

CR-1 や clusterin の発現を同様に免疫組織化学で調べた。

(iii) プリオン蛋白相互作用因子の探索

プリオン蛋白結合蛋白質解析： マウスの神経芽細胞腫細胞 (N2a) と RML 株に持続感染した N2a 細胞 (ScN2a)、同じく N2a 細胞にプリオン Fukuoka-1 株、22L 株を感染させた F3 細胞と L1 細胞を使用した。精製した組換え体プリオン蛋白 PrP121-231 をビオチン標識し、アビジン磁気ビーズに結合させた。³⁵S - メチオニン、システイン含有培地で細胞を生育させ生合成タンパク質を放射線ラベルした。細胞を 1% Triton X-100 含有 PBS で溶解し、上清を OptiPrep (SIGMA 社) を用いた不連続濃度勾配によって分画した。得られたラフト画分と PrP アフィニティビーズを混合し、4°C で一晩結合反応を行った。PrP アフィニティビーズからの溶出は段階的に塩濃度を上昇させて行い (200、400、600、800 mM NaCl)、得られた溶出液を 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって展開し、細胞間で泳動パターンを比較した。また、ScN2a 細胞をペントサンポリ硫酸 (PPS) 400 ng/ml を添加した培地で 5 回継代後、通常生育培地に戻して継代を行い、異常型プリオン蛋白の産生が抑制された細胞を作製し、同様にラフト画分を分画して PrP 結合蛋白質を解析した。

プリオン蛋白分解酵素解析： PCR によって増幅したマウス PrP cDNA (23-231) を C 末端に 6 残基のヒスチジンが付加される pQE ベクター (QIAGEN 社) に組み込み、大腸菌にて発現させた。菌体を尿素で溶菌し、得られた上清を活性化した Ni-NTA と混合

吸着させ、巻き戻しを行った後に溶出した。精製した HisPrP23-231 にラフト画分を加え、4°C で 24 時間反応させた。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて研究を行った。同指針の改正 (平成 16 年 2 月) 後には遺伝子解析を実施していない。

C. 研究結果

(i) 疾患感受性因子の検討

C1qRP において認められた P559S、M662V、R512R (数字は、アミノ酸通し番号) の 3 つのアミノ酸置換を伴う多型のうち、P559S は、疾患確定群で S/S 55.6%、S/P 29.6%、P/P 14.8% であり、対照群で S/S 45.7%、S/P 50.0%、P/P 4.3% であった。両群間でカイ二乗検定を行ったところ、 $p=0.047$ で有意差を認めた。しかし、臨床的に特発性ヤコブ病が疑われた症例も疾患群に加えて統計的検討を行うと、対照群との間に有意差を認めなかった。

CR1 の exon19/22/33 でそれぞれ G3093T、A3650G、C5507G (数字は、ヌクレオチド通し番号) の多型が存在し、これらの多型は、DNA シークエンシングに加えて RFLP でも同様の結果が確認され、3 つの多型には強い連鎖があり、遺伝子型は 3093G/G-3650A/A-5507C/C を持つものと、3093G/T-3650A/G-5507C/G を持つものと 2 通りであったので、代表して G3093T の遺伝子多型の保有率の分布を調べた。疾患確定群で G/G 60.7%、G/T 39.3% であり、対照群で G/G 51.0%、G/T 49.0% で有意差を認めなかった。また、CR1 では T1408M の遺伝子

多型があったが、疾患群と対照群で有意差を認めなかった。C1qBP では第 3 エクソン近傍のイントロン内に 14 塩基の欠失多型が観察されたが、これも疾患群と対照群で有意差を認めなかった。CR2 については、第 9/10 エクソンにアミノ酸置換を伴わない SNP を 1 箇所、アミノ酸置換を伴う SNP を別の箇所に観察したが、これらの多型の保有率の分布は疾患群と対照群で有意差を認めなかった。なお、clusterin 遺伝子の蛋白質コード領域にはアミノ酸置換を伴う遺伝子多型を認めなかった。

(ii) 補体系蛋白質の免疫組織化学的検討
NZW マウスに福岡 1 株を接種した感染マウスの脾臓では、異常なプリオン蛋白質の沈着に一致して CR-1 と clusterin の発現増加が認められた。プリオン蛋白質の局在とこれらの補体系蛋白質（特に CR-1）の局在は一致していた。このことは、lymphotoxin β receptor-Ig により follicular dendritic cell の分化を抑制したプリオン伝播抑制モデルマウスの脾臓組織においても、確認された。すなわち、脾臓組織へのプリオン蛋白質の沈着と、これらの補体系蛋白質の発現亢進が時間的・空間的に一致していた。

