

研究題目 正常型プリオン蛋白質刺激による抗炎症性 M2 マクロファージの誘導を介した インフルエンザウイルス予防・治療薬の開発

研究組織

研究代表者：新竜一郎（宮崎大学医学部感染症学講座微生物学分野）

共同研究者：坂口末廣（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

M2 マクロファージを誘導可能な抗プリオン蛋白質抗体などの生物学的製剤は高額である。従って、正常型プリオン蛋白質 (PrP) をターゲットにした感染症の予防・治療法を広く臨床応用するためには、より安価な薬剤の開発が重要である。申請者らは、既に、リコンビナント PrP を作製し、アメリカの FDA が承認している 1,200 個の薬剤をスクリーニングすることにより、PrP に強力に結合する 31 個の化合物を同定済みである (Mol Neurobiol 2019)。本研究では、それら 31 個の化合物の中から抗炎症 M2 マクロファージを誘導する化合物を同定し、さらにその化合物の構造最適化を行い、その化合物がインフルエンザウイルス感染等の呼吸器感染症に対する予防・治療効果について検証することを目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

スクリーニング法としては、マクロファージの cell line (J774.1) を用いて抗 PrP 化合物を添加した際の Src ファミリーキナーゼ (SFK) の活性化の有無をウェスタンブロッティング等で行う。

スクリーニングを行う前に、J774 細胞に PrP を発現しているかどうか、確認し、発現レベルが低いあるいは認めない場合は遺伝子導入を行う。J774 細胞に PrP 発現を導入できなかった場合は、PrP の発現が確認されている N2a 細胞に抗 PrP 抗体(38-2mAb)刺激を加え、Src ファミリーキナーゼ (SFK) のリン酸化レベルを測定する。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

J774 細胞の PrP 発現を確認するため、Western blotting を行ったところ、発現を認めなかった(図 1 参照)。次に J774 細胞に PrP 遺伝子の transfection を行った。コントロールとしての N2a 細胞で DNA 量 2.5 μ g で強い PrP の発現増強が見られたのに対して、J774 細胞では DNA 量を 2.5, 5.0, 7.5 μ g で transfection したが、いずれも発現を認めなかった(図 1)。

次に J774 細胞の transfection 効率を調べるため、GFP 遺伝子を用いた。その結果、PrP 遺伝子と同様、N2a 細胞で GFP の蛍光シグナルを認めたのに対して、J774 細胞では検出できなかった(図 2)。さらに N2a 細胞 (ベクターのみ transfection とヒト PrP 過発現)に抗 PrP 抗体(38-2mAb)刺激を加えたが、SFK のリン酸化レベルの上昇は認めなかった(図 3)。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

上記実験結果より、J774 細胞は PrP を発現しておらず、また発現誘導困難であることが判明した。さらに PrP を発現している N2a 細胞に対して抗 PrP 抗体(38-2mAb)刺激を加えたが、SFK のリン酸化レベルの上昇は認めなかった。これらの結果から、PrP に結合する化合物を用いたスクリーニングを行う理論的妥当性が示されなかった。一方で、マウスレベルでスクリーニングを行うには時間やコスト面で割に合わないことから、スクリーニング法の再構築が必要であると考えられた。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

PrP を発現するマクロファージ cell line を作製し、抗 PrP 抗体刺激により SFK の活性化を起す系を確立することが必要と考えられる。

図1 J774 細胞の PrP の発現量と PrP 遺伝子 transfection の試み

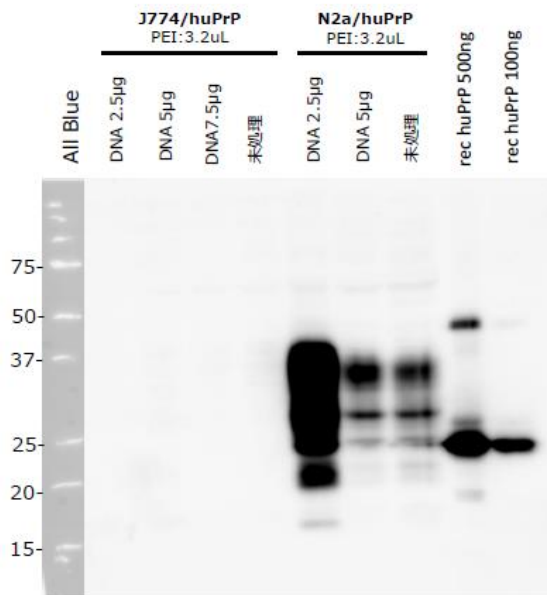


図2 J774 細胞の transfection 効率(N2a 細胞との比較)

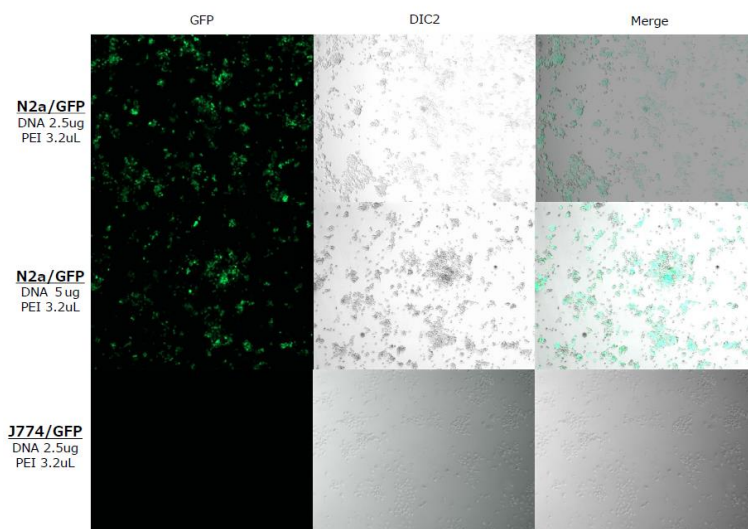


図3 N2a細胞における抗PrP抗体(38-2mAb)刺激によるSrc family リン酸化の検出

