

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790955

研究課題名（和文）：プリオン仮説は本当か？：宿主自然免疫機構から探る真の病原体

研究課題名（英文）：Is a prion hypothesis the validity?: The real pathogen explored from the host innate immune systems

研究代表者

石橋 大輔（ISHIBASHI DAISUKE）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10432973

研究成果の概要（和文）：

本研究では、宿主の自然免疫機構に着目し、プリオン感染との関係について検討した。結果として転写因子 IRF3 がプリオン感染に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究により、自然免疫機構をターゲットにしたプリオン病の予防・治療薬の開発が進むと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this research assignment, we focused the innate immune system in host, and examined the relationship between prion infection and the system. As a result, we revealed that transcription factor IRF3 plays a key role in prion infection. Consequently, we considered that development of prevention and therapeutic agent against the prion disease which targeted the innate immune system would progress by this research project.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：プリオン・自然免疫・IRF3

1. 研究開始当初の背景

プリオン病はヒトを含む各種動物に見られる空砲変性及びグリオーシスなどの脳内病理変化を伴う難治性の中樞神経変性疾患で

ある。ヒトではクロイツフェルトヤコブ病（CJD）と称され、ヒツジではスクレイピー、さらにウシにおける牛海綿状脳症（狂牛病：BSE）など一連のこの疾患は、同一の病原体に

より発症すると考えられている。これまで病原体（プリオン）は、正常型プリオン蛋白質（PrP）の構造変換によって作られる異常型プリオン蛋白質と推測されているが確定はしていない（プリオン仮説）。また、病原体の感染経路は不明な点が多いが、実験的にはプリオンに暴露した臓器の経口、腹腔および脳内接種により感染が成立する。現在、ヒトからヒトおよびウシからウシへの同種感染やウシからのヒトへの異種感染など、種の壁を越える感染が問題となっており、世界中で様々な治療法および予防法の検討が行われている。プリオン病治療薬の開発には、in vitroの実験であるプリオン持続感染細胞中の異常型プリオン蛋白質をターゲットとしたスクリーニングが主に行われており、近年、このスクリーニングは治療薬研究にとって欠かせない実験系となっているが、結果として得られた薬剤・化合物が、必ずしもプリオン感染モデル動物を用いたバイオアッセイの検討において、劇的な治療効果を認めるわけではなく、結局死に至ってしまう。申請者らもプリオン蛋白質を認識する抗体に着目し、プリオン病モデルマウスにおいて生存期間が延長するプリオンワクチンを開発してきた(1,2)が、同様に死に至る。つまり、プリオン病では**病原体の感染に関わる主要な因子および感染経路メカニズムが未だ確定、解決していないという大きな問題**があるため、治療、予防薬の実用化までは至っていないのである。

<病原体の信頼性>

プリオン仮説は、正常型 PrP ノックアウトマウスにプリオンに暴露した脳乳剤の感染させる実験が基盤となっており、現在のところ、異常型プリオン蛋白質自身が病態に深く関わることについては合意されているが、プリオンに暴露した臓器からの**病原体の単離は**

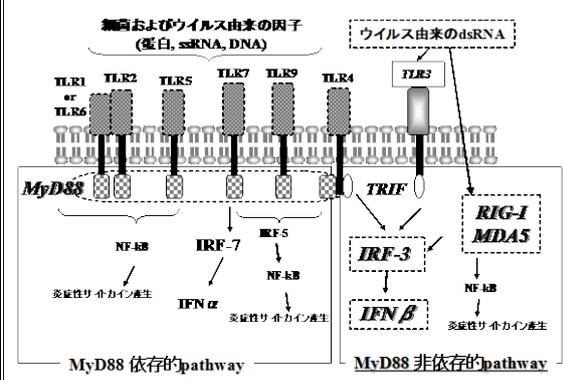
未だ成されておらず真に蛋白質のみで構成されているか否かについては結論がでない。

興味深いことに、近年、当研究室の西田教授らにより in vivo および in vitro の系を用いたプリオン感染実験において、ウイルス感染時に特徴的な“干渉”という現象が証明され(3,4)、さらに、プリオン感染は Retrovirus により増強効果があること(5)や、プリオン持続感染細胞にウイルス様の粒子が存在していること(6)などが報告されている。これらことは、**プリオン感染に際しウイルスを含む新たな別の因子が感染に関与している可能性を示唆するものである。**

<病原体に関与する因子の可能性>

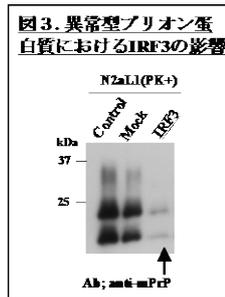
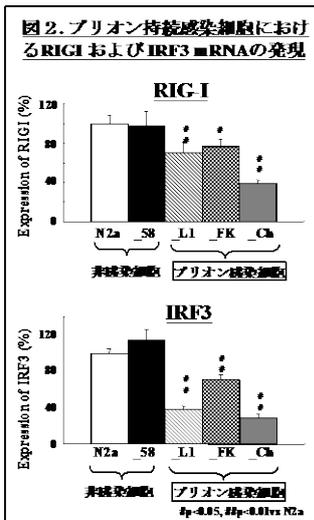
生体外の因子（ウイルス、細菌など）がプリオン感染に関与すると仮説づけると、感染時には何らかの免疫機構が働いている可能性があると考えられる。一般的に、生体内へのウイルスや細菌などの侵入により、リンパ球系細胞による免疫機構が働くが、その一端を担っているのが自然免疫機構（TLRs、IRFs など）（図1）であり、近年、細胞内への病原体の感染とその機構の重要性について数多くの報告がなされている。特に、Newcastle disease virus 等いくつかの RNA ウイルスゲノムが自然免疫機構のセンサーとして働く TLR3 や RIG-I、MDA5 に結合し、下流の転写因子 IRF3 を介して I 型 IFN β を誘導すること

図1. 自然免疫機構におけるTLRsシグナルカスケード



が報告されている (7)。

2. 研究の目的



プリオン感染と自然免疫機構との関与については、まだまだ不明な点が多い。そこで、我々は、プリオン持続感染細胞における自然免疫関連分子の発現を調べたところ、ウイルス由来の dsRNA に対し働く MyD88 非依存のシグナルカスケードの代表的な因子である RIG-I や IRF3 の有意な発現減少が確認された (未発表: 図 2)。さらに、プリオン持続感染細胞への IRF3 の強制発現により、異常型プリオン蛋白質の発現抑制が見られた (図 3)。これらの結果は、MyD88 非依存シグナルカスケードの因子が、プリオン感染に関与する可能性を示唆しており、未知のウイルスなどの因子がプリオン感染に影響を及ぼしていると考えられる。これらことは、近年報告された細菌由来の因子により働く MyD88 依存のカスケードがプリオン感染に影響しないこと (8) と矛盾しないのである。そこで、本研究では、**プリオン病原体を構成する微小な RNA (non-coding, small RNA) の存在を想定し、外来性 RNA により惹起される自然免疫機構に焦点を置きプリオン感染の成立機構および病原体の特定について検討すること**を目的とした。

(参考文献)

1) [Ishibashi D., Yamanaka H., Yamaguchi N.,](#)

[et al. Vaccine. 2007. 25. 985-992.](#)

2) [Yamanaka H., Ishibashi D., Yamaguchi N., et al. Vaccine. 2006. 24. 2815-2823.](#)

3) [Nishida N., Katamine S., Manuelidis L. Science. 2005. 310. 493-496.](#)

4) [Manuelidis L., et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. 95. 2520-2525.](#)

5) [Lablanc P., Alais S., et al. EMBO J. 2006. 25. 2674-2685.](#)

6) [Manuelidis L., et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007. 104. 1965-1970.](#)

7) [Kato H., Takeuchi O., Sato S., et al. Nature. 2006. 441. 101-105.](#)

8) [Prinz M., et al. EMBO reports. 2003. 4. 195-1-199.](#)