(iii) プリオン蛋白質相互作用因子の探索
ラフト画分中の PrP 結合分子： ScN2a と N2a のラフト画分と PrP121-231 の反応を行い、溶出画分ごとに 10% SDS-PAGE にて比較した結果、約 100 kDa の分子が ScN2a に約 200 kDa の分子が N2a に特異的に認められた。そこで競合反応を行ったが明確なバンドの消失は見られず、特異的な結合分子ではなかった。他にも PrP121-231 に結合する分子は多数あったが、細胞間に差は

認められず、感染に関係するような特異的結合タンパク質を同定することができなかった。他の PrP 感染細胞 (F3, L1) と N2a、薬剤処理 ScN2a と ScN2a を用いた同様の実験を行ったが、特異的結合分子を同定することができなかった。また HisPrP23-231 を用いた結合反応を行ったが、特異的結合分子を同定することはできなかった。

ラフト画分中に存在する PrP 分解酵素：塩で溶出後に Ni-NTA より EDTA にて HisPrP23-231 を溶出したところ、約 17 kDa 付近にバンドが認められた。免疫染色を行った結果、PrP の C 末認識抗体で染色された。HisPrP23-231 と EDTA、EGTA、PMSF を加えたラフトとの混合反応を行ったところ、EDTA、EGTA より PMSF に分解阻害効果が認められた。また感染細胞群と非感染細胞群、さらにはコンゴレッド処理群との間で分解活性を比較検討したが、有意な差は観察されなかった。

D. 考察

プリオン病感染因子の末梢からの（経口あるいは血液を介した）伝播・発症には、脾臓、リンパ装置など網内系や補体系が関与している (Klein MA, et al. Nat Med 2001, 7:488-492)。C3 レセプターである CR1 は、濾胞樹状細胞を含め網内系細胞にも発現していることが報告されているが、CR1 exon19/22/33 の多型は、赤血球表面に発現する CR1 蛋白質の量と相関があり、3093G-3650A-5507C は高発現型 (H type)、3093T-3650G-5507G は低発現型 (L type) の表現型と相関するとされている (Xiang L, et al. J Immunol 1999, 163:4939-4945)。

低発現型個体では、CR1 ノックアウト・マウスにおけるプリオン病感染因子の腹腔内投与による伝播の抑制と同じ傾向が見られることが期待されたが、今回の研究では疾患確定群と対照群の間でこの多型の保有率に有意差を認めなかったことから、特発性ヤコブ病においては末梢組織でのプリオン病感染因子の増幅は関与していない可能性がある。免疫組織化学的解析から、脾臓での異常プリオン蛋白の沈着とCR1の発現量が時間的・空間的に一致することから、CR1が異常型プリオン蛋白の産生に何らかの役割を果たしているものと考えられるが、今回の研究からは特発性ヤコブ病の疾患感受性遺伝子とは結論できない。一方、C1q レセプターである C1qBP は、C1q と結合してその作用を抑制するとされており、マウスの C1qBP 遺伝子は 11 番染色体の 37.00cM の位置にある。プリオン病感染因子の脳内接種後の潜伏期間の長さとの相関が強い部分とされるマーカーは 11 番染色体 40.31cM にあり (Lloyd SE, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98:6279-6283)、C1qBP 遺伝子はそれに近いところに存在する。しかし、今回の解析では C1qBP 遺伝子に観察されたイントロン部の欠失多型の保有率は対照群と疾患群との間で有意差が見られなかったことから、疾患感受性遺伝子ではないと考えられる。しかし、別の C1q レセプターである C1qRP では、疾患確定群と対照群で有意な差を示す多型が確認できた。ただ、臨床疑い例を加えた統計的解析では有意差が消失してしまったことより、さらに疾患確定症例数を増やして検討する必要がある。

また、559P 多型を持つ C1qRP が、実際にプリオン伝播・発症の感受性に関与しているかどうかを検証することは今後の課題である。

一方、ラフトはプリオン蛋白の発現部位であり、正常型から異常型への変換反応が行われる場であるとされているため、この画分中においてプリオン蛋白と結合する因子が正常型から異常型への変換反応に関与している可能性が高いのではないかと推測したが、特異的な結合分子を同定することはできなかった。その理由の一つは実験で用いた感染細胞の性質にあると考えられる。持続感染細胞株として樹立されているが、異常型プリオン蛋白の産生は不安定であり、その発現量は細胞全蛋白質量あたりでは極わずかである。そのため感染細胞中でのプリオン蛋白特異的結合分子も極微量である可能性がある。本実験では微量分子でも検出できるように放射性同位元素を用いて細胞蛋白質を標識して行ったが、その感度以下である可能性が考えられる。異常型プリオン蛋白を高発現する細胞を作製すること、2次元電気泳動のように高い解像度を与える方法による解析の必要がある。また、結合・解離といった相互作用が瞬間に起こっている可能性や弱い相互作用である可能性も想定できるため、架橋剤を用いた結合反応や、他の分子間相互作用を解析する手法を取り入れるなどの工夫が必要であると考えられる。また今回、プリオン蛋白の代謝に関係していると考えられる酵素の存在が示唆された。プリオン蛋白を切断する酵素として ADAMs が知られているが、これらは EDTA

