

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02721

研究課題名(和文) ヒトプリオン持続感染培養細胞樹立による増幅機構の解明と新たな予防・治療法の創出

研究課題名(英文) Elucidation of the amplification mechanism using cultured human prion persistent infection cells and development of novel prevention and treatment for prion diseases

研究代表者

新 竜一郎 (Atarashi, Ryuichiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90452846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,580,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1)ヒトプリオンの培養細胞への感染様式と持続感染機構の解明、2)昆虫細胞由来組換えプリオンタンパクを用いたプリオン自発生成系の開発を目的とした。1)では複数の培養細胞の増殖特性その他の解析を行った後、持続的にヒトプリオンに感染するかについて検証した。その結果、数回の継代まではプリオンシード活性が検出されたが、その後、徐々に消失することが判明した。2)では45℃の反応により複数の亜型プリオンが自発生成したが、反応を継続すると亜型の特徴は消失し、単一のものに収束した。本研究によりヒトプリオンの培養細胞における消失過程と複数のプリオン亜型の自発生成機構とその競合過程が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリオン病は致死性の神経変性疾患で病理像の異なる複数の変異株が存在する。現時点ではプリオン病に対する有効な予防・治療法は存在せず、その開発が切実に求められている。孤発性や遺伝性プリオン病では生体内で自発的に異常型プリオンタンパクが生じ、生体内で増幅するが、その分子機構の詳細は不明である。本研究により、ヒトプリオンの培養細胞への持続感染成立の条件と自発生成機構の解明につながる研究成果を得ることができ、現在それらの知見を活かした予防・治療法の開発を目指し、研究活動を継続している。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were (1) to elucidate the mode of infection of cultured cells with human prion and the mechanism of persistent infection, and (2) to develop a system for spontaneous prion generation using recombinant prion protein derived from insect cells. After analyzing the growth characteristics and other properties of cultured cells that were used in this study, we verified whether the cells could be infected with human prion persistently. In (2), multiple prion variants were spontaneously generated by the reaction at 45 degrees Celsius, but the variants lost their characteristics and converged to a single one after the reaction repeated. This study clarified the disappearance process of human prion in cultured cells and the mechanism of spontaneous generation of multiple prion variants and their competing processes.

研究分野：微生物学

キーワード：プリオン病 RT-QuIC法 PMCA法 孤発性クロイツフェルトヤコブ病 異常型PrP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は伝達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 (CJD)、羊のスクレイピー、牛の牛海綿状脳症、鹿類の慢性消耗病などが代表的な疾患である。病原体プリオンは、病原体特異的な核酸は存在せず、単一のタンパク質であるプリオンタンパク (Prion Protein; PrP) の異常凝集体 (Scrapie form of PrP; PrP^{Sc}) より構成されると考えられているが、いまだ多くの解明されていない謎が残されている。プリオン病の分類としては、プリオン感染組織等の暴露による獲得性プリオン病、孤発性プリオン病、PrP 遺伝子の変異による遺伝性プリオン病がある。遺伝性を含め、ヒトプリオン病に対する有効な予防・治療法は存在せず、その開発が切実に求められている。

プリオンには、宿主の遺伝的背景が同じでもウイルスのような病型の異なる亜型(プリオン株)が存在する。またそのプリオン株は宿主の種が異なると特性がしばしば変化することも知られている。現在、プリオン病の予防・治療薬のスクリーニングにはマウスプリオン株感染培養細胞が用いられており、そこで見出された一部の化合物がヒトプリオン病にも効果があることが期待されたが、これまでに臨床的に有効性が示されたものはない。さらにマウスプリオン株と CJD をはじめとするヒトプリオン株とは候補化合物に対する反応性が大きく異なることも報告されており、ヒトプリオン病の病態解明と予防・治療法の開発のためにはヒトプリオン感染培養細胞を用いた薬剤スクリーニングが必要であると考えられる。

孤発性や遺伝性プリオン病では、生体内で自発的に PrP^{Sc} が生成し、神経系で増幅して発病に至ると考えられるが、その自発生成と増幅に関する分子機構は不明な点が多い。以上が研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

