様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　６ 月 １０ 日現在

機関番号：１６１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ０８９３０

研究課題名（和文）プリオン蛋白質を分子標的としたインフルエンザ重症化の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Prion protein signaling induces M2 macrophage polarization and protects from lethal influenza infection in mice

研究代表者

千田　淳司（CHIDA, Junji）

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号：２０４３７６５１

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）：研究代表者は、抗プリオン蛋白質抗体(抗PrP抗体)を前投与したインフルエンザAウイルス(IAV)感染マウスの肺のマクロファージでは、Src family kinase(SFKs)タンパク質のリン酸化が起こり、抗炎症性(M2)マクロファージに分極していることを確認した。すなわち、IAV感染で重症化するマウスの肺では炎症性(M1)マクロファージが増加して「サイトカイン・ストーム」を引き起こすものと考えられるが、抗PrP抗体はマクロファージに作用してM1マクロファージへの分極を抑制し、M2マクロファージの分極を誘導して「サイトカイン・ストーム」を回避する効果があることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
インフルエンザの重症化機序が明確でない現状で、抗ウイルス薬の一方的な投与が原因で、抗ウイルス薬の耐性株が世界各地で急増している。一方、ワクチンではインフルエンザの感染予防は不可能であると世界保健機関が既に提言している。このような背景から、抗ウイルス薬とは作用機序の異なる「耐性株を出現させない治療薬」の開発が急務であるが、これまで宿主因子を標的とした治療薬の開発は国内外で成功例がない。従って、宿主因子であるPrPを分子標的とした治療薬を開発する試みはこれまでに例がなく、本研究の成果は、今後この方面の研究に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We show here that stimulation of PrPC with anti-PrP mAbs protected mice from lethal infection with IAVs by stimulating macrophage polarization to an anti-inflammatory M2 phenotype through activation of SFKs in infected lungs. IAVs are causative agents for seasonal epidemic outbreaks of influenza, and often cause high morbidity and mortality in infected people, particularly in the young and elderly and those with underlying chronic diseases. The other problem with IAV infections is that new IAV strains, which are resistant to currently available anti-influenza agents such as neuraminidase inhibitors, have been emerging in human populations. Our current results showing that targeting PrPC with anti-PrP mAbs protected against lethal infection with IAVs in mice give rise to the possibility that PrPC-targeting therapeutics might be beneficial in influenza infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ　プリオン蛋白質　抗プリオン抗体　脳症　多臓器不全

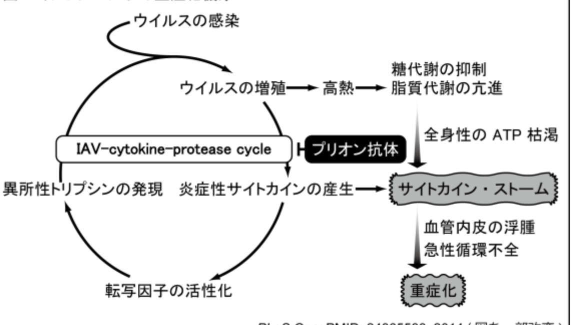
※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

「インフルエンザは風邪の一種であり、恐れる病気にあらず」と捉える人が多いが、これは大きな誤解である。インフルエンザは時に重症化し患者を死に至らしめる。特に、基礎疾患をもつ高齢者では呼吸器合併症による死亡率が高く、小児ではインフルエンザ脳症等の重篤な病態を併発する。

インフルエンザの重症化には、ウイルス感染初期で起こる「サイトカイン・ストーム」が関与する。これが起こる機序として「インフルエンザウイルス(IAV)-サイトカイン-プロテアーゼサイクル」説を申請者は提唱してきた**(図1)**。IAV が感染能を獲得するためには、ウイルス膜表面の HA(Haemagglutinin)が宿主由来のプロテアーゼにより切断される必要がある。IAV が肺に感染すると、炎症性サイトカインが産生される。これら炎症性サイトカインは転写因子の活性化を介し、ウイルスの HA を切断する異所性トリプシン等の発現を上昇させる**(図 1)[1-3]**。その結果、ウイルス HA が効率よく切断され、ウイルスの増殖は加速する。この「負のウイルスの増殖サイクル」によって、サイトカイン・ストームが誘発され、これが肺の血管内皮の浮腫を伴う循環不全に繋がり重症化を引き起こす**[4-7]**。

