

令和元年5月28日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07042

研究課題名(和文)プリオン病分子病態の解明：新規治療法の開発に向けたインターフェロンシステムの解析

研究課題名(英文)The elucidation of molecular pathological condition in prion disease: analysis of interferon system to develop novel therapeutic method

研究代表者

石橋 大輔 (ISHIBASHI, Daisuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：10432973

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)：本研究では、宿主の自然免疫機構のI型インターフェロンとプリオン感染との関わりについて検討した。結果として、I型インターフェロン受容体を介したシグナル機構がプリオン感染を制御している可能性を明らかにした。本研究により、このI型インターフェロン受容体をターゲットにしたプリオン病の予防・治療法の開発が進むと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで注目されてこなかった自然免疫機構を視点としたプリオン感染病態メカニズムの解明について研究を遂行することにより、治療法がないプリオン病の創薬開発が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated a relationship of between type I interferon in innate immune responses and prion infection to host. As a result, we defined that innate immune system mediating type I interferon receptor might negatively regulate prion invasion to host. In the future, we believe that our project will be promoted development of prevention and drug for prion disease.

研究分野：ウイルス学、免疫学、分子生物学

キーワード：プリオン 自然免疫 インターフェロン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

生体内への病原体・異物の侵入により、病原体由来の核酸や構成蛋白(PAMPs)を認識するパターン認識レセプター(PRRs)を介した宿主の免疫機構が働く。その一端を担う自然免疫機構(TLRs, IRFs など)は、下流の I 型インターフェロンを惹起するなど、病原体に対する防御機構として重要な働きを持つとされている。プリオン感染と自然免疫機構との関与については、まだまだ不明な点が多い。近年、申請者らは、プリオン持続感染細胞における異常型プリオンタンパクに対する影響や遺伝子改変マウスを用いたプリオン感染実験により、MyD88 非依存的機構の代表的な因子である IRF3 がプリオン感染を抑制する働きを持つことを報告した(Ishibashi, et al. *J Virol* 2012)。このことは、プリオンはウイルスなどの病原体同様、宿主に感染する際、インターフェロン機構を回避して感染成立している可能性をもつ。プリオン病と I 型インターフェロンシステムとの関係性については、1970 年代より今日まで皆無とされてきた。しかし近年、他の研究施設からも我々の研究結果を支持する報告が出されていることより、現在は、プリオン病研究にとって重要な研究領域になり得る状況である。

2. 研究の目的

本研究では、病原体プリオンの感染時における宿主免疫機構の役割を明らかにするために、IRF3 の下流に位置する I 型インターフェロンに着目し、プリオン感染成立における役割について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス胎児由来線維芽細胞の樹立

妊娠マウスより E17-18 日目の胎仔を無菌的に採取する。マウス胎仔の頭、四肢、内臓を取り除き、トリプシン処理を行い、細胞を分離し、遠心等にて不純物を取り除いた後に、培養シャーレに播種する。数日かけて培養し、線維芽細胞を単離する。細胞の不活化には、SV40 Large-T の遺伝子を組み込んだ MSCV (Murine Stem Cell Virus) のレトロウイルスベクターを用いて、ピューロマイシン薬剤選択により、不活化細胞を樹立した。

(2) プリオン感染後の細胞における各種インターフェロン刺激遺伝子の発現解析

3T3 細胞および野生型マウス胎児由来の線維芽細胞にプリオン感染を行い、リアルタイム PCR 法を用いて、経時的にインターフェロン刺激遺伝子の発現検討を行った。

(3) I 型インターフェロン受容体遺伝子欠損マウスを用いたプリオン感染における病態変化の解析

4 週齢の I 型インターフェロン受容体遺伝子欠損マウスの雄にプリオン感染を行い、生存期間および脳病理変化について検討した。プリオン感染は脳内投与および腹腔内投与の 2 種類について検討した。

(4) I 型インターフェロン受容体遺伝子欠損マウス胎児由来線維芽細胞株に I 型インターフェロン受容体遺伝子を組み込んだ I 型インターフェロン受容体恒常発現細胞の樹立

I 型インターフェロン受容体遺伝子発現におけるプリオン感染に対する影響を *in vitro* で検討するため、I 型インターフェロン受容体遺伝子欠損マウスの胎仔より、線維芽細胞の樹立を行った。さらに I 型インターフェロン受容体遺伝子を細胞に導入するために I 型インターフェロン受容体の遺伝子を組み込んだ MSCV のウイルスベクターを作成し、ピューロマイシン薬剤選択により、不活化細胞を樹立した。遺伝子を導入する前と後における細胞内の正常プリオンタンパクの発現や I 型インターフェロン受容体の発現についてはフローサイトメトリーを用いて確認した。

