

令和元年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14954

研究課題名(和文) 脳内神経細胞特異的トランスクリプトーム解析から挑むプリオン病の神経変性機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of mechanism of neurodegeneration in prion diseases by neuron-specific transcriptome analysis in brain

研究代表者

山崎 剛士 (Takeshi, Yamasaki)

北海道大学・獣医学研究院・助教

研究者番号：70709881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン病では、異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) が脳内の神経細胞で増殖することで神経変性が起こる。本研究では、神経変性過程にある脳内神経細胞の遺伝子発現プロファイルを解明することを足掛かりとして、プリオン病の神経変性機構の分子基盤の解明を試みた。神経細胞の脱落が顕著な視床領域のトランスクリプトーム解析により、ストレス応答性の転写調節因子であるATF3を中心として、アポトーシス関連因子の遺伝子発現が上昇することが明らかになった。本研究から、プリオン病では、神経細胞でのPrP^{Sc}増殖に加えて、ATF3分子を中心としたシグナル伝達経路が活性化することで神経変性が起こることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患の治療法開発のためには異常タンパクの増殖に起因する神経変性機構を解明することが最重要課題である。本研究で、プリオン病モデルマウスの脳内で変性過程にある神経細胞の遺伝子発現プロファイルが得られたことから、神経変性機構を理解する上で価値の高い情報を提供できた。また、プリオン感染マウスの脳内神経細胞で、アポトーシス関連因子の発現上昇を伴ってATF3が発現誘導されたことから、ATF3分子が変性過程にある神経細胞のマーカーとなることが示された。今後、ATF3分子を中心とした解析を行うことで、詳細な神経変性機構の解明、ひいてはATF3関連分子を標的とした治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Neurodegeneration in prion diseases is considered to be caused by generation of an abnormal isoform of prion protein (PrP^{Sc}) within neurons in the brains of animals affected by prions. In this study, we approached the molecular basis of mechanism of the neurodegeneration by comprehensive gene expression analysis of degenerating neurons in prion-infected mouse brains. Transcriptome analysis on the thalamus, where severe neuronal loss was observed, revealed that expression of apoptosis-related genes such as a stress-responsive transcription factor, ATF3, were up-regulated by prion-infection. The results suggest that neurodegeneration in prion diseases might be caused by the activation of signaling pathway involved in ATF3 molecules.

研究分野：プリオン病学

キーワード：プリオン病 神経変性 トランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた本国では、2035年までに65歳以上の高齢者の12.5%、470万人まで認知症患者が増加すると推定されている。認知症の発生は、患者と家族の quality of life や社会経済への負担が著しいことから、治療法・予防法の開発が強く望まれている。認知症の8割以上を、アルツハイマー病やパーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症そしてプリオン病に代表される神経変性疾患が占める。これらの疾患では、本来正常な機能を持つタンパク質が構造異常を起こして凝集し、神経細胞や脳組織に蓄積して神経変性を引き起こす。プリオン病では、異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) が鋳型のように働いて正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) を PrP^{Sc} に構造転換し、PrP^{Sc} が脳内で増殖して神経変性を引き起こす。他の神経変性疾患でも、病因タンパクであるアミロイド やリン酸化タウ、 α -シヌクレイン、ハンチンチンタンパク質、TDP-43 が神経細胞内でプリオン様の増殖を示すことが報告されており、異常タンパクの増殖に起因する神経変性機構の解明は、神経変性疾患の治療法・予防法を開発する上で最重要課題となっている。

2. 研究の目的

プリオン病は、PrP^{Sc}を動物に接種することで明確な感染現象を起こし、ヒトの病態と同様に PrP^{Sc} の増殖と致死性の神経変性を忠実に再現する。従って、プリオン病モデル動物は、異常タンパクの増殖を原因とする神経変性のメカニズムを解析する上で極めて有用である。プリオン感染動物の脳組織では、PrP^{Sc} の蓄積部位に付随して神経細胞死やグリア細胞の活性化が認められる。脳組織での PrP^{Sc} の増殖がグリア細胞の応答に先立つこと、神経細胞で PrP^{Sc} の増殖が起こらない条件では、PrP^{Sc} が神経細胞外やグリア細胞に存在しても神経変性が軽度であることから、プリオン病の神経変性の主因が神経細胞での PrP^{Sc} の増殖であることは明白である。PrP^{Sc} が脳内で増殖してから神経細胞死が起こるまでの間に、小胞体ストレスや翻訳抑制、シナプスの障害や樹状突起の消失が起こることが報告されているが、神経変性が起こる分子メカニズムは十分に理解されていない。

プリオン感染マウスの脳では炎症性サイトカインの発現が上昇する。感染マウスに CSF1R の阻害剤を投与してミクログリアの増殖を抑制すると、炎症性サイトカインの発現が低下し、病態の進行が遅延する。また、脳内で抗炎症性サイトカイン TGF- β 1 の阻害因子を過発現させると、ミクログリアの活性化と炎症が亢進し、神経細胞死が亢進する。申請者らは、活性化グリア細胞の病態生理学的意義を明らかにするため、プリオン感染マウスの脳からアストロサイトとミクログリアを分離し、トランスクリプトームを解析した。その結果、病態の進行に伴って、アストロサイトでは神経保護因子の発現が上昇すること、ミクログリアでは炎症性サイトカインを含む神経傷害性因子の発現が上昇することが明らかとなった。これらの研究成果を統合すると、プリオン病では、活性化グリア細胞が発現する神経傷害性因子が神経細胞に作用することで神経変性が誘発される可能性がある。これまで、炎症性サイトカインやその下流シグナル分子の欠損マウスを用いて、プリオン感染実験が行われてきた。しかし、その多くは脳病変にほとんど影響を及ぼさず、神経変性を誘発する活性化グリア細胞由来因子や、神経変性に関与する神経細胞内のシグナル伝達経路は十分に理解されていない。その主な原因のひとつは、グリア細胞と比べて、神経変性過程にある神経細胞の遺伝子発現プロファイルが明らかになっていないことである。そこで本研究では、プリオン感染マウスの脳内で、PrP^{Sc} が増殖している神経細胞のトランスクリプトームを明らかにし、神経変性過程で活性化する神経細胞内のシグナル伝達経路を推定すること、この情報と活性化グリア細胞の遺伝子発現プロファイルを統合することで、神経変性を誘発する活性化グリア細胞由来の因子を同定し、神経変性機構の分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プリオン感染マウスの脳内 PrP^{Sc} 陽性細胞の経時的変化の解析

プリオン感染後45日から病末期である145日まで、プリオン感染マウスの脳から経時的に神経系細胞を採材した。神経細胞、アストロサイト、ミクログリアおよび PrP^{Sc} を免疫蛍光染色した後、フローサイトメトリーにより PrP^{Sc} 陽性細胞の経時的変化を解析した。また、PrP^{Sc} 陽性神経細胞を fluorescence-activated cell sorting (FACS) により分取し、次世代シーケンサー Ion Proton を用いた RNA-sequencing 法によるトランスクリプトーム解析を試みた。

(2) PrP^{Sc} 蓄積脳領域および神経脱落部位の解析

プリオン感染マウスの脳から経時的に脳を採材し、凍結切片を作製した後、NeuN 陽性神経細胞、GFAP 陽性アストロサイト、Iba1 陽性ミクログリア、PrP^{Sc} を免疫蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、扁桃核、小脳、延髄における PrP^{Sc} の蓄積、アストロサイト、ミクログリアの活性化、神経細胞数を定量解析した。

(3) 神経脱落脳領域のトランスクリプトーム解析

症状期、病末期のプリオン感染マウスから、実体顕微鏡下で視床を採取し、RNA-sequencing 法によるトランスクリプトーム解析を行った。

(4) プリオン感染初代培養神経細胞と活性化ミクログリアの共培養

マウス胎仔より調整した初代培養神経細胞にプリオンを感染させ、症状期のマウスから免疫磁気分離法により分取した活性化ミクログリアとの共培養を行った。活性化ミクログリア由来因

子が神経細胞に及ぼす影響は、神経細胞数、神経突起、ストレス応答性転写調節因子 ATF3 の発現により評価した。

4 . 研究成果

PrP^{Sc} の増殖と神経細胞死との関連を明確にするため、PrP^{Sc} が蓄積する脳領域と神経細胞の脱落が起こる脳領域を解析した。PrP^{Sc} は症状期には既に脳全体に伝播していたが、神経細胞の脱落は特定の脳領域に局限して起こることが分かった。PrP^{Sc} が増殖している神経細胞を詳細に解析するため、感染マウスの脳から神経系細胞を分離し、PrP^{Sc} 陽性神経細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、神経細胞の 80%以上に PrP^{Sc} が存在することが明らかになった。これらの結果は、PrP^{Sc} の増殖が直接的な原因となって神経細胞死が起こるのではなく、PrP^{Sc} の増殖に加えて何らかの誘因が加わることで神経細胞死が起こることを示している。

神経細胞死を惹起する因子の同定のため、分取した PrP^{Sc} 陽性神経細胞のトランスクリプトーム解析を試みた。しかし、精製した RNA の質と収量の問題から、解析に十分なデータは得られなかった。そこで研究方針を改め、プリオン感染マウスの脳組織から神経細胞の脱落が顕著な視床領域を採材し、トランスクリプトームを解析することとした。神経細胞特異的な細胞応答を捉えるため、グリア細胞が発現する遺伝子以外について解析を進めたところ、神経細胞で小胞体ストレス応答・酸化ストレス応答が活性化することを示唆する結果を得た。特に、ストレス応答性の転写調節因子である ATF3 を中心として、CHOP や CHAC1, Caspase 7 など、アポトーシス誘発に關与する遺伝子の発現が上昇することがわかった。脳の PrP^{Sc} の蓄積と ATF3 の発現を経時的に解析した結果、PrP^{Sc} が感染初期から蓄積する脳領域で、ATF3 が神経細胞に発現誘導されることが分かった。以上の結果から、プリオン病では、PrP^{Sc} 増殖に加えて、ATF3 を中心としたシグナル伝達経路が活性化することで神経細胞死が起こる、という仮説が立てられた。

活性化グリア細胞が神経変性に關与する可能性を鑑み、プリオン感染初代培養神経細胞と感染マウスの脳から分離した活性化マイクログリアとの共培養を試みた。しかし、ATF3 の発現誘導や神経細胞死は認められなかった。この結果は、プリオン感染と活性化マイクログリア由来因子だけでは神経変性を惹起するのに不十分であることを示唆している。

本研究からプリオン病の神経変性には PrP^{Sc} の増殖に加えて ATF3 を中心としたストレス応答が重要であることが示唆された。しかし、神経変性を惹起する活性化グリア細胞由来の因子の同定には至らなかった。今後、ATF3 分子を中心として ATF3 の上流解析、下流解析を行うことで、より詳細な神経変性機構が解明できると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Retrograde Transport by Clathrin-Coated Vesicles is Involved in Intracellular Transport of PrP^{Sc} in Persistently Prion-Infected Cells. Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Scientific reports 8(1) 12241 2018 査読有

DOI: 10.1038/s41598-018-30775-1

Flow Cytometric Detection of PrP^{Sc} in Neurons and Glial Cells from Prion-Infected Mouse Brains. Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Journal of Virology 92(1) 2018 査読有

DOI: 10.1128/JVI.01457-17

〔学会発表〕(計 4 件)

山崎 剛士、岩丸 祥史、鈴木 章夫、長谷部 理絵、堀内 基広、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、第 161 回日本獣医学会学術集会、2018 年

Takeshi Yamasaki, Akio Suzuki, Rie Hasebe and Motohiro Horiuchi, Comparison of intracerebral spread of abnormal isoform of prion protein between three rodent prion strains., Asian Pacific Prion Symposium 2018 (国際学会), 2018 年

Takeshi Yamasaki, Akio Suzuki, Rie Hasebe and Motohiro Horiuchi, Comparison of intracerebral spread of abnormal isoform of prion protein between three rodent prion strains., 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018 年

Takeshi Yamasaki, Yoshifumi Iwamaru, Yuichi Matsuura, Minoru Kuroda, Rie Hasebe, Hiroyuki Okada and Motohiro Horiuchi, Characterization of gene expression profiles in brains of mice infected with typical and atypical BSEs., Asia Pacific Prion Symposium 2017 (国際学会), 2017 年

〔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〕
該当なし

6．研究組織
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。