

# プリオンタンパク遺伝子は胚発生初期にも発現する

班 員：三好 一郎（東北大学・大学院医・動物実験施設）  
班 員：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）  
班 員：毛利 資郎（九州大学・大学院医・実験動物）  
研究協力者：岡村 匡史（東北大学・大学院医・動物実験施設）  
研究協力者：村本 環（東北大学・大学院医・病態神経）  
研究協力者：平林 義雄（理研・脳科学・神経回路）

## 【研究要旨】

マウスプリオンタンパク(PrP)遺伝子のプロモータの制御によりヒト正常グルコシルセラミド合成酵素(Ugcg)を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを交配させることにより、内在性 Ugcg を欠損するため胎生 7.5 日頃に死亡してしまうマウスを生後 1 週目までレスキューできた。このことは、既に胎生 7.5 日の外胚葉を中心に PrP 遺伝子が発現していることを示唆する。

## Expression of mouse prion protein gene in embryo at gastrulation

Ichiro MIYOSHI, Tadashi OKAMURA, Tetsuyuki KITAMOTO<sup>1)</sup>, Tamaki MURAMOTO<sup>1)</sup>, Shirou MOHRI<sup>2)</sup>,  
Yoshio HIRABAYASHI<sup>3)</sup>

Institute for Animal Experimentation, <sup>1)</sup>Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine, <sup>2)</sup>Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, <sup>3)</sup>Neuronal Circuit Mechanisms Research Group, RIKEN Brain Science Institute

## ABSTRACT

Glucosylceramide synthase (Ugcg) gene disrupted mice were rescued from early embryonic death caused by apoptosis of ectodermal cells by introduction of the transgene, which was composed of mouse prion protein (PrP) promoter region and human Ugcg cDNA fragment. As mouse PrP promoter regulated the expression of the transgene, spatial- and temporal-specificity of Ugcg expression was expected to be similar to that of mouse PrP. This finding suggests that mouse PrP is already expressed in ectodermal cells of embryo at embryonic day 7.5.

## 【はじめに】

これまで我々は、様々な改変プリオンタンパク(PrP)遺伝子導入トランスジェニックマウスを作製してきた。用いた導入遺伝子の基本構造は内在性 PrP 遺伝子の機能を保存しており、実際に導入遺伝子の発現はコピー数に依存した。また、導入遺伝子の発現は、中枢神経系の神経細胞、および一般臓器でも神経提出来の細胞を中心に広く分布した<sup>1)</sup>。11.5 日齢以降の胎仔では神経管や交感神経節などでも発現が確認されている<sup>2)</sup>。脾臓の follicular dendritic cells (FDC)での発現がノックインマウスに比較して顕著に低いという差異はあるものの、総じて導入遺伝子の時期あるいは組織特異性は内在性 PrP 遺伝子のものを反映していると考えられた。今回、スフィンゴ糖脂質合成に必須の重要な酵素を欠損するために胎生 7.5 日前後に主に外胚葉系細胞のアポトーシスで死亡してしまうマウスに、これまでと同じ基本構造を用いたスフィンゴ糖脂質合成酵素遺伝子を導入することによって胎性致死の回

避を試み、胚発生初期の PrP 遺伝子の発現を検討した。

## 【方 法】

平成 8 年度の本研究班で報告した導入遺伝子の構造や方法に準じてヒト正常グルコシルセラミド合成酵素 (Ugcg) cDNA 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (以下 PrUgcg) を作製した<sup>3)</sup>。導入遺伝子の検出および発現は PCR, あるいは RT-PCR, サザンブロット, ノザンブロット, ウェスタンブロット, 酵素活性測定により検討した。

Ugcg ゲノム遺伝子をノックアウトしたマウスヘテロ個体(Ugcg+/-, 市川ら未発表)と PrUgcg トランスジェニックマウスを交配させ, Ugcg の欠損による胎性致死を回避することが出来るか調べた。

## (倫理面への配慮)

全ての動物実験は, 東北大学大学院医学系研究科の動物実験指針に従って行われた。

## 【結果と考察】

PrUgcg マウスは神経組織でグルコシルセラミド合成酵素を強く発現しているが, 外見上顕著な異常は示さなかった。これまで作製した様々な改変 PrP 遺伝子導入トランスジェニックマウスの解析から, PrUgcg マウスでも同様な組織特異的発現, 即ち中枢神経系の神経細胞, および一般臓器でも神経提由来の細胞を中心に広く発現するだけでなく, 胎生期の神経組織での発現が予想された。

古くから神経系組織に豊富であることが知られているスフィンゴ糖脂質は, 細胞間相互作用の介在因子として, あるいは, 細胞膜におけるシグナル伝達系の調整因子としての機能が示唆されている。その合成系の起点であるセラミドの修飾機構には, グルコシルセラミド合成系とスフィンゴミエリン合成系の 2 種類が存在する。前者において数百にも及ぶスフィンゴ糖脂質分子合成への最初の糖転移酵素が Ugcg である。同酵素遺伝子の欠損は細胞レベルでは生存や形態に直接関与しないが, 山下<sup>4)</sup>および市川らのグループで作製されたノックアウトマウス (ホモ, Ugcg-/-) では, 胎生期 7.5 日胚では内および中, 外胚葉からなる初期構造に異常はないものの, 正常に比較して部分的には高頻度のアポトーシスが観察された。このマウスの胎性致死の詳細な機構は明らかではないが, 少なくともグルコシルセラミド合成が胚発生に重要であることが判明している。