4. 研究成果

(1) プリオンの宿主内侵入機構の解明として、プリオンの細胞内感染経路を明らかにするため IRF3 の上流に位置する PRRs) のシグナル経路の違いに着目して、TLR3 の下流に位置する TICAM1 および RIGI, MDA5 の下流に位置する MAVS それぞれの遺伝子欠損マウスから樹立したマウス胎児線維芽細胞を用いてプリオン感染実験を行い、異常プリオンタンパクの発現について検討することを目的とした。Ex vivo プリオン感染実験のために、TICAM1 および MAVS それぞれの遺伝子改変マウス由来の線維芽細胞に SV40 Large-T の遺伝子を組み込んだ MSCV のウイルスベクターを感染させ、ピューロマイシンで薬剤選択し、不活化細胞を樹立すると共に、Large-T によるプリオン感染の影響を考慮するためにウイルスベクターを使用せずに不活化するまで継代し続けた細胞も樹立した。Ex vivo プリオン感染実験において、プリオン病発症マウスの脳乳剤の量や感染成立までの時間、継代回数などの詳細な検討はない。そこで不活化した野生型の線維芽細胞をプリオン感染実験のコントロールとして用いるために、独自に不活化した線維芽細胞を樹立し、数クローンの細胞株の樹立に成功した（詳細は継続して解析中）。

(2) マウス線維芽細胞株 (3T3) にプリオン感染させ、インターフェロン刺激遺伝子の

遺伝子発現について検討した。24 時間以内に複数のインターフェロン刺激遺伝子を含む PRR 下流の遺伝子の発現が上昇していた。

- (3) I 型インターフェロンとプリオン感染との関与を検討するため、継続的に I 型インターフェロン受容体遺伝子欠損マウスにプリオン感染実験を行った。プリオン感染は 22L プリオン株脳乳剤を腹腔内投与または脳内投与にて行った。いずれのプリオン感染の条件においても生存期間を確認したところ遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して統計学的に有意な短縮を認めた。プリオン感染後 100 日目におけるそれぞれのマウスの脳病理変化についても検討し、HE 染色による空胞変性、特異抗体を用いたミクログリオシスおよびアストログリオシスさらに異常型プリオンタンパク沈着の程度について検討した。いずれの病理変化においても遺伝子欠損マウスは早期にプリオン病の病理変化が認められた。
- (4) 培養細胞を用いたプリオン感染病態モデルにて、I 型インターフェロンとプリオン感染との関与について検討した。I 型インターフェロン受容体遺伝子欠損マウスの胎仔より、線維芽細胞を単離し、細胞不死化のために SV40 Large-T の遺伝子を組み込んだ MSCV レトロウイルスベクター感染を行い、ピューロマイシンを用いて薬剤選択による不死化細胞の樹立を行った。さらに不死化した細胞に I 型インターフェロン受容体遺伝子を再導入し、I 型インターフェロン受容体恒常発現細胞を樹立した。樹立後の細胞を用いて、ウエスタンブロット法にて正常プリオンタンパク、I 型インターフェロン受容体の発現を確認し、I 型インターフェロン受容体遺伝子導入による正常プリオンタンパクの発現に影響は無かった。また、フローサイトメトリーを用いた正常プリオンタンパクおよび I 型インターフェロン受容体の発現の検討を行い、細胞表面におけるそれぞれのタンパク発現を確認した。それぞれの細胞にプリオン感染を行い感染効率について検討した。I 型インターフェロン受容体を発現した細胞では、遺伝子欠損細胞に比べ、プリオン感染に対し、抵抗性を示した。

以上、これらの結果はプリオン感染と I 型インターフェロンのシグナル経路が密接に関係していることを示唆するデータであることから、今後、下流のインターフェロン刺激遺伝子のプリオン感染への影響と関連づけて検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Ken Watanabe, Takeshi Ishikawa, Hiroki Otaki, Satoshi Mizuta, Tsuyoshi Hamada, Takehiro Nakagaki, [Daisuke Ishibashi](#), Shuzo Urata, Jiro Yasuda, Yoshimasa Tanaka, Noriyuki Nishida. Structure-based drug discovery for combating influenza virus by targeting the PA-PB1 interaction. *Scientific reports*. 7(9500). 2017. doi: 10.1038/s41598-017-10021-w. 査読有
2. Kazunori Sano, Ryuichiro Atarashi, Katsuya Satoh, [Daisuke Ishibashi](#), Takehiro Nakagaki, Yasushi Iwasaki, Mari Yoshida, Shigeo Murayama, Kenichi Mishima, Noriyuki Nishida. Prion-Like Seeding of Misfolded α -Synuclein in the Brains of Dementia with Lewy Body Patients in RT-QUIC. *Molecular Neurobiology*. 1-15. 2017. doi: 10.1007/s12035-017-0624-1. Epub 2017 May 26. 査読有
3. [Daisuke Ishibashi](#), Takehiro Nakagaki, Takeshi Ishikawa, Ryuichiro Atarashi, Ken Watanabe, Felipe Cruz, Tsuyoshi Hamada, Noriyuki Nishida. Structure-based drug discovery for prion disease using a novel binding simulation. *EBioMedicine*. 9. 238-249. 2016. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.010. Epub 2016 Jun 8. 査読有
4. Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi, Kana Furukawa, Hanae Takatsuki, Katsuya Satoh, Kazunori Sano, Takehiro Nakagaki, [Daisuke Ishibashi](#), Kazuko Ichimiya, Masahisa Hamada, Takehisa Nakayama, Noriyuki Nishida. A direct assessment of human prion adhered to steel wire using real-time quaking-induced conversion. *Scientific reports*. 6. 24993. 2016. doi: 10.1038/srep24993. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. Gen Matsumoto, Naruhiko Sahara, [Daisuke Ishibashi](#), Noriyuki Nishida, Nozomu Mori. Prion-like propagation of filamentous tau inclusions in cultured neuronal cells. *Asian pacific prion symposium 2018 (APPS2018)*. 東京お台場. 2018. 10. 4-5
2. [石橋大輔](#), 中垣岳大, 西田教行. I 型インターフェロンのプリオン感染に対する抑制作用 Type I interferon suppresses prion infection. 第 91 回日本生化学会大会. 京都国際会議場. 2018. 9. 24-26