などのキレート剤の影響を受ける金属プロテアーゼであり、今回の結果と異なる。この酵素がプリオン蛋白の代謝に関係しているのであれば、異常型プリオン蛋白の産生に何らかの影響があると考えられたが、検討した限りではそのことを実証できなかった。

E. 結論

特発性プリオン病の疾患感受性因子の候補として補体系蛋白質の遺伝子多型を、特発性ヤコブ病患者群と対照群において解析し、ClqRp 遺伝子において疾患確定群と対照群とで有意に異なる多型を認めた。脾臓において異常プリオン蛋白沈着と補体系蛋白質の発現が、時間的・空間的に一致していた。プリオン蛋白に作用するラフト中の蛋白質としてプリオン蛋白分解酵素の活性を検出した。この酵素活性は感染細胞と非感染細胞で差が見られなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T: Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* (in press)
- 2) Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T: Amyloid imaging probes are useful for

evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol* (in press)

- 3) Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T: Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol* 78:1281-1288, 2004

- 4) Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y: Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Neurology* 62:502-505, 2004

- 5) Tsuji Y, Kanamori H, Murakami G, Yokode M, Mezaki T, Doh-ura K, Taniguchi K, Matsubayashi K, Fukuyama H, Kita T, Tanaka M: Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease: diffusion-weighted MRI and PET characteristics. *J Neuroimaging* 14:63-66, 2004

- 6) Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, Tanoue Y, Ishikawa K, Katsuragi S, Nakamura M, Sun X, Nakagawa K, Sasamoto K, Takesako K, Ishizaki T, Sasaki Y, Doh-ura K: A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo. *Lab Invest* 83:1751-1759, 2003

- 7) Sasaki K, Doh-ura K, Furuta A, Nakashima S, Morisada Y, Tateishi J, Iwaki T: Neuropathological features of

a case with schizophrenia and prion protein gene P102L mutation before onset of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Acta Neuropathol* 106: 92-96, 2003

8) Nishida T, Tokumaru AM, Doh-ura K, Hirata A, Motoyoshi K, Kamakura K: Probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with valine homozygosity at codon 129 and bilateral middle cerebellar peduncle lesions. *Intern Med* 42:199-202, 2003

9) 堂浦克美: プリオン病治療薬の開発. *神経研究の進歩*, 47:109-118, 2003

10) 堂浦克美: プリオン病研究の進歩. *脳科学研究の現状と課題* 杉田秀夫、高橋清久編集、311-315頁、平成15年9月、じほう社、東京

2. 学会発表

1) 堂浦克美: 「プリオン病の治療戦略」 第26回日本医学会総会学術講演会、痴呆の克服、シンポジウム、福岡、2003年4月

2) 堂浦克美: 「プリオン病の治療」 第44回日本神経学会総会、シンポジウム、横浜、2003年5月

3) 堂浦克美: 「ヒトプリオン病の現況」 第51回日本輸血学会総会、シンポジウム、北九州、2003年5月

4) 堂浦克美: 「BSE とヒトプリオン病」 第24回衛生微生物技術協議会総会、シンポジウム、福岡、2003年7月

5) Doh-ura K: "Experimental animal studies on pentosan polysulphate." Case conference on Jonathan Simms. An inter-disciplinary meeting. Belfast, UK,

September 2003

6) Kawatake S, Doh-ura K, Murakami-Kubo I, et al: "Interaction of anti-prion chemicals with prion protein analyzed by surface plasmon resonance." International prion conference. Munchen, Germany, October 2003

7) Doh-ura K: "Interaction of prion protein and anti-prion chemicals." 第76回日本生化学会大会、シンポジウム、横浜、2003年10月

8) 堂浦克美: 「抗プリオン作用を持つ化合物の性質」生体分子ダイナミクスと機能立体構造形成研究会、岡崎、2003年12月

H. 知的所有権の出願・登録状況

工藤幸司、澤田徹、堂浦克美: プリオン蛋白蓄積性疾患の診断プローブおよび治療薬ならびにプリオン蛋白の染色剤. PCT/JP03/11056 2003年8月2日

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

プリオン感受性・非感受性細胞を用いたプリオン増殖関連因子の探索

分担研究者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

本研究ではプリオンが増殖可能なプリオン感受性細胞とプリオンが増殖できないプリオン非感受性細胞の比較解析から、プリオン複製に関与する因子の同定をすