

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07499

研究課題名（和文）培養細胞を用いた世界初のプリオン病モデル構築と異常型プリオン産生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Construction of prion disease model using neuroblastoma cells and elucidation of the production mechanism of abnormal prion protein

研究代表者

原 英之（HARA, Hideyuki）

徳島大学・先端酵素学研究所（次世代）・助教

研究者番号：40469953

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：プリオン病は、健常神経組織に発現する正常型プリオン蛋白質が感染性を有するプロテアーゼK抵抗性の異常型プリオン蛋白質へと構造変換し、中枢神経に蓄積する神経変性疾患である。ヒトのプリオン病の約77%を占める特発性プリオン病は、毎年100万人に1人の割合で発症するが、その原因はわかっておらず、治療法も存在しない。

本研究では、インフルエンザウイルス（以下、IAV）感染が正常型プリオン蛋白質を異常型プリオン蛋白質に構造変換できるのではないかと考え、マウスの神経細胞に神経病原性のIAVを感染した。その結果、正常型プリオン蛋白質は異常型プリオン蛋白質へと構造変換することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオン病は、病因が不明で治療法も存在しない希少疾患であるが、潜在的风险保有者が多数おり、治療・予防法の確立が求められている。神経細胞にIAVを感染することで、正常型プリオンが異常型プリオンへと構造変換するという研究代表者の発見は、これまで不明だったプリオン病発症のトリガー因子としてIAV感染が関与している可能性を強く示しており、プリオン病の病因解明に新たな指針を与える。また、アルツハイマー病やパーキンソン病といった、蛋白質凝集体の蓄積が原因の神経変性疾患でも、ウイルス感染が凝集体形成のきっかけになる可能性が示唆されており、神経変性疾患全般の治療・予防に向けたフィードバックも可能となる。

研究成果の概要（英文）：Prion disease is a neurodegenerative disease in which normal prion protein expressed in healthy nerve tissues undergoes conformational conversion into an infectious, protease K resistant, abnormal prion protein that accumulates in the central nervous system. Idiopathic prion diseases, which account for about 77% of all human prion diseases, occur in one out of one million people each year, but their etiology are unknown and there is no cure. In this study, we infected mouse neurons with neuropathogenic influenza A virus (IAV) in the hope that IAV infection could conformational conversion from normal prion protein into abnormal prion protein. As a result, we found that the normal prion protein undergoes conformational conversion into the abnormal prion protein.

