

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591482

研究課題名(和文) 宿主自然免疫応答に作用するプリオンの感染メカニズムの解明

研究課題名(英文) The elucidation of prion infectious mechanism on host innate immunity

## 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)・助教

研究者番号：10432973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、宿主の自然免疫機構に着目し、プリオン感染との関係について検討した。結果としてIRF3の下流に位置するI型IFNの機構がプリオン感染に重要な役割を果たしていることやIRF3の転写因子Oct-1の発現がプリオン感染によって制御されていることを明らかにした。本研究により、自然免疫機構をターゲットにしたプリオン病の予防・治療薬の開発が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused the innate immune system in host, and examined the relationship between prion infection and the immune system. As a result, we revealed that IRF3-type I IFNs system plays a key role in prion infection and that the expression of Oct-1, which is a selectively transcription factor of IRF3 gene, is negatively controlled by prion infection. Consequently, we consider that development of prevention and therapeutic agent against the prion disease, which targets this innate immune system, would progress by our project.

研究分野：ウイルス学、免疫学、分子生物学

キーワード：prion innate immunity IRF3 IFN Oct-1

## 1. 研究開始当初の背景

プリオン病はヒトを含む各種動物に見られる空砲変性及びグリオーシスなどの脳内病理変化を伴う難治性の中樞神経変性疾患である。長年、真偽の的であった「異常型 PrP=プリオン病原体？」という問題が収束しうる状況であり病原体の本体が確定してきたにもかかわらず、“ヒトからヒト”や“ウシからのヒト”への感染など、種の壁を越える感染が現在もなお問題となっており、治療・予防法の研究が急務に行われている。しかし、プリオン感染を完全に抑制することができないのが現状である。プリオン病では病原体の感染に関わる主要な因子および詳細な感染経路メカニズムが未だ確定、解決していないという大きな問題があるため、治療・予防薬の実用化までは至っていないのである。

生体内への病原体・異物の侵入により、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、病原体の感染に対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、細菌由来の因子により働く MyD88 依存のカスケードがプリオン感染に影響しないことや TLR4 を不活性化させた遺伝子変異マウスがプリオン病を早期に発症することが報告された。これらのことは、自然免疫機構とプリオン感染との関与を示唆するものであり、この研究領域はプリオン病研究にとって重要な分野となり得ると考えられる。

## 2. 研究の目的

申請者らは、プリオン持続感染細胞における自然免疫関連因子の発現を検討し、ウイルス由来の dsRNA に対し働く MyD88 非依存のシグナルカスケードの代表的な因子である IRF3 の発現減少や IRF3 の強制発現による異常型 PrP の発現抑制を確認した。また、IRF3 遺伝子欠損マウスはプリオン感染後、早期にプリオン病を発症した。これらの結果、IRF3 がプリオン感染に強く関与する可能性を示唆しており、過去の報告に矛盾しない。そこで本研究では、

プリオン感染による IRF3 の発現抑制機構の解明

IRF3 の下流に位置する I 型 Interferon (IFN) とプリオン感染の関係性に着

目し、IRF3 を介した抗プリオン効果のメカニズムの詳細な解析

について重点的に検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### プリオン感染による IRF3 抑制機構を解明

IRF3 の転写に着目し、IRF3 のプロモーター領域を同定後、プリオン感染時のレポーターアッセイを行った。また、そのプロモーター領域に関わる転写因子との因果関係についても免疫沈降(IP)などを用いて検討した。

### プリオン感染と自然免疫関連因子との関係性

in vitro の系におけるプリオン感染モデルでの自然免疫関連候補因子の挙動において、非感染培養細胞および正常マウスにプリオンを感染させ、候補因子の発現を経時的にリアルタイム PCR、ウエスタンブロット法にて確認した。

