

静止期の状態になることが示唆された。

F.研究発表

1.論文発表

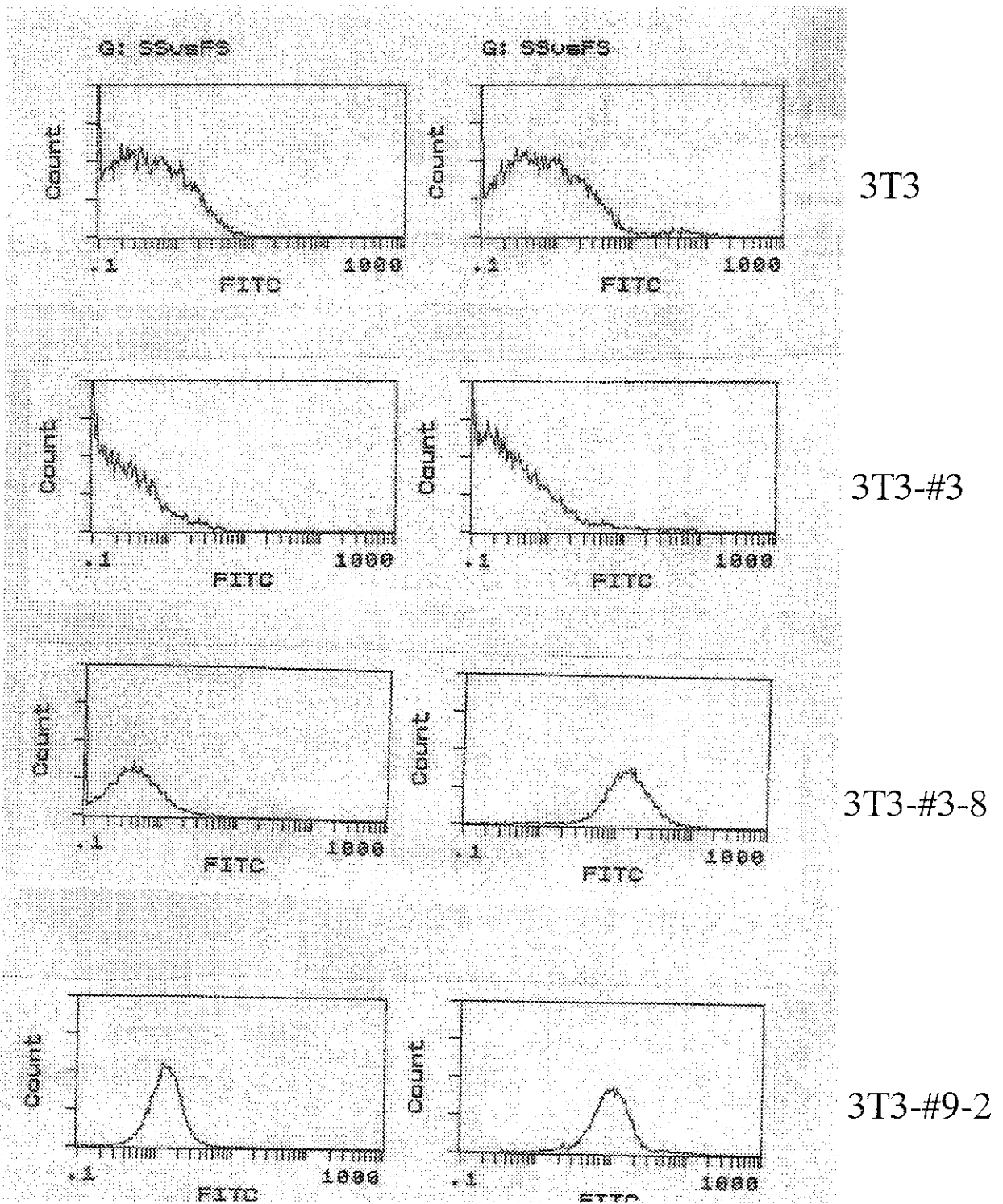
なし

2.学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、福島誉子、小室勝利：ヒトプリオン蛋白発現細胞株の解析。第47回日本ウイルス学会。1999年。

G. 知的所有権の取得状況

なし



2nd-Antibody

3F4 Antibody

Fig.1 Expression of prion protein on transfected cells

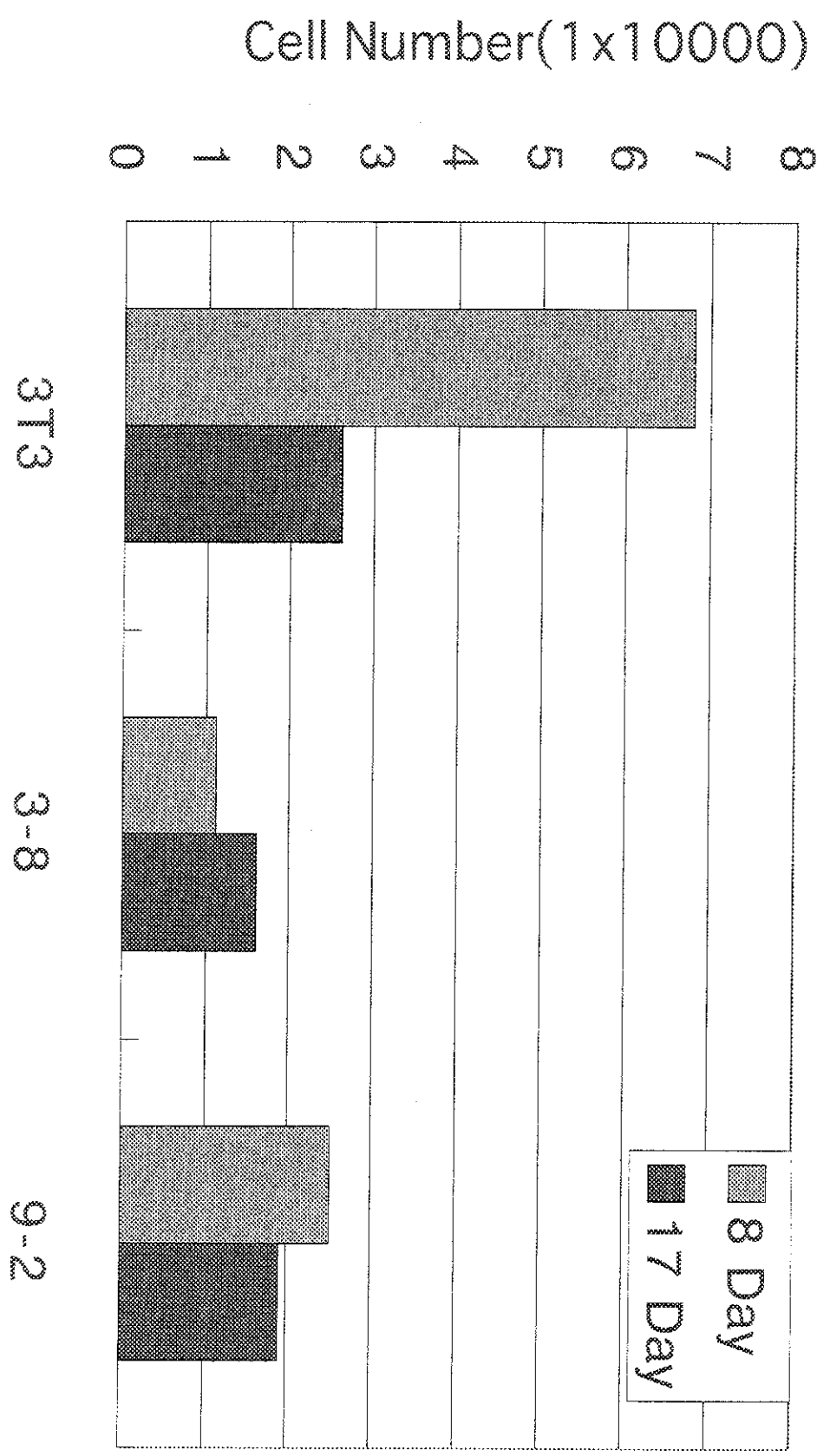


Fig.2 Alive Cell Number on Pr Transfectant Cell Line

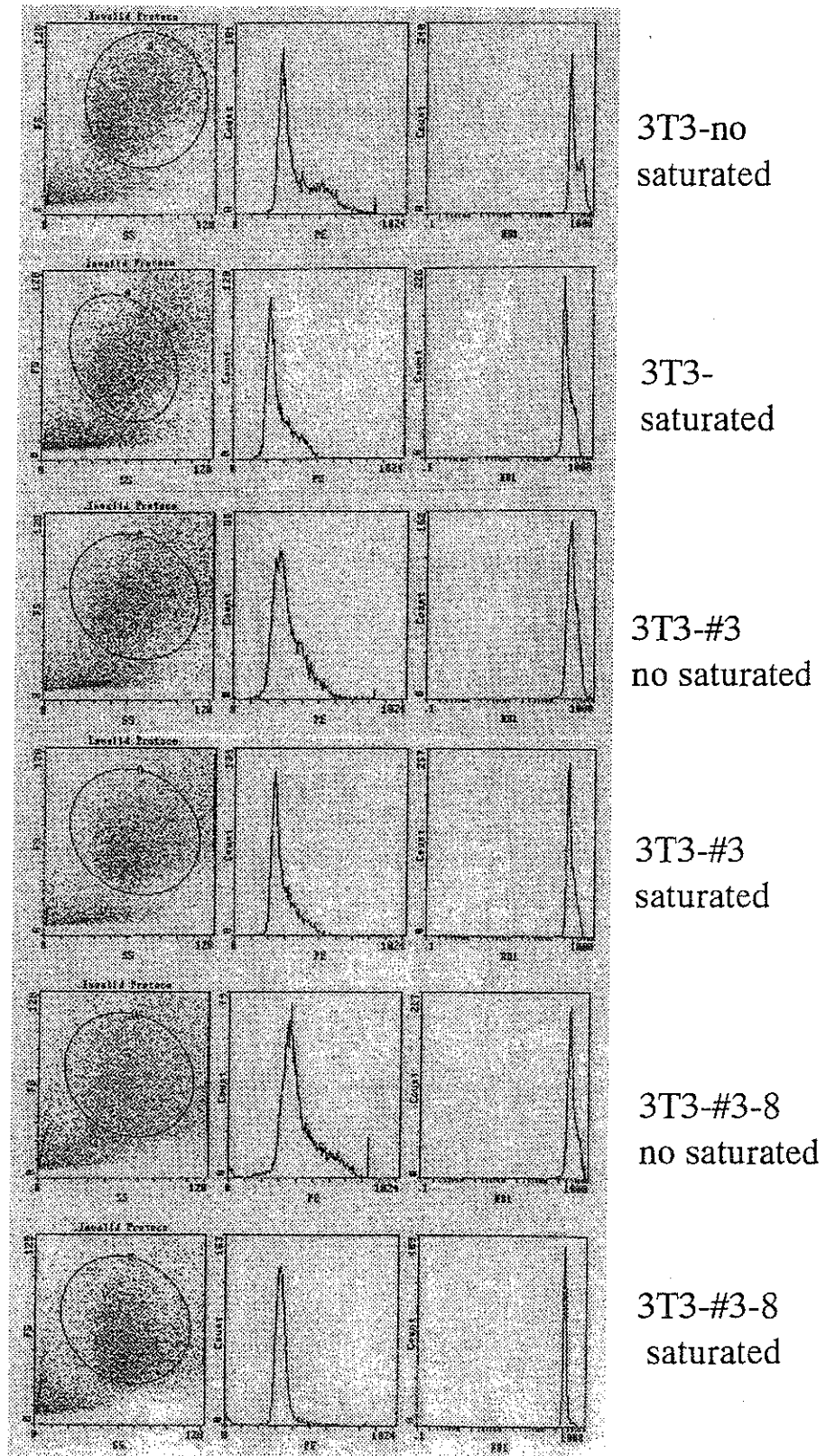


Fig.3 Cell cycle on prion protein expressing cells

厚生科学研究費補助金（研究事業）
分担研究報告書

プリオン病のバイオアッセイに関する研究

分担研究者 北本哲之 東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野 教授

研究要旨

ヒト・プリオンに対する高い感受性を示す動物モデルの樹立に成功したが、今年度は遺伝子導入した動物の中で、レコンビナント・プリオン蛋白の発現量によって、モデル動物の感受性が変化するのかを検討した。2つのヒト型モデルを利用してこの検討を行ったところ、予想外に高い発現量を示すモデル動物が高い感受性を示すのではなく、ほぼ野生型マウスにおけるプリオン蛋白の発現量と等量の発現を示すモデル動物が最も感受性の高いモデルであることが明らかとなった。

A. 研究目的

プリオン病の高感度バイオアッセイ法を確立するにあたり、問題となるのはそれぞれのプリオン病にはいろいろな宿主動物がいることである。例えば、CJDの場合はヒト型のプリオン蛋白の導入モデルが必要となり、スクレピーの場合はヒツジ型が必要となる。そこで、それぞれの宿主動物に即した遺伝子導入モデルと作製し、高感度のバイオアッセイモデルと樹立することが本研究の主な目的である。

B. 研究方法

今年度は、ヒト型のトランスジェニック・マウスのレコンビナント蛋白の発現量が違う5つの系統に関する感染実験を行った。発現量を野生型マウスと比較したところ、ChW#30が0.6倍、ChW#59が9倍、ChW#69が18倍、129#12が2倍、129#21が4倍であった。ChWシリーズはコドン129がMethionine、129シリーズはコドン129がValineであるトランスジェニックマウスである。ほとんど、全てのマウスは内因性の野生型のプリオン蛋白の影響を除くため、ノックアウト・マウスと交配しレコンビナントプリオン蛋白のみを発現するモデルにしている。感染実験の接種材料としては、遺伝子変異がなく

コドン129がMet/Metで、コドン219がGlu/Gluの孤発例CJDを選んだ。

C. 研究結果

ChWシリーズでは、#30（0.6倍）が156 ± 14.2日（発病11匹/接種11匹）、#30のホモ（1.2倍）が147 ± 9.9日（4/4）、#59（9倍）が >300日（0/2）、#69（18倍）が260—270日（0/2）であったが、#69に関しては異常プリオン蛋白の沈着はごく一部で見られたものの、過剰発現症状が強くプリオン病の発病には至っていないと考えた。一方、129シリーズでは、#12（2倍）が175 ± 15.3日（18/18）、#21（4倍）が192 ± 4.0日（3/3）という結果が得られた。

D. 考察

マウス・プリオン蛋白やハムスター・プリオン蛋白の遺伝子導入の結果と異なり、ヒト・マウスのキメラ型のプリオン蛋白の遺伝子導入モデルでは、レコンビナント蛋白の高い発現量が必ずしも高い感受性を示さないことが明らかとなった。ChWの系では、ほぼ野生型マウスの発現量の等量発現しているモデル（#30のホモ）が最適であること、また129シリーズでも発現量が増

すにしたがって潜伏期間が延長することが示された。これは、意外な結果であり、いまのところ説明しうる可能性としては、キメラ型にすることによって正常なコンフォメーションを取り難い分子が存在しPrP^{Ab^{-Con}} (Abnormal-Conformation) はPrP^{Sc}とはならずむしろPrP^{Sc}へのConversionを抑制しているのではないかということである。高い発現量のモデル動物においては、当然PrP^{Ab^{-Con}}の量も高く、この分子の増加がPrP^CからPrP^{Sc}への変換を押さえることによって感受性を低下させている可能性が示唆される。

E. 結論

今年度得られた結果から、少なくともヒト・マウスのキメラ型プリオン蛋白を遺伝子導入したモデル動物においては、野生型マウスのプリオン蛋白の発現量にほぼ等しい発現量のモデルが潜伏期間が最短であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuda H, Mitsuda H, Nakamura N, Furusawa S, Mohri S, Kitamoto T:

A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23:189-194, 1999

2) Shimizu S, Hoshi K, Muramoto T, Homma M, Ironside JW, Kuzuhara S, Sato T, Yamamoto T, Kitamoto T: Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques after cadaveric dural grafting. *Arch. Neurol.* 56: 357-362, 1999

3) Yamada H, Itoh Y, Inaba A, Wada Y, Takashima M, Satoh S, kamata T, Okeda R, Kayano T, Suematsu N, Kitamoto T, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. An inherited prion disease with PrP

P105L mutation: clinicopathological and PrP heterogeneity. *Neurology* 53:181-188, 1999

4) Hainfellner JA, Parchi P, Kitamoto T, Jarius C, Gambetti P, Budka H. A novel phenotype in familial Creutzfeldt-Jakob disease: Prion protein gene E200K mutation coupled with Valine at codon 129 and type 2 protease-resistant prion protein. *Ann. Neurol.* 45: 812-816, 1999

5) Nagashima T, Okawa M, Kitamoto T, Takahashi H, Ishihara Y, Ozaki Y, Nagashima K. Wernicke encephalopathy-like symptoms as an early manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease in a chronic alcoholic. *J. Neurol. Sci.* 163: 192-198, 1999

6) Murayama J, Shin R-W, Higuchi J, Shibuya S, Muramoto T, Kitamoto T: Interaction of Aluminum with PHFt in Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration evidenced by desferrioxamine-assisted chelating autoclave method. *Am. J. Pathol.* 155: 877-885, 1999

7) Yamasaki M, Oyanagi K, Mori O, Ohyama M, Terashi A, Kitamoto T, Katayama Y. Variant Gerstmann-Straussler syndrome with the P105L prion protein gene mutation: an unusual case with nigral degeneration and widespread neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol.* 98: 506-511, 1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
な し

