

令和元年5月24日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19661

研究課題名(和文)プリオン蛋白質は耐性ウイルスを誘導しない夢のインフルエンザ薬のターゲットである

研究課題名(英文)Prion protein is a target molecule for a novel anti-influenza therapeutic

研究代表者

坂口 末廣(SAKAGUCHI, Suehiro)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・教授

研究者番号：60274635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規のインフルエンザ治療薬の開発を目指し、我々が見出したプリオン蛋白質(PrP)の抗酸化機能による抗インフルエンザ活性と抗PrP抗体による抗インフルエンザ活性の分子機構を解明する。野生型マウスと比べて、PrP欠損マウスの肺ではスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性が低下し、その活性に重要な銅も低下していた。従って、PrPは銅を肺内に留めSODを活性化し抗酸化機能を発揮すると考えられた。一方、抗PrP抗体はSODでなく、Srcを活性化した。また、Src阻害剤は抗PrP抗体の抗インフルエンザ活性を阻害した。従って、抗PrP抗体の抗インフルエンザ活性はSrcを介すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在使用されているオセルタミビル(タミフル)などのインフルエンザ治療薬の問題点は、薬剤耐性ウイルスを誘導することである。これは、これらの薬剤がウイルス蛋白質をターゲットにしていることが原因である。従って、ウイルス蛋白質でなく、宿主蛋白質をターゲットにすれば、薬剤耐性ウイルスを誘導しない新規のインフルエンザ治療薬ができると考えられる。本研究では、プリオン蛋白質の抗インフルエンザ活性のメカニズムと抗プリオン蛋白質抗体による抗インフルエンザ活性のメカニズムを解明し、プリオン蛋白質は薬剤耐性ウイルスを誘導しない新規のインフルエンザ治療薬のターゲット分子になり得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, to develop a novel therapeutic against influenza, we elucidated the mechanism for the anti-influenza activity mediated by the anti-oxidative function of prion protein (PrP) and the anti-influenza activity elicited by anti-PrP antibody (Ab). Compared to wild-type mice, PrP-knockout mice showed lower activity of superoxide dismutase (SOD) and lower contents of Cu ions in their lungs. These results suggest that PrP might function to retain Cu ions and activate SOD in lungs, thereby eliciting the anti-influenza activity. However, anti-PrP Ab activated Src not SOD. In addition, the Src inhibitor blocked anti-PrP Ab from eliciting anti-influenza activity. These results suggest that Src could be essential for anti-PrP Ab to execute the anti-influenza activity.

研究分野：分子生物学

キーワード：プリオン蛋白質 インフルエンザ インフルエンザウイルス 抗体 スーパーオキシドジスムターゼ Src

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在使用されているオセルタミビル (タミフル®) などのインフルエンザ治療薬の大きな問題点は、薬剤耐性ウイルスを誘導することである (①-③)。これは、これらの薬剤がウイルス蛋白質をターゲットにしていることが原因である (①-③)。従って、ウイルス蛋白質でなく、宿主蛋白質をターゲットにすれば、薬剤耐性ウイルスを誘導しない新規のインフルエンザ治療薬ができると考えられる。しかし、このようなインフルエンザ治療薬は開発されていない。

我々は、プリオン蛋白質欠損マウスにインフルエンザウイルスを鼻腔内感染させると、重症な肺炎を起こし非常に高い致死率で死亡すること、またプリオン蛋白質に対するモノクローナル抗体がインフルエンザウイルス感染による死亡率を著明に改善することを見出した。これらの結果は、宿主蛋白質であるプリオン蛋白質が抗インフルエンザ活性を有し、その活性が抗体により誘導できる可能性を示し、プリオン蛋白質が耐性ウイルスを誘導しないインフルエンザ治療薬のターゲット分子である可能性を示している。

### 2. 研究の目的

本研究では、プリオン蛋白質をターゲットにしたインフルエンザ治療薬の開発を目指し、プリオン蛋白質の抗インフルエンザ活性のメカニズムと抗プリオン蛋白質抗体による抗インフルエンザ活性の誘導メカニズムの解明を行なう。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス

C57BL/6 正常マウスは SLC から購入した。プリオン蛋白質ノックアウトマウスは以前に作製された (④)。

#### (2) インフルエンザウイルスの調整

A 型インフルエンザウイルス株 (PR8) を鶏卵の尿膜腔内で増殖させ、超遠心にて精製した後、リン酸緩衝液生理食塩水に懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