これまで PrP^{Sc} の産生抑制や分解促進をターゲットとしたプリオン病治療薬のスクリーニングには、プリオン培養細胞に候補化合物を添加し、ウェスタンブロッティング法 (WB 法) により PrP^{Sc} 量の減少を調べる方法が用いられてきた。一方、我々は以前、WB による PrP^{Sc} の検出に比べて 1,000 倍以上高い感度で測定することが可能な試験管内 PrP^{Sc} 増幅法として、real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) 法を開発した (文献①)。本研究では、(1) RT-QuIC 法を用いて、これまで見逃されていた可能性のあるヒトプリオン感染培養細胞を検出できる可能性を探索し、ヒトプリオンの細胞への感染様式とその増幅機構の解明、(2) バキュロウイルス-昆虫細胞発現系からの組換えプリオンタンパク質 (Bac-rPrP) と昆虫細胞由来の補助因子を用いたプリオン自発生成機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒトプリオンの細胞への感染様式とその増幅機構

ヒト配列の正常型 PrP (PrP^C) を発現する培養細胞として 3 種類のグリオーマ細胞株と 1 種類のニューロblastoma 細胞株を入手した。最初にその増殖特性と PrP の多型(コドン 129 がメチオニンかバリンかでヒトプリオンに対する感受性が異なることが知られている)について調べた。その後、孤発性プリオン病患者由来の脳乳剤を暴露し、細胞への感染を試みた。感染成立について WB 法による PrP^{Sc} の検出と RT-QuIC 法によるプリオンシード活性を測定した。

RT-QuIC の基質は、ヒト配列 PrP の 23~231 残基に相当する大腸菌由来組換え PrP (Ec-rHuPrP) を発現し、可溶性形態にリフォールドし、FPLC を用いて精製した。反応混合物は、96 ウェルプレートで最終容量が 100 μ L になるように調製した。反応緩衝液成分の最終濃度は、500 mM NaCl、

25 mM PIPES pH 7.0、1 mM EDTA、10 μ M Thioflavin T および 100 μ g/mL Ec-rHuPrP であった（各ロットに最適な Ec-rHuPrP の濃度を決定した）。反応のシードまたはコントロールとして、希釈した脳乳剤または 1×PBS を添加した。96 ウェルプレートシーリングテープで覆い、プレートリーダー（FLUOstar Omega, BMG Labtech）で 37°C、間欠的に振盪しながらインキュベートした。励起波長 440 nm、測定波長 485 nm で 20 分ごとにプレート底部の蛍光強度を読み取り、アミロイド形成のキネティクスをモニターした。50%播種量（SD₅₀）は、Spearman-Kärber 法により算出した。

（2）Bac-rPrP と昆虫細胞由来の補助因子を用いたプリオン自発生成機構

バキュロウイルス-昆虫細胞発現系由来の組換え PrP（rPrP）（Bac-rPrP）を基質として、PrP^{Sc} の自発生成の分子機構を調べた。大腸菌由来の rPrP（Ec-rPrP）とは異なり、Bac-rPrP は、生体内に発現する PrP^C と同様、N-グリコシル化およびグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー修飾を有していることが第一の利点である。さらに、脳由来 PrP^C よりも調製が容易であることも別の利点として挙げられる。さらに、Bac-rPrP はプリオンシーディング反応において、株特異性を保ったまま増殖させることができる（文献②）。ここでは、昆虫細胞由来の補助因子存在下での間欠的超音波照射反応（insect cell protein misfolding amplification、iPMCA 法）において、Bac-rPrP^{Sc} が自発的に生成されるか、また、この自発的 Bac-rPrP^{Sc} が野生型マウスに伝染するかどうか等について検討した。

iPMCA 法は、超音波発生装置（ELESTEIN 070-GOT, エレコン）を用いて行った。増幅は、32 サイクルの超音波照射（3 秒間のパルス発振を 0.1 秒間隔で 5 回繰り返す）後、37°C または 45°C で穏やかに攪拌しながら 30 分間保温することにより実施した。反応混合物は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）精製 Bac-rPrP（マウス配列）に、プロテイナーゼ K（PK）および熱処理した昆虫細胞（HighFive 細胞）溶解物等を加えて調整した。超音波反応を促進するため、各チューブに直径 1 mm のジルコニアビーズを入れた。一次増幅後に得られた増幅産物を新しい iPMCA 反応混合物で 1:10 に希釈し、二次増幅を行った。この作業を必要なときに繰り返した。また、一部の試験で、iPMCA における Bac-rPrP^{Sc} の生成に必要な補酵素を調べるため、ホスファチジルエタノールアミン（PE）またはポリ A（PA）単独の存在下および補酵素の非存在下で iPMCA を実施した。

iPMCA 反応生成物を 50 μ g/mL proteinase K（PK）で 37°C、1 時間消化した。等量の 2×SDS サンプルバッファーをサンプルに加え、5 分間煮沸した。サンプルを従来の 12% Tris-glycine ゲルまたは NuPAGE 12% Bis-Tris ゲルで SDS-PAGE により分離し、PVDF メンブレンに転写した。PrP の検出には、HRP 結合抗 PrP モノクローナル抗体 T2（T2-HRP）を使用し、化学発光システムにより画像化した。

4. 研究成果

（1）ヒトグリオーマ細胞とニューロblastoma の特性解析

3 種類のヒトグリオーマ細胞と 1 種類のニューロblastoma 細胞を JCRB 細胞バンクより入手して、PrP 遺伝子解析他を行った。その結果、いずれもコドン 129 はいずれもメチオニン（129M/M）であったが、1 種類のグリオーマ細胞（Cell-C）はコドン 219 が 219E/K であった（それ以外は 219E/E）。次に PrP^C の発現レベルについて WB 法で測定したところ、3 種類のグリオーマ細胞はいずれも高いことが判明した。ニューロblastoma（Cell-D）の発現レベルはグリオーマ細胞より低く、HEK293T 細胞と同レベルであった。細胞の増殖性も加味し、以降の実験には主にグリオーマ細胞である Cell-B を用いることにした。

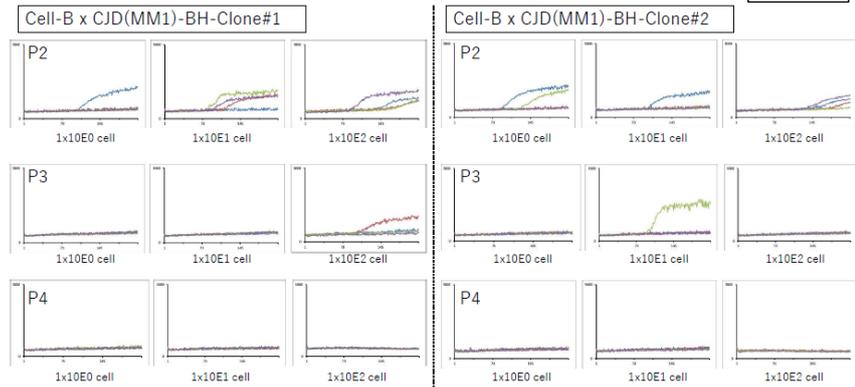
(2) ヒト配列 PrP^C 発現培養細胞へのヒトプリオン感染実験

孤発性 CJD 患者(129 M/M、タイプ 1)由来脳乳剤を上記培養細胞 (Cell-B) へ曝露し、ヒトプリオンが感染するかどうか検証した。WB 法では、PrP^{Sc} の検出は感染後 17 日、61 日いずれも検出レベル以下であった。

曝露後、クローン化した細胞をさらに 2 継代後 (P2)、3 継代後 (P3)、4 継代後 (P4) に細胞を採取し、RT-QuIC 法によるプリオンシード活性を測定した。その結果、P2 までは比較的高レベルのシード活性が測定されたものの、P4 では検出レベル以下となることが判明した (図 1)。すなわち、一端は感染するものの、継代により細胞の増殖とそれに伴う PrP^{Sc} の分解の促進等により、プリオンの減少速度が、細胞内での増加速度を上回るため、シード