研究分野：分子生物学

キーワード：プリオン プリオン病 ウイルス ウイルス感染 神経変性 構造変換

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

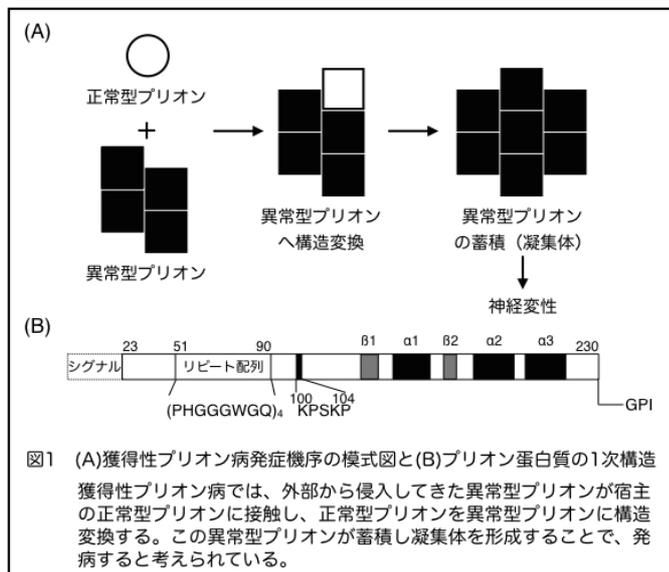
1. 研究開始当初の背景

プリオン病は、健常神経組織に発現する正常型プリオン蛋白質が構造変換によって異常型プリオン蛋白質に変化し、中枢神経に蓄積する神経変性疾患である。正常型プリオン蛋白質と異常型プリオン蛋白質は、アミノ酸配列は同じでも立体構造が異なっており、正常型プリオン蛋白質はプロテアーゼK (以下、PK) で分解されるが、異常型プリオン蛋白質はPKで分解されにくい特徴がある。これは、正常型プリオン蛋白質は $\alpha$ ヘリックスが多く $\beta$ シートが極端に少ない構造を有しているのに対して、異常型プリオン蛋白質は $\alpha$ ヘリックスより $\beta$ シートが多い構造となっているためである。したがって、 $\alpha$ ヘリックスから $\beta$ シートへの構造の変化が、正常型プリオン蛋白質から異常型プリオン蛋白質への構造変換に重要だと考えられている。

ヒトのプリオン病は病因により、他のプリオン病からの感染による獲得性プリオン病、プリオン蛋白質遺伝子変異による遺伝性プリオン病、原因不明の特発性プリオン病の3種類に分類される(表1)。また、構造変換の機序については以下のように考えられている。獲得性プリオン病では、外部から侵入してきた異常型プリオンが宿主の正常型プリオンに接触し、正常型プリオンを異常型プリオンに構造変換することで、発病すると考えられている(図1A)。研究代表者は、獲得性プリオン病の細胞モデルを使って、構造変換の鍵となるプリオン蛋白質のアミノ酸配列を探索し、100-104番目のアミノ酸が重要であることを報告した(Hara, *et al.*, *J. Virol.*, 2012: 図1B)。遺伝性プリオン病では、プリオン蛋白質遺伝子の変異が、そこから翻訳されたプリオン蛋白質に変異を起し、その高次構造が、異常型プリオンを産生しやすく変化した

	内訳	病因
獲得性プリオン病: 医原性CJD、変異型CJD	3.0%	他のプリオン病からの感染
遺伝性プリオン病: 家族性CJD	20.0%	プリオン蛋白質遺伝子変異
特発性プリオン病: 孤発性CJD	76.6%	不明

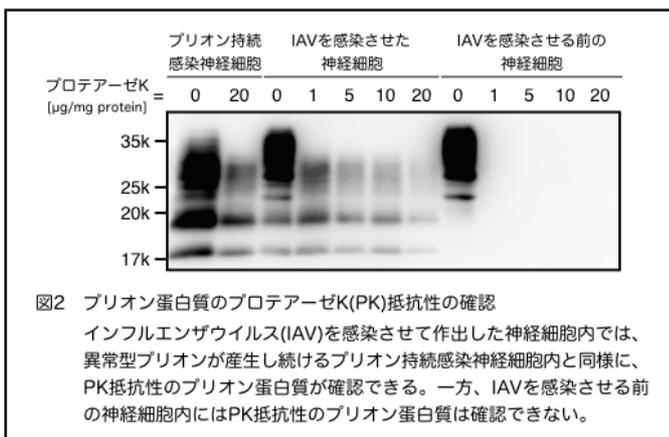
CJD=クロイツフェルト・ヤコブ病 2017年2月2日現在



と考えられている。研究代表者は、遺伝性プリオン病のモデルとして、プリオン蛋白質遺伝子に変異を導入した遺伝子改変マウスを用いて、N末領域のリピート配列が異常型プリオンの産生のしやすさを規定していることを報告した(Hara, *et al.*, *J. Virol.*, 2018: 図1B)。しかし、ヒトのプリオン病の大部分(約77%)を占める特発性プリオン病については、異常型プリオンがどのように産生されるのか不明である。そこで本研究では、特発性プリオン病の病因解明を目指し、異常型プリオンの産生を誘導するトリガー因子の同定を行うこととした。

2. 研究の目的

研究代表者は、マウスの神経細胞にA型インフルエンザウイルス(以下、IAV)を感染したところ、正常型プリオン蛋白質が異常型プリオン蛋白質と同じPK抵抗性の構造に変換することを発見した(図2)。そこで本研究では、IAV感染がプリオン病発症のトリガー因子となりえるのか、IAV感染により産生したPK抵抗性のプリオン蛋白質がプリオ



