

【材料と方法】

1. ハイブリドーマ

哺乳動物 PrP の N 末端領域を特異的に認識するニワトリ型モノクローナル抗体 HUC2-13 (IgG) を産生するハイブリドーマを用いた。ハイブリドーマはイスコフ変法ダルベッコ MEM にウシ胎児血清を 10% 加えた培地で、38.5C に設定した 5% CO₂ インキュベーターで培養した。

2. V_H と V_L の増幅

V_H と V_L の増幅は、HUC2-13 ハイブリドーマから作成した cDNA を元に KOD DNA ポリメラーゼを用い PCR で行った。なお、プライマーはニワトリ抗体遺伝子の特性である 5'、3' 側の配列がそれぞれ同一であることから V 領域が完全にカバーできる一対プライマーを設計し用いた。

3. scFv の調整

単離、精製した V_H と V_L は、(Gly4-Ser)₃ をコードする塩基配列を持ったリンカーと同一モル比で PCR によりアッセンブル・増幅させた。

4. ファージ発現 scFv の調整

単離、精製した scFv 遺伝子は、Eag I BssH II で制限酵素処理し、同様に処理した発現ベクター pPDS にライゲーションし、サプレッサー株の XL1-Blue に形質転換した。得られたコロニーは、アンピシリンを添加した SOC 培地で培養し、0.5 (600nm) 時に VCSM13 ヘルパーファージを感染させた。1 時間の感染の後、遠心によって培養上清をすて新たに終濃度 250 mM IPTG を含むアンピシリン・カナマイシン含有の SuperBrowth 培地で終夜培養し、遠心後の培養上清をファージ発現 scFv として用いた。

5. 可溶化 scFv 抗体の調整

可溶化抗体は、ファージ発現 scFv をノンサプレッサー株 SOLR に 1 時間感染させ、アンピシリン含有 SuperBrowth 培地で終夜培養し、その培養上清および菌体破壊によって得られたものを可溶化抗体として用いた。

6. ELISA

ファージ発現抗体 および可溶化抗体 の反応性および選抜は、ELISA 法を用いた。ヒト PrP ペプチド H25 をコートしたプレートにファージ発現抗体および可溶化抗体を加えて反応後、パーオキシダーゼ標識抗 M13 抗体あるいはアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG (H+L) 抗体を用いて検出した。

7. ウエスタンブロットィング

正常マウスおよびヒツジの脳から膜フラクションを、また CJD 患者から PrP^{sc} を、それぞれ常法に従って調整した。

【結果と考察】

哺乳動物 PrP の N 末を認識するニワトリ型モノクローナル抗体 HUC2-13 は、ウエスタンブロットならびに免疫組織化学染色において種々の PrP と特異的に反応し、非特異反応の極めて低い有用な抗体であった。最も一般的に活用されているマウスモノクローナル抗体 3F4 と HUC2-13 を CJD 患者脳材料を用いてウエスタンブロット法で比較したところ、HUC2-13 は 3F4 と異なりプロテナーゼ K (PK) 処理試料とは反応しなかったものの PK 未処理試料に対する反応性は 3F4 より優れていた (図 1)。

HUC2-13 抗体の欠点のひとつはハイブリドーマの培養上清を抗体として用いるところにある。これは、初期にニワトリ融合用細胞株が雑系のニワトリ B 細胞から樹立されたため (6)、ハイブリドーマ移植による腹水抗体の作成が期待出来ない。また、ニワトリハイブリドーマによる抗体産生量をマウスハイブリドーマと比較すると約 1/10 であることを経験している。従って、プリオン研究に有用であることが確認された HUC2-13 抗体を広範に活用できるようにするために、本研究では HUC2-13 ハイブリドーマから抗体 V 遺伝子 (V_H と V_L) を増幅させ、リンカーを間に接続した 1 本

鎖 scFv (VH-Linker-VL) を構築し、これを線状ファージ M13 のコートタンパク CP3 上に発現させたファージ抗体を作成した。同時に本抗体の実用性を考慮して可溶性 scFv も作成した。マウスを始めとする哺乳動物抗体については、すでに数多くのファージ抗体が作られているが、これまでに報告されたファージ発現ニワトリ抗体 (7,8) は 2 例のみである。既報のファージ発現ニワトリ抗体と異なる優位性は、ニワトリハイブリドーマからファージ抗体を作成した点で、細胞融合後にアフィニティの高い抗体を産生するハイブリドーマを選別していることから、一般にファージ抗体選別で行われるパニング操作なしに目的とするファージ抗体を取得できた。

作出したファージ抗体 (HUC2p3 と HUC2p5) および可溶性抗体 (HUC2s3 と HUC2s5) の有用性を確かめるために、H25 ペプチドを用いた ELISA を行った結果、ファージ抗体 HUC2p3 とその可溶性抗体 HUC2s3 を比較すると可溶性抗体は約 2 倍近く OD 値が高く、ファージ抗体 HUC2p5 とその可溶性抗体 HUC2s5 はほぼ同様の値であった (Fig. 2)。なお、対照として用いた 3c8 抗体はほとんど H25 ペプチドと反応しなかった。次に、正常マウスとヒツジの脳から PrPc を調整し、ファージ抗体 HUC2p3 とその可溶性抗体 HUC2s3 の特異性をウエスタンブロット解析し、いずれの抗体を用いても陽性所見を得ることができた。

今回用いたりコンビナント抗体作成用のベクターは当初マウス用に作成されたものであり、そのため M13 ファージの cp3 膜蛋白上にマウスの L 鎖の定常域 C カッパー鎖が発現するように構築されている。そのため、ニワトリ抗体として広く本法を活用するために、新たにニワトリ L 鎖の定常域 C ラムダ鎖の発現するベクターを作成する必要がある。私達は、この目的を達するために、すでにその構築にほぼ成功している。

【文 献】

- 1) Groschup, M. H., Harmeyer, S. and Pfaff, E.: Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *J. Immunol. Methods* 207: 89-101, 1997
- 2) Matsushita, K., Horiuchi, H., Furusawa, S., Horiuchi, M., Shinagawa, M. and Matsuda, H.: Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 777-779, 1998
- 3) Krasemann, S., Groschup, M., Harmeyer, S., Hunsmann, G. and Bodemer, W.: Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP0/0-mice. *Mol. Med.* 2: 725-734, 1996
- 4) Williamson, R. A., Peretz, D., Smorodinsky, N., Bastidas, R., Serban, H., Mehlhorn, I., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. and Butron, D. R.: Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7279-7282, 1996
- 5) Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K. and Oesch, B.: Prion (PrPsc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature (Lond.)* 390: 74-77, 1997
- 6) Nishinaka, S., Matsuda, H. and Murata, M.: Establishment of a chicken x chicken hybridoma secreting antibody. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89: 416-419, 1989
- 7) Davies, E. L., Smith, J. S., Birkett, C. R., Manser, J. M., Anderson-Dear, D. V. and Young, J. R.: Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. *J. Immunol. Methods* 186: 125-135, 1995
- 8) Yamanaka, H. I., Inoue, T. and Ikeda-Tanaka, O.: Chicken monoclonal antibody isolated by a phage display system. *J. Immunol.*, 157: 1156-1162, 1996

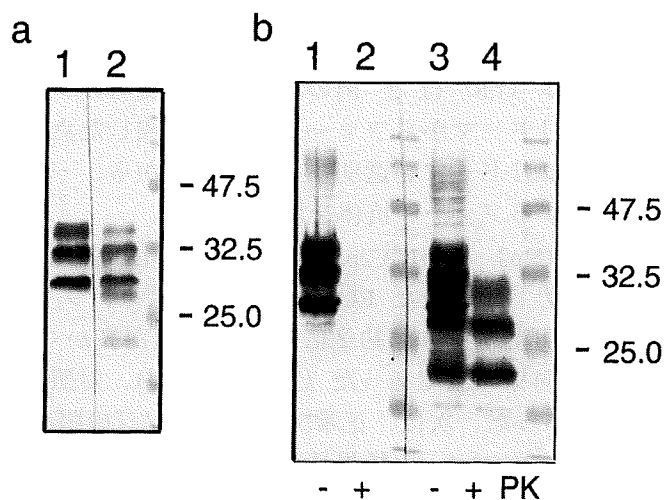


Fig. 1. Western blot analysis. (a) Five ml of the 10% homogenate of the brain tissue from a patient with CJD were applied on the 15% SDS-PAGE. Lane 1 was stained with HUC2-13. Lane 2 was stained with 3F4 antibody. (b) Purified human PrPsc fraction without PK digestion (lanes 1 and 3) and with PK digestion (lanes 2 and 4) were applied on the 15% SDS-PAGE. Lanes 1 and 2 were stained with HUC-2-13. Lanes 3 and 4 were stained with 3F4 antibody.

