

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月12日現在

機関番号：17301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790998  
 研究課題名（和文）孤発性クロイツフェルトヤコブ病におけるプリオン自然発生機構の解明  
 研究課題名（英文）Understanding of spontaneous generation of prions in sporadic Creutzfeld-Jakob disease  
 研究代表者  
 佐野 和憲（SANO KAZUNORI）  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：50534343

## 研究成果の概要（和文）：

病原体プリオンはウイルスなどとは異なり、病原特異的な核酸を持たず、おそらくは単一の異常型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) のみから構成されていると推測されている（タンパク単独仮説）。しかしながら、我々は、ウイルス由来の二本鎖 RNA (dsRNA) と同様の免疫活性を持つ合成 dsRNA である Poly(I:C) がプリオン感染神経芽細胞中の PrP<sup>Sc</sup> 蓄積を増大し、そして、野生型マウスにおけるプリオン感染後の発症までの潜伏期間を短縮することを確認し、dsRNA がプリオン病を増悪させる因子であることを示した。さらに、神経芽細胞へ dsRNA を認識する Toll-like receptor 3 (TLR3)、Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)、Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) を導入することによって、プリオン感染後の PrP<sup>Sc</sup> 蓄積の増大が観察され、プリオン病における PrP 以外の修飾・補助因子として、dsRNA とその宿主側シグナル分子群が働いていることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Prion diseases are infectious and fatal neurodegenerative disorders characterized by progressive spongiform changes and the accumulation of abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in the central nervous system. Although prion diseases were thought to be caused by slow-virus infections, no exogenous viral genome has been identified. The infectious agent, now called prion, is thought not to possess its own genome and to be composed uniquely of prion proteins, which are encoded by the host gene. In this study, we found that polyinosine-polycytidylic acid (poly(I:C)), a synthetic analog of dsRNA, treated mice increased accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells, and accelerated the onset of prion disease in wild-type mice. Moreover, PrP<sup>Sc</sup> was increased by overexpression of Toll-like receptor 3 (TLR3), Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I), and Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5), which recognize dsRNA, in prion-infected cells. Our findings suggest that dsRNA may play a key role in prion infection.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン病（別名；伝達性海綿状脳症）は病原体プリオンによって引き起こされる致死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（Creutzfeldt-Jakob disease; CJD）、ヒツジのスクレイピー、牛の牛海綿状脳症（Bovine Spongiform encephalopathy; BSE）などが代表的な疾患である。病原体プリオンはウイルス、細菌などとは異なり、病原特異的な核酸を持たず、おそらくは単一の異常型プリオンタンパク（PrP<sup>Sc</sup>）のみから構成されていると推測されている（タンパク単独仮説）。PrP<sup>Sc</sup>は、哺乳類の主に神経系に発現している正常型プリオンタンパク（PrP<sup>C</sup>）が構造上変化したものである。PrP<sup>Sc</sup>とPrP<sup>C</sup>ではアミノ酸配列に違いはなく、その立体構造のみが異なっている。PrP<sup>C</sup>は $\alpha$ -helix構造を多く含み、可溶性で柔軟な構造をしているが、PrP<sup>Sc</sup>は $\beta$ -sheet含量が非常に高く、そのため凝集しやすく不溶性、蛋白分解酵素処理に抵抗性などの性質を持つことが知られている。

ヒトのプリオン病であるCJDは①自然発症型の孤発性、②プリオンタンパク（PrP）遺伝子異常による遺伝性、③プリオンの汚染による感染性に分類されるが、孤発性CJDはCJD全体の78%を占めるにもかかわらず、現在のところ発症原因は分かっていない（図1）。おそらく、遺伝性、感染性以外に、PrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>への変換を促進する因子が存在すると考えられる。

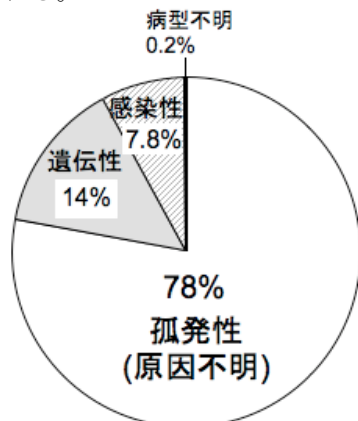


図1. CJDサーベイランス委員会(1999年4月～2007年2月)により調査されたCJDの分類

## 2. 研究の目的

本研究室は、これまでにウイルス感染時の特徴的な干渉現象（Science, 310:493-6, 2005）や自然免疫機構の活動（J Virol, 86:4947-55, 2012）がプリオン感染時においても見られることを証明し、ウイルスなどPrP<sup>Sc</sup>以外の因子が病態に関与している可能

