

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23248050

研究課題名(和文) ミクログリアの機能変化とプリオン病神経病態の関係の解明

研究課題名(英文) Role of functional change of microglia in neuropathogenesis of prion diseases

研究代表者

堀内 基広 (HORIUCHI, Motohiro)

北海道大学・(連合) 獣医学研究科・教授

研究者番号：30219216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々が確立した異常型プリオンタンパク質の特異染色を用いて、アストロサイトがプリオンの増殖あるいはプリオンの増殖により生じる神経細胞の微細な変化を認識し、その後ミクログリアが活性化するという感染初期における神経病態の一端を明らかにした。ミクログリアの遺伝子発現解析から、ミクログリアはプリオン感染早期では病気の進行に抑制的に働くが、感染の進行とともに炎症促進性の活性化状態にシフトすることを明らかにした。また、抗炎症性サイトカインは脳におけるプリオンの増殖を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established PrPSc-specific staining method and using this method we elucidated a part of neuropathophysiology in the early stage of prion infection; astrocytes recognize prion propagation directly or subtle changes in neurons by prion propagation and astrocyte activation precedes over microglial activation. Gene expression analysis of microglia in prion-infected mice showed that microglia play a neuroprotective role by secreting neurotrophic factors at the early stage of prion infection in the early stage of prion infection, but the microglial activation state shifts to pro-inflammatory or neurotoxic state along with the progression of prion disease. Furthermore, anti-inflammatory cytokines such as IL-10 interfere the propagation of prions in brain.

研究分野：獣医衛生学

キーワード：プリオン病 ミクログリア 自然免疫 アストロサイト 抗炎症性サイトカイン 磁気細胞分離法 IL10 CD14

1. 研究開始当初の背景

羊のスクレイピーおよびヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) に代表されるプリオン病は、致死性の神経変性疾患である。現在まで有効な治療法はなく、その確立が希求されている。これまでプリオン病の治療法開発に関する研究は、プリオンの増殖阻害を標的として進められてきたが、機能的な回復には及ばない効果しか得られていない。有効な治療法を確立するためには、プリオン病における神経変性機構を含む病態機序を理解する必要がある。

我々は、プリオン病の神経病変形成機構を知る目的で、プリオン感染マウスの脳局所における遺伝子発現を経時的に解析してきた。その結果、ミクログリアで発現する Aif1, CCL9, CD14, CD68 などが感染後早期から発現が上昇することを見出した。ミクログリアの活性化は、プリオン病、アルツハイマー病などの神経変性疾患の特徴の一つである。しかし、神経変性疾患におけるミクログリアの活性化は、その活性化状態により、病気に対して保護的に機能したり、病気を増悪させる方向に働く、「諸刃の剣」である (Hickman et al, J Neurosci, 2008)。

マクロファージと同様に、ミクログリアが産生する分子群のプロファイルにより、ミクログリアの活性化状態を IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインの刺激に制御される M1-type、抗炎症性サイトカインである IL-4 に対する応答の M2-type に分類することも提案されている (Morgan et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2005)。しかし、分類のためには、プロファイリングの精度の向上、および新規マーカーの同定が必要である。また、プロファイルとミクログリア機能の関連を明確にする必要がある。ミクログリアの活性化状態は、病気の進行の最初から最後まで一定ではなく、病態進行の過程で変化すること、また、異なる機能を有するミクログリアが混在することも予想される。従って、病気の進行に伴うミクログリアの活性化状態およびその変化を知ることは、プリオン病の神経病態を理解する上で重要である。

2. 研究の目的

ミクログリアは神経組織で神経細胞の活性の監視、異物除去、自然免疫の調節などに関わる多機能細胞である。ミクログリアの増生はプリオン病の神経病変の特徴の一つであり、ミクログリアの活性化はプリオン病の病態の進行に関与すると考えられるが、その作用はほとんど判っていない。プリオン病の治療法は未だ確立されておらず、プリオンの増殖阻害を標的とする戦略だけでは有効な治療法は望めない。有効な治療法の開発のため、今一度、病態機序の解明に取り組み、治