#### (3) インフルエンザウイルス感染、抗プリオン蛋白質抗体投与、および Src ファミリーキナーゼ阻害剤 dasatinib 投与

5 週令のマウスの両側の鼻腔内に  $20\ \mu\text{L}$  のウイルス量を接種した。接種後、2 週間マウスを観察した。抗プリオン蛋白質抗体投与は感染 1 日前に腹腔内に  $1\ \text{mg}/\text{マウス}$  で接種した。Dasatinib (Santa Cruz) を DMSO に溶解し、感染当日から  $200\ \mu\text{L}$  ( $20\ \text{mg}/\text{kg}$ ) を 1 日 1 回ゾンデで使用し経口投与した。

#### (4) 銅イオンの測定

銅イオンの量、Metallo assay low copper LS kit (Metallogenics) を用いて測定した。

#### (5) スーパーオキシドジスムターゼ活性の測定

スーパーオキシドジスムターゼ活性は、OxiSelect™ Superoxide dismutase activity assay kit (Cell Biolabs) を用いて測定した。

#### (6) Src ファミリーキナーゼ活性

抗 Src ファミリーキナーゼリン酸化抗体 (Cell Signaling Technology) を用いてウェスタン・ブロッティングを行い、調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) プリオン蛋白質は、肺内の銅イオン濃度を調節しスーパーオキシドジスムターゼを活性化させる

プリオン蛋白質は銅イオンと結合する (⑤)。そこで、プリオン蛋白質の抗インフルエンザウイルス活性における銅イオンの役割を明らかにするために、プリオン蛋白質ノックアウトマウスと野生型マウスの肺内における銅イオン濃度を測定した。その結果、ノックアウトマウスの肺内では銅イオンが低下していることが分かった (図 1)。これらの結果は、プリオン蛋白質は銅イオンを肺内に留めておくのに重要であることを示した。

銅イオンは、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼの活性に重要である (⑥)。そこで、この酵素の活性をプリオン蛋白質ノックアウトマウスと野生型マウスの肺で測定した。その結果、ノックアウトマウスの肺内では、ス

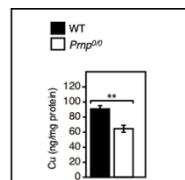


図1: プリオン蛋白質ノックアウト (*Prnp*<sup>0/0</sup>) マウスの肺内における銅イオンの含量。野生型 (WT) マウスの肺内における銅イオン濃度と比べて、*Prnp*<sup>0/0</sup> マウスの肺内では銅イオンが低下していた。

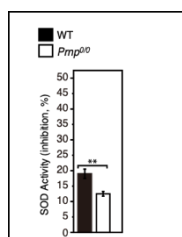


図2: *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスの肺内における SOD 活性。WT マウスの肺内における SOD 活性と比べて、*Prnp*<sup>0/0</sup> マウスの肺内では SOD 活性が低下していた。

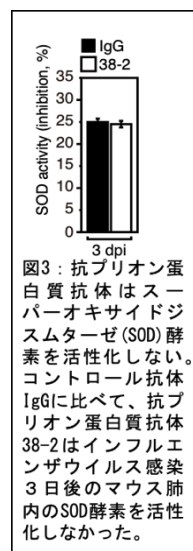


図3: 抗プリオン蛋白質抗体はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 酵素を活性化しない。コントロール抗体 IgG に比べて、抗プリオン蛋白質抗体 38-2 はインフルエンザウイルス感染 3 日後のマウス肺内の SOD 酵素を活性化しなかった。

スーパーオキシドジスムターゼの酵素活性が低下していることが分かった (図2)。これらの結果は、プリオン蛋白質が銅イオンを肺内に留め、スーパーオキシドジスムターゼの酵素活性を調節し、その結果抗インフルエンザ活性を発揮している可能性を示した。

### (2) 抗プリオン蛋白質抗体はスーパーオキシドジスムターゼを活性化しない

抗プリオン蛋白質抗体による抗インフルエンザ活性がスーパーオキシドジスムターゼ酵素を活性化することによるのか明らかにするために、抗プリオン蛋白質抗体を投与したインフルエンザウイルス感染マウス (感染後3日) の肺内のスーパーオキシドジスムターゼ酵素活性を測定した。その結果、抗プリオン蛋白質抗体を投与してもスーパーオキシドジスムターゼ酵素活性は上昇しなかった (図3)。これらの結果は、抗プリオン蛋白質抗体による抗インフルエンザ活性にスーパーオキシドジスムターゼ酵素は関与しないことを示した。