図 1. インフルエンザの重症化機序



PLoS One; PMID: 24865588, 2014 (図を一部改変)

さらに研究代表者は特定患児がインフルエンザで重症化しやすい主要因として、ウイルス感染後期で起こる「全身性のエネルギー(ATP: Adenosine triphosphate)産生障害」を見出した。重症化あるいは死亡した患児の半数以上は、CPT2(Calnitine palmitoyltransferase 2)遺伝子の 熱不安定多型の保因者であった。CPT2 はミトコンドリア内膜に局在し、脂肪酸の β 酸化において重要な働きを担う酵素である。すなわち、重症化患児ではインフルエンザの高熱時に CPT2 が不活化し、ミトコンドリアで肪酸を代謝できず、細胞内の ATP 産生が低下し、重症化していた**[8-10]**。実際に研究代表者は、組織や細胞内の ATP の定量法を開発し**[11,12]**、インフルエンザの重篤な感染症で集中治療室(ICU)に入室した患者の末梢血中の ATP を定量した結果、ICU 入室患者では健常者と比較して ATP が低値であった**[13-15]**。そこで糖代謝改善薬の投与による ATP 枯渇を防止する治療をマウスで試みたが、病態の改善効果は低かった**[16]**。現在、抗ウイルス薬に対する耐性株の出現が問題になっている状況下で、ウイルスの増殖を抑制し、サイトカイン・ストームを抑制する宿主因子を標的とした根本療法の開発が世界中で行われているが、これまでに成功例はない。

最近、研究代表者はプリオン蛋白質遺伝子欠損(PrP–KO)マウスに IAV を感染させた結果、野生型マウスと比べて致死率が著明に高いことを見出した[17–19]。さらに、マウスへの抗プリオン蛋白質抗体(抗 PrP 抗体)の投与で、野生型マウスでは IAV 感染後の致死率の大幅な低下が認められたが、PrP–KO マウスでは治療効果が認められなかったことから、PrP はインフルエンザの重症化の治療標的となる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は未だ明らかでない抗PrP抗体の作動機序を解明し、既存の抗ウイルス薬とは作用機序の異なるPrPを分子標的としたIAV重症化の治療薬を開発することである。

インフルエンザの重症化機序が明確でない現状で、抗ウイルス薬の一方的な投与が原因で、抗ウイルス薬の耐性株が世界各地で急増している。一方、ワクチンではインフルエンザの感染予防は不可能であると世界保健機関が既に提言している。このような背景から、抗ウイルス薬とは作用機序を異にする「耐性株を出現させない治療薬」の開発が急務であるが、これまで宿主因子を標的とした治療薬の開発は世界で成功例がない。

3. 研究の方法

抗 PrP 抗体の前投与により、抗体非投与及びコントロール(IgG)抗体を前投与した場合と比べて、IAV 感染後のマウスの生存率が大幅に改善され、肺の炎症が軽減することを既に申請者は見出している**(図 2,3)**。その機序を解明するために、以下の研究を実施する。

(1) SFK(Src family kinase)のリン酸化が起こる浸潤性細胞を特定する。

研究代表者は、抗 PrP 抗体を前投与した IAV 感染マウスの肺で、何らかの浸潤性細胞で SFK のリン酸化が起こることを見出した(図4)。この浸潤性細胞は抗PrP抗体を投与したIAV非感染肺では認められないことから、自然免疫系を担当する細胞である可能性が高い。それがマクロファージ、樹状細胞、好中球であるのか、それ以外の細胞なのかについて明らかにする。具体的には、IAV 感染肺の組織切片を用い、SFK のリン酸化抗体と各種免疫細胞系マーカーとの二重免疫染色を実施する。

(2) 抗 PrP 抗体の投与が、如何にして IAV 重症化を軽減するのか明確にする。

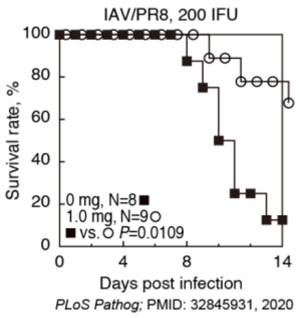
SFK は哺乳類では 9 種類存在しており、そのうちどの SFK のリン酸化が IAV 重症化の軽減に重要であるの

か特異抗体を用いた免疫沈降と質量分析法により明確にする。他にも、抗 PrP 抗体を投与した IAV 感染マウスを用い、肺の細胞死(アポトーシス)、ウイルス力価等について評価する。また、抗 PrP 抗体の投与により、肺のウイルス力価が低下していた場合、浸潤性細胞の活性化や貪食能について評価し、抗 PrP 抗体の作動機序について明確にする。

4. 研究成果

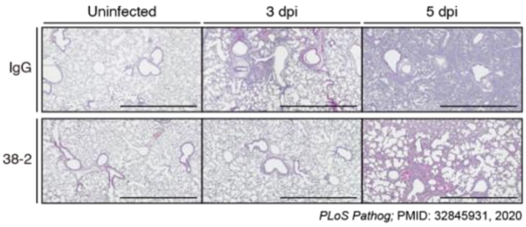
(1)本研究は季節型 IAV(Influenza A virus/Puerto Riko/8/34 株)を用い、ヒトのインフルエンザの重症化に近い評価系でマウスを用い感染試験を実施した。野生型マウス(C57BL6J, 5 週齢, オス)に抗 PrP 抗体(38-2)を腹腔内投与(1 mg)した翌日に、マウスにケタラール麻酔下で IAV(200 IFU)を経鼻感染させた。抗体非投与マウスと比較して、38-2 抗体投与マウスでは生存率が大幅に上昇することが確認された(図 2)。

図 2. IAV 感染後のマウスの生存曲線



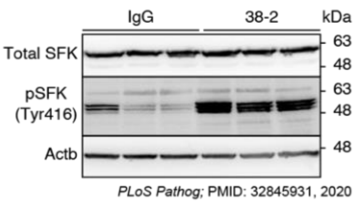
(2)IAV 感染 3、5 日後のマウスの肺を摘出し、HE 染色を実施した。コントロール IgG を前投与したマウスの肺は IAV 感染 3 日後から炎症性細胞の浸潤領域が拡大し、5 日後には炎症領域が肺全体で認められた。しかし、38-2 を前投与したマウスの肺では炎症が著明に軽減されていた(図 3)。

図 3. IAV 感染マウスの肺の HE 染色像



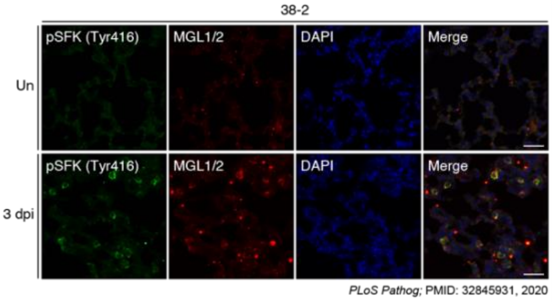
(3) IAV 感染 3 日後の肺でウエスタンブロットを試みた結果、38-2 を前投与したマウスでは、SFK の一過的なリン酸化が起こることが確認された(図 4)。さらに、SFK のリン酸化阻害剤(Dasatinib)と 38-2 を併用投与で治療効果が消失することから、38-2 の作動機序に SFK のリン酸化が重要であることが示唆された。

