

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03548

研究課題名（和文）プリオン病の神経細胞障害のメカニズム解明とその障害を改善する化合物の探索

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanism and screening of therapeutic compounds in prion disease

研究代表者

坂口 末廣（SAKAGUCHI, Suehiro）

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

研究者番号：60274635

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アトラクチンとソーチリンのTgマウスを作製しプリオンを感染させた。アトラクチンTgマウスはコントロールマウスより早期にプリオン病を発症したが、ソーチリンTgマウスでは遅延した。この結果は、アトラクチンがプリオン病の進行を促進し、ソーチリンは逆に抑制することを示唆した。また、トランスゴルジネットワーク（TGN）のゴルジン97がソーチリンと結合し、プリオン感染細胞ではゴルジン97が低下することを明らかにした。この結果は、プリオン感染細胞ではゴルジン97の低下によりソーチリンのTGNへ逆輸送が障害されることを示唆した。また、新規のプリオン病の治療薬としてエタノールアミンを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオン病の病態メカニズムを明らかにし、プリオン病の治療法を開発することは緊急の課題である。本研究では、アトラクチンがプリオン病の進行を促進し、ソーチリンは逆にプリオン病の進行を抑制することを明らかにした。この結果は、アトラクチンとソーチリンがプリオン病の病態に関与することを示し、アトラクチンの機能抑制やソーチリンの活性化がプリオン病の治療法開発につながる可能性を示した。また本研究では、新規のプリオン病の治療薬としてエタノールアミンを同定した。以上の研究成果は、プリオン病の病態メカニズムの解明やプリオン病の治療法開発に貢献するものであり、学術的意義及び社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）： In this study, we produced transgenic (Tg) mice expressing either attractin or sortilin and intracerebrally inoculated prions into them. Attractin-Tg mice developed disease earlier than control mice and sortilin-Tg mice succumbed to disease later than control mice. These results suggest that attractin could promote the pathogenesis of prion disease while sortilin could retard disease progression. We also found that golgin-97, which is expressed in the trans-Golgi network (TGN), could interact with sortilin-containing vesicles. However, golgin-97 was reduced in prion-infected cells. These results suggest that prions could reduce golgin-97, thereby disturbing the retrograde transport of sortilin to the TGN in infected cells. We also identified ethanolamine as a new anti-prion agent.

研究分野：分子生物学

キーワード：プリオン プリオン病 アトラクチン ソーチリン エタノールアミン トランスジェニックマウス
ポストゴルジ輸送

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、感染性蛋白質「プリオン」の脳内蓄積により起こる神経変性疾患である。プリオン病の病態メカニズムは十分に解明されておらず、治療法も未だ開発されていない。従って、プリオン病の病態メカニズムの解明及びプリオン病の治療法開発は緊急の課題である。

プリオンは、神経細胞の膜蛋白質である正常プリオン蛋白質 (以下、正常プリオン) が構造変化を起こし蛋白分解酵素抵抗性となった異常プリオン蛋白質 (以下、異常プリオン) から構成されている。プリオンが感染すると、その構成蛋白質である異常プリオンが正常プリオンに作用し、正常プリオンの構造を異常プリオンの構造へと変化させ、その結果異常プリオンが脳内に蓄積しプリオン病が起こると考えられている。実際、研究代表者らは、正常プリオン欠損マウスを作製しプリオンを脳内に接種しても欠損マウスは病気にならないことを明らかにし、正常プリオンが異常プリオンに変換し、その結果起こる異常プリオンの蓄積がプリオン病の病態に必須であることを報告した(1)。また研究代表者らは、プリオン病では神経細胞内の細胞膜蛋白質のポストゴルジ小胞輸送が障害され細胞膜蛋白質の細胞膜発現が低下し、その結果細胞膜蛋白質の機能が低下することを報告した(2)。さらに、プリオン病では蛋白質輸送関連分子ソーチリンが減少し、その結果ソーチリンを介した蛋白質の輸送が障害され、プリオンの産生が増加しプリオン病が増悪することを報告した(3)。しかし、プリオンによるポストゴルジ小胞輸送障害がプリオン病の病態に関与するのか不明である。また、プリオンによるソーチリンの減少メカニズムも不明であり、ソーチリンの減少が抑制されればプリオン病の病態が改善するのかも不明である。そこで本研究では、プリオン病の病態メカニズムを解明することを目的とし、これらの問題に取り組む。また、プリオン病の治療法開発を目指し、プリオンの産生を抑制する化合物の同定も行う。