療標的を明らかにする必要がある。そこで本研究では、プリオンの増殖に対するミクログリアの反応、ミクログリアで発現する分子群、およびミクログリアの機能を詳細に解析して、プリオン病の神経病態とミクログリアの関係を明らかにすることを目的とする。

プリオンの増殖に対するミクログリアの反応、プリオン病の神経病態の進行に伴うミクログリアの活性化状態の変化を知ることは、病態機序を解明する上で重要である。

そこで本研究では、

- ① PrP^{Sc} の蓄積がプリオン感染後早期から起こる脳局所で、PrP^{Sc} の蓄積が起こる細胞と PrP^{Sc} の細胞内局在を明らかにする。
- ② PrP^{Sc} の蓄積がプリオン感染後早期から起こる脳局所で、PrP^{Sc} の蓄積、ミクログリアおよびアストロサイトの反応の時間的、空間的变化を明らかにする。
- ③ プリオンの増殖に反応して活性化するミクログリアにおける遺伝子および蛋白発現を経時的に解析してプロファイル化する。
- ④ ミクログリアの機能を経時的に解析して、その時点における遺伝子および蛋白発現プロファイルと対応させ、ミクログリアの機能との関連が明確なプロファイリング法を提案する。

これら通じて、プリオン病の神経病態におけるミクログリアの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プリオン感染マウスの脳内における PrP^{Sc} 蓄積部位、ミクログリア、アストロサイトの時間的、空間的解析

抗 PrP 抗体 mAb132 を用いる PrP^{Sc} 特異的染色法を確立したことで、凍結組織切片上で PrP^{Sc} と他のマーカー分子の蛍光多重染色が可能となり、形態学的な情報の収集精度が向上した。この方法では、プリオン接種後 30 日目から視床外側および延髄で PrP^{Sc} の増殖を検出できる。そこで、感染早期を中心に、PrP^{Sc} の蓄積、細胞内局在、およびミクログリアとアストロサイトの反応を調べる。

(2) ミクログリアの遺伝子発現の解析

プリオン感染マウスの脳組織を酵素処理し、Percoll 密度勾配遠心により、単核細胞を回収する。ミクログリアの表面マーカーとなる CD11b, CD45 に対する抗体を用いて、免疫磁気細胞分離法によりミクログリアを分離する。

回収したミクログリアから total RNA を抽出し、M1/M2-type マクロファージのマーカーとして使用される遺伝子の発現を、TaqMan assay による RT-PCR により解析する。

定量 RT-PCR の実施と並行して、より多く

の遺伝子を解析するために、Affymetrix Gene Chip Mouse Exon ST Array、あるいは次世代シーケンサーを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施する。

(3) ミクログリアにおける遺伝子産物発現の免疫組織化学的解析

プリオン感染マウスの脳を経時的に採材して、延髄前庭核および視床背外側を含む冠状断の凍結切片を作製し、ミクログリアマーカー分子と、ケモカイン・サイトカイン、あるいは神経細胞とのクロストークに重要な役割を果たす分子など、ミクログリアの機能と直接的な関連が示唆されている分子の免疫多重染色を行い、遺伝子発現解析の結果を検証する。

(4) ミクログリアの機能解析

プリオン感染マウスの脳から経時的に分離したミクログリアを用いて、神経保護・傷害作用、異物貪食能、活性酸素種の産生能を解析する。

4. 研究成果

(1) プリオン感染マウスの脳内における PrP^{Sc} 蓄積部位、ミクログリア、アストロサイトの時間的、空間的解析

プリオン接種後早期から PrP^{Sc} が検出される脳の部位を調べたところ、Chandler 株感染マウスでは、プリオン接種後 30 日から延髄で PrP^{Sc} が検出され始め、視床では接種後 45 日から検出され始めた。PrP^{Sc} と細胞マーカー分子との蛍光二重染色により、感染後早期に検出される PrP^{Sc} の大部分が、前シナプス領域のマーカー分子である Synaptophysin 陽性となる領域の近傍に位置することが判明した。Chandler 株感染マウスの視床では、接種後 45 日に GFAP 陽性アストロサイトの増生を認め始め、その後 Iba-1 陽性の活性化ミクログリアが検出されるようになった。凍結連続切片の蛍光免疫染色とタイルスキャン画像取得による、広範囲かつ高倍率の画像取得により、アストロサイトの活性化がミクログリアの活性化よりも先に起こることは、感染後早期から実際に PrP^{Sc} が存在する局所でも確認できた。これらの結果から、アストロサイトがプリオンの増殖あるいはプリオンの増殖により生じる神経細胞の微細な変化を認識し、その後ミクログリアが活性化するという感染初期における神経病態の一端が明らかとなった。

(2) ミクログリアの遺伝子発現の解析

脳組織から酵素消化、密度勾配遠心、および磁気細胞分離を組み合わせ、Cd11b 陽性ミクログリアを 4 時間程度で分離する方法を確

立した。プリオン感染マウスの脳組織から CD11b 陽性ミクログリアを経時的に分離し、遺伝子発現解析を行った。プリオン感染マウス由来ミクログリアでは、感染初期の接種後 60 日では、NGF および BDNF など神経栄養因子の発現上昇が見られ、接種後 90 日では、プリオン病の病気の進行に抑制的に働くことが示唆されている CXCL10 の発現が一過性に上昇した。一方で、感染の進行に伴い、特に接種後 90 日以降、TNF- α 、IL-12p40 および IL-1 β などの炎症性サイトカインの遺伝子発現の上昇が顕著となり、炎症抑制性の M2 マクロファージでの発現上昇が知られる YM-1、MRC-1、FIZZ-1 および CD163 の遺伝子発現は低下した (図 1)。これらの結果から、ミクログリアは、プリオン感染の初期においては神経栄養因子などの分泌により神経保護的に機能するが、感染の進行とともに炎症促進性の活性化状態にシフトすることが示唆された。

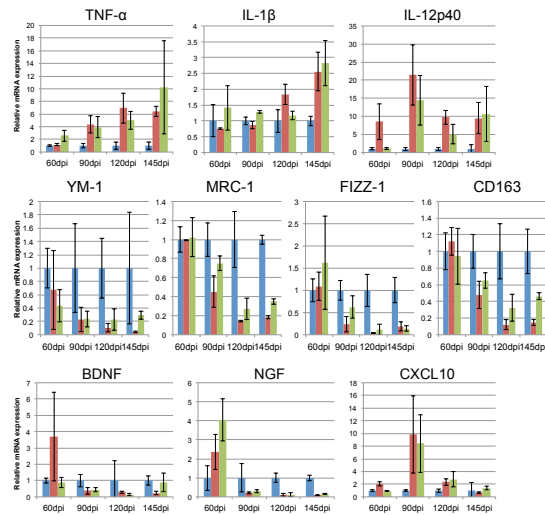


図 1. プリオン感染マウス由来ミクログリアにおける、サイトカイン、M2 タイプマクロファージマーカー、神経栄養因子等の遺伝子発現の変化。

プリオン Chandler 株、Obihiro 株およびプリオン非感染脳乳剤接種後 60 日、90 日、120 日、145 日にそれぞれ CD11b 陽性ミクログリア細胞を分離し、定量 RT-PCR によって栄養因子の遺伝子の発現量を比較した。各感染後日数における、プリオン非感染のマウス由来ミクログリアにおける mRNA 発現量を 1 とした場合の相対値を棒グラフに平均値 ± 誤差 (n=3) で示した (左縦軸)。青: 非感染マウス、赤: Chandler 株感染マウス、緑: Obihiro 株感染マウス

遺伝子発現解析をさらに発展させ、次世代シーケンサーを用いて、ミクログリアにおける遺伝子発現の網羅的解析を実施した。その結果、ケモカイン遺伝子 CCL2, CCL7, および CXCL10 の発現が感染早期から上昇する傾

向が確認できた。Pathway 解析により、インターフェロン応答の刺激因子となる Secreted phosphoprotein 1, Synaptotagmin 1 や SNAP25 等のシナプス関連タンパクと、これらケモカインの分子間ネットワークの存在が示唆された。この分子間ネットワークの上流に存在する分子の解析により、プリオン増殖に伴い生じる神経細胞での変化のどのような現象が、ミクログリアを活性化させるかが解明できる可能性がある。