性を示してきた。そこで、本研究では、プリオン病態機構に関わるプリオンタンパク以外の因子を特定し、その作用メカニズムを解析することにより、現在全く分かっていない、孤発性クロイツフェルトヤコブ病におけるプリオンが自然発生する機構の解明に貢献することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### <培養細胞を用いたプリオン感染>

22L株プリオン感染マウス脳乳剤のマウス由来神経芽細胞N2a58細胞への感染時に、ウイルス由来の合成二本鎖RNA（dsRNA）、一本鎖RNA（ssRNA）、細菌由来の二本鎖DNA（dsDNA）、リポ多糖（LPS）を処置し、その後のPrP<sup>Sc</sup>の発現について検討を行った。PrP<sup>Sc</sup>は回収した細胞試料を蛋白分解酵素（Proteinase-K:PK）による消化後、ウェスタンブロット法により検出した。さらに、その関連分子の遺伝子導入により分子を人為的に増減させたN2a58細胞に対して22Lプリオン感染実験することにより、その作用メカニズムを解析した。

### <野生型マウスへのプリオン感染>

22L株プリオン感染マウス脳乳剤の野生型マウスへの脳内投与による感染時に、上記の検討で影響を示した因子を同時に脳内投与し、プリオン病態進行に対する因子の作用を観察した。

## 4. 研究成果

N2a58細胞への22Lプリオン感染と同時にウイルス由来のdsRNA、ssRNAと同様の免疫活性を持つ合成dsRNA（Poly(I:C)）、合成ssRNA（PolyU）、細菌由来のdsDNA、LPSをそれぞれ同時に添加し48時間後PrP<sup>Sc</sup>蓄積の増減を測定した。Poly(I:C)は、濃度依存的にN2a58細胞におけるPrP<sup>Sc</sup>蓄積を増大した（図2）。一方、PolyU、dsDNA、LPSはPrP<sup>Sc</sup>蓄積に影響を示さなかった。