ン感染性を有するのかを明らかにし、異常型プリオン蛋白質の産生メカニズムを解明する。

神経細胞に IAV が感染することで、正常型プリオン蛋白質が異常型プリオン蛋白質と同じ PK 抵抗性の構造へと変換するという研究代表者の発見は、これまで不明だったプリオン病発症のトリガー因子として IAV 感染が関与している可能性を強く示している。本研究により、IAV 感染がどのように正常型プリオンを異常型プリオンに構造変換するのかを解明できれば、世界に先駆けた研究成果となり、プリオン病の解明に新たな指針を与えることになる。

### 3. 研究の方法

研究代表者は、IAV 感染がプリオン病発症のトリガー因子となりえるのかを解明する。そのために、産生した PK 抵抗性のプリオン蛋白質が、プリオン感染性を有するのかを明らかにし、プリオン蛋白質の構造変換に IAV 感染がどのように作用するのかを解明する。

IAV 感染により産生した PK 抵抗性のプリオン蛋白質が、プリオン感染性を有するのか明らかにするために、このプリオン蛋白質をマウスに接種する。その結果、接種したマウス脳内において、PK 抵抗性のプリオン蛋白質が産生され、プリオン病が発症すれば、上記のプリオン感染性が確認されたことになり、IAV 感染が正常型プリオン蛋白質を感染性の異常型プリオン蛋白質に構造変換することを証明できたことになる。

(1) IAV 感染により産生した PK 抵抗性のプリオン蛋白質は、申請者が所属する研究グループが作製した、プリオン蛋白質が過剰発現した神経芽細胞腫由来の Neuro2a 細胞 (N2aC24 細胞 (Fujita *et al.*, *Cell Mol. Neurobiol.*, 2011)) に A/WSN/33(H1N1)株の IAV を感染させ、生き残った細胞から抽出した。このプリオン蛋白質を含む細胞抽出液を  $1.5 \times 10^7$  cells/mL PBS の濃度で作製し、申請者が所属する研究グループが報告した方法 (Arima *et al.*, *J. Virol.*, 2005) を参考に、プリオン病への感受性が高い、ICR マウスに 20  $\mu$ L を脳内接種する。

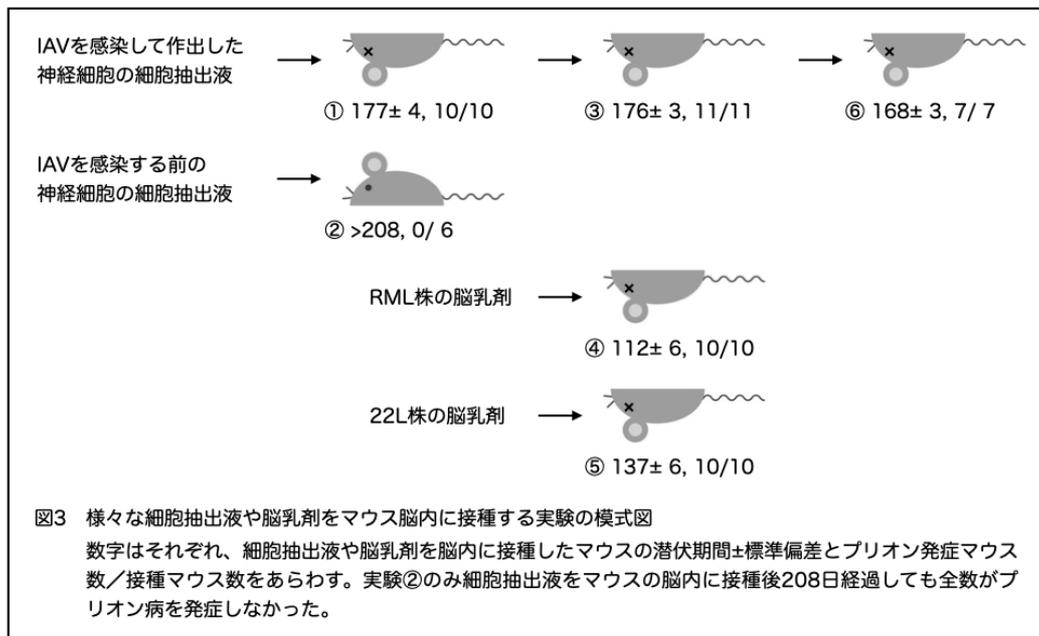
(2) 異常型プリオンを本実験と同様に脳内接種すると約 150 日でプリオン病を発症する (未発表)。よって、上記の(1)で細胞抽出液を脳内接種した ICR マウスについては、プリオン病発症後に脳を採材し、以下の病理学的解析と生化学的解析を行う。

