

200935023A

厚生労働科学研究費補助金

—こころの健康科学研究事業—

プリオン病における免疫反応の解明とそれに  
基づく診断・治療法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 片峰 茂

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

—こころの健康科学研究事業—

プリオン病における免疫反応の解明とそれに  
基づく診断・治療法の開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 片峰 茂

平成 22 (2010) 年 3 月

一 目 次

I. 総括研究報告

- プリオン病における免疫反応の解明とそれに基づく診断・治療法の開発  
(長崎大学学長・前長崎大学大学院教授) 片峰 茂  
----- 1

II. 分担研究報告

1. プリオン感染における I 型インターフェロンを介した  
干渉現象の機構解明  
(長崎大学・院・医歯薬総合・感染分子) 西田教行  
----- 9

2. 抗プリオン抗体発現ミクログリアを接種した  
プリオン感染マウスの解析  
(徳島大学・疾患酵素学研究センター・神経変性疾患) 坂口末廣  
----- 14

3. 組み換え型抗体作製とプリオン特異性判定に関する研究  
(鹿児島大学・工学部・生命工学科) 杉村和久  
----- 18

4.  $\beta$  型プリオン蛋白特異的ヒト単鎖抗体の調製法の検討  
(鹿児島大学・工学部・生命工学科) 橋口周平  
----- 21

5. プリオン病患者における髄液中での免疫反応  
(長崎大学・医歯附属病院・へき地病院再生機構) 調 漸  
----- 23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 29

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

V. 班会議プログラム ----- 119

# 總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

## プリオン病における免疫反応の解明とそれに基づく診断・治療法の開発

総括責任者：片峰 茂 長崎大学学長（前長崎大学大学院教授）

### 要旨

プリオン病の感染予防、発病遅延、治療は未だに有効な手法が確立されていない。プリオンは宿主のプリオン蛋白質（PrP）の立体構造異性体から主に構成されると考えられ、そのため宿主の免疫反応を惹起しないとされてきた。我々はプリオンの異なる株の重感染において病原体間の“干渉現象”が惹起されることを証明し、また異種PrP接種によって誘導される抗PrP抗体がプリオン病発症遅延効果を示すことを明らかにし、プリオンに対するワクチンや抗体療法の可能性を見出した。本研究では自然免疫を含む免疫反応の意義を解明し、免疫応答を利用したプリオン病診断、予防・治療法の確立を目指した。昨年度までにプリオン感染細胞モデルを用いて、プリオン持続感染の成立に伴って自然免疫系因子のうち、TLR3, RIG-I, IRF3といったこれまではRNAウイルス感染に反応するとされてきた宿主因子の発現抑制が起こることを明らかにした。また、逆にこれらの因子の活性化は異常PrPの産生を抑制することを見出した。IRF3遺伝子欠損マウスではプリオンの潜伏期間が短縮されることから、生体内においてもIRF3活性化を伴う自然免疫系経路がプリオン増殖抑制に関与していることが示唆された。宿主自然免疫とくにウイルス由来のRNAを認識する機構（MyD88非依存性インターフェロン誘導経路）がプリオン感染に応答し抑制的に作用することは世界初の知見であり驚きに値する。またインターフェロンは従来抗プリオン作用がないとされてきたが、今回I型IFNは感染抑制に有効である可能性を見だし、その作用機序をさらに解明することであらたな治療戦略が見えてくると思われる。このほか、培養ミクログリアを用いた抗プリオン抗体（Sh3.9scFv）の脳内デリバリーシステムがプリオン病の発症遅延に有効であることを見出した。また、新規に異常PrP特異的ヒト型IgGの分離作製に成功した。プリオン病患者髄液を用いた免疫系因子の発現解析ではIL-8がプリオン病特異的に高値であることを見出し、神経変性疾患の鑑別に有用である可能性を見出した。

### A. 研究方法

自然免疫：プリオン感染マウスモデル、培養感染細胞における宿主自然免疫関連因子の発現様式を解析した。IRF3遺伝子欠損マウスを用いてプリオン感染にお

けるIRF3の役割を解析した。（長崎大学片峰、西田担当）

抗体療法とワクチン：ヒトPrPのβ-PrPファイバーに結合するscFv抗体フラージ及びFab抗体フラージを単離し、

抗プリオン効果を調べた。抗プリオン抗体 Sh3.9 発現レンチウイルスベクターをミクログリア細胞株 (Ra2) に遺伝子導入後、マウス脳内に移植し感染実験を行った。サイトカイン (IL-12 または TGF $\beta$ ) と PrP を同時に発現する DNA ワクチンを作製し、マウスでの抗体産生誘導能を調べた。(鹿児島大学 杉村、徳島大学 坂口、および長崎大学 西田、山中担当)

髄液中サイトカイン測定：クロイツフェルト・ヤコブ病患者の髄液検査については長崎大学附属病院倫理委員会の承認を経て、インフォームドコンセントを取り実施した。クロイツフェルト・ヤコブ病患者 (41 例)、アルツハイマー型認知症等 (53 例)、正常コントロール (18 例) の髄液を用いて、髄液内の INF- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10 について ELISA 法にて定量した。IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  については血清中の濃度も同時に測定した。(長崎大学 調担当)

