

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08859

研究課題名(和文) プリオン感染によるソーティリン発現量低下機構の解明と治療法開発への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of Sortilin reduction by prion infection and its application to therapeutic method development

研究代表者

内山 圭司 (UCHIYAMA, Keiji)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・准教授

研究者番号：60294039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プリオン感染によりソーティリン発現量が低下するメカニズムの1つとして、ソーティリンとレトロマー複合体との相互作用が制限されているため、トランスゴルジネットワークへのソーティリンの回収が抑制され、リソソームに過剰に流入することでソーティリン発現量が低下していることが示唆された。また、エタノールアミンやLiver X receptorアゴニスト(T0901317)が、CH25Hの発現上昇を引き起こし、これにより増加する25-ヒドロキシコレステロールが抗プリオン活性を示しソーティリン発現量を回復すること、また、マウスにおけるプリオン感染実験において有意に生存期間を延長することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、プリオン感染によるソーティリン発現量低下を回復し、さらに、異常プリオンの減少を引き起こす新規抗プリオン活性物質として、エタノールアミンおよびLiver X receptor(LXR)のアゴニストであるT0901317を同定した。これらはともに、25HCを介して抗プリオン活性を示していると考えられ、今後、25HCの抗プリオン活性発現機構を明らかにすることで、プリオン病に対する新たな治療方策や治療標的が同定されることが考えられる。また、LXR活性化が抗プリオン活性を示すことから、LXRをターゲットとした新たな創薬の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was suggested that one of the mechanisms that reduces the expression of Sortilin by prion infection is that the interaction between Sortilin and the retromer complex is restricted, which suppresses the retrieval of Sortilin from endosomes into the trans-Golgi network and causes excessive influx into lysosomes. Consequently, it was thought that the expression level of sortilin was decreased by prion infection.

In addition, it was found that ethanolamine and Liver X receptor agonist (T0901317) upregulated CH25H expression, which converts cholesterol to 25-hydroxycholesterol. It was also shown that the 25-hydroxycholesterol has an anti-prion activity and decreases abnormal prion protein, and recovers Sortilin expression level. Furthermore, it was shown that these compounds prolong the survival time of prion infected mice in prion infection experiments.

研究分野：ウイルス学(プリオン)

キーワード：異常プリオン ソーティリン エタノールアミン T0901317 Liver X receptor 抗プリオン活性

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、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病やウシの海綿状脳症(BSE)などプリオンタンパク質(PrP)がその病因に関与する神経変性疾患の一群である。プリオンタンパク質には、 $\alpha$ ヘリックス構造を多く持つ正常プリオン(PrP<sup>C</sup>)と、アミノ酸配列は同じであるが構造が異なり $\beta$ シート構造を多く持つ異常プリオン(PrP<sup>Sc</sup>)がある(参考文献(1))。PrP<sup>Sc</sup>は、感染性を示し、体内に侵入するとPrP<sup>C</sup>と相互作用してPrP<sup>C</sup>の異常化を引き起こし、この結果PrP<sup>Sc</sup>が複製・蓄積し、神経細胞死が誘導される。また、プリオン遺伝子欠損マウスにPrP<sup>Sc</sup>を接種してもプリオン病を発症しない(参考文献(2))。これらの結果は、PrP<sup>C</sup>のPrP<sup>Sc</sup>への構造変換とPrP<sup>Sc</sup>蓄積がプリオン病の病態に中心的役割を果たしていることを示している。

現在、プリオン病の根本的な治療法は開発されていない。これは、「プリオン感染による神経細胞死誘導機構」、「正常プリオンの異常化機構」、「異常プリオン蓄積機構」が未だ解明されていないためである。これに対して、我々は、プリオン感染がゴルジ体から細胞膜への小胞輸送を抑制し、細胞膜受容体などの細胞膜局在タンパク質の細胞膜発現量低下を引き起こす結果、細胞膜を介した細胞の正常機能破綻を招き細胞死を誘導し得ることを示した(参考文献(3))。また、新規PrP結合因子としてソーティリンを同定し、ソーティリンは、PrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>Sc</sup>のソーティングレセプターとして機能し、PrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>Sc</sup>をリソソーム分解経路へ誘導するために作用していることを明らかにした。そして、ソーティリン欠損マウスは、野生型マウスと比較して有意に早期の異常プリオン蓄積、早期発症および生存期間短縮を呈することを示した。そして、プリオン感染は、ソーティリン発現量低下を引き起こし、これが異常プリオンの分解抑制そして過剰蓄積を引き起こすこと、さらに、一過性のソーティリン過剰発現により異常プリオンが減少することを明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