2. 実用新案登録
な し

3. その他
な し

厚生科学研究費補助金（振興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

白オリックスプリオン遺伝子を用いたトランスジェニックマウスの作成及び
ノックアウトマウスとの交配

分担研究者 小野寺 節 東京大学農学部応用免疫学教室教授

研究要旨

オリックス型トランスジェニックマウスを作成した。脳及び心筋の病理学的変化が観察された。

A. 研究目的

牛型プリオン病原体について牛や羊の数千倍感受性が高いと考えられるオリックスについてプリオン遺伝子をクローニングして、遺伝子構造を決定する。この分離した遺伝子について、すでに我々の開発しているプリオン遺伝子ノックアウトマウスを用いてトランスジェニック動物を作製する。

B. 研究方法

前年得られたマウスについてノックアウトマウスと交配し、オリックス型プリオン遺伝子(o-Prnp)マウスを作製した。また、前年得られたマウスについて、臓器毎にオリックス型遺伝子のRT-PCR及びノーザンブロッティングをおこなった。さらに異常の見られたマウスについて、病理組織学的検索および、心電図の波形検査を行った。

C. 研究結果

トランスジェニックマウスについて、RT-PCRを行い、脳、筋肉、心臓、腎臓にオリックス遺伝子のmRNAを検出した、さらに、ノーザンブロッティングにより、心臓に強い陽性バンドが観察された。病理組織学的には大脳海馬、骨格筋の一部に変性が観察された。さらに心臓において心室部心筋空胞変性が多数観察された。マウスは、20週齢より心臓負荷(40mg/kg アトロピン)により心電図に異常波形を示した。また、50週齢を越えたマウスは負荷無しでも異常波形を示した。

D. 考察

過去において、マウス及びヒツジプリオン遺伝子を過発現することにより、心臓に異常を認めた報

告は見られない。これらの結果より、o-Prnpトランスジェニックマウスの有用性が確認された。伝達性海綿状脳症はヒトや、ヒツジ、ウシなど多くの哺乳動物に見られる神経変性疾患であり、プリオン蛋白の異常によって起こるプリオン病である。シロオリックスやムフロンなどの野生反芻獣のプリオン病発症までの潜伏期間はヒツジのそれよりも短い。一般に海綿状脳症の伝達性および発症までの期間は各種のプリオン蛋白の数個のアミノ酸の違いによるという可能性が示唆されているo-Prnpはヒツジのプリオン遺伝子と1アミノ酸異なるのみで、この1アミノ酸の違いが病原体に対する感受性、及び組織病変に関与している可能性が考えられる。

E. 結論

他動物種よりも潜伏期の短いシロオリックスのプリオン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いた迅速な高感度検出系の確立を目的として研究を行った。トランスジェニックマウス独自の感染実験も可能であるが、コロニーの拡大を計画しなければならない。さらに、オリックス型プリオン遺伝子マウスの繁殖も可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizoi, S., Yoshino, T., Momotani, E., Kubosaki, A., Nakamura, Y., and Onodera, T.: Exacerbated spongiform lesions in cerebral cortex of scrapie in Japanese sheep, in outbreak during 1984-1987. Jpn. J. Inf. Dis. 52:(6), 1999.
- 2) Kuwahara, C., Takeuchi, A.M., Nishimura, T.,

- Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Itohara, S., and Onodera, T.: Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400:225-226, 1999.
- 3) Yusa, S., Ohnishi, M., Naito, M., Yamamoto, S., Ishihara, H., Hirokami, Y., Onodera, T., and Miyazaki, T.: AIM, a murine apoptosis inhibitory factor, induces strong and sustained growth inhibition of B lymphocytes in combination with TGF- β 1. *Eur. J. Immunol.* 29:1086-1093, 1999.
- 4) Hashimoto, A., Onodera, T., Ikeda, H., and Kitani, H.: Isolation and characterization of fetal bovine brain cells in primary culture. *Res. Vet. Sci.* 63:(3), 1999.
- 5) Onodera, T.: Role of prion protein (Review). *Modern Aspect of Immunobiology* 1:25-35, 2000
- 6) Kuwahara, C., Kubosaki, A., Nishimura, T., Nasu, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., and Onodera, T.: Enhanced expression of cellular prion protein gene by insulin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 213:(in printing), 2000.

G. 特許申請

糸原重美, 局博一, 小野寺節: 心臓に異常を示すプリオン遺伝子改変マウスとその使用 (申請中)