

令和元年6月11日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10029

研究課題名(和文) 肺のプリオン蛋白質を分子標的としたインフルエンザ重症化予防の確立

研究課題名(英文) Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A virus

研究代表者

千田 淳司 (CHIDA, Junji)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・助教

研究者番号：20437651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： PrP遺伝子欠損(KO)マウスにインフルエンザAウイルス(IAV)を感染させると、KOマウスはIAVに高感受性を示し、高い致死率を呈する。次に、機能領域を解明するためにOR領域を欠損したPrPを発現するTg(OR)/KOマウスにIAVを感染させた結果、このマウスはKOマウスと同等の致死率であることから、OR領域がPrPの抗IAV活性に重要な領域であると推定された。OR領域は銅イオンと結合し、SOD1の酵素活性を調節するとの報告がある。そこで、肺の銅イオンを定量した結果、野生型マウスと比べてKOマウスやTg(OR)/KOマウスでは肺の銅イオン含有量及びSOD1酵素活性が低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでPrPは脳の神経細胞で特に高発現していること、PrPの構造変異体(異常型PrP)は凝集体を形成し、プリオン病を引き起こすことが知られている。しかし、PrPのKOマウスは正常に成長することから、PrPの生体機能は不明であった。従って、本研究はこれまで不明であったPrPの生体機能を解明する独創的研究であり、インフルエンザの病態の理解のみならずプリオン病の理解にも繋がる。本研究ではPrPが肺を構成する肺胞上皮やクララ細胞内の銅イオン濃度を保持することでSOD1の酵素活性を調節し、その結果、IAV感染により産生されるROSを不活化し、インフルエンザの重症化を軽減していることを明確にした。

研究成果の概要(英文)： Compared with wild-type (WT) mice, PrP-KO mice (KO) were highly susceptible to influenza A viruses (IAVs), with higher mortality. Infected KO lungs were severely injured, with higher inflammation of epithelial cells, and contained higher reactive oxygen species (ROS) than WT lungs. Treatment with a ROS scavenger or an inhibitor of xanthine oxidase, a major ROS-generating enzyme in IAV-infected lungs, rescued KO mice from the lethal infection with IAV. Moreover, KO mice transgenic for PrP with a deletion of the Cu-binding OR region, Tg(OR)/KO mice, were also highly susceptible to IAV infection. These results indicate that PrP has a protective role against lethal infection with IAVs through the Cu-binding OR region by reducing ROS in infected lungs. Cu content and the activity of SOD1, were lower in KO and Tg(OR)/KO lungs than in WT lungs. It is thus conceivable that PrP functions to maintain Cu content and regulate SOD1 through the OR region in lungs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ プリオン蛋白質 抗プリオン抗体 脳症 多臓器不全

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

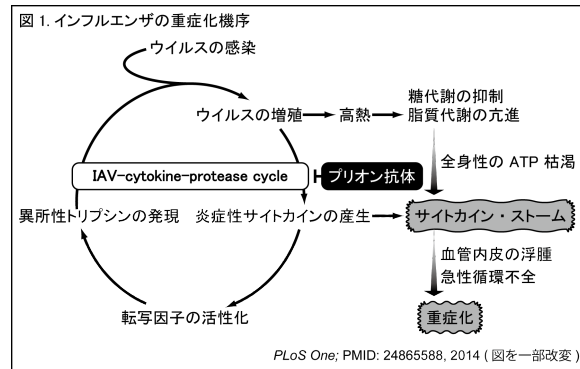
## 1. 研究開始当初の背景

「インフルエンザは風邪の一種であり、恐れる病気にあらず」と捉える人が多いが、これは大きな誤解である。インフルエンザは時に重症化し患者を死に至らしめる。特に、基礎疾患をもつ高齢者では呼吸器合併症による死亡率が高く、小児ではインフルエンザ脳症等の重篤な病態を併発する。

インフルエンザの重症化には、ウイルス感染初期で起こる「サイトカイン・ストーム」が関与する。これが起こる機序として「インフルエンザウイルス(IAV)-サイトカイン-プロテアーゼサイクル」説を申請者らは提唱してきた(図1;文献1)。IAV が感染能を獲得するためにはウイルス膜表面の HA(Haemagglutinin)が宿主由来のプロテアーゼにより切断される必要がある。IAV が肺に感染すると、炎症性サイトカインが産生されるが、これら炎症性サイトカインは転写因子の活性化を介し、HA を切断する異所性プロテアーゼ(Trypsin, MMP-9)の発現を上昇させる(図1;文献1-3)。その結果、ウイルスの HA が効率よく切断され、ウイルスの増殖は加速する。この「負のウイルスの増殖サイクル」により、サイトカイン・ストームが誘発され、これが肺の血管内皮の浮腫を伴う循環不全に繋がり重症化を引き起こす(文献4-7)。