### (3) 抗プリオン蛋白質抗体はSrcファミリーキナーゼを活性化する

抗プリオン蛋白質抗体を神経培養細胞に添加すると、Srcファミリーキナーゼが活性化することが知られている (7)。そこで、抗プリオン蛋白質抗体を投与すると、インフルエンザウイルス感染マウスの肺内におけるSrcファミリーキナーゼが活性化するのか調べた。その結果、コントロール抗体を投与してもインフルエンザウイルス感染マウスの肺内におけるSrcファミリーキナーゼは活性化しなかったが、抗プリオン蛋白質抗体を投与したインフルエンザウイルス感染マウスの肺内では、Srcファミリーキナーゼが著名に活性化していた (図4)。これらの結果は、抗プリオン蛋白質抗体はインフルエンザウイルス感染マウスの肺内のSrcファミリーキナーゼを活性化する機能を有していることを示した。

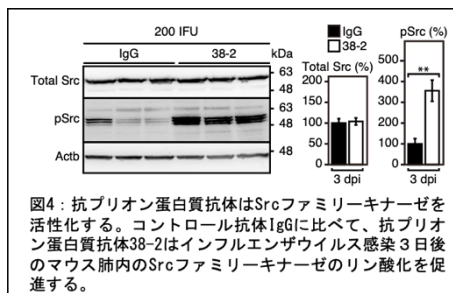


図4: 抗プリオン蛋白質抗体はSrcファミリーキナーゼを活性化する。コントロール抗体IgGに比べて、抗プリオン蛋白質抗体38-2はインフルエンザウイルス感染3日後のマウス肺内のSrcファミリーキナーゼのリン酸化を促進する。

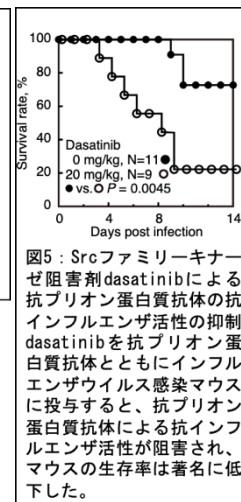


図5: Srcファミリーキナーゼ阻害剤dasatinibによる抗プリオン蛋白質抗体の抗インフルエンザ活性の抑制。dasatinibを抗プリオン蛋白質抗体とともにインフルエンザウイルス感染マウスに投与すると、抗プリオン蛋白質抗体による抗インフルエンザ活性が阻害され、マウスの生存率は著名に低下した。

### (4) Srcファミリーキナーゼの活性化は抗プリオン蛋白質抗体の抗インフルエンザ活性に必須である

抗プリオン蛋白質抗体の抗インフルエンザ活性におけるSrcファミリーキナーゼの役割を明らかにするために、Srcファミリーキナーゼ阻害剤dasatinibを抗プリオン蛋白質抗体とともにインフルエンザウイルス感染マウスに投与した。その結果、Srcファミリーキナーゼ阻害剤を投与すると、抗プリオン蛋白質抗体による抗インフルエンザ活性が阻害され、マウスは高い死亡率で死亡した (図5)。これらの結果は、抗プリオン蛋白質抗体の抗インフルエンザ活性にはSrcファミリーキナーゼの活性化が必須であることを示した。

### <引用文献>

- Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG: Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *Journal of virology* 83:10366-10373, 2009.
- McKimm-Breschkin JL, Sahasrabudhe A, Blick TJ, McDonald M, Colman PM, Hart GJ, Bethell RC, Varghese JN: Mutations in a conserved residue in the influenza virus neuraminidase active site decreases sensitivity to Neu5Ac2en-derived inhibitors. *Journal of virology* 72:2456-2462, 1998.
- Mishin VP, Hayden FG, Gubareva LV: Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:4515-4520, 2005.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, et al.: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582, 1992.
- Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J: Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8531-8535, 2001.
- Xikeranmu Z, Abdunasir M, Ma J, Tusong K, Liu X: Characterization of two copper/zinc superoxide dismutases (Cu/Zn-SODs) from the desert beetle *Microdera punctipennis* and their activities in protecting *E. coli* cells against cold. *Cryobiology* 87:15-27, 2019.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O: Signal transduction through prion protein. *Science* 289:1925-1928, 2000.