3. 研究の方法

平成 22 年度

<培養系におけるスクリーニングから新たな自然免疫関連候補因子の同定>

(1) プリオン持続感染細胞と非感染細胞との間における自然免疫関連因子発現の差異

リアルタイム PCR、ウェスタンブロット法質量分析装置 (LC MS/MS) 等を用いて当研究室で樹立済みのプリオン持続感染細胞に特徴的な自然免疫関連因子の探索を行う。

(2) 自然免疫関連因子のプリオン持続感染細胞に与える影響

上記 1) で検索した因子および、既存の自然免疫関連因子をプリオン持続感染細胞に遺伝子導入した際の異常型プリオン蛋白質の発現および遺伝子導入した非感染細胞におけるプリオン感染の影響について検討を行う。

平成 23 年度

<自然免疫関連候補因子とプリオン初期感染との関係性>

(1) 自然免疫関連候補因子の遺伝子操作によるプリオン感染の成立

スクリーニングなどで絞られた自然免疫関連因子の過剰発現した細胞にプリオンを感染させる in vitro 感染実験を行い、プリオン感染の成立への関与について検討する。

(2) 遺伝子改変マウスを用いたプリオン感染

の成立機序の解明

自然免疫シグナルカスケード上の転写因子 IRF3 のノックアウトマウス (Sato M, et al. *Immunity*. 2000. 13. 539-548.) を用いてプリオン感染の成立の経時的変化について検討する。

4. 研究成果

平成 22 年度

<培養系におけるスクリーニングから新たな自然免疫関連候補因子の同定>

(1) プリオン持続感染細胞と非感染細胞との間における自然免疫関連因子発現の差異

プリオン持続感染細胞と非感染細胞との間における自然免疫関連因子発現の差異についてリアルタイム PCR 法を用いてプリオン持続感染細胞に特徴的な自然免疫関連因子の探索を行った結果、ウイルス由来の dsRNA に対し働く MyD88 非依存のシグナルカスケードの代表的な因子である RIG-I、TLR3、IRF3 その下流の因子 IFN β など有意な発現減少が確認された。さらにプリオン持続感染・非感染細胞ライセートの iTRAQ ラベルによる LC/MSMS の解析により TLR4 の発現の差違が確認された。これらの結果は、プリオン感染が自然免疫機構に何らかの関与を示しているものであり、特に、MyD88 非依存シグナルカスケードの因子がターゲットとなっていると示唆された。

(2) 自然免疫関連因子のプリオン持続感染細胞に与える影響

プリオン持続感染細胞への IRF3 の強制発現により、異常型プリオン蛋白質の発現抑制が見られ、一方 IRF3siRNA を用いた検討により、異常型プリオン蛋白質の発現増加も確認された。

上記の結果より、平成 22 年度では MyD88 非依存シグナルカスケードの因子の中でも

IRF3 が重要な役割を担っていると提起した。

平成 23 年度

<自然免疫関連候補因子とプリオン初期感染との関係性>

(1) 自然免疫関連候補因子の遺伝子操作によるプリオン感染の成立

プリオン非感染細胞に IRF3 遺伝子を導入し、IRF3 恒常過剰発現細胞を作成した。その細胞にプリオン病発症マウスの脳乳剤を添加し、継代後の PrP^{Sc} の発現について検討した。この *in vitro* プリオン感染実験において、IRF3 恒常的過剰発現細胞群は、コントロール群に比べプリオン感染に対し抵抗性であった。

(2) 遺伝子改変マウスを用いたプリオン感染の成立機序の解明

IRF3 ノックアウト (IRF3^{-/-}) マウスを用いて、*in vivo* プリオン感染実験を行った。異なる 3 種のプリオン株、22L (スクレイピー由来)、Fk-1 (GSS 由来)、mBSE (BSE 由来) のプリオン感染において IRF3^{-/-} マウスは野生型に比べ有意に早期の病態発症が確認され、22L 株感染後 25 週の IRF3^{-/-} マウスの脳における空胞変性、グリオシスの程度は、野生型に比べ重度であった。