さらに申請者らは、特定の患児がインフルエンザで重症化しやすい主要因として、ウイルス感染後期で起こる「全身性のエネルギー(ATP: Adenosine triphosphate)産生障害」を見出した。重症化あるいは死亡した患児の半数以上は、

CPT2(Carnitine palmitoyltransferase 2)遺伝子の熱不安定多型の保因者であった。CPT2 はミトコンドリア内膜に局在し、脂肪酸のβ酸化において重要な働きを担う酵素である。すなわち、重症化患児ではインフルエンザの高熱時にCPT2が不活化し、ミトコンドリアで脂肪酸を代謝できず、細胞内のATP産生が低下し、重症化していた(文献8-10)。実際に申請者らは、組織や細胞内のATPの定量法を開発し(文献11,12)、インフルエンザ等の重篤な感染症で集中治療室(ICU)に入室した患者の末梢血中のATPを定量した結果、ICU入室患者では健康者と比較してATPが低値であった(文献13,14)。糖代謝改善薬の投与によるATP枯渇を防止する治療をマウスで試みたが、病態の改善効果は低かった(文献15)。現在、抗ウイルス薬に対する耐性株の出現が問題になっている状況下で、ウイルスの増殖を抑制し、サイトカイン・ストームを抑制する宿主因子を標的とした根本療法の開発が世界中で行われているが、これまでに成功例はない。



## 2. 研究の目的

プリオン蛋白質(PrP)は神経細胞で多く発現することが報告されているが、PrP 遺伝子欠損(*Prnp<sup>0/0</sup>*)マウスは表現型が認められず正常に生育することから、その生体機能は不明である。また、免疫系において PrP は胸腺の未成熟 T 細胞や骨髄の造血系前駆細胞で発現しており、PrP はリンパ球の活性化や分化に関与すると推定されているが、その詳細についても不明である。

最近、申請者らは *Prnp<sup>0/0</sup>* マウスに IAV を感染させると、野生型(WT)マウスと比べて死亡率が著明に高いことを見出した。以上の背景から、PrP はインフルエンザの重症化を軽減する新規宿主因子であり、ウイルス罹患時に「神経の保護(インフルエンザ脳症発症の抑制)」や「免疫担当細胞の活性化」等に関与している可能性が高い。そこで本研究では、未だ明らかでない PrP の生体機能を解明し、これを基盤にした既存の抗ウイルス薬とは作用機序の異なる PrP を分子標的としたインフルエンザの重症化予防法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では季節型 IAV(Influenza A virus/Puerto Rico/8/34 株)を用い、ヒトのインフルエンザの重症化に近い評価系でマウスを用いて検証する。具体的には、ウイルス感染後の WT マウス、*Prnp<sup>0/0</sup>* マウス、PrP 遺伝子過剰発現(Tg)マウス間で肺組織のウイルス力価、炎症度、サイトカインの産生量、アポトーシス(細胞死)の評価、活性酸素(ROS)の産生量等を比較し、PrP の生体機能について明確にする。さらに、肺の PrP を分子標的としたインフルエンザの重症化の予防が可能か否かについて検証をする。

## 4. 研究成果

IAV 増殖を抑制する新規宿主因子として、PrP を申請者らは同定した。*Prnp*<sup>0/0</sup> マウスは WT マウスと比較すると IAV に高感受性であり、高い致死率を呈した(図 2A)。逆に、*Prnp*<sup>0/0</sup> マウスにマウス由来 PrP 遺伝子を遺伝子導入して作出した PrP 過剰発現(Tg)マウスでは、死亡率が大幅に低下した(図 2B)。以上の結果から、肺で発現する PrP は IAV 増殖を抑制する宿主因子であることが示唆された。

次に、PrP の機能領域を解明するために OR 領域を欠損した PrP を発現する Tg(PrP $\Delta$ OR)/*Prnp*<sup>0/0</sup> マウス(図 3A)に IAV を感染させた結果、このマウスは *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスと同等の致死率であることから、PrP の OR 領域が抗 IAV 活性に重要であることが明らかになった(図 3B)。

IAV の重症化の指標として、肺の浮腫(湿重量)や HE 染色による炎症性細胞の浸潤、各種サイトカインや ROS の産生量、ウイルスカ価、TUNNEL アッセイによる細胞死の評価等を試みた結果、WT マウスと比較して *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスや Tg(PrP $\Delta$ OR)/*Prnp*<sup>0/0</sup> マウスでは肺の炎症・浮腫や細胞死の亢進が確認された。