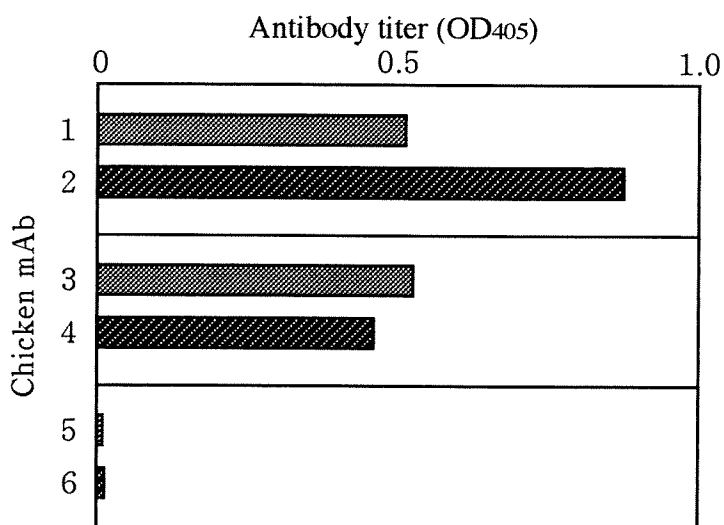


Fig. 2. Specificity of recombinant chicken mAbs (1, HUC2 p3; 2, HUC2s3; 3, HUC2p5; 4, HUC2s5) to H25 peptide. Control mAbs (6, 3c8p; 7, 3c8s) to mouse serum albumon were also used.

▨ : phage-type Ab ▩ : soluble-type Ab

実験動物におけるヒト遺伝子発現系の開発

班 員：中村 健司（東大・医科研・ヒト疾患セ・高次機能）
研究協力者：北本 哲之（東北大・医・病態神経）
 中尾 和貴（東大・医科研・ヒト疾患セ・高次機能）
 勝木 元也（東大・医科研・ヒト疾患セ・高次機能）

Human Prion Gene Expression in Humanized Mice

Kenji NAKAMURA¹⁾, Tetsuyuki KITAMOTO²⁾, Kazuki NAKAO¹⁾, Motoya KATSUKI¹⁾

1) Division of DNA Biology and Embryo Engineering, Center for Experimental Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

2) Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

ABSTRACT

To elucidate the infectious agents which attack the human brain with an illness, appropriate experimental animals are necessary as models for human infectious diseases. However, there are species barriers between human and animals. Many infectious agents, such as viruses, prions etc., that cause the serious human brain disorder, can not infect the animals other than human brain. To overcome these species barriers, we have performed the manipulation of the receptor genes. Two steps of gene targeting were used to replace the mouse prion gene with the human prion gene in mouse embryonic stem (ES) cells. Then, the humanized mouse which carries the human prion gene is generated through germ-line chimera mice. The infectious agents for the human, human prions, are analyzed by using this mouse. The coding region of the exon 3 in mouse prion gene was replaced with the human prion gene (pW) or the chimeric gene of human and mouse (pCh-W).

We have obtained the heterozygous mice for these two humanized mutants. Furthermore we tried to obtain homozygous mutants after intercrosses, we have obtained homozygotes. A Western blot analysis with anti-human prion specific monoclonal antibody showed human prion proteins in the extracts from humanized mice. It seems that the humanized prion gene might be compensate to the mouse development and growth.

[はじめに]

ヒトに感染し、脳機能に異常をもたらす外来因子の研究を行なうには、動物実験が必要である。しかし、外来因子のヒトに対する作用を解析する場合、種による特異性が存在し、感染が成立しないことが多い。本研究では、ヒトとマウスで反応に種差が存在するプリオン遺伝子を、マウス個体の遺伝子操作を通してマウス型からヒト型へと変換し、プリオンの作用をこれらのマウスを用いて解析することを目的とする。ヒト型への変換には、ES細胞を用いた2段階のジーンターゲティング（標的遺伝子置換）法を実施する。この方法により、種の壁を越えた実験動物の作成が可能であり、ヒトに対する外来因子の反応をマウスを用いて解析することが可能である。

今年度までの成果として、2種類の正常ヒト型プリオン遺伝子置換マウスの作成を成功させた。これは、CRE-LoxPシステムを用いたknock-in型のターゲティングベクターを構築し、マウスES細胞において、マウスプリオン遺伝子をヒトプリオン遺伝子へと置換した。続いて、キメラマウスの生殖系

列を通してヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスを作成した。さらに、ヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換マウス同士を交配し、ホモ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスを作成した。このマウスは、内在性のマウスプリオン蛋白質を欠失し、ヒトのプリオン蛋白質だけを発現しているマウスである。今後は、得られたヒト型プリオン遺伝子置換マウスを用いて、プリオンの機能解析とプリオン蛋白質の感染実験が期待できる。

【方法】

(1) ヒト型プリオン遺伝子置換ES細胞の作成

マウスプリオン遺伝子のヒト型への置換は、CRE-loxPシステムを用いたgene knock-in法を用いて作成した。マウス及びヒトのプリオン遺伝子は、全ての翻訳領域が第3エクソン内に存在する。これを利用して、ターゲティングベクターは、第3エクソンのSmaIサイト以降をすべてヒトの遺伝子に置換し、ヒトプリオン蛋白質を発現するように構築した。さらに、ポジティブ選択遺伝子としてloxP-neo遺伝子-loxPを第3エクソンの3'側Untranslated Regionに挿入し、ネガティブ選択遺伝子としてDT-A遺伝子を使用した。ターゲティングベクターを、Electroporation法にてマウスES細胞に導入し、G418選択を行なった。G418耐性colonyをクローニングし、ターゲティングベクターの外側に位置する5' probe、3' probe及び内在性のneo probeを用いたサザンハイブリダイゼーションにより、ヒト型プリオン遺伝子置換ES細胞を同定した。

(2) ヒト型プリオン遺伝子置換マウスの作成

得られたヒト型プリオン遺伝子置換ES細胞を用いて、注入キメラ法により、キメラマウスを作成した。キメラマウスから生殖細胞を通して、目的とするヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスを得た。さらに、ヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスとB6マウスを体外受精した。得られた受精卵にpCAGGS-CREプラスミドをマイクロインジェクションし、CRE酵素を一時的に発現させてloxP配列間での欠失を起こし、neo選択遺伝子を持たないヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換を完成させた。続いて、このヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換マウス同士を交配し、ホモ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスを作成した。

