

厚生科学研究研究費補助金

特定疾患対策研究事業

硬膜移植後アライメント病に対する進行阻止法の開発に関する基礎研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 清俊

平成14(2002)年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告		
硬膜移植後プリオン病に対する進行阻止法の開発に関する基礎研究	—————	1
金子清俊		
II. 分担研究報		
1. ヒト硬膜移植後プリオン病のモデルとなるマウス手術系の確立	—————	4
川原信隆		
2. プリオン感染細胞培養系及びマウスを用いた感染実験施行	—————	7
西島正弘		
3. 遺伝子導入法の確立	—————	9
武田伸一		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	—————	12

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
総括研究報告書

硬膜移植後プリオン病に対する進行阻止法の開発に関する基礎研究

主任研究者 金子清俊（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部長）

研究要旨

日本でのプリオン病の主な症例は脳外科手術によるヒト乾燥硬膜移植後の医原性 Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) である。また平成 13 年 9 月に国内で初のウシ海綿状脳症 (BSE) が発見されて以来、プリオン病に対する社会的関心が非常に高く、本疾患の治療法開発が期待されている。

そこで本研究では、プリオン蛋白遺伝子の遺伝子多型を有する日本人が孤発性 CJD に対して抵抗性を示すという疫学的報告および、この多型に相当する変異型マウスプリオン蛋白 (PrP218K) を感染細胞に発現させると異常感染型プリオン蛋白複製が抑制されるという *in vitro* の実験結果を基にして、この「異常感染型プリオン蛋白複製抑制効果」を有する変異型プリオン蛋白 (PrP218K) を用いた硬膜移植後プリオン病の進行阻止法を開発している。

今回我々は、PrP218K の細胞外からの投与による異常感染型プリオン蛋白複製抑制効果を検討するため、感染細胞の培養液中に精製した PrP218K を添加したところ、異常感染型プリオン蛋白複製が抑制されることを確認した。この結果から、PrPK218 はプリオン病の発症予防・治療に応用できる因子であることが改めて示唆された。

A. 研究目的

プリオン病は、プリオン蛋白 (PrP) の立体構造変換がその病因に関与する疾患である。プリオン蛋白には正常型 (PrP<sup>C</sup>) と異常感染型 (PrP<sup>Sc</sup>) とが存在し、両者のアミノ酸配列は相同だが立体構造は大きく異なる。構造変換の際には PrP<sup>Sc</sup> を鋳型として PrP<sup>C</sup> が PrP<sup>Sc</sup> に変換されると考えられているが、その詳細は依然不明である。ヒトのプリオン病である Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) は、進行性

痴呆や運動機能障害が急速に悪化して数ヶ月で無動無言状態となる致死性の疾患であり、我が国では 1973 年から 1997 年 3 月までの脳外科手術において年間約 2 万枚の乾燥硬膜が使用された。この硬膜移植が原因と考えられる医原性 CJD が我が国でもっとも発症例が多く、大きな社会問題となっている。また平成 13 年 9 月に国内初のウシ海綿状脳症 (BSE) が発見されて以来、プリオン病に対する社会的関心は非常に強い。我々は硬膜移植後プ

リオン病の進行阻止・治療法の開発のために、PrP<sup>Sc</sup>複製の抑制を目標とした検討をおこなっている。

## B. 研究方法

孤発性 CJD の疫学的研究から、ヒトのプリオン遺伝子のコドン 219 のグルタミン酸がリジンに置換した遺伝子多型 (219K) を有する個体が、プリオン病に対して抵抗性を有することが判った。金子らは、スクレイピー持続感染 N2a (ScN2a) 細胞に 219K に相当するマウスの変異型プリオン蛋白 (MoPrP218K) を発現させることによって、PrP<sup>Sc</sup>複製が抑制され dominant negative 効果を呈することを示した。

そこで我々は MoPrP218K の細胞外からの投与による PrP<sup>Sc</sup>複製に対する効果を検討するため、大腸菌に発現させた MoPrP218K を精製し ScN2a 細胞の培養液中に MoPrP218K を添加、細胞内の PrP<sup>Sc</sup> を Western blot 法で検出した。

(倫理面への配慮)

