellular vesicles, probably due to an increase in Rab5 activity through the interaction with RabGDI. These findings suggest that IFITM3 facilitates the formation of multi-vesicular body (MVB), by regulating Rab5 activity through the interaction with RabGDI.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：IFITM3 アストロサイト RabGDI Fstl1 神経発達障害

### 1. 研究開始当初の背景

インターフェロン治療中患者は大うつ病性障害発症のリスクが高いことが知られており、過剰免疫反応は精神疾患発症の一因である。したがって、過剰免疫反応による精神疾患発症機構を明らかにすることは、精神疾患の病態解明および新規治療薬の開発に極めて重要である。IFITM3 はインターフェロン誘導性の分子として同定された膜タンパク質であり、宿主細胞がウイルス感染を抑制するために一過性に発現誘導される。死後脳を用いた研究により、統合失調症や自閉症などの神経発達障害患者の脳では IFITM3 の発現が上昇していることが示されており、IFITM3 を標的とする抗精神病薬の開発も提唱されている (Biol Psychiatry 2013)。これまでに我々は、IFITM3 が周産期の自然免疫応答誘発性の神経発達障害に関与していることを明らかにしている。また、IFITM3 の発現により影響を受けるグリア因子を網羅的に解析した結果、候補分子として Follistatin-like 1 (Fst11) の同定に成功している (図 1: Ibi et al., Neurosci Res 2009; Glia 2013)。しかし、精神疾患における IFITM3 および Fst11 の役割はほとんど解っていない。



### 2. 研究の目的

IFITM3 が過剰免疫反応による精神疾患発症に関与する可能性は極めて高く、従って中枢神経系における IFITM3 の機能を解明することで過剰免疫反応による精神疾患発症のメカニズムの全容が明らかになることが考えられた。本研究では、リアルタイムイメージング技術を用いて IFITM3 の中枢神経系における機能を解明する。

### 3. 研究の方法

本研究では過剰免疫反応による精神疾患発症の分子メカニズムを解明するために、IFITM3 と Fst11 の機能および分子動態に焦点を絞って検討を進める。

(1) IFITM3 によるエンドサイトーシス制御機構の解明

エンドサイトーシスは様々な分子が時間空間的に複合体を形成することで達成される。IFITM3 も同様に直接または間接的にエンドサイトーシスに関与する分子に結合している可能性が高い。本研究では、生化学的

法と LC-MS/MS を組み合わせたプロテオーム解析により新規 IFITM3 結合タンパク質の同定を試みた。新生仔マウスを生後 2 日目から 5 日間 polyI:C (5mg/kg) を連続投与し、最終投与 2 4 時間後にマウスから脳を取り出し、tritonX-100 を含むバッファーを用いて脳抽出液を作成した。得られた脳抽出液を IFITM3 を認識する抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈物を脱塩・濃縮し、トリプシン消化した後、LC-MS/MS により網羅的に解析した。同定された IFITM3 結合タンパク質と IFITM3 との結合部位を検討するために種々の point mutant を site-directed mutagenesis kit を用いた PCR 法により作製し、免疫沈降法や GST pull-down assay によりタンパク質間相互作用を評価した。細胞内局在については、COS7 細胞および初代培養アストロサイトをj用いて免疫染色法により評価した。初代培養アストロサイトをj用いて内在性の IFITM3 の局在を評価する場合、細胞を固定する 2 4 時間前に polyI:C (10μg/mL) で細胞を処置した。細胞内輸送系の分子動態は初期エンドソームのマーカー分子のひとつである Rab5 と GFP の融合蛋白質 (GFP-Rab5) を発現させ、リアルタイムイメージングを行った。IFITM3 による細胞内輸送系の変化は生化学的手法、共焦点顕微鏡および TIRF 顕微鏡を用いたリアルタイムイメージングにより検討した。

(2) IFITM3 の Fst11 分泌増加メカニズムの解明

IFITM3 発現上昇による培養上清中の Fst11 の分泌について検討する。COS7 細胞に IFITM3 および Fst11 を強制発現させたのち、培養上清を回収し、TCA 沈殿により培養上清中のタンパク質を回収した。培養上清中の Fst11 量はウエスタンブロットにより解析した。Fst11 の細胞内挙動を解析するためのツールとして、Fst11 と GFP または SEP の融合蛋白質を発現するためのコンストラクトの作製を行った。