(3) ヒト型遺伝子置換体マウスの解析

得られたヒトプリオン遺伝子置換マウスを用いて、プリオンの機能解析とプリオン蛋白質の伝播実験を行なう。

【研究成果】

(1) 正常ヒト型プリオン遺伝子置換マウスの作成 1

<ORFを全てヒト型にしたWildタイプ (pWマウス) >

knock-in型のターゲティングベクターは、プリオン遺伝子の第3エクソンの3'側のApa I サイトにloxP配列ではさんだneo遺伝子を挿入し、さらにアームの3'末端にDT-A遺伝子を加えて構築した。このベクターは、第3エクソンのSmaIサイト以降をすべて正常なヒト型に置換し、ORFを全てヒト型に置き換えてあるため、第1段階のジーンターゲティングでヒト型への置換が完成し、その後不要となったneo遺伝子をCRE酵素により除去することができる。

得られた、ヒトプリオン遺伝子置換ES細胞より、キメラマウスを作成した。続いて、キメラマウスの生殖系列を通してヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスを作成した。さらに、ヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスとB6マウスを体外受精し、得られた受精卵にCRE酵素を一時的に発現させてloxP配列間での欠失を起こし、neo遺伝子マーカーを持たないヒトプリオン遺伝子置換を完成させた。このマウスは、安定してヒト型遺伝子が伝達しており、また、選択遺伝子であるneo遺伝子を失っていることがDNA解析により分かった。さらに、ヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換マウス同士を交配しホモ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスを作成した結果、正常に発生、成長し生存することが判明した。

(2) 正常ヒト型プリオン遺伝子置換マウスの作成 2

<ORFをヒト型+C末端をマウス遺伝子にしたChimeraWildタイプ (pCh-Wマウス) >

ターゲティングベクターとして、第3エクソンのSmaIサイト以降をヒトプリオン遺伝子に置換し、BstEIIサイトからC末端を再度マウスプリオン遺伝子にしたChimeraWildタイプ (pCh-W) を作成した。このベクターは、ポジティブ選択遺伝子として3'側 Untranslated Region のApaIサイトにloxP-pgkneo-loxPを導入し、ネガティブ選択遺伝子として3'側末端にDT-A遺伝子を導入した。ターゲティングベクターは、Electroporation法にてES細胞に導入し、G418選択を行なった。ターゲティングベクターの外側に位置する5'probeと3'probeを用いたDNA解析の結果、3クローンの相同組換え体を得た。得られた、ヒトプリオン遺伝子 (pCh-W) 置換ES細胞より、キメラマウスを作成した。続いて、キメラマウスの生殖系列を通してヘテロ型ヒトプリオン遺伝子 (pCh-W) 置換マウスを作成した。さらに、ヘテロ型ヒトプリオン遺伝子 (pCh-W) 置換マウスとB6マウスを体外受精し、得られた受精卵にCRE酵素を一時的に発現させてloxP配列間での欠失を起こし、neo遺伝子マーカーを持たないヒトプリオン遺伝子 (pCh-W-CRE) 置換を完成させた。このマウスは、安定してヒト型遺伝子が伝達しており、また、選択遺伝子であるneo遺伝子を失っていることがDNA解析により分かった。さらに上記pWマウスと同様に、ヘテロ型ヒトプリオン遺伝子置換マウス同士を交配しホモ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスを作成した結果、生存することが判明した。

(3) 正常ヒト型プリオン遺伝子置換マウスにおけるヒトプリオン蛋白質の発現

pWは、ヒト正常多型として、129 Met、219 Gluのアミノ酸変異と24 bpのDeletionを持っている。またpCh-Wは、第3エクソンのBstE II siteからC末端側をマウスプリオン遺伝子に戻してあるため、1アミノ酸が多く付加される。そのため、pWとpCh-Wでは9アミノ酸分の大きさの違いを生ずると予想される。得られたヒト型プリオン遺伝子置換マウスに対し、ヒトプリオン蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を用いて、Western blot解析を行った。その結果、野性型マウスのプリオン蛋白質とは交差せず、ヒト型プリオン遺伝子置換マウス由来のプリオン蛋白質とのみ反応してバンドが認められた。また、pWとpCh-Wとのサイズを比較するとpWの方が小さく、双方とも予想される大きさのバンドが検出された。

[考察]

本研究では、ヒトとマウスで反応に種差が存在するプリオン遺伝子を、マウス個体の遺伝子操作を通してマウス型からヒト型へと変換し、プリオンの作用をこれらのマウスを用いて解析することを目的としている。マウスES細胞を用いた相同組換えと発生工学を用いたキメラマウス作成技術を駆使して、マウスプリオン遺伝子をヒトプリオン遺伝子へと置換した。これまでに、2種類 (pWとpCh-W) のヒトプリオン遺伝子置換マウスの作成に成功した。双方とも、置換したヒト遺伝子がホモ型のマウスが得られており、ホモ型ヒトプリオン遺伝子置換マウスは生存することが判明した。このマウスは、内在性のマウスプリオン蛋白質を欠失し、ヒトのプリオン蛋白質だけを発現しているマウスである。ヒトプリオン蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を用いたWestern blot解析により、これら2種類のヒトプリオン遺伝子置換マウスがヒトプリオン蛋白質を発現していることが確認された。

今後は、得られたヒトプリオン遺伝子置換マウスを用いて、プリオンの機能解析とプリオン蛋白質の感染実験を進める。

[文献]

- 1) Honda,H., Oda,H., Nakamoto,T., Honda,Z., Sakai,R., Suzuki,T., Saito,T., Nakamura,K., Nakao,K., Ishikawa,T., Katsuki,M., Yazaki,Y., Hirai,H. : Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas. *Nat Genet* 19(4) : 361-365 1998
- 2) Sugihara,K., Nakatsuji,N., Nakamura,K., Nakao,K., Hashimoto,R., Otani,H., Sakagami,H., Kondo,H., Nozawa,S., Aiba,A. and Katsuki,M. : Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene in press*

プリオン蛋白過剰発現トランスジェニックマウスにおける筋病変

班 員：三好 一郎（東北大・医・附属動物実験施設）
班 員：北本 哲之（東北大・医・病態神経）
研究協力者：村本 環（東北大・医・病態神経）
 ：笠井 憲雪（東北大・医・附属動物実験施設）
 ：埜中 征哉（国立精神・神経センター）

Muscular degeneration in the transgenic mice which over-express prion protein

Ichiro MIYOSHI, Tetsuyuki KITAMOTO*, Tamaki MURAMOTO*, Noriyuki KASAI and Ikuya NONAKA**

Institute for Animal Experimentation, *Department of Neurological Science,
Tohoku University School of Medicine, **Department of Ultrastructural Research,
National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

ABSTRACT

Transgenic mice over-expressing the chimeric PrP transgene (human/mouse, bovine/mouse or sheep/mouse) exhibited similar phenotypes such as abnormal gait, emaciation and consequential paralysis of hind limb. The onset and progress of these phenotypes varied depending on the expression of the transgenes. Histological analysis of these mice revealed drastic muscular atrophy caused by the degeneration of red muscle of hind limb. The mice transgenic for the mutated PrP, which seemed to alter in structure, stability, localization and/or ability to interact with other elements, were also established. The mutation introduced into PrP in this study were, epitope-tagging, deletion of one of 8 amino acids repeat sequences, deletion of one of α -helix domains ($Mu\alpha$), conversion to secretory form, and mouse homologue to FFI (FFI-Mo). $Mu\alpha$ #14 and FFI-Mo #17 having high copy number of transgene exhibited the phenotypes similar to those observed in chimeric PrP transgenic mice.

