

今回検討したラットおよびハムスターでは、シナプス型沈着はマウスとほぼ同様に頭頂葉皮質、視床、線状体、海馬などの灰白質に瀰漫性に認められ、継代伝播ラットでは継代マウスと同様に脳幹諸核や内臓にもみられた。一方 PrP の斑型沈着はラット、ハムスターでは潜伏期間とは無関係に、マウスよりも高頻度に出現する傾向があり、ラットではマウスよりも広い範囲に、ハムスターでは狭い範囲に認められた。またマウスに斑型沈着のみられぬ Fukuoka-1 株からも、ラットへの継代伝播後に少数の斑状沈着が認められ、チュービンゲンの GSS 症例から伝播したラットは初代から 4 代にいたる各系統のラットに高率に、多量の PrP がシナプス型および斑型沈着として認められ、PrP 多発系と言えよう。この特徴は他の GSS 症例にはみられぬところから、P102L 変異以外の要因の関与が疑われる。

#### [まとめ]

1, 散発性および遺伝性プリオン病症例から伝播した初代および継代伝播ラットおよびハムスターで、異常型プリオン蛋白質の沈着を検索し、マウスと同様にシナプス型および斑型沈着を認めた。

2, シナプス型沈着はマウスとほぼ同様な分布を示し、斑型沈着はラットではマウスより広い範囲で、ハムスターでは側脳室壁に局限して認められた。

3, チュービンゲンの GSS 症例から伝播したラットでは、多量の PrP が瀰漫性および斑状に広い範囲に認められ、ラットの系統や伝播世代数には無関係であり、P102L 変異以外の要因の関与が疑われた。

#### [文献]

- 1) Tateishi, J., Nagara, H., Hikita, K., Sato, Y.: Amyloid plaques in the brains of mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol.* 15: 278-280, 1984
- 2) 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
- 3) Tateishi, J., Ohta, M., Koga, M., Sato, Y., Kuroiwa, Y.: Transmission of chronic spongiform encephalopathy with kuru plaques from human to small rodents. *Ann Neurol.* 5: 581-584, 1979
- 4) Tateishi, J., Sato, Y., Nagara, H., Boellaard, J.W.: Experimental transmission of human spongiform encephalopathy to small rodents. IV. Positive transmission from a typical case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker's disease. *Acta Neuropathol.* 64: 85-88, 1984

表1 散発性CJD症例からラットへの初代伝播

症例 病院	性	発病 年齢	罹病 期間	ラット の系統	発病数/ 接種数	潜伏期間 (日)	PrP斑 沈着 (匹数)
1. 広島市民病院	男	71才	5月	Donryu	2/7	337,617	+ (2)
2. 山口労災病院	男	70	8月	Donryu	3/11	906,945,1008	+ (3)
3. 早良病院	男	69	8月	Donryu	2/9	421,554	+ (1)
4. 九大神内	女	56	1年8月	Wister	2/7	543,547	-
5. 九大精神*	女	37	9年	SD	1/7	378	-

\* プリオン蛋白遺伝子のコドン129がM/Vの症例

表2 散発性CJD症例からハムスターへの継代伝播

症例 病院	接種 動物群	潜伏期間 M±SD (日)	発病数/ 接種数	PrP斑 (沈 着動物数)
1. 湯が丘病院	No.1	145 ± 7	5/5	2
	2	141 ± 7	4/5	0
2. 早良病院	3	265 ± 10	4/4	3
	4	278 ± 60	4/4	0

表3 遺伝性GSS症例からラットへの継代伝播

症例	伝播 世代	ラット 系統	潜伏期間 M ± SD (日)	発病数/ 接種数	PrP 斑
1.	1代	Donryu	406 ± 24	11/13	-
	2代	Donryu	242 ± 55	11/12	+
		Donryu	255 ± 44	7/7	+
		Donryu	261 ± 7	8/9	+
3代	Donryu	219 ± 44	4/4	+	
2.	1代	Donryu	526	1/6	++
	2代	SD	324 ± 18	5/5	++
	3代	Zitter	218 ± 7	5/6	++
	4代	Zitter	238*	7/7	++

\* 同一日に屠殺し、病変を確認。

## CJDの病態発現にiNOSは必要か

班 員：玉井 洋一（北里大・医・生化学）  
研究協力者：笹原 武志（北里大・医・微生物学）  
小嶋 久子（北里大・医・生化学）  
中村 和生（北里大・医・生化学）  
滝 龍雄（北里大・医療衛生・微生物学）  
田口 文章（北里大・医療衛生・微生物学）  
大谷 義夫（北里大・医 / 医療衛生・精神科学）  
三浦 貞則（北里大・医 / 医療衛生・精神科学）

Is inducible nitric oxide synthase (iNOS ) essential requirement  
of pathogenesis of Creutzfeldt-Jakob disease mice ?

Yoichi TAMAI<sup>1</sup>, Takeshi SASAHARA<sup>2</sup>, Hisako KOJIMA<sup>1</sup>, Kazuo NAKAMURA<sup>1</sup>,  
Tatsuo SAITO-TAKI<sup>3</sup>, Fumiaki TAGUCHI<sup>3</sup>, Yoshio OHTANI<sup>4</sup>, Sadanori MIURA<sup>4</sup>

Departments of <sup>1</sup>Biochemistry and <sup>2</sup>Microbiology, School of Medicine, <sup>3</sup>Department of Microbiology, School of Allied Health Sciences, and <sup>4</sup>Department of Psychiatry, Schools of Medicine and Allied Health Sciences, Kitasato University

### ABSTRACT

Previously we observed heightened expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) -mRNA as well as that of cytokines such as TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$ , suspecting that they may mediate neuropathological processes in transmissible spongiform encephalopathy. To explore this hypothesis, we inoculated Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) agent into brains of iNOS gene-deficient mice, and examined the expression of mRNAs of iNOS and glial fibrillary acidic protein (GFAP) by RT-PCR. The brains were also histologically examined. Both iNOS (+/+) and (-/-) mice showed clinical symptoms on 17 weeks after the inoculation. No difference of clinical course to terminal stage was observed between two groups. In iNOS (+/+) mice heightened expression of iNOS-mRNA was found on 15 weeks after inoculation, the periods before onset of clinical symptoms, whereas iNOS-mRNA was not detected in iNOS (-/-) mice. Overexpression of GFAP-mRNA was observed on 15 weeks in both iNOS (+/+) and (-/-) mice. HE staining of brains of affected mice showed vacuolation of the brain tissues at various levels diffusely in cerebrum and cerebellum of iNOS (+/+) and (-/-) mice, in association with astrogliosis. No difference in neuropathological findings were found between two groups. Taking together the findings obtained by the present and previous experiments, we concluded that not only cytokines but also iNOS systems are not an essential requirement of pathogenesis of experimentally induced CJD.