病理学的解析：採材した脳の各部位を HE 染色、抗プリオン蛋白質抗体および抗 GFAP 抗体により染色し、プリオン病特異的病態である、異常型プリオンの蓄積や空胞形成、または神経炎症の度合いを調べる。

生化学的解析：採材した脳から作製した脳乳剤を PK で消化し、PK 抵抗性のプリオン蛋白質の産生量をウェスタンブロット法により定量する。

### 4. 研究成果

マウスの神経細胞に IAV を感染することで産生した PK 抵抗性のプリオン蛋白質のプリオン感染性の有無を明らかにするために、このプリオン蛋白質を含む細胞抽出液を、研究代表者が所属するグループが報告した方法 (Arima *et al.*, *J. Virol.*, 2005) を参考に、マウスの脳内に接種した。その結果、PK 抵抗性のプリオン蛋白質を含む細胞抽出液を接種したマウスは、全数が約 177 日でプリオン病を発症し、その後死亡した。また、これらのマウスでは、脳に PK 抵抗性のプリオン蛋白質を蓄積していることも確認できた (図 3 の実験①)。一方、IAV を感染する前のマウスの神経細胞の細胞抽出液を接種したマウスは、1 匹もプリオン病を発症しなかった (図 3 の実験②)。さらに、PK 抵抗性のプリオン蛋白質を含む細胞抽出液を接種したマウス (図 3 の実験①) が、プリオン感染性を有する異常型プリオン蛋白質を産生していることを確認するために、このマウスの脳乳剤をマウスの脳内に接種する実験を繰り返した。その結果、接種したマウスは、全数がそれぞれ、約 176 日と約 168 日でプリオン病を発症し、その後死亡した。もちろん、これらのマウスでも脳に PK 抵抗性のプリオン蛋白質を蓄積していた (図 3 の実験③と⑥)。この結果から、IAV 感染により産生した PK 抵抗性のプリオン蛋白質はプリオン病を誘発し、さらに、プリオン感染性を有する PK 抵抗性のプリオン蛋白質を新規に産生・蓄積することが明らかとなった。このことは、IAV 感染により産生した PK 抵抗性のプリオン蛋白質が、異常型プリオン蛋白質であると証明できたことを示している。次に、図 3 の実験③で作出した異常型プリオン蛋白質の生化学的・病理学的な特徴を、2 種類の異なる性質を有するプリオン株 (RML、22L 株) と比較した。まず、生化学的な特徴については、プリオン病を発症したマウスの脳から脳乳剤を作製し、これを PK で消化後、PK 抵抗性のプリオン蛋白質の産生量と糖鎖パターン (2 糖鎖、1 糖鎖、無糖鎖型それぞれの割合) を、抗プリオン蛋白質抗体を用いたウェスタンブロット法で定量した。その結果、図 3 の実験③~⑤のすべてのマウス脳に PK 抵抗性のプリオン蛋白質



