

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461514

研究課題名(和文) 二本鎖RNAによるプリオン感染促進分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Involvement of double-stranded RNA in the pathogenesis of prion disease

研究代表者

佐野 和憲 (SANO, KAZUNORI)

福岡大学・薬学部・講師

研究者番号：50534343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：病原体プリオンはウイルスなどとは異なり、病原特異的な核酸を持たず、おそらくは単一の異常型プリオンタンパク(PrP<sup>Sc</sup>)のみから構成されていると推測されている。しかしながら、ウイルス感染時の特徴的な干渉現象や自然免疫機構の活動がプリオン感染時においても見られ、ウイルス由来の核酸などPrP<sup>Sc</sup>以外の因子がプリオン感染病態に関与することが示唆される。本研究により我々は、プリオン感染病態にPrP<sup>Sc</sup>以外の修飾・補助因子として二本鎖RNAもしくは二本鎖RNA様因子と、その宿主側シグナル分子群である自然免疫関連因子が関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Although the pathogenesis of prion disease has not been clarified fully, it is widely accepted that prion disease occurs through autocatalytic conformational conversion of the ubiquitous normal form of prion protein (PrP<sup>C</sup>) to PrP<sup>Sc</sup> in a protein only manner. Meanwhile, activation of the innate immune system has been suggested to partially block the progression of prion disease. Furthermore, different prion strains can interfere with each other, and this is known as prion strain interference. The results suggest that cofactors, such as virus derived nucleic acids, involve in prion propagation. In this study, we demonstrated that double-stranded RNA innate immune responses play a key role in the pathogenesis of prion disease.

研究分野：神経分子病態学

キーワード：プリオン dsRNA 感染

### 1. 研究開始当初の背景

プリオン病(別名; 伝達性海綿状脳症)は病原体プリオンによって引き起こされる致死性の神経変性疾患であり、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease: CJD)、ヒツジのスクレイピー、牛の牛海綿状脳症(Bovine Spongiform encephalopathy: BSE)などが代表的な疾患である。現在、病原体プリオンはウイルス、細菌などとは異なり、病原特異的な核酸を持たず、正常型プリオンタンパク(PrP)からの構造変換によって凝集・蓄積される異常型PrP(PrP<sup>Sc</sup>)が主要構成因子と推測されている。一方PrP以外の修飾・補助因子の存在することを示唆する報告もなされているが、それら因子の存在についてはまだ議論のあるところであり、プリオン感染病態における役割も解明されていない。

ヒトのプリオン病であるCJDは自然発症型の孤発性、PrP遺伝子異常による遺伝性、

プリオンの汚染による感染性に分類され、孤発性CJDはCJD全体の78%を占めるにもかかわらず、現在のところ発症原因は解明されていないが(図1)研究代表者らは予備的実験から(研究の目的に後述)PrP<sup>Sc</sup>以外の修飾・補助因子が孤発性CJDの発症に大きく関与しているのではないかと考えている。

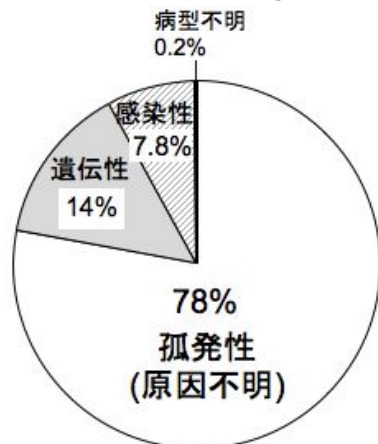


図1. CJDサーベイランス委員会(1999年4月～2007年2月)により調査されたCJDの分類

### 2. 研究の目的

これまでにウイルス感染時の特徴的な干渉現象(Science. 310:493-6. 2005)や自然免疫機構の活動(J Virol. 86:4947-55. 2012)がプリオン感染時においても見られることが証明され、ウイルスなどPrP<sup>Sc</sup>以外の因子の関与が示唆されている。さらに、研究代表者らは、ウイルス由来の二本鎖RNA(dsRNA)と同様の免疫活性を持つ合成dsRNAであるPolyI:Cが、野生型マウスにおけるプリオン感染後の発症までの潜伏期間を短縮し、神経芽細胞腫細胞株N2a58細胞におけるプリオン感染後のPrP<sup>Sc</sup>蓄積を増大することを確認した。これらの結果は、dsRNAがプリオン感染を促進し、プリオン病を増悪させる因子であることを示している。本研究では、プリオン

