

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21080

研究課題名(和文) 周産期ウイルス感染が惹起する炎症反応に基づく神経発達障害の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying neurodevelopmental impairment induced by perinatal viral infection

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：周産期ウイルス感染は精神疾患発症のリスクを増加させることが知られているが、その詳細な分子機構については不明である。本研究では、周産期ウイルス感染による精神疾患発症の分子機構を明らかにすることを目的とし、IFITM3の機能解析を行った。プロテオミック解析からIFITM3の新規結合タンパク質としてRabGDIを同定した。培養細胞を用いた実験からIFITM3の強制発現により活性化型Rab5の増加が認められた。また、EEA1陽性エンドソームの増大が認められた。

研究成果の概要(英文)：Viral infection in perinatal period increases the risk of psychiatric disorders in the offspring. Polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C) induces strong immune reaction which mimic viral infection. Previous findings showed that interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) is a key molecule in polyI:C-induced neuronal impairment. It is unknown how IFITM3 mediates polyI:C-induced neuronal impairment. The purpose of this study is to understand the role of IFITM3 in polyI:C-dependent neuronal impairment. We identified Rab GTPase dissociation inhibitor as novel IFITM3-interacting protein by proteomic analysis. IFITM3 was colocalized with RabGDI in cultured astrocytes. We found that expression of IFITM3 increased the EEA1-positive vesicle size. We also found that forced expression of dominant negative Rab5 in astrocytes partially ameliorated polyI:C-induced neuronal impairment. These results suggest that IFITM3 may mediate polyI:C-induced neuronal impairment through RabGDI.

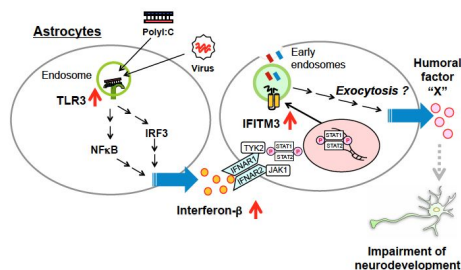
研究分野：神経化学

キーワード：IFITM3 astrocyte polyI:C 周産期ウイルス感染

1. 研究開始当初の背景

胎児や新生児期の発達期にある脳は外的刺激に対して脆弱であり、この時期における脳の障害が後の精神疾患発症に影響することが示唆されている。すなわち、統合失調症などには遺伝的要因のみならず、ストレスやウイルス感染などの環境要因が疾患の発症に寄与すると考えられている。疫学的研究から妊娠中にインフルエンザに感染した母体から生まれた子供は非感染群に比べ統合失調症や自閉症スペクトラム、双極性障害の発症リスクが高いことが報告されている。また、新生児のウイルス感染が自閉症スペクトラムのリスク因子であるとの報告もある。この様に精神神経疾患発症において周産期のウイルス感染は重要なリスクファクターのひとつであるが、ウイルス感染による精神神経疾患発症の詳細な分子メカニズムについては不明である。

我々はこれまで自然免疫を活性化する二本鎖 RNA である poly I:C を用いた周産期擬似ウイルス感染モデルマウス (poly I:C モデル) を作製した。生後 2 日目から 5 日間 poly I:C を新生仔マウスに投与すると成獣期のマウスに学習記憶障害や情動障害など統合失調症様の行動異常を示すことを報告した [Ibi D et al, 2009 Neurosci Res]。また、poly I:C 投与と特異的に発現変化する遺伝子群を検討した結果、統合失調症関連遺伝子や炎症性サイトカインなどの免疫システムに関連する遺伝子の発現変化が認められ、その中でも IFITM3 が重要な役割を果たすことを明らかにした [Ibi D et al, 2013 Glia]。IFITM3 はウイルス感染などの炎症反応に依存して一過性に発現する分子であり、ウイルス感染の防御因子として知られているが中枢神経系における役割については未知であった。我々は IFITM3 ノックアウト (KO) マウスを用いて解析を行った結果、野生型では poly I:C 投与により障害される認知機能が KO マウスでは障害されないことを示した。また、中枢における IFITM3 はアストロサイト特異的に発現誘導され、IFITM3 が過剰発現したアストロサイトの条件培地を神経細胞に処置すると神経突起の伸張や樹状突起上のスパインの形成が障害されることを明らかにした。以上から poly I:C 投与による高次脳機能障害は IFITM3 を過剰発現したアストロサイトから放出される液性因子が神経細胞障害を惹起することで起こると考えられた。