質が蓄積していたのはもちろんのこと、図3の実験③で作出したプリオン蛋白質の糖鎖パターンは、RML株とは異なり、22L株と似ていた。続いて、病理学的な特徴については、プリオン病を発症したマウスの脳の各部位をHE染色、抗プリオン蛋白質抗体、および抗GFAP抗体により染色し、プリオン病の特異的病態である、異常型プリオン蛋白質の蓄積や空胞形成、または神経炎症の度合いを調べた。その結果、図3の実験①で作出した異常型プリオン蛋白質を脳内に接種したマウス（図3の実験③）では、異常型プリオン蛋白質の蓄積や空胞形成が、RMLや22L株（図3の実験④と⑤）とは異なり、視床に特に多いという特徴を有していた。つまり、図3の実験③で得られた異常型プリオン蛋白質は、潜伏期間（図3）、異常型プリオン蛋白質の糖鎖パターン、および異常型プリオン蛋白質の脳内での蓄積部位がRML、22L株とは異なっていた。

以上の結果から、正常型プリオン蛋白質はIAV感染によって、新規なタイプの異常型プリオン蛋白質へと構造変換することが明らかとなった。研究代表者のこの発見は、培養細胞を用いたプリオン病発症のはじめてのモデルを提示するものであり、プリオン仮説において未解決な正常型プリオン蛋白質から異常型プリオン蛋白質への構造変換において、IAV感染がそのトリガー因子として働いている可能性を示すものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hara Hideyuki, Chida Junji, Pasiana Agriani Dini, Uchiyama Keiji, Kikuchi Yutaka, Naito Tomoko, Takahashi Yuichi, Yamamura Junji, Kuromatsu Hisashi, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Vaporized Hydrogen Peroxide and Ozone Gas Synergistically Reduce Prion Infectivity on Stainless Steel Wire	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3268 - 3268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22063268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uchiyama Keiji, Miyata Hironori, Yamaguchi Yoshitaka, Imamura Morikazu, Okazaki Mariya, Pasiana Agriani Dini, Chida Junji, Hara Hideyuki, Atarashi Ryuichiro, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Strain-Dependent Prion Infection in Mice Expressing Prion Protein with Deletion of Central Residues 91-106	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7260 - 7260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hara Hideyuki, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 21
2. 論文標題 N-Terminal Regions of Prion Protein: Functions and Roles in Prion Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6233 - 6233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chida Junji, Hara Hideyuki, Uchiyama Keiji, Takahashi Etsuhisa, Miyata Hironori, Kosako Hidetaka, Tomioka Yukiko, Ito Toshihiro, Horiuchi Hiroyuki, Matsuda Haruo, Kido Hiroshi, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Prion protein signaling induces M2 macrophage polarization and protects from lethal influenza infection in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1008823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 †Das Rani Nandita, †Miyata Hironori, †Hara Hideyuki, Chida Junji, Uchiyama Keiji, Masujin Kentaro, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Sakaguchi Suehiro, †equally contribution	4. 巻 57
2. 論文標題 The N-Terminal Polybasic Region of Prion Protein Is Crucial in Prion Pathogenesis Independently of the Octapeptide Repeat Region	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol.	6. 最初と最後の頁 1203-1216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-019-01804-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hagiwara Ken'ichi, Sato Yuko, Yamakawa Yoshio, Hara Hideyuki, Tobiume Minoru, Okemoto-Nakamura Yuko, Sata Tetsutaro, Horiuchi Motohiro, Shibata Hiroaki, Ono Fumiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Tracking and clarifying differential traits of classical- and atypical L-type bovine spongiform encephalopathy prions after transmission from cattle to cynomolgus monkeys	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chida Junji, Hara Hideyuki, Yano Masashi, Uchiyama Keiji, Das Nandita Rani, Takahashi Etsuhisa, Miyata Hironori, Tomioka Yukiko, Ito Toshihiro, Kido Hiroshi, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 原 英之、千田 淳司、坂口 未廣
2. 発表標題 ウイルス感染を用いたプリオン病発症機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 英之、千田 淳司、坂口 未廣
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 廣川 信隆、板東 武彦 / 編、原 英之 / 9章を分担執筆	4. 発行年 2021年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 240
3. 書名 ブレインサイエンス・レビュー2021	

〔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
---------	---------