2. 研究の目的

(1) プリオンによる細胞膜蛋白質のポストゴルジ輸送障害を抑制するとプリオン病の病態が改善するのか明らかにする。研究代表者らは、プリオン病では、インスリン受容体やアトラクチンなどの細胞膜蛋白質のポストゴルジ輸送が障害され、その結果これらの蛋白質の細胞膜発現が低下しそれぞれの蛋白質の機能が低下することを報告した(2)。従って、これらの蛋白質を過剰発現させると、プリオンが感染しても細胞膜の発現低下を抑制でき、その結果ポストゴルジ輸送障害による機能低下を抑制できると考えられる。そこで本研究では、それぞれの蛋白質を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、これらのマウスにプリオンを感染させ、プリオン病の病態が改善するのか明らかにする。もしこれらのTgマウスでプリオン病の病態が改善すれば、細胞膜蛋白質の細胞膜発現の低下を抑制するとプリオン病の病態が改善することを示すことができる。

(2) ソーチリンを介した蛋白質の輸送障害を改善するとプリオン病が改善するのか明らかにする。研究代表者らは、ソーチリンをプリオン感染細胞に過剰発現すると、ソーチリンによる蛋白質輸送が改善しプリオンが減少することを見出した(3)。そこで、ソーチリンの過剰発現Tgマウスを作製しプリオンを感染させると、プリオンの産生が抑制されプリオン病の進行が抑制されるのか明らかにする。

(3) プリオンによるソーチリンを介した蛋白質輸送障害のメカニズムを解明する。研究代表者らは、プリオンが感染するとソーチリンが蛋白質レベルで減少し、その結果蛋白質の輸送が障害

されることを明らかにした(3)。そこで、プリオンがソーチリンを介した蛋白質輸送を障害するメカニズムを解明するために、プリオンによりソーチリンが減少するメカニズムを明らかにする。

(4) プリオンの産生を抑制する化合物を同定する。申請者らは、偶然にも、プリオン感染細胞を Advanced DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific 社) で培養すると通常の DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific 社) と異なりプリオンが減少することを見出した。そこで、Advanced DMEM 培地から、プリオンの産生を抑制する化合物を同定する。

3. 研究の方法

(1) アトラクチン過剰発現 Tg マウスの作製: アトラクチンの cDNA をハムスタープリオン蛋白質遺伝子ゲノムを含む CosSHa.Tet コスミドベクター(InPro Biotechnology, Inc.)に挿入し、アトラクチンがハムスタープリオン蛋白質遺伝子プロモーター下に発現するようにした。コスミドベクター由来の DNA を除去したのち、コンストラクトを C57BL/6 マウスの受精卵に注入し、常法に従い Tg マウスを作製した。

(2) プリオン感染: マウスの脳内に RML プリオン感染マウス脳乳剤を 20 μ L ずつ接種した。

(3) ウェスタンブロッティング(WB)法: 細胞ライセート及びマウス脳乳剤を SDS-ポリアクリアミドゲルにて電気泳動を行い、蛋白質を Immobilon-P PVDF membrane (Millipore Corp.) に電氣的に転写し、1 次抗体で反応させたのち Horse-radish peroxidase 抱合 2 次抗体で反応させた。シグナルは、Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) で反応させたのち、LAS-4000 mini (Fujifilm Co.) で検出した。

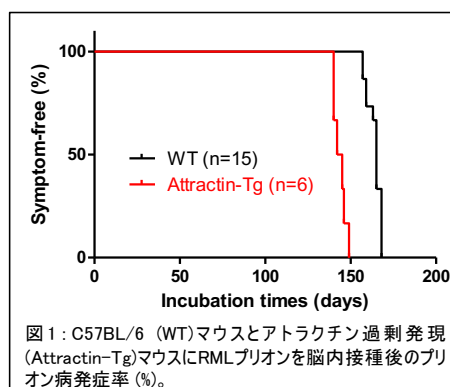
(4) プリオン感染細胞の薬剤処理: プリオン感染細胞(N2aC24L1-3)の培養液にそれぞれの薬剤を添加し、その細胞ライセートを WB に供し、異常プリオンの量を調べた。

