

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07462

研究課題名（和文）ネクロトーシスをトリガーとした異常型プリオン蛋白質産生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of abnormal prion protein production triggered by necroptosis

研究代表者

原 英之（HARA, Hideyuki）

大阪大学・感染症総合教育研究拠点・特任准教授（常勤）

研究者番号：40469953

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000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、プロテアーゼK抵抗性の異常型プリオン蛋白質に構造変換し、中枢神経に蓄積する神経変性疾患であるが、その分子機構は不明であり、治療法も存在しない。研究代表者は、インフルエンザウイルスを感染したマウスの神経細胞は、ネクロトーシスを惹起し、異常型プリオン蛋白質が産生することを発見している。そこで本研究では、ネクロトーシスが異常型プリオン蛋白質産生のトリガーとなるのではないかと考え、マウスの神経細胞に、薬剤を用いてネクロトーシスを惹起したが、異常型プリオン蛋白質の産生は確認できなかった。

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。ネクロトーシスが異常型プリオン蛋白質産生のトリガーとなるのではないかとという研究代表者の発見は、異常型プリオン蛋白質産生メカニズムの解明に新たな指針を与える。興味深いことにネクロトーシスの関与は、同じく蛋白質凝集体の蓄積が原因のアルツハイマー病やパーキンソン病でも報告されている。よって、プリオン病で得られた研究成果は、神経変性疾患全般の発症機構解明にフィードバックすることも可能となる。

研究成果の概要（英文）：Prion diseases are neurodegenerative disorders in which normal prion protein expressed in healthy nervous tissue undergoes conformational conversion into an infectious, protease K resistant, abnormal prion protein that accumulates in the central nervous system, but the molecular mechanism is unknown and no treatment exists. We have found that infection of mouse neuroblastoma cells with influenza virus induces necroptosis and the production of abnormal prion protein. In this study, we hypothesized that necroptosis might trigger the production of abnormal prion protein, and induced necroptosis in mouse neuroblastoma cells using chemicals, but failed to confirm the production of abnormal prion protein.

研究分野：分子生物学

キーワード：プリオン ネクロトーシス 神経変性

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、構造変換によって感染性を有するプロテアーゼ K (以下、PK) 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が、その分子機構は不明であり、治療法も存在しない。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 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。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。なかでも、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、毎年 100 万人に 1 人の割合で発症するが、異常型プリオン蛋白質がどのように産生するのか不明である。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、異常型プリオン蛋白質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神経病原性の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に変換することを発見している (Hara *et al.*, *Sci. Rep.* 2021)。さらに、異常型プリオン蛋白質が、なぜ IAV 感染により産生されるのか調べたところ、IAV が感染した神経細胞は、プログラム細胞死の 1 つであるネクロトーシスを惹起していた。そこで本研究では、ネクロトーシスが異常型プリオン蛋白質産生のトリガーとなりえるのかを明らかにすることで、異常型プリオン蛋白質産生メカニズムを解明する。

ネクロトーシス

ネクロトーシスは、2005年に提唱された概念で、プログラムされたネクローシスと言える細胞死である。ネクロトーシスでは、シグナル伝達において MLKL、RIP3 及び RIP1 がネクロソームと呼ばれる複合体を形成する。ネクロソームでは、RIP1 → RIP3 → MLKL と連続的にリン酸化が誘導され、リン酸化された MLKL はオリゴマーを形成して細胞膜と結合し、細胞膜を破壊するきっかけとなる孔 (ポア) を形成すると考えられている。

本研究により、ネクロトーシスがプリオン病発症のトリガーとなりえることが明らかとなれば、プリオン病がどのように発症するのかという病因の理解が可能となる。また興味深いことに、ネクロトーシス阻害剤による治療の効果が、同じく蛋白質凝集体の蓄積が原因のアルツハイマー病やパーキンソン病でも確認できたことが報告されている。この報告は、蛋白質凝集体の蓄積が原因の神経変性疾患では、プログラム細胞死によって形成されるオリゴマーが凝集体形成のきっかけになる可能性が示唆され、プリオン病で得られた成果は、ほかの神経変性疾患全般の理解に向けフィードバックすることも可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、プログラム細胞死の 1 つであるネクロトーシスが、異常型プリオン蛋白質の産生とどのように関係しているのかを明らかにすることで、異常型プリオン蛋白質産生メカニズムを解明する。具体的には、以下の通りに研究をすすめる。