病における二本鎖RNAの作用メカニズムを解析し、未だ不明確である病原体プリオンの感染病態機構を解明することが目的である。

### 3. 研究の方法

#### 【培養細胞へのプリオン感染】

22L株プリオン感染マウス脳乳剤のN2a58細胞への感染時に、PolyI:C、一本鎖RNA(PolyU)、二本鎖DNA(dsDNA)、リポ多糖(LPS)を処置し、その後のPrP<sup>Sc</sup>の発現について検討を行った。PrP<sup>Sc</sup>は回収した細胞試料を蛋白分解酵素(Proteinase-K:PK)による消化後、ウエスタンブロット法により検出した。さらに、その関連分子の遺伝子、siRNAの導入により分子を人為的に増減させたN2a58細胞に対して22Lプリオン感染実験することにより、その作用メカニズムを解析した。

#### 【野生型マウスへのプリオン感染】

22L株プリオン感染マウス脳乳剤の野生型マウスへの脳内投与による感染時に、PolyI:C、PolyU、LPSをそれぞれ同時に脳内投与し、プリオン病態進行に対する因子の作用を観察した。

#### 【PMCA法(Protein misfolding cyclic amplification)】

野生型マウス由来の正常脳乳剤と1ng PrP<sup>Sc</sup>相当量の22L株プリオン感染マウス脳乳剤を混ぜ合わせて、そこに間欠的な超音波処理をすることによりPrP<sup>Sc</sup>を増幅するPMCA法を用いて、無細胞系PrP<sup>Sc</sup>増幅におけるPolyI:Cの作用を調べた。

### 4. 研究成果

N2a58細胞への22Lプリオン感染と同時にPolyI:C、PolyU、dsDNA、LPSをそれぞれ同時に添加し48時間後PrP<sup>Sc</sup>蓄積の増減を測定した。PolyI:C(0.02, 0.2, 2μg)は、濃度依存的にN2a58細胞におけるPrP<sup>Sc</sup>蓄積を増大した(図2)。一方、PolyU、dsDNA、LPS添加後のPrP<sup>Sc</sup>蓄積には有意な変化は観察されなかった。そのPolyI:C(2μg)のPrP<sup>Sc</sup>蓄積に対する増大作用は、dsRNA分解酵素であるRNaseの前処理により抑制された(図3)。さらに、PolyI:C(2μg)は野生型マウスにおける22Lプリオン感染後発症までの潜伏期間を有意に短縮した(図4)。一方、PolyU、LPSが投与された野生型マウスでは、有意な潜伏期間の変化は観察されなかった。これらの結果は、dsRNAがプリオン感染を促進し、プリオン病を増悪させる特異的な因子であることを示している。

次に、PolyI:CのPrP<sup>Sc</sup>蓄積増大作用が、PrP<sup>Sc</sup>に対する直接的な作用によるものなのかを判断するため、PolyI:C(2μg)を前処置し0, 3, 24, 48時間後にPBSによる洗浄を行った後、22Lプリオン感染実験を行った。その結果、24, 48時間処置群において、PolyI:CはPrP<sup>Sc</sup>蓄積を増大し(図5)PolyI:Cの除去後も同様の反応が観察されることが判明した。さらに、無細胞系であるPMCA法においては、

PolyI:C (0.2, 2 μg) は PrP<sup>Sc</sup> 増幅に対して有意な作用を示さなかった (図6)。このことから、PolyI:C の PrP<sup>Sc</sup> 蓄積増大作用は PrP<sup>Sc</sup> への直接的な作用によるものではなく、宿主側シグナル分子群が関与していることが示唆された。