(5) マウスへのエタノールアミン投与: 飲料水にエタノールアミン(8 g/L)を加え、プリオン感染マウスにプリオン感染日から与えた。

4. 研究成果

(1) アトラクチン過剰発現 Tg マウスはプリオン病を早期に発症する

プリオン病におけるポストゴルジ小胞輸送障害により細胞膜発現が低下するアトラクチンの役割を解明するために、アトラクチン過剰発現 Tg マウスを作製し、RML プリオンを脳内接種した。コントロール C57BL/6 マウスは、接種後 164 \pm 4 日でプリオン病を発症した (図 1)。一方、アトラクチン過剰発現 Tg マウスは接種後 144 \pm 3 日で発症した (図 1, $p<0.0001$)。以上の結果は、アトラクチンの過剰発現はプリオン病の病態を促進することを示した。これらの結果は、申請者らが当初考えていたプリオンによるポストゴルジ輸送障害により細胞膜発現が



低下したアトラクチンの発現を増加すればプリオン病の病態が改善するかもしれないという考えに反することとなった。従ってこれらの結果は、プリオン感染細胞で認められるポストゴルジ輸送障害はプリオン感染に対する細胞の防御機構の一つである可能性を示した。

(2) ソーチリン過剰発現 Tg マウスはプリオン病の発症が遅れる

研究代表者らは、ソーチリン欠損マウスに RML プリオンを感染させるとプリオン病の進行が早まることを既に報告している(3)。このことは、逆にソーチリンを過剰発現させるとプリオン病の病態進行を遅らせることができると考えられる。そこで、研究代表者らはソーチリン過剰発現 Tg マウスを作製し RML プリオンを脳内接種した。コントロール C57BL/6(WT)マウスは、接種後 159 ± 8 日でプリオン病を発症した (図 2)。一方、ソーチリン過剰発現 Tg マウスは接種後 185 ± 20 日で発症した (図 2, $p=0.0006$)。これらの結果は、ソーチリンを過剰発現させるとプリオン病の病態進行が遅れることを示し、プリオンによるソーチリンの蛋白質レベルの低下を抑制できればプリオン病の進行を抑制できる可能性を示した。

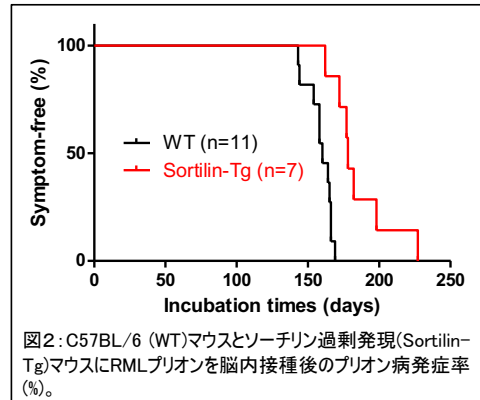


図2: C57BL/6 (WT)マウスとソーチリン過剰発現(Sortilin-Tg)マウスにRMLプリオンを脳内接種後のプリオン病発症率(%)。

(3) ソーチリン含有小胞はゴルジン 97 と結合する

ソーチリンは積荷蛋白質をリソソームに運んだのち、自身はトランスゴルジネットワーク (TGN)に逆輸送されリソソームでの分解を逃れ、その結果自身の蛋白質レベルを維持していると考えられている。申請者らは、TGN 蛋白質であるゴルジン 97 がソーチリン含有小胞を膜に係留する機能を有することを見出した。また、プリオン感染細胞では、ゴルジン 97 の蛋白質レベルが低下していることも見出した。以上の結果は、プリオンが感染するとゴルジン 97 の蛋白質レベルが低下し、その結果ソーチリン含有小胞が TGN に係留できなくなり、ソーチリンの TGN への逆輸送が障害され、ソーチリンはリソソームで分解され蛋白質レベルが低下する可能性が考えられた。

(4) エタノールアミンは新規の抗プリオン薬である

研究代表者らは、偶然にも、プリオン感染細胞を Advanced DMEM 培地で培養すると通常の DMEM 培地と異なり、プリオンが減少することを見出していた。そこで、Advanced DMEM 培地に含まれるどの化合物が抗プリオン活性を持つのか明らかにすることにした。Advanced DMEM 培地には通常の DMEM 培地に加えて 10 種類の化合物が添加されている。そこで、これらの化合物の中から抗プリオン活性を持つ化合物を同定することにした。その結果、エタノールアミンを添加するとプリオン感染細胞のプリオンが減少することを明らかにした(4)。次に、プリオンを感染させたマウスにエタノールアミンを投与するとプリオン病の進行が遅れることも明らかにした (図 3, $p=0.0005$) (4)。以上の結果は、エタノールアミンが新規の抗プリオン

