

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08070

研究課題名(和文) 補体因子はプリオン病初期の病態形成に影響を与えるか

研究課題名(英文) Function of complement factors in the neuropathogenesis of prion disease

研究代表者

山崎 理絵(長谷部理絵)(Yamasaki (Hasebe), Rie)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：70431335

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文): 補体因子はプリオン感染マウスの脳で感染初期から発現が増加するが、病態形成における補体因子の機能は不明であった。プリオン感染マウスモデルと初代培養系を用いた実験により、補体因子C1qはプリオン感染マウスの脳においてミクログリアから分泌され、神経細胞に対してp38 MAPKを介した細胞シグナリングを誘導することにより、細胞膜の透過性を亢進させ、PrPSc蓄積量を減少させることが示唆された。C1qはまた、STAT3経路を介してアストロサイトを活性化させることが示唆された。また、補体因子はプリオン感染初期から中期にかけて病態進行に影響を与えるが、臨床期以降は影響を与えないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究により、補体因子はプリオンが末梢から中枢神経系に侵入する際に重要であることが報告されていたが、神経病態形成における補体因子の機能は不明であった。本研究の成果より、補体因子がプリオン感染初期から中期にかけて病態進行に影響を与えることが明らかとなった。補体因子C1qの機能として、神経細胞の細胞膜の透過性を変化させること、アストロサイトの活性化状態を変化させることが発見された。補体因子は神経細胞でのPrPScの増殖を制御することから、本研究の成果は新たな治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文): Function of the complement factors in the neuropathogenesis of prion disease still remains unclear, although the expression of complement factors is up-regulated from the early stage of the disease. The results of the current study suggest that complement factor C1q expressed by microglia increased the permeability of plasma membrane of neurons via p38 MAPK pathway, and up-regulated activation of astrocytes both in vivo mouse model and in a primary culture system of neurons and glia. The influence of C1q was valid in the early and middle stage of prion infection, however, there was no influence in the clinical and terminal stage of the disease. These results suggest that complement factor C1q may work as a transmitter among neurons and glia that influence the neuropathogenesis of prion disease.

研究分野：神経病理

キーワード：プリオン病 補体因子 神経病態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

補体とその制御因子は30種類以上存在し、古典的経路、代替経路、レクチン経路を介して膜障害性複合体を形成し、標的となる細胞や細菌の融解を引き起こす。オプソニン作用やケモカインとしての作用も補体因子の機能として古くから知られてきたが、それらに加えて様々な機能が近年報告されている。補体因子は細胞の生存、細胞死、Toll様受容体を介した免疫反応などの細胞シグナリングを誘導する。また、C1q、C3のオプソニン作用は神経発生時に過剰なシナプスをミクログリアが剪定する際に働く。この現象は神経変性疾患でも起こることが報告されており、C1q、C3はアルツハイマー病でミクログリアの貪食を促進し、シナプスの脱落を誘導する(Hong et al., 2016)。その一方で、外来性のC5aはAによる神経細胞の傷害を抑制することが報告されており(O' Barr et al., 2001)、補体因子は神経変性疾患の病態に対し、いわゆる諸刃の剣と考えられている。補体遺伝子の発現はプリオン病でも感染初期から上昇しているが、補体因子C1q、C3、C3/C4受容体、C5欠損マウスにプリオンを脳内接種しても野生型マウスと生存期間は変わらないことから、補体因子はプリオン病の神経病態には関与しないものと考えられてきた(Klein et al., Nat Med. 2001; Mabbott et al., Nat Med. 2001; Mabbott et al., J Virol. 2005)。しかし申請者はプリオン持続感染神経芽腫細胞に補体因子を反応させると、細胞内膜のホスファチジルセリンが細胞外膜に露出すること(Hasebe et al, Virology. 2012)、プリオン感染初代培養神経細胞に補体因子を反応させると細胞膜透過性が亢進し、Chandler株感染細胞ではPrP^{Sc}蓄積量が減少することを報告した(Hasebe et al., Virology. 2016)。この初代培養系にはミクログリアはほとんど含まれておらず、PrP^{Sc}蓄積量が減少する際には、PrP^{Sc}とリソソームマーカーの共局在率が増加していた。以上の結果から、PrP^{Sc}蓄積量の減少はミクログリアによる貪食によるものではなく、補体因子が神経細胞に何らかのシグナル伝達を誘導することによりPrP^{Sc}のリソソームへの輸送を亢進させ、PrP^{Sc}の蓄積量が減少する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究の目的は、補体因子がプリオン病の神経病態形成に影響を与えるかを検討することであった。