PrP の OR 領域は銅イオンと結合し、銅依存的抗酸化酵素(SOD1)の酵素活性を調節するとの報告がある。そこで、肺の SOD1 の酵素活性を測定した結果、WT マウスと比較して *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスや Tg(PrP $\Delta$ OR)/*Prnp*<sup>0/0</sup> マウスでは SOD1 の酵素活性が低下していることが確認された(図 4A)。さらに、肺の銅イオンの含有量を測定した結果、WT マウスと比べて、*Prnp*<sup>0/0</sup> マウスや Tg(PrP $\Delta$ OR)/*Prnp*<sup>0/0</sup> マウスでは肺の銅イオン含有量が低下していた(図 4B)。

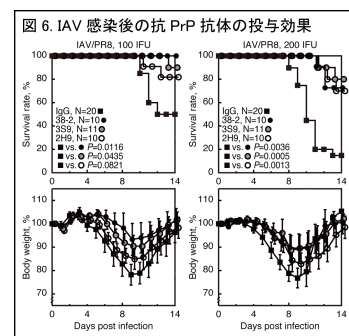
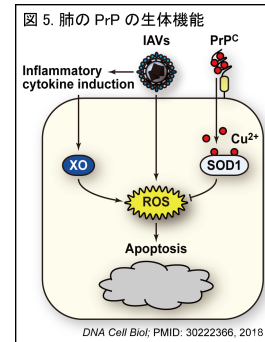
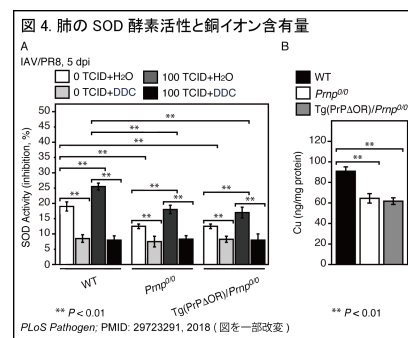
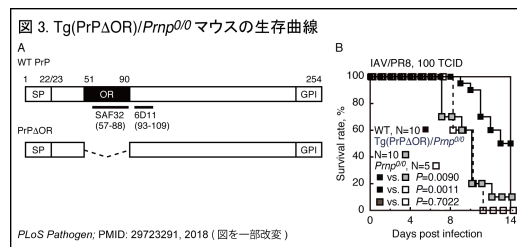
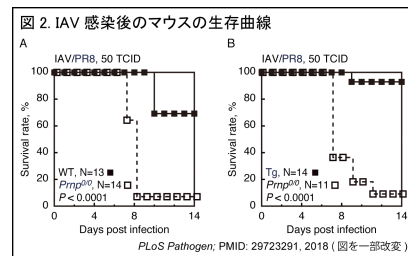
以上の結果は、PrP が肺内の銅イオンを保持することで SOD1 の酵素活性を調節し、その結果、IAV 感染により産生される ROS を不活化し、抗 IAV 活性を発揮していることを明確にした(図 5)。以上の結果から、肺で発現する PrP はインフルエンザの重症化を抑制する宿主因子であると言える。

さらに最近、抗 PrP 抗体を前(腹腔内)投与した場合、コントロール(IgG)抗体を前投与した場合と比較し、IAV 感染後のマウスの生存率が大幅

に改善されること、肺における炎症性サイトカインの産生量や炎症領域も軽減することを見出した(図 6)。さらに、抗 PrP 抗体を前投与した IAV 感染マウスの肺では Tyrosine protein kinase (Src)蛋白質の一過的なリン酸化が起こること、Src 蛋白質のリン酸化阻害剤(Dasatinib)と抗 PrP 抗体を併用投与するとその治療効果が消失することから、抗 PrP 抗体の作動機序に Src 蛋白質が中心的な役割を果たすものと推定された。この抗 PrP 抗体による治療効果は *Prnp*<sup>0/0</sup> マウスでは認められないことから、抗 PrP は肺あるいは免疫担当細胞で発現する PrP と結合することで治療効果を発揮するものと考えられた。これに関して、抗 Src 蛋白質のリン酸化特異抗体を用いて肺の免疫組織染色を行ったところ、IAV 感染で肺に動員される免疫系の浸潤性細胞で Src 蛋白質のリン酸化が起こっていることを見出した。この浸潤性細胞は抗 PrP 抗体を投与した IAV 非感染肺では認められないことから、自然免疫系を担当する細胞である可能性が高い。これがマクロファージ、樹状細胞、好中球であるのか、それ以外の細胞であるのかについて現在解析中である。

#### <引用文献>

1. Kido H, Chida J, Yao M, et al. *Nippon Rinsho*; 68 (8): 1565-1573. 2010.
2. Pan H, Chida J, Wang S, et al. *Cardiovasc Res*; 89 (3): 595-603. 2011.
3. Wang S, Le QT, Chida J, et al. *Journal Med Invest*; 57 (1-2): 26-34. 2010.
4. Wang S, Le QT, Kurihara N, et al. *J Infect Dis*; 202 (7): 991-1001. 2010.