PrUgcg マウスと Ugcg+/-マウスを交配させたところ, 内在性の Ugcg は発現しないが, 導入遺伝子由来の Ugcg 活性をもつマウス(Tg+/+Ugcg-/-または Tg+/-Ugcg-/-)が正常に分娩された (図. 1)。この事実が 2 系統の PrUgcg マウスを用いて再現されることから, PrP 遺伝子のプロモータの制御により胚発生初期(胎生 7.5 日前後以降)の外胚葉で Ugcg が発現されていることを示唆すると同時に, Ugcg-/-の胎性致死は神経系組織における Ugcg の欠損に起因する可能性も考えられた。しかしながら, 分娩された新生仔は 2 系統とも生後の発育が悪く, 数日から一週間で衰弱死してしまうことも明らかとなった (図. 2)。これらのマウスでは, 角質層を含む表皮の肥厚などの異常, あるいは小腸の腸絨毛の崩壊などの腸管の異常, 胸腺皮質で高頻度にアポトーシスが観察された。この表現型は, 主に神経組織等で Ugcg を強制発現することにより胎性致死からレスキューされた Ugcg-/-マウスに, それ以降の発生・分化過程で PrP 遺伝子のプロモータでは Ugcg 遺伝子が発現しない組織生じる異常の一部と考えられる。

従来我々が用いた導入遺伝子用のマウス PrP 遺伝子プロモータは, 発現の組織特異性などの点で非常に内在性のものに近く, 伝播実験に有用なトランスジェニックマウスの作製に有効であった。しかしながら, 内在性プロモータとの明らかな相違も判明しつつあり, 発現部位の特異性が重要な意味を持つことが改めて認識されている。異なる組織特異性を持つプロモータを用いることによって, 単独で, あるいは既に確立した遺伝子改変マウスに相加的に導入遺伝子を発現させることによってプリオンに対する感受性や抵抗性を修飾できる可能性も考えられる。

## 【結 論】

マウス PrP 遺伝子は、中枢神経系の神経細胞、および一般臓器でも神経提由来の細胞を中心に広く発現するだけでなく、胎生期の神経組織でも発現していることが知られている。今回の結果から、既に胎生 7.5 日前後の胚でも外胚葉を中心に PrP 遺伝子が発現していると考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) 北本哲之, 三好一郎; 正常プリオン蛋白の局在とプリオン仮説。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: 13-15, 1998.
- 2) 三好一郎, 北本哲之; プリオン蛋白過剰発現マウスの臨床と病理。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: 19-23, 1998.
- 3) 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.
- 4) Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K, and Proia, R.L.: A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9142-9147, 1999

#### 【研究発表】

1. 論文発表
  2. 学会発表
- 1) 毛利資郎, 三好一郎, 笠井憲雪, 北本哲之: ヒト・プリオンのバイオアッセイ。第 132 回日本獣医学会学術集会, 岩手, 2001 (ワークショップ「プリオン研究の進展」)

図1.  $Tg^{+/+}Ugcg^{-/-}$ または  $Tg^{+/-}Ugcg^{-/-}$ 個体の作製

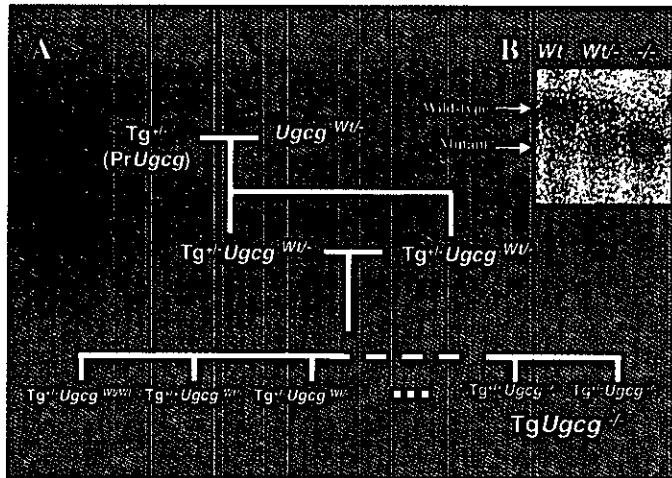
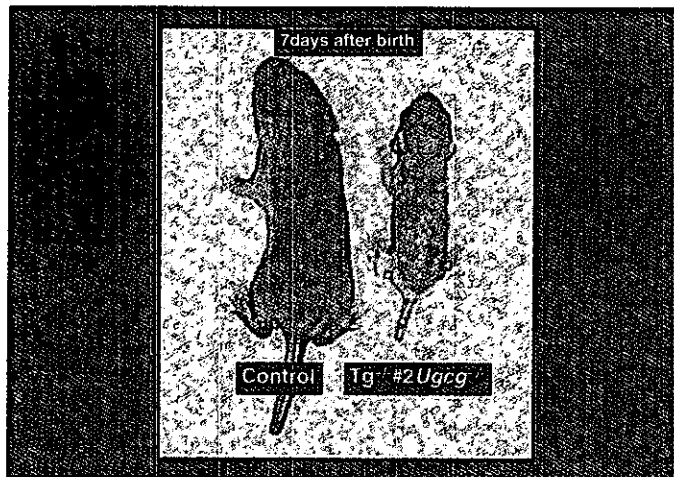