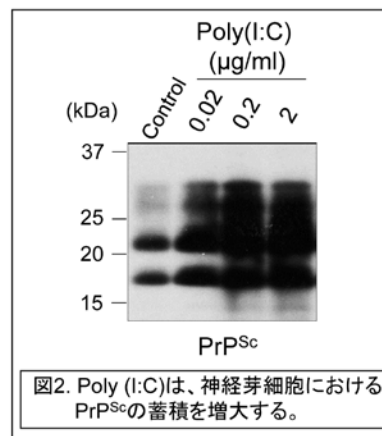


図2. Poly(I:C)は、神経芽細胞におけるPrP<sup>Sc</sup>の蓄積を増大する。

そのPoly(I:C)のPrP<sup>Sc</sup>蓄積に対する増大作用は、dsRNA 分解酵素である RNaseIIIの前処理により抑制された (図3)。

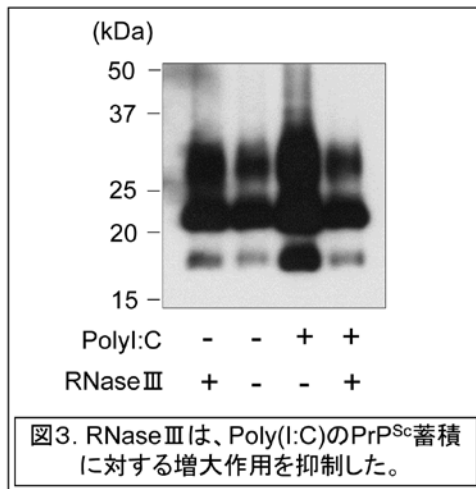


図3. RNase IIIは、Poly(I:C)のPrP<sup>Sc</sup>蓄積に対する増大作用を抑制した。

さらに、Poly(I:C)は野生型マウスにおける22L プリオン感染後発症までの潜伏期間を短縮した (図4)。

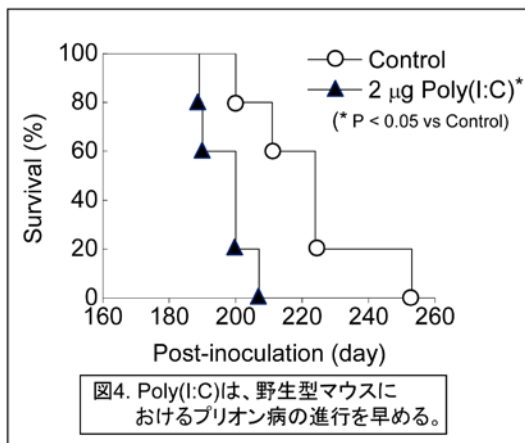


図4. Poly(I:C)は、野生型マウスにおけるプリオン病の進行を早める。

これらの結果は、dsRNA がプリオン感染を促進し、プリオン病を増悪させる因子であることを示している。

次に、Poly(I:C)のPrP<sup>Sc</sup>蓄積増大作用が、PrP<sup>Sc</sup>に対する直接的な作用によるものなのかを判断するため、Poly(I:C)を前処置し48時間後にPBSによる洗浄を行った後、22Lプリオン感染実験を行った。その結果、感染4、8、24時間後において、Poly(I:C)はPrP<sup>Sc</sup>蓄積を増大し (図5)、Poly(I:C)の除去後も同様の反応が観察されることが判明した。このことから、Poly(I:C)のPrP<sup>Sc</sup>蓄積増大作用はPrP<sup>Sc</sup>への直接的な作用によるものではなく、細胞内シグナル機構が関与している可能性が示唆された。

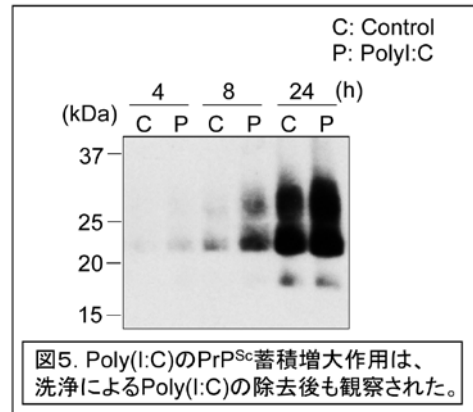


図5. Poly(I:C)のPrP<sup>Sc</sup>蓄積増大作用は、洗浄によるPoly(I:C)の除去後も観察された。

神経芽細胞へ dsRNA を認識する Toll-like receptor 3 (TLR3) を導入することによって、プリオン感染後の PrP<sup>Sc</sup>蓄積が増大した (図6)。また、dsRNA を認識する Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)、Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) の導入によっても PrP<sup>Sc</sup>蓄積の増大が観察されることを確認している。一方、LPS を認識する TLR4、ssRNA を認識する TLR8 の導入は PrP<sup>Sc</sup>蓄積に影響しなかった (図6)。

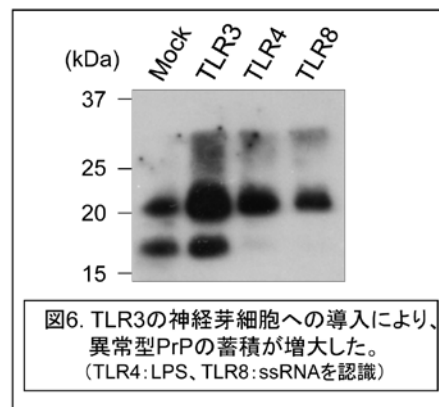


図6. TLR3の神経芽細胞への導入により、異常型PrPの蓄積が増大した。(TLR4: LPS、TLR8:ssRNAを認識)

以上より、プリオン病におけるPrP以外の修飾・補助因子として、dsRNAとその宿主側シグナル分子群が働いていることが明らかとなった。このことは、dsRNAを介したシグナル機構と孤発性クロイツフェルトヤコブ病におけるプリオン自然発生機構との関連性を示唆する結果でもあった。

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2件)

- (1) Kazunori Sano, Katsuya Satoh,  
Ryuichiro Atarashi, Hiroshi Takashima,  
Yasushi Iwasaki, Mari Yoshida, Nobuo  
Sanjo, Hiroyuki Murai, Hidehiro  
Mizusawa, Matthias Schmitz, Inga Zerr,  
Yong-Sun Kim, Noriyuki Nishida, Early  
detection of abnormal prion protein in  
genetic human prion diseases now  
possible using real-time QUIC assay,  
PLoS One, 査読有, 8巻, 2013, e54915  
DOI : 10.1371/journal.pone.0054915
  
- (2) Ryuichiro Atarashi, Kazunori Sano,  
Katsuya Satoh, Noriyuki Nishida,  
Real-time quaking-induced  
conversion: a highly sensitive assay  
for prion detection, Prion, 査読有, 5  
巻, 2011, 150-153  
DOI : 10.4161/pri.5.3.16893

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 和憲 (SANO KAZUNORI)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号 : 50534343

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし