

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15380

研究課題名(和文) 我々の最新の発見は薬剤耐性ウイルスを誘導しない夢の抗インフルエンザ薬を可能にする

研究課題名(英文) Elucidation of our recent findings on the protective role of prion protein against lethal infection with influenza A viruses is useful for development of a new type of anti-influenza drugs

研究代表者

坂口 末廣 (SAKAGUCHI, Suehiro)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・教授

研究者番号：60274635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン蛋白質は、肺にも発現する。我々は、プリオン蛋白質欠損マウスがA型インフルエンザウイルスに感染すると高い死亡率を示すことを見出した。欠損マウスの肺内の活性酸素種は高く、肺上皮細胞はアポトーシスを起こしていた。活性酸素種スカベンジャーを投与すると、ウイルス感染による欠損マウスの死亡率が改善された。欠損マウスの肺内の銅イオン及び銅/亜鉛依存性スーパーオキシドジスムターゼ活性は低下していた。以上の結果は、プリオン蛋白質が銅イオンの調節を介して銅/亜鉛依存性スーパーオキシドジスムターゼを活性化し、活性酸素種による肺上皮細胞のアポトーシスを抑制し、インフルエンザウイルス感染を防御することを示した。

研究成果の概要(英文)：Here we show that the cellular prion protein, PrPC, is expressed in lung epithelial cells. Compared with wild-type (WT) mice, PrPC-null mice (Prnp0/0) developed higher mortality after infection with influenza A viruses (IAVs). Infected Prnp0/0 lungs were severely injured, with higher apoptosis of the epithelial cells, and contained higher ROS than control WT lungs. Treatment with a ROS scavenger rescued Prnp0/0 mice from the lethal infection with IAV. These results indicate that PrPC provides a protection against lethal infection with IAVs by reducing ROS in infected lungs. Cu contents and the activity of anti-oxidant enzyme Cu/Zn-dependent superoxide dismutase, SOD1, were lower in Prnp0/0 lungs than in WT lungs. It is thus conceivable that PrPC functions to maintain Cu contents and regulate SOD1 in lungs, thereby reducing ROS in IAV-infected lungs and eventually protecting from lethal infection with IAVs, suggesting that PrPC might be a new target for anti-influenza therapeutics.

研究分野：分子生物学

キーワード：プリオン蛋白質 インフルエンザ インフルエンザウイルス 活性酸素種 銅イオン 銅/亜鉛依存性スーパーオキシドジスムターゼ ノックアウトマウス アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

正常型プリオン蛋白質は、神経細胞に最も強く発現する膜糖蛋白質である。正常型プリオン蛋白質が構造変化を起こし蛋白質分解酵素抵抗性の異常型プリオン蛋白質に変換すると、プリオン病を引き起こす。最近、正常型プリオン蛋白質が神経保護に機能することが明らかとなってきた<sup>②-④</sup>。

正常型プリオン蛋白質は、神経組織と比べて発現レベルは少ないが、肺、心臓、及び腎臓などの神経組織以外の組織でも発現している。最近、正常型プリオン蛋白質が心臓及び腎臓を虚血による障害から保護する役割を担っていることが報告された<sup>5</sup>。これらの結果は、正常型プリオン蛋白質が神経組織のみでなく神経組織以外の組織でも保護機能を有することを示している。

A型インフルエンザウイルスは、肺の上皮細胞に感染しインフルエンザを引き起こす。小児や高齢者、また肺などに基礎疾患を有するヒトがインフルエンザウイルスに感染すると、重篤になり、時には死に至ることもある。

正常型プリオン蛋白質が、インフルエンザウイルス感染に対して防御的に機能するのか、これまで報告されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルス感染における正常型プリオン蛋白質の防御機能について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス

C57BL/6 正常マウスは SLC から購入した。正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスやオクタペプチド領域のみを欠損するプリオン蛋白質を発現する正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスは以前に作製された<sup>6</sup>。