3. 研究の方法

(1) プリオン感染神経細胞・グリア細胞初代培養系における補体因子の機能の検討

ICRマウス胎仔および新生仔より培養神経細胞、アストロサイトの初代培養系を作製した。プリオン感染初代培養神経細胞に補体因子を反応させ、細胞膜の透過性を亢進させた。Chandler株感染神経細胞では感染16-20日後に補体因子を反応させたのち、補体因子に対するshRNAの導入、シグナル経路阻害剤の作用が細胞膜の透過性およびPrP^{Sc}蓄積に与える影響を検討した。

(2) プリオン感染マウスにおける補体因子の機能の検討

補体因子に対するshRNAをプリオン感染マウスの脳にレンチウイルスベクターにより導入した。レンチウイルスベクターを導入する時期は感染60、90、120日後に行う。ノックダウンした補体因子およびその他の補体因子の発現、PrP^{Sc}蓄積量、細胞内シグナル分子の発現とそのリン酸化をウェスタンブロットティングにより、組織病変やミクログリア・アストロサイトの活性化に与える影響をHE染色および免疫染色により解析し、補体因子のノックダウンがin vivoのプリオン感染の病態、特に感染初期である60日に病態に影響を与えるかを評価した。

4. 研究成果

補体因子はプリオン感染マウスの脳で感染初期から発現が増加するが、病態形成における補体因子の機能は不明であった。補体因子はプリオン感染初代培養神経細胞の細胞膜の透過性を亢進させ、異常型プリオンタンパク質(PrP^{Sc})を減少させることから、補体因子がプリオン感染神経細胞に何らかのシグナル伝達を誘導する可能性が考えられた。また、アルツハイマー病モデルマウスでは、補体因子C1qはミクログリアによるアミロイドの貪食を亢進すること、アストロサイトのNF- κ B経路を活性化することから、補体因子はプリオン病でも神経細胞・グリア細胞間のクロストークを担う伝達物質として機能する可能性が考えられた。

H29年度は、補体因子がプリオン感染神経細胞に誘導するシグナル経路を解析した。プリオン初代培養神経細胞にMAPK経路阻害剤存在下または非存在下で補体因子を用させたところ、p38MAPK経路阻害剤存在下で補体因子による細胞膜の透過性亢進が阻害された。しかしながら、阻害剤処理そのものでPrP^{Sc}量が減少したため、阻害剤を用いた実験では補体因子の効果を評価することが困難であると考えられた。補体因子がプリオン病において神経細胞・グリア細胞間のクロストークを担う伝達物質として機能する可能性を検討するために、プリオン感染神経細胞・アストロサイト混合培養系にプリオン感染マウス脳より分離したミクログリアを加えると、アストロサイトマーカーであるGFAPの発現が増加した。これはミクログリアのC1q遺伝子発現をノックダウンすると観察されなくなった。プリオン感染マウスの脳でC1q遺伝子発現をノックダウンしても、GFAPの発現増加が抑制された。以上の結果からミクログリアから分泌されるC1qは、1. p38MAPK経路を介してプリオン感染神経細胞の膜透過性を亢進する可能性、2. アストロサイトを活性化させる可能性が示唆された。

H30年度はプリオン感染マウスの感染初期、中期、後期に C1qa 遺伝子をノックダウンし、脳内での PrP^{Sc} の沈着およびアストロサイトの活性化に与える影響を検討した。プリオン感染初期、中期、後期に、マウスの右側視床に C1qa 遺伝子に対する shRNA をレンチウイルスベクターにより導入した。感染初期及び中期では、左右の視床で C1qa 遺伝子の発現が有意に減少したが、後期では導入側のみで遺伝子発現が有意に減少した。PrP^{Sc} 量をウェスタンブロットにより解析すると、感染中期では C1qa 遺伝子ノックダウンにより左右の視床で PrP^{Sc} 量が有意に増加したが、感染後期では左右の視床ともに変化がなかった。GFAP の発現を免疫染色で解析したところ、感染中期では C1qa 遺伝子ノックダウンにより左右の視床で GFAP 発現が減少したが、感染後期では左右の視床ともに変化がなかった。以上の結果より、補体因子 C1q は in vivo のプリオン感染においても PrP^{Sc} の蓄積を減少させ、アストロサイトを活性化させることが示唆された。

H31 (R1) 年度は、神経細胞、アストロサイトで C1q により誘導される細胞シグナル経路を解析した。プリオン感染神経細胞・アストロサイト混合培養系に C1q を作用させたときに亢進する神経細胞の細胞膜透過性は、p38MAPK 経路阻害剤により抑制された。また、同培養系に C1q を作用させたときに亢進するアストロサイトの活性化は、STAT3 阻害剤により抑制された。プリオン感染神経細胞・アストロサイト混合培養系に C1q を作用させると、神経細胞において p38 の核移行が観察され、アストロサイトでは STAT3 の核移行が観察された。