図 1

活性が次第に検出されなくなると考察された。現在、P1 時点で増殖を止めるような薬剤 (マイトマイシン C など) 処理により、長期間シード活性が保持できるかどうか、また抗プリオン作用



のある化合物添加によって PrP^{Sc} やプリオンシード活性の減少を観察できるかどうかについて検討を行っている。

(3) 反応温度を 45°C に上げることによる Bac-rPrP^{Sc} の自発的な生成

まず、脳由来の PrP^{Sc} (シード) を添加せずに、断続的に超音波処理を行うことにより、Bac-rPrP が昆虫細胞由来の補酵素の存在下でプロテイナーゼ K (PK) 耐性を有する異常型 (Bac-rPrP^{Sc}) に変換されるか否かを検討した。予想に反して、37 °C で 8~30 回反応を繰り返しても Bac-rPrP^{Sc}

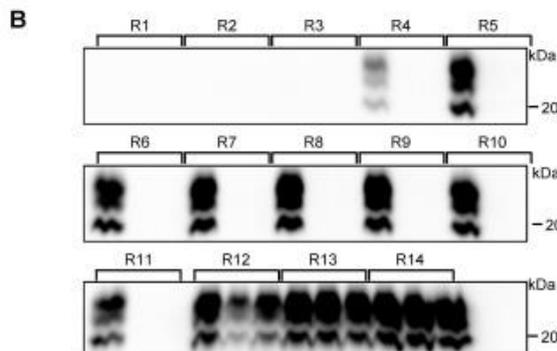
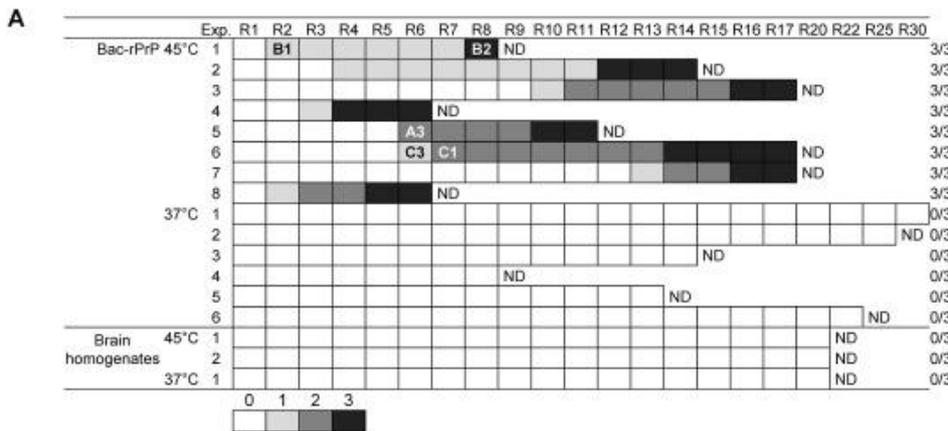


図 2

の形成は認められなかった (図 2 A)。そこで、反応温度を 45 °C に上げることで、Bac-rPrP^{Sc} の形成確率が上がるかどうかを調べた。その結果、45 °C で 2~15 回反応させたところ、すべてのケースで Bac-rPrP^{Sc} が生成した (図 2 A, B)。これに対し、マウス脳ホモジネートを用いて 37°C または 45°C でシードなし従来の PMCA を 20 ラウンドまで行ったが、PrP^{Sc} は自然発生しなかった (図 2 A)。

