

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

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

リコンビナントプリオンタンパク投与によるプリオン病発症の遅延効果

分担研究者 西島正弘 (国立感染症研究所 細胞化学部)

研究協力者 山河芳夫 (国立感染症研究所 細胞化学部)

研究要旨

異常型プリオン持続感染株 scN2a 細胞において recPrP の培地内への添加で異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) の生成が阻害されることから、recPrP のマウスプリオン病の発症に及ぼす効果を検討した。その結果、病原体 (10ug 脳当量) の単独接種でマウスの平均生存日数は約 95 日であったが、病原体と 1 または 10ug の recPrP 218K を同時に接種した場合には生存日数が約 10 日延伸した。Wild type recPrP でも 1ug で PrP 218K と同様の生存日数の延伸がみとめられ、10ug 脳当量の投与ではコントロール群に比べて約 20 日の生存日数の延伸がみとめられた。一方、病原体と 10ug の recPrP 218K を同時接種して 40 日経過後に 10ug の recPrP 219K を脳室内に追加投与したが、さらなる延伸効果は認められなかった。

A. 研究目的

異常型プリオン持続感染株 scN2a 細胞において recPrP の培地内への添加で異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) の生成が阻害されることから、recPrP のマウスプリオン病の発症に及ぼす影響を検討する事を目的として、病原体と recPrP をマウスに同時投与して、発症に及ぼす recPrP の影響を検討する。

(帯広 1 株) 発症マウスの脳ホモジネート (10-0.1%) を用いた。recPrP は大腸菌で発現せしめた wild type 及び 218K をそれぞれ精製して用いた(前年度報告書参照)。マウスは 8 週齢から 10 週齢の両性 C57 マウス (PrP^C 過発現トランスジェニック) を一群 5 匹として用い、病原体を単独あるいは recPrPs (1 及び 10ug) と共に脳室内へ 25ul を投与した。

B. 研究方法

病原体はマウス順化スクレイピー

(倫理面への配慮)

本実験においては、予め実験動物倫

理委員会に申請を行い審議の後、了承を受けた上で実施した。

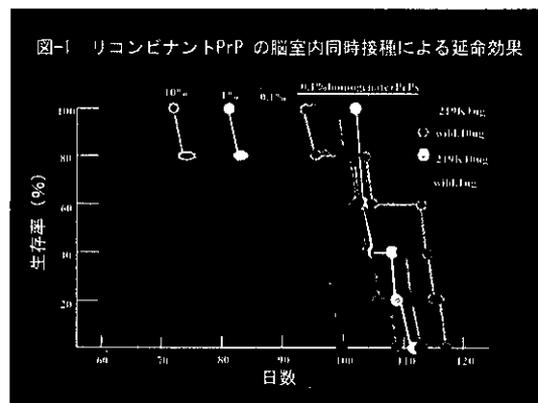
C. 研究結果

図1に示すように、病原体の単独接種（0.1%脳ホモゲネート）でマウスの平均生存日数は約95日であった。これに対して、同量の病原体と1または10ugのrecPrP 218Kを同時に接種した場合には生存日数が約10日延伸した。Wild type recPrPでは1ugでPrP 218Kと同様の生存日数の延伸がみとめられ、10ugの投与ではコントロール群に比べて約20日の生存日数の延伸がみとめられた。なお、病原体と10ugのrecPrP 218Kを同時接種して40日経過後に10ugのrecPrP 219Kを脳室内に追加投与したが、さらなる延伸効果は認められなかった。

D. 考察/ E. 結論

recPrPは病原体と同時に接種した場合にプリオン病の発症を10日-20日程遅延させた。これは、病原体と宿主のPrP^{sc}との相互作用をrecPrPが阻害したか、recPrPが異常型プリオンの生成に必需と考えられているシャペロン様物質（プロテインX）と相互作用してその活性あるいは量を一時的に阻害または減少せしめた結果と考えられる。本実験ではrecPrPが脳室内に投与されているために、一過性の投与ではrecPrPが脳脊髄液で希釈され十分な治療・遅延効果が得られなかった可能性がある。今後、マイクロポンプを用いてより高濃度のrecPrPを連

続投与することによりrecPrPの治療・発症予防効果をより確実なものにしたいと考えている。



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) 「プリオン病のプロテオーム解析」 大内史子、山河芳夫、西島正弘（国立感染研・細胞化学部）第75回日本生化学会大会（京都）2002.10月
- (2) 「ウイルス感染時におけるプリオンタンパク質の機能関与」 中村優子¹、山河芳夫¹、西島正弘¹、佐伯圭一²、小野寺節²、¹国立感染研・細胞化学部 ²東大大学院・農学部・応用免疫。第75回日本生化学会大会（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

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

遺伝子導入法の確立

分担研究者 武田伸一（国立精神・神経センター遺伝子疾患治療研究部）
研究協力者 鈴木友子（遺伝子疾患治療研究部）
吉村まどか（東京大学大学院）

研究要旨

孤発性CJDの治療の基礎的研究として、中枢神経系の細胞に効率よく治療用遺伝子を導入・発現すると報告されているAAVウイルスベクターとセンダイウイルスベクターにレポーター遺伝子を組み込み、マウス及び実験犬に導入し、経時的にその発現を検討した。

