

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461596

研究課題名(和文)プリオン蛋白質欠損マウスを用いた、インフルエンザ脳症の発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular pathogenesis of influenza virus-associated encephalopathy using Prnp0/0 mice.

研究代表者

千田 淳司(CHIDA, Junji)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号：20437651

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)：プリオン蛋白質(PrPC)は細胞膜蛋白質であり、これまでに脳の神経細胞で特に高発現していること、PrPCの構造変異体(PrPSc)は凝集体を形成し、プリオン病を引き起こすことが知られている。しかし、PrP遺伝子欠損(Prnp0/0)マウスは正常に発育成長することから、PrPCの生体機能は不明であった。申請者らは、Prnp0/0マウスにインフルエンザAウイルス(IAV)を感染させた結果、野生型(WT)マウスと比較すると、ウイルスに高感受性であり高い致死率を呈した。以上の結果から、肺で発現するPrPCはIAVの増殖を抑制する宿主側因子である可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：The cellular prion protein, designated PrPC, is a membrane glycoprotein expressed the most abundantly in brain and to a lesser extent in other non-neuronal tissues. Conformational conversion of PrPC into the amyloidogenic isoform, PrPSc, is a key event in the pathogenesis of prion disease. However, the physiological functions of PrPC remain largely unknown, particularly in non-neuronal tissues. Here we show that, compared with wild-type (WT) mice, mice devoid of PrPC (Prnp0/0) were highly susceptible to various strains of influenza A virus (IAV). Prnp0/0 mice displayed higher mortality after intranasal infection with IAVs, with higher virus titers and more severe inflammatory responses in their lungs, indicating that PrPC has a protective role against IAV infection.

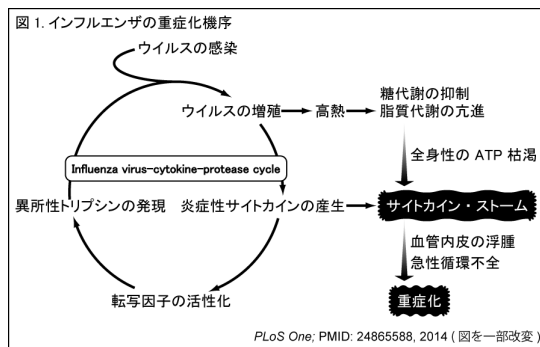
研究分野：小児科学、ウイルス学

キーワード：インフルエンザ プリオン蛋白質 抗プリオン抗体 脳症 多臓器不全

1. 研究開始当初の背景

「インフルエンザは風邪の一種であり、恐れる病気にあらず」と捉える人が多いが、これは大きな誤解である。インフルエンザは時に重症化し患者を死に至らしめる。特に、基礎疾患をもつ高齢者では呼吸器合併症による死亡率が高く、小児ではインフルエンザ脳症等の重篤な病態を併発する。

インフルエンザの重症化には、ウイルス感染初期で起こる「サイトカイン・ストーム」が関与する。これが起こる機序として「インフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼサイクル」説を申請者らは提唱してきた(図1;文献1)。



ウイルスが感染能を獲得するためにはウイルス膜表面のHA(Haemagglutinin)が宿主由来のプロテアーゼにより切断される必要がある。ウイルスが肺に感染すると、炎症性サイトカインが産生されるが、これら炎症性サイトカインは転写因子の活性化を介し、HAを切断する異所性プロテアーゼ(Trypsin, MMP-9)の発現を上昇させる(図1;文献2,3)。その結果、ウイルスのHAが効率よく切断され、ウイルスの増殖は加速する。この「負のウイルスの増殖サイクル」により、サイトカイン・ストームが誘発され、これが血管内皮の浮腫を伴う循環不全に繋がり重症化を引き起こすことを明確にした(文献4,5)。