本実験においてはヒト及び動物の試料を使用しないため、特に倫理上の問題点はないと考えている。

## C. 研究結果

細胞外の MoPrP218K によって、濃度依存的に PrP<sup>Sc</sup> の複製が抑制されることが判った。

完全な複製抑制効果を発揮するには 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度を必要とした。

## D. 考察

我々は、PrP<sup>C</sup>の立体構造変換には PrP<sup>C</sup>と PrP<sup>Sc</sup>のほか、未知のシャペロン様分子「プロテイン X」がコドン 218 とその近傍の部位と相互作用して、PrP<sup>Sc</sup>の複製反応を触媒すると考えている。すなわち MoPrP218K はプロテイン X と PrP<sup>C</sup>の相互作用を阻害するため、ドミナントネガティブ効果を呈すると推測している。今回の結果は、MoPrP218K はプリオン病の進行阻止・治療開発に応用できる可能性を強く示唆する。ただし最近、抗プリオン抗体による同様の実験で最低 0.45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で PrP<sup>Sc</sup> が消失したと報告がある。現時点ではこの抗体と比較すると MoPrP218K による抑制効果は小さいが、両者とも PrP<sup>C</sup>に作用し、その立体構造変換を阻害すると考えられる。今後はさらに低濃度で効果を発揮しかつ安定なリコンビナント蛋白をスクリーニングする予定である。

## E. 結論

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の MoPrP218K を細胞外から投与することによって PrP<sup>Sc</sup>複製が抑制された。MoPrP218K はプリオン病の進行阻止・治療開発に応用できる可能性が十分ある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

岸田日帯, 戸田宏幸, 金子清俊 : 遺伝子改変動物からみたプリオン病研究の進歩. 脳と神経 53 : 821, 2001

岸田日帯, 戸田宏幸, 金子清俊 : プリオン病 分子病態と治療に向けて.  
Molecular Medicine 38 : 1254, 2001  
Peretz, D., Williamson, R.A., Kaneko, K., et al. : Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. Nature, 412: 739, 2001.

## 2. 学会発表

岸田日帯, 戸田宏幸, 鈴木友子, 武田伸一, 古屋一英, 川原信隆, 桐野高明, 絹見朋也, 山河芳夫, 西島正弘, 金子清俊 : マウス (Mo) K218 の遺伝子多型の dominant negative 効果を利用したプリオン病に対する治療法の確立、2001 年 CREST シンポジウム「脳を守る」

## H. 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（特定疾患対策研究事業）

### 分担研究報告書

#### ヒト硬膜移植後プリオン病のモデルとなるマウス手術系の確立

分担研究者 川原信隆（東京大学医学部付属病院講師）

#### 研究要旨

ヒト硬膜移植後プリオン病は、脳神経外科手術後の問題として大きな社会問題となっている。本研究では、当疾患に対する進行阻止法開発研究の基礎となるマウスを用いた実験系を確立することを目的とした。正常型プリオンを通常の8倍発現しているトランスジェニックマウスでは、脳内に感染型プリオンを接種すると約40日でプリオン病を発症することが知られている。このトランスジェニックマウスから感染硬膜を取りだし、さらにトランスジェニックマウスに硬膜移植を行って、プリオン病を発症させるモデル系の基礎的実験条件の検討を行った。この実験系の確立に際しての技術的問題としては、マウスの硬膜は非常に薄い為、1) 発症後のマウス硬膜を1枚のシート状に取り出すのは困難、2) 同様に正常マウスの硬膜を脳損傷なしに切除するのも困難と考えられる。このため、強拡大の脳神経外科手術用顕微鏡を用い、ダイヤモンドドリルで開頭し硬膜損傷を最小限にする手法を用いた。組織学的検索では、本法では損傷は脳表面の一部に限局しており十分モデルとして使用可能であった。ただし、硬膜をシート状にして取り出すことは技術的に不可能であることから、自家筋膜ないしコラーゲン膜に感染型プリオンを付着させて脳表に移植する方法が最適であることが判明した。次年度から実際の感染実験を行う予定である。

#### A. 研究目的

ヒト硬膜移植後プリオン病は、脳神経外科手術後の問題として大きな社会問題となっている。本研究では、当疾患に対する進行阻止法開発研究の基礎となるマウスを用いた実験系の基礎的条件を確立することを目的とした。

#### B. 研究方法

動物は正常型プリオンを通常の8倍発現しているトランスジェニックマウスを用いることとした。本系はプリオン病の自然発症系ではないが、脳内に感染型プリオンを接種すると約40日でプリオン病を発症すること

が知られており、短期間で実験を成立させることが可能である。このトランスジェニックマウスから感染硬膜を取りだし、さらにトランスジェニックマウスに硬膜移植を行って、プリオン病を発症させるモデル開発のために、当年度はその技術的基礎条件の検討を行った。この実験系の確立に際しての技術的問題としては、マウスの硬膜は非常に薄い為、1) 発症後のマウス硬膜を1枚のシート状で取り出すのは困難、2) 同様に正常マウスの硬膜を脳損傷なしに切除するのも困難と考えられる。このため、強拡大の脳神経外科手術用顕微鏡を用い、ダイヤモンドドリルで開頭し硬膜損傷を最小限にする手法を用いた。

(倫理面への配慮)

#### C. 研究結果

高倍率の顕微鏡を用いることで、開頭は脳損傷なく可能であった。硬膜を切開すると脳損傷が生じたが、組織学的検索では脳表面の一部に損傷は限局しており十分モデルとして用いることができると判断できた。一方、マウスから硬膜を1枚のシート状にして取り出すことは不可能であった。

#### D. 考察

マウスの開頭は困難ではあるが、本実験系に用いることは可能であることが組織学的に示された。移植する硬膜に関しては、シート状での採取そのものが不可能であった。硬膜そのもの

を用いても処理の過程で表面に付着したプリオンの量も変動すると考えられたため、自家筋膜か人工コラーゲン膜にプリオンを付着させて脳表に移植する方法が最適であると結論した。その際には、表面に付着させるプリオンの量も定量的に変化させることが可能となる。

本年度は実験器具の感染管理区域への設置等の時間的制約のために上記までの実験しかできなかったが、次年度には本手術系を用いてプリオン病の発症モデルの確立とその発症様式を早急に解析し、各種治療法の効果を検定してゆく予定である。

#### E. 結論

マウスの開頭による硬膜移植モデルの動物系は確立された。本系は、硬膜移植によるプリオン病の発症機序解析、治療法の開発に有用と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

#### H. 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（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

プリオン感染細胞培養系及びマウスを用いた感染実験施行

分担研究者 西島正弘 （国立感染症研究所 細胞化学部）

研究要旨

本研究で治療剤（異常プリオン合成阻害剤試薬）として用いる変異型マウスプリオンタンパク質を安定に供給する為に、その大腸菌での発現と、発現タンパク質の精製方法及びタンパク質化学的性状を検討した。その結果、マウス/ヒトキメラ(MHM2)-Gln<sup>218</sup> プリオン蛋白質およびマウス-Lys<sup>218</sup> プリオン蛋白質を大腸菌で効率良く産生させることに成功した。また、封入体として産生された、タンパク質をイオン交換クロマト（CM- Sepharose）と HPLC 用ゲルろ過の2段階の簡単な操作で大量かつ高度に精製する方法を開発することに成功した。

A. 研究目的

本研究で異常プリオン合成阻害剤として用いる変異型マウスプリオンタンパク質を長期間安定に供給することを目的として、その大腸菌での発現と、発現タンパク質の精製方法を開発し、タンパク質化学的性状を検討する。

B. 研究方法

1. 組換えマウスプリオンタンパクの作成：

mousePrP をコードする cDNA およびマウス/ヒトキメラ(MHM2)-Lys<sup>218</sup> をコードする cDNA を鋳型として、その Lys<sup>23</sup>-Ser<sup>230</sup> に相当する領域を PCR 法を用いて pET11a ベクター（Novagen）にクローニングした。なお Ser<sup>230</sup> に続く終止コドンには TGA (Opal) を用いた。得られ

た組換え DNA をもとに、マウス/ヒトキメラ(MHM2)-Gln<sup>218</sup> プリオン蛋白質およびマウス-Lys<sup>218</sup> プリオン蛋白質の全ての組み合わせを作製して大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株に導入し、プリオン蛋白質の発現を常法により誘導した。

2. 組換えマウスプリオンタンパクの精製と性状

封入体を 0.1%メルカプトエタノールを含む 8M 尿素で可溶化後、8M 尿素を含む 50mM Tris-HCl buffer pH8.0 で平衡化した CM- Sepharose カラムに吸着せしめ、同緩衝液で洗浄後プリオンタンパクを 6M グアニジンで溶出し、最終的に 6M グアニジンを含む 0.1M リン酸緩衝液で平衡化した HPLC 用ゲルろ過カラムで PrP を精製した。

（倫理面への配慮）

### C. 研究結果

精製タンパク質 (wild, 218K) は質量分析及アミノ酸配列分析により所期の目的に合致した PrP であることを確認した。精製表品には分子量の若干大きな成分が含まれていたが (1%程度)、この翻訳産物は cDNA に導入した Ser<sup>230</sup> の直後の終止コドン (TGA) において翻訳が終了せずに、さらに 63 塩基 (即ち 21 アミノ酸残基分) を下って現れる pET11a 由来の TAA 配列 (終止コドン、Ochre) まで翻訳が続いてしまった産物であると決定できた。

### D・E 考察・結論

本研究で得られたリコンビナントプリオンタンパク (マウス-Lys<sup>218</sup> プリオン蛋白質) を異常プリオン持続感染株 (ScN2a) に作用させることにより、異常プリオンの生成が阻害されることは主任研究者の金子が別に報告している。今後、マウスにプリオン病を発症させ、その発症過程でリコンビナントプリオンタンパクを投与してその治療効果を確認する予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

(1)「プリオンタンパク質の competitive

assay による定量」 大内史子、山河芳夫、西島正弘 (国立感染研・細胞化学部) 神山恒夫 (同・獣医科学部)

第74会日本生化学会大会 (京都) 2001. 10月

(2)「遺伝性プリオン病 M232R 変異とプリオンタンパクの異常化」 絹見朋也<sup>1</sup>、山河芳夫<sup>1</sup>、萩原健一<sup>1</sup>、金子清俊<sup>2</sup>、西島正弘<sup>1</sup> <sup>1</sup>感染研・細胞化学部 <sup>2</sup>国立精神神経センター疾病研究部第7部

第74会日本生化学会大会 (京都) 2001. 10月

(3)「マウスプリオン病発症過程における脳、脾臓への異常プリオンタンパク質の蓄積」 井上雄嗣<sup>1</sup>、大内文子<sup>2</sup>、神山恒夫<sup>3</sup>、岩崎拓也<sup>4</sup>、小野寺節<sup>5</sup>、西島正弘<sup>2</sup>、山河芳夫<sup>2</sup> 1.東工大(資源化学研究所) 2.感染研・細胞化学部 3.同・獣医科学部 4.同・感染病理部 5.東大(農)

第74会日本生化学会大会 (京都) 2001. 10月

### H. 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（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

遺伝子導入法の確立

分担研究者 武田伸一 国立精神・神経センター神経  
研究所

研究協力者 遺伝子疾患治療研究部 部長  
鈴木友子（遺伝子疾患治療研究部）  
岸田日帯（疾病研究第七部）

研究要旨

プリオン病発症の原因である異常感染型プリオン蛋白（PrP<sup>Sc</sup>）の複製の抑制を目的として、孤発性CDJの疫学的研究等からその重要性が指摘されているヒトの遺伝子多型に相当するマウスの変異型プリオン蛋白（MoPrP218K）を頭蓋内に十分供給するためのレトロウイルスベクターの作製を行った。

A. 研究目的

プリオン病は、プリオン蛋白（PrP）の立体構造変換がその病因に関与する疾患である。プリオン蛋白には正常型（PrP<sup>C</sup>）と異常感染型（PrP<sup>Sc</sup>）とが存在し、両者のアミノ酸配列は相同だが立体構造は大きく異なる。PrP<sup>Sc</sup>を鋳型としてPrP<sup>C</sup>がPrP<sup>Sc</sup>に変換されると考えられているが、その詳細は依然不明である。ヒトのプリオン病であるCreutzfeldt-Jakob病（CJD）は、進行性痴呆や運動機能障害が急速に悪化して数ヶ月で無動無言状態となる致死性の疾患である。我が国では1973年から1997年3月まで脳外科手術において年間約2万枚の乾燥硬膜が使用された。この硬膜移植が原因と考えられる医原性CJDは我が国でもっとも発症例が多く、大きな社会問題となっている。孤発性CJDの疫学的研究から、ヒトのプリオン遺伝子のコドン219のグルタミン酸がリジンに置換した遺伝子多型（219K）を有する個体が、プリオン病に対して抵抗性

を有することが判った。金子らは、スクレイピー持続感染N2a（ScN2a）細胞に219Kに相当するマウスの変異型プリオン蛋白（MoPrP218K）を発現させることによって、PrP<sup>Sc</sup>複製が抑制されることを示した。そこで、我々は硬膜移植後プリオン病の進行阻止・治療法の開発のために、PrP<sup>Sc</sup>複製の抑制を目標として、変異型プリオン蛋白を頭蓋内に十分供給するための基礎研究を行った。

B. 研究方法

治療効果を有する変異型プリオン蛋白（MoPrP218K）を細胞外に分泌させるため、そのシグナル配列よりGPIアンカー付着領域の直前まで（PrPの1-230番目のアミノ酸）の塩基配列を含むレトロウイルスベクターを作製した。

さらにlacZを発現するレトロウイルスベクターを用いて、新しいパッケージング細胞（Plat-E）を使用することで高力価ウイルス液の調整方法を検討した。その結果、安定して10<sup>8</sup>cfu/mlの感染力

価のウイルス液を得られるようになった。

(倫理面への配慮)

本実験において、現在までではヒト及び動物の試料を使用していないため、特に倫理上の問題点はないと考える。

#### C. 研究成果

上記ベクターの作製をおこなうとともに、安定して高価のレトロウイルスベクター液を得ることができた。

#### D. 考察

マウスの変異型プリオン蛋白 (MoPrP218K) が、PrP<sup>Sc</sup>複製に対して抑制効果を持つ可能性は、孤発性CJDの疫学的研究などから、既に指摘されている。

この dominant negative 効果を有する MoPrP218K を大腸菌より精製し、ScN2a 細胞の培養液中に添加した結果、細胞外からの投与でも PrP<sup>Sc</sup>複製が抑制される傾向がみられた。そこでプリオン病の進行阻止・治療法を検討する際に、MoPrP218K を安定に頭蓋内に十分供給することが重要になる。in vitro で合成した MoPrP218K を経頭蓋的に持続注入するほか、ex vivo で MoPrP218K を細胞外に分泌するよう遺伝子導入をおこなった細胞を頭蓋内に移植する方法も有用であると思われる。その際に永続的に安定した発現を維持するためにはレトロウイルスベクターが最適であり、上記のベクターを作製した。

非分裂細胞である神経細胞へ in vivo に局所的な遺伝子導入をおこなうためには、アデノウイルスベクターやアデノ関連ウイルス(AAV)ベクターが頻用されるが、プリオン病は脳全体の広範な領域が侵される疾患であり、これらのベクターは使用しづらい。

#### E. 結論

プリオン病に対する遺伝子治療法を

検討する際に、dominant negative 効果を有する MoPrP218K を安定に頭蓋内に十分供給することが重要になる。細胞外に MoPrP218K を安定に分泌するためのレトロウイルスベクターを作製した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

なし

##### II. 学会発表

岸田日帯, 戸田宏幸, 鈴木友子, 武田伸一, 古屋一英, 川原信隆, 桐野高明, 絹見朋也, 山河芳夫, 西島正弘, 金子清俊: マウス (Mo) K218 の遺伝子多型の dominant negative 効果を利用したプリオン病に対する治療法の確立、2001 年 CREST シンポジウム「脳を守る」

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岸田日帯, 戸田 宏幸, 金子清俊	遺伝子改変動物から みたプリオン病研究 の進歩	脳と神経	53	821	2001
岸田日帯, 戸田 宏幸, 金子清俊	プリオン病 分子病 態と治療に向けて	Molecular Medicine	38	1254	2001
Peretz, D., Williamson, R.A., Kaneko, K., et al.	Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity.	Nature	412	739	2001