## B. 研究結果及び考察

(1) プリオン感染は TLR3、RIG-I といったウイルス由来 dsRNA センサー分子に認識され、IRF3-IFN-I の活性化を引き起こした。しかし同時に IRF3 系の発現抑制がおこり、持続感染が成立することが示唆された。

(2) IRF3 欠損マウスを用いた感染実験では潜伏期間が4週間ほど短縮し、プリオン感染早期に IRF3 を介する自然免疫系が抑制的に関与していると思われた。このことから I 型 IFN 投与によるプリオン病治療の可能性が示唆される。

(3) ファージ抗体のうち異常型特異的抗体 PRB7 単鎖抗体が持続感染細胞の異常型プリオン蛋白を減少させた。

(4) Sh3.9scFv 産生 microglia 細胞を脳内移植後チャンドラー株感染を行ったところ生存期間の延長が見られた。

(5) IL-12 と PrP 発現 DNA ワクチンベクターを作製し PrP 欠損細胞に導入し、PrP の発現と IL-12 の発現を確認した。Balb/c マウスに投与し抗体産生 (IgG1) が有意に上昇していた。

(6) クロイツフェルト・ヤコブ病患者脊髄液におけるサイトカイン等の発現を他の類似疾患と比較検討した結果、IL8、IL10 が有意に上昇していることを見いだした。患者髄液中の IL-8 が特異的に高値であることは、アストログリアの活性化に伴う現象と思われるが、その分子機序と病態への影響については今後の検討課題である。

## C. 結論

プリオン感染、増殖における自然免疫系の抑制作用を明らかにした。宿主自然免疫とくにウイルス由来の RNA を認識する機構がプリオン感染にも応答していることは世界初の知見であり、驚きに値する。またインターフェロンは従来抗プリオン作用はないとされてきたが、今回 I 型 IFN は有効である可能性を見だし、その作用機序をさらに解明することであらたな治療戦略が見えてくると思われる。マイクログリアをベクターとして用いる抗体遺伝子導入法の治療効果を証明し臨床応用の可能性を見いだした。抗プリオン活性を持つ異常型 PrP 特異的ヒト型抗体を得た。マイクロ

グリアを用いた PrP 抗体デリバリーの発症予防可能性が見出された。IL-12-PrP-DNA ワクチンは抗体産生誘導をし、予防効果が期待された。患者髄液中の IL-8 は鑑別診断の補助マーカーとして有意義であると考えられる。

D. 健康危険情報  
特になし

E. 研究発表

国内

口頭発表 25件  
原著論文による発表 10件  
それ以外（レビュー等）の発表 2件

論文発表

1: Fujihara A, Atarashi R, Fuse T, Ubagai K, Nakagaki T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Katamine S, Nishida N. Hyperefficient PrP<sup>Sc</sup> amplification of mouse-adapted BSE and scrapie strain by protein misfolding cyclic amplification technique. FEBS J. 2009 May;276(10):2841-8.

2: Shigematsu K, Nishida N, Sakai H, Igawa T, Toriyama K, Nakatani A, Takahara O, Kawai K. Synaptophysin immunoreactivity in adrenocortical adenomas: a correlation between synaptophysin and CYP17A1 expression. Eur J Endocrinol. 2009 Dec;161(6):939-45.

3: Shigematsu K, Nishida N, Sakai H, Igawa T, Suzuki S, Kawai K, Takahara O. Primary aldosteronism with aldosterone-producing adenoma consisting of pure zona glomerulosa-type cells in a pregnant woman. Endocr Pathol. 2009 Spring;20(1):66-72.

4: Sakaguchi S, Ishibashi D, Matsuda H. Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases. Expert Opin Ther Pat. 2009 Jul;19(7):907-17.

5: Sakaguchi S: Prospects for Preventative Vaccines Against Prion Diseases. Protein and Peptide Letters 16(3), 260-70, 2009.

6: 坂口末廣: プリオン病と治療戦略の最近の動向. BRAIN and NERVE 第61巻 第8号 929-938, 2009

7: 坂口末廣: プリオン病予防ワクチンの開発の試み. 「バイオ医薬の開発技術とシーズ」. 山本重夫監修. pp373-384. シーエムシー出版. 2009

8: Satoh K, Kawakami A, Shirabe S, Tamai M, Sato A, Tsujihata M, Nagasato K, Eguchi K. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP antibody) is present in the sera of patients with dementia of Alzheimer's type in Asian.

Acta neurologica Scandinavica. 2009.  
[published online]

9: Satoh K, Tobiume M, Mutsukura M, Nishida N, Shiga Y, Eguchi K, Shirabe S and Sata T. Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. Laboratory Investigation [2010 in press]

10: Ida H, Aramaki T, Nakamura H, Fujikawa K, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Satoh K, Origuchi T, Kawakami A, Furuichi I, Kawabe Y, Eguchi K Different expression levels of TNF receptors on the rheumatoid synovial macrophages derived from surgery and a synovectomy as detected by a new flow cytometric analysis. Cytotechnology. 2009;60:161-164

11: Mutsukura K, Satoh K, Shirabe S, Tomita I, Fukutome T, Morikawa M, Iseki M, Sasaki K, Shiaga Y, Kitamoto T, Eguchi K. Familial Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I mutation: comparative analysis with pathological findings and diffusion-weighted images. Dementia and geriatric cognitive disorders. 2009;28:550-557

12: Nakamura H, Okada A, Kawakami A, Yamasaki S, Ida H, Masuda T, Fukuda T, Satoh K, Yoshimura T, Nakashima M, Hayashi T, Eguchi K.. Rheumatoid vasculitis of crural muscles confirmed by muscle biopsy in the absence of inflammatory myopathy: histologic and MRI study. Rheumatology international. 2009 [published online]

学会発表

1) 西田教行「プリオン感染における株多様性の存在と株間干渉現象の意義」  
第 47 回日本生物物理学シンポジウム  
平成 21 年 10 月 30 日 徳島

2) 石橋大輔, 布施隆行, 山口尚宏, 中垣岳大, 佐野和憲, 松原岳大, 新 竜一郎, 西田教行「プリオン感染における TLR3-IRF3 signaling pathway の役割」  
文部科学省 人獣共通感染症研究クラスター支援事業 2009 年プリオン研究会  
宮城県刈田群蔵王町 平成 21 年 8 月 29-30 日

3) 新 竜一郎, 佐藤克也, 佐野和憲, 布施隆行, 山中仁木, 山口尚宏, 石橋大輔, 松原岳大, 中垣岳大, 山田正仁, 水澤英洋, 北本哲之, 調 漸, 片峰茂, 西田教行「Real-time QUIC(QUaking-Induced Conversion)によるクロイツフェルトヤコブ病患者由来髄液中の PrP<sup>Sc</sup> の検出」  
2009 年プリオン研究会 ラフォーレ蔵王・宮城県刈田郡 平成 21 年 8 月 30 日



- 4) 佐野和憲, 新 竜一郎, 石橋大輔, 山口尚宏, 布施隆行, 西田教行「リコンビナントプリオンタンパクのアミロイド線維形成反応と構造解析」 文部科学省人獣共通感染症研究クラスター支援事業 プリオンシンポジウム 平成 21 年 8 月 29-30 日 宮城県刈田群蔵王町
- 5) 藤原愛子, 新 竜一郎, 布施隆行, 祖母井香織, 中垣岳大, 山口尚宏, 石橋大輔, 片峰 茂, 西田教行「PMCA 法によるマウスプリオン株の高効率の増幅」 第 62 回日本ウイルス学会九州支部総会 平成 21 年 9 月 4-5 日 佐賀大学医学部
- 6) 中垣岳大, 佐藤克也, 鎌足雄司, 新竜一郎, 石橋大輔, 山口尚宏, 西田教行「プリオン病におけるタクロリムスの治療効果」 第 62 回日本ウイルス学会九州支部総会 平成 21 年 9 月 4-5 日 佐賀大学医学部
- 7) 佐野和憲, 新 竜一郎, 石橋大輔, 山口尚宏, 布施隆行, 西田教行「リコンビナントプリオンタンパクのアミロイド線維形成反応と構造解析」 第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月 22 日 神戸 神戸ポートアイランド
- 8) 中垣岳大, 佐藤克也, 鎌足雄司, 新竜一郎, 石橋大輔, 山口尚宏, 西田教行「プリオン病におけるタクロリムスの治療効果」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 平成 21 年 10 月 25-27 日 東京 (都市センターホテル)
- 9) 布施隆行, 西田教行「プリオン病における感染特異的分子の探索」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 平成 21 年 10 月 25-27 日 東京 (都市センターホテル)
- 10) 中垣岳大, 石橋大輔, 西田教行「タクロリムスはプリオン感染マウスの生存期間を延長させる」 第 39 回日本免疫学会総会 平成 21 年 12 月 2-4 日 大阪国際会議場
- 11) 布施隆行, 中垣岳大, 西田教行「プリオン株における細胞指向性と感染機構の解明」 第 34 回長崎感染症研究会 平成 22 年 3 月 6 日 長崎大学 医学部 ポンペ会館
- 12) 藤田浩司, 松田治男, 坂口末廣「抗プリオン scFv 抗体を発現する脳移行性ミクログリア細胞株の樹立/Establishment of a brain-migratory microglial cell line expressing therapeutic anti-prion scFv antibody.」 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 大阪 平成 21 年 12 月 2-4 日
- 13) 杉村和久, 橋口周平「プリオン特異的ヒト抗体の特異性に及ぼす IgG 定常領域の影響の検討」 第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月 兵庫
- 14) 第 106 回日本内科学会総会・講演会。平成 21 年 4 月 10-12 日, 岡 芳知, 東京。ポスター: 栢田智子, 本村政勝, 徳田昌紘, 立石洋平, 石飛進吾, 福田 卓,

佐藤克也, 辻野 彰, 吉村俊朗, 江口勝美「重症筋無力症の嚥下機能評価に関する検討」

15) 第 285 回日本内科学会九州地方会. 平成 21 年 5 月 30 日, 辻 貞俊, 北九州. 一般口演 : 六倉和生, 佐藤克也, 福田卓, 辻野 彰, 吉村俊朗, 中村龍文, 本村政勝, 今西大介, 波多智子, 江口勝美. 「進行性の認知機能障害で発症し, 骨髄生検にて診断しえた血管内悪性リンパ腫症(IVL)の 1 例」

16) 第 21 回日本神経免疫学会. 平成 21 年 3 月 12-13 日, 楠 進, 大阪. ワークショップ : 柘田智子, 本村政勝, 徳田昌紘, 福田 卓, 石飛進吾, 佐藤克也, 辻野 彰, 吉村俊朗, 江口勝美, 辻畑光宏「アセチルコリン受容体・ $\alpha 67-76$  抗体は重症筋無力症の重症度と相関する」

17) 第 34 回日本脳卒中学会総会. 平成 21 年 3 月 20-22 日, 小林祥泰, 島根. 一般口演 : 立石洋平, 辻野 彰, 福田卓, 佐藤克也, 中村龍文, 本村政勝, 吉村俊朗, 江口勝美, 北川直毅, 永田 泉. 「当院における Stroke Care Unit と地域医療連携が脳卒中診療に与える影響」

18) 第 34 回日本脳卒中学会総会. 平成 21 年 3 月 20-22 日, 小林祥泰, 島根. 一般口演 : ポスター : 辻野 彰, 立石洋平, 六倉和生, 徳田昌紘, 坂井無二子, 柘田智子, 福田 卓, 佐藤克也, 本村政

勝, 江口勝美「他の疾患に合併した急性期無症候性脳梗塞の症例検討」

19) 第 185 回日本神経学会九州地方会. 平成 21 年 3 月 28 日, 山田達夫, 福岡. 一般口演 : 徳田昌紘, 本村政勝, 柘田智子, 坂井無二子, 立石洋平, 福田 卓, 佐藤克也, 辻野 彰, 中村龍文, 江口勝美, 吉村俊朗, 福島直美「seminoma を合併した Isaacs 症候群の 1 例」

20) 第 50 回日本神経学会総会. 平成 21 年 5 月 20-22 日, 糸山泰人, 仙台. 一般口演 : 六倉和生, 佐藤克也, 江口勝美, 調 漸, 長郷国彦, 岸田日帯, 黒岩義之, 三條伸夫, 水澤英洋「クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)における血液脳関門(BBB)についての検討」

21) 第 50 回日本神経学会総会. 平成 21 年 5 月 20-22 日, 糸山泰人, 仙台. 一般口演 : 佐藤克也, 調 漸, 六倉和生, 江口勝美, 新竜一郎, 西田教行「CJD 患者における髄液中の異常プリオン蛋白の検出」

22) 第 50 回日本神経学会総会. 平成 21 年 5 月 20-22 日, 糸山泰人, 仙台. 一般口演 : ポスター : 辻野 彰, 吉浦孝一郎, 三嶋博之, 坂井無二子, 立石洋平, 吉村俊朗, 佐藤 聡, 辻畑光宏, 佐藤克也, 本村政勝, 江口勝美「孤発性若年性パーキンソン病におけるホモ接合マッピング」

23) 第 50 回日本神経学会総会.平成 21  
年 5 月 20-22 日, 糸山泰人, 仙台.  
一般口演 : 本村政勝, 石飛進吾, 枘田智  
子, 徳田昌紘, 福田 卓, 六倉和生,  
佐藤克也, 辻野 彰, 吉村俊朗, 江口勝  
美「アセチルコリン受容体  $\alpha$ 67-76 抗体  
と MG 嚥下障害に関する検討」

24) 第 27 回日本神経治療学会総会.平成  
21 年 6 月 11-12 日, 内野 誠, 熊本.  
一般口演 : 佐藤克也, 福田 卓, 六倉和  
生, 徳田昌紘, 立石洋平, 坂井(加用)無  
二子, 枘田智子, 辻野 彰, 吉村俊朗,  
中村龍文, 本村政勝, 江口勝美「当科に  
おける重症筋無力症(MG)・胸腺腫に合  
併した赤芽球癆(PRCA)の 5 症例」

25) 第 14 回日本神経感染症学会総会.平  
成 21 年 10 月 16-17 日, 中野今治.  
一般口演:佐藤克也, 調 漸, 六倉和生,  
江口勝美, 新竜一郎, 西田教行「CJD 患  
者における髄液中の異常プリオン蛋白  
の検出」

F. 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む。)

特になし

# 分担研究報告

## プリオン感染における I 型インターフェロンを介した干渉現象の機構解明

研究分担者：西田 教行 長崎大学医歯薬学総合研究科感染免疫学講座

研究協力者：石橋 大輔 長崎大学医歯薬学総合研究科感染免疫学講座

### 研究要旨

プリオン持続感染細胞における宿主自然免疫関連因子の解析を行い、TLR3, RIG-I, IRF3 の発現が感染細胞で有意に低下していること、細胞への感染後の異常 PrP の産生増加に伴い IRF3 発現量が減少し、プリオン持続感染は IRF3 経路の不活化を伴って成立することを見いだした。さらに、IRF3 欠損マウスを用いた感染実験にて、IRF3 欠損マウスではプリオンの潜伏期間の有意な短縮および末梢（脾臓）における異常 PrP の早期蓄積について報告した。これらのことから、MyD88 非依存性自然免疫系因子がプリオン感染初期にプリオン増殖に対し抑制的に作用していること、そして宿主応答の抑制がプリオン持続感染にともなって起こることを報告した。さらに本研究では、I 型インターフェロン (Type I IFNs) のシステムがプリオンの感染を抑制しうるかどうか、また、マウスにプリオン感染を行った際の IRF3 の発現についての検討を *in vitro* および *in vivo* の実験系を用いて行った。

### A. 研究目的

Type I IFN シグナルを介した干渉現象における自然免疫系の関与を解明し、インターフェロンなど自然免疫賦活物質の抗プリオン効果を検討しすることで、未だ治療・予防法のないプリオン病の臨床応用につなげる。

### B. 研究方法

1. プリオン感染後の自然免疫関連因子の経時的な発現を検討するために、N2a-58 細胞に 22L 株を感染させ、各継代時における自然免疫関連因子の発現について real-time PCR について検討を行った。また、マウスにおける BSE 株プリオン感

染後の MyD88 非依存的経路のシグナル分子の中心に位置する IRF3 の経時的な発現について検討した。コントロール群としては C57Bl/6J を用いた。

2. プリオン感染に対し感受性を持つ N2a-58 細胞（マウス神経芽細胞腫 Neuro 2a (N2a) 細胞にマウス PrP を恒常的に過剰発現させた細胞）にマウス IRF3 の遺伝子を導入後、Blasticidin にて薬剤選択を行い、IRF3 を恒常的に発現する細胞をクローニングした。その細胞に 22L 株の感染したマウスの脳乳剤を 0.2% で感染させ、継代を行い異常型 PrP の発現について検討を行った。

3. Type I IFNs の抗プリオン感染効果に

ついて検討するために、Type I IFNs を前処理した N2a-58 細胞に対するプリオン感染実験を行い、異常型 PrP の発現について検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、『遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律』ならびに『研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令』等の関連法令および大学内規定を遵守して実施した。

### C. 研究結果

MyD88 非依存的経路の自然免疫系シグナル分子 (IRF3、TLR3、RIG-I) の発現低下が持続感染細胞特異的に認められる事、それらを過剰発現させることで異常型 PrP (PrP-res) を減少させることができることをすでに報告した。前年度までに自然免疫とプリオン感染との関与は認められるが、感染の結果生じている事かどうかは明らかでなかった。本研究の細胞への感染実験により、プリオン感染後の自然免疫系シグナル分子の発現が経時的に減少していたこと (図 1)、マウスへの BSE 株のプリオン感染により、IRF3 の発現が経時的に減少していた (図 2) ことより、プリオン感染によって自然免疫の活性化が抑えられることを意味していると考えられる。

また、非感染細胞にあらかじめ IRF3 の恒常的発現を高めておくと、プリオンを感染した際、コントロールの細胞に比べ、少量の PrP-res が産生された。また、

そのプリオン感染抵抗性の効果は、IRF3 の発現量に相関していることが示唆された (図 3)。さらに、Type I IFNs の前処理は、PrP-res の産生に抵抗性を示すことを見いだした (図 4)。

すなわち、予想した通り、IRF3 を介する IFN 産生が、感染初期にはプリオンの感染、増殖をある程度抑制的に制御しているものと思われ、プリオン感染は宿主の自然免疫活性を抑制することで、感染が成立するのではと示唆された。

### D. 考察

本研究結果の IRF3 の恒常的発現、Type I IFNs は確かにプリオン感染に対し、抵抗性を示すがその効果は限定的である。すなわち、プリオン感染には IRF3 シグナルカスケードの以外の因子が関与している可能性があると考えられるため、今後、詳細なメカニズムについてを追求する必要がある。また、プリオンはどうやって自然免疫シグナル因子を抑制しているかどうかについても大きな疑問が残る。TLR3 および RIG-I は、dsRNA を認識するとされており、プリオン感染に特異的な dsRNA の存在するのかもしれない。このことについても今後検討していく必要がある。近年の報告により自然免疫系の抑制とオートファジー機能阻害が関連している可能性が考えられる。そこで、感染成立早期の宿主遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイ解析および質量分析装置を用いた iTRAQ の解析に着手し、特に自然免疫系関連因子とオートファジー系因子の発現変化を明らかにする。

## E. 結論

1. in vitro、in vivo のプリオン感染実験により、MyD88 非依存性自然免疫系因子はプリオン感染後に経時的に抑制される。
2. IRF3 は、プリオン感染に対し抵抗性を示し、その効果は、発現量に相関していた。
3. I 型 IFN のプリオン感染抑制効果は、限定的ではあるが、有意に作用していた。

## F. 研究発表

### 論文発表

1: Fujihara A, Atarashi R, Fuse T, Ubagai K, Nakagaki T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Katamine S, Nishida N. Hyperefficient PrP<sup>Sc</sup> amplification of mouse-adapted BSE and scrapie strain by protein misfolding cyclic amplification technique. FEBS J. 2009 May;276(10):2841-8.

2: Shigematsu K, Nishida N, Sakai H, Igawa T, Toriyama K, Nakatani A, Takahara O, Kawai K. Synaptophysin immunoreactivity in adrenocortical adenomas: a correlation between synaptophysin and CYP17A1 expression. Eur J Endocrinol. 2009 Dec;161(6):939-45.

3: Shigematsu K, Nishida N, Sakai H, Igawa T, Suzuki S, Kawai K, Takahara O. Primary aldosteronism with aldosterone-producing adenoma consisting of pure zona glomerulosa-type cells in a pregnant woman. Endocr Pathol. 2009 Spring;20(1):66-72.

4: Sakaguchi S, Ishibashi D, Matsuda H.

Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases. Expert Opin Ther Pat. 2009 Jul;19(7):907-17.

### 学会発表

1) 西田教行, プリオン感染における株多様性の存在と株間干渉現象の意義 第47回日本生物物理学シンポジウム 平成21年10月30日 徳島

2) 石橋大輔、布施隆行、山口尚宏、中垣岳大、佐野和憲、松原岳大、新竜一郎、西田教行「プリオン感染におけるTLR3-IRF3 signaling pathway の役割」文部科学省 人獣共通感染症研究クラスター支援事業2009年プリオン研究会 宮城県刈田群蔵王町 平成21年8月29-30日

3) 新竜一郎、佐藤克也、佐野和憲、布施隆行、山中仁木、山口尚宏、石橋大輔、松原岳大、中垣岳大、山田正仁、水澤英洋、北本哲之、調漸、片峰茂、西田教行「Real-time QUIC (QUaking-Induced Conversion)によるクロイツフェルトヤコブ病患者由来髄液中の PrP<sup>Sc</sup> の検出」2009年プリオン研究会 ラフォーレ蔵王・宮城県刈田郡 平成21年8月30日

4) 佐野和憲、新竜一郎、石橋大輔、山口尚宏、布施隆行、西田教行「リコンビナントプリオンタンパクのアミロイド線維形成反応と構造解析」文部科学省 人獣共通感染症研究クラスター支援事業プリオンシンポジウム 平成21年8月29-30日 宮城県刈田群蔵王町

5) 藤原愛子、新竜一郎、布施隆行、祖母井香織、中垣岳大、山口尚宏、石橋大輔、片峰茂、西田教行「PMCA 法によるマウスプリオン株の高効率の増幅」 第 62 回日本ウイルス学会九州支部総会 平成 21 年 9 月 4-5 日 佐賀大学医学部

6) 中垣岳大、佐藤克也、鎌足雄司、新竜一郎、石橋大輔、山口尚宏、西田教行「プリオン病におけるタクロリムスの治療効果」 第 62 回日本ウイルス学会九州支部総会 平成 21 年 9 月 4-5 日 佐賀大学医学部

7) 佐野和憲、新竜一郎、石橋大輔、山口尚宏、布施隆行、西田教行「リコンビナントプリオンタンパクのアミロイド線維形成反応と構造解析」 第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月 22 日 神戸神戸ポートアイランド

8) 中垣岳大、佐藤克也、鎌足雄司、新竜一郎、石橋大輔、山口尚宏、西田教行「プリオン病におけるタクロリムスの治療効果」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 平成 21 年 10 月 25-27 日 東京(都市センターホテル)

9) 布施 隆行、西田 教行 「プリオン病における感染特異的分子の探索」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 平成 21 年 10 月 25-27 日 東京(都市センターホテル)

10) 中垣岳大、石橋大輔、西田教行「タク

ロリムスはプリオン感染マウスの生存期間を延長させる」 第 39 回日本免疫学会総会 平成 21 年 12 月 2-4 日 大阪国際会議場

11) 布施 隆行、中垣 岳大、西田 教行 「プリオン株における細胞指向性と感染機構の解明」 第 34 回長崎感染症研究会 平成 22 年 3 月 6 日 長崎大学 医学部 ポンペ会館

G. 知的財産の出願・登録状況

特許取得 なし

実用新案登録 なし



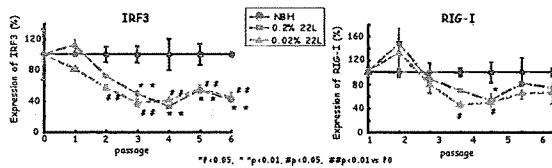
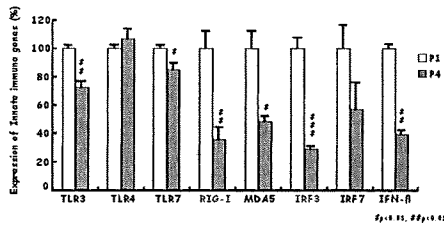


図 1. In vitro におけるプリオン感染後の自然免疫関連因子の発現

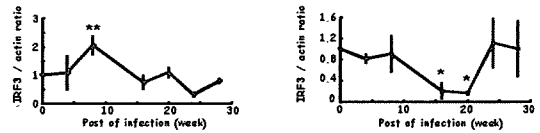
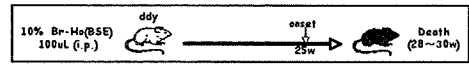


図 2. In vivo におけるプリオン感染後の IRF3 の発現

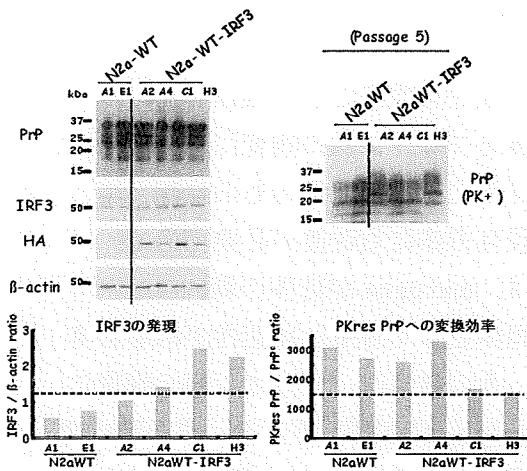


図 3. IRF3 恒常発現細胞におけるプリオン感染の抵抗性

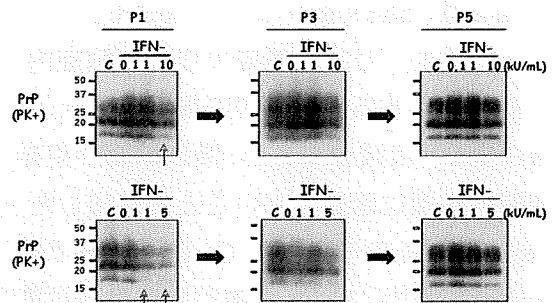


図 4. Type I IFNs 前処理によるプリオン感染に対する効果

## 抗プリオン抗体発現ミクログリアを接種したプリオン感染マウスの解析

分担研究者：坂口 末廣 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

研究協力者：藤田 浩司 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

### 研究要旨

Sh3.9 抗プリオン抗体は、プリオン感染細胞において抗プリオン活性を示す。従って、Sh3.9 はプリオン病治療に有用であると考えられる。しかし抗体は巨大分子であるために血液脳関門を通過できず、また脳室内に持続注入しても生命維持に重要な深部領域まで浸透できない可能性が高い。これまでに、我々は、より分子量の小さい Sh3.9 single chain Fv (Sh3.9scFv) を作製し、Sh3.9scFv が正常プリオン蛋白と結合すること、および抗プリオン活性を有することを報告した。また我々は、Sh3.9scFv を脳内にデリバリーするために、Sh3.9scFv を発現する microglia (Ra2) subclone を樹立した。今回、我々は、プリオン感染の様々な時期に同 subclone をマウスの脳内に接種し治療効果を解析したところ、病早期であれば生存期間を有意に延長させることを見出した。この結果は、microglia による Sh3.9scFv の脳内デリバリーシステムがプリオン病の発症遅延に有効であることを示した。

### A. 研究目的

我々は、Sh3.9 抗プリオン蛋白モノクロナル抗体をプリオン感染マウスの脳室内に持続投与すると、脳内の異常プリオン蛋白 (PrP<sup>Sc</sup>) は減少するが、潜伏期間や生存期間は有意に延長しないことを見出した (未発表)。その理由として、抗体は分子量が大きいため、Sh3.9 抗体が生命維持に重要な脳の深部領域まで効率よく浸透しなかったことが考えられた。そこでこれまでに、我々は、より分子量の小さい Sh3.9 抗体の single chain Fv に myc tag を付加した Sh3.9scFv-myc を培養 HEK293T 細胞にて作製し、Sh3.9scFv-myc が正常プリオン蛋白 (PrP<sup>C</sup>) と結合すること、及び抗プリ

オン活性を有することを報告した。

抗体をプリオン病の病変に効率よく到達させるには、抗体そのものに加えて、その投与方法にも改善が必要である。

我々は、microglia が抗体の脳内デリバリーの担体として有用な可能性があると考えた。その根拠は、プリオン病の病変には microglia が集積すること、また脳内で長期間生存する microglia 株 (Ra2 および 6-3) が既に樹立されていること、である。そこで我々は、Sh3.9scFv-myc を発現するミクログリア細胞株を樹立し、その抗プリオン活性についてプリオン感染マウスを用いて検討した。

