

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580389

研究課題名（和文） ミクログリアからのプリオン放出機構に関する研究

研究課題名（英文） Study on the molecular mechanisms of prion secretion from microglial cells

研究代表者

竹之内 敬人（TAKENOUCHI TAKATO）

独立行政法人農業生物資源研究所・動物生体防御研究ユニット・主任研究員

研究者番号：20292518

研究成果の概要（和文）：病原体“プリオン”が感染細胞から近隣の非感染細胞へ細胞間を伝播するメカニズムは未解明である。本研究では、脳内でのプリオン拡散に重要な役割を持つミクログリアに注目し、ミクログリアで多く発現している ATP 受容体サブタイプ P2X7 受容体とプリオン放出との関連について検討した。その結果、プリオンを貪食したミクログリアでは P2X7 受容体活性化に伴いプリオンが細胞外に放出されることがわかった。また、P2X7 受容体アンタゴニストとしても知られる Brilliant blue G (BBG) がプリオン感染細胞及びマウスにおいてプリオン蓄積を抑制することがわかった。

研究成果の概要（英文）：Prions are infectious agents composed of protein, and cause transmissible spongiform encephalopathies which are neurodegenerative diseases in mammals. The molecular mechanisms that regulate the spread of prion from cell to cell still remain obscure. In this study, we examined the role of ATP-gated P2X7 receptor (P2X7R) in the release of prions from microglial cells. We found that P2X7R activation promotes the prion release in microglia ingesting prions. We also found that brilliant blue G (BBG) which is known as a P2X7R antagonist reduces prion accumulation both *in vitro* and *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：プリオン、ミクログリア、P2X7 受容体

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は感染性蛋白質“プリオン”を病原体とする致死性・伝達性の神経変性疾患の総称であり、ヒツジ・ヤギのスクレイピー、牛海綿状脳症（BSE）、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）などが知られて

いる。BSE は多くの動物種に伝達可能であり、変異型 CJD の原因であると考えられていることから、プリオン病は人獣共通の感染症としての側面を持っている。

プリオンの主要な構成成分は異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）であり、宿主に発現する正

常プリオン蛋白質 (PrP^C) を構造変換することで複製・増幅する。PrP^C は C 末端に GPI アンカーを持つ細胞膜結合型の蛋白質であり、変換した PrP^{Sc} も含め単独では細胞外に分泌されないため、PrP^{Sc} が細胞間を伝播するメカニズムは未解明である。最近、エキソソームやマイクロベシクルなど分泌性の膜小胞に PrP^{Sc} が存在し、これらが細胞外へ放出されることで PrP^{Sc} も伝播することが示されたが、PrP^{Sc} を含む膜小胞の放出に関わる分子やメカニズムについては不明である。

一方、P2X7 受容体はイオンチャネル型 ATP 受容体サブタイプの 1 つであり、単球・マクロファージ等の免疫系細胞に特徴的に発現する。P2X7 受容体は多様な細胞内情報伝達系を活性化し生理的作用を発揮する一方で、その機能異常がアルツハイマー病などの神経変性疾患の病態進行に関与することも知られている。

脳内で P2X7 受容体は免疫担当細胞であるミクログリアに多く発現し、免疫機能調節に関与する。ミクログリアの異常活性化は神経変性疾患発症と密接に関連しており、プリオン病においてもその関与が知られている。我々は、プリオンが持続感染したミクログリア細胞株を樹立し、この細胞での P2X7 受容体の発現増加及び機能亢進について報告した。また最近、P2X7 受容体活性化によるエキソソームやマイクロベシクルの放出促進も示されている。これらの報告から、ミクログリアにおいて P2X7 受容体が PrP^{Sc} 放出を介してプリオンの細胞間伝播に関与する可能性が高いと考え、本研究課題を提案した。

2. 研究の目的

プリオン感染マウス脳のミクログリアには高い感染性が確認されている。これはミクログリアが、プリオン感染によって死んだ神経細胞などを貪食し、細胞内に多くの PrP^{Sc} を貯留するためであると考えられる。よって本研究ではまずこの病態を反映した、培養ミクログリアをプリオン病発症マウスの脳乳剤に暴露し PrP^{Sc} を貪食させた細胞モデル系を構築し、P2X7 受容体活性化と PrP^{Sc} 放出との関連性及び関与するメカニズムを解析した。

またミクログリアには発現量は低い PrP^C も存在し、ミクログリア自体が PrP^{Sc} を複製・増幅する。我々は、PrP^C 過発現ミクログリア細胞株を用いることでプリオンが持続感染したミクログリア細胞株 (ScMG20) の樹立に成功した。ScMG20 細胞では、定常的に放出された PrP^{Sc} が断続的に次の細胞に

伝播し持続感染を維持している可能性も考えられる。よって、この細胞について P2X7 受容体活性化と PrP^{Sc} 放出・細胞間伝播との関連性を検討した。さらにプリオン感染マウスに P2X7 受容体アンタゴニストを投与することで、プリオン病の病態進行における P2X7 受容体の関与について *in vivo* で検証した。

3. 研究の方法

- (1) PrP^{Sc} の検出: PrP^{Sc} は PrP^C と異なり蛋白質分解酵素処理に対し部分抵抗性を示す。よって、サンプルをプロテイナーゼ K (PK) で処理し、ウエスタンブロット法あるいは Seprion ELISA 法により PK 抵抗性の PrP^{Sc} を検出した。
- (2) PrP^{Sc} 貪食ミクログリア細胞モデルの構築: 正常不死化ミクログリア細胞株 (MG6) をマウススクレイピー ME7 株感染マウス脳乳剤に 1 時間暴露後洗浄し、1 晩培養した。
- (3) PrP^{Sc} 放出機構の解析: PrP^{Sc} 貪食 MG6 細胞または ScMG20 細胞を P2X7 受容体アゴニストである ATP で 30 分間刺激し、培養上清中へ放出される PrP^{Sc} を検出した。P2X7 受容体アンタゴニストまたは細胞内情報伝達系の阻害剤を用いることで PrP^{Sc} 放出に関わるメカニズムを調べた。
- (4) プリオン感染マウスに対する Brilliant blue G (BBG) の投与実験: ヒトプリオン由来マウス適合プリオン Fukuoka-1 株感染マウス脳乳剤を C57BL/6 マウスに脳内接種し、100 日後から発症・致死まで BBG (100 mg/kg, 500 μ l) を週に 2-3 回腹腔内投与した。

4. 研究成果

- (1) PrP^{Sc} 貪食 MG6 細胞を ATP 刺激すると緩衝液中への PrP^{Sc} 放出が観察された (図 1)。P2X7 受容体機能を阻害する Mg²⁺ を緩衝液から除去すると、さらに顕著な PrP^{Sc} 放出が観察された (図 1)。この放出は Ca²⁺ 除去および P2X7 受容体アンタゴニスト Oxidized-ATP (OxATP) 添加により減弱したことから (図 1)、P2X7 受容体活性化に伴う細胞内への Ca²⁺ 流入が PrP^{Sc} 放出に関与すると考えられた。PrP^{Sc} を含む膜小胞には誘導性の放出機構に加えて、定常レベルでの持

続的な放出機構の存在が推測される。そこで、無刺激の PrP^{Sc} 貪食 MG6 細胞を P2X7 受容体アンタゴニストのみで処理することで、定常的な PrP^{Sc} 放出機構への P2X7 受容体の関与について調べた。その結果、OxATP 添加により定常的な PrP^{Sc} の放出量が低下することがわかった (図 1)。よって、定常レベルでの持続的な PrP^{Sc} 放出機構にも P2X7 受容体の関与が示唆された。

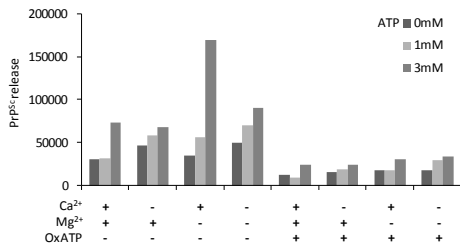


図 1 ATP 刺激による PrP^{Sc} 貪食 MG6 細胞から培養上清中への PrP^{Sc} 放出 (Seprion ELISA 法)。

- (2) 次に、ATP 刺激した ScMG20 細胞の培養上清中の PrP^{Sc} を測定したが、有意な PrP^{Sc} 放出は検出されなかった。つまり貪食された PrP^{Sc} と異なり、ミクログリアで持続感染している PrP^{Sc} は P2X7 受容体活性化によって積極的に放出されないことが示唆された。また、ScMG20 細胞を P2X7 受容体アンタゴニスト (BBG, OxATP, A438079) で処理したところ、BBG によってのみ持続感染している PrP^{Sc} 量の有意な減少が観察された (図 2)。これは同時に、BBG による ScMG20 細胞での PrP^{Sc} 量の減少が P2X7 受容体を介した効果では無い可能性も示唆している。さらに、試験管内での PrP^{Sc} 増幅実験を行ったところ、BBG には PrP^{Sc} 複製を直接阻害する効果は無かったことから、PrP^{Sc} 増幅に関わる細胞内メカニズムが BBG 処理で影響を受けることによって PrP^{Sc} 量が減少したと考えられた。

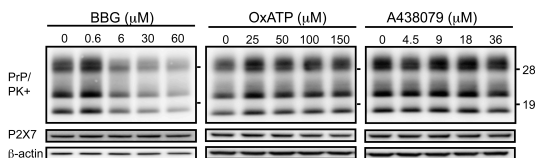


図 2 ScMG20 細胞での PrP^{Sc} 蓄積に対する BBG の抑制効果。

- (3) プリオン感染マウスに BBG を投与する

と、脳内に蓄積する PrP^{Sc} 量が有意に減少することがわかった (図 3)。また、プリオン病発症に伴い脳の P2X7 受容体発現量が増加するが、BBG の投与によってその増加が抑制されることもわかった (図 3)。しかしながら、プリオン病の病態を反映するシナプスの脱落、アストロサイト・ミクログリア細胞の増殖 (グリオシス) は抑制されなかった (図 3)。加えて、プリオン接種後のマウスの生存日数も延長されないことがわかった。これらの結果から、BBG には PrP^{Sc} 蓄積を抑制する効果はあるが、少なくとも今回の実験条件においてはプリオン病に対する治療効果を認める事は出来なかった。プリオン病の病態進行における P2X7 受容体の役割の解明には、BBG の投与条件のさらなる検討あるいは他の P2X7 受容体アンタゴニストを用いた *in vivo* での検討を継続する必要があると考えられた。

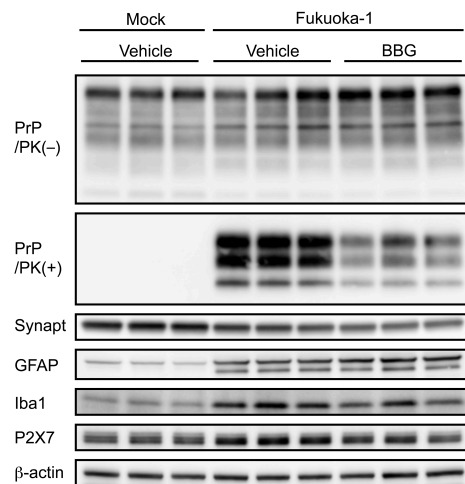


図 3 プリオン (Fukuoka-1 株) 感染マウスにおける BBG 投与の効果。Synapt: シナプスマーカー、GFAP: アストロサイトマーカー、Iba1: ミクログリアマーカー。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① **Takenouchi T***, **Iwamaru Y***, Imamura M, Fukuhara S, Sugama S, Sato M, Mochizuki N, Hashimoto M, Yokoyama T, Mohri S, Kitani H. Cytochalasin D enhances the accumulation of a protease-resistant form of prion protein in ScN2a cells: Involvement of PI3 kinase/Akt signalling pathway. *Cell Biol. Int.* (査読有) 2012, 36:1223-1231.

DOI: 10.1042/CBI20120329 (*Equal contribution)

- ② Iwamaru Y*, Takenouchi T*, Murayama Y, Okada H, Imamura M, Shimizu Y, Hashimoto M, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Anti-prion activity of Brilliant Blue G. *PLoS ONE* (査読有) 2012, 7:e37896. DOI: 10.1371/journal.pone.0037896 (*Equal contribution)
- ③ Takenouchi T, Iwamaru Y, Sugama S, Tsukimoto M, Fujita M, Sekigawa A, Sekiyama K, Sato M, Kojima S, Conti B, Hashimoto M, Kitani H. The activation of P2X7 receptor induces cathepsin D-dependent production of a 20-kDa form of IL-1 β under acidic extracellular pH in LPS-primed microglial cells. *J. Neurochem.* (査読有) 2011, 117:712-723. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07240.x.
- ④ Takenouchi T, Yoshioka M, Yamanaka N, Kitani H. Reversible conversion of epithelial and mesenchymal phenotypes in SV40 large T antigen-immortalized rat liver cell lines. *Cell Biol. Int. Rep.* (査読有) 2010, 17:e00001. DOI: 10.1042/CBR20100001

[学会発表] (計 6 件)

- ① 竹之内敬人, 岩丸祥史, 今村守一, 佐藤充, 横山隆, 毛利資郎, 木谷裕, プリオン感染 N2a 細胞での異常プリオン蛋白蓄積におけるアクチン骨格及び PI3 キナーゼ経路の関与、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、仙台
- ② Takenouchi T, Iwamaru Y, Tsukimoto M, Sato M, Kojima S, Hashimoto M, Kitani H. P2X7 receptor-mediated pathways involved in the production and release of a 20-kDa form of IL-1 β from LPS-primed microglial cells. *Purine* 2012、2012 年 5 月 31 日、福岡
- ③ Iwamaru Y, Takenouchi T, Imamura M, Shimizu Y, Murayama Y, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Brilliant blue G, an antagonist of the ATP sensitive receptor P2X7 prevents prion accumulation. *Prion* 2011、2011 年 5 月 17 日、モントリオール、カナダ
- ④ Iwamaru Y, Takenouchi T, Imamura M, Shimizu Y, Murayama Y, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H. Anti-prion activity

of Brilliant blue G, an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7. *Asian Pacific Prion Symposium 2011*、2011 年 7 月 11 日、軽井沢

- ⑤ 竹之内敬人, 岩丸祥史, 洲鎌秀永, 月本光俊, 佐藤充, 小島周二, 橋本款, 木谷裕, P2X7 受容体活性化に伴うミクログリアからの 20-kDa IL-1 β フラグメントの産生機構、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都
- ⑥ 岩丸祥史, 竹之内敬人, 清水善久, 今村守一, 村山裕一, 横山隆, 木谷裕, P2X7 受容体阻害剤 Brilliant Blue G は持続感染細胞におけるプリオン増殖を阻害する、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 8 日、神戸

[図書] (計 1 件)

- ① Takenouchi T, Sekiyama K, Tsukimoto M, Iwamaru Y, Fujita M, Sugama S, Kitani H, Hashimoto M. Role of autophagy in P2X7 receptor-mediated maturation and unconventional secretion of IL-1 β in microglia. *AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, and Infection*, Elsevier, 2013 in press

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹之内 敬人 (TAKENOUCHI TAKATO)
独立行政法人農業生物資源研究所・動物生体防御研究ユニット・主任研究員
研究者番号：20292518

(2)研究分担者

岩丸 祥史 (IWAMARU YOSHIFUMI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・プリオン病研究チーム・主任研究員
研究者番号：20355142