我々は、これまでの研究において、プリオン感染によるソーティリン発現量の低下が異常プリオンの過剰蓄積を引き起こしていることを明らかにしていた。そこで、本研究では、この研究成果をさらに発展させ、プリオン感染によるソーティリン発現量の低下を抑制・回復することでプリオン病の病態改善や治療法開発を目指すための基盤的な研究として、プリオン感染によるソーティリン発現低下機構の解明、ソーティリン発現低下を抑制する物質の同定とそのプリオン病治療に対する有用性の検証を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞は、マウス神経芽腫由来N2a細胞に由来するプリオン過剰発現細胞N2aC24細胞を用いた。また、プリオン(22L株)に対する感染が持続的に維持されているN2aC24細胞由来のN2aC24L1-3細胞をプリオン感染細胞として用いた。これらの細胞は、DMEM培地(FujiFilm社)を用いて培養した。また、抗プリオン活性を示す培地であるAdvanced DMEM培地は、Thermo Scientific社より購入した。これらの細胞に対する遺伝子の導入には、Lipofectamine 2000(Thermo Scientific社)をまた、siRNAの導入にはLipofectamin RNAiMAX(Thermo Scientific社)を用いた。マウスにおけるプリオン感染実験にはICRマウスを用いた。プリオン感染は、4週齢のICRマウス脳に、プリオン(RML株)感染終末期の1%脳乳剤20 $\mu$ lを接種することにより実施した。感染7日後から、エタノールアミン(ET)は、8g/lのエタノールアミンを飲水により継続的に経口投与した。また、T0901317は、感染7日後から、週3回、1回あたり5 $\mu$ g/g-mouseの投与量で継続的に腹腔投与した。

#### 4. 研究成果

プリオン感染によるソーティリン発現量低下機構の解明に関しては、これまでの研究結果から、プリオン感染によりソーティリンがリソソームで過剰に分解されるためであることが明らかになっていった。このことから、プリオン感染はレトロマー複合体によるソーティリンのトランスゴルジネットワークへの回収を障害し、ソーティリンのリソソームでの過剰分解が生じているのではないかと考えた。そこで、ソーティリンとレトロマー複合体を構成する VPS35 との共局在を非感染細胞およびプリオン感染細胞において確認した結果、プリオン感染細胞において明らかにこれらの共局在が低下していた。そこで、プリオン感染細胞での VPS35 過剰発現により、ソーティリン発現量が回復するのかが確認した。しかし、VPS35 の mRNA レベルは上昇しているにもかかわらず、蛋白レベルでは VPS35 発現量は増加しておらず、ソーティリン発現量回復には至らなかった。

ソーティリン発現量低下を抑制する物質の同定に関しては、これまでの研究において Advanced DMEM 培地で培養することにより、プリオン感染細胞において異常プリオンが減少しソーティリン発現量が増加することが明らかになっていた。そこで、Advanced DMEM に含まれる未知のソーティリン発現回復因子の同定とその作用機序の解明に取り組んだ。Advanced DMEM 培地に加えられた 15 種類の添加物各々を通常の DMEM 培地に添加した培地を作製し、この培地によりプリオン感染細胞を培養し、ソーティリンおよび異常プリオン発現量を確認した。その結果、エタノールアミンのみが異常プリオンの減少および、ソーティリン発現量回復を引き起こすことを明らかにした。

エタノールアミンが生体においても有効に作用し、プリオン病の予防・治療効果を示すのかが確認された、その作用機序の解明さらに、新たな抗プリオン活性物質の同定とプリオン病治療の標的となる宿主因子の同定を試みた。マウスにおけるプリオン感染実験において、8g/l のエタノールアミンを飲水により継続的に経口投与した結果、感染初期 (49dpi) において、有意に異常プリオン蓄積を抑制し生存期間の延長が確認された (図 1)。しかし、高濃度のエタノールアミン投与は副作用が強く体重増加が抑制されたため、これ以上の効果を得ることは困難であると考えられた。そこで、エタノールアミンが示す抗プリオン活性の作用機序を明らかにすることで新たな抗プリオン活性物質やプリオン病治療の標的となる宿主因子を同定することにした。その結果、エタノールアミンの投与により、コレステロールからの 25-ヒドロキシコレステロール (25HC) 合成を担う CH25H の発現が上昇しており、さらに、25HC が抗プリオン活性を示すことが確認された (図 2)。

これと同様の作用を示す Liver X receptor のアゴニストである T0901317 が抗プリオン活性を示し、ソーティリン発現量が回復するのかが確認したところ、プリオン感染細胞に対して T0901317 は抗プリオン活性を示した (図 3)。また、LXR を siRNA によりノックダウンすることで T0901317 の抗プリオン活性が抑制され、逆に、LXR を過剰発現することによりその作用が増強された。これらの結果から、LXR の活性化を介したシグナルが抗プリオン活性に關与していることが示唆された。さらに、CH25H のノックダウンにより T0901317 が示す抗プリオン活性が抑制されたことから、CH25H の作用により増加する 25HC が抗プリオン活性の責任因子であると考えられた。また、T0901317 が、プリオン病の治療・予防効果を示すのかが、マウスにおけるプリオン感染実験において確認した。T0901317 をプリオン感染後 7 日から継続的に腹腔に投与した結果、異常プリオン蓄積が抑制され (53dpi)、生存期間の延長が確認された (図 4)。これらの結果から、25HC や LXR アゴニストさらに、LXR が、プリオン病治療や治療法開発の標的として有効であると考えられた。