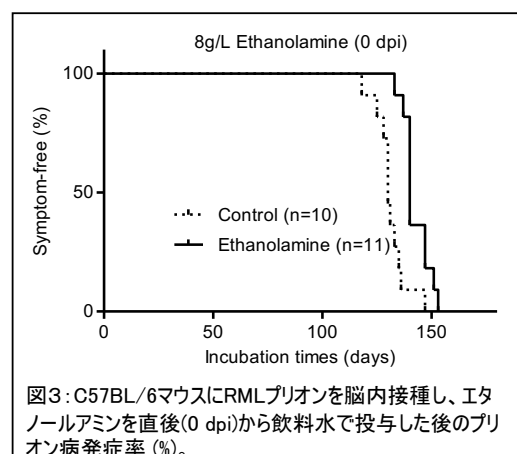


図3: C57BL/6マウスにRMLプリオンを脳内接種し、エタノールアミンを直後(0 dpi)から飲料水で投与した後のプリオン病発症率(%)。

薬であることを示した。

<参考文献>

- ① Sakaguchi, S., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Moriuchi, R., Nishida, N., Kurokawa, K., Nakaoke, R., Sato, H., Jishage, K., Kuno, J., Noda, T., and Miyamoto, T. Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J. Virol.* **69**, 7586-7592, 1995
- ② Uchiyama, K., Muramatsu, N., Yano, M., Usui, T., Miyata, H., and Sakaguchi, S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nat. Commun.* **4**, 1846, 2013
- ③ Uchiyama, K., Tomita, M., Yano, M., Chida, J., Hara, H., Das, N. R., Nykjaer, A., and Sakaguchi, S. Prions amplify through degradation of the VPS10P sorting receptor sortilin. *PLoS Pathog.* **13**, e1006470, 2017
- ④ Uchiyama, K., Hara, H., Chida, J., Pasiona, A. D., Imamura, M., Mori, T., Takatsuki, H., Atarashi, R., and Sakaguchi, S. Ethanolamine Is a New Anti-Prion Compound. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10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 Kishimoto Yasushi, Hirono Moritoshi, Atarashi Ryuichiro, Sakaguchi Suehiro, Yoshioka Tohru, Katamine Shigeru, Kirino Yutaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Impairment of cerebellar long-term depression and GABAergic transmission in prion protein deficient mice ectopically expressing PrPLP/Dpl	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15900~15900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72753-6	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 e1008823
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 Sakaguchi Suehiro, Chida Junji	4. 巻 37
2. 論文標題 Prion Protein is a Novel Modulator of Influenza: Potential Implications for Anti-Influenza Therapeutics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21775/cimb.037.021	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 Nandita Rani, Miyata Hironori, Hara Hideyuki, Chida Junji, Uchiyama Keiji, Masujin Kentaro, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Sakaguchi Suehiro	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 2019年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	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 Sakaguchi Suehiro, Hara Hideyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 The first non-prion pathogen identified: neurotropic influenza virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Prion	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336896.2021.2015224	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 22
2. 論文標題 Virus Infection, Genetic Mutations, and Prion Infection in Prion Protein Conversion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12439 ~ 12439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212439	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, Hara Hideyuki, Chida Junji, Pasiana Agriani Dini, Imamura Morikazu, Mori Tsuyoshi, Takatsuki Hanae, Atarashi Ryuichiro, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Ethanolamine Is a New Anti-Prion Compound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11742 ~ 11742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111742	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, Chida Junji, Uchiyama Keiji, Pasiana Agriani Dini, Takahashi Etsuhisa, Kido Hiroshi, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Neurotropic influenza A virus infection causes prion protein misfolding into infectious prions in neuroblastoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-89586-6	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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 千田 淳司、原 英之、坂口 未廣
2. 発表標題 プリオン蛋白質はインフルエンザAウイルス感染による重症化を軽減する
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 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 Suehiro Sakaguchi
2. 発表標題 Prion protein in influenza virus infection.
3. 学会等名 APPS2021 -The next challenge for understanding of the diseases- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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感染性プリオンの産生を引き起こす
3. 学会等名 第 44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suehiro Sakaguchi
2. 発表標題 Prion protein in health and disease
3. 学会等名 The 12th BRI International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学先端酵素学研究所神経変性病態学分野
<http://www.iams.tokushima-u.ac.jp/lab/sakaguchi/>

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
研究分担者	千田 淳司 (CHIDA Junji) (20437651)	徳島大学・先端酵素学研究所・助教 (16101)	
研究分担者	原 英之 (HARA Hideyuki) (40469953)	徳島大学・先端酵素学研究所・助教 (16101)	

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
---------	---------