【はじめに】

昨年我々は、プリオン感受性モデルマウスを確立する目的で作製したヒトおよびウシ、ヒツジとマウスのキメラ型プリオン蛋白遺伝子導入マウスのうち、過剰（高）発現の個体・系統が、運動失調や後肢麻痺など類似の症状を呈することを報告した。プリオン蛋白を過剰発現するマウスは、プリオン病の症状の一部を表すこと、および、プリオン蛋白の機能を解明する有効なモデルになる可能性を持つと考えられた。今回、プリオン蛋白の構造に基づいたプロセシングあるいは局在性、安定性、更にそれらに関わる因子などの情報を得ることも考慮し、ヒトの多型 1 種およびエピトープタグを持つプリオン蛋白、 α ヘリックス構造の一部を欠損するプリオン蛋白、分泌型プリオン蛋白、FFI 型プリオン蛋白を発現するトランスジェニックマウスを作製した。これらについても、導入遺伝子を過剰発現する個体・系統には同様の症状を示すものが観察された。一方、昨年報告したマウスでは後肢の赤筋に顕著な病変が認められ、症状の主原因の一つと考えられたので報告する。

【方 法】

従来用いてきた導入遺伝子の基本構造をもとに、発現後プロセシングを受けた N-末端に 8 アミノ

酸からなる flag と 3F4 エピトープタグを持つマウス型プリオン蛋白(Flag)、および、プロセッシングを受け signal peptide が除かれると全てヒト型になるが 8 アミノ酸の繰返し配列の一つ(24bp)を欠失しているヒト型多型(Hu)、codon140-152 を欠失し α ヘリックス構造の一部を持たないマウス型プリオン蛋白($\text{Mu}\alpha$)、codon231 に stop codon が挿入され GPI アンカーリングが起こらず分泌型となったマウス型プリオン蛋白($\text{Mu}\beta$)、codon 177 が Asn に置換されたマウス型プリオン蛋白(FFI-Mo)等を発現するコンストラクトを作製した(表 1)。

トランスジェニックマウスは、従来の方法に従い、BDF1 マウス受精卵の前核に導入遺伝子をマイクロインジェクションすることにより作製した。得られた仔マウスの尾から抽出した DNA を用いてサザンブロットおよび PCR 法にて、導入遺伝子の検出を行った。導入遺伝子の発現は、各組織から抽出した RNA を用いてノザンブロットおよび RT-PCR RFLP 法、あるいは in situ hybridization や抗プリオン抗体による免疫組織学的方法にて検討した。また、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を HE 染色し、病理組織学的解析を行った。

[結果と考察]

昨年述べたように、chw では 8 匹、129 では 5 匹、bovine では 3 匹、sheep では 5 匹の founder が得られ、その内、各々、6、2、3、5 系統が系統化されている。今回作製したトランスジェニックマウスでは、得られた Flag 5 匹、Hu 1 匹、 $\text{Mu}\alpha$ 6 匹、 $\text{Mu}\beta$ 4 匹、FFI-Mo 2 匹の founder の内、各々 4、1、5、2、1 系統が確立された(表 1)。導入遺伝子の mRNA・タンパクの両レベルでの発現は、chw、および 129、bovine、sheep、Flag の全系統でそのコピー数に依存する事が明らかとなったが、特にキメラ型プリオン蛋白(chw および 129、bovine、sheep)高発現の系統は歩行異常(震顫)や削瘦などの類似する症状を示した。また、逆に $\text{Mu}\alpha$ と FFI-Mo では導入遺伝子のコピー数の多い各々 1 系統が発症しており、導入遺伝子の高発現が原因であることが予想された。死亡したため系統化出来なかった 129 の 1 匹および $\text{Mu}\beta$ の 2 匹の founder でも高コピー数の導入遺伝子が確認されており、同様に導入遺伝子の過剰発現が発症・致死の原因と考えられた。

症状の程度や経過は個体・系統により異なるが、その由来動物種・遺伝型に関わらずキメラ型プリオン蛋白導入遺伝子を高発現するマウスの症状は類似している。また、今回作製した人工的な変異を導入したプリオン蛋白の過剰発現が期待されるマウスのうち、少なくとも $\text{Mu}\alpha$ 14 と FFI-Mo17 では同様の発症が観察された。しかし、キメラ型の場合と異なり変異導入型はプリオン蛋白の構造的な変化に伴う機能の変化(プロセッシングあるいは局在性、安定性、他の因子との相互作用など)が予想されるため過剰発現に起因する表現形も異なる可能性が高く、今後の慎重な検討が必要である。

129#12 系統は、早いものでは 2 ヶ月から歩行異常・運動失調を示すが完全な後肢麻痺には 16 ヶ月以上を要した。他の系統も成熟後に発症し経過は緩やかであった。しかし、最も導入遺伝子を強く発現している sheep#58 (ヘテロ個体) 系統は、生後 4 週目で正常な同腹仔より矮小であるため識別でき、7-8 週目には歩行異常および下半身の削瘦が進行し 9-10 週目にはほぼ後肢が完全に麻痺した。このように、発症の時期やその経過は個体の年齢だけでなくプリオン蛋白の発現量に依存していることが示唆された。Sheep#58 および 129#12 の両系統は顕著な筋組織の萎縮を示し、症状の原因の一つであると考えられたため、主に赤筋からなる Soleus と、白筋からなる Tibialis anterior を検討した。肉眼的には Soleus の萎縮が特に顕著であった。顕微鏡的には、ミトコンドリアを多く含む赤筋の萎縮が著明であり、白筋と比較し赤筋の筋繊維の直径の低下が著明であり、中心核も存在した。筋繊維間の繊維化は認められず、また筋繊維の壊死も認められなかった。また、明らかな Group atrophy も認められなかった。末梢神経の萎縮は認められなかった。筋病変の解析からは、明らかな神経原性、筋原性の萎縮を示唆するものは得られず現在神経・筋接合部の詳細な検討を行っている。

表1. プリオオン蛋白遺伝子導入マウス

	導入遺伝子	Founderの数	系統数	発症数 Fo	系統
Chw		8	6	1	1
129		5	2	2	1
Bovine		3	3	0	1
Sheep		5	5	1	1
Flag		5	4	0	0
Hu		1	1	0	0
Muα		6	5	1	1
Muβ		4	2	2	0
FFI-Mo		2	1	0	1

導入遺伝子の名称とそのexon3を模式的に示した。キメラ型導入遺伝子 (Chwおよび129, Bovine, Sheep)のプリオン蛋白をコードするORFは、シグナルペプチドを含むN末端、および、GPIアンカーが結合するC末端は129SVマウス (Mo)由来のものを用い、その間にヒト (Hu)129MetまたはHu129Val)あるいはウシ(Bo)、ヒツジ(Sh)由来プリオン蛋白の配列が位置する。FlagはN末端に8アミノ酸からなるflagと3F4エピトープタグを持つマウス型プリオン蛋白、Huはプロセッシングを受けマウス(Mo)由来のsignal peptideが除かれると全てヒト型になるが8アミノ酸の繰返し配列の一つ(24bp)を欠失しているヒトの多型、Muαはcodon140-152を欠失しαヘリックス構造の一部を持たないマウス型プリオン蛋白、Muβはcodon231にstop codonが挿入されGPIアンカーリングが起こらず分泌型となったマウス型プリオン蛋白、FFI-Moはcodon 177がAsnに置換されたマウス型プリオン蛋白を発現する導入遺伝子である。各々の導入遺伝子について、得られたFounderマウスの数、および確立された系統数、本文中に述べたような症状を示したFounder(Fo)の個体数、系統数を示した。

ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験 (その2)

班 員：毛利 資郎 (九大・医・動物実験)
班 員：北本 哲之 (東北大・医・病態神経)
班 員：三好 一郎 (東北大・医・動物実験)

Susceptibility test for new transgenic mice expressing human/mouse chimeric prion gene to human prion (Part 2)

Shirou MOHRI¹, Tetsuyuki KITAMOTO² and Ichiro MIYOSHI³

¹Laboratory Animal Center, Faculty of Medicine Kyushu University

²Department of Neurological Science, ³Institute for Animal Experimentation,
Tohoku University School of Medicine

ABSTRACT

We established two strains of human/mouse chimeric transgenic (Tg) mice which express human wild-type prion gene, codon 129met and codon 129val, and ablate wild-type mouse PrP gene.

To evaluate the susceptibility to human prion, twenty microliters of 10% brain homogenate of sporadic CJD patient (codon 129met/met) was inoculated to the mice with intracerebral route. The shortest incubation period was 154 ± 15.4 (days \pm SD) in 129met ablated wild-type PrP gene and incubation period in 129val ablated PrP gene was 172 ± 13.5 . Incubation periods in Tg mice with wild-type homozygote (129met +/- · w/w: 367 ± 60.0 , 129val +/- · w/w: 319 ± 18.0) were longer than in Tg mice with wild-type heterozygote (129met +/- · w/0: 215 ± 30.8 , 129val +/- · w/0: 259 ± 15.9), however, none of the non-Tg mice have exhibited any affection still 1490 days after inoculation. Histological examination of all affected mice and immunoblotting studies of some mice confirm spongiform neurodegeneration and the presence of human PrP^{sc}.

It is evident that our human/mouse chimeric Tg mice are the most susceptible to human prion. These mice should be useful tool for the safety evaluation of prions and for a model of elucidation of the prion.

【はじめに】

血液製剤などの医薬品ならびに原材料、さらには食肉類にわたるプリオンに関するヒトへの安全性試験を行うためには、各種プリオンのヒトへの感染性を調べる動物モデルが必要不可欠である。われわれはヒト型プリオン蛋白を産生するヒトプリオン蛋白遺伝子導入モデルを作製し、種の壁を越えたプリオン高感受性マウスの開発を目的で研究を行っている。

この班会議で北本、三好らにより一昨年報告されたいくつかの遺伝子導入マウスを入手し、マウスの内在性プリオンの除去と感染実験を行っていることを昨年報告したが、今回はマウス内在性プリオンの除去された完全なヒト/マウスキメラ型プリオンマウスの系統確立と散発型 CJD プリオンによるそれらの系統の感染実験の結果を報告する。

【材料と方法】

1. マウス：ヒト/マウスキメラプリオン蛋白遺伝子発現マウス

北本、三好らの作製したヒト/マウスキメラプリオン蛋白遺伝子発現マウスをプリオン蛋白遺伝子欠損マウス、Pm 0/0 マウス (糸原博士作製) に戻し交配し、マウス内在性プリオンの除去された完全なヒト/マウスキメラ型プリオン遺伝子発現マウス 2 系統を樹立した。すなわちヒト PrP 遺伝子の codon 129

がメチオニンタイプ (Tg#30 HuPrP(129Met) +/- · 0/0) とヒト PrP 遺伝子の codon129 がバリンタイプ (Tg#12 HuPrP(129Val) +/- · 0/0) および各々内在性のマウス PrP 遺伝子をヘテロ、ホモに持つマウスを以下の組み合わせで用いた。トランスジーンを持たない同系統のマウスをワイルドマウスとして利用した。

Tg#30 HuPrP(129Met) +/- · 0/0

Tg#30 HuPrP(129Met) +/- · w/0

Tg#30 HuPrP(129Met) +/- · w/w

Tg#30 HuPrP(129Met) -/- · w/w

Tg#12 HuPrP(129Val) +/- · 0/0

Tg#12 HuPrP(129Val) +/- · 0/w

Tg#12 HuPrP(129Val) +/- · w/w

Tg#12 HuPrP(129Val) -/- · w/w

3. サザンブロットによる遺伝子スクリーニング

従来の PCR 法に加えて、導入遺伝子については制限酵素 Sac I と chw プロンプをもちいて、内在性のマウス PrP 遺伝子については制限酵素 Bam HI と 3'プロンプで確認試験を行った。

4. ウェスタンブロット

系統として確立されたヒト/マウスキメラ遺伝子導入マウスがヒト型のプリオン蛋白を発現しているかどうか、感受性試験に際して実際にヒト型プリオン蛋白が異常型プリオン蛋白に変換されているかどうかを調べるために Collinge らの方法に準じて Western blot を行った。一次抗体として、マウスプリオン蛋白検出にはウサギポリクローナル抗体 1B3 (BBSRC & MRC, NPU, Edinburgh の Mrs Farquhar より分与)、ヒトプリオン蛋白用にはモノクローナル抗体 3F4 を用いた。発色系は alkaline phosphatase-P CIB/NBT (Promega) を用いた。

5. 接種材料

129Met/Met 型の PrP 遺伝子をもつ sporadic CJD 患者 10% 脳乳剤 (H3) 20 μ l を脳内接種 (i.c.)、一部は腹腔内接種 (i.p.) も併用した。

6. 潜伏期間

接種日を 0 日とし、反応遅延、運動失調、消瘦、無動などの臨床症状を呈し安楽死させる日までを潜伏期間とした。

7. 確定診断

確定診断のため、安楽死させたマウスは全てホルマリンに固定後、実験室内汚染防止のため蟻酸処理を行い、常法によりパラフィン切片を作製、HE 染色と免疫組織染色を行った。免疫組織染色は hydrolytic autoclaving 法による前処理の後、一次抗体として抗 N 未合成ペプチドウサギ血清とモノクローナル抗体 3F4 を用いた。また一部は上述のウェスタンブロットを行った。

【結果と考察】

ヒト/キメラプリオン蛋白遺伝子発現マウスをプリオン蛋白遺伝子欠損マウスと戻し交配することによってマウスの内在性プリオン遺伝子が発現しない完全なヒト/マウスキメラ遺伝子発現マウスの系統が確立された (図 1)。さらに、このマウスはヒト型のプリオン蛋白遺伝子が発現していることが確認された (図 2)。

これらのマウスは現在までのところ 2 つのハプロタイプのうち、HuPrP(129Met) +/- · 0/0 が 1 系統、HuPrP(129Val) +/- · 0/0 が 2 系統、合計 3 系統が確立されており、現在、導入遺伝子以外の遺伝的背景を均一にするための近交系にバッククロスが進行中である。

これらのうち材料と方法で示した Tg#30 HuPrP(129Met)型、Tg#12 HuPrP(129Val)型に sporadic CJD 患者脳乳剤 H3 を接種した感染実験の成績を table 1 に纏めた。129Met 型である Tg#30 のヒトプリオン蛋白のみを産生する系では平均 154 日、最短個体で 132 日の潜伏期間であった。マウスワイルドプリオンをヘテロに持つ場合は平均 215 日と延長し、ホモに持つ場合は平均 367 日であった。129Val 型の Tg#12 では Met 型に比べて少し遅れるが、マウスワイルドをホモにもつ場合のみ平均 319 日と Met 型に比べて短い潜

伏期間を示したが原因は不明である。Tg#30, Tg#12 共に H3 を接種された同じコロニーの Tg をもたないマウスワイルドタイプは 490 日を超えても全て元気に生存している。また、対象として同様に H3 を接種された通常のマウス (NZW) にも何らの変化も認められていない。つまり、これまでのマウスでは 500 日以上日数を費やしても感染性の有無が判定できなかったヒトプリオンについて、わずか 150 日程度で感染性が確かめられた。異常なプリオン蛋白の産生と沈着は発症よりずっと以前から起こっていることから、実際の診断はもっと短期間で可能である。他方、もし、ワイルドタイプがこのまま発症しなかった場合は、この Tg マウスの存在意義は計り知れなく重要なものになると考えられる。

なお、潜伏期間の平均 154 日はヒトプリオンの感染実験では世界最短である。したがって、血液製剤などの医薬品ならびに材料のプリオンに関するヒトへの安全性試験のために利用可能な、世界で最も感受性の高い実験動物が樹立されたと考えられる。現在、さらにより高感受性マウスの系統樹立を目指したマウスの交配と、各種のプリオン遺伝子多型や変異株に対する感受性領域の拡大を目指して感染実験を行っている。

今回のヒト/マウスキメラ型プリオン遺伝子導入マウスの系統確立と散発型 CJD プリオンによる感染実験の結果、導入された遺伝子産物であるヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白がヒトのプリオンを感染させることによって異常なプリオン蛋白にコンバートされ、宿主を発病させるという機能も備えていることも証明された。すなわち、これらのマウスへの導入に使用されたユニークなヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白遺伝子のデザインがマウス内在性のプリオン蛋白遺伝子に近い形でプロセッシングを受けてプリオン蛋白が産生されていると考えられる。このことは単にヒトプリオン高感受性マウスの樹立のみならず、このコンストラクトによる多型、変異、部分欠損などさまざまなプリオン蛋白遺伝子導入マウスが作製され、基礎研究への応用が広がる可能性が高いことの意義もあわせて重要である。

【まとめ】

1. ヒト/マウスキメラプリオン蛋白のみを発現する 2 系統 (Tg#30 HuPrP129Met, Tg#12 HuPrP129Val) のトランスジェニックマウスを確立した。
2. CJD 患者脳乳剤接種による感受性試験における平均潜伏期間は 154 日および 172 日で、ヒトのプリオン伝播実験では世界最短である。
3. この結果から、本トランスジェニックマウスはヒトプリオンに対する感受性が最も高い系統であると考えられる。

【文献】

- 1) 北本哲之、玉井洋一：プリオン病のイムノアッセイ法、パイオアッセイ法の確立をめざして。厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班、(班長 北本哲之)平成 8 年度研究報告書：9-13、1997
- 2) 三好一郎、北本哲之：ヒトプリオン感受性モデルマウスの確立。厚生省特定疾患「遅発性ウイルス感染」調査研究班、(班長 北本哲之)平成 8 年度研究報告書：20-24、1997
- 3) Collinge, J., Sidle, K.C.L., Meads, J., Ironside, J., Hill, A.F. : Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. Nature. 383 : 685-690, 1996

Table 1. Transmission tests to human type PrP transgenic mice

Mouse	Mouse genotype	Affected /Inoculated	Incubation periods
Tg#30	HuPrP (129met) +/- • 0/0	8/8	154 ± 15.4
	HuPrP (129met) +/- • w/0	5/5	215 ± 30.8
	HuPrP (129met) +/- • w/w	10/10	367 ± 60.0
	HuPrP (129met) -/- • w/w	0/7	>490 alive
Tg#12	HuPrP (129val) +/- • 0/0	11/11	172 ± 13.5
	HuPrP (129val) +/- • w/0	5/5	259 ± 15.9
	HuPrP (129val) +/- • w/w	9/9	319 ± 18.0
	HuPrP (129val) -/- • w/w	0/4	>490 alive

Inoculated via i.c. with 10% human brain homogenate of 129met/met patient.

図1. Southern Hybridization によるPrP遺伝子のスクリーニング

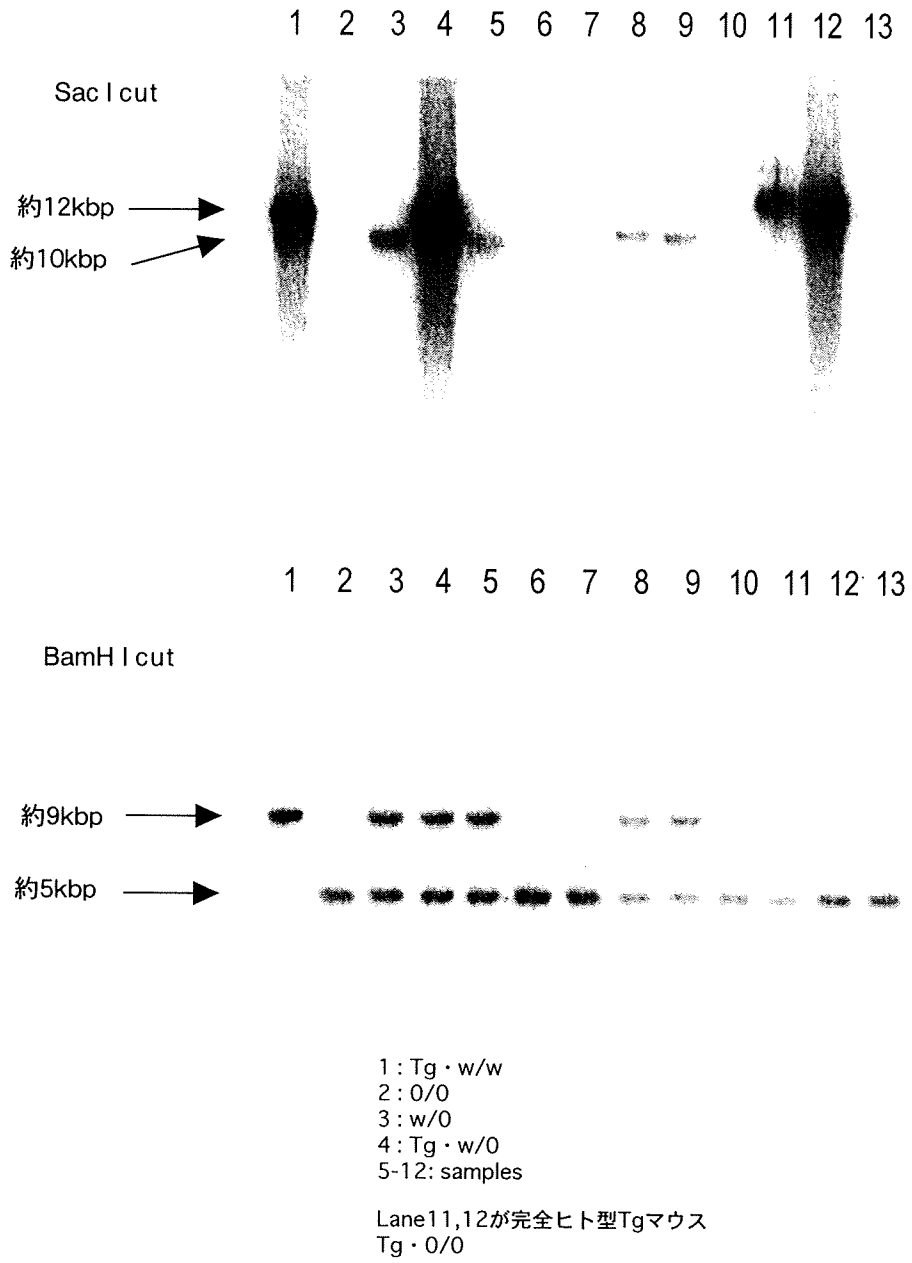
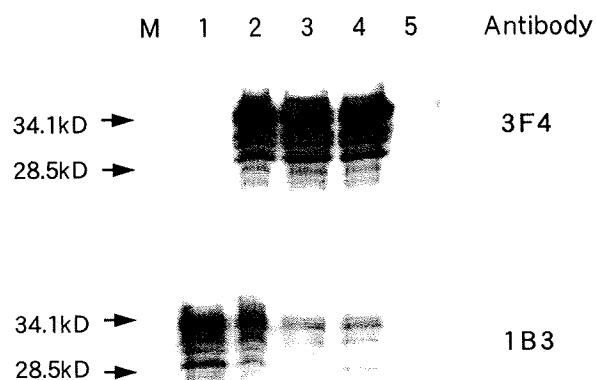


図 2 . Western blot analysis of Tg mice



M : Marker

1 : Tg#12 HuPrP(129Val) -/- · w/w

2 : Tg#12 HuPrP(129Val) +/- · w/w

3 : Tg#12 HuPrP(129Val) +/- · 0/0

4 : Tg#12 HuPrP(129Val) +/- · 0/0

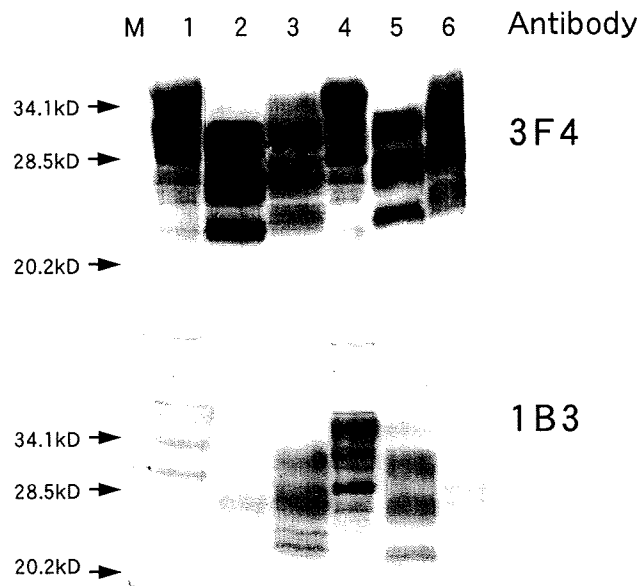
5 : Tg#12 HuPrP(129Val) -/- · 0/0

Lane 1 はマウス型プリオン蛋白のみを産生

Lane 2~4はヒト型プリオン蛋白を産生

Lane 5 はプリオン蛋白の産生は認められない

図 3. Western blot analysis of infected Tg mice



M : Marker

Lane 1	: Tg#12 HuPrP(129Val) +/- · 0/0	PK -
2	: "	PK + (×10 ⁻³ tissue weight)
3	: "	PK + (×10 ⁻⁴)
4	: Tg#12 HuPrP(129Val) +/- · w/w	PK -
5	: "	PK + (×10 ⁻³)
6	: "	PK + (×10 ⁻⁴)

Lane 1~3 はH3(129met/met)接種後164日

Lane 4-6 は同上接種後307日

トランスジェニック・マウスの病理

班 員：北本 哲之（東北大学・医・病態神経学）
班 員：毛利 資郎（九州大学・医・動物実験施設）

Pathologic examinations in the transgenic mice

Tetsuyuki KITAMOTO*, Shirou MOHRI**

*Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine

**Laboratory Animal Center, Faculty of Medicine, Kyushu University

ABSTRACT

We examined transgenic (Tg) mice with human/mice chimeric transgene, with codon 129 Val (Tg129) or with codon 129 Met (TgChW) prion protein allele, after the inoculation of human 129 Met type prions. Western blot analysis revealed abnormal PrP (PrP^{Sc}) with almost the same molecular weight both in the brains of Tg 129 and TgChW. In the brain of the Tg mice, human PrP^{Sc} accumulations were observed immunohistochemically. In Tg129, we could detect plaque-like deposits in the Corpus callosum, hippocampus, thalamus, brainstem, but not in TgChW. In TgChW, serious PrP^{Sc} deposits were observed in the striatum and cerebellar cortices. Compared with the first passage results of the wild type mice, PrP^{Sc} was widely distributed in the central nervous system in the Tg mice. In the non-neuronal organs, PrP depositions were observed faintly in the follicular dendritic cells in the lymphoid organs.

〔はじめに〕

ヒト型のトランスジェニック (Tg) マウスを作製して、ヒト・プリオン感染実験により世界最短の潜伏期を示すモデル動物の作製に成功した。本研究では、感染実験後の Tg マウスの病理解析を行ったので報告する。

〔材料および方法〕

1) 今回用いた Tg マウスのプリオン蛋白翻訳領域は、BstEII サイトより C 末側はマウスのプリオン蛋白であり、N 末側はヒト・プリオン蛋白である。N 末側に存在するコドンの 129 に関しては Met(TgChW#30)と Val(Tg129#12)を使用した。トランスジェニックのコンストラクトはすでに本分科会で報告したものと同一である。

2) 感染実験に使用したヒト・プリオン病患者の剖検脳は、孤発例の CJD 由来であり、コドン 129 は Met/Met、コドン 219 は Glu/Glu の症例でプリオン蛋白遺伝子には変異の認められない症例である。10%脳乳剤を作製して、頭蓋内投与または、頭蓋内及び腹腔内の同時投与を行った。

3) 異常プリオン蛋白の検出には、Western Blot 法、免疫染色を行い、1 次抗体としては 3F4 抗体、PrP-N 抗体を用いた。

〔結果及び考察〕

1) Western Blot 法

発病した Tg マウスの脳を用いて、Detergent 不溶性の分画に関して Proteinase K 処理を行った。

Proteinase K 処理後に、やや分子量の低下した異常プリオン蛋白が検出できた。この分子量を Tg129#12、TgChW#30、接種に用いたヒト CJD 脳で比較したが、明らかな分子量の差異は検出できなかった。最近、ヒト・プリオン病の異常プリオン蛋白の構造のちがいで、Proteinase K での分解される部位が異なり、分子量の変化として捉えることが可能となっており¹⁾、今後、多数のプリオン病の脳乳剤を接種することによって、ヒトの異常プリオン蛋白の構造がそれを感染させた Tg マウスの脳で再現できるかが一つの興味ある点である。

2) 中枢神経系の組織学的検索

組織学的検索では、Tg129#12 と TgChW#30 の間には明らかな差異は見られなかった。しかしながら、野生型マウスを使用した初代の感染実験における海綿状変性と比べると、明らかに広範な海綿状変性を示した。ヒト型 Tg マウスでは、大脳皮質、基底核、視床など広く海綿状変性が認められた。

プリオン蛋白の免疫染色を行うと、129Val と129Met の Tg マウスの差異が描出できた。最も明らかな差は、129Val の Tg マウスにおいて、クル斑様のアミロイド沈着が認められた点である。アミロイド斑は、脳梁、視床、海馬、脳幹などに認められた。これは、ヒトの孤発例の CJD でコドン 129Val を有する症例の脳内にクル斑がみられるという結果と符合する^{2,3)}。また、基底核での海綿状変性、異常プリオン蛋白の沈着はやや TgChW#30 の 129Met 型の Tg マウスに強い傾向が認められた。さらに、小脳の分子層に異常プリオン蛋白が沈着するのも129Met 型の Tg マウスの特徴であった。

3) リンパ系のプリオン蛋白の沈着

野生型マウスをつかった初代の感染実験では、決して認められなかったリンパ装置内の濾胞樹状細胞(Follicular dendritic cell;FDC)へのプリオン蛋白の沈着を認めた^{4,5)}。しかしながら、この沈着はその程度が軽いものであり、3F4 抗体でヒト型の導入遺伝子産物であるレコンビナント PrP の量はごく少ないものであった。次にロックアウト・バックグランドのヒト型マウスでもごく少量の FDC へのプリオン蛋白の沈着を認めた。これらを総合すると、いまのところリンパ装置でも、ヒト・プリオン感染によって脳内同様の異常プリオン蛋白への変換は効率も問題はあるが起こっていそうである。この変換の効率の悪さは C 末端をマウス・プリオン型にしたためであるのか、またやはりマウスではいくら Tg マウスでも一般臓器の異常プリオン蛋白への変換効率が悪いのかが今後の検討課題である。我々はすでに完全ヒト型の pW ノックインマウスと TgHu という完全なヒト型を導入したトランスジェニックマウスを作製済みであり、今後はこれらの完全なヒト型プリオン蛋白の遺伝子導入モデルで検索する予定である。

〔文 献〕

- 1) Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Giese A, Kretzschmar H.: Typing prion isoforms. *Nature*. 386:232-233, 1997
- 2) Miyazono M, Kitamoto T, Doh-ura K, Iwaki T, Tateishi J.: Creutzfeldt-Jakob disease with codon 129 polymorphism (Valine): a comparative study of patients with codon 102 point mutation or without mutation. *Acta Neuropathol*. 84:354-359, 1992
- 3) Kitamoto T, Doh-ura K, Muramoto T, Miyazono M, Tateishi J.: The primary structure of the prion protein influences the distribution of abnormal prion protein in the central nervous system. *Am J Pathol*. 141: 271-277, 1992
- 4) Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-ura K, Tateishi J.: Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*. 65: 6292-6295, 1991
- 5) Muramoto T, Kitamoto T, Hoque M Z, Tateishi J, Goto I.: Species barrier prevents an abnormal isoform of prion protein from accumulating in follicular dendritic cells of mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*. 67: 6808-6810, 1993

CJD 感染動物脳に沈着するプリオン蛋白斑

班 員：立石 潤 (老健施設・春風・Brain Research Laboratory)
班 員：北本 哲之 (東北大・医・病態神経)
班 員：毛利 資郎 (九州大・医・動物実験)
研究協力者：村本 環 (東北大・医・病態神経)

Prion protein plaques in animal brains infected with Creutzfeldt-Jakob disease

Jun TATEISHI, Tetsuyuki KITAMOTO, Shirou MOHRI, Tamaki MURAMOTO

Brain Research Laboratory, Geriatric Health Care Facilities, Harukaze
Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine
Laboratory Animal Center, Faculty of Medicine, Kyushu University

ABSTRACT

Rats and hamsters infected with sporadic CJD and familial GSS with P102L mutation showed similar deposition of abnormal isoform of prion protein (PrP) as seen in mouse brains. Synaptic-type deposition was observed in all diseased rats and hamsters, and diffusely distributed in the gray matter of the parietal lobe, thalamus, striatum and hippocampus, as seen in infected mice. Plaque-type deposition in rat brains distributed in the gray and white matter of the parietal lobe and near the ventricular wall, more widely than in mice. In hamster brains, the plaques deposited near the ventricular walls. Rats of various strains in the serial propagation of GSS from a German patient with P102L mutation showed huge amounts of PrP in synaptic- and plaque-type distribution, suggesting PrP-productive character of the infectious agent.

【はじめに】

われわれは CJD 感染マウス脳に異常型プリオン蛋白質 (PrP) が瀰漫性 (シナプス型) のみならず、斑状 (斑型) に沈着する事を始めて報告した^{1, 2)}。今回はラットとハムスターでの PrP 沈着をしらべた。

【材料と方法】

これまでに行ったヒトプリオン病 100 症例以上の伝播実験から、ラット、ハムスターを用いた実験を選び、病理標本のパラフィンブロックから新たに薄切を行い、脱パラ後 2 mmMHCl 溶液に浸して 121 °C 10 分加熱後水洗し、PrP の N-末端部の合成ペプチドに対する抗体を 2000 倍に希釈したものを一次抗体として用いた。

【結果】

1、散発性 CJD 症例からラットへの初代伝播

ラットへの初代伝播の成績は、マウスに比し陽性の症例数も、発症動物の比率も少ない (表 1)。脳内接種後、発症までの潜伏期間は初代接種マウスのそれに近い。発症ラットの脳には海綿状態、グリオシス、神経細胞の脱落と PrP の灰白質への瀰漫性沈着 (シナプス型) が、頭頂葉、視床、線条体、海馬などを中心に認められた。さらに大小の PrP 顆粒の斑状沈着が頭頂葉皮質、白質、側脳室壁

などに散発性に認められた。シナプス型沈着は感染マウスでの分布に近いが、斑状沈着はマウスでは側脳室壁に大型の斑が少数みられるのに比し、ラットではより広範囲に、大小さまざまな大きさの斑が多数みられた。

2、散発性 CJD 症例からハムスターへの継代伝播

プリオン病症例からハムスターへの初代伝播は、ラットと同様に、マウスよりも低率であった。しかしマウスからハムスターへの継代伝播は、初回の潜伏期間はマウスよりも長い、ハムスターに続けて継代するとマウスに近い速発病系のハムスターもみられた。しかしハムスターでの継代を重ねても潜伏期間の短縮があまり起こらない遅発病系のハムスターも存在する（表 2）。今回はこれらの 2 代表株につき PrP 沈着を検討した。

接種症例はいずれも散発性 CJD で、症例 1 は発病時 72 才で、10 月後に死亡。症例 2 は表 1 の症例 3 と同一例である。症例 1 はマウスに 3 代継代したものをハムスターに接種し、その潜伏期間は 213 ± 66 日 (7/7) で、そのうちの 2 匹からハムスターへの 2 代目伝播は 136 ± 6 日 (6/6) と 157 ± 3 日 (4/4) であり、この 2 群の各 1 匹からの 3 代目（通算 6 代目）の伝播成績を表 2 に示した。症例 2 はマウスに 6 代継代したものをハムスターに接種し（ 454 ± 33 日、3/4）、さらにハムスターに継代（通算 8 代目）したもので、この発病の遅れはハムスター 3 代目（通算 9 代目）も同様（ 313 ± 15 日、8/8）であった。

発病ハムスターのすべてにシナプス型 PrP 沈着がみられ、その分布はマウスでの分布に近く、No.1 群と No.3 群では PrP の斑状沈着が側脳室壁に局限して認められた。

3、遺伝性 GSS 症例からラットへの継代伝播

PrP 遺伝子のコドン 102 のプロリンからロイシンへの変異（P 102 L）を持つ 2 症例からラットへの継代伝播の成績は表 3 の通りである。症例 1³⁾ は発病時年齢 52 才の男性で、罹病期間は 3 年 10 月。ラットおよびマウスへの伝播に成功し、その病原株を Fukuoka-1 株と命名した症例である。初代接種マウス 3 匹中の 2 匹は脳内接種 3 0 5、3 3 5 日後に発病し、ラットへの初代伝播は高率（1 1 / 1 3）に行われたが、その平均潜伏期間はマウスより長かった。初代伝播ラット 3 匹から行った 2 代目継体ラットはいずれも 2 4 0～2 7 0 日前後に発病しており、3 代目はさらに短縮していた。発症マウス、ラット共に著明な海綿状態、グリオシスと軽度の神経細胞脱落があり、PrP 沈着は瀰漫性のシナプス型であった。接種症例の病変の特徴である PrP 斑（クールー斑）はマウスでは初代、継代伝播を通してみられなかったが、ラットでは 2 代目以降に少数みとめられた。

症例 2⁴⁾ は同じく P 102 L 変異を持つチュービンゲンの 5 4 才の男性で、罹病期間は 6 年。マウスは高率に伝播し（2 0 / 2 8）、その潜伏期間は $2 5 5 \pm 5 5$ 日と短い傾向があった。ラットは 6 匹中の 1 匹のみが 5 2 6 日後に発病したが、継代接種では高率に発病し、潜伏期間も短縮した。これらのラットでは海綿状脳症と多量の PrP 沈着が認められた。シナプス型 PrP は散発性 CJD 感染ラット、マウスとほぼ同一の灰白質領域にみられ、さらに継代ラットでは脳幹諸核（特に前庭神経核や背側正中部の運動核）、小脳核、脊髄灰白質にも認められ、脾やリンパ節の濾胞樹状突起細胞（FDC）や小腸粘膜上皮細胞にも認められた。一方 PrP の斑状沈着は頭頂葉皮質、白質、脳室壁のみならず小脳皮質にも多発し、ヒト P 102 L 症例に近い。PrP 斑の多発とその分布は、継代を重ね、またラットの系統を変えても不変であった。

【考察】

ヒトプリオン病の実験的伝播は、マウスでもっとも高頻度、高率に起こり、伝播の有無は海綿状脳病変と PrP の沈着で確認してきた。この際マウスでは PrP のシナプス型沈着と斑型沈着が起こるが¹²⁾、斑型沈着は潜伏期間の長い初代伝播マウスにみられ、早く発病する継代伝播マウスには稀であり、接種症例による差もみられた。