

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860671

研究課題名(和文)オートファジー活性化剤によるプリオン病治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of anti prion therapy by autophagy inducers

研究代表者

中垣 岳大 (NAKAGAKI, Takehiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：80722917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が見出したオートファジー活性化剤であるFK506と既知のオートファジー活性化剤(Torin1, Torin2など)をそれぞれプリオン感染細胞に添加してその抗プリオン効果を比較した。Torin1, Torin2はオートファジー感受性のプリオン株(Fukuoka-1)感染細胞においてPrPScを約50%減少させたが、オートファジー抵抗性のプリオン株(22L)感染細胞に対しては抗プリオン効果を示さなかった。一方でFK506はFukuoka-1、22Lいずれの感染細胞においてもPrPScを約80%減少させた。以上よりFK506の抗プリオン効果は他のオートファジー活性化剤よりも強力であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We focused on autophagy that is degradation pathway of abnormal prion protein (PrPSc) as a therapeutic target of prion diseases. Previously, we reported that FK506 can be a therapeutic agent by activating autophagy. The most known regulator of autophagy is mammalian Target Of Rapamycin(mTOR). Torin1 and Torin2 which inhibit mTOR are well known autophagy inducer. We compared the anti prion effect of autophagy inducers(FK506, Torin1 and Torin2). Whereas Torin 1 and Torin2 they are well known autophagy inducers decreased PrPSc by about 50% in autophagy sensitive prion strain (Fukuoka-1 strain) infected cells, they did not reduce PrPSc in autophagy resistant strain (22L strain) infected cells. On the other hand, FK506 reduced PrPSc by about 80% in the cells with both Fukuoka-1 and 22L strains. These results suggested that FK506 has anti-prion effect stronger than already known autophagy inducers.

研究分野：プリオン病

キーワード：FK506 プリオン病 オートファジー 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は感染性を持つタンパク質(異常型プリオンタンパク:PrP^{Sc})を病原体とする致死性の神経変性疾患である。PrP^{Sc}は正常型プリオンタンパク(PrP^C)と結合することで、PrP^{Sc}に構造変換する。この反応が繰り返される結果、PrP^{Sc}が脳内に蓄積する。これまでに挙げられてきた治療薬の候補は、主にプリオンタンパクと結合して構造変換を抑制するものであった。しかし、その多くは *in vitro* で有効であっても、*in vivo* における効果は限定的であり、新たな治療ターゲットが必要とされている。近年では PrP^{Sc} がオートファジーと呼ばれるタンパク分解経路によって分解されていると考えられている。オートファジー活性の調節因子の一つに mammalian Target Of Rapamycin(mTOR)がある。mTOR 阻害剤は最もよく知られているオートファジー活性化剤である。しかしその一方で mTOR 非依存性のオートファジーも存在しており、その全容は明らかになっていない。近年では、FK506 Binding Protein (FKBP)と呼ばれるタンパク質もオートファジー活性の調節に関与していると報告されている。FKBP は免疫抑制剤 FK506 と結合することが知られている。そこで我々は FK506 がオートファジーを活性化させる作用を有する、さらにこの作用によってプリオン病の治療薬になり得ると考えてその効果を検証した。FK506 をプリオン感染細胞に添加したところ、オートファジーに特徴的なオートリソソームが増加し、PrP^{Sc}が減少した。さらにオートファジーの阻害剤である NH₄Cl や BafilomycinA1 を細胞に加えると FK506 を添加しても PrP^{Sc}の減少は見られなくなった。次にプリオン感染マウスに感染 20 日後から FK506 を腹腔内投与したところ、非治療群に比べて生存期間が約 14 日間延長した。さらに非治療群の発症時(感染 110 日後)において治療群はオートファジー関連因子が増加し、PrP^{Sc}の蓄積が抑制されていた。以上の結果から FK506 はオートファジーを活性化させることでプリオン病の治療薬になり得ると考えられた (Nakagaki T, et al. Autophagy 2013)。

2. 研究の目的

FK506 のオートファジー活性化作用を解明することで新たなオートファジー活性化経路の発見や複数のシグナル経路間のクロストークを明らかにする。さらに、作用機序の異なる様々なオートファジー活性化剤のプリオン病に対する治療効果を比較することで、有効なプリオン病治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