2. 研究の目的

上記の様な結果は周産期ウイルス感染による精神疾患発症における IFITM3 の重要性を示しているが、1) 神経障害の原因となるアストロサイトからどのような液性因子が放出され、どの様に神経細胞に影響するのか、2) IFITM3 がどのようにして液性因子の放出を制御しているかについては未解決である。そこで本研究では IFITM3 の中枢神経系における機能を解析することで、ウイルス感染による精神疾患発症の分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は IFITM3 の中枢神経系における機能を明らかにすることで周産期ウイルス感染による精神神経疾患発症の分子メカニズムを解明することを目的とし、これまでの研究で未解決であった以下の 2 点について検討する。

(1) IFITM3 を過剰発現したアストロサイトより放出される液性因子の特定およびその機能

以前の結果から poly I:C 依存的にアストロサイトから放出される分子として Follistatin like-1 (Fstl1) を同定している。Fstl1 を発現させるための AAV ベクターを作製した。Fstl1 の組換えタンパク質を得るために、Expi293 細胞に Fstl1 発現ベクターを導入し、その後、細胞培養上清を回収した。

(2) IFITM3 による液性因子放出 (細胞内輸送系) の制御機構

先行研究の結果より IFITM3 は初期エンドソームに局在していることが示されている。IFITM3 の astrocyte における局在を細胞免疫染色法および密度勾配遠心法により確認した。次に、初期エンドソームに局在する Rab family small GTPase として Rab5 に注目し、IFITM3 発現による活性への影響について Rabaptin Rab5 binding domain (R5BD) を bait とした pull down assay により検討した。Rab5 のドミナントネガティブ変異体 (S34N) を発現させたアストロサイトを poly I:C (10 μg/mL) 処置し、24 時間後に条件培地 (ACM) を回収した。初代培養神経細胞を回収した ACM 中で培養し、突起伸長を評価した。

4. 研究成果

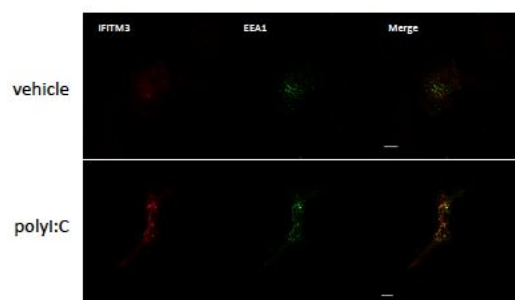
(1) IFITM3 を過剰発現したアストロサイトより放出される液性因子の特定およびその機能

平成 28 年度は IFITM3 と RabGDI の結合についての validation を行った。HEK 細胞に GST-IFITM3 および myc-RabGDI を発現させ、Glutathione beads を用いた pull down assay を行った。その結果、GST-IFITM3 と myc-RabGDI の結合が確認できた。

平成29年度は in vivo における Fst11 の発現を達成するために Fst11 の AAV ベクターを作製した。作製したプラスミドを HEK ベクターに導入し、Fst11 の発現をウエスタンブロットにより確認することができた。予備的検討により GFAP プロモーター下に EGFP を組み込んだ AAV ベクターを生後2日目のマウス脳内に注入し、成獣マウスにおける EGFP の発現を確認したが、アストロサイト非特異的な細胞にも EGFP の発現が認められた。現在、Fst11 の組換えタンパク質 (rFst11) を直接注入する方法を検討している。Fst11-myc-DDK を発現するプラスミドを Expi293 細胞に導入し、培養上清を回収した。

(2) IFITM3 による液性因子放出 (細胞内輸送系) の制御機構

マウス皮質から採取した培養アストロサイトを polyI:C 処置し、抗 IFITM3 抗体および抗 GDI1 抗体を用いた免疫染色により IFITM3 と RabGDI の細胞内局在について検討した。IFITM3 は一部 RabGDI と共局在していた。また、培養アストロサイト抽出液を密度勾配遠心法により分離し、回収した各フラクションを用いてウエスタンブロットを行った。IFITM3 の一部は RabGDI と同じフラクションに検出された。COS7 細胞に HA-IFITM3 を発現させた細胞においては活性化型 Rab5 が mock vector に比べ増加していることが明らかになった。また、HA-IFITM3 を発現させることにより EEA1 陽性エンドソームが増大していた。同様に polyI:C 処置した培養アストロサイトにおいても vehicle 処置群に比べ EEA1 陽性エンドソームの増大が認められた。