### 【はじめに】

われわれは先に、伝達性海綿状脳症マウスの脳でPrPScの蓄積、臨床症状の発現、脳の病理組織学的変化、およびサイトカイン（TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ ）と一酸化窒素合成酵素（iNOS）-mRNAの発現増強がほぼ平行して起こることを観察した（1）。サイトカインによって活性化されたiNOSがアルギニンをシトルリンに変える過程で多量のNOが放出される。とくにミクログリアやグリア細胞で大量に産生されたNOはグリア細胞や周辺のニューロンに細胞毒性を発揮し、細胞死に関与することが推測されている（2、3）。一方、培養神経細胞でプリオンタンパクのペプチド断片であるPrP106-126が細胞毒性を発揮する際、ミクログリアが必須の因子として要求されることが報告されている（4）。このような知見を総合すると、PrPScの

蓄積がサイトカインを誘導し、これがiNOSを活性化して多量のNOが放出され、その結果、空胞変性などの組織変化を引き起こすというシーケンスが推定される。本実験では、この仮説を検証するためにiNOS遺伝子ノックアウトマウスにCJD因子を接種し、野性株との間で病態の発現に差があるかどうかを調べた。

#### [材料と方法]

1. iNOS遺伝子ノックアウトマウス C57BL/6-Nos2<sup>tm1Lau</sup>, homozygous, はJackson Laboratory より購入した。野性株 (C57BL/6) とともにCJD北里1株および対照としてPBSを脳内接種した。症状の発現前の15週目と死亡直前の終末期に脳を採取した。
2. iNOS-およびGFAP-mRNAの検出 脳RNAは即日、Chomczynski らによるシングルステップ法で抽出し(5)、エタノール沈澱後、分析まで-70℃で保存した。RT-PCRは常法に従いcDNAを合成し、それに特異的オリゴヌクレオチドプライマーを加え、PCRを40サイクル行った。PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色した。
3. 病理組織学的検索 mRNAの検出に用いた対側脳半球についてHE染色を行った。

#### [結果]

##### 1. 潜伏期間

表1に示すように、iNOS(+/+)群と(-/-)群はいずれも接種後17週で発症し、両群の間に有意差は観察されなかった。終末期に至るまでの期間についても、両群の間で大きな差は見られなかった。

##### 2. iNOSおよびGFAP-mRNAの発現

図1に示すように臨床的に発症が認められる前の15週目ですでにiNOS-mRNAの発現が明瞭に観察され、23、24週目で増強する傾向にあった。iNOS(-/-)群とPBS接種群ではiNOS-mRNAは検出されなかった。GFAP-mRNAも15週目ですでに検出され、しかもiNOS(-/-)群とiNOS(+/+)群との間に顕著な差は観察されなかった。

##### 3. 病理組織学的検索

典型的な病理組織像を図2に示した。HE染色の結果から、症状発現前の15週目ですでに中程度から激しい空胞変性が脳、小脳に広く観察された。空胞変性の分布状況を表2にまとめた。HE染色像については、iNOS(-/-)群とiNOS(+/+)群との間で個体差以上の病変の程度や分布上の差は認められなかった。

#### [考察]

サイトカインとiNOSに関する一連の実験から、伝達性海綿状脳症に見られる神経細胞の崩壊や脳の空胞変性にサイトカインとiNOS系が必須の因子として関与していないと結論した。すなわち、PrPScの蓄積、TNF $\alpha$ -およびIL1 $\alpha$ -mRNAの発現増強などそれぞれ個々の変化は確認されているにもかかわらず、TNF $\alpha$ 遺伝子ノックアウトマウスおよびiNOS遺伝子ノックアウトマウスを使った接種実験では野性株との間に何らの有為差が観察されなかった。1995年にiNOS遺伝子ノックアウトマウスの作出が相次いで報告された(6,7,8)。多くの場合、iNOS遺伝子ノックアウトマウスは生存期間、細菌やウイルス感染に対する反応などに顕著な変化は認められていない。種々の実験的な神経疾患でiNOSの発現増強が観察されているが(9)、その基本的な意味については今後さらに検討の必要があると考えられる。

#### [謝辞]

マウス脳の病理組織像の評価にご協力いただきました農水省家畜衛生試験場の関川賢二博士と百溪英一博士に深謝いたします。

#### [文献]

- 1) 玉井洋一他：伝達性海綿状脳症の発症機序と炎症性サイトカインおよびNOSとの関連性。厚生省特定疾患遅発性ウイルス感染調査研究班平成8年度研究報告書、43-51, 1997

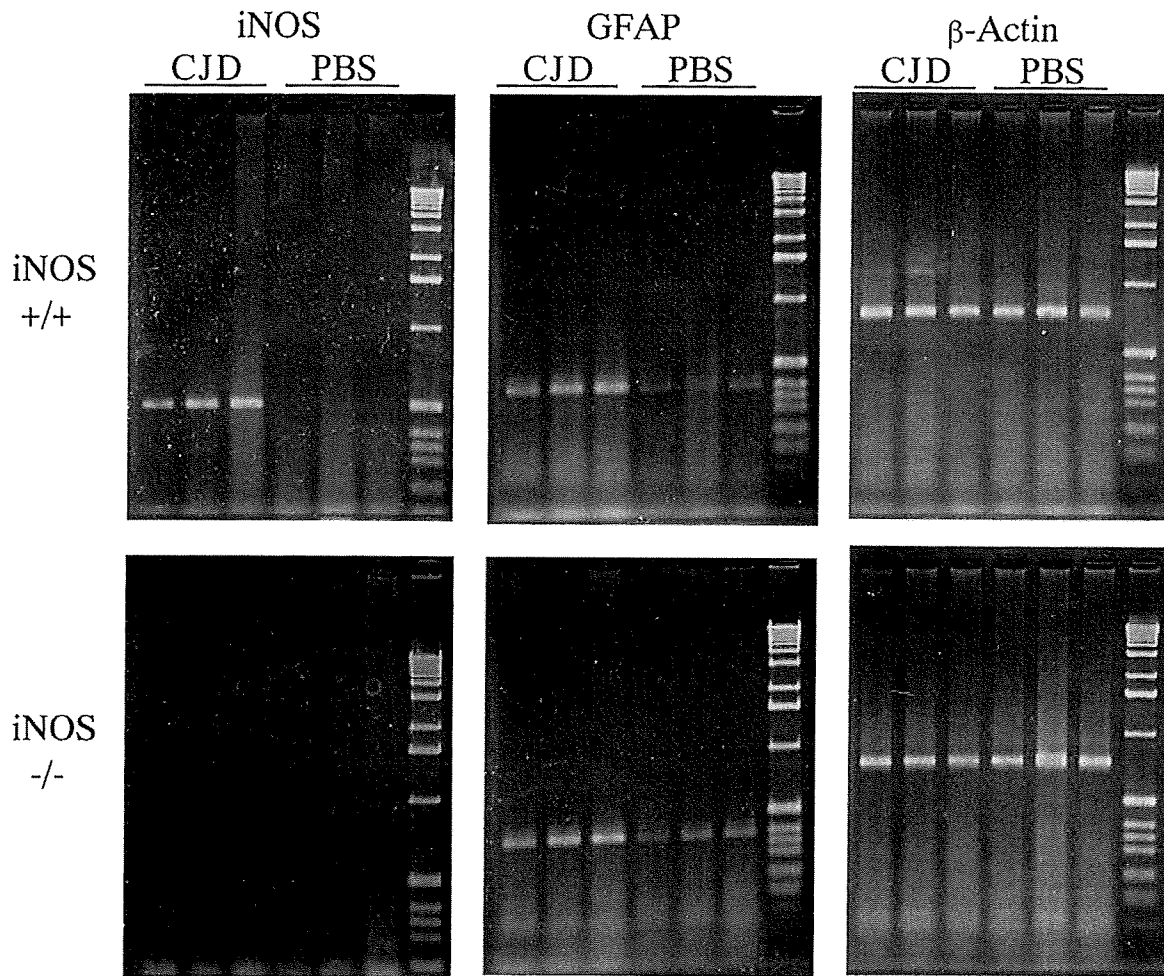
- 2) Nathan C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6:3051-3064, 1992
- 3) Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H.: Nitric oxide synthase isoforms. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 23(part 2):1121-1131, 1994
- 4) Brown D.R., Schmidt B., Kretschmar H.A.: Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature.* 380:345-347, 1996
- 5) Chomczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159, 1987
- 6) MacMicking J.D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D.S., Trumbauer M., Stevens K., Xie Q., Sokol K., Hutchinson N., Chen H., Mudgett J.S.: Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell.* 81:641-650, 1995
- 7) Wei X., Charles I.G., Smith A., Ure J., Feng G., Huang F., Xu D., Muller W., Moncada S., Liew F.Y.: Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 375:408-411, 1995
- 8) Laubach V.E., Shesely E.G., Smithies O., Sherman P.A.: Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc. Natl. Sci. USA.* 92:10688-10692, 1995
- 9) Koprowski H., Zheng Y.M., Heber-Katz E., Frase N., Rorke L., Fu Z.F., Hanlon C., Dietzschold B.: In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc. Natl. Sci. USA.* 90:3024-3027, 1993

表 1. Incubation periods

Mice C57BL/6 - Nos2<sup>tm1Lau</sup>, homozygous  
Agent Kitasato 1  
Injection Intracerebral

	Onset	Terminal
iNOS +/+ (n=7)	17 weeks	20 - 23 weeks
iNOS -/- (n=7)	17	21 - 25

Fig. 1. RT-PCR products of iNOS- and GFAP-mRNA



Samples (left to right): 15, 23 and 24 weeks after the inoculation of CJD-agent or PBS. Right lane, molecular weight marker

图2. 组织病理学 (HE 染色) 的 CJD 受累小鼠脑

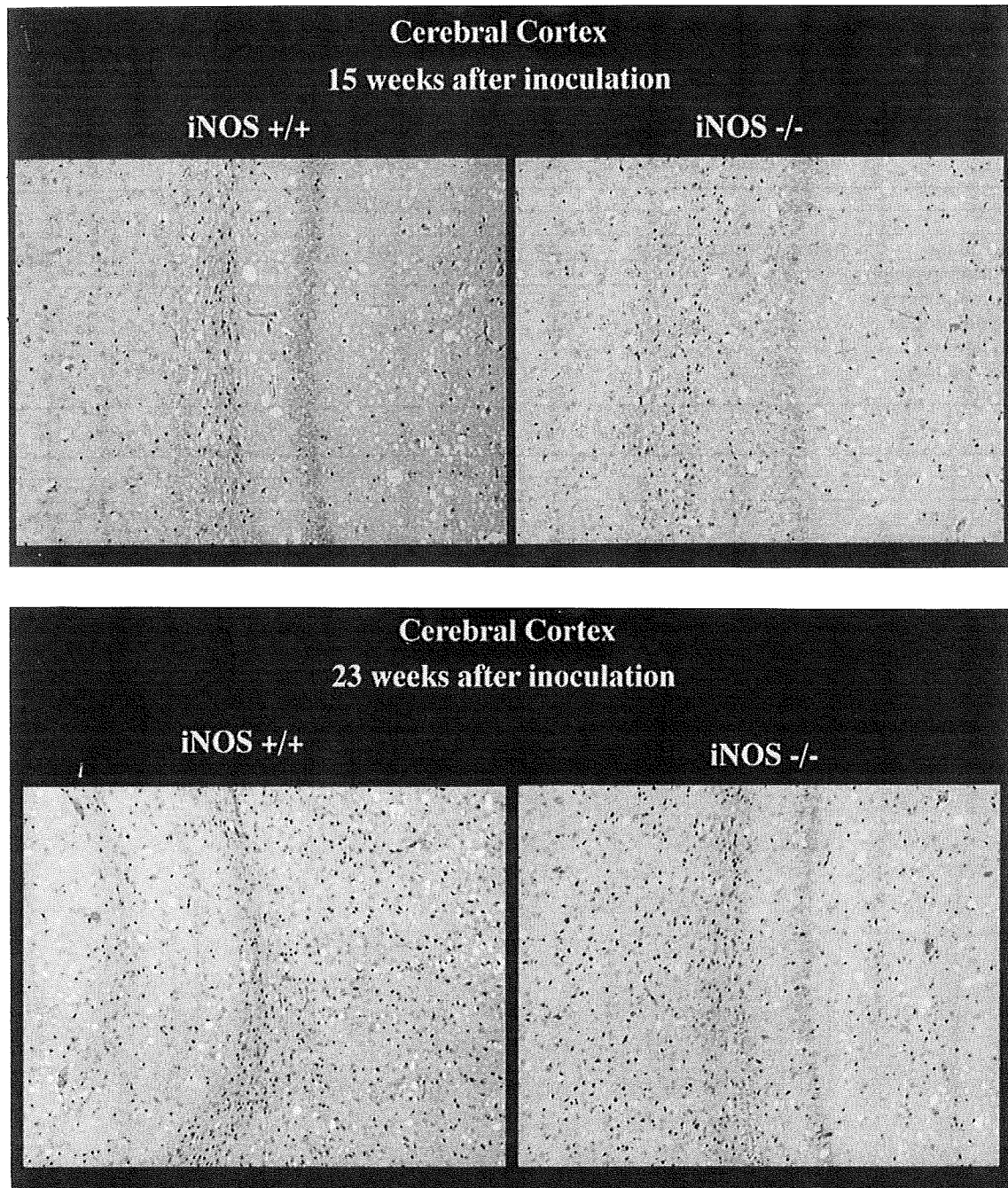




表 2. Vacuolation index

0: no lesion, 1:minimal, 2:medium level, 3: severe, 4:very severe

		Case number of NOS+/-									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inoculum		PBS1	PBS3	PBS4	CJ-A2	CJ-A1	CJ-B2	CJ-B1	CJ-A4	CJ-B3	CJ-C3
Periods(weeks)		15	22	23	15	15	19	20	23	23	24
cerebral cortex		0	0	0	1-2	2-3	1-2	4	3-4	4	3-4
hipocampus		0	0	0	3-4	3-4	2-3	3	3-4	3-4	2-3
thalamus		0	0	0	2-3	2-3	2-3	3-4	2-3	3-4	4
cerebellum		0	0	0	2	1	3	4	4	3	3-4
pons		0	0	0	2-3	1-3	4	4	4	4	4

		Case number of NOS-/-									
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Inoculum		PBS1	PBS3	PBS4	CJ-A3	CJ-A2	CJ-B2	CJ-B1	CJ-B3	CJ-C1	CJ-C4
Periods(weeks)		15	23	24	15	15	22	23	23	24	26
cerebral cortex		0	0	0	3-4	1-2	3	3-4	3-4	3-4	4
hipocampus		0	0	0	1-3	2-3	2-3	2-3	3	3	3-4
thalamus		0	0	0	4	3-4	3-4	3	3-4	2-3	3-4
cerebellum		0	0	0	1	2	4	4	4	4	4
pons		0	0	0	4	1-2	4	4	3-4	4	4

# プリオン病脳組織特異的発現遺伝子の病態形成における役割解明

班 員：片峰 茂 (長崎大学・医・細菌学教室)  
研究協力者：Juraj Kopacek (長崎大学・医・第一薬理学教室)  
坂口 末廣 (長崎大学・医・細菌学教室)

Overexpressing genes and their roles in the pathogenesis of prion diseases of a mouse model

Shigeru KATAMINE\*, Juraj KOPACEK\*\*, Suehiro SAKAGUCHI\*

\*Department of Bacteriology and \*\*The first Department of Pharmacology,  
Nagasaki University School of Medicine

## ABSTRACT

In order to identify the molecules involved in the pathogenesis of prion diseases, cDNA subtraction was performed between the mouse brain tissues affected with an experimental prion disease and the unaffected control tissues. The genes identified as to be upregulated in the prion-infected brain included those encoding a series of lysosomal enzymes (lysozyme M and both isoforms of N-acetylhexosaminidase), a perforin-like protein (macrophage gene-1/macrophage proliferation specific gene-1, Mpg-1/Mps-1), and a radical oxygen scavenger (selenium-independent glutathione peroxidase, GPx). Low levels of transcripts of these genes were detectable in the control brain, but the dramatic, 3-40 times, increases in the expression level occurred between 12 and 16 wk after intracerebral inoculation of a prion, when the spongiform degeneration began to develop in the brain tissues. The PrP<sup>Sc</sup> accumulation was detected by immunoblotting well before 12 wk, suggesting the causal relationship between PrP<sup>Sc</sup> and the gene activation. Immunohistochemistry paired with *in situ* hybridization on the sections of affected brain tissues revealed that the genes for the lysosomal enzymes and Mpg-1/Mps-1 were overexpressed exclusively by microglia which colocalized with spongiform pathologic changes. On the other hand, the expression of GPx gene was restricted to astrocytes distributing throughout the affected brain tissue. These all results indicate that aberrant activation of the lysosomal system and overproduction of radical oxygens are likely to be involved in the pathogenesis of prion diseases, and that microglia play crucial roles in this process by releasing such a neurotoxic substance.

## 【はじめに】

プリオン病は、人のクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) や羊のスクレーピーをはじめとする中枢神経系の伝播性変性疾患である。この疾患は、中枢神経系に海綿状変化を伴う神経細胞死やグリオシスなどの特徴的な病理学的変化を呈する。我々は、前年度プリオン蛋白以外の病態関連遺伝子を同定するために cDNA サブトラクション法を行い、プリオン病感染マウス脳に lysozyme M,  $\beta$ -hexosaminidase (Hexb), macrophage gene-1 (Mpg-1)/ macrophage proliferation specific gene-1 (Mps-1), glutathione peroxidase (GPx) などの過剰発現遺伝子の同定を行った<sup>1)</sup>。今年度は、これらの遺伝子の経時的発現変化、PrP<sup>Sc</sup> 蓄積との関係、および *in situ* hybridization 法による発現細胞の同定を行うことにより、これらの遺伝子の過剰発現とプリオン病病態形成との関係をさらに検討することにした。

## 【方法】

### 1) 感染実験

CJD 病原体である福岡 1 株を ddY マウスに脳内接種し、発症まで経時的に脳を摘出し急速凍結した。対照 (非感染) 脳は、PBS のみを脳内接種したものをを用いた。

### 2) cDNA サブトラクション

福岡 1 株感染及び非感染 ddY マウス脳からの RNA の抽出は Acid Guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform (AGPC) 法を、mRNA の抽出はオリゴ (dT) セルロース (mRNA purification kit; Pharmacia Biotech) を用いて行った。cDNA サブトラクションは、PCR-Select cDNA Subtraction Kit (CLONTECH) を用いて行った。

### 3) ノーザンブロットング法

RNA または mRNA を 1.2 % 変性アガロースゲルにて電気泳動後、HybondN+メンブレン (Amersham) に 20 × SSC を用いてトランスファーした。プレハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション緩衝液 (50% フォルマミド、5 × SSC、2 × デンハルト液、0.1% SDS、100 μg/ml Salmon sperm DNA) 中にて 42 °C で数時間行い、ハイブリダイゼーションは <sup>32</sup>P 標識プローブ (Megaprime DNA labelling system, Amersham) にて上記条件で一昼夜行った。洗いは、2 × SSC / 0.5% SDS で 65 °C 20 分を 2 回行い、さらに 0.2 × SSC / 0.5% SDS で 65 °C 20 分を 2 回行った。シグナルは、X 線フィルム (Konica) に感光することにより検出した。

### 4) ウェスタンブロットング法

DNase I で消化した 20 % 脳乳剤 (40mM Tris-HCl, pH 7.5/10mM NaCl/6 mM MgCl<sub>2</sub>) を 1 % サルコシル存在下で proteinase K (100 μg/ml) 処理を 37 °C 1 時間行った。処理した脳乳剤は Laemmli 緩衝液下で熱処理し、12.5 % SDS-アクリルアミドゲルにて電気泳動後、ニトロセルロースにトランスファーした。ブロッキングは、5 % ミルクを含む PBS/0.2% Tween20 (PBST) にて 1 時間行った。PrP の検出は、0.2 % BSA を含む PBST にて一次抗体<sup>2)</sup> (PrP-N 未合成ペプチドに対する抗ウサギ血清、1 : 2000) を 2 時間反応させ、PBST で洗浄後、<sup>125</sup>I-protein A (Amersham) にて行った。

### 5) *In situ* hybridization 法

感染脳組織を 4 % パラフォルムアルデヒドにて固定した後、5 μm 厚の切片を作成した。脱パラ後、8 mg/ml ペプシンで 37 °C 10 分処理し、ハイブリダイゼーション (50% フォルマミド、10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.6 M NaCl, 0.5 mg/ml yeast tRNA, 0.25 mg/ml salmon sperm DNA, 1% skim milk, 0.25% SDS, 5 × デンハルト液) を 50 °C 16 時間行った。cRNA プローブはジゴキシゲニン-UTP (Boehringer Mannheim Biochem.) でラベルした。洗いは、4 × SSC で数回行い、50% フォルマミド / 2 × SSC で 50 °C 30 分行った。さらに、20 μg/ml RNase A で 37 °C 30 分処理し、0.2 × SSC で 60 °C 20 分洗浄した。シグナルはアルカリフォスファターゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体で検出した。

### 6) 免疫組織化学法

感染脳組織の切片を上記同様に脱パラし、0.3% 過酸化水素で 30 分処理した。正常ウサギ血清でブロッキングしたのち、一次抗体の抗 GFAP 抗体 (1 : 50, Dako) または抗 F4/80 抗体 (1 : 20, Serotec Ltd.) で 30 分間反応させた。シグナルの検出は、ビオチン化抗 IgG 抗体 (1 : 500) とアビジン結合ペルオキシダーゼ (1 : 500, Dako) で行った。

## 【結果】

β-hexosaminidase (HEX) には 2 つの isoform (HEXA, HEXB) が存在する。HEXA は α-と β-subunit からなり、HEXB は 2 つの β-subunit からなる<sup>3)</sup>。β-subunit の過剰発現については、既に報告した<sup>1)</sup>。今回、α-subunit も過剰発現していることが分かった (図 1)。このことは、感染脳では両方の isoform の活性が上昇していること示した。次に、GPx 以外の活性酸素不活化酵素遺伝子について検討した。図 1 に示すように common-type glutathione peroxidase (GSHPx)<sup>4)</sup> の過剰発現を認めたが、catalase, Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) には顕著な発現増強は認められなかった。また、antioxidant protein 1<sup>5)</sup>, mouse macrophage 23-kD protein<sup>6)</sup> にも顕著な発現増強は認められなかった (data not shown)。さらに、lysozyme

M、hexosaminidase の  $\beta$ -subunit (Hexb) , Mpg-1/Mps-1, GPx の遺伝子発現と PrP<sup>Sc</sup> 蓄積との関係を経時的に検討した。すべての遺伝子の発現は、感染後 16 週から活性化が認められ 18 週にはさらに活性化が認められた (図 2 a)。PrP<sup>Sc</sup> は感染後 12 週から検出され 18 週まで増加した (図 2 b)。

感染脳の組織学的検索を行うと、主に collupus colosum, interna capusule, externa capusule の周辺に海綿状変性とグリオシスが認められた (図 3 a)。GFAP 陽性細胞 (アストロサイト) は感染脳全体に認められたが、F4/80 陽性細胞 (ミクログリア) は病変部位に一致して認められた (図 3b, c)。また、F4/80 陽性細胞が神経細胞や空包を取り囲んでいる所見も認められた (data not shown)。さらに *in situ* hybridization 法にて、ミクログリアが lysozyme M, Hexa と Hexb, Mpg-1/Mps-1 を発現しており、アストロサイトが GPx を発現していることが分かった (data not shown)。

#### [考察]

我々は、PCR を利用した cDNA サブトラクション法である Suppressive subtraction hybridization 法<sup>7)</sup> を用いプリオン病感染マウス脳内に過剰発現する遺伝子の同定を行い、それらの遺伝子の過剰発現とプリオン病病態形成との関係を検討した。今回同定した遺伝子は、活性酸素不活性化に関与している GPx と GSHPx, ライソゾーム酵素である lysozyme M と HEXA と HEXB、それにパーフォリンと相同性の高いアミノ酸配列を持つ Mpg-1/Mps-1 であった。

GPx と GSHPx の活性酸素不活性化酵素遺伝子の過剰発現は、プリオン感染脳内で活性酸素が過剰産生されていることを示唆した。そして、その他の活性酸素不活性化酵素遺伝子 (catalase, Cu/Zn SOD, antioxidant protein 1, mouse macrophage 23-kD protein) が発現増強されていないことは、その不活性化に glutathione が深く関わっていることを示した。また、PrP<sup>Sc</sup> は感染後 12 週から検出され、遺伝子の活性化は感染後 16 週から認められたことは、PrP<sup>Sc</sup> 蓄積が遺伝子活性化に関与している可能性を示唆した。さらに、活性化したミクログリアが主に病変部位に認められ、lysozyme M、HEXA、HEXB、Mpg-1/Mps-1 といった神経細胞毒性を有すると考えられる遺伝子産物を過剰に産生していることは、ミクログリアが病態形成に深く関与していることを示唆した。また、アストロサイトは GPx を発現することによって、ミクログリアから産生された活性酸素を不活性化し自己防衛を行っていることが示唆された。

これらの実験結果を総括すると、プリオン病感染脳では、まず PrP<sup>Sc</sup> の産生が起こり、ミクログリアが活性化され、そして活性化されたミクログリアが活性化酸素やライソゾーム酵素をはじめとした神経細胞毒性を有する物質を過剰産生し、神経細胞死が起こるといった一連の過程が考えられる。

#### [文献]

- 1) 片峰 茂、Juraj Kopacek、坂口末廣、西田教行：プリオン病感染マウス脳特異的に発現する遺伝子の同定。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 9 年度研究報告書：46-51、1998
- 2) Shinagawa, M., Munekata, E., Doi, S., Takahashi, K., Goto, H., Sato, G.: Immunoreactivity of synthetic pentadecapeptide corresponding to the N-terminal region of the scrapie prion protein. J Gen Virol. 67: 1745-1750, 1986
- 3) Beccari, T., Orlacchio, A., Costanzi, E., Appolloni, M-G., Laurenzi, A., Bocchini, V.: Constitutive expression of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase in a microglial cell line: transcriptional modulation by lipopolysaccharide and serum factors. J Neurosci Res. 50: 44-49, 1997
- 4) Kayanoki, Y., Fujii, J., Islam, K-N., Suzuki, K., Kawata, S., Matsuzawa, Y., Taniguchi, N.: The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. J Biochem. 119: 817-822, 1996
- 5) Tsuji, K., Copeland, N. G., Jenkins, N.A., Obinata, M.: Mammalian antioxidant protein complements alkylhydroperoxide reductase (ahpC) mutation in *Escherichia coli*. Biochem J. 307: 377-381, 1995
- 6) Ishii, T., Yamada, M., Sato, H., Matue, M., Taketani, S., Nakayama, K., Sugita, Y., Bannai, S.: Cloning and

characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. *J Biol Chem.* 268: 18633-18636, 1993

- 7) Diatchenko, L., Lau, Y-F. C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D.: Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030, 1996

図1 プリオン病感染マウス脳内における過剰発現遺伝子

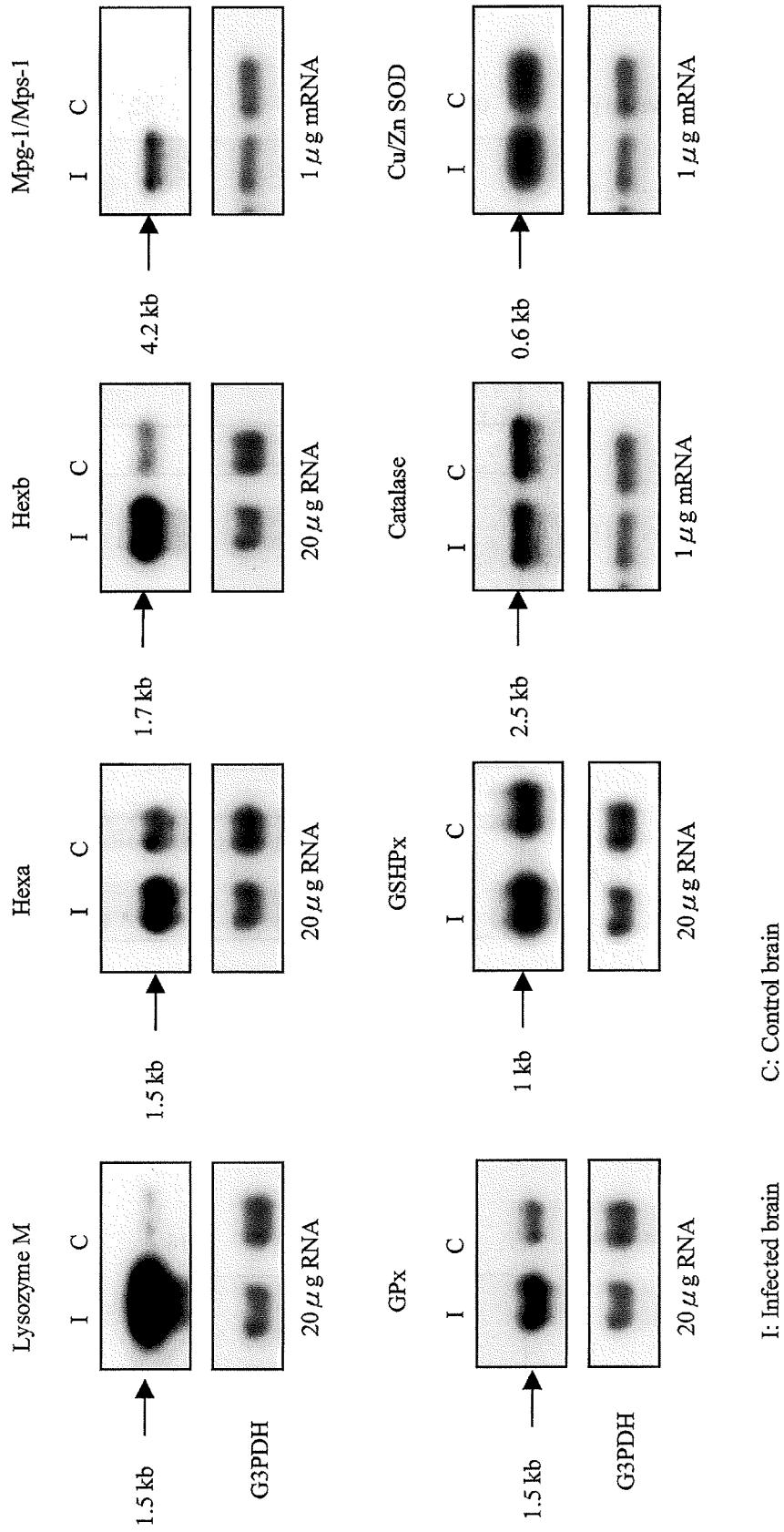


図2 過剰発現遺伝子とPrP<sup>Sc</sup>との経時的変化

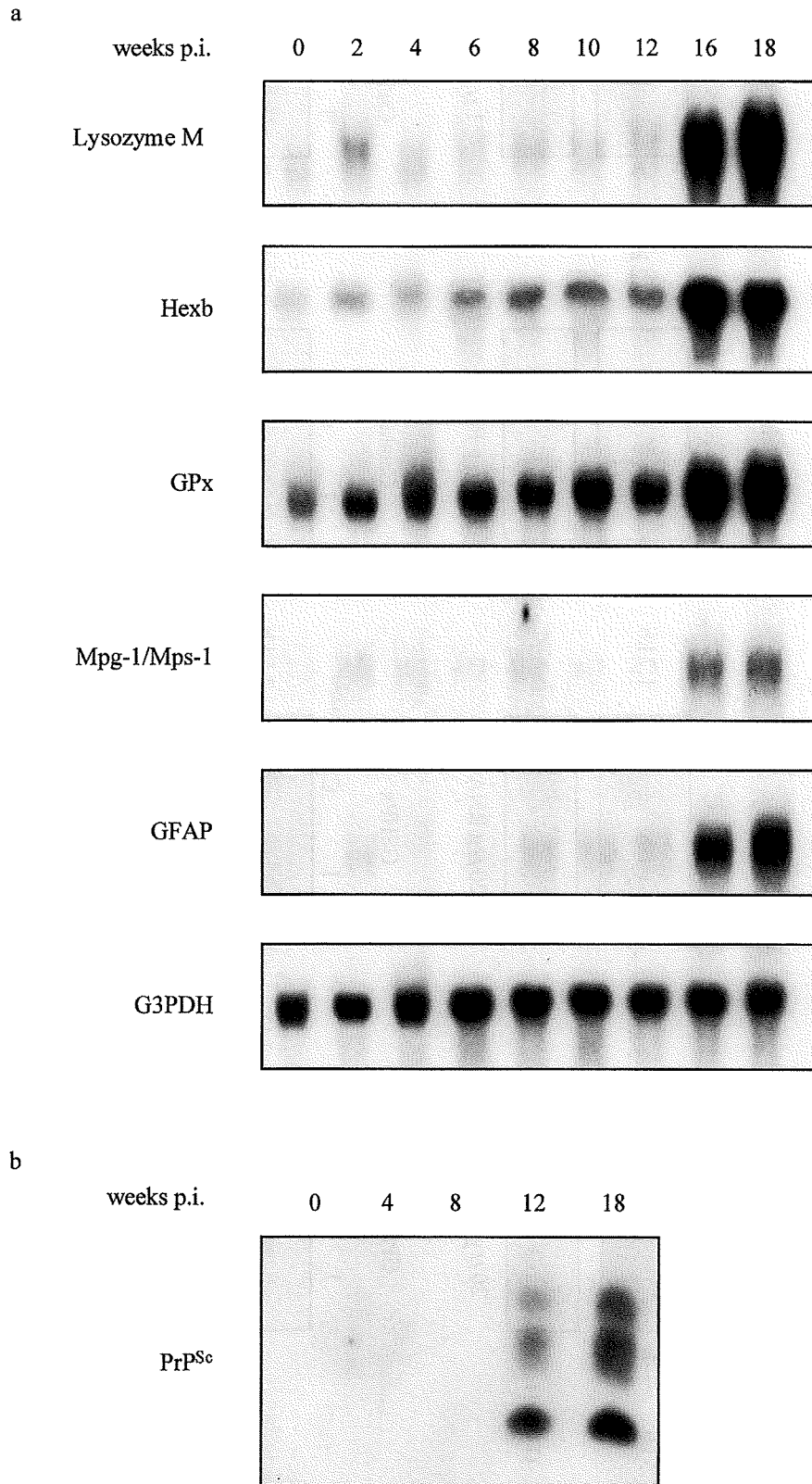
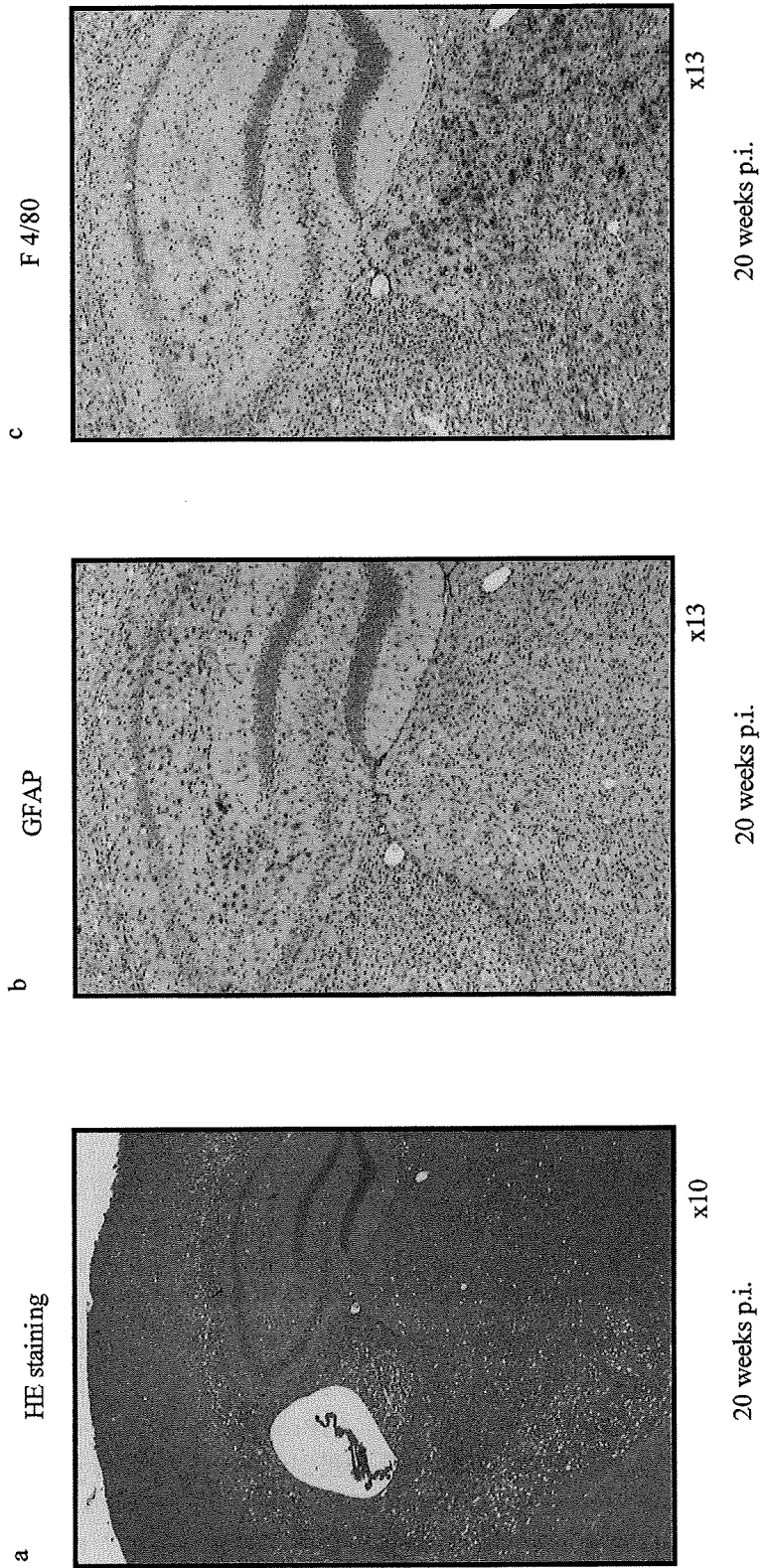


図3 プリオン感染脳における病理組織学的変化とグリア細胞





# 感染型プリオン蛋白質の産生および安定性に影響する因子の探索

班 員：堂浦 克美（九大・医・脳研病理）  
研究協力者：岩城 徹（九大・医・脳研病理）

Screening of chemical agents reducing PrPres accumulation

Katsumi DOH-URA, Toru IWAKI

Department of Neuropathology, Neurological Institute, Kyushu University

## ABSTRACT

In order to get basic information to develop chemotherapy for prion diseases, we examined effects of some chemical agents on infection-associated prion protein (PrPres) accumulation in persistently infected culture cells. PrPres was extracted from the cells incubated in the presence of chemical agents, and it was analyzed by Western blotting. Normal cellular prion protein (PrPc) was also analyzed by metabolic labeling and immunoprecipitation method to examine metabolic alteration induced by the chemical agents. First we found that lysosomotropic amines and thiol protease inhibitors inhibit PrPres accumulation in the cells, while inhibitors for serine proteases or acid proteases did not. Next, protein kinase A inhibitors were shown to inhibited PrPres accumulation in the cells without changing of PrPc metabolism. However, other inhibitors for protein kinases such as protein kinase C, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase, myosin light chain kinase and casein kinase had no effect on PrPres accumulation. In addition, reactive blue 2 dye, which has a similar structure in part as congo red (potent PrPres inhibitor), inhibited PrPres accumulation and did not influence PrPc metabolism. Reactive blue 2 was also shown to stain PrP amyloids in the brain of prion-disease patient, but it did not exert any direct interaction with PrPres in a similar manner as congo red.

### 〔はじめに〕

プリオン病患者の生命予後を改善するための治療薬剤開発の基礎的研究として、スクレイピー持続感染細胞を用いて感染型プリオン蛋白質（PrPres）の産生や安定性に影響する化学物質の探索を行った。PrPresが神経細胞内に蓄積する機序についてはまだ十分には解明されていないが、スクレイピー持続感染細胞においてはカベオラあるいはクラスリン被包小胞内で正常型プリオン蛋白質（PrPc）からPrPresへの構造変化が起こり、PrPresはライソゾームに蓄積することが明らかとなっている。PrPresの蓄積を抑えるための化学療法のターゲットとしては、（１）PrPcの産生を抑える、（２）PrPresへの構造変換を抑える、（３）PrPres沈着の除去が考えられる。我々は、昨年度までにライソゾームに存在する蛋白分解酵素の発現が、PrPresの蓄積と相関してプリオン病罹患脳で増加することを明らかにしている。そこで、（３）をめざしライソゾーム/ライソゾーム酵素に作用する化学物質がPrPres沈着に影響するかどうか調べた。つぎに、PrPc産生からPrPres蓄積に至るまでに関与している細胞内情報伝達系については解明が遅れているが、細胞内情報伝達系を修飾する化学物質の中にPrPres蓄積を抑制するものがないか検討した。さらに、（２）についてはすでにCongo redをはじめ有効な化学物質が知られているが、構造が類似するものの中に他に有効な

ものが存在しないか検討した。

#### [材料および方法]

細胞培養 米国NIHロッキー山脈研究所で樹立されたスクレイピー持続感染神経芽細胞腫細胞(1,2)を(Caughey博士より品川先生、村本先生を通じて供与された)10%FBS加MEM培地で培養した。confluent細胞数の10分の1の細胞を播き、半日後に試薬を培地中に加え、3.5日間培養を続けた。細胞をPBSで洗浄したのち、生細胞数を数え細胞のviabilityの指標とした。対照(溶媒のみ)群に比し生細胞数の少ない試薬濃度群は以下の実験から除いた。

PrPresの解析 培養細胞をlysis buffer(0.5% NP-40, 0.5% Na deoxycholate, PBS)で溶かしDNAなどの不溶性成分を低速遠心で除いた。25 $\mu$ g/ml Proteinase Kを加え、37 $^{\circ}$ C 30分反応させたのち、PMSFで反応を止めた。330,000 $\times$ g, 20 $^{\circ}$ C, 1時間遠心し、得られた沈殿をSDS-PAGE, Western blot法で解析した。抗体はマウスプリオン蛋白のAA89-103, AA218-232の合成ペプチドを兔に免疫して得られた2種を用いた。シグナル検出は化学発光法を用いた。

PrPcのmetabolic labeling confluentな細胞をPBSで洗浄し、1%FBS加MEM(Met-, Cys-)を加え30分間培養した。試薬とTrans 35S-labelを加え100分間培養したのち、10%FBS加MEMと試薬を加え20分から8時間のchaseを行った。細胞をPBSで洗浄したのち、lysis bufferで溶解した上清を用いて免疫沈降を行った。免疫複合体の沈殿をSDS-PAGEとautoradiogramで解析した。一方、細胞膜上のGPIアンカーを持つPrPcは、同様なmetabolic labelingを行った細胞をPBSで洗浄後に1.6 $\mu$ mol/ml PIPLCで37 $^{\circ}$ C 30分反応させ、免疫沈降でPrPcを回収し同様に解析した。

#### [結果]

##### Lysosomotropic aminesの効果

ライソゾームに親和性が高い試薬であるNH<sub>4</sub>Cl, chloroquine, quinacrineについて調べた。NH<sub>4</sub>Clは2.5mMより、chloroquineは1 $\mu$ Mより、quinacrineは0.5 $\mu$ Mより明らかなPrPresシグナルの減少が認められた。

##### Protease inhibitorsの効果

ライソゾームに移行しそのpHを高め酵素活性を阻害する働きのあるlysosomotropic aminesがPrPresのシグナルを減少させたことが確かめられたので、次にライソゾームに存在するカテプシンなどの蛋白質分解酵素に対する阻害剤の効果について調べた。Cysteine (thiol) proteasesの阻害剤であるE-64は、5 $\mu$ MよりPrPresシグナルの減少が明らかに認められた。しかし、acid proteasesの阻害剤やserine proteasesの阻害剤であるpepstatin AやAEBSF, aprotininはいずれも細胞のviabilityに影響がでない濃度内ではPrPresシグナルの減少が認められなかった。

##### Protein kinase inhibitorsの効果

PrPcの産生、PrPresへの変換・蓄積に細胞内情報伝達系の因子がどうかかわるかは不明であるので、各種のprotein kinase inhibitorsを用いて検討した。Protein kinase Aの阻害剤であるH-89やKT5720ではそれぞれ2.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ Mより明らかにPrPresシグナルの減少が認められた。しかしながら、それ以外のprotein kinase C, protein kinase G, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase, myosin light chain kinase, casein kinaseなどのリン酸化酵素に対するinhibitorsでは、細胞のviabilityに影響がでない濃度内ではPrPresシグナルの減少が認められなかった。

このprotein kinase A inhibitorsによる働きが、PrPcの産生や代謝を変化させた結果である可能性についてはPrPcのmetabolic labelingにより検討した。20分から8時間のchaseを行ったが、H-89によるPrPcの代謝への直接的な影響は認められなかった。また、細胞膜上に発現しているGPIアンカーを持つPrPcについて、同様にmetabolic labelingとPIPLCを用いて調べたが、H-89およびKT5720による変化は観察されなかった。

##### Reactive blue 2の効果

身近に使われている化学物質の中からcongo redと同様な働きを期待できる化学物質をその構造

の類似性から探索したところ、色素アフィニティークロマトグラフィーのリガンドとして一般的に使われている reactive blue 2 が候補として挙げられた。Reactive blue 2 は 100 $\mu$ M 以上まで細胞の viability に影響が出なかったが、5 $\mu$ M より明らかに PrPres シグナルの減少をきたした。Reactive blue 2 による PrPc への影響の有無を metabolic labeling と PIPLC を用いて調べたが、PrPc の代謝への直接的な影響は認められなかった。

また、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病患者の小脳を reactive blue 2 を使って congo red 染色と同様に染色したところ、PrP のアミロイド斑（クールー斑）が青色に染色されたことより、reactive blue 2 が PrP アミロイドと直接結合することが示唆された。Congo red の作用として PrPres と強固に結合して PrPc の変換反応を阻害することが Gabizon ら<sup>3)</sup>により報告されている。そこで、同様な作用が reactive blue 2 にも見られるかどうか超遠心で精製した PrPres の懸濁液と感染細胞溶解液の両者を用いて検討した。これらの試料を reactive blue 2 と反応させても通常の SDS-PAGE のゲル中に入らないような複合体を形成することはなく、Western blot で PrPres シグナルの変化は見られなかった。

#### [考 察]

本年度の研究により、ライソゾームの機能、特に cysteine proteases の活性を抑えることにより PrPres の蓄積が抑えられることが判明した。昨年度までの研究で、ライソゾームに存在する蛋白分解酵素の発現が、PrPres の蓄積と相関してプリオン病罹患脳で増加することを明らかにしたが、ライソゾーム酵素の発現増加が PrPres の蓄積や神経細胞死に伴う 2 次的な反応であるばかりでなく PrPres の蓄積に促進的に働いている可能性がある。Cysteine protease inhibitors が PrPres の蓄積と神経細胞変性を抑える治療薬となる可能性があり、今後動物実験にて確かめる必要がある。

また、protein kinase A inhibitors が PrPres の蓄積を抑えることを明らかにしたが、protein kinase A inhibitors が PrPc の代謝に影響せず、PrPres への変換過程あるいは PrPres 除去過程において作用していることが判明した。protein kinase A は様々な生命現象に関わっているため、その inhibitors が臨床応用されることは困難であると考えられる。しかし、その作用機序をさらに解明していくことにより新たな治療薬剤の開発に結び付くものと期待される。

さらに、reactive blue 2 が PrPres と結合し、その蓄積を阻害することが判明した。Reactive blue 2 はもっとも一般的に使われている色素アフィニティークロマトグラフィーのリガンドであり、この色素アフィニティークロマトグラフィーによる PrPres の除去と言った臨床応用の可能性が考えられる。

#### [文 献]

- 1) Caughey B and Race RE. : Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. J Neurochem. 59:768-771, 1992
- 2) Caughey B and Raymond GJ. : Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. J Virol. 67:643-650, 1993
- 3) Caspi S, Halimi M, Yanai A, et al. : The anti-prion activity of congo red: putative mechanism. J Biol Chem. 273:3484-3489, 1998

# プリオン蛋白質遺伝子欠損マウス小脳における グルタミン酸トランスポーター EAAT4 遺伝子発現の解析

班 員：黒田 康夫（佐賀医科大学・医・内科学）  
片峰 茂（長崎大学・医・細菌学）  
研究協力者：佐藤 準一（佐賀医科大学・医・内科学）  
雪竹 基弘（佐賀医科大学・医・内科学）  
黒原 和博（佐賀医科大学・医・内科学）  
宮本 勉（長崎大学・医・細菌学）

The unaltered expression of EAAT4 mRNA in the cerebellum of mice devoid of the prion protein gene

Yasuo KURODA, Jun-ichi SATOH, Motohiro YUKITAKE, Kazuhiro KUROHARA,  
Shigeru KATAMINE, Tsutomu MIYAMOTO

Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Saga Medical School  
and Department of Bacteriology, Nagasaki University School of Medicine

## ABSTRACT

Excitatory amino acid transporter type 4 (EAAT4) is a Purkinje cell-specific, postsynaptic glutamate transporter that plays a role in adjustment of the extracellular glutamate concentration. To investigate the role of EAAT4 in the pathogenesis of selective loss of Purkinje cells in the cerebellum of mice devoid of prion protein gene ( $PrP^{-/-}$ ), EAAT4 mRNA expression was studied by semiquantitative RT-PCR analysis in the cerebellar and cerebral tissues isolated from  $PrP^{-/-}$ ,  $PrP^{+/-}$ , or  $PrP^{+/+}$  mice at ages of 35 and 70 weeks. The levels of EAAT4 mRNA expression did not significantly differ between  $PrP^{-/-}$  and control mice in the cerebellum. Furthermore, the expression of EAAT4 mRNA was detected at substantial levels in the cerebral cortex of all the mice examined. Our results indicate that EAAT4 mRNA expression is not affected by either the existence or the absence of  $PrP^C$  in the cerebellar tissues, and suggest that EAAT4 may not play a key role in the selective death of Purkinje cells in  $PrP$ -knockout mice.

## 【はじめに】

プリオン蛋白質 ( $PrP^C$ ) は細胞膜表面上に glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchor で結合している糖蛋白質で、ほとんど全ての細胞で構成的に発現されているが生物学的機能は未だ明らかではない。Creutzfeldt-Jakob disease や Gerstmann-Strussler-Scheinker syndrome 等プリオン病罹患脳では、 $PrP^C$  と蛋白質一次構造は完全に同一で、高次構造が異なり難溶性・凝集性・感染性を示す異常型プリオン蛋白質 ( $PrP^{Sc}$ ) が蓄積し、広汎な神経細胞死・海綿状変性およびアストログリア・ミクログリアの増生が見られる。最近  $PrP^C$  遺伝子欠損 ( $PrP^{-/-}$ ) マウスでは  $PrP^{Sc}$  が感染しないこと [1]、海馬神経細胞で GABA<sub>A</sub> receptor-mediated fast inhibition が障害されていること [2]、サーカディアンリズム異常があること [3] が報告され、感染成立には宿主に鋳型となる  $PrP^C$  の存在が必須であること、 $PrP^C$  は神経細胞機能遂行に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また  $PrP^{-/-}$  マウスでは発育過程は正常だが、生後 70 週令頃から小脳失調が観察され、病理学的に小脳 Purkinje 細胞選択的変性脱落を認めること [4] が報告された。Excitatory amino acid transporter type 4 (EAAT4) はグルタミン酸トランスポーターの一つで、小脳 Purkinje 細胞 dendritic spine 特異的に発現され [5,6]、シナプス間隙に放出されたグルタミン酸