ヒト遺伝性プリオン病由来の Fukuoka-1 株

はオートファジー感受性のプリオン株であるが、ヒツジのプリオン病(スクレイピー)由来のプリオン株である 22L 株オートファジーに抵抗性であると報告されている。

mTOR は AKT によって活性調節を受けていることから、mTOR 阻害剤だけでなく AKT 阻害剤もオートファジー活性化作用を有している。また、mTOR 非依存性のオートファジー活性化剤としてイノシトール三リン酸産生阻害作用を有する Lithium chloride (LiCl)などがある。これら既知のオートファジー活性化剤と FK506 をそれぞれプリオン感染細胞に添加して PrP^{Sc}の減少(抗プリオン効果)を評価した。

4. 研究成果

mTOR 阻害剤である Torin1、Torin2、Rapamycin をそれぞれ Fukuoka-1 感染細胞に添加すると、いずれも PrP^{Sc}を 50%程度減少させた。その一方で 22L 感染細胞においては PrP^{Sc}の減少は認められなかった。

panAKT 阻害剤である AZD6353 は Fukuoka-1 および 22L 感染細胞のいずれにおいても PrP^{Sc}の減少が認められなかった。

LiCl は Fukuoka-1 感染細胞においては mTOR 阻害剤と同程度の抗プリオン効果を示したが、22L 感染細胞においては PrP^{Sc}を約 70%減少させた。

一方 FK506 は Fukuoka-1 および 22L 感染細胞のいずれにおいても PrP^{Sc}を 80%程度減少させた。

以上の結果から Fukuoka-1 株は AKT 阻害剤以外のいずれのオートファジー活性化剤に対しても感受性を示した。22L 株は mTOR 阻害剤に対しては抵抗性を示すのに対して LiCl には感受性であった。このように同じオートファジー活性化剤でもプリオン株によって抗プリオン効果が異なることが明らかになった。さらに FK506 は Fukuoka-1 および 22L のいずれのプリオン株に対しても強力な抗プリオン効果を示した。

FK506 のオートファジー活性化作用については明らかになっていないが、他のオートファジー活性化剤と比較しても強力な抗プリオン効果を有することが分かった。今後は FK506 の作用機序を明らかにするとともに、臨床応用への道を探る予定である。

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 7 件)

1. Fuchigami T, Yamashita Y, Kawasaki M, Ogawa A, Haratake M, Atarashi R, Sano K, Nakagaki T, Ubagai K, Ono M, Yoshida S, Nishida N, Nakayama M.

- Characterisation of radioiodinated flavonoid derivatives for SPECT imaging of cerebral prion deposits. *Sci Rep.* Dec 16;5:18440, 2015. 査読有
2. Ishibashi D, Homma T, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Takatsuki H, Atarashi R and Nishida N. Strain-Dependent Effect of Macroautophagy on Abnormally Folded Prion Protein Degradation in Infected Neuronal Cells. *PLoS One.* Sep 14;10(9) 2015. 査読有
 3. Takatsuki H, Satoh K, Sano K, Fuse T, Nakagaki T, Mori T, Ishibashi D, Mihara B, Takao M, Iwasaki Y, Yoshida M, Atarashi R and Nishida N. Rapid and Quantitative Assay of Amyloid-Seeding Activity in Human Brains Affected with Prion Diseases. *PLoS One.* Jun 12;10(6), 2015. 査読有
 4. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Mori T, Satoh K, Atarashi R and Nishida N. Ubiquitin-specific protease 14 modulates degradation of cellular prion protein. *Sci Rep.* Jun 10;5:11028, 2015. 査読有
 5. Sano K, Atarashi_R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, and Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *J Virol.* Oct;88(20):11791-801. 2014. 査読有
 6. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Atarashi R, and Nishida N. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. *Sci Rep.* Aug 8;4:6006. 2014. 査読有
 7. Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Sano K, Atarashi R, and Nishida N. Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. *Sci Rep.* 28;4:4504 2014. 査読有
- 〔学会発表〕(計 2 件)
1. Takehiro Nakagaki, Noriyuki Nishida and Ryuichiro Atarashi. The comparison of anti-prion effect of autophagy inducers. Asia Pacific Prion Symposium 2015, 石川音楽堂(石川県金沢市), September 4th-5th 2015.(ポスター発表)
 2. 中垣岳大, 森剛志, 古川佳奈, 西田教行, 多剤併用療法によるプリオン病治療の確立, 第 51 回ウイルス学会九州支部総会 演題番号 33, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市), 2014 年 9 月 5 日(口頭発表)
- 〔図書〕(計 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
- 取得状況(計 0 件)
- 名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

受賞

Best Poster Award および Young Travel Award
受賞(Asia Psific Prion Symposium 2015)

6．研究組織

(1)研究代表者

中垣 岳大 (NAKAGAKI, Takehiro)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科(医学系) 助教
研究者番号：80722917