図 4. 抗体投与 3 日後の肺の pSFK の発現量



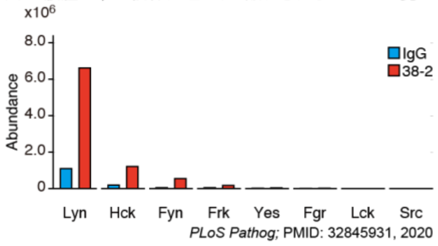
(4)肺組織のどの細胞で SFK がリン酸化しているのかを明らかにするために、IAV 感染肺の組織切片を作製し、SFK のリン酸化(pSFK)抗体と各種免疫細胞系マーカーとの二重免疫染色を実施した。その結果、抗 pSFK 抗体と抗炎症性 M2 マクロファージ(M2M φ)のマーカーである抗 MGL1/2 抗体の染色が一致した。すなわち、肺の M2M φ で SFK が特異的にリン酸化していることを 確認した(図 5)。

図 5. マウス肺の免疫染色像



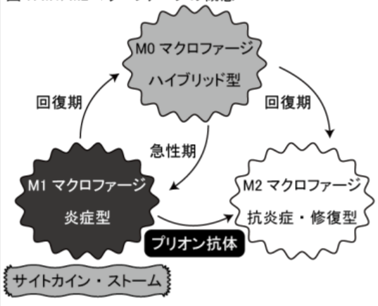
(5)SFK は哺乳類では 9 種類存在しており、そのうちどの SFK のリン酸化が IAV 重症化の軽減に重要であるのかを明らかにするために、抗 pSFK 抗体を用いた免疫沈降を行い、質量分析法による解析を試みた。本試験では気管支肺胞洗浄液から十分量のマクロファージを単離することが困難であったため、マウスの腹腔マクロファージを調製して抗体処理を行なった。質量分析の結果、SFK の Lyn、Hck、Fyn の 3 種のリン酸化が重要であることが明らかになった(図 6)。

図 6. 腹腔 Mφ の抗体処理でリン酸化される SFK の一覧



(6)IAV感染後の急性期には肺のウイルス感染部位に炎症性M1マクロファージ(M1M φ)が浸潤し、一過的に多量の炎症性サイトカインが産生され、時にはサイトカインストームを引き起こして、これが重症化に繋がる(図 7)。一方、その後の回復期には M1M φ は M2M φ へと分極し、組織の炎症部位の瓦礫処理を担うことが知られている。研究代表者は、IAV 感染後の急性期に抗 PrP 抗体(38-2)は M1M φ への分極を抑制して、M2M φ への分極を誘導することで、過剰な炎症を回避していることを実証した(図 7)。しかし、その作動機序の詳細は不明であり、現在解析中である。

図 7. M1/M2 マクロファージの概念



<引用文献>

1. Kido H, Chida J, Yao M, *et al.* **Nippon Rinsho;** 68 (8): 1565-1573. 2010.
2. Pan H, Chida J, Wang S, *et al.* **Cardiovasc Res;** 89 (3): 595-603. 2011.
3. Wang S, Le QT, Chida J, *et al.* **Journal Med Invest;** 57 (1-2): 26-34. 2010.