5. Kido H, Okumura Y, Takahashi E, *et al.* **Biochim Biophys Acta**; 1824 (1): 186-194. 2012.
6. Kido H, Chida J, Yao M, *et al.* **Jikken Igaku**; 28 (18): 2927-2933. 2012.
7. Kido H. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**; 91 (8): 351-368. 2015.
8. Yao D, Mizuguchi H, Yamaguchi M, *et al.* **Hum Mutat**; 29 (5): 718-727. 2008.
9. Yao M, Yamaguchi M, Chida J, *et al.* **Mol Genet Metab**; 104 (3): 265-272. 2011.
10. Kubota M, Chida J, Hoshino H, *et al.* **Brain Dev**; 34 (1): 20-27. 2012.
11. Chida J, Yamane K, Takei T and Kido H. **Anal Chim Acta**; 727: 8-12. 2012.
12. Chida J, Kido H. **Methods Molecular Biol**; 1098: 21-32. 2014.
13. Kubota M, Chida J, Hoshino H, *et al.* **Brain Dev**; 34 (1): 20-27. 2012.
14. Chida J, Nishimura M, Imanaka H, *et al.* **PLoS One**; (PMID: 23577122). 2013.
15. Yamane K, Indalao IL, Chida J, *et al.* **PLoS One**; PMID: 24865588. 2014.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Oda J, Yukioka T, Azuma K, *et al.* (6 人中 5 番目) Endogenous genetic risk factor for serious heatstroke: the thermolabile phenotype of carnitine palmitoyltransferase II variant. 6:25-29. 査読有, **Acute Med Surg**; 2018. DOI: 10.1002/ams2.373
2. Chida J, Sakaguchi S. (2 人中 1 番目) Cellular prion protein-mediated protection against influenza A virus infection. 査読無, **Future Virol**; 2018. In press.
3. Sakaguchi S, Chida J. (2 人中 2 番目) Roles of prion in virus infection. 37:808-811. 査読無, **DNA Cell Biol**; 2018. DOI: 10.1089/dna.2018.4402
4. Chida J, Hara H, Yano M, *et al.* (11 人中 1 番目) Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses. 14:e1007049. 査読有, **PLoS Pathogens**; 2018. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007049
5. 千田 淳司, 木戸博, 坂口末廣. (3 人中 1 番目) 宿主因子を標的にした新たなインフルエンザ治療の試み. 33:52-55. 査読無, **BIO Clinica**; 2018. ISSN: 0919-8237
6. Hara H, Miyata H, Das NR, *et al.* (10 人中 4 番目) Prion protein devoid of the octapeptide repeat region delays bovine spongiform encephalopathy pathogenesis in mice. 92:e01368-17. 査読有, **J Virol**; 2017. DOI: 10.1128/JVI.01368-17
7. Das NR, Miyata H, Hara H, *et al.* (9 人中 5 番目) Effects of prion protein devoid of the N-terminal residues 25-50 on prion pathogenesis in mice. 162:1867-1876. 査読有, **Arch Virol**; 2017. DOI: 10.1007/s00705-017-3295-3

[学会発表] (計 5 件)

1. 原 英之, 千田 淳司, 坂口 末廣.  
Influenza virus infection triggers *de novo* generation of prions in neuronal cells.  
第 41 回日本分子生物学会大会, 横浜, 11・2018.
2. 千田 淳司, 原 英之, 坂口 末廣.  
Prion protein reduces influenza A virus-induced lung injury in mice.  
第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 京都, 10・2018.
3. 千田 淳司, 原 英之, 坂口 末廣.  
Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses.  
ConBio2017, 神戸, 12・2017.
4. 千田 淳司, 原 英之, 坂口 末廣.  
肺で発現する正常プリオン蛋白質の機能解析.  
第 32 回中国四国ウイルス研究会, 岡山, 06・2017.
5. 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年会, 横浜, 12・2016.

## 6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名: 原 英之

ローマ字氏名: (HARA, Hideuki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。