A. 研究目的

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。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・治療効果を持つ治療用遺伝子を効率よく、硬膜及び神経細胞に導入することを目標とした遺伝子導入法の検討を行った。

B. 研究方法

1. AAV-2およびAAV-5を用いた遺伝子導入法の検討

AAV-2および、AAV-5にLacZ遺伝子、およびDMDの治療遺伝子、マイクロジスト

ロフィンを組み込んだベクターを構築した。挿入遺伝子の発現を制御するプロモーターとして、ubiquitousなCMVプロモーターと骨格筋組織特異的プロモーターMCKプロモーターおよび、その変異型CK-6を用いた。これらのウイルスベクターを、C57Bl/10マウス、C57Bl/10-mdxマウス、およびビーグル犬及び同腹の筋ジストロフィー犬に導入し、経時的にLacZおよびマイクロジストロフィンの発現と、筋変性に対する治療効果を検討した。

2. センダイウイルスベクターへの治療遺伝子の挿入と、ベクターの産生

センダイウイルスベクターにマイクロジストロフィン（CS-1）を導入したウイルスベクターを構築した。（筑波大・神経内科、石井亜紀子先生、DNAVECとの共同研究）

（倫理面への配慮）

本実験においては、予め実験動物倫理委員会に申請を行い審議の後、了承を受けた

上で実施した。

C. 研究成果

AAV-2ベクターは、分裂後の筋細胞に導入効率が高く、安定した導入遺伝子の発現が可能であった。また、組織特異的プロモーターと組み合わせることで、ホストの免疫反応を惹起することが阻害されるため、より長期間の発現が可能になった。現在AAVの血清型（2型と5型）による遺伝子導入効率の比較検討を行っている。センダイウイルスベクターに導入したマイクロジストロフィンは、現在 mdx マウスに導入中である。

D. 考察

中枢神経系や骨格筋に治療用遺伝子を導入するためには、1) 長期間発現可能で細胞毒性が少ないAAVベクターが有効であると考えられるが、2) CJDの進行を阻止する目的では、高い発現レベルが可能なセンダイウイルスが有効かも知れない。また、投与ルートや組織へのtargetingのストラテジーを検討することが今後必要である。今後は、その細胞毒性や安全性を考慮しながら、中枢神経系へ導入実験を行っていききたい。

E. 結論

中枢神経系の細胞に効率よく遺伝子を導入発現させる目的で、ウイルスベクターを用いた検討を行い、骨格筋細胞においてはAAVベクターにより、高い導入・発現効率を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, and Takeda S:

Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ)

Experimental Animals (in press) 2003

2. Yuge R, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Ikuta Y, and Kataoka K:
Simulated microgravity inhibits p38^{MAPK} cascade and cell differentiation in human osteoblasts cultured in a 3D-clinostat
In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal (in press) 2003
3. Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, and Engvall E:
Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice.
Neuromuscul Disord 2003 13(3):207-15
4. Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J and Chamberlain JS, Xiao X, and Takeda S:
Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product.
Gene Ther 9: 1576-88, 2002
5. Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S, and Takeda S:
Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice.
Biochim Biophys Acta 1588:195, 2002
6. Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Matsuda R, Ikemoto T, Kameya S, and Takeda S:
 α 1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration.
J Cell Biol 158: 1097-1107, 2002
7. Roberts ML, Wells DJ, Graham IR, Fabb SA, Hill VJ, Duisit G, Yuasa K, Takeda S, Cosset FL, and Dickson G:
Stable micro-dystrophin gene transfer using an integrating adeno-retroviral hybrid vector ameliorates the dystrophic pathology in mdx mouse muscle.
Hum Mol Genet 11: 1719-30, 2002
8. Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M,

- Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S:
Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene.
Biochem Biophys Res Commun 293(4): 1265-72, 2002
9. Sakamoto K, Ohara O, Takagi M, Takeda S, and Katsube K:
Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification.
Developmental Biology 241(2):313-26, 2002
10. Fujimori K, Itoh Y, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Yoshizaki Y, Yamamoto H, and Takeda S:
Interleukin-6 induces over-expression of the sarcolemmal utrophin in neonatal *mdx* skeletal muscle.
Human Gene Therapy 13: 509-518, 2002
11. Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, Takeda S, and Yamamoto H:
Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice.
J Cell Sci 115: 1285-1293, 2002
- Inobe M, Inobe I, Adams GR, Baldwin KM, and Takeda S:
Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle.
J Appl Physiol 92(5): 1936-42, 2002
12. Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, and Ikeda S:
Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin in *mdx* mice hearts by physiological exercise.
FEBS Letter 520(1-3): 18-24, 2002

II. 学会発表

なし

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
Korth C, Kaneko K, Groth D, NHeye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB	Abbreviated transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to mice expressing a novel chimeric prion protein transgene.	Proc Natl Acad Sci U S A.		印刷 中	2003
Toda H, Sakasegawa, Y, Kishida, H, Arima K, Yamada M, Arai T, K, Hitoshi Takahashi H, Yoshiyuki Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K.	Distinct pattern of tau phosphorylation in laser microdissected Pick bodies: "A novel microbiological approach <i>in situ</i> ".	Neurosci Lett,		印刷 中	2003

Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y.	Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein (HuPrP) reveals the higher stability of the dimeric form.	Biophys J		印刷中	2003
Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K	Two-Dimensional Electrophoresis/ hage Panning (2D-PP): A Novel Technology for Direct Antibody Selection on 2-D Blots.	J Biochem (Tokyo)	132	245	2002
Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K	In Situ Phage Screening. A method for identification of subnanogram tissue components <i>in situ</i> .	J Biol Chem.	277	30382	2002
Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC	Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice.	Proc Natl Acad Sci U S A.	99	13709	2002
八谷如美, 金子清俊	プリオン病	医学のあゆみ	200	1241	2002
金子清俊	ヤコブ病	医学最前線 健康な子ども,	132	352	2002
逆瀬川裕二, 金子清俊	分子レベルの最新疾患研究①プリオン病の分子病態と抗体を用いた治療法	実験医学	2	1344	2002
桜井総子, 金子清俊	プリオン蛋白質異常化の分子メカニズムと治療への応用	ファルマシア	38	64	2002
金子清俊	プリオン病研究の現状と変異型CJD	脳と精神の医学	13	171	2002
金子清俊	牛海綿状脳症: BSEいわゆる狂牛病とは、どんな病気か?	武田薬報	430	23	2002

金子清俊	BSEによる人への感染の危険性と治療法	食品衛生学雑誌	43	221	2002
逆瀬川裕二、金子清俊	プリオン病とプリオン特異抗体を用いた治療法	Cognition and Dementia	1	33	2002
金子清俊	牛海綿状脳症(BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)	東京保険医新聞	1206	3	2002
金子清俊	牛海綿状脳症(BSE)と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)	東京内科医会会誌	18	21	2002
金子清俊	プリオン病の分子生物学	臨床検査	46	1501	2002
金子清俊	Prion病発症のメカニズム	神経内科	57	377	2002
金子清俊	プリオン蛋白関連疾患	医学の歩み	203	855	2002
逆瀬川(八谷)如美、金子清俊	プロテインX-異常プリオン増殖に関するプレイヤー	医学の歩み	203	877	2002
金子清俊	プリオン病の分子生物学	臨床検査	46	1501	2002
金子清俊	牛海綿状脳症(BSE)と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)。	運動障害	12	113	2002
金子清俊	プリオン蛋白質異常化のメカニズム	神経研究の進歩	47	37	2003
Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, and Takeda S	Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ)	Experimental Animals		印刷中	2003

Yuge B, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Ikuta Y, and Kataoka K	Simulated microgravity inhibits p38 ^{MAPK} cascade and cell differentiation in human osteoblasts cultured in a 3D-clinostat	In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal		印刷中	2003
Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, and Engvall E	Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice.	Neuromuscul Disord	13	207	2003
Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Tanouchi A, Yamamoto H, Li J and Chamberlain JS, Xiao X, and Takeda S	Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product.	Gene Ther	9	1576	2003
Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Haraoka K, Nonoto S, Kaneko K, Ikeda S, and Takeda S	Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice.	Biochim Biophys Acta	1588	195	2002
Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Matsuda R, Ikenoto T, Kameya S, and Takeda S	{alpha}1-Syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration.	J Cell Biol	158	1097	2002
Roberts ML, Wells DJ, Graham IR, Fabb SA, Hill WJ, Duisit G, Yuasa K, Takeda S, Cosset FL, and Dickson G	Stable micro-dystrophin gene transfer using an integrating adeno-retroviral hybrid vector ameliorates the dystrophic pathology in <i>mdx</i> mouse muscle.	Hum Mol Genet	11	1719	2002

Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S	Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into <i>mdx</i> mice as a transgene.	Biochem Byophys Res Commu	293(4)	1265	2002
Sakamoto K, Ohara O, Takagi M, Takeda S, and Katsube K	Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands.	Developmental Biology	241(2)	313	2002
Fujimori K, Itoh Y, Yamamoto K, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Yoshizaki Y, Yamamoto H, and Takeda S	Interleukin-6 induces over-expression of the sarcolemmal utrophin in neonatal <i>mdx</i> skeletal muscle.	Human Gene Therapy	13	509	2002
Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, Takeda S, and Yamamoto H	Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice.	J Cell Sci	115	1285	2002
Inobe M, Inobe I, Adams GR, Baldwin KM, and Takeda S	Effects of microgravity on the expression of myogenic factors during postnatal development of rat skeletal muscle.	J Appl Physiol	92(5)	1936	2002
Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, and Ikeda S	Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin in <i>mdx</i> mice hearts by physiological exercise.	EBS Letter	520(1-3)	18	2002