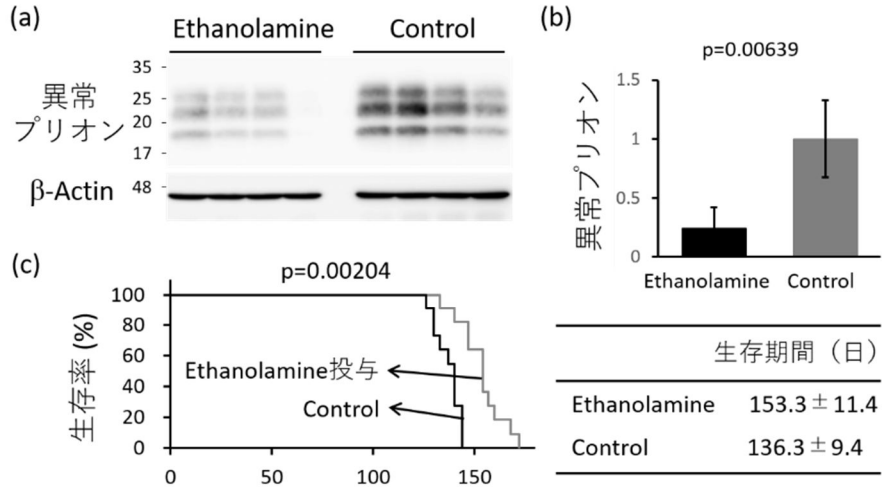


図1. プリオン感染に対するエタノールアミン投与の効果  
(a) 49dpiでの異常プリオン蓄積、(b)定量結果、(c)生存曲線

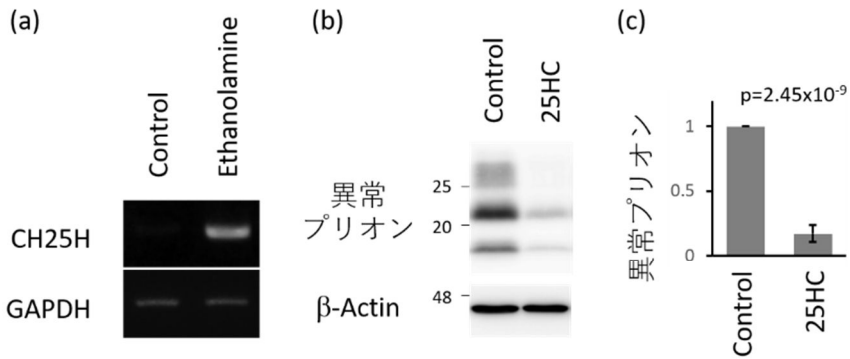


図2. CH25Hの発現上昇を25-ヒドロキシコレステロールが示す抗プリオン活性。  
(a)エタノールアミンによりCH25Hの発現が上昇する、(b)25HCが示す抗プリオン活性、(c)定量結果。

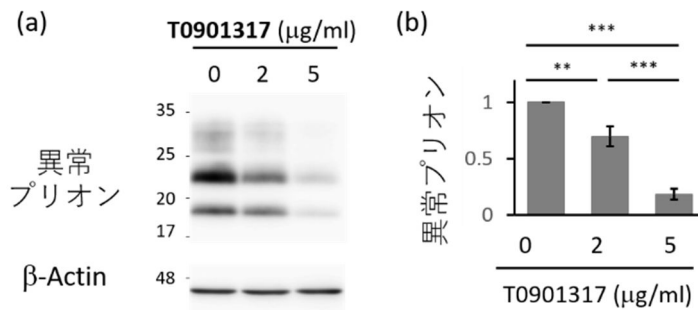


図3. T0901317が示す抗プリオン活性。  
(a)T0901317が抗プリオン活性、(b)定量結果。

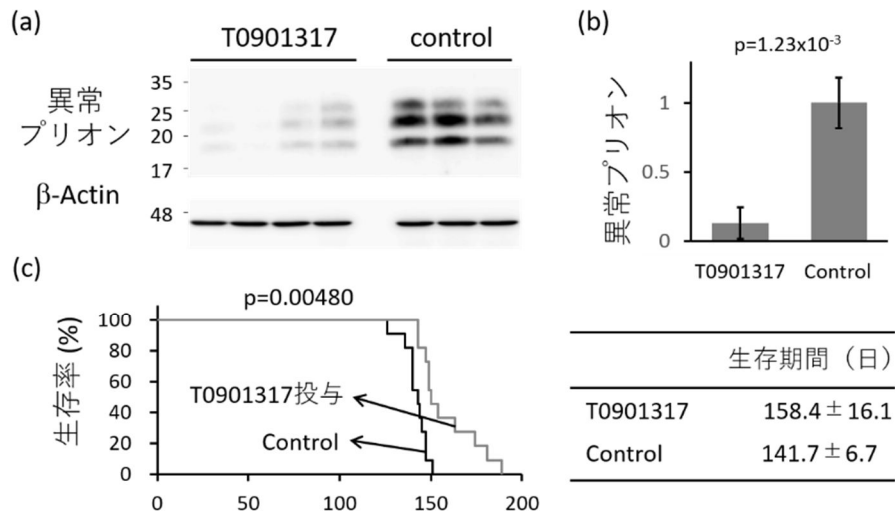


図4. プリオン感染に対するT0901317投与の効果  
 (a) 49dpiでの異常プリオン蓄積、(b)定量結果、(c)生存曲線

< 参考文献 >

- (1) Prusiner SB. Science, 216, 136-44(1982)
- (2) Sakaguchi S et al. J Virol, 69, 7586-92(1995)
- (3) Uchiyama K et al. Nat commun, 4, 1846(2013)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kaneyoshi K, Uchiyama K, Onitsuka M, Yamano N, Koga Y, Omasa T.	4. 巻 127
2. 論文標題 Analysis of intracellular IgG secretion in Chinese hamster ovary cells to improve IgG production.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng	6. 最初と最後の頁 107-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.06.018.	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 Kaneyoshi K, Kuroda K, Uchiyama K, Onitsuka M, Yamano-Adachi N, Koga Y, Omasa T.	4. 巻 71
2. 論文標題 Secretion analysis of intracellular "difficult-to-express" immunoglobulin G (IgG) in Chinese hamster ovary (CHO) cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 305-316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s10616-018-0286-5.	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 Kaneyoshi K, Yamano-Adachi N, Koga Y, Uchiyama K, Omasa T.	4. 巻 71
2. 論文標題 Analysis of the immunoglobulin G (IgG) secretion efficiency in recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cells by using Citrine-fusion IgG.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 193-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s10616-018-0276-7.	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 Chida J, Hara H, Yano M, Uchiyama K, Das NR, Takahashi E, Miyata H, Tomioka Y, Ito T, Kido H and Sakaguchi S	4. 巻 14
2. 論文標題 Prion Protein Protects Mice from Lethal Infection with Influenza A Viruses.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1317/journal.ppat.1007049.	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 -

1. 著者名 Linsenmeier L, Mohammadi B, Wetzel S, Puig B, Jackson WS, Hartmann A, Uchiyama K, Sakaguchi S, Endres K, Tatzelt J, Saftig P, Glatzel M and Altmeyen HC	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural and mechanistic aspects influencing the ADAM10-mediated shedding of the prion protein.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Neurodegeneration	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s13024-018-0248-6.	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 該当する

1. 著者名 Uchiyama Keiji, Tomita Mitsuru, Yano Masashi, Chida Junji, Hara Hideyuki, Das Nandita Rani, Nykjaer Anders, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Prions amplify through degradation of the VPS10P sorting receptor sortilin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1006470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1371/journal.ppat.1006470	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 Das Nandita Rani, Miyata Hironori, Hara Hideyuki, Uchiyama Keiji, Chida Junji, Yano Masashi, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Sakaguchi Suehiro	4. 巻 162
2. 論文標題 Effects of prion protein devoid of the N-terminal residues 25-50 on prion pathogenesis in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 1867 ~ 1876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1007/s00705-017-3295-3	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 Hara H, Miyata H, Das N, Chida J, Yoshimochi T, Uchiyama K, Watanabe H, Kondoh G, Yokoyama T and Sakaguchi S.	4. 巻 92
2. 論文標題 Prion Protein Devoid of the Octapeptide Repeat Region Delays BSE Pathogenesis in Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01368-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sakaguchi Suehiro, Uchiyama Keiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel amplification mechanism of prions through disrupting sortilin-mediated trafficking	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Prion	6. 最初と最後の頁 398 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1080/19336896.2017.1391435	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 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kaneyoshi K, Kuroda K, Yamano N, Koga Y, Uchiyama K and Omasa T
2. 発表標題 Analysis of intracellular secretion processes by Citrine fusion IgG aiming to establish high producer CHO cells. Analysis of intracellular secretion processes by Citrine fusion IgG
3. 学会等名 JAACT2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼吉航平, 黒田昂輝, 山野-足立範子, 鬼塚正義, 古賀 雄一, 内山圭司, 大政健史
2. 発表標題 生産性向上を目指した医薬品抗体生産細胞における分泌過程解析
3. 学会等名 日本化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaneyoshi K, Uchiyama K, Onitsuka M, Yamano N, Koga Y and Omasa T
2. 発表標題 Intracellular secretion analysis of recombinant therapeutic antibodies in engineered CHO cells aiming to establish high produce.
3. 学会等名 The 25th Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Sakaguchi S and Uchiyama K
2. 発表標題 Prion propagation through sortilin degradation.
3. 学会等名 第60回日本神経化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Uchiyama K, Toko T, Sakaguchi S.
2. 発表標題 High susceptibility of Sortilin-deficient cells to prion infection.
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Uchiyama, K and Sakaguchi S.
2. 発表標題 Identification and investigation of a novel anti-prion compound.
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Uchiyama K and Sakaguchi S	4. 発行年 2018年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 71
3. 書名 Prions - Some Physiological and Pathophysiological Aspects. Chapter 3, A Molecular Mechanism for Abnormal Prion Protein Accumulation	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----