以上の結果から、ミクログリアから分泌された補体因子 C1q はプリオン感染神経細胞に p38MAPK シグナルを誘導することにより、細胞膜の透過性を亢進し、PrP^{Sc} 蓄積量を減少させること、アストロサイトに STAT3 シグナルを誘導し、活性化させることから、神経細胞-グリア細胞のクロストークを担う伝達物質として機能することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Akio, Yamasaki Takeshi, Hasebe Rie, Horiuchi Motohiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Enhancement of binding avidity by bivalent binding enables PrPSc-specific detection by anti-PrP monoclonal antibody 132	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0217944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 長谷部 理絵, 上村 大輔, 村上 正晃	4. 巻 72(6)
2. 論文標題 神経炎症とゲートウェイ反射	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 683-690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Retrograde transport by clathrin-coated vesicles is involved in intracellular transport of PrPSc in persistently prion-infected cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-30775-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M.	4. 巻 92
2. 論文標題 Flow cytometric detection of PrPSc in neurons and glial cells from prion-infected mouse brains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01457-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1128/JVI.01457-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shan Z, Hirai Y, Nakayama M, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, Horiuchi M	4. 巻 98
2. 論文標題 Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 2615-2627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1099/jgv.0.000907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasebe R, Nakao R, Ohnuma A, Yamasaki T, Sawa H, Takai S, Horiuchi M.	4. 巻 79
2. 論文標題 Listeria monocytogenes serotype 4b strains replicate in monocytes/macrophages more than the other serotypes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 962-969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1292/jvms.16-0575	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Rie Hasebe, Hiroshi Asano, Ayako Nozaki, Kei Ihira, Takeshi Mitamura, Yosuke Konno, Tatsuya Kato, Hidemichi Watari, Takuya Otsuka, Yoshihiro Matsuno, Hidemitsu Kitamura, Masahiro Sonoshita, Tetsuro Hirose, Masaki Murakami
2. 発表標題 Functional and transcriptome analysis of different histological types of HPV+ cancers
3. 学会等名 第14回生命医学研究所ネットワーク国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Yamasaki, Akio Suzuki, Rie Hasebe, Yuichi Matsuura, Kohtaro Miyazawa, Yoshifumi Iwamaru, Motohiro Horiuchi
2. 発表標題 Characterization of gene expression profiles in brains of mice infected with typical and atypical BSEs
3. 学会等名 Prion2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimakura A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M
2. 発表標題 Identification and transcriptome analysis of brain regions vulnerable to neuronal loss in prion infection
3. 学会等名 Prion 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakayama M, Shan Z, Yamasaki T, Hasebe R, Sawada K, Horiuchi M.
2. 発表標題 Alteration of microglial activation state by mesenchymal stem cells
3. 学会等名 Prion 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 剛士、岩丸 祥史、鈴木 章夫、長谷部 理絵、堀内 基広
2. 発表標題 定型BSEおよび非定型BSEプリオンに感染したマウスの脳のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島倉 綾乃、山崎 剛士、鈴木 章夫、長谷部 理絵、堀内 基広
2. 発表標題 神経細胞特異的遺伝子発現解析によるプリオン病の神経変性機構の解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部 理絵、中尾 亮、鈴木 章夫、山崎 剛士、堀内 基広
2. 発表標題 北海道の反芻動物より分離されたListeria monocytogenesの分子遺伝学的解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuroda M, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M.
2. 発表標題 Activation state of glial cells in prion diseases
3. 学会等名 Asia Pacific Prion Symposium 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanaka M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M.
2. 発表標題 Analyses of neuron-autonomous mechanisms for neurodegeneration in prion diseases on neuron-enriched primary cell cultures
3. 学会等名 Asia Pacific Prion Symposium 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamasaki T, Iwamaru Y, Matuura Y, Kuroda M, Hasebe R, Okada Y, Horiuchi M.
2. 発表標題 Characterization of gene expression profiles in brains of mice infected with typical and atypical BSEs
3. 学会等名 Asia Pacific Prion Symposium 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hasebe R, Nakao R, Ohnuma A, Yamasaki T, Sawa H, Takai S, Horiuchi M.
2. 発表標題 Listeria monocytogenes serotype 4b strains replicate in monocytes/macrophages more than the other serotype strains
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M.
2. 発表標題 Unique reactivity of cervid recombinant PrP for the detection of L-BSE and CWD by RT-QuIC
3. 学会等名 Prion 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shan Z, Hirai Y, Nakayama M, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, Horiuchi M
2. 発表標題 Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease
3. 学会等名 Prion 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 長谷部 理絵. 編者: 小熊 恵二, 堀田 博, 若宮 伸隆	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 474
3. 書名 シンプル微生物学 改訂第6版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----