(2) CD14 欠損マウスを用いたミクログリアの機能の解析

我々はこれまでに、CD14 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、プリオン感染に伴う生存期間が延長すること、感染早期では、CD14 欠損マウスでミクログリアがより活性化することを報告してきた。接種後 60 日の感染早期では、CD14 マウス欠損マウスの脳では WT マウスと比較して、PrP^{Sc} の蓄積が軽度であり、プリオン感染価も低かった。従って、CD14 欠損マウスにおける早期のミクログリアの活性化が、PrP^{Sc} の産生抑制（プリオンの増殖抑制）効果を発揮することが示唆された。

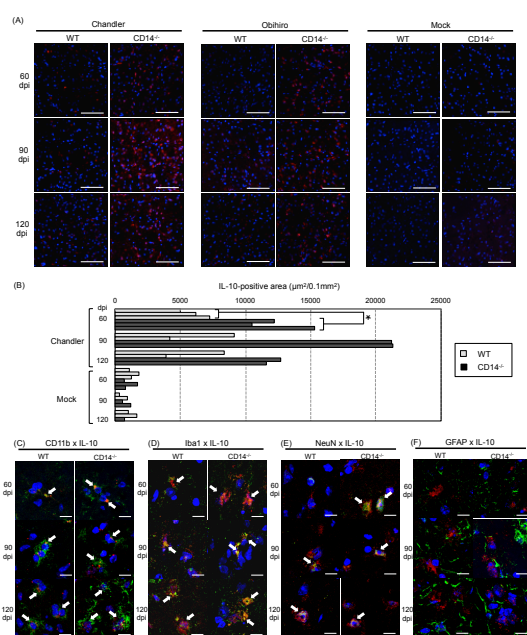


図 2. CD14 欠損マウスにおける IL10 の発現解析。

そこで、プリオン感染 CD14 欠損マウスの脳におけるミクログリア活性化状態の詳細な解析を行った。プリオン感染 CD14 欠損マウスでは、Iba-1 や CD11b のミクログリアマーカーに加えて、ミクログリアマーカーとして使用される CD68 や F4/80 の発現増加が認められた。また、感染初期の接種後 60-75 日の時点では、抗炎症性サイトカインとして知られる IL-10 や TGF- β の発現が高く、炎症性

サイトカインである IL-1 β の発現が低下していた (図 2)。また、興味深いことに、抗炎症性サイトカインである IL-13 の発現が接種後 75 日で一過性に増加し、その後、発現が殆ど認められなくなった。これらサイトカイン、ケモカインの発現パターンは、CD14 欠損マウスでは、プリオン感染初期にミクログリアが一時的に炎症制御性の M2-type にシフトすることを示唆している。これらの結果は、プリオン感染初期において CD14 分子は脳内の抗炎症性に作用する自然免疫応答を抑制することで、プリオン感染初期におけるプリオンの増殖を進める方向に作用することが示唆された。

<引用文献>

- Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*, 28(33): 8354-8360, 2008.
- Morgan D, Gordon MN, Tan J, Wilcock D, Rojiani AM. Dynamic complexity of the microglial activation response in transgenic models of amyloid deposition: implications for Alzheimer therapeutics. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(9): 743-753, 2005.

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 16 件)

- Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Comparison of the anti-prion mechanism of four different anti-prion compounds, anti-PrP monoclonal antibody 44B1, pentosan polysulfate, chlorpromazine, and U18666A, in prion-infected mouse neuroblastoma cells. *PLoS One*, 9(9): e106516, 2014. (DOI: 10.1371/journal.pone.0106516) (査読有り)
- Yamasaki T, Baron GS, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrP(Sc) during early stage prion infection in Neuro2a cells. *Virology*, 450-451:324-335, 2014. (DOI: 10.1019/j.virol.2013.11.007) (査読有り)
- Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, and Horiuchi M. Temporal upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-13 expression in the brains of CD14 deficient mice in the early stage of prion infection. *Biochem Biophys Res Commun.*, 454: 125-130, 2014. (DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.043) (査読有り)
- Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song CH, Suzuki A, Yamasaki T, and Horiuchi M.

Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. *J. Virol.*, 87(24): 13433-13445, 2013. (DOI: 10.1128/JVI.02072-13) (査読有り)

- ⑤ Ohsawa N, Song CH, Suzuki A, Furuoka H, Hasebe R, and Horiuchi M. Therapeutic effect of peripheral administration of an anti-prion protein antibody on mice infected with prions. *Microbiol. Immunol.*, 57: 288-297, 2013. (DOI: 10.1111/1348-0421.12037) (査読有り)
- ⑥ Hasebe R, Raymond GJ, Horiuchi M, and Caughey B. Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo. *Virology*, 423: 205-213, 2012. (DOI: 10.1016/j.virol.2011.11.017) (査読有り)
- ⑦ Yamasaki T, Suzuki A, Shimizu T, Watarai M, Hasebe R, and Horiuchi M. Characterization of intracellular localization of PrP(Sc) in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119-127 of mouse PrP. *J. Gen. Virol.*, 93: 668-680, 2012. (DOI: 10.1099/vir.0.037101-0) (査読有り)
- ⑧ Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, and Ohno H. Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J. Immunol.*, 189: 1540-1544, 2012. (DOI: 10.4049/jimmunol.1103332) (査読有り)
- ⑨ Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, and Sata, T. Predominant Involvement of the Cerebellum in Guinea Pigs Infected with Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). *J. Comp. Pathol.*, 144(4): 269-276, 2011. (DOI: 10.1016/j.jcpa.2010.10.004) (査読有り)
- ⑩ Song C.-H., Honmou, O., Furuoka, H. and Horiuchi, M. Identification of chemoattractive factors involved in the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to brain lesions caused by prions. *J. Virol.*, 85(21): 11069-11078, 2011. (DOI: 11069-78. doi: 10.1128/JVI.05318-11) (査読有り)

[学会発表] (計 30 件)

- ① Fujiwara A, Sassa Y, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of prion infection in primary cortical neurons. Prion2014, May 27-30, 2014, International School for Advanced Studies, Trieste, Italy,
- ② Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of mechanism for PrPSc-specific detection by anti-PrP monoclonal antibody mAb132. Prion2014, May 27-30, 2014, International School for Advanced Studies, Trieste, Italy.

- ③ Hasebe R, Sakai K, Song C-H, Takahashi Y, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Involvement of CD14 in neuropathogenesis of prion diseases. APPS2014, July 6-7, 2014, Cheju International Conference Center, Cheju, Korea.
- ④ Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. High throughput detection of PrPSc from prion-infected cells without PK-treatment: cell-based ELISA for novel screening method for anti-prion compounds. APPS2014, July 6-7, 2014, Cheju International Conference Center, Cheju, Korea.
- ⑤ Horiuchi M, Kabuki H, Hasebe R. Analysis of microglial activation state in brains of prion-infected mice. Prion2013, May 26-29, 2013, Fairmount Banff Hotel, Banff, Canada.
- ⑥ Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Reaction of complement factors on scrapie-infected primary-cultured neurons temporarily increases permeability of plasma membrane. Prion2013, May 26-29, 2013, Fairmount Banff Hotel, Banff, Canada.
- ⑦ Kabuki H, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of microglial activation state in brains of prion-infected mice. Asia Pacific Prion Symposium 2013, July 21-22, 2013, Huistenbosch, Sasebo, Japan.
- ⑧ Sakai K, Hasebe R, Takahashi Y, Song C-H, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. Expanding Prion Horizon 2013, Oct. 16-18, 2013, Colorado State University, Fort Collins, USA.
- ⑨ Horiuchi M, Yamasaki T, Hasebe R, Takahashi Y. Analysis of PrPSc accumulation and glial cell activation in brains of prion-infected mice at the early stage of infection. Prion2012, May 10-12, 2012, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.
- ⑩ 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. Prion2012, May 10-12, 2012, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.

[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：
出願年月日：
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

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

(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
(平成 23～25 年度研究分担者)

(3) 研究分担者

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

(4) 研究分担者

佐々 悠木子 (SASSA, Yukiko)
北海道大学・大学院獣医学研究科・博士研究員
研究者番号：20582464

(5) 連携研究者

大島 正伸 (OHSIMA, Masanobu)
金沢大学・がん研究所・教授
研究者番号：40324610