図2. レスキューされた  $Tg^{+/-}Ugcg^{-/-}$ 個体の形態異常



# ヒト・プリオンに対する新しいバイオアッセイ法

班 員：北本 哲之（東北大学・大学院医・病態神経）

## 〔研究要旨〕

ヒト・プリオンに対する高感受性マウスを作成する際の一つの目標として、脳内接種後の潜伏期間の短縮だけでなく、ヒト化マウスにおいて濾胞樹状細胞を用いたアッセイ法が確立できるのではないかという仮説の検証があった。野生型マウスを用いる限り、ヒト・プリオン接種後の検出は中枢神経系のみに限られ、リンパ装置での異常プリオン蛋白の検出は不可能であったからである。我々が作製した、ヒト化トランスジェニックマウスとノックインマウス的一般臓器を検討した結果、ノックインマウスで濾胞樹状細胞に正常型プリオン蛋白の発現を認め、またその細胞でプリオン蛋白の異常化が認められることを確認した。トランスジェニックマウスでは、正常型プリオン蛋白の発現がほとんど確認されず、新しいヒト・プリオンに対するバイオアッセイ法にはヒト化ノックインマウスが適当であることが明らかとなった。

A New Bioassay for Human Prions.

Tetsuyuki KITAMOTO

Department of Neurological Science, Tohoku University School of Medicine

## ABSTRACT

We established a new bioassay method for human prion infection. Humanized knock-in mouse expressing human/mouse chimeric prion protein had abnormal prion protein accumulation within the follicular dendritic cells in the spleen, lymph nodes, and Peyer's patches. The abnormal prion proteins in the follicular dendritic cells were composed of recombinant chimeric prion protein. Thus, this knock-in mouse model provides a new bioassay system against infectious prion diseases.

## 〔はじめに〕

異常プリオン蛋白が中枢神経系以外の細胞で検出されたのは、濾胞樹状細胞がはじめてである。CJDのマウス株で、脾臓組織を検索することによって明らかにされ、免疫不全マウス (Scid) を用いた感染実験でこの濾胞樹状細胞への異常プリオン蛋白の沈着が腹腔内投与での発病を規定していることが明らかとなり、末梢ルートからの感染には非常に大切な現象であることが示唆された<sup>(1)</sup>。その後、ヒツジの Scrapie でも、また近年 vCJD 患者でもこの濾胞樹状細胞への異常プリオン蛋白の沈着が認められることが報告されている<sup>(2,3)</sup>。我々の CJD マウス株を用いた研究から、濾胞樹状細胞への異常プリオン蛋白の沈着は感染早期に起こる現象であり、発病前診断が可能であることが明らかになっていたが<sup>(4)</sup>、これらの現象は、マウス株を用いた感染実験でのみ示され、ヒト・プリオンを用いた感染実験ではヒトからマウスへの種の壁が存在し、マウスの濾胞樹状細胞に異常プリオン蛋白が認められず、ヒト・プリオンのアッセイ系には応用できなかった<sup>(5)</sup>。そこで、ここ数年にわたって開発してきたヒト化遺伝子導入マウスを用いて、本年度はヒト・プリオンのアッセイ系が開発できないかどうかを検討した。

## 〔材料および方法〕

1. トランスジェニックマウスとして、ヒト・マウスのキメラ蛋白を発現する Tg-ChM#30 (Prnp0/0)を用いた。
2. ノックインマウスとして、トランスジェニックマウスと同じレコンビナント蛋白を発現する Ki-ChM マウスを用いた。
3. ヒト・プリオンの接種材料として孤発性 CJD (コドン 129Met/Met で異常プリオン蛋白タイプ 1、いわゆる MMI) の症例の 10%脳乳剤を用いて、脳内接種による感染実験を行った。

4. 脾臓でのレコンビナント・プリオン蛋白の発現を検討するために、脾臓の膜分画を抽出し、Western blot でレコンビナント・プリオン蛋白を同定した。また、直接脾臓の凍結切片を作成し、蛍光抗体法でレコンビナントプリオン蛋白を発現している細胞を同定した<sup>(6)</sup>。
5. 異常プリオン蛋白の検出には、Hydrolytic autoclave 前処理法を利用した免疫染色法と、直接異常プリオン蛋白を抽出した後の Western blot 法で確定した<sup>(7)</sup>。

#### (倫理面への配慮)

動物実験に際しては、動物実験委員会の審査を受け行った。

#### [結果および考察]

##### 1. 脳内投与による感染実験の潜伏期間

Tg-ChM#30 マウスでは、脳内接種後平均 156 日で 100%のマウス(8 匹/8 匹)で発病が認められ、一方 Ki-ChM マウスでは潜伏期間は平均 151 日(5 匹/5 匹)であった。トランスジェニック法であれ、ノックイン法であれ我々の導入したキメラ型プリオン蛋白を発現するマウスは、ヒト・プリオンに高い感受性を示すことが明らかとなった。

##### 2. 脾臓での異常プリオン蛋白の検出

発病したヒト化マウスの一般臓器を免疫染色で調べた結果、Tg-ChM#30 ではリンパ装置にまったく異常プリオン蛋白の沈着を認めず、一方 Ki-ChM マウスでは 5 匹全てで濾胞樹状細胞に異常プリオン蛋白の沈着を認めた。また、Ki-ChM マウスの脾臓から異常プリオン蛋白を抽出し、Western blot でも異常プリオン蛋白を確認した。Ki-ChM マウスでは、脾臓だけでなく、腸管のパイエル氏板、腸間膜リンパ節でも同様に異常プリオン蛋白の沈着を認めた。

##### 3. レコンビナント・プリオン蛋白の発現

脾臓におけるレコンビナント・プリオン蛋白の発現を Ki-ChM と Tg-ChM#30 で比較したところ、Tg-ChM#30 では Western blot 解析でほとんど発現していないことが証明され、また凍結切片を用いた蛍光抗体法でも濾胞樹状細胞にレコンビナント・プリオン蛋白が確認されたのは Ki-ChM のみであった。よって、トランスジェニックマウスでリンパ装置に異常プリオン蛋白の異常化が検出できなかった原因として、我々がトランスジェニックマウス作製にもちいたプロモーターでは十分な濾胞樹状細胞への発現が見られないという単純な理由であることが示唆された。

##### 4. 濾胞樹状細胞の異常プリオン蛋白は、単に接種したヒト・異常プリオン蛋白を集めただけなのか?

レコンビナント蛋白が異常化したのか、単に接種した材料を集めただけなのかを区別することはバイオアッセイ法としては大きな問題である。プリオン蛋白の異常化を高い感度で調べるのが目的のバイオアッセイ法であるので、当然接種した脳乳剤のなかに含まれる異常プリオン蛋白を集めただけでは意味がない。そこで、キメラ型プリオン蛋白を認識せず、完全なヒト型蛋白を認識する TNT#71 抗体<sup>(8)</sup>を用いて検索した。Ki-ChM マウスの脾臓と vCJD 患者の脾臓を用いて、TNT#71 抗体で免疫染色を行った結果、TNT#71 抗体は vCJD 患者の脾臓の濾胞樹状細胞に沈着した異常プリオン蛋白は認識したが、Ki-ChM マウスの脾臓の濾胞樹状細胞に沈着する異常プリオン蛋白は認識しなかった。よって、Ki-ChM マウスに認められる異常プリオン蛋白はレコンビナント・プリオン蛋白が異常化したものであることが明らかとなった。

#### [引用文献]

1. 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).
2. Schreuder, B.E., van Keulen, L.J., Vromans, M.E., Langeveld, J.P. & Smits, M.A. Preclinical test for prion diseases. *Nature* **381**, 563 (1996).
3. Hilton, D.A., Fathers, E., Edwards, P., Ironside, J.W. & Zajicek, J. Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **352**, 703-704 (1998).
4. Muramoto, T., Kitamoto, T., Tateishi, J. & Goto, I. The sequential development of abnormal prion protein accumulation in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Pathol.* **140**, 1411-1420 (1992).
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).

6. Kitamoto, T. *et al.* Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Pathol.* **140**, 1285-1294 (1992).
7. Grathwohl, K.U., Horiuchi, M., Ishiguro, N. & Shinagawa, M. Improvement of PrPSc-detection in mouse spleen early at the preclinical stage of scrapie with collagenase-completed tissue homogenization and Sarkosyl-NaCl extraction of PrPSc. *Arch. Virol.* **141**, 1863-1874 (1996).
8. Muramoto, T. *et al.* Analyses of Gerstmann-Sträussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect human prion protein with 219Glu. *Neurosci. Lett.* **288**, 179-182 (2000).

〔研究発表〕

1. 発表論文

- 1) 田中智之 北元憲利 村本 環 藤井秀治 坂本晴彦 吉田宗平 辻 力 北本哲之：ヒト型プリオン蛋白のコードン 219 polymorphism を認識する新しい単クローン抗体の作製—その診断的価値—。臨床と病理. 19(1) : 91-93,2001
- 2) Mariko Yamashita, Toru Yamamoto, Kazuto Nishinaka, Fukashi Udaka, Masakuni Kameyama and Tetsuyuki Kitamoto : Severe brain atrophy in a case of thalamic variant of sporadic CJD with plaque-like PrP deposition. *Neuropathology* 21 : 138-143, 2001
- 3) Jun Tateishi, Tetsuyuki Kitamoto, Shirou Mohri, Sakae Satoh, Tetsuo Sato, Ailsa Shepherd and Malcolm R. Macnaughton : Scrapie Removal using Planova Virus Removal Filters. *Biologicals* 29 : 17-25, 2001

## ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験（その5）

班 員：毛利 資郎（九州大・大学院医・実験動物学）  
班 員：北本 哲之（東北大・大学院医・病態神経）  
班 員：三好 一郎（東北大・大学院医・動物実験施設）

### 【研究要旨】

これまでの研究結果から、ヒト/マウスキメラ型のプリオン蛋白質を発現するノックインマウスはヒトプリオンの脳内接種で非常に高い感受性を示すと同時に脾臓、リンパ節の濾胞樹状細胞にも異常プリオンタンパク質の沈着が認められることが判明した。この研究では、腹腔内接種後のいつからこの異常プリオン蛋白質の沈着が起こるのかということ、沈着した濾胞樹状細胞の異常プリオン蛋白質の感染性の有無について調べた。その結果、脾臓の濾胞樹状細胞における沈着は腹腔内接種後 14 日目から検出可能となり、30 日目にはすべてのマウスで陽性となった。また、脾臓の濾胞樹状細胞における異常プリオンタンパク質には感染性があることも証明された。このヒト・プリオンに対する新しいバイオアッセイ法を評価するために、接種試験により種々のヒト・プリオンに対する感受性を調べた。現在までのところ孤発例 CJD、硬膜移植後 CJD のクラシックタイプ、英国の変異型 CJD、それに GSS 由来のプリオンについて異常プリオン蛋白質が検出されている。評価試験は継続中であるが、このノックインマウスのシステムがヒト・プリオンに対する新しいバイオアッセイ法として画期的かつ実用的であることが明らかとなった。

Estimation for a novel knock-in mouse as rapid and sensitive bioassay system for inspection to human-prions

Shirou MOHRI 1, Tetsuyuki KITAMOTO 2, Ichiro MIYOSHI 3

1 Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

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

### ABSTRACT

We estimated a knock-in mouse strain named Ki-ChM that expresses a chimeric prion gene of human and mouse replaced with the mouse wild gene. After inoculation into the mice with a sporadic Creutzfeldt-Kakob disease (sCJD) case via intraperitoneal route, abnormal prion protein were detected in follicular dendritic cells (FDCs) in the spleens, lymph nodes and intestinal peyer's patches by immunohistochemistry. The sequential study showed that abnormal prion protein were first detected in spleens and lymph node at 14 days after inoculation and were found in spleens of all mice after 30 days. Infectivity of the spleen post inoculated with variant Creutzfeldt-Kakob disease (vCJD) case via intraperitoneal route was also demonstrated by a serial passage. Many other strains of human prions were detected in FDCs of the mice after inoculation intraperitoneally. The Ki-ChM mice should provide a rapid and sensitive bioassay system for inspection to various types of human-prions of vCJD, GSS and dura-associated classic type CJD cases.

### 【はじめに】

プリオン病のモデル動物を確立するために様々なヒト・プリオンタンパク遺伝子導入マウスについ



て、系統樹立とその感受性試験を行っている。ヒト/マウスキメラ蛋白質を発現するノックインマウスは同じ導入遺伝子構造を有するトランスジェニックマウスと同様にヒト・プリオンに対して脳内接種により、非常に高い感受性を有することを昨年報告した<sup>1)</sup>。今回は、ノックインマウスではヒト・プリオン接種後、脾臓、リンパ節の濾胞樹状細胞 (FDC) において異常プリオンタンパク質が検出できることが判明したので、腹腔内接種による Ki-ChM マウスの FDC を指標にしたバイオアッセイ法について検討、評価をおこなった。

## 【材料と方法】

ノックインマウス：作出方法等についてはすでに平成 10 年度の本研究班で中村らにより報告されている、マウスプリオン遺伝子の第 3 エクソンの SmaI サイト以降がヒトプリオン型遺伝子で、BstEII サイト以降の C 末端がマウス型プリオンタンパク質遺伝子構造の相同組換え遺伝子を有し、ヒト/マウスキメラ蛋白質を発現する Ki-ChM マウスを用いた<sup>2)</sup>。

接種方法：ヒト脳、Ki-ChM マウス脳、脾臓由来の接種材料はすべて PBS にて 10% ホモジネートとし、マウス脳内接種 (IC) は 20  $\mu$ l、腹腔内接種 (IP) は 50  $\mu$ l を用いた。

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。

確定診断：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 末合成ペプチドウサギ血清を用いた。

評価方法：

### 1. 異常プリオンタンパク質の経時的沈着

孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者の脳乳剤 (H3) を Ki-ChM マウスに IP 後、14 日、30 日、45 日、60 日、75 日、150 日後にそれぞれ安楽死させ、ホルマリンに固定後、免疫組織染色により脾臓、腸間膜リンパ節、腸粘膜集合リンパ小節 (パイエル板) における異常プリオン蛋白質の沈着について検索した。

### 2. 脾臓における異常プリオン蛋白質の感染性の有無

Ki-ChM に沈着した異常プリオン蛋白質の感染性の有無を調べるために孤発性 CJD 由来プリオン H3 の IC、161 日後と英国の変異型 CJD (vCJD) 由来プリオン 96/02 の IP、75 日後にそれぞれ安楽死させ採取された Ki-ChM マウスの脾臓について半分を免疫組織検査用に、残り半分を Ki-ChM マウスの IC による継代接種を行った。

### 3. Ki-ChM マウス脾臓の異常プリオン蛋白質を指標としたヒト・プリオンに対する感受性試験

IP 75 日後の FDC における異常プリオン蛋白質沈着を指標として幾つかの CJD 由来ヒト・プリオンの感受性試験を行った。陰性対照としてアルツハイマー病患者脳、正常ヒト脳を用いた。

## （倫理面への配慮）

動物実験に際しては、九州大学大学院医学研究院動物実験指針に従い、動物実験委員会による実験計画書の審査を受け、感染実験は物理的封じ込め設備を有する専用の感染実験室でおこなった。