PolyI:C 処置した ACM により神経細胞突起の神経突起の伸長が抑制された。この条件下において、アストロサイトに Rab5 のドミナントネガティブ変異体を発現させると、神経細胞突起の伸長阻害効果が部分的にレスキューされた。

RabGDI のノックアウトマウス (KO) の作製を試みた。GDI1 に対するガイド RNA を4種類用意し、pX330 ベクターにサブクローニングした。得られたプラスミドを Neuro2A 細胞に導入し、DBS 検出キットを用いて切断活性を評価した。1種類の切断活性を示すプラスミドを得ることができた。切断活性の認められたプラスミドを受精卵にインジェクションした。ファウンダーマウス (F0) の配列を確認

したが、大幅な欠損やフレームシフトを有するマウスを得ることができなかった。今後は切断活性を有する他の gRNA 配列を組み込んだプラスミドを準備するなど引き続き、KO マウスの作製を試みる必要がある。

本研究により、IFITM3 による細胞内輸送系への影響が明らかになった。IFITM3 の新規結合タンパク質として同定した RabGDI は Rab small GTPase の制御因子として知られている。そのため、IFITM3 が RabGDI を介して Rab small GTPase を制御していることが示唆された。今後は in vivo における機能を明らかにするため、rFst11 を直接脳内に注入するなど、in vivo での解析を行う必要があると考えられた。

<引用文献>

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.

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4件)

Repetitive and compulsive-like behaviors lead to cognitive dysfunction in Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3 mice
Wulaer B, Nagai T, Sobue A, Itoh N, Kuroda K, Kaibuchi K, Nabeshima T, Yamada K.
Genes Brain Behav. in press, 査読有

Astroglial major histocompatibility complex class I following immune activation leads to behavioral and neuropathological changes.
Sobue A[#], Itoh N[#], Nagai T[#], Shan W, Hada K, Nakajima A, Murakami Y, Mouri A, Yamamoto Y, Nabeshima T, Saito K, Yamada K. [#]co-first author
Glia. 2018 May;66(5):1034-1052., 査読有
doi: 10.1002/glia.23299.

Neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) controls neuronal homeostasis in pentylenetetrazole-induced epilepsy through the induction of Homer1a.

Shan W, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Sokabe M, Yamada K.

J Neurochem. 2017 Dec 9., 査読有
doi: 10.1111/jnc.14274.

Valosin-containing protein (VCP) is a novel IQ motif-containing GTPase activating protein 1 (IQGAP1)-interacting protein.

Itoh N, Nagai T, Watanabe T, Taki K, Nabeshima T, Kaibuchi K, Yamada K.

Biochem Biophys Res Commun. 2017 Dec 2;493(4):1384-1389., 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.159.

〔学会発表〕(計4件)

伊藤 教道、祖父江 顕、永井 拓、シヤン ウェイ、中島 晶、村上 由希、毛利 彰宏、山本 康子、鍋島 俊隆、斎藤 邦明、山田 清文：アストロサイト由来する MHC classI の機能解析、第 138 回日本薬理学会関東部会、2018 年 3 月 10 日

Norimichi Itoh, Taku Nagai, Daisuke Ibi, Akira Nakajima, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada.: IFITM3 regulates polyI:C-induced neuronal impairment via Rab small GTPase. SfN 2017 Annual Meeting. Nov 11 - 15, 2017

Norimichi Itoh, Taku Nagai, Akira Sobue, Daisuke Ibi, Akira Nakajima, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada.: Up-regulation of astrocyte-derived immune-related genes contributes to behavioral impairment. IBNS 2017 Annual Meeting in Hiroshima. Jun 26 - 30, 2017

伊藤 教道、永井 拓、山田 清文：IFITM3 による細胞内輸送の制御機構、第 18 回応用薬理シンポジウム、2016 年 8 月 5 日～6 日、愛知県名古屋市、名古屋大学医学部医系研究棟 1 号館（地下 1 階会議室）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし