

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16904

研究課題名(和文)プリオン病におけるTGM1発現アストロサイト亜集団の病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文)Clarification of pathophysiological role of astrocytes that express transglutaminase 1 in prion diseases

研究代表者

山崎 剛士 (Yamasaki, Takeshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員

研究者番号：70709881

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)：多くの神経変性疾患でグリア細胞が形成する脳内環境の変化が神経変性に関与する。しかしプリオン病におけるアストロサイトの病態生理学的意義は十分に理解されていない。我々はプリオン病モデルマウスの病態解析によりトランスグルタミナーゼ1 (TGM1) が神経脱落部のアストロサイトに発現誘導されることを見出した。プリオン感染初代神経細胞とアストロサイトの共培養系を用いてTGM1発現と神経変性の関係を超解像顕微鏡で解析したところ、TGM1とプリオン病原タンパクとの相互作用が示唆されたが神経変性効果はみられなかった。そこでTGM1陽性アストロサイトの機能解析を行うためのアデノ随伴ウイルスベクターを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオン病モデルマウスの脳内神経脱落部位でアストロサイトにTGM1が発現誘導されること、アストロサイトでのTGM1の発現がプリオン感染神経細胞に変性効果を示さないことを考えると、TGM1の直接的な神経変性への関与は薄いと考えられる。最近、TGM1が神経保護的なA2アストロサイトのマーカーとする報告が蓄積している一方で、アストロサイト亜集団をA1/A2の分類に留めず、神経変性疾患特異的なアストロサイト亜集団を考慮すべきという考え方も普及してきている。本研究で示されたウイルスベクターを用いた方法論は、TGM1陽性アストロサイトを含む疾患特異的なアストロサイト亜集団の機能解析への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Alteration of the brain environment by activated glial cells is considered to be closely associated with the mechanism of neurodegeneration in many neurodegenerative diseases. However, the pathophysiological role of astrocytes in prion-diseases has not been fully understood. Previously, we analyzed the pathogenesis in prion-disease model mice, and found that the expression of Transglutaminase 1 (TGM1) was induced in astrocytes at the brain regions where neuronal loss was observed. Here, we analyzed relationship between the TGM1 expression and neurodegeneration using the co-culture system of prion-infected primary neurons and astrocytes. The imaging by super-resolution microscopy revealed the close association between TGM1 molecules and pathogenic prion proteins. However, we could not observe any cytotoxic effect by the TGM1 expression. Therefore, we developed a novel adeno-associated viral vector which enables the analysis of the function of TGM1-positive astrocytes.

研究分野：プリオン病学

キーワード：神経変性疾患 Transglutaminase 1 アストロサイト プリオン病

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病 (CJD)、ヒツジのスクレイピー、ウシ海綿状脳症、シカ科動物の慢性消耗病に代表される感染性・致死性の神経変性疾患である。その成因から、由来が不明の孤発性、プリオンタンパク質遺伝子の変異に起因する遺伝性、他個体から感染することが原因の獲得性の3つに大別される。ヒトのプリオン病の約75%を孤発性CJDが占め、人口100万人当たり年間ほぼ一人の割合で発症することから、ヒトのプリオン病の発生自体を止めることはできない。プリオン病患者の脳では、本来正常な機能を持つ正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) が構造異常を起こすことで異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) となり、PrP^{Sc} が神経細胞で増殖・蓄積して神経変性を引き起こす。近年、PrP^{Sc} を標的とした画像診断や脳脊髄液・鼻粘膜を用いた高感度診断法が開発され、プリオン病の早期診断が可能になるとしている。以前にも増して治療・予防法の確立が強く求められているが、PrP^{Sc} を標的とした治療薬を含めプリオン病に有効な治療法は存在しない。プリオン病の克服のためには、PrP^{Sc} を標的とした治療薬の探索に加えて、神経変性機構を標的とした新たな治療戦略が必要とされており、そのメカニズムの解明が急務である。

多くの神経変性疾患に共通して、活性化したグリア細胞が形成する脳内環境の変化が神経変性に関与することが知られている。プリオン病の動物の脳では、PrP^{Sc} の蓄積部位に付随して神経細胞死やミクログリア・アストロサイトの活性化が認められる。プリオン病モデルマウスでは、臨床症状期にミクログリアの増生を抑制することで、炎症性サイトカインの発現が低下し、生存期間が延長する。一方、前臨床症状期にミクログリアを脳から除去すると、神経症状が悪化して生存期間が短縮する。これらの結果は、プリオン病モデルマウスの脳には活性化状態の異なるミクログリアが存在し、病態が進行するにつれてミクログリアの活性化状態が炎症性に遷移して神経傷害性に働くことを示唆している。

プリオン病の病態における活性化ミクログリアの役割が解明されつつある一方で、アストロサイトの病態生理学的意義に関しては十分に理解されていない。古くから、アストロサイトは神経細胞の支持細胞として神経保護的な役割を持つと考えられてきた。しかし近年、発生・発達・老化などの生理的条件下あるいは脳損傷や脳症などの病的条件下において、貪食性アストロサイトや神経毒産生アストロサイト、老化型アストロサイト、A1アストロサイトと呼ばれる神経傷害性のアストロサイトが存在することが報告されており、プリオン病においてもアストロサイトの亜集団の理解とその機能の解明が求められている。

我々は、プリオン病の神経変性機構の解明のため、プリオン病モデルマウスの脳病変部のトランスクリプトーム解析、およびプリオン病モデルマウスの脳から分離した活性化ミクログリア・アストロサイトのトランスクリプトーム解析を行ってきた。その過程で、Transglutaminase 1 (TGM1) が神経脱落部位に発現誘導されることを見出した。TGM1を発現する細胞種と脳内分布を免疫組織学的手法により経時的に解析したところ、TGM1が神経細胞の脱落に先立ち、GFAP陽性の活性化アストロサイトの一部に発現誘導されることを発見した。さらに、TGM1陽性アストロサイトが、神経細胞を貪食するミクログリアに接触する像が観察された(図1)。このことは、プリオン病においても活性化アストロサイトに亜集団が存在すること、TGM1陽性のアストロサイトがミクログリアと協働して神経変性に関与することを示唆している。

Transglutaminase family は分子間架橋に関与する酵素群であり、Transglutaminase family の中でも TGM2 は中枢神経組織において神経傷害性に働くという報告が蓄積している。一方で、TGM1 は神経保護的な A2 アストロサイトが発現する分子群のひとつとして報告されているが、TGM1 の中枢神経組織での機能はほとんど知られていない。プリオン病の病態において、アストロサイトが発現する TGM1 分子がどのように神経変性に関与するのか、TGM1 陽性アストロサイトが神経保護的に働くのか、神経傷害性に働くのかという「問い」を解くことは、プリオン病のアストロサイト亜集団の機能を理解する上で重要な課題である。

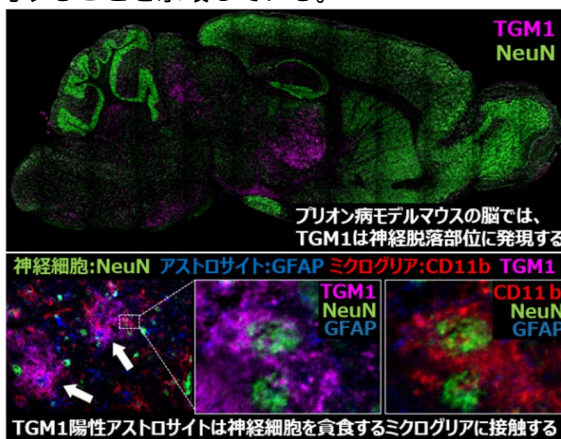


図1. プリオン病モデルマウスの脳でのTGM1の発現

2. 研究の目的

TGM1 は皮膚で発現して上皮組織角質層の形成に関わると報告されているが、生理的条件下では中枢神経組織で発現しないため、その機能については不明である。本研究では、神経変性疾患の疾患モデルとしてプリオン病モデルを用い、神経変性過程における TGM1 分子の機能を明らかにすること、プリオン病における TGM1 陽性アストロサイトの病態生理学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プリオン病 ex vivo 実験系の樹立

研究の効率化のため、プリオン病モデルマウスの脳内で起こるアストロサイトでの TGM1 分子の発現を ex vivo 実験系で再現することを試みた。マウス胎仔大脳皮質より初代培養神経細胞および初代培養混合グリア細胞をそれぞれ調整した。初代神経細胞にプリオン感染マウスの脳由来抽出物を接種することで、プリオン感染初代培養神経細胞を調整した。その後、混合グリア細胞を神経細胞の培養系に加えて、プリオン感染神経細胞とアストロサイトの共培養系を樹立した。さらに、アストロサイト特異的な TGM1 の発現を実現するため、アストロサイト特異的なプロモーター-hGfaABC₁D 下に TGM1 を発現するベクターを血清型 PHP.eB のアデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) にパッケージングし、上記共培養系に接種した。PrP^{Sc} と TGM1 を免疫染色した後、超解像共焦点顕微鏡 LSM800 を用いて画像解析に供した。

(2) TGM1 陽性アストロサイト除去用ウイルスベクターの開発

TGM1 陽性アストロサイトの役割を明らかにするため、マウスの脳から TGM1 陽性アストロサイトを除去する方法を計画・検討した。TGM1 プロモーター下に自殺誘導遺伝子 FKBP 付加 Caspase8 (FKBP-Casp8) を配置したベクターを血液脳関門透過型の rAAV-PHP.eB にパッケージングし、静脈投与によりマウスの脳へ送達する計画である。FKBP-Casp8 は低分子化合物 AP20187 存在下で 2 量体を形成し Caspase 活性を発揮してアポトーシスを誘導する。公開トランスクリプトームデータベースを用いて TGM1 遺伝子の体内発現分布を検索すると、皮膚での発現が高いことから、TGM1 プロモーター下に FKBP-Casp8 を発現する方法では、アストロサイトに加えて皮膚細胞のアポトーシスを誘導することが懸念された。そこで、Cre/loxP システムで TGM1 陽性アストロサイト特異的に FKBP-Casp8 を発現する 2 ベクターシステムを構築した。アストロサイト特異的な hGfaABC₁D プロモーター下に Cre を発現する rAAV-PHP.eB、Cre 依存的に TGM1 プロモーター下で FKBP-Casp8 を発現する FLEX 型 rAAV-PHP.eB をそれぞれ調整した。

4. 研究成果

プリオン感染初代培養神経細胞と初代培養アストロサイトの共培養を作製し、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、共培養系内のアストロサイト特異的に TGM1 の過発現を試みたところ、プリオン病の病原タンパク質である PrP^{Sc} と TGM1 分子の共局在が見られた。超解像共焦点顕微鏡を用いて詳細な解析を行った結果、神経細胞で増殖した PrP^{Sc} とアストロサイトで発現した TGM1 分子が極めて近接することが明らかになった (図 2)。アストロサイトの発現する TGM1 分子と PrP^{Sc} の間に何らかの相互作用があることを示唆する一方で、プリオン感染神経細胞に神経変性の兆候は認められなかった。

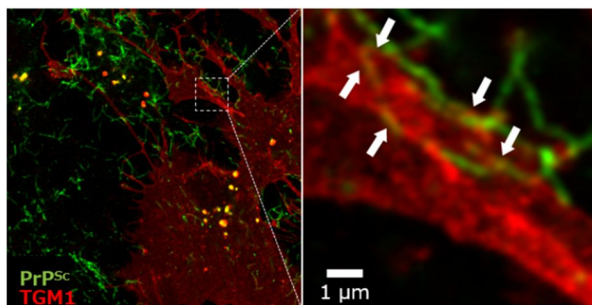


図2. ex vivo実験系でのTGM1とPrP^{Sc}の共局在

TGM1 陽性アストロサイトの役割を明らかにするため、マウスの脳から TGM1 陽性アストロサイトを除去する方法を計画した。アデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) を用いて自殺誘導遺伝子を発現させ、脳から TGM1 陽性アストロサイトを除去することで、プリオン病モデルマウスの病態への影響を評価する計画であった。しかし、本ベクターでは TGM1 が発現している皮膚でのアポトーシス誘導が懸念されたため、Cre/loxP システムで TGM1 陽性アストロサイト特異的にアポトーシスを誘導する 2 ベクターシステムの rAAV-PHP.eB を作製した (図 3)。株化培養を用いて Cre/loxP システムで発現させた FKBP-Casp8 がアポトーシス誘導を起こすか否かを評価したところ標的細胞の除去効果が確認できたことから、本法がアストロサイト亜集団の機能を解析する上で有用なツールとなることが示された。



図3. TGM1陽性アストロサイト特異的アポトーシス誘導2ベクターシステム

プリオン病モデルマウスの脳内神経脱落部位でアストロサイトに TGM1 が発現誘導されること、アストロサイトでの TGM1 の発現がプリオン感染神経細胞に変性効果を示さないことを考えると、TGM1 の直接的な神経変性への関与は薄いと考えられる。最近、TGM1 が神経保護的な A2 アストロサイトのマーカーとする報告が蓄積している一方で、アストロサイト亜集団を A1/A2 の分類に留めず、神経変性疾患特異的なアストロサイト亜集団を考慮すべきという考え方も普及してきている。本研究で示されたウイルスベクターを用いた方法論は、TGM1 陽性アストロサイトを含む疾患特異的なアストロサイト亜集団の機能解析への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi Yamasaki, Akio Suzuki, Rie Hasebe, Yuichi Matsuura, Kohtaro Miyazawa, Yoshifumi Iwamaru, and 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 PRION 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------