#### (2) インフルエンザウイルスの調整

A型インフルエンザウイルス株 (PR8, Aichi, WSN) を鶏卵の尿膜腔内で増殖させ、超遠心にて精製した後、リン酸緩衝液生理食塩水に懸濁し、-80℃ に保存した。

#### (3) インフルエンザウイルス感染価の測定

イヌ腎臓尿細管上皮細胞 (NDCK) にウイルスを感染させ、ウイルス蛋白質 NP に対する抗体を用いて、免疫染色法にて感染細胞数を計測し、感染価を算出した。

#### (4) インフルエンザウイルス感染

5週令のマウスの両側の鼻腔内に 20 µL のウイルス量を接種した。接種後、2週間マウスを観察した。

#### (5) 銅イオンの測定

銅イオンの量、Metallo assay low copper LS

kit (Metallogenics) を用いて測定した。

#### (6) 活性酸素種の測定

活性酸素種の量は、OxiSelect<sup>TM</sup> Intracellular ROS Assay Kit (Cell Biolabs) を用いて測定した。

#### (7) スーパーオキシドジスムターゼ活性の測定

スーパーオキシドジスムターゼ活性は、OxiSelect<sup>TM</sup> Superoxide dismutase activity assay kit (Cell Biolabs) を用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 正常型プリオン蛋白質は肺上皮細胞に発現する

我々は、まず、正常型プリオン蛋白質の発現を C57BL/6 正常マウスの様々な組織についてウェスタンブロッティング法にて調べた。これまでの報告の通り、脳で最も高い発現が認められた (図1)。次に、肺で高く、脾臓、心臓、肝臓の順で発現が認められた (図1)。腸管では発現が検出できなかった (図1)。次に、どの細胞が正常型プリオン蛋白質を発現しているのか、免疫蛍光法にて調べた。その結果、1型及び2型肺上皮細胞、及びクララ気管支上皮細胞に正常型プリオン蛋白質の発現が確認された。これらの結果は、正常型プリオン蛋白質が肺組織の上皮細胞に発現していることを示した。

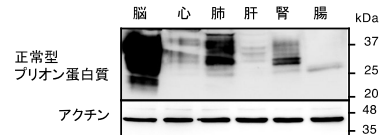


図1: 様々な組織における正常型プリオン蛋白質の発現

#### (2) 正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスはA型インフルエンザウイルス感染に高い感受性を示す

次に、インフルエンザウイルス感染における正常型プリオン蛋白質の役割を明らかにするために、正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスにA型インフルエンザウイルス (PR8株) を経鼻感染させた。コントロールとして、野生型マウスも同様に感染させた。コントロールマウスと比べて、ノックアウトマウスは非常に高い致死率で死亡した (図2A)。

感染した肺を病理学的に解析すると、ノックアウトマウスの肺は肺炎がひどく、無気肺が広く認められた。炎症性サイトカインもより多く産生されていた。ウイルスもノックアウトマウスの肺で、より多く産生されていた。

また、我々は、他のA型インフルエンザウイルス株 (Aichi, WSN) についても同様に調べた。その結果、PR8株と同様に、Aichi株及びWSN株に対しても、正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスは高い感受性を示し、高い死亡率で死亡した (図2B, C)。

以上の結果は、正常型プリオン蛋白質がA型インフルエンザウイルス感染に対して防御

的に機能し、死亡率を低下させることを示した。

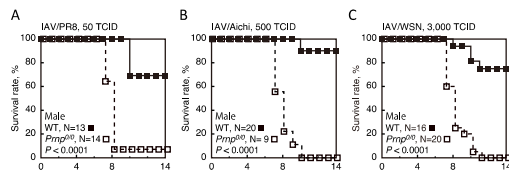


図2: 正常型プリオン蛋白質欠損(*Prnp*<sup>0/0</sup>)マウスと野生型(WT)マウスの生存率曲線  
A型インフルエンザウイルス(PR8, Aichi, WSN株)をそれぞれの感染価(TCID)で正常型プリオン蛋白質欠損(*Prnp*<sup>0/0</sup>)マウスと野生型(WT)マウスに径鼻感染させ、2週間観察した。