(4) 5 種類の自発生成 Bac-rPrP^{Sc} 変異体の野生型マウスへの伝播性と生化学的特性

次に、作製した Bac-rPrP^{Sc} が野生型 (C57BL/6J) マウスに伝達されるかどうかを調べた。マウスへの接種に用いた別々に調整した 5 つの Bac-rPrP^{Sc} は、B1、B2、A1、C1、C3 と命名した。B2、A1、C3 を接種したマウスには神経症状や脳内 PrP^{Sc} の蓄積は見られなかったが、B1 を反応 3 ラウンド目 (B1/R3)、C1/R3、C1/R10、C1/R20 後に接種したマウスには症状の発生、PrP^{Sc} の蓄積、あるいはその両方を示すものがあった。しかし、40 回反応させた変異体を接種した後では、C1 を接種したマウスでも、症状を発症したり、PrP^{Sc} の蓄積を示したりするものはなかった。注目すべきは、同じ超音波照射設定と補酵素を含む同じ実験条件下で、PK に対する耐性と増幅時の補酵素依存性が異なる様々な Bac-rPrP^{Sc} 変異体が生成されたことである。しかし、それらの特性も 40 回反応後には消失し、単一なタイプに収束した。これらの結果は、マウスへの伝達性や構造的性質の異なる様々な Bac-rPrP^{Sc} 変異体が生成され、それらが互いに競合し、次第に増幅速度がやや速い変異体に収束していくことを示唆している。

(5) Bac-rPrP^{Sc} の初回接種後に c 陽性となったマウスの 2 回目、3 回目の継代接種実験

Bac-rPrP^{Sc} を接種した PrP^{Sc} 陽性マウスのタンパク質にプリオン適応反応が起こるかどうかを調べるために、2 回目および 3 回目の継代接種実験を行った。マウスに B1/R3 を接種した場合 (接種後 454 日)、生存期間は 2 継代の平均 189 日から 3 継代では 157 日に短縮された。しかし、マウスに C1/R3 (接種後 515 日) を接種した場合、生存期間は 2 回目、3 回目とも約 150 日であった。この生存期間は、対照として用いた ME7 を接種したマウスと同様であった。これらの結果は、B1/R3 については、第 2 継代から第 3 継代にかけてさらなるプリオン適応が起こったが、C1/R3 については、第 2 継代で既に適応が完了したことを示唆している。

<引用文献>

- ① Imamura M *et al.* J Virol. 2011;85(6):2582-8.
- ② Atarashi R *et al.* Nat Med. 2011;17(2):175-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imamura Morikazu, Tabeta Naoko, Iwamaru Yoshifumi, Takatsuki Hanae, Mori Tsuyoshi, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 613
2. 論文標題 Spontaneous generation of distinct prion variants with recombinant prion protein from a baculovirus-insect cell expression system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 67～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takatsuki Hanae, Imamura Morikazu, Mori Tsuyoshi, Atarashi Ryuichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Pentosan polysulfate induces low-level?persistent prion infection keeping measurable?seeding activity without PrP-res detection in Fukuoka-1 infected cell cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12049-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森剛志, 今村守一, 高月英恵, 井口洋美, 大野美奈子, 新竜一郎
2. 発表標題 さまざまなリコンビナントプリオン蛋白を基質としたRT-QUIC法の反応性の比較解析
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Imamura M, Miyazawa K, Matsuura Y, Iwamaru Y, Kitamoto T, Mohri S, Takatsuki H, Mori T, Atarashi R
2. 発表標題 Isolation of hidden minor prion conformers from classical scrapie isolates in advanced protein misfolding cyclic amplification in the presence of arginine ethyl ester.
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takatsuki H, Mori T, Imamura M, Atarashi R
2. 発表標題 Pentosan polysulfate induces latent prion infection in Fukuoka-1 strain-infected cells.
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森剛志, 今村守一, 高月英恵, 井口洋美, 大野美奈子, 新竜一郎
2. 発表標題 ヒトグリオーマ細胞におけるプリオン感染動態の解析.
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高月英恵, 森剛志, 今村守一, 新竜一郎
2. 発表標題 ペントサンポリサルフェートによるプリオン(Fukuoka-1株) 持続感染細胞における薬剤誘導性潜伏感染.
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新竜一郎
2. 発表標題 異常型プリオンタンパク無細胞増幅法(RT-QUIC法とPMCA法)を駆使したプリオン病病態機構の解明.
3. 学会等名 日本神経感染症学会総会・学術大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村守一, 宮澤光太郎, 森剛志, 高月英恵, 新竜一郎
2. 発表標題 スクレイビー感染ヒツジ脳には複数のプリオン株が混在している.
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩丸 祥史 (Iwamaru Yoshifumi) (20355142)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・ユニット長 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------