

## 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：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450447

研究課題名(和文) ミクログリアにおけるプリオン蛋白質の機能とプリオン感染病態に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of prion protein in microglia/macrophages in the pathophysiology of prion disease

研究代表者

作道 章一 (SAKUDO, Akikazu)

琉球大学・医学部・准教授

研究者番号：10397672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン感染マウス脳の免疫組織化学染色でPrPScの蓄積が強く認められたアストロサイトではiNOS発現が上昇しており、ミクログリアではNOX2の発現の上昇が認められた。脳において酸化ストレス障害マーカーの8-OHdGやニトロ化チロシン修飾蛋白質の増加も観察された。PrP遺伝子欠損マクロファージを用いた解析では、貪食能がPrP再発現マクロファージに比べて低下しており、貪食能とPrP発現との相関は、初代培養細胞を用いた解析でも確認された。以上のことから、プリオンの感染病態において、酸化ストレス制御の観点から、ミクログリア/マクロファージにおけるPrP発現は重要な役割を果たしているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：One of the main characteristics of prion diseases, which makes them distinct from bacterial and viral infections, is the absence of an inflammatory reaction. However, recent studies have shown that microglia, macrophage-like cells found in the brain, become activated after prion infection thereby initiating an inflammatory response. Here, we have studied on the physiological role of microglia/macrophages in the pathogenesis of prion diseases. Immunohistochemistry of prion-infected mouse brain showed vacuolar degeneration and the accumulation of PrPSc. PrPSc accumulation was especially evident in astrocytes, which express high levels of iNOS. In addition, microglia showed increased expression of NOX2. Moreover, prion infection increased oxidative stress injury markers including 8-OHdG and nitrated proteins in the brain. Studies using a PrP-deficient macrophage cell line and primary cultures showed a positive correlation between PrP expression and phagocytotic activity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：プリオン 酸化ストレス マクロファージ ミクログリア 貪食能 8-OHdG ニトロチロシン iNOS

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は別名伝達性海綿状脳症と呼ばれるように、ウイルスや細菌の感染が原因で起こる脳炎とは異なり、感染時にも炎症はあまり起きないことが特徴の一つとして挙げられてきた。しかし、最近の研究では、感染動物には脳内マクロファージ様細胞であるミクログリアの活性化に伴う炎症が起きていることが明らかになりつつある。しかし、このミクログリア活性化は病気の進行に伴う付随的变化なのか、それとも発症機構として重要なのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、これらの背景をもとに、プリオン病発症におけるミクログリア/マクロファージ活性化の生理的意義と病態発現機構の解析を行った。

3. 研究の方法

プリオン蛋白質(PrP)遺伝子 (*Prnp*) 欠損マクロファージ細胞株に *Prnp* 遺伝子を再導入した細胞を作製して、*Prnp* 非発現細胞と性状の解析として、貪食能などの比較を行った。感染マウス脳内でも、ミクログリアの活性化と神経細胞の傷害および異常型 PrP(PrP<sup>Sc</sup>)蓄積が起きているかを経時的に解析した。アストロサイトおよびミクログリアが活性化すると、Nitric oxide synthase (iNOS) から Nitric oxide (NO) が、NADPH oxidase 2 (NOX2) から superoxide anion が産生されるため、iNOS や NOX2 およびそれらの関連産物を中心に解析を行った。Chandler 株、Obihiro 株および PBS (リン酸緩衝液) を 14 週齢のマウスに脳内接種し、各々一定期間後にマウスを安楽屠殺し、常法による脳組織切片や脳ホモジネートを調整した。その後、PrP, GFAP, iNOS, NOX2 (gp91phox), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) に対する特異抗体を用いて免疫組織化学染色、ウエスタンブロットティング、および Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により解析し

た。

4. 研究成果

*Prnp* 欠損マクロファージと野生型マクロファージおよび *Prnp* 再導入細胞と空ベクター導入細胞の培養液にラテックスビーズを添加したところ、野生型や *Prnp* 再導入細胞はラテックスビーズを効率的に貪食したが、空ベクター導入細胞や *Prnp* 欠損細胞は貪食効率が低かった(図1)。これらの貪食能と PrP 発現との関係は、初代培養細胞を用いた解析でも確認された。さらに血清除去に対する感受性が *Prnp* 欠損マクロファージの方が、野生型マクロファージや *Prnp* 再導入細胞よりも低かった。

また、プリオンを脳内接種により感染させ経時的に回収したマウス脳について免疫組織化学染色等や生化学解析を行った。その結果、Chandler 株および Obihiro 株感染脳において、プリオン病の感染病態である空胞変性および PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が確認された。また PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が認められたアストロサイトでの iNOS およびミクログリアでの NOX2 の発現が認められた。さらに DNA 酸化ストレス障害マーカーの 8-OHdG 陽性細胞が顕著に認められた。一方でこれらは PBS 投与脳ではほとんど認められなかった。また、ウエスタンブロットティングや ELISA では、感染脳においてニトロ化チロシン修飾蛋白質や 8-OHdG の増加が接種後 40 日以内という比較的早期に観察された。

本研究より PrP<sup>Sc</sup> が脳内に蓄積することで、iNOS および NOX2 の発現が上昇し、酸化ストレス障害が生じることが明らかとなった。その際、グリア細胞だけでなく、ミクログリアも重要な役割を果たしているものと考えられた。さらに、DNA 酸化損傷や蛋白質酸化損傷など酸化ストレスマーカーがプリオン感染により増加していることが明らかとなった。これらのことから、図2に示すようなスキームを考えることができ、ミクログリア/マクロファージにおける PrP 発現は脳内にお