### IRF3 を介したシグナルカスケードにおける自然免疫関連因子の探索

リアルタイム PCR 法を用いて当研究室で樹立済みのプリオン持続感染細胞に自然免疫関連因子の中で特徴的な因子の探索を行った。さらに、その因子の異常型 PrP への影響について、持続感染細胞への遺伝子導入実験により、評価した。

### 遺伝子改変マウスを用いた自然免疫関連因子とプリオン感染と関係性

I 型 IFN 受容体遺伝子欠損マウスへのプリオン感染によるパイオアッセイにより、I 型 IFN 下流シグナルの重要性について評価した。

## 4. 研究成果

プリオン感染による IRF3 抑制機構を解明について検討を行い、以下の結果を得た。1)レポーターアッセイによりマウス IRF3 遺伝子の転写開始地点から上流-119bp に位置するプロモーター領域に結合すると推定された転写因子 E2F1 や AML1 では無く、Oct-1 が特異的に転写活性を示すこと 2)プリオン持続感染細胞における IRF3 遺伝子発現の減少と共にそのプロモーター活性が低下していたこと 3)異常型プリオン蛋白を減少させる薬剤 pentosan polysulfate や Congo-red 処置により減少していたプロモーター活性が回

復したこと 4)クロマチン免疫沈降アッセイにより Oct-1 が特異的にプロモーター領域と結合していること 5)プリオン感染マウスの脳において Oct-1 の発現が有意に減少していたことである。

非感染培養細胞にプリオンを感染させ、自然免疫関連因子の発現を経時的にリアルタイム PCR、ウエスタンブロット法にて確認した結果、1)IRF3 を介したシグナルカスケードの下流に位置する複数の interferon stimulated genes (ISGs) の重要性を確認した。

恒常的に異常型 PrP を発現しているプリオン持続感染細胞において TLRs family, MyD88 に依存した因子の遺伝子発現について検討した結果、特有な遺伝子の発現に変化があった。また、IRF3 の下流に位置する ISGs をそれぞれ単独でプリオン持続感染細胞に導入した後の異常型 PrP の発現に顕著な変化は見られなかった。さらに複数の遺伝子を組み合わせで導入する検討も行ったが、同様の結果であった。しかしながら、興味深いことに、3F4 タグの配列を挿入した PrP をプリオン持続感染細胞に導入後、新規合成される 3F4 タグ異常型 PrP に対する影響について検討したところ、一部の ISGs の因子については、抑制効果があることが確認された。

I 型 IFN とプリオン感染との関与を検討するため、I 型 IFN 受容体遺伝子欠損マウスにプリオン感染させ、生存期間等を検討した結果、生存期間に影響を示した（詳細を再検討中）。

本研究課題にて、我々は、プリオン感染による IRF3 発現低下の要因の一つが Oct-1 の減少に伴う結果であることを明らかにした。また、本実験によって得られた ISGs がプリオン感染に影響するという新たな知見は、これまでにプリオン感染において関与を示唆する報告は無く、全く新しいものである。今後、さらにこれらの因子の重要性について深く検討していく予定である。

## 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 7 件)

Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Fuse T, Sano K, Satoh K, Atarashi R, Nishida N.

Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. *Sci Rep.* 2014 Aug 8;4:6006. doi: 10.1038/srep06006. 査読有  
Sano K, Atarashi R, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Nishida N. Conformational properties of prion strains can be transmitted to recombinant prion protein fibrils in real-time quaking-induced conversion. *J Virol.* 2014 Oct; 88(20): 11791-11801. doi: 10.1128/JVI.00585-14. 査読有

Homma T, Ishibashi D, Nakagaki T, Satoh K, Sano K, Atarashi R, Nishida N. Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. *Sci Rep.* 2014 Mar 28; 4: 4504. doi: 10.1038/srep04504. 査読有

Nakagaki T, Satoh K, Ishibashi D, Fuse T, Sano K, Kamatari YO, Kuwata K, Shigematsu K, Iwamaru Y, Takenouchi T, Kitani H, Nishida N, Atarashi R. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice. *Autophagy.* 2013 Sep;9(9):1386-1394. doi: 10.4161/auto.25381. 査読有