N2a58 細胞へ dsRNA を認識する Toll-like receptor 3 (TLR3) を導入することによって、プリオン感染後の PrP<sup>Sc</sup> 蓄積が増大した (図7)。また、dsRNA を認識する Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)、Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) の導入によっても PrP<sup>Sc</sup> 蓄積の増大が観察された (図7)。一方、LPS を認識する TLR4、一本鎖 RNA を認識する TLR8 の導入は PrP<sup>Sc</sup> 蓄積に影響しなかった (図7)。

また、TLR3、RIG-I に対する siRNA の神経芽細胞への導入は、PolyI:C 非存在下及び存在下における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積に対して抑制傾向を示した (図8)。

以上の結果より、プリオン感染に PrP 以外の修飾・補助因子として dsRNA もしくは dsRNA 様因子と、その宿主側シグナル分子群である TLR3、RIG-I、MDA5 などの自然免疫関連因子が働いていることが示唆された。

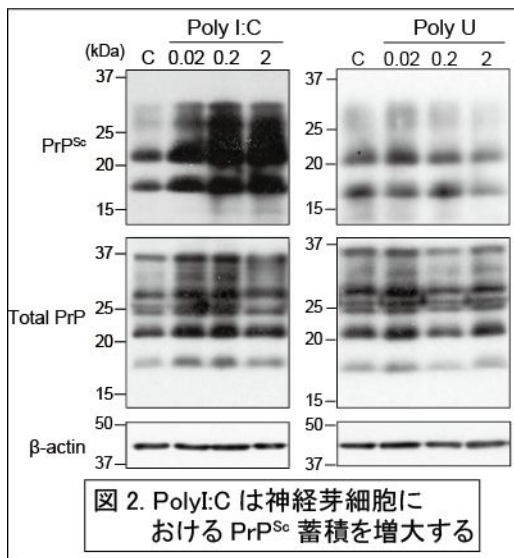


図2. PolyI:C は神経芽細胞における PrP<sup>Sc</sup> 蓄積を増大する

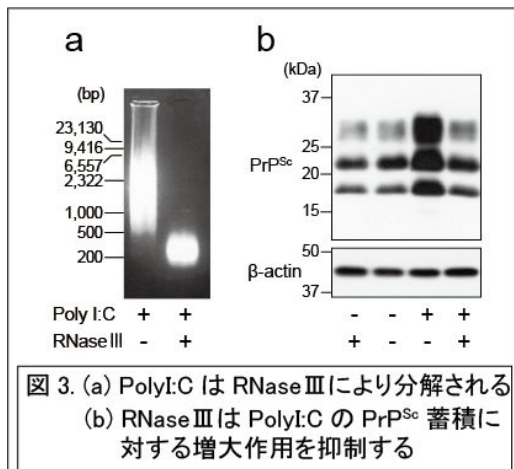


図3. (a) PolyI:C は RNase III により分解される (b) RNase III は PolyI:C の PrP<sup>Sc</sup> 蓄積に対する増大作用を抑制する