## 【結果と考察】

### 1. 異常プリオンタンパク質の経時的沈着

孤発性 CJD 患者の脳乳剤 (H3) を IP 後、免疫組織染色により 14 日後にすでに 4 例中 2 例、50% (2/4) の脾臓で異常プリオン蛋白質の沈着が検出され、30 日後以降はすべての脾臓が 100% 陽性となった。腸間膜リンパ節でも 14 日後に 33% (1/3) 陽性となり、経時的に増加し、60 日以降は 100% を示した。パイエル板ではやや遅れて 45 日後から検出され、75 日後に 100% (4/4) となった。これらは Muramoto らが報告したマウス純化株 (Fukuoka2 株) IP 後の野生型マウスに少し遅れる傾向で

あったが、ほぼ同様の成績であった<sup>3)</sup>。このことは Ki-ChM マウスは末梢の異常プリオン沈着動態についても種の壁を越えたものと考えられる。これまでの脳内接種法とその後の発症を指標としたバイオアッセイ法では種の壁によりマウスを用いたバイオアッセイが野生マウスで平均 600 日以上、ヒト型プリオン蛋白質発現マウスでも最短 150 日を要したが<sup>4)</sup>、われわれの Ki-ChM マウスを用いた腹腔内接種法 (Ki-ChM/FDC) によって驚異的短時間でバイオアッセイが可能となった。

## 2. 脾臓で検出された異常プリオンタンパク質は感染性を有するのか？

Ki-ChM マウスの FDC において検出された異常プリオンタンパク質が感染性を有するかどうかは非常に重要である。IC,161 日後、IP,75 日後の Ki-ChM の脾臓は継代接種による IC 後、それぞれ 156 日、170 日の潜伏期間で接種されたすべての Ki-ChM マウスを発症させることができた。すなわち、脳内接種でも末梢からの接種でも、接種ルートに関わらず Ki-ChM マウスの脾臓に蓄積する異常プリオン蛋白質は感染性を有することが判明した。

## 3. Ki-ChM マウス脾臓の異常プリオン蛋白を指標としたヒト・プリオンに対する感受性試験

現在までのところ孤発例 CJD、硬膜移植後 CJD のクラシックタイプ、英国の変異型 CJD、それに GSS 由来のプリオンについて Ki-ChM/FDC において異常プリオン蛋白質が検出されている。陰性対照として接種されたアルツハイマー病患者脳、正常ヒト脳については、異常プリオンタンパク質はまったく検出されなかった。現在、さらに感受性試験を継続中である。

## 【結 論】

1. ノックインマウスの濾胞樹状細胞 (FDC) に極初期から異常プリオンタンパク質の沈着が確認された。
2. ノックインマウス FDC の異常プリオンタンパク質には感染性が証明された。
3. 種々のヒト・プリオンについて極短期間にバイオアッセイが可能となった。

以上のことからこのノックインマウスをもちいたアッセイ系はヒト・プリオンに対する新しいバイオアッセイとして非常に有用であることが明らかとなった。

## 【参考文献】

- 1) 毛利資郎、北本哲之、三好一郎：ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験 (その 4)、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 12 年度研究報告書：135-139、2001.
- 2) 中村健司、北本哲之、中尾和貴、勝木元也、：実験動物におけるヒト遺伝子発現系の開発。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 10 年度研究報告書：81-83、1999.
- 3) Muramoto T., Kitamoto T., Tateishi J., & Goto I. Accumulation of abnormal prion protein in mice infected with Creutzfeldt-Jakob disease via intraperitoneal route: a sequential study. *Am. J. Pathol.* **143**, 1470-1479 (1993).
- 4) 毛利資郎、北本哲之、三好一郎：ヒト PrP 遺伝子発現マウスのプリオン感受性試験 (その 2)、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 10 年度研究報告書：87-93、1999.

## 【研究発表】

### 1. 論文発表

1) Tateishi J., Kitamoto T., Mohri S., Satoh S., Sato T., Shepherd A. and Macnaughton M R.: Scrapie Removal using Planova Virus Removal Filters. *Biologicals*. 29: 17-25, 2001

### 2. 学会発表

1) 毛利資郎、三好一郎、笠井憲雪、北本哲之：ヒト・プリオンのバイオアッセイ、第 132 回日本獣

医学会学術集会ワークショップ（岩手県、盛岡市）7, October 2001

**【知的特許の取得状況】**

3. その他

国内特許ならびに PCT 国際特許出願中

発明の名称：「プリオン病感染因子のスクリーニング方法」

発明者：北本哲之、三好一郎、毛利資郎

出願日：平成 13 年 1 月 31 日

出願番号：特願 20001-024279

# 研究成果の刊行に関する一覧表

平成13年度研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者名	論文名	雑誌名	巻：頁、 発行西暦年号
Ito T., Yasui K., Mukaigawa J., Katsume A., Kohara M., and Mitamura K.	Acquisition of susceptibility to hepatitis C virus replication in HepG2 cells by fusion with primary human hepatocytes: establishment of a quantitative assay for hepatitis C virus infectivity in a cell culture system.	Hepatology	34:556-572,2001
Kato T., Furusaka A., Miyamoto M., Date T., Yasui K., Hiramoto J., Nagayama K., Tanaka T., and Wakita T.	Sequence analysis of Hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient.	J Med Virol	64:334-339,2001
Suzuki T., Ogata A., Tashiro K., Nagashima K., Tamura M., Yasui K., and Nishihira J.	Japanese encephalitis virus up-regulates expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA in the mouse brain.	Biochimica et Biophysica Acta	1517:100-106,2000
Okada, Y., Sawa, H., Tanaka, S., Takada, A., Suzuki, S., Hasegawa, H., Umemura, T., Fujisawa, J., Tanaka, Y., Hall, W. W., Nagashima, K.	Transcriptional activation of JC virus by human T-lymphotropic virus type I tax protein in human neuronal cell lines	J Biol Chem,	275:17016-17023,2000
Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T., Nagashima, K.	Distribution and function of JC virus agnoprotein	J Neurovirol,	7:302-306,2001
Safak, M., Barrucco, R., Darbinyan, A., Okada, Y., Nagashima, K., Khalili, K.	Interaction of JC Virus Agno Protein with T Antigen Modulates Transcription and Replication of the Viral Genome in Ghal Cells	J Virol	75:1476-1486,2001
Suzuki, S., Sawa, H., Komagome, R., Orba, Y., Yamada, M., Okada, Y., Ishida, Y., Nishihara, H., Tanaka, S., and Nagashima, K.	Broad distribution of the jc virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication	Virology	286:100-112,2001

著者名	論文名	雑誌名	巻：頁、 発行西暦年号
Okada, Y., Sawa, H., Endo, S., Orba, Y., Umemura, T., Nishihara, H., Stan, A. C., Tanaka, S., Takahashi, H., Nagashima, K	Expression of JC virus (JCV) agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) brain	Acta Neuropathologica	in press
Miki K, Komase K, Mgone CS, Kawanishi R, Iijima M, Mgone JM, Asuo GP, Alpers MP, Takasu T, Mizutani T	Molecular analysis of measles virus genome derived from SSPE and acute measles patients in Papua New Guinea	J Med Virol	2002 in press
Yamamoto M, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M, Matsuo T, Kaneko K.	Glycidol degrades scrapie mouse prion protein.	J. Vet. Med. Sci.	63:983-990,2001
Laws DD, Bitter HM, Liu K, Ball HL, Kaneko K, Wille H, Cohen FE, Prusiner SB, Pines A, Wemmer DE	Solid-state NMR studies of the secondary structure of a mutant prion protein fragment of 55 residues that induces neurodegeneration.	Proc Natl Acad Sci USA	98:11686-11690,2001
Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB	Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity	Nature	412:739-743,2001
Zulianello L, Kaneko K, Scott M, Erpel S, Han D, Cohen FE, Prusiner SB	Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein	J Virol	74:4351-4360,2001
Atarashi R, Sakaguchi S, Shigematsu K, Arima K, Okimura N, Yamaguchi N, Li A, Kopacek J, Katamine S	Abnormal activation of glial cells in the brains of prion protein-deficient mice ectopically expressing prion protein-like protein, Pr <sup>PLP</sup> /Dpl	Mol Med	7:803-809,2001

著者名	論文名	雑誌名	巻：頁、発行西暦年号
Kawashima T, <u>Doh-ura K</u> , Ogomori K, Iwaki T	Apoptotic bodies in the cerebellum of Japanese patients with Creutzfeldt-Jakob disease	Pathol. Int	51:140-144,2001
Kawashima T, <u>Doh-ura K</u> , Kikuchi H, Iwaki T	Cognitive dysfunction in patients with amyotrophic lateral sclerosis is associated with spherical or crescent-shaped ubiquitinated intraneuronal inclusions in the parahippocampal gyrus and amygdala, but not in the neostriatum	Acta Neuropathol	102:467-472,2001
Murakami M, Suzuki T, Nakagawasai O, Murakami H, Murakami S, Esashi A, Taniguchi R, Yanagisawa T, Tan-no K, <u>Miyoshi I</u> , Sasano H, Tadano T	Distribution of various calcium channel $\alpha_1$ subunits in murine DRG neurons and antimociceptive effect of $\omega$ -conotoxin SVIB in mice.	Brain Res	903:231-236,2001
Kikuchi K, Kawasaki Y, Ishii N, Sasaki Y, Asao H, Takeshita T, <u>Miyoshi I</u> , Kasai N, Sugamura K	Suppression of thymic development by the dominant-negative form of Gads	Int Immunol	13:777-782,2001
Takahashi E, <u>Miyoshi I</u> , Nagasu T	Rescue of transgenic mouse line by transplantation of frozen-thawed ovary obtained postmortem	Contemp Top Lab Anim Sci	40:28-31,2001
Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, Murakami T, Takahashi M, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, <u>Miyoshi I</u> , Kasai N, Kobayashi E	Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research	Biochem Biophys Res Commun	286:779-785,2001
Nagai M, Aoki M, <u>Miyoshi I</u> , Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown Jr R.H, Itoyama Y	Rats expressing human cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations develop motor neuron disease	J Neurosci	21:9246-9254,2001
Hirabayashi M, Kato M, Aoto T, Sekimoto A, Ueda M, <u>Miyoshi I</u> , Kasai N, Hochi S	Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm	Transgenic Res	in press,2001

著者名	論文題名	雑誌名	巻：頁、発行西暦年号
Miyoshi J, Maki K, Kon Y, Yamashita T, Aoyama S, Hayashizaki Y, Kasai N	Targeting oncogenesis by introduction of a 5.2-Kbp segment of 5' regulatory region of the human thyrotropin $\alpha$ -subunit gene	Endocrine Res	27:387-398,2001
Mariko Yamashita, Toru Yamamoto, Kazuto Nishinaka, Fukashi Udaka, Masakuni Kameyama and Tetsuyuki Kitamoto	Severe brain atrophy in a case of thalamic variant of sporadic CJD with plaque-like PrP deposition	Neuropathology	21:138-143,2001
Jun Tateishi, Tetsuyuki Kitamoto, Shirou Mohri, Sakae Satoh, Tetsuo Sato, Ailsa Shepherd and Malcolm R. Macnaughton	Scrapie Removal using Planova Virus Removal Filters	Biologicals	29:17-25,2001
Y. Shiga, H. Seki, A. Onuma, H. Shimizu, Y. Itoyama.	Decrement of N20 amplitude of the median nerve somatosensory evoked potential in Creutzfeldt-Jakob disease patients.	J Clin Neurophysiol	18: 2001 in press
Kimura K, Nonaka A, Tashiro H, Yaginuma M, Shimokawa R, Okeda R, Yamada M	Atypical form of dural graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: report of a postmortem case with review of the literature	J Neurol Neurosurg Psychiatry	70:696-699,2001
Nishida Y, Yamada M, Hara K, Tsunemi T, Yamawaki M, Shimokawa R, Okeda R, Tsutsumi T, Mizusawa H	Creutzfeldt-Jakob disease after Janneta's operation with cadaveric dura mater graft: initial manifestations related to the grafted site.	J Neurol	2001 in press
Uchihara T, Fujigasaki H, Koyano S, Nakamura A, Yagishita S, Iwabuchi K	Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias; triple-labeling immunofluorescence study	Acta Neuropathol	102:149-152,2001
Fujigasaki H, Uchihara T, Takahashi J, Matsushita H, Nakamura A, Koyano S, Iwabuchi K, Hirai S, Mizusawa H	Preferential recruitment of ataxin-3 independent of expanded polyglutamine; an immunohistochemical study on Marinesco bodies	J Neurol Neurosurg Psychiatry	71:518-520,2001



著者名	論文名	雑誌名	巻：頁、発行西暦年号
二瓶健次、伊藤真美	亜急性硬化性全脳炎(SSPE)	日本臨床	59:463-469,2001
佐藤 猛	プリオン病—21世紀に向けての課題—	順天堂医学	46:311-321,2001
佐藤 猛	Creutzfeldt-Jakob病の病型	Clinical Neuroscience	19:902-904,2001
田中智之、北元憲利、村本環、藤井秀治、阪本晴彦、吉田宗平、辻 力、北本哲之	ヒト型プリオン蛋白のコードン219polymorphismを認識する新しい単クローン抗体の作製 —その診断的価値—	病理と臨床	19:91-93,2001
品川森二、堀内基広	牛海綿状脳症について	北海道公衆衛生学雑誌	14:12-20,2001
品川森二、堀内基広、松井高峯	プリオンの免疫学的検出法	生活衛生	45:259-269,2001
池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森二	牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応	食品衛生研究	52:23-42,2002
岸田日帯、戸田宏幸、金子清俊	遺伝子改変動物から見たプリオン病研究の進歩	脳と神経	53:821-827,2001
戸田宏幸、金子清俊	Cognitive Disorder—内科医が知っておくべき認知機能障害—認知機能障害を呈する疾患プリオン病	Medicina	38(8):1370-1371,2001
桜井総子、伊藤卓、金子清俊	プリオン病—プリオンの代謝経路の解明と治療への応用	細胞工学	20(11):1485-1488,2001
岸田日帯、戸田宏幸、金子清俊	神経変性疾患の最前線—分子病態と治療に向けて—4. プリオン病 分子と治療に向けて	Molecular Medicine	38(11):1254-1260,2001
村井弘之	クロイツフェルト・ヤコブ病の現状.	日本輸血学会雑誌	47:363-368,2001
村井弘之、吉良潤一	Creutzfeldt-Jakob病と感染源—Variant Creutzfeldt-Jakob病とその現状	Clin Neurosci	19:930-931,2001

著者名	論文名	雑誌名	巻：頁、発行西暦年号
村井弘之, 吉良潤一	感染性Creutzfeldt-Jakob病の予防対策—医療現場の立場から	Clin Neurosci	19:936-937,2001
山田正仁	プリオン病とその診断	総合臨床	50:168-174,2001
山田正仁	Creutzfeldt-Jakob病をめぐる疾患群の定義とその異同および関連性	Clin Neurosci	19:876-881,2001
岩淵 潔	脊髄小脳変性症(SCD) 遺伝子座により病理所見が位置づけられる	病理と臨床	19:738-743,2001
岩淵 潔	運動失調 update ; 舞踏運動	Clinical Neuroscience	19:1274-1275,2001

平成13年度研究成果の刊行に関する一覧表

単行本

著者名	論文題名	編集者名、書籍名	巻;頁	出版社名	発行西暦年号
山田正仁 (分担執筆)	生物学のミステリー—アプリーオン病の発症機構と診断のこつ—	水澤英洋 (編) ; 神経・筋疾患のとらえかた	207-220	文光堂、東京	2001
山田正仁 (分担執筆)	アプリーオン病	中井利昭ほか (編) ; 遺伝子検査早 わかり事典	842	中外医学社、東京	2001

厚生労働省特定疾患 遅発性ウイルス感染調査研究班  
英国における変異型クロイツフェルト・ヤコブ病  
診療に関する報告会

プログラム