これらの結果より、MyD88 非依存シグナルカスケードの中でも IRF3 がプリオン感染の初期に重要な役割を担っていると考えられる。

以上の結果は、今日まで否定的であった「プリオン感染では IFN system は惹起されない」定説に異を唱えるものであり。プリオン感染に異常型プリオン蛋白以外の未知のウイルスなどの他の因子がプリオン感染に影響を及ぼしている可能性を提起するものである。さらに、MyD88 非依存シグナルカスケードの中でも IRF3 がプリオン感染の初期

に重要な役割を担っていると考えられ、今後、IRF3 を介したシグナルカスケード因子によるプリオン感染防御機構のより詳細なメカニズムを明らかにすることにより、この系を賦活化させる化合物などを探索し、実用化に向けた治療薬および予防薬開発を目指すことを考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- 1) Ishibashi D, Atarashi R, Fuse T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Satoh K, Honda K, Nishida N. Protective role of interferon regulatory factor3-mediated signaling against prion infection. *J Virol*. 査読有, 2012 Feb 29. In press.
- 2) Kubota T, Hamazoe Y, Hashiguchi S, Ishibashi D, Akasaka K, Nishida N, Katamine S, Sakaguchi S, Kuroki R, Nakashima T, Sugimura K. Direct evidence of generation and accumulation of β -sheet-rich prion protein in ScN2a cells de novo illuminated by human IgG1 antibody recognizing β -form but not α -form of prion protein. *J Biol Chem*. 査読有, 2012 Feb 22. In press.
- 3) Ishibashi D, Yamanaka H, Mori T, Yamaguchi N, Yamaguchi Y, Nishida N, Sakaguchi S. Antigenic mimicry-mediated anti-prion effects induced by bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase in mice. *Vaccine*. 査読有, 29(50), 2011, 9321-8.
- 4) Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med*. 査読有, 17(2), 2011, 175-8.
- 5) 石橋 大輔 「プリオン仮説」の証明はどこまで進んだのか? Today, How much do we know now about the prion theory? 最新医学, 査読無, 65 巻 10 号, 2010 年, p2306-2310.

[学会発表] (計5件)

- 1) 本間拓二郎、石橋大輔、西田教行. 異常型プリオン蛋白の細胞内代謝機構の解明. 第36回長崎感染症研究会. 2012 年年3月24日. 長崎大学 (良順会館)
- 2) Daisuke Ishibashi, Hitoki Yamanaka, Naohiro Yamaguchi, Yoshitaka Yamaguchi, Noriyuki Nishida. Suehiro Sakaguchi. 細菌由来の蛋白succinylarginine dihydrolaseの免疫によるプリオン病の予防効果. Immunization with bacterial enzyme succinylarginine dihydrolase induces antigenic mimicry-mediated anti-prion effects in mice. 第40回日本免疫学会総会. 2011.11.27-29, 幕張メッセ.
- 3) Takujiro Homma, Daisuke Ishibashi, Noriyuki Nishida. Analysis of murine interferon regulatory factor-3 (IRF-3) promoter. IUMS 2011. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011. 2011.9.6-10. Sapporo.
- 4) Daisuke Ishibashi, Noriyuki Nishida . Protective Role of Interferon Regulatory Factor 3-Dependent Signaling Against Prion Infection. *Prion* 2011. 2011.5.5-11. Montreal, Canada.
- 5) 本間拓二郎、石橋大輔、西田教行. プリ

オン感染における Interferon regulatory factor-3 (IRF-3) 遺伝子の発現抑制機序の解明. 第 35 回長崎感染症研究会. 2011 年 3 月 26 日. 長崎大学 (良順会館)

- 6) Kazunori Sano, Ryuichiro Atarashi, Daisuke Ishibashi, Naohiro Yamaguchi, Takayuki Fuse, Noriyuki Nishida. Reconstruction of infectious prion protein in vitro. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 2010.12/7-10.神戸.
- 7) 中垣 岳大, 佐藤 克也, 鎌足 雄司, 新 竜一郎, 石橋 大輔, 山口 尚宏, 西田 教行. FK506 はプリオン感染マウスの生存期間を延長させる. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010.12/7-10.神戸.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cmb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 大輔 (ISHIBASHI DAISUKE)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号 : 10432973

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し