### 4. 研究成果

平成 26 年度には、新規 IFITM3 結合蛋白質の網羅的解析を行った。Poly I:C 投与したマウスの脳抽出液を抗 IFITM3 抗体により免疫沈降し、共沈したタンパク質を LC-MS/MS により解析した結果、新規 IFITM3 結合タンパク質の候補タンパク質として RabGTPase dissociation inhibitor (RabGDI) を同定した。さらに、プロテオミック解析の結果の妥当性を検証するため、IFITM3 と RabGDI の結合を GST pull down assay により確認したところ、IFITM3 と RabGDI の結合が認められた。IFITM3 は RabGDI の α および β の両アイソフォームと結合することが明らかになった (図 2)。IFITM3 はリン酸化やユビキチン化、パルミチン酸化などの翻訳後修飾を受けることが知られている (Chesarino et al, Future Microbiol 2014)。IFITM3 の翻訳後修飾が RabGDI との結合やエンドサイトーシスに影

響するか否かを検討するため、IFITM3の変異体(非リン酸化、非パルミトイル化)を作成し、pull-down assayによりRabGDIとの結合について予備的検討を行ったところ、IFITM3の非リン酸化変異体および非パルミチン酸化変異体とRabGDIとの結合は野生型と比べて明らかな違いは認められなかった。また、イメージングの準備として蛍光タンパク質とFstI1の融合タンパク質を発現するプラス

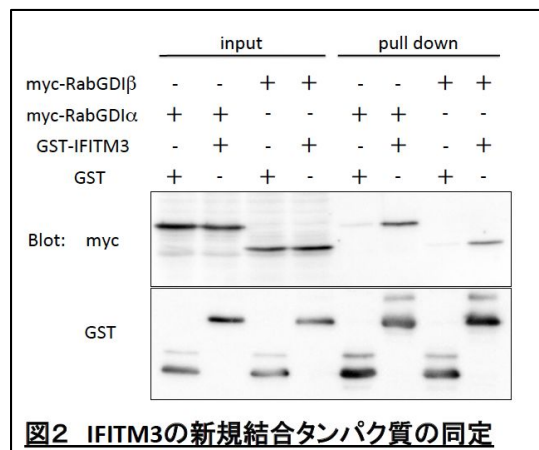


図2 IFITM3の新規結合タンパク質の同定

ミドを作製し、細胞内での発現を確認した。

平成 27 年度には、エンドサイトーシスにおける IFITM3 と RabGDI の相互作用の役割を解明するための実験を行った。IFITM3 と RabGDI のアストロサイトにおける細胞内局在について検討した結果、内在性の IFITM3 と RabGDI は一部共局在していた。次に、IFITM3 は特定のベシクル(初期エンドソーム、後期エンドソーム)に局在することが知られているため、IFITM3 と共局在する RabGTPase について検討した。COS7 細胞に強制発現させた IFITM3 は Rab5 および Rab7 と一部共局在することが確認できた。一方、IFITM3 と Rab3 の明らかな共局在は認められなかった。また、予備的検討から IFITM3 を COS7 細胞に強制発現させると初期エンドソームのマーカーである EEA1 positive なベシクルのサイズが増大する傾向が認められた。これらの結果から、IFITM3 は RabGDI との結合を介して、Rab5 および Rab7 の活性を制御する可能性が考えられた。IFITM3 の発現による細胞内輸送系の変化を解析するために、COS7 細胞に IFITM3 および GFP-Rab5 を発現させ、GFP-Rab5 の細胞内挙動を経時的に観察した。IFITM3 の発現により GFP-Rab5 を含むベシクルのサイズが増大する傾向が認められた。現在、再現性の確認およびベシクルの輸送速度や距離などの解析を進めている。

PolyI:C 依存的なエンドサイトーシスにおける RabGDI の機能を解析するために siRNA による RabGDI のノックダウンおよびゲノム編集技術による RabGDI のノックアウトを試みたが、十分な RabGDI の発現抑制を得るに至っていない。

IFITM3 による培養上清中の FstI1 の分泌量の変化について、これまでの結果と同様に

IFITM3 の発現により培養上清中の FstI1 量が増加する傾向が認められたが、前述の通り RabGDI のノックダウン系が確立できていないために研究期間内に IFITM3 と RabGDI の結合による FstI1 分泌量の変化を十分に評価することはできなかった。

以上、本研究において IFITM3 の新規結合タンパク質として RabGDI を同定した。さらに IFITM3 を過剰発現させると細胞内小胞サイズが大きくなり、IFITM3 は RabGDI との相互作用により、Rab5 を活性化して小胞の融合と multi-vesicular body (MVB) の形成を促進することが示唆された。

#### <引用文献>

Horváth S, Mirnics K. Immune system disturbances in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 75:316-23, 2014.

Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Mizoguchi H, Koike H, Shiraki A, Takuma K, Kamei H, Noda N, Nitta A, Nabeshima T, Yoneda Y and Yamada K: Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci. Res.* 64:297-305, 2009.

Ibi D, Nagai T, Nakajima A, Mizoguchi H, Kawase T, Tsuboi D, Kano S, Sato Y, Hayakawa M, Lange UC, Adams DJ, Surani MA, Satoh T, Sawa A, Kaibuchi K, Nabeshima T and Yamada K: Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *Glia* 61:679-693, 2013.

Chesarino NM, McMichael TM, and Yount JS: Regulation of the trafficking and antiviral activity of IFITM3 by post-translational modifications. *Future Microbiol* 10:1151-1163, 2014.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

Itoh N, Enomoto A, Nagai T, Takahashi M, Yamada K: Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory: The role of Girdin in the CNS. *Rev Neurosci.*, 査読有, 2016, in press.  
DOI: 10.1515/revneuro-2015-0072.

Aoyama Y, Toriumi K, Mouri A, Hattori T, Ueda E, Shimato A, Sakakibara N, Soh Y, Mamiya T, Nagai T, Kim HC, Hiramatsu M, Nabeshima T, Yamada K: Prenatal nicotine exposure impairs the proliferation of neuronal progenitors,

leading to fewer glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 査読有, 41, 2016, 578-589  
DOI: 10.1038/npp.2015.186

Nakajima A, Aoyama Y, Shin, EJ, Nam Y, Kim HC, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Yokoi, T, Ohizumi Y, Yamada K: Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and reduces soluble  $\beta$  levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). *Behav. Brain Res.*, 査読有, 289, 2015, 69-77  
DOI:10.1016/j.bbr.2015.04.028

Ibi D, Yamada K: Therapeutic targets for neurodevelopmental disorders emerging from animal models with perinatal immune activation. *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, 16, 2015, 1-12  
DOI:10.3390/ijms161226092

Nakai T, Nagai T, Wang R, Yamada S, Kuroda K, Kaibuchi K, Yamada K: Alterations of GABAergic and dopaminergic system in mutant mice with disruption of exons 2 and 3 of the *Disc1* gene. *Neurochem. Int.*, 査読有, 74, 2014, 74-83  
DOI:10.1016/j.neuint.2014.06.009

Nakajima A, Ibi D, Nagai T, Yamada S, Nabeshima T, Yamada K: Induction of interferon-induced transmembrane protein 3 gene expression by lipopolysaccharide in astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 査読有, 745, 2014, 166-175  
DOI:10.1016/j.ejphar.2014.08.034

Nakai T, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Asai N, Enomoto A, Asai M, Yamada S, Saifullah MAB, Sokabe M, Takahashi M, and Yamada K: Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. *J. Neurosci.*, 査読有, 34, 2014, 14995-15008  
DOI:10.1523/JNEUROSCI.2228-14.2014

[学会発表](計 5件)

伊藤教道、永井拓、中島晶、衣斐大祐、山田清文: IFITM3 による細胞内輸送系の制御機構、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日～11 日、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜

永井拓、中井剛、田中基樹、浅井直也、榎本篤、曾我部正博、高橋雅英、山田清文: リン酸化 Girdin は NMDA 受容体を介して神経可塑性を制御する、第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会、2014 年 11 月 20 日～22 日、愛知県名古屋市、名古屋国際会議場

永井拓、山田真之亮、山田清文: マトリックスメタロプロテアーゼは polyI:C 誘発性自然免疫活性化により惹起される神経発達障害を仲介する、第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2014 年 11 月 15 日～16 日、熊本県熊本市、熊本大学

伊藤教道、渡辺崇、永井拓、貝淵弘三、山田清文: IQGAP1 の神経細胞における機能解析、第 126 回日本薬理学会近畿部会、2014 年 10 月 24 日、和歌山県和歌山市、和歌山県 J R ビル

永井拓、山田真之亮、山田清文: Matrix metalloproteinase-3 と polyI:C 誘発性自然免疫活性化により惹起される神経発達障害、第 37 回日本神経科学学会、2014 年 9 月 11 日～13 日、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科 医療薬学・附属病院薬剤部

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/pharmacy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 清文 (YAMADA, Kiyofumi)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 30303639

(2) 研究分担者

なし

(2) 連携研究者

伊藤教道 (ITO, Norimichi)

名古屋大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号: 30726310