## B. 研究方法

### 1. Sh3.9scFv-myc 導入ミクログリア細胞株 (scFv-myc/GFP-Ra2) における抗体発現の解析

前年度、レンチウイルスベクターを用いて、Sh3.9scFv-myc と GFP 遺伝子を Ra2 に導入し、両者を共発現する細胞株 scFv-myc/GFP-Ra2 を樹立した。またコントロールとして、GFP 遺伝子のみを導入した GFP-Ra2 も樹立した。RT-PCR によって、scFv-myc/GFP-Ra2 が Sh3.9scFv mRNA を発現することを確認した。また Western blot (WB) によって、Sh3.9scFv-myc の蛋白レベルでの発現を解析した。Microglia を 10-cm plate で confluent になるまで培養したのち細胞融解液を回収し、WB に供した。一次抗体に rabbit 抗 myc 抗体、二次抗体に抗 rabbit-IgG HRP を用いた。

### 2. 抗プリオン活性の解析

scFv/GFP-Ra2 または GFP-Ra2 を、C57BL6J マウスの脳内に Chandler 株または 22L 株プリオンを接種前、または接種後に脳内接種した。Chandler 株感染マウスにおいては、感染前 (感染 3 週前及び 1 週前)、感染中期 (感染 7 週後)、感染後期 (感染 13 週後) に scFv/GFP-Ra2 または GFP-Ra2 を接種した。22L 株感染マウスにおいては、感染中期、感染後期に scFv/GFP-Ra2 または GFP-Ra2 を接種した。10<sup>6</sup> 個/20 $\mu$ l の細胞をマウスの右大脳に接種した。各群 n=9-10 にて、プリオン接種から終末状態ないし死亡に至るまでの期間を解析した。

## (倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、『遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律』ならびに『研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令』等の関連法令および大学内規定を遵守して実施した。

## C. 研究結果

### 1. scFv-myc/GFP-Ra2 は Sh3.9scFv を発現する

scFv-myc/GFP-Ra2 における scFv-myc の蛋白発現を確認するために、一次抗体に Rabbit 抗 myc 抗体、二次抗体に抗 rabbit-IgG HRP を用いて、scFv-myc/GFP-Ra2 の細胞融解液の WB を行った。その結果、scFv-myc の発現を確認した (図 1、矢印)。

### 2. 早期の scFv-myc/GFP-Ra2 投与はプリオン感染マウスの生存期間を延長する

Chandler 株感染マウスにおいて、プリオン感染前に scFv-myc/GFP-Ra2 を脳内に接種すると、GFP-Ra2 接種に比して生存期間は有意に延長した (表 1)。一方、感染中期及び後期における scFv/GFP-Ra2 の接種では、生存期間の延長は認められなかった (表 1)。

22L 株感染マウスでは、感染中期に scFv-myc/GFP-Ra2 を接種すると、GFP-Ra2 接種に比して生存期間は有意に延長した (表 1)。しかし感染後期での scFv-myc/GFP-Ra2 接種では生存期間の延長は見られなかった (表 1)。

#### D. 考察

主要な結果： 1) scFv-myc/GFP-Ra2 は Sh3.9scFv-myc 抗体を発現する； 2) scFv-myc/GFP-Ra2 はプリオン感染マウスの生存期間を延長するが、その効果は接種時期（早期のほうがよい）やプリオン株によって異なる（22L 株では感染中期接種でも改善）。

病期により scFv-myc/GFP-Ra2 接種の効果が異なるのは、scFv-myc/GFP-Ra2 における Sh3.9scFv の発現量が十分でなかったために、感染が進行した中期及び後期では抗プリオン活性が認められなかったためと考えられた。

#### E. 結論

ミクログリア細胞株 Ra2 を用いて脳内にデリバリーした Sh3.9scFv は、Chandler および 22L 株感染プリオンに対して抗プリオン効果を発揮した。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1: Sakaguchi S, Ishibashi D, Matsuda H: Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 19(7): 907-917, 2009.

2: Sakaguchi S: Prospects for Preventative Vaccines Against Prion Diseases. *Protein and Peptide Letters* 16(3), 260-70, 2009.

3: 坂口末廣：プリオン病と治療戦略の最近の動向. *BRAIN and NERVE* 第 61 巻 第 8 号 929-938, 2009

4: 坂口末廣：プリオン病予防ワクチンの開発の試み. 「バイオ医薬の開発技術とシーズ」. 山本重夫監修. pp373-384. シーエムシー出版. 2009

##### 学会発表

1) 藤田浩司, 松田治男, 坂口末廣. 抗プリオン scFv 抗体を発現する脳移行性ミクログリア細胞株の樹立/Establishment of a brain-migratory microglial cell line expressing therapeutic anti-prion scFv antibody. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2009.12.2-4

#### F. 知的財産の出願・登録状況

特許取得 なし

実用新案登録 なし