3. 中垣岳大, 的場苑子, 石橋大輔, 西田教行. 炭酸水素カルシウムメゾ構造体によるプリオン不活性化能の検討. 第71回日本細菌学会九州支部総会・第55回日本ウイルス学会九州支部総会. 産業医科大学. 2018.9.7-8
4. 渡邊健, Juliann Nzembi Makau, 石川岳志, 大滝大樹, 水田賢志, 中垣岳大, 石橋大輔, 浦田秀造, 安田二郎, 西田教行. インフルエンザウイルス複製を標的とした蛋白質-蛋白質相互作用阻害剤の開発. 第71回日本細菌学会九州支部総会・第55回日本ウイルス学会九州支部総会. 産業医科大学. 2018.9.7-8
5. 石橋大輔, 中垣岳大, 石川岳志, 水田賢志, 濱田剛, 西田教行. in silico プリオン病創薬における薬効特異性の評価. 生体機能と創薬シンポジウム2018. 福岡大学. 2018.8.23-24
6. 石橋大輔. プリオン病におけるインシリコ創薬開発. 第8回認知症研究を知る若手研究者の集まり2018. 滋賀. 2018.7.31-8.1
7. Daisuke Ishibashi, Takujiro Homma, Takehiro Nakagaki, Kazunori Sano, Kenya Honda, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. プリオン感染における自然免疫機構の役割 Protective role of host innate immunity system in prion pathogenesis. 日本薬学会第138年会. 金沢 (Ishikawa). 2018年3月25-28日
8. Daisuke Ishibashi, Takehiro Nakagaki, Takeshi Ishikawa, Tsuyoshi Hamada, Noriyuki Nishida. Evaluation of drug specificity for anti-prion compounds selective by structure-based binding simulation in silico プリオン病創薬における薬効特異性の評価. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 第40回日本分子生物学会年会, 第90回日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド (Hyogo) 2017年12月6-9日
9. 石橋大輔, 石川岳志, 中垣岳大, 丹下寛也, 西田教行, プリオン病におけるインシリコ創薬開発, 第70回日本細菌学会九州支部総会, 第54回日本ウイルス学会九州支部総会. 那覇市ぶんかテンプス館 (Okinawa) 2017年9月8-9日
10. Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi, Katsuya Satoh, Daisuke Ishibashi, Takehiro Nakagaki, Noriyuki Nishida. Wire-QuIC reaction can detect abnormal human prion seeds from contaminated stainless steel-wire. Wire-QuIC はステンレススチールワイヤー上に付着したプリオンを検出できる. 第64回日本ウイルス学会. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市) 2016年10月23日~2016年10月25日
11. Daisuke Ishibashi, Takehiro Nakagaki, Takeshi Ishikawa, Ryuichiro Atarashi, Tsuyoshi Hamada, Noriyuki Nishida. Structure-based drug discovery for prion disease by using a novel binding simulation on the graphics processing unit intensive supercomputer. 第89回日本生化学会大会. 仙台国際センター (宮城県・仙台市) 2016年09月25日~2016年09月27日
12. Tsuyoshi Mori, Ryuichiro Atarashi, Hanae Takatsuki, Katsuya Satoh, Takehiro Nakagaki, Daisuke Ishibashi, Noriyuki Nishida. Wire-QuIC: A new detection system of human prion. Prion2016 & APPS2016 (国際学会) 日本教育会館・一橋ホール (東京都・千代田区) 2016年05月10日~2016年05月13日
13. Daisuke Ishibashi, Takehiro Nakagaki, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. Prion strain-dependent effect of macroautophagy on abnormal prion protein degradation. Prion2016 & APPS2016 (国際学会) 日本教育会館・一橋ホール (東京都・千代田区) 2016年05月10日~2016年05月13日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: プリオン病治療薬

発明者: 石橋大輔, 西田教行, 水田賢志, 石川岳志

権利者：長崎大学
種類：特許
番号：特願 2018-177224
出願年：2018.9.21
国内外の別：国内

2. 名称：プリオン病予防・治療剤
発明者：石橋大輔、西田教行、中垣岳大、濱田剛、石川岳志
権利者：長崎大学
種類：特許
番号：特願 2016-170349
出願年：2016年08月31日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

※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。