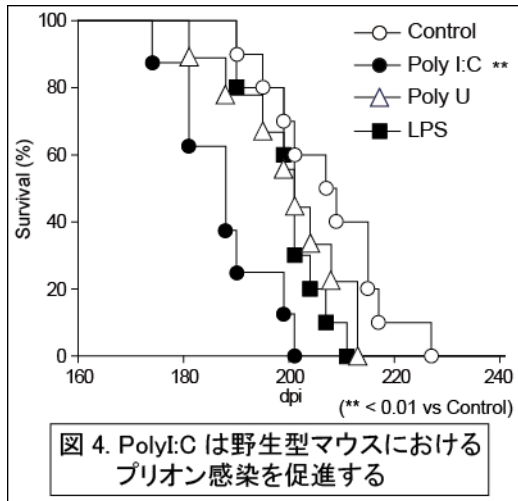


図4. PolyI:C は野生型マウスにおけるプリオン感染を促進する

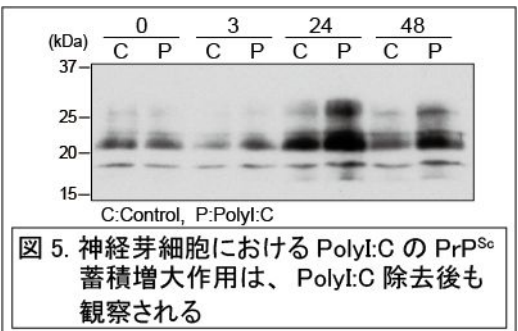


図5. 神経芽細胞における PolyI:C の PrP<sup>Sc</sup> 蓄積増大作用は、PolyI:C 除去後も観察される

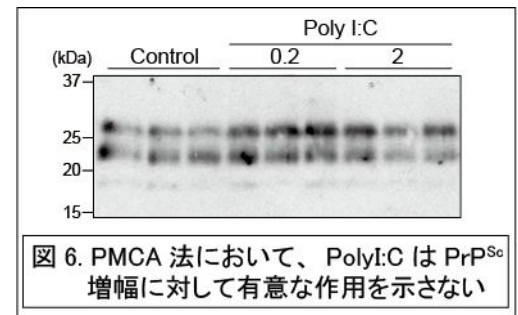


図6. PMCA 法において、PolyI:C は PrP<sup>Sc</sup> 増幅に対して有意な作用を示さない

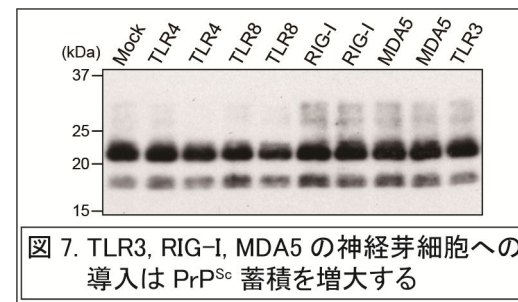


図7. TLR3、RIG-I、MDA5 の神経芽細胞への導入は PrP<sup>Sc</sup> 蓄積を増大する

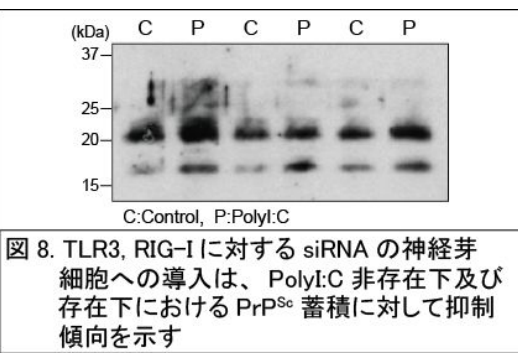


図8. TLR3、RIG-I に対する siRNA の神経芽細胞への導入は、PolyI:C 非存在下及び存在下における PrP<sup>Sc</sup> 蓄積に対して抑制傾向を示す

## 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2件)

Kazunori Sano, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. Structural conservation of prion strain specificities in recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion, Prion, 査読有, 9巻, 2015, 237-243  
DOI : 10.1080/19336896.2015.1062201

Kazunori Sano, Ryuichiro Atarashi, Daisuke Ishibashi, Takehiro Nakagaki, Katsuya Satoh, Noriyuki Nishida. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion, Journal of virology, 査読有, 88巻, 2014, 11791-11801  
DOI : 10.1128/JVI.00585-14

〔学会発表〕(計1件)

Kazunori Sano, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion, PRION2014, 2014年5月27日, Trieste

〔図書〕(計1件)

佐野和憲、西田教行. 中外医学社、「プリオン蛋白異常化とプリオン病感染の機序」プリオン病 Clinical Neuroscience. Vol.31(9), 2013, 3(1019-1021)  
〔産業財産権〕

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 和憲 (SANO, Kazunori)

福岡大学・薬学部・講師

研究者番号 : 50534343