(3) オクタペプチド領域は正常型プリオン蛋白質のインフルエンザウイルス感染に対する防御機能に重要である

正常型プリオン蛋白質のN末側には、銅イオンと結合するオクタペプチド領域が存在する。そこで、インフルエンザウイルス感染に対するオクタペプチド領域の役割を明らかにするために、オクタペプチド領域のみを欠損するプリオン蛋白質を発現する正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスにPR8株を感染させた。その結果、これらのマウスはノックアウトマウスと同様な死亡率で死亡した(図3)。また、これらの死亡率は、野生型マウスの死亡率より高かった(図3)。つまり、オクタペプチド領域が正常型プリオン蛋白質の抗インフルエンザウイルス活性に重要な役割を担っていることが明らかになった。

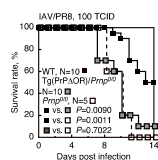


図3: 正常型プリオン蛋白質欠損(*Prnp*<sup>0/0</sup>)マウス、オクタペプチド領域のみを欠損するプリオン蛋白質を発現する正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウス(Tg(PrPAOR)/*Prnp*<sup>0/0</sup>)マウス、及び野生型(WT)マウスの生存率曲線  
A型インフルエンザウイルス(PR8株)を100TCID感染価でそれぞれのマウスに径鼻感染させ、2週間観察した。

(4) 銅イオン及びスーパーオキシドジスムターゼ活性が正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウス肺では低下している

正常型プリオン蛋白質の抗インフルエンザウイルス活性のメカニズムを解明するために、銅イオンを正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスと野生型マウスの肺で測定した。その結果、ノックアウトマウスの肺では銅イオンが低下していることが分かった。また、オクタペプチド領域のみを欠損するプリオン蛋白質を発現する正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスの肺でも低下していることが分かった。これらの結果は、オクタペプチド領域を介して、正常型プリオン蛋白質は銅イオンを肺内に留めておく機能を有することを示唆した。

銅イオンは、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ活性に重要である。そこで、この酵素の活性を正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスと野生型マウスの肺で測定した。その結果、ノックアウトマウスの

肺では、スーパーオキシドジスムターゼの酵素活性が低下していることが分かった。また、オクタペプチド領域のみを欠損するプリオン蛋白質を発現する正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスの肺でも低下していることが分かった。これらの結果は、オクタペプチド領域を介して、正常型プリオン蛋白質は銅イオンを肺内に留め、スーパーオキシドジスムターゼの酵素活性を調節している可能性を示した。

(5) 正常型プリオン蛋白質は活性酸素種を抑制し、インフルエンザウイルスから防御的に機能する

次に、我々は、正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスと野生型マウスの感染肺内における活性酸素種の量を測定した。その結果、ノックアウトマウスの感染肺では、活性酸素種の量が上昇していることが分かった。また、オクタペプチド領域のみを欠損するプリオン蛋白質を発現する正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスの感染肺でも上昇していることが分かった。さらに我々は、正常型プリオン蛋白質ノックアウトマウスにインフルエンザウイルスを感染させるとともに、活性酸素種スカベンジャー物質BHAを投与した。その結果、ノックアウトマウスの死亡率は著明に改善した(図4)。これらの結果は、正常型プリオン蛋白質はオクタペプチド領域を介して活性酸素種を抑制する機能を有し、インフルエンザウイルスから防御的に機能することが示唆された。

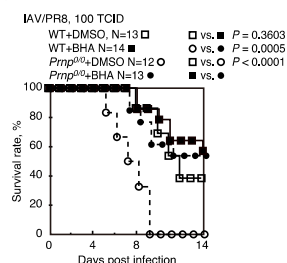


図4: 正常型プリオン蛋白質欠損(*Prnp*<sup>0/0</sup>)マウスと野生型(WT)マウスのBHA投与後の生存率曲線

A型インフルエンザウイルス(PR8株)を100TCID感染価でそれぞれのマウスに径鼻感染させ、BHAを投与し2週間観察した。

#### < 引用文献 >

- Prusiner SB (1998) Prions. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13363-13383.
- Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bahr M, et al. (2004) Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. Neurosci Lett 372: 146-150.
- McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, et al. (2004) Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. Am J Pathol 165: 227-235.

Sakurai-Yamashita Y, Sakaguchi S, Yoshikawa D, Okimura N, Masuda Y, et al. (2005) Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* 136: 281-287.

Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746.

Zhang B, Cowden D, Zhang F, Yuan J, Siedlak S, et al. (2015) Prion Protein Protects against Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *PLoS ONE* 10: e0136923.

Zanetti F, Carpi A, Menabo R, Giorgio M, Schulz R, et al. (2014) The cellular prion protein counteracts cardiac oxidative stress. *Cardiovascular research* 104: 93-102.

Fiore AE, Shay DK, Broder K, Iskander JK, Uyeki TM, et al. (2008) Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control* 57: 1-60.

Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, et al. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582.

Yoshikawa D, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Okimura N, et al. (2008) Dominant-negative effects of the N-terminal half of prion protein on neurotoxicity of prion protein-like protein/doppel in mice. *J Biol Chem* 283: 24202-24211.

## 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 4 件)

Das NR, Miyata H, Hara H, Uchiyama K, Chida J, Yano M, Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi S. Effects of prion protein devoid of the N-terminal residues 25-50 on prion pathogenesis in mice. *Archives of Virology* (in press). 査読有り(2017)  
doi: 10.1007/s00705-017-3295-3.

Hamanaka T, Nishizawa K, Sakasegawa Y, Oguma A, Teruya K, Kurahashi H, Hara H, Sakaguchi S, Doh-ura K. Melanin or melanin-like substance interacts with the N-terminal portion of prion protein and inhibits abnormal prion protein formation

in prion-infected cells. *Journal of Virology*, 2017, 91(6). pii: e01862-16. 査読有り  
doi: 10.1128/JVI.01862-16.

Nagasawa Y, Takahashi Y, Itani W, Watanabe H, Hidaka Y, Morita S, Suzuki K, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Imamura M, Yokoyama T, Horiuchi M, Sakaguchi S, Mohri S, Rose MT, Nochi T, Aso H. Prion Protein Binds to Aldolase A Produced by Bovine Intestinal M Cells. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 5, 43-60. 査読有り  
doi: 10.4236/ojvm.2015.53007.

Uchiyama K, Miyata H, Yano M, Yamaguchi Y, Imamura M, Muramatsu N, Das NR, Chida J, Hara H, Sakaguchi S. Mouse-Hamster Chimeric Prion Protein (PrP) Devoid of N-terminal Residues 23-88 Restores Susceptibility to 22L Prions, But Not to RML Prions in PrP-Knockout Mice. *PLoS ONE* 9(10):e109737, 2014. 査読有り  
doi: 10.1371/journal.pone.0109737.

### [学会発表](計 15 件)

原英之、千田淳司、坂口末廣 . 蛋白質凝集体「プリオン」による抗インフルエンザウイルス活性機構の解明 . 第39回日本分子生物学会 . 2016/11/30-12/2、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市) .

原英之、千田淳司、坂口末廣 . 蛋白質凝集体「プリオン」による抗インフルエンザ活性の発見 . 第38回に本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会、2015/12/1-4、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) .

坂口末廣 . 次世代抗インフルエンザ薬の宿主ターゲット分子の発見とその治療効果 . 四国地区五大学新技術説明会、2015/11/27、JST東京本部別館 1Fホール (東京都千代田区)

### [その他]

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/divisions/nerve.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

坂口 末廣 (SAKAGUCHI, Suehiro)  
徳島大学・先端酵素学研究所・教授  
研究者番号：60274635

### (2)研究分担者

矢野 雅司 (YANO, Masashi)  
徳島大学・先端酵素学研究所・技術専門職員  
研究者番号：10531858