Ishibashi D, Atarashi R, Nishida N. Protective role of MyD88-independent innate immune responses against prion infection. *Prion.* 2012 Nov-Dec; 6(5): 443-446. doi: 10.4161/pri.22579. 査読有

Ishibashi D, Atarashi R, Fuse T, Nakagaki T, Yamaguchi N, Satoh K, Honda K, Nishida N. Protective role of interferon regulatory factor 3-mediated signaling against prion infection. *J Virol.* 2012 May; 86(9):4947-4955. doi: 10.1128/JVI.06326-11. 査読有

Kubota T, Hamazoe Y, Hashiguchi S, Ishibashi D, Akasaka K, Nishida N, Katamine S, Sakaguchi S, Kuroki R, Nakashima T, Sugimura K. Direct evidence of generation and accumulation of  $\beta$ -sheet-rich prion protein in scrapie-infected neuroblastoma cells with

human IgG1 antibody specific for  $\beta$ -form prion protein. J Biol Chem. 2012. Apr 20; 287 (17): 14023-14039. doi: 10.1074/jbc.M111.318352. 査読有

[学会発表](計 19件)

**Daisuke Ishibashi**, Takujiro Homma, Takehiro Nakagaki, Noriyuki Nishida. Persistent prion infection disturbs the function of Oct-1, resulting in the down-regulation of murine interferon regulatory factor-3. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2014.12.10-12. 国立京都国際会館、京都

**Daisuke Ishibashi**, Takujiro Homma, Takehiro Nakagaki, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. Metabolism of PrPSc differs depending on prion strains. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014.11.10-12. パシフィコ横浜、神奈川県 **石橋大輔**、プリオン感染における宿主自然免疫応答の役割 Role of the host innate immune responses against prion pathogenesis. 第 87 回日本生化学会大会. 2014.10.15-18. 国立京都国際会館、京都 **石橋大輔**、本間拓二郎、西田教行、病原体プリオンによる転写因子 IRF3 の発現抑制機構、第 67 回日本細菌学会九州支部総会・第 51 回日本ウイルス学会九州支部総会、2014.9.5-6. 城山観光ホテル、鹿児島

本間拓二郎、**石橋大輔**、新竜一郎、西田教行、正常型プリオン蛋白のプロテアソーム分解機構を再考する、第 33 回分子病理学研究会宮城蔵王シンポジウム、2014.7.25-26. 宮城蔵王ロイヤルホテル、宮城

**Daisuke Ishibashi**, Takujiro Homma, Takehiro Nakagaki, Kazunori Sano, Naohiro Yamaguchi, Tsuyoshi Mori, Katsuya Satoh, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. Metabolism of PrPSc differs depending on prion strains. Prion2014. May 27-30, 2014. Trieste, Italy

**Daisuke Ishibashi**, Takujiro Homma, Takehiro Nakagaki, Kazunori Sano, Kenya Honda, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki

Nishida. Type I interferon signal pathway of host innate immune response regulates prion infection. 第 42 回日本免疫学会学術集会. 2013.12.11-13. 幕張メッセ、千葉 **石橋大輔**、本間拓二郎、中垣岳大、佐野和憲、本田賢也、新竜一郎、西田教行、I 型インターフェロンを介した宿主自然免疫応答におけるプリオン感染抑制機構、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013.11.10-12. 神戸国際会議場、兵庫 Takujiro Homma, **Daisuke Ishibashi**, Takehiro Nakagaki, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. p62/SQSTM1 promotes the sequestration and clearance of pathogenic prion protein. Expanding prion horizons-prion reseach center-.2013.10.16-18. University center for the arts fort collins, Colorad, USA