4. Wang S, Le QT, Kurihara N, *et al.* **J Infect Dis;** 202 (7): 991-1001. 2010.
5. Kido H, Okumura Y, Takahashi E, *et al.* **Biochim Biophys Acta;** 1824 (1): 186-194. 2012.
6. Kido H, Chida J, Yao M, *et al.* **Jikken Igaku;** 28 (18): 2927-2933. 2012.
7. Kido H. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci;** 91 (8): 351-368. 2015.
8. Yao D, Mizuguchi H, Yamaguchi M, *et al.* **Hum Mutat;** 29 (5): 718-727. 2008.
9. Yao M, Yamaguchi M, Chida J, *et al.* **Mol Genet Metab;** 104 (3): 265-272. 2011.
10. Kubota M, Chida J, Hoshino H, *et al.* **Brain Dev;** 34 (1): 20-27. 2012.
11. Chida J, Yamane K, Takei T and Kido H. **Anal Chim Acta;** 727: 8-12. 2012.
12. Chida J, Kido H. **Methods Molecular Biol;** 1098: 21-32. 2014.
13. Kubota M, Chida J, Hoshino H, *et al.* **Brain Dev;** 34 (1): 20-27. 2012.
14. Chida J, Nishimura M, Imanaka H, *et al.* **PLoS One;** PMID: 23577122. 2013.
15. Oda J, Yukioka T, Azuma K, *et al.* **Acute Med Surg;** PMID: 30651994. 2018.
16. Yamane K, Indalao IL, Chida J, *et al.* **PLoS One;** PMID: 24865588. 2014.
17. Chida J, Hara H, Yano M, *et al.* **PLoS Pathog;** PMID: 29723291. 2018.
18. Sakaguchi S, Chida J. **DNA Cell Biol;** PMID: 30222366. 2018.
19. Sakaguchi S, Chida J. **Curr Issues Mol Biol;** PMID: 31814573. 2020.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計9件（うち査読付論文　9件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　9件）

1．著者名	4．巻
Tambe Yukihiro、Terado Tokio、Kim Chul Jang、Mukaisho Ken‐ichi、Yoshida Saori、Sugihara Hiroyuki、Tanaka Hiroyuki、Chida Junji、Kido Hiroshi、Yamaji Kenzaburo、Yamamoto Tsuyoshi、Nakano Hirofumi、Omura Satoshi、Inoue Hirokazu	58
2．論文標題	5．発行年
Antitumor activity of potent pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitors from plants in pancreatic cancer	2019年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Molecular Carcinogenesis	1726～1737
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1002/mc.23045	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名	4．巻
Das Nandita Rani、Miyata Hironori、Hara Hideyuki、Chida Junji、Uchiyama Keiji、Masujin Kentaro、Watanabe Hitomi、Kondoh Gen、Sakaguchi Suehiro	57
2．論文標題	5．発行年
The N-Terminal Polybasic Region of Prion Protein Is Crucial in Prion Pathogenesis Independently of the Octapeptide Repeat Region	2019年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Molecular Neurobiology	1203～1216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1007/s12035-019-01804-5	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名	4．巻
Sakaguchi Suehiro、Chida Junji	37
2．論文標題	5．発行年
Prion Protein is a Novel Modulator of Influenza: Potential Implications for Anti-Influenza Therapeutics	2020年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Current Issues in Molecular Biology	21～32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.21775/cimb.037.021	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名	4．巻
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	21
2．論文標題	5．発行年
Strain-Dependent Prion Infection in Mice Expressing Prion Protein with Deletion of Central Residues 91-106	2020年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
International Journal of Molecular Sciences	7260～7260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.3390/ijms21197260	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

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 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 －

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 -
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、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 Nishiyama Keine、Mizukami Ryohei、Kuki Shizuka、Ishida Akihiko、Chida Junji、Kido Hiroshi、Maeki Masatoshi、Tani Hirofumi、Tokeshi Manabu	4．巻 198
2．論文標題 Electrochemical enzyme-based blood ATP and lactate sensor for a rapid and straightforward evaluation of illness severity	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	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） 10.1016/j.bios.2021.113832	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 千田 淳司， 原 英之，坂口 末廣．
2．発表標題 Prion protein protects mice from lethal influenza with influenza A virus.
3．学会等名 第42回日本分子生物学会大会
4．発表年 2019年

1．発表者名 原 英之，千田 淳司，坂口 末廣．
2．発表標題 Elucidation of pathogenic mechanism in prion disease using virus infection.
3．学会等名 第42回日本分子生物学会大会
4．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称 非アルコール性脂肪肝炎を治療または予防するための医薬組成物	発明者 坂口末廣，千田淳司	権利者 国立大学法人徳島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-008773	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕　計0件

〔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
研究協力者	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