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- Chida J, Sakaguchi S: Cellular prion protein-mediated protection against influenza A virus infection. *Future Virology* 14 (1): 31-37, 2018. 査読有  
<https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0146>
- Sakaguchi S, Chida J: Roles of Prion Protein in Virus Infections. *DNA and Cell Biology*

37(10):808-811, 2018. 査読有

doi:10.1089/dna.2018.4402

- ③ Chida J, Hara H, Yano M, Uchiyama K, Das NR, Takahashi E, Miyata H, Tomioka Y, Ito T, Kido H, Sakaguchi S: Prion Protein Protects Mice from Lethal Infection with Influenza A Viruses. PLOS Pathogens 14(5):e1007049, 2018. 査読有  
doi: 10.1371/journal.ppat.1007049
- ④ Linsenmeier L, Mohammadi B, Wetzel S, Puig B, Jackson WS, Hartmann A, Uchiyama K, Sakaguchi S, Endres K, Tatzelt J, Saftig P, Glatzel M, Altmeyer HC: Structural and mechanistic aspects influencing the ADAM10-mediated shedding of the prion protein. Molecular Neurodegeneration 13(1):18, 2018. 査読有  
doi: 10.1186/s13024-018-0248-6
- ⑤ 千田 淳司、木戸 博、坂口 末廣、宿主因子を標的にした新たなインフルエンザ治療の試み、BIO Clinica 33 巻、2018、52(256)-55(259)、査読無
- ⑥ Sakaguchi S, Uchiyama K: Novel Amplification Mechanism of Prions through Disrupting Sortilin-Mediated Trafficking. Prion 11(6):398-404, 2017. 査読有  
doi: 10.1080/19336896.2017.1391435
- ⑦ Hara H, Miyata H, Das NR, Chida J, Yoshimochi T, Uchiyama K, Watanabe H, Kondoh G, Yokoyama T, Sakaguchi S: Prion Protein Devoid of the Octapeptide Repeat Region Delays BSE Pathogenesis in Mice. Journal of Virology 92(1). pii: e01368-17, 2017. 査読有  
doi: 10.1128/JVI.01368-17
- ⑧ Uchiyama K, Tomita M, Yano M, Chida J, Hara H, Das NR, Nykjaer A, Sakaguchi S: Prions Amplify through Degradation of the VPS10P Sorting Receptor Sortilin. PLOS Pathogens 13(6):e1006470, 2017. 査読有  
doi: 10.1371/journal.ppat.1006470
- ⑨ Das NR, Miyata H, Hara H, Uchiyama K, Chida J, Yano M, Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi S: Effects of prion protein devoid of the N-terminal residues 25-50 on prion pathogenesis in mice. Archives of Virology 162(7):1867-1876, 2017. 査読有  
doi: 10.1007/s00705-017-3295-3
- ⑩ 坂口 末廣、プリオン病におけるポストゴルジ小胞輸送障害、臨床評価、44 巻、2017、719-725、査読無

[学会発表] (計 7 件)

- ① 千田 淳司、原 英之、坂口 末廣、プリオン蛋白質はインフルエンザ A ウイルス感染に防御的に機能する、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018
- ② 原 英之、千田 淳司、坂口 末廣、インフルエンザウイルス感染は神経細胞において異常型プリオン産生のトリガーとなる、第 40 回日本分子生物学会年会、2018
- ③ 千田 淳司、原 英之、坂口 末廣、プリオン蛋白質はインフルエンザ A ウイルスの感染を制御する、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 第 40 回日本分子生物学会年会/第 90 回日本生化学会大会、2017
- ④ 内山 圭司、坂口 末廣、Identification and investigation of a novel anti-prion compound、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017
- ⑤ 内山 圭司、藤稿 智宏、坂口 末廣、High susceptibility of Sortilin-deficient cells to prion infection、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017
- ⑥ 坂口 末廣、内山 圭司、Prion propagation through sortilin degradation、第 60 回日本神経化学学会大会、2017
- ⑦ 千田 淳司、原 英之、坂口 末廣、肺で発現する正常プリオン蛋白質の機能解析、第 32 回中国四国ウイルス研究会、2017

[図書] (計 1 件)

- ① 坂口 末廣、南江堂出版、シンプル微生物学 [改訂第 6 版]. 小熊 恵二、堀田 博、若宮 伸隆 編集. 遅発性ウイルス感染症とプリオン病 p350-356, 2018

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/divisions/nerve.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：原 英之  
ローマ字氏名：(HARA, Hideyuki)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：先端酵素学研究所（次世代）  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：40469953

※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。