本間拓二郎、**石橋大輔**、中垣岳大、新竜一郎、西田教行、選択的オートファジーによる異常型プリオン蛋白 (PrPSc) の認識および分解 Sequestosome-1/p62 enhances clearance of pathogenic prion protein. 第 25 回高遠シンポジウム. 2013.8.29-30.延暦寺会館(比叡山)、滋賀 Takehiro Nakagaki, Katsuya Satoh, **Daisuke Ishibashi**, Takayuki Fuse, Kazunori Sano, Yuji O. Kamatari, Kazuo Kuwata, Kazuo Shigematsu, Yoshifumi Iwamaru, Takato Takenouchi, Hiroshi Kitani, Noriyuki Nishida, Ryuichiro Atarashi. FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice. Asian pacific prion symposium 2013 in Nagasaki (APPS2013). 2013.7.21-22. HUIS TEN BOSCH. Nagasaki.

**Daisuke Ishibashi**, Takujiro Homma, Takehiro Nakagaki, Kazunori Sano, Kenya Honda, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. Type I IFN signal pathway of host innate immune response regulates prion infection. Asian pacific prion symposium 2013 in Nagasaki (APPS2013). 2013.7.21-22. HUIS TEN BOSCH. Nagasaki.

Takujiro Homma, **Daisuke Ishibashi**,

Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. Analysis of Interferon Regulatory Factor-3 (IRF-3) Promoter: Implications for Prion Infection. Asian pacific prion symposium 2013 in Nagasaki (APPS2013). 2013.7.21-22. HUIS TEN BOSCH. Nagasaki.

Takujiro Homma, **Daisuke Ishibashi**, Takehiro Nakagaki, Ryuichiro Atarashi and Noriyuki Nishida. p62/SQSTM1 promotes the sequestration and clearance of pathogenic prion protein. Asian pacific prion symposium 2013 in Nagasaki (APPS2013). 2013.7.21-22. HUIS TEN BOSCH. Nagasaki.

本間拓二郎、**石橋大輔**、中垣岳大、新竜一郎、西田教行、セクエストソーム1蛋白によるプリオン凝集体の認識、第37回長崎感染症研究会、2013.3.16. 長崎大学(ポンペ会館)、長崎

本間拓二郎、**石橋大輔**、中垣岳大、西田教行、セクエストソーム1蛋白によるプリオン凝集体の認識、感染症若手フォーラム、2013.2.28-3.2. 北広島クラッセホテル、北海道

濱添勇太、橋口周平、杉村和久、**石橋大輔**、西田教行、プリオン阻害活性を示す抗プリオンタンパク質抗体による非感染神経芽腫細胞内でのPK抵抗性プリオンオリゴマーの生成、第85回日本生化学会大会、2012.12.14-16. マリンメッセ福岡

**Daisuke Ishibashi**. Protective role of host innate immune response against prion pathogen. The 6th Nagasaki Symposium on Emerging Infectious Diseases and the 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. December 10 (Mon)-12(Wed), 2012. Ryojun auditorium, Nagasaki university

Takujiro Homma, **Daisuke Ishibashi**, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. Increased expression of Sequestosome-1 in prion disease and its association with pathogenic prion protein. Asian Pacific Prion Symposium 2012 (APPS2012). 2012.7.29-30. Pacifico Yokohama

**Daisuke Ishibashi**, Takujiro Homma, Takehiro Nakagaki, Kazunori Sano, Naohiro Yamaguchi, Tsuyoshi Mori, Katsuya Satoh, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida. P.17: Metabolism of PrPSc differs depending on prion strains. Prion. 2014. Volume. 8, Supplement. April/May/ June. p32.

中垣岳大、**石橋大輔**、西田教行、プリオン病の病態解明の進展と治療へのアプローチ、感染 炎症 免疫、2013年 summer Vol.43. No.2. P91-93

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

無し

○取得状況(計 0件)

無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/cmb/>

6. 研究組織

(1)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)・助教

研究者番号: 10432973

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

〔図書〕(計 2件)