さらに申請者らは、特定の患児がインフルエンザで重症化しやすい主要因として、ウイルス感染後期で起こる「全身性のエネルギー(ATP: Adenosine triphosphate)産生障害」を見出した。重症化あるいは死亡した患児の多く(半数以上)は、CPT2(Carnitine palmitoyltransferase 2)遺伝子の熱不安定多型の保因者であった。CPT2はミトコンドリア内膜に局在し、脂肪酸のβ酸化において重要な働きを担う酵素である。すなわち、重症化患児ではインフルエンザの高熱時にCPT2が不活化し、ミトコンドリアの脂肪酸を代謝できず、細胞内のATP産生が低下し、重症化していた(文献6,7)。実際に申請者らは、組織や細胞内のATPの定量法を開発し(文献8,9)、インフルエンザ等の重篤な感染症で集中治療室(ICU)に入室した患児の末梢血中のATPを定量した結果、ICU入室患児では健常者と比較してATPが低値であった(文献10,11)。糖代謝改善薬の投与による

ATP枯渇を防止する治療は、病態の改善効果が若干は認められるのみであった(文献12)。従って、ウイルス増殖を抑制し、サイトカイン・ストームを抑制する宿主側因子を標的とした根本療法の開発が世界中で望まれている。

2. 研究の目的

最近、申請者らはプリオン蛋白質遺伝子欠損マウス(*Prnp*^{0/0}マウス)では野生型(WT)マウスと比較し、インフルエンザウイルスに対し死亡率がきわめて高いことを見出した。このプリオン蛋白質(PrP)は神経細胞に多く存在することが報告されているが、*Prnp*^{0/0}マウスは特に表現型は認められず、その生体機能は不明である。免疫系においてPrPは胸腺の未成熟T細胞と骨髄の造血系前駆細胞で特に発現しており、PrPはリンパ球の活性化や分化に関与すると推定されているが、その機序については明らかにされていない。

以上の背景から、PrPはインフルエンザの重症化を左右する新規リスク因子であり、ウイルス罹患時に「神経の保護(インフルエンザ脳症発症の抑制)」や「免疫担当細胞の活性化」等に関与している可能性が高いと申請者は考えている。従って、本研究では*Prnp*^{0/0}マウス及びPrP遺伝子過剰発現マウス(Tgマウス)を用い、インフルエンザウイルス感染試験を実施することで、PrPのウイルス感染防御機序の詳細について明確にすることを主目的とする。

3. 研究の方法

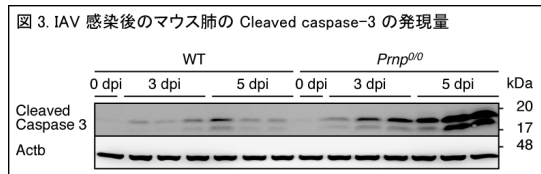
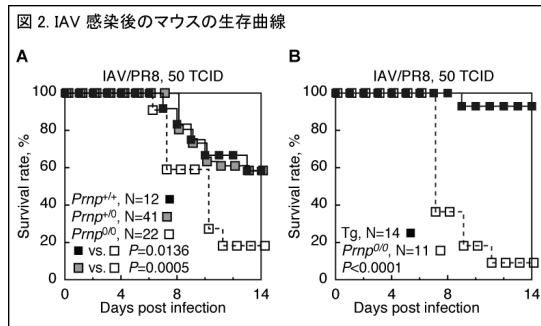
本研究では季節型インフルエンザ(*Influenza virus A/Puerto Rico/8/34*株: IAV)を用い、ヒトのインフルエンザの重症化に近い評価系でマウスを用いて検証をする。具体的には、ウイルス感染後のWTマウス、*Prnp*^{0/0}マウス、Tgマウス間の各組織の炎症度、サイトカインの産生量、組織のATP量等を比較し、PrPの生体機能を明確にする。さらに、肺のPrPを分子標的としたインフルエンザ重症化の予防・治療法を確立する。

4. 研究成果

(1)肺のPrPはIAV増殖を抑制する

IAV増殖を抑制する宿主側因子として、プリオン蛋白質(PrP)を申請者らは同定した。*Prnp*^{0/0}マウスはWTマウスと比較すると、ウイルスに高感受性であり、高い致死率を呈した(図2A)。PR8株以外のウイルス株(IAV/Aichi株、IAV/WSN株)でもウイルス感染試験を実施したが、いずれの株でも*Prnp*^{0/0}マウスはウイルスに高感受性を示した。逆に、*Prnp*^{0/0}マウスにマウス由来PrP

遺伝子を遺伝子導入して作出した PrP 過剰発現(Tg)マウスでは、死亡率が大幅に低下した(図 2B)。以上の結果から、肺で発現する PrP はウイルス増殖を抑制する宿主側因子である可能性が高いことが示唆された。

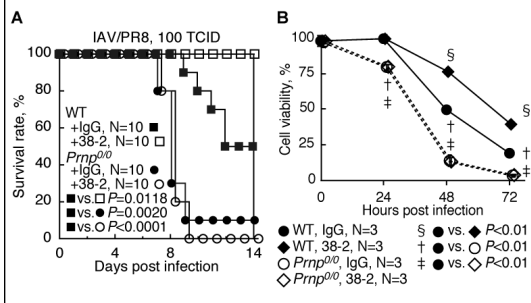


そこで肺で発現する PrP の生体機能を明らかにする目的で、IAV 感染させた WT マウス及び *Prnp*^{0/0} マウスの肺を摘出した後に、肺の 1)組織(HE)染色、2)湿重量の測定、3)炎症性サイトカインの定量、4)ウエスタンブロット、5)ウイルス力価の測定を試みた。
Prnp^{0/0} マウス肺は WT マウス肺と比較して、広範な炎症性細胞の浸潤が認められ、浮腫も著明に進行していた。また、*Prnp*^{0/0} マウス肺では WT マウス肺と比べて、炎症性サイトカイン(IL-6、TNF- α 、IFN- γ)の産生が有意に亢進しており、肺ホモジネート及び BALF(気管支肺胞洗浄液)のウイルス力価が 2 倍程度であった。さらに、アポトーシス(細胞死)の指標である Cleaved caspase-3 の発現量を調べたところ、WT マウス肺と比べて *Prnp*^{0/0} マウス肺ではアポトーシスが進行していることがウエスタンブロットの結果から明らかになった(図 3)。他にも、ウエスタンブロットの結果から、肺の TJ (Tight Junction)を構成する Claudin-3 の著明な減少が *Prnp*^{0/0} マウスで認められており、TJ の不安定化が *Prnp*^{0/0} マウスにおける重症化の主要因であるものと推定している。以上の結果から、肺で発現する PrP は IAV 増殖を抑制するものと考えられるが、その詳細な機序については不明であり、現在解析中である。

(2)抗 PrP 抗体は IAV の重症化を予防する

マウスへの抗 PrP 抗体(38-2)の前(腹腔内)投与で、WT マウスでは IAV の重症化を予防できること、すなわち、肺で起こるアポトーシスを著明に抑制する効果があることを見出した(図 4A)。この予防効果は、

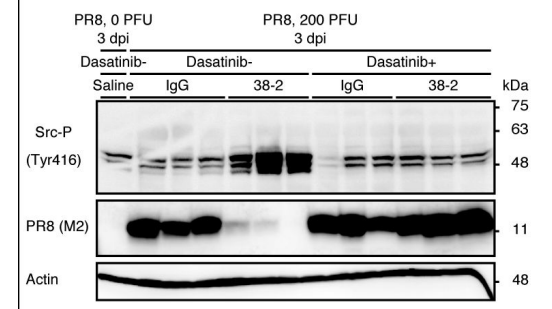
図 4. マウス及びマウス肺初代培養細胞を用いた抗 PrP 抗体の治療効果



1)Control IgG を前投与した際には認められないこと、2)*Prnp*^{0/0} マウスでは抗 PrP 抗体の予防効果は認められないことから、抗 PrP 抗体は肺の PrP と結合することにより予防効果を発揮するものと考えられる。さらに、マウス肺初代培養細胞を調製することに成功し、この細胞を用いた評価試験を実施した結果、抗 PrP 抗体の前処理による IAV 増殖の抑制効果が再確認された(図 4B)。

マウスを用いた IAV 感染試験及び上述したマウス肺初代培養細胞を用いた IAV 感染試験において、抗 PrP 抗体と共に Src family 構成蛋白質の阻害剤(Dasatinib)を前投与(前処理)した際、抗 PrP 抗体の予防効果が消失することが最近、明らかとなった。そこで Src family 構成蛋白質のリン酸化を特異的に検出する抗体を用いて、マウス肺のウエスタンブロットを試みた結果、抗 PrP 抗体を前投与したマウスでは、ウイルス感染後の初期(ウイルス感染 3 日後)に Src family 構成蛋白質のリン酸化が亢進していることが判明した。従って、抗 PrP 抗体の作動する機序として Src family 構成蛋白質がリン酸化され、活性型になることが重要であると推定され、その詳細な機序について、現在解析中である(図 5)。

図 5. IAV 感染後のマウス肺の Src-P とウイルス蛋白質の発現量



<引用文献>

- 木戸 博, 千田 淳司, Yao Min *et al.*
Mechanisms of multi-organ failure in severe influenza. *Nippon Rinsho*; 68 (8): 1565-1573, 2010.
- Pan HY, Yamada H, Chida J *et al.*
Up-regulation of ectopic trypsin in myocardium by influenza A virus infection triggers acute myocarditis. *Cardiovasc Res*; 89 (3): 595-603, 2011.
- Wang S, Quang Le T, Chida J *et al.*
Mechanisms of matrix metalloprotease-9 upregulation and tissue destruction in various organ in IAV infection. *J Med Invest*; 57

(1-2): 26-34, 2010.
Wang S, Quang LT, Kurihara N *et al.*
Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J Infect Dis*; 202 (7): 991-1001, 2010.
木戸 博, 千田 淳司, Yao Min *et al.*
Mechanisms of multi-organ failure in severe influenza. *Nippon Rinsho*; 68 (8): 1565-1573, 2010.
Kubota M, Chida J, Hoshino H *et al.*
Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children. *Brain Dev*; 34 (1): 20-27, 2012.
Yao D, Mizuguchi H, Yamaguchi M *et al.*
Thermal instability of compound variants of carnitine palmitoyltransferase II and impaired mitochondrial fuel utilization in influenza-associated encephalopathy. *Hum Mutat*; 29 (5): 718-727, 2008.
Chida J, Kido H.
Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Methods in molecular biology*; 1982: 21-32. 2014.
Chida J, Yamane K, Takei T *et al.*
An efficient methods for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Anal Chim Acta*; 727: 8-12, 2012.
Chida J, Nishimura M, Imanaka H *et al.*
Blood lactate/ATP score (A-LES) as a real-time diagnostic/prognostic biomarker of patients in critical care. *PLoS One*; PMID: 23577122. 2013.
Kubota M, Chida J, Hoshino H *et al.*
Thermolabile CPT II variants and low blood ATP levels are closely related to severity of acute encephalopathy in Japanese children. *Brain Dev*; 34 (1): 20-27, 2012.
Yamane K, Indalao IL, Chida J *et al.*
Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for metabolic disorder and multiorgan failure in severe influenza. *PLoS One*; PMID: 24865588. 2014.

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 4 件)

Uchiyama K, Miyata H, Yano M, Yamaguchi Y, Imamura M, Muramatsu N, Das NR, Chida J, Hara H, Sakaguchi S.
Mouse-hamster chimeric prion protein (PrP) devoid of N-terminal residues 23-88 restores

susceptibility to 22L prions, but not to RML in PrP-knockout mice.

PLoS One; (PMID: 25330286). 査読有.
2014.

Yamane K, Indalao IL, Chida J, Yamamoto Y, Hanawa M, Kido H.

Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for metabolic disorder and multiorgan failure in severe influenza.

PLoS One; (PMID: 24865588). 査読有.
2014.

Chida J, Nishimura K, Imanaka H, Ono R, Onodera M, Nakataki E, Shichijo K, Yamane K, Kido H.

Blood lactate/ATP score (A-LES) as a real-time diagnostic/prognostic biomarker of patients in critical care.

PLoS One; (PMID: 23577122). 査読有.
2014.

Chida J, Kido H.

Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells.

Methods in molecular biology; 1982: 21-32. 査読有. 2014.

[学会発表](計 1 件)

原 英之, 千田 淳司, 坂口 末廣
蛋白質凝集体「プリオン」による抗インフルエンザウイルス活性の発見
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学学会大会合同大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)、12・3・2015.

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: 抗プリオン蛋白質抗体およびその用途
発明者: 坂口 末廣, 千田 淳司
権利者: 国立大学法人徳島大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2016-61106
出願年月日: 平成 28 年 4 月 5 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

研究代表者

千田 淳司 (CHIDA, Junji)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号: 20437651