図1

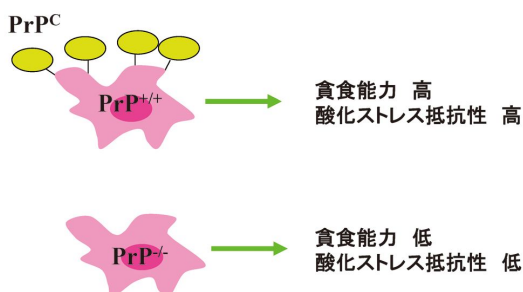
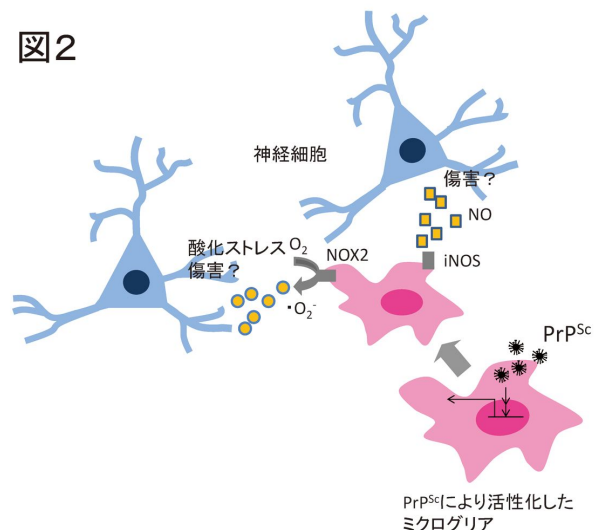


図2



いて酸化ストレス制御に役割を果たしているとともに、プリオン感染時にはその機能の破綻が生じていることが考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Sakudo A, Onodera T, Prion protein (PrP) gene-knockout cell lines: insight into functions of the PrP, *Front. Cell Dev. Biol.* 2015; 2:75.

doi: 10.3389/fcell.2014.00075

査読有

Sakudo A, Shintani H (2015) Advanced Technology in Clinical Microbiology for the Diagnosis and Prevention of Viral Diseases. *Clin Microbiol Open Access* 4: e129.

doi: 10.4172/2327-5073.1000e12 9

査読有

Hirata A, Sakudo A, Takano K, Kanaya S, Koga Y (2015) Effects of Surfactant and a Hyperthermostable Protease on Infectivity of Scrapie-Infected Mouse Brain Homogenate. *J Biotechnol Biomater* 5: 194.

doi:10.4172/2155-952X.1000194

査読有

Onodera T, Sakudo A, Tsubone H, Itohara S, Studies for normal function of prion protein using knockout mice under the immunological or pathophysiological stress. *Microbiol Immunol* 2014; 58(7):361-74.

doi: 10.1111/1348-0421.12162.

査読有

Koga Y, Tanaka SI, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S, Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014; 98(5):2113-20.

doi: 10.1007/s00253-013-5091-7.

査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

清水七海, 古賀雄一, 作道章一, 原 英之, 坂口末廣, 金谷茂則: 超好熱菌由来プロテアーゼによるプリオン蛋白質分解の評価, 第 87 回日本生化学会大会 (2014.10.15-18), 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

古賀雄一, 清水七海, 作道章一, 原 英

之, 坂口末廣, 金谷茂則: 超好熱菌由来プロテアーゼによるプリオンタンパク質分解の評価, 第 66 回 日本生物工学会大会 (2014.9.9), 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

作道章一, 豊川洋一, 清水尚博, 今西雄一郎: 窒素ガスプラズマによるプリオン病原体の不活化, 2014 年度農業施設学会大会 (2014.8.28-29), 神戸大学大学院農学研究科 (兵庫県・神戸市)

作道章一: プリオン病の制圧のための技術開発 ~ プリオン蛋白質機能解析とプリオン不活化法開発 ~, 第 14 回東京理科大学理工学部応用生物科学科卒業生によるセミナー (2014.10.27), 東京理科大学理工学部 (千葉県・野田市)

作道章一, 清水尚博, 今西雄一郎: 窒素ガスプラズマ処理がプリオン病原体に与える影響の解析, 第 89 回日本医療機器学会大会 (2014.6.12-14), 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

〔図書〕(計 7 件)

Sakudo A, Onodera T, Chapter 7, Prions in "Laboratory Models for Foodborne Infections (Edited by Don Liu)", Taylor & Francis CRC Press, in press

Sakudo A, Onodera T, Chapter 98. Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in Molecular detection of animal viral pathogens (Edited by Don Liu), Taylor & Francis CRC Press, in press

Sakudo A, Onodera T, Chapter 99. Chronic wasting disease (CWD) in Molecular detection of animal viral pathogens (Edited by Don Liu), Taylor & Francis CRC Press, in press

Onodera T, Sakudo A, Introduction, Prions: Current Progress in Advanced Research, Caister Academic Press, UK, pp.1-3, 2013.

Onodera T, Sugiura K, Matsuda S, Sakudo A, Function of cellular prion protein, Prions: Current Progress in Advanced Research, Caister Academic Press, UK, pp.11-29, 2013.

Sakudo A, Prion protein and the family members, Doppel and Shadoo, Prions: Current Progress in Advanced Research, Caister Academic Press, UK, pp.5-10, 2013.

Sakudo A, CWD and other prion diseases,  
Prions: Current Progress in Advanced  
Research, Caister Academic Press, UK,  
pp.111-118, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

作道 章一 (SAKUDO, Akikazu)

琉球大学・医学部・准教授

研究者番号：10397672

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし