

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450397

研究課題名(和文) 補体因子によるプリオン増殖抑制効果の検討

研究課題名(英文) Analysis of suppressive role of complement factors in prion propagation

研究代表者

長谷部 理絵 (Hasebe, Rie)

北海道大学・獣医学研究院・講師

研究者番号：70431335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではプリオン初代培養神経細胞とプリオン感染マウスモデルを用いてプリオン病の神経病態における補体因子の機能を解析した。Chandler株感染神経細胞および感染マウスの脳では、補体因子C1qとC3が異常型プリオンタンパク質(PrPSc)蓄積量を減少させていること、22L株感染神経細胞および感染マウスの脳ではC3がPrPSc蓄積量を増加させていることが示唆された。本研究の結果より、プリオン感染神経細胞およびマウスの脳では、プリオン株により異なる補体因子が反応すること、補体反応が病態に与える影響が異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Roles of complement factors in neuropathogenesis of prion diseases are unknown. The results of the current study suggest that the amount of abnormal form of prion protein (PrPSc) was reduced in Chandler-infected primary cultured neurons, but was increased in 22L-infected neurons after temporary decrease. To assess the effects of complement reaction in in vivo prion infection, I injected lentivirus vectors harboring shRNA against complement factors C1qA and C3 into prion-infected mouse brains. In Chandler-infected mice, PrPSc was increased after C1q- and C3-shRNA injection. In contrast, PrPSc was decreased in 22L-infected mouse brains after C3-shRNA injection, but not C1qA-shRNA injection. These results suggest that the type and the effect of complement factors on the neuropathogenesis were different among the prion strains

研究分野：獣医病理学、病原微生物学

キーワード：プリオン病 補体因子 神経病態

1. 研究開始当初の背景

プリオン病には羊のスクレイピー、牛海綿状脳症(BSE)、人のクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)などがあり、BSEは人の変異型CJDの原因となることから、人獣共通感染症としても知られている。異常型プリオンタンパク質(PrP^{Sc})の沈着はプリオン病の病因であり、これまでもプリオン増殖抑制活性を持つ因子が報告されてきているが、その多くは発症前から投与をする必要があり、現在のところプリオン病に有効な治療法はない。補体は自然免疫因子であり、病原体の感染や神経変性疾患で脳内に発現することが報告されている。プリオン病では、補体因子C1q、C3、C3/C4受容体欠損マウスは末梢からのプリオン感染に抵抗性を示すことから、補体はプリオンが末梢から中枢神経系に侵入する過程で重要であると考えられてきた(Klein *et al.*, 2001; Mabbott *et al.*, 2001; Zabel *et al.*, 2007)。一方で、補体因子の神経病態における役割は不明である。C1q、C3、C5、Factor B 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(Klein *et al.*, 2001; Mabbott *et al.*, 2001, 2005)。しかし、補体因子がプリオン病の神経病態に関与している可能性も示唆されている。人のプリオン病患者の脳では、PrP^{Sc}の沈着に一致して補体が検出される。また、プリオンを脳内に感染させたマウスでは空胞変性が観察される以前から補体遺伝子の発現が上昇する(Dandoy-Dron *et al.*, 1998; Skinner *et al.*, 2006)。申請者は、プリオン持続感染マウス神経芽腫細胞に補体を作用させると、細胞膜の不安定化が起こり、細胞内膜のホスファチジルセリンが外膜に露出することを報告した(Hasebe *et al.*, *Virology* 2012)。神経芽腫細胞は末梢神経由来であり、中枢神経系の神経細胞とは性質が異なるが、プリオン感染初代培養神経細胞でも同様に、補体反応により膜の不安定化が起こることがこれまでの研究で明らかとなっている。初代培養神経細胞にスクレイピーChandler株を感染させると、感染10日前後からPrP^{Sc}量の増加が認められる。補体反応による膜の不安定化がPrP^{Sc}量に影響を与えるかを検討するために、Chandler株感染16日後の神経細胞に補体を反応させると、PrP^{Sc}量が減少した。しかし驚くことに、感染12日後に補体を反応させてもPrP^{Sc}の蓄積量に変化は認められなかった。以上の結果

から、補体反応はプリオン感染神経細胞からPrP^{Sc}を減少させるが、ある程度PrP^{Sc}が細胞に蓄積した後でないと補体反応が起こらないことが示唆された。すなわちPrP^{Sc}が増殖し、病気が進行した後でも治療効果が得られる可能性が期待された。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究は補体によるプリオン増殖抑制効果とPrP^{Sc}蓄積量の関係を複数のプリオン株で検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プリオン感染初代神経細胞におけるPrP^{Sc}の蓄積に対する補体因子の影響

胎齢15-16日のICRマウス胎仔の代の皮質より神経細胞を培養した。Chandler株と22L株感染マウスの脳より調整したミクロソーム画分を培養8日目の神経細胞に暴露した。対照として、非感染マウスの脳より調整したミクロソーム画分を神経細胞に暴露した。感染8、12、16、20日目にほぼ全ての補体因子を含む正常マウス血清を終濃度10%となるように培養上清に添加した。陰性対照として、非働化した正常マウス血清を培養上清に添加した。マウス血清添加4、8日後に細胞を回収し、Proteinase K処理後にPrP^{Sc}をウエスタンブロットにより検出した。PrP^{Sc}蓄積量の変化がマウス血清中の補体因子によるものかを確認するために、正常マウス血清に抗C1q、C3、C9抗体またはこれら3種の抗体を添加し、4°C3時間反応させた。その後、Protein Gビーズにより抗体を除去し、それぞれを培養上清に添加した。

(2) プリオン感染マウスモデルにおけるPrP^{Sc}の蓄積に対する補体因子の影響

4週齢のICRマウスの脳にChandler株と22L株感染マウスの脳乳剤、および非感染マウスの脳乳剤を接種した。感染90、120日後に左海馬および視床背側に補体因子C1qA、C3に対するshRNAを保有するレンチウイルスベクターを $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ infectious unit導入した。2週間後に脳を採材し、PrP^{Sc}特異的免疫染色によりPrP^{Sc}を検出した。

4. 研究成果

(1) プリオン感染マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞における PrP^{Sc} 蓄積

初代培養神経細胞における PrP^{Sc} 蓄積の動態を解析した。神経細胞を Chandler 株、22L 株感染および非感染感染マウス脳由来ミクロソームに暴露し、2、4、8、12、16、20 日目に PrP^{Sc} 量を解析した。Chandler 感染、22L 感染神経細胞ともに暴露後 8 日目から顕著に PrP^{Sc} 量が増加し、Chandler 感染神経細胞では 16 日目に、22L 感染神経細胞では 12 日目にプラトーに達した。

(2) プリオン感染初代神経細胞における PrP^{Sc} の蓄積に対する補体因子の影響

感染 8、12、16、20 日目に正常マウス血清 (NMS) および非働化マウス血清 (H-NMS) を添加し、4 および 8 日後に PrP^{Sc} をウェスタンブロットにより検出した。Chandler 感染神経細胞では、感染 12 日目に NMS を添加しても PrP^{Sc} 量に変化は認められなかったが、感染 16 および 20 日後に NMS を添加すると、PrP^{Sc} 量が H-NMS 添加群と比較して有意に減少した (図 1A、C)。一方で 22L 感染神経細胞では、感染 8 日目に NMS を添加しても PrP^{Sc} 量に変化は認められなかったが、感染 12 および 16 日後に NMS を添加すると、添加 4 日後には PrP^{Sc} 量が H-NMS 添加群と比較して有意に減少したのち、添加 8 日後には増加した (図 1B、D)。しかしながら、感染 20 日後には PrP^{Sc} 量に変化は認められなかった。以上の結果から、補体因子の反応にはある程度の PrP^{Sc} 蓄積が必要であり、かつ PrP^{Sc} 量がプラトーに達してから一定の期間までしか起こらないことが示唆された。また、プリオン株により PrP^{Sc} 蓄積量に異なる影響を与えることが示唆された。

これらの変化が補体因子によるものかを確認するために、NMS から補体因子を除去した血清を用いて Chandler 感染神経細胞では感染 20 日目に、22L 感染神経細胞では感染 12 日目に同様の実験を行った。その結果、Chandler 感染神経細胞では C1q、C3、C9 を除去したときに、NMS 添加群と比較して有意に PrP^{Sc} 量が増加した (図 1E、G)。一方で、22L 感染神経細胞では C3 を除去したときのみ NMS 添加群と比較して有意に PrP^{Sc} 量が減少した (図 1F、H)。以上の結果から、反応する補体因子はプリオン株によりことなること

が示唆された。

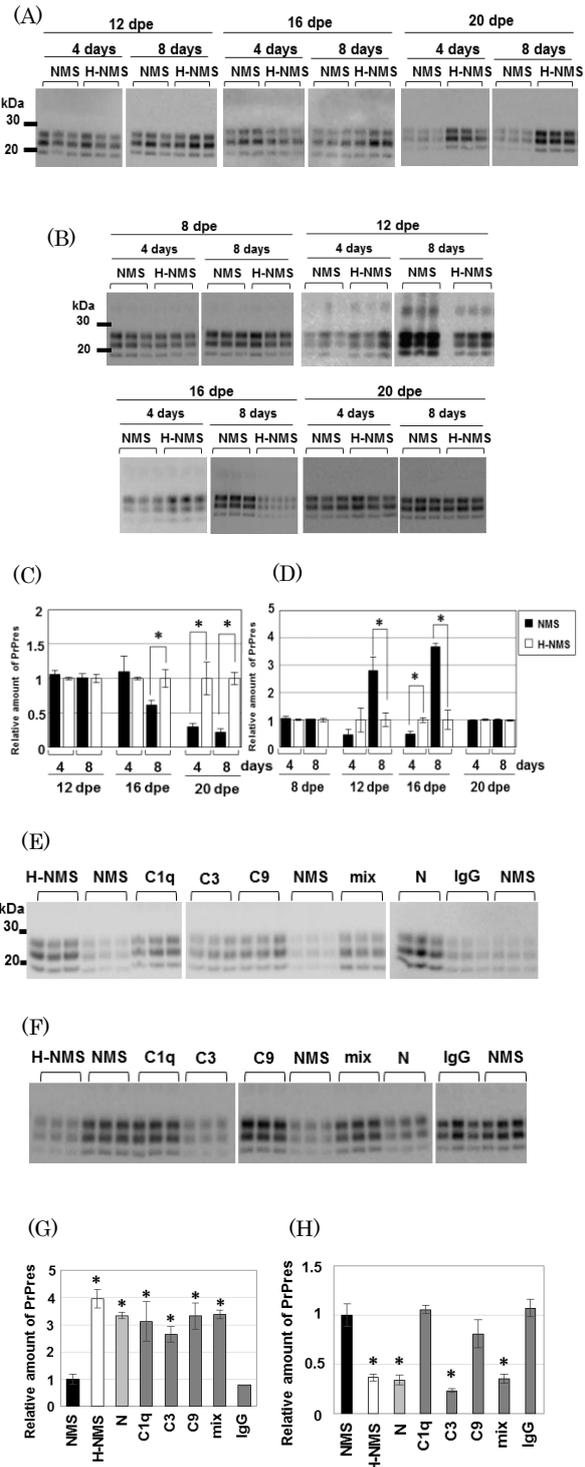


図 1. 補体因子の反応による PrP^{Sc} 蓄積量の変化. (A) NMS または H-NMS 添加 Chandler 感染神経細胞における PrP^{Sc} 蓄積. (B) NMS または H-NMS 添加 22L 感染神経細胞における PrP^{Sc} 蓄積. (C, D) Chandler (C) および 22L (D) 感染神経細胞における PrP^{Sc} 蓄積量の定量解析. 黒: NMS. 白: H-NMS. * p < 0.05 (Student's t-test). (E-G) Chandler (E, G) および 22L (F, H) 感染神経細胞の PrP^{Sc} 蓄積量に対する補体因子

除去の効果と PrP^{Sc} 蓄積量の定量解析 (G, H).
 N: 血清添加なし. mix: 抗 C1q-, C3-, C9-抗体
 の混合液. IgG: 抗マウス IgG 抗体(陰性対照).
 *p<0.05 (Dunnett's test)

(3) プリオン感染マウスにおける補体遺伝子ノックダウンの PrP^{Sc} 蓄積量への影響

In vivo でのプリオン感染において補体因子が PrP^{Sc} 蓄積量へ及ぼすかを検討するために、Chandler および 22L 感染マウス 90、120 日目に補体因子 C1qA、C3 に対する shRNA をレンチウイルスベクターにより脳内に導入した。in situ hybridization により、shRNA を導入した側と反対側の海馬および視床において、これらの因子の遺伝子発現がノックダウンされていることを確認した (図 2A)。Chandler 感染マウスでは感染 90 日目に C1qA および C3 に対する shRNA を導入した場合、コントロール shRNA を導入したものと比較して PrP^{Sc} 蓄積量が増加した (図 2B)。一方で 22L 感染マウスでは、90 日目に C3 に対する shRNA を挿入した場合のみコントロールと比較して PrP^{Sc} 量が減少した (図 2C)。120 日目に shRNA を導入した場合は、Chandler と 22L 感染マウスいずれも効果が認められなかった (図 2B, C)。

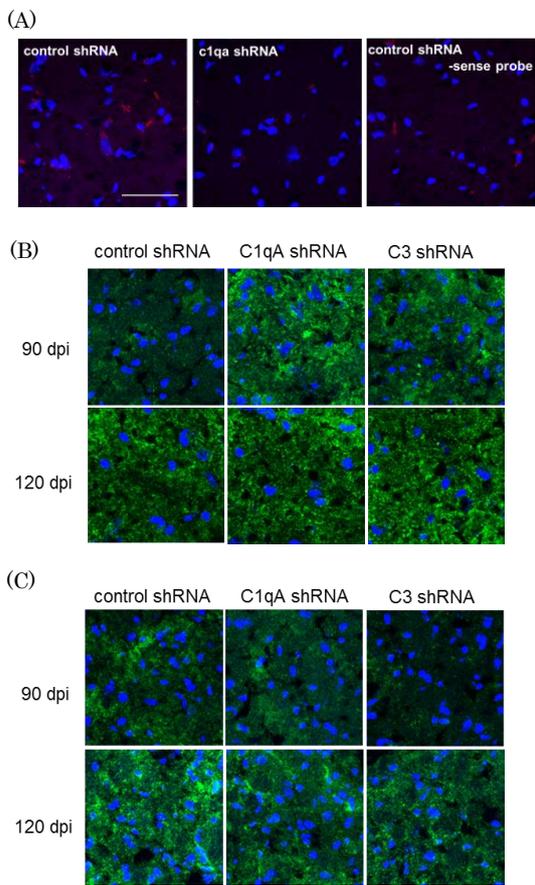


図 2. プリオン感染マウス脳内への shRNA 導入による補体遺伝子のノックダウンが PrP^{Sc} 蓄積量に与える影響. (A) shRNA による C1qA 遺伝子のノックダウン. 赤: C1qA. 青: 核. (B) shRNA 導入による Chandler 感染マウス視床における PrP^{Sc} 蓄積量の変化. (C) shRNA 導入による 22L 感染マウス視床における PrP^{Sc} の蓄積量の変化. 緑: PrP^{Sc}. 青: 核.

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 9 件)

1. Hasebe R, Tanaka M, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Complement factors alter the amount of PrP^{Sc} in primary-cultured mouse cortical neurons associated with increased membrane permeability. *Virology*. 2016. 496: 9-20. 査読有.
2. Tanaka M, Fujiwara A, Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Masujin K, Horiuchi M. Comparison of abnormal isoform of prion protein in prion-infected cell lines and primary-cultured neurons by PrP^{Sc}-specific immunostaining. *J Gen Virol*. 2016. 97: 2030-2042. 査読有.
3. Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Establishment of a simple cell-based ELISA for the direct detection of abnormal isoform of prion protein from prion-infected cells without cell lysis and proteinase K treatment. *Prion*. 2016. 10: 305-318.
4. Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, Horiuchi M. Temporary upregulation of anti-inflammatory cytokine IL-13 expression in the brains of CD14 deficient mice in the early stage of prion infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014. 454: 125-130. 査読有.
5. Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Comparison of the anti-prion mechanism of four different anti-prion compounds, anti-PrP monoclonal antibody 44B1, pentosane polysulfate, chlorpromazine, and U18666A, in prion-infected mouse neuroblastoma cells. *PLOS One*. 2014. 9: e106516. 査読有.
6. Kobayashi S, Orba Y, Yamagushi H, Takahashi K, Sasaki M, Hasebe R, Kimura T, Sawa H. Autophagy inhibits viral genome replication and gene expression stages in West Nile virus infection. *Virus Res*. 2014. 191: 83-91. 査読有.
7. Yamasaki T, Baron GS, Suzuki A, Hasebe

- R, Horiuchi M. Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP^{res} and newly generated PrP^{Sc} during early stage prion infection in Neuro2a cells. *Virology*. 2014. 450-451: 324-335. 査読有.
8. Hirano M, Yoshii K, Sakai M, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H. Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol*. 2014. 95: 849-861. 査読有.
 9. Makino Y, Suzuki T, Hasebe R, Kumura T, Maeda A, Takahashi H, Sawa H. Establishment of tracking system for West Nile virus entry and evidence of microtubule involvement in particle transport. *J Virol Methods*. 2014. 195: 250-257. 査読有.
- [学会発表] (計 26 件)
1. Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Neuron and glial cell type-specific detection of PrP^{Sc} in prion-infected mouse brain by flow cytometry. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016 年 9 月 13 日～2016 年 9 月 25 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌).
 2. Kuroda M, Yamasaki T, Hasebe R, Suzuki A, Horiuchi M. Analysis of activation state of microglia and astrocytes in prion-infected mice by RNA-sequencing. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016 年 9 月 13 日～2016 年 9 月 25 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌).
 3. Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Utility of cervid recombinant PrP for the detection of L-BSE and CWD prions by RT-QuIC. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 2016 年 9 月 13 日～2016 年 9 月 25 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌).
 4. 長谷部 理絵, 青島 圭佑, 棟居 佳子, 三谷 朋宏, 平井 佑治, 山崎 剛士, 木村 享史, 堀内 基広. 北大農場で発生したリステリア症罹患羊飼育環境からのリステリア属菌の分離とゲノム解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年 9 月 6 日～2016 年 9 月 8 日. 日本大学 (神奈川県・藤沢).
 5. 平井佑治, 神吉 政史, 長谷川 めぐみ, 池田 徹也, 長谷部 理絵, 堀内 基広. リステリアモノサイトゲネスの腸管上皮細胞モデルとの相互作用解析と分子遺伝学的解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年 9 月 6 日～2016 年 9 月 8 日. 日本大学 (神奈川県・藤沢).
 6. 田中 美咲, 舛甚 賢太郎, 山崎 剛士, 長谷部 理絵, 鈴木 章夫, 堀内 基広. 異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) 特異的免疫染色法に依るプリオン持続感染株化細胞とプリオン感染初代培養神経細胞における PrP^{Sc} の解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年 9 月 6 日～2016 年 9 月 8 日. 日本大学 (神奈川県・藤沢).
 7. 黒田 弥乃梨, 山崎 剛士, 鈴木 章夫, 長谷部 理絵, 堀内 基広. 次世代シーケンサーを用いた、プリオン感染マウス脳由来ミクログリアおよびアストロサイトの活性化状態の解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年 9 月 6 日～2016 年 9 月 8 日. 日本大学 (神奈川県・藤沢).
 8. Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Neuron and glial cell type-specific detection of PrP^{Sc} in prion infected mouse brain by flow cytometry. Prion 2016 (国際学会). 2016 年 5 月 10 日～2016 年 5 月 13 日. Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.
 9. Kuroda M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Transcriptome analysis of microglia and astrocytosis in prion-infected mice. Prion 2016 (国際学会). 2016 年 5 月 10 日～2016 年 5 月 13 日. Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.
 10. Tanaka M, Fujiwara A, Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Masujin K, Horiuchi M. Comparison of abnormal isoform of prion protein in prion-infected cell lines and primary cultured neurons by PrP^{Sc}-specific immunostaining. Prion 2016 (国際学会). 2016 年 5 月 10 日～2016 年 5 月 13 日. Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.
 11. Tanaka M, Masujin K, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Comparison of PrP^{Sc}-specific staining with two anti-PrP monoclonal antibodies 132 and 8D5 in immune-cytochemistry. The 63rd Annual Meeting of The Japanese Society for Virology. 2015 年 11 月 22 日～2015 年 11 月 24 日. 福岡国際会議場 (福岡県・福岡).
 12. Tanaka M, Masujin K, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Comparison of PrP^{Sc}-specific staining with two anti-PrP monoclonal antibodies in immunocytochemistry. APPS2015 (国際学会) 2015 年 9 月 4 日～2015 年 9 月 5 日. Kanazawa, Ishikawa, Japan.
 13. Hasebe R, Suzuki A, Yamasaki T, and Horiuchi M. Increased membrane permeability by complement factors affect PrP^{Sc} deposition in neurons. Prion 2015 (国際学会). 2015 年 5 月 26 日～2015 年 5 月

- 29 日. Fort Collins, Colorado, USA.
14. Kuroda M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Analysis of activation state of astrocytes with the progression of prion diseases. Prion 2015 (国際学会). 2015 年 5 月 26 日～2015 年 5 月 29 日. Fort Collins, Colorado, USA.
 15. Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Highthroughput detection of PrP^{Sc} for prion-infected cells without PK treatment: Cell-based ELISA for novel screening method for anti-prion compound. Prion 2015 (国際学会). 2015 年 5 月 26 日～2015 年 5 月 29 日. Fort Collins, Colorado, USA.
 16. Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Flow cytometric detection of PrP^{Sc} in neurons from prion-infected mouse brains. Prion 2015 (国際学会). 2015 年 5 月 26 日～2015 年 5 月 29 日. Fort Collins, Colorado, USA.
 17. 堀内 基広, 斎藤 真央, 長谷部 理絵, 山崎 剛士. プリオンの増殖に関わる細胞内小器官の同定ープリオン感染マウス脳組織の免疫組織学的解析からー. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10 日～2014 年 11 月 12 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜).
 18. 山崎 剛士, 鈴木 章夫, 長谷部 理絵, 堀内 基広. フローサイトメトリーによるプリオン感染細胞の検出. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10 日～2014 年 11 月 12 日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜).
 19. 長谷部 理絵, 鈴木 章夫, 山崎 剛士, 堀内 基広. 補体反応はプリオン感染マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞の細胞膜透過性を亢進し、異常型プリオンタンパク質の蓄積量を変化させる. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10 日～2014 年 11 月 12 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜).
 20. 黒田 弥乃梨, 山崎 剛士, 鈴木 章夫, 長谷部 理絵, 堀内 基広. プリオン感染の病態進行に伴うアストロサイトの活性化状態の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10 日～2014 年 11 月 12 日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜).
 21. 藤原 愛, 山崎 剛士, 鈴木 章夫, 長谷部 理絵, 堀内 基広. 大脳皮質由来初代培養神経細胞におけるプリオン感染の解析. 2014 年 9 月 9 日～2014 年 9 月 12 日. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道大学 (北海道. 札幌).
 22. 黒田 弥乃梨, 山崎 剛士, 鈴木 章夫, 長谷部 理絵, 堀内 基広. プリオン感染マ

ウス脳由来アストロサイトの活性化状態の解析. 2014 年 9 月 9 日～2014 年 9 月 12 日. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道大学 (北海道. 札幌).

23. Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Comparison of anti-prion mechanism of four different anti-prion compounds, anti-PrP monoclonal antibody 44B1, pentosane polysulfate, chlorpromazine, and U1866A in prion-infected mouse neuroblastoma cells. APPS2014 (国際学会). 2014 年 7 月 6 日～2014 年 7 月 7 日. Jeju, Korea.
24. Fujiwara A, Sassa Y, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Analysis of prion infection in primary cortical neurons. APPS2014 (国際学会). 2014 年 7 月 6 日～2014 年 7 月 7 日. Jeju, Korea.
25. Shan Z, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. High throughput detection of PrP^{Sc} from prion-infected cells without PK-treatment: cell based ELISA for novel screening for anti-prion compounds. APPS2014 (国際学会). 2014 年 7 月 6 日～2014 年 7 月 7 日. Jeju, Korea.
26. Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, Horiuchi M. Reaction kinetic analysis of anti-PrP monoclonal antibody 132 by surface plasmon resonance. APPS2014 (国際学会). 2014 年 7 月 6 日～2014 年 7 月 7 日. Jeju, Korea.

〔図書〕 (計 1 件)

1. 長谷部 理絵. 人獣共通感染症. 改訂 3 版. IV. 細菌性人獣共通感染症 8. リステリア症. 医薬ジャーナル社. 木村 哲, 喜田 宏 編. P265-269. 2016 年.

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷部 理絵 (HASEBE, Rie)

北海道大学・大学院獣医学研究院・講師

研究者番号: 70431335