- (1) ネクロトーシスと異常型プリオン蛋白質産生の関係を調べるために、マウスの神経細胞に、ネクロトーシスの阻害剤である Nec-1 共存下で IAV 感染を行う。その結果、ネク

ロトーシス惹起の指標である MLKL のリン酸化と異常型プリオン蛋白質産生の指標である PK 抵抗性プリオン蛋白質産生の両方が阻害されれば、ネクロトーシスの阻害が、異常型プリオン蛋白質産生を抑制していることを証明できたことになる。

- (2) 異常型プリオン蛋白質の産生が、ネクロトーシスを阻害することで抑制するならば、ネクロトーシス阻害剤がどのようにして異常型プリオン蛋白質の産生を抑制するのかを明らかにする必要がある。そのために、ネクロトーシスを惹起しない MLKL ノックアウト（以下、KO）細胞を作製し、IAV を感染する。その結果、MLKL KO 細胞への IAV 感染によって、異常型プリオン蛋白質の産生が確認できなければ、MLKL が異常型プリオン蛋白質の産生に関与していることを証明できたことになる。
- (3) 研究代表者は、神経細胞に IAV を感染すると、ネクロトーシスを惹起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へと構造変換することを発見している。そこで、ネクロトーシスを惹起することで異常型プリオン蛋白質を産生できるのではないかと考え、神経細胞を薬剤で処理し、ネクロトーシスを惹起することで、異常型プリオン蛋白質が産生するのか確認する。その結果、異常型プリオン蛋白質の産生が確認できれば、ネクロトーシスが異常型プリオン蛋白質産生のトリガーであることを証明できたことになる。

4 . 研究成果

ネクロトーシスと異常型プリオン蛋白質産生の関係を調べるために、マウスの神経細胞に、ネクロトーシスの阻害剤である 50 μ M Nec-1 共存下で、既報 (Hara *et al.*, *Sci. Rep.* 2021) に従って IAV 感染を行った。その結果、ネクロトーシス惹起の指標である MLKL のリン酸化と異常型プリオン蛋白質産生の指標である PK 抵抗性プリオン蛋白質産生の両方が阻害された。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いて MLKL KO 細胞を作製し、この細胞に IAV 感染を行ったところ、MLKL が発現している細胞と比べて、産生した異常型プリオン蛋白質量は減少するが、ゼロにはならないことが明らかになった。これらの結果は、MLKL が異常型プリオン蛋白質産生において、重要な役割を果たしているが、MLKL 以外にも異常型プリオン蛋白質の産生に関与する因子の存在が想定されることを意味している。そこで、MLKL 以外のネクロトーシス構成因子である RIP1、RIP3 についても KO 細胞を作製し、IAV 感染を行ったが、現時点では、異常型プリオン蛋白質の産生は確認できていない。

研究代表者は、神経細胞に IAV を感染すると、ネクロトーシスを惹起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へと構造変換することを発見している。そこで、神経細胞を 10 ng/mL TNF 、50 μ M zVAD で処理し、ネクロトーシスを惹起することで、異常型プリオン蛋白質を産生するかどうか検討した。しかし、残念なことに、ネクロトーシスを惹起しただけでは、異常型プリオン蛋白質の産生は確認できなかった。これまでにも、RNA (Nature, 2003) などがプリオン蛋白質の構造変換を促進することが報告されていることから、IAV/WSN 株由来の 1 μ g/mL ウイルス RNA 共存下、神経細胞を薬剤で処理し、ネクロトーシスを惹起した。しかしながら、この条件でも異常型プリオン蛋白質の産生は確認できなかった。

以上まとめると、

異常型プリオン蛋白質の産生には、ネクロトーシスが関与しているが、その役割については、MLKL だけでは説明できない。

ネクロトーシスを惹起しただけでは、異常型プリオン蛋白質は産生しない。ネクロトー

シス以外で異常型プリオン蛋白質の産生に関与する分子の候補としては、RNA や脂質などが考えられるが、現時点では、その同定に至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Pasiana Agriani Dini, Miyata Hironori, Chida Junji, Hara Hideyuki, Imamura Morikazu, Atarashi Ryuichiro, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 298
2. 論文標題 Central residues in prion protein PrPC are crucial for its conversion into the pathogenic isoform	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102381	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, 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 10109-10109
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 ネクロトーシスをトリガーとした異常型プリオン蛋白質産生の分子機構
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 廣川 信隆、板東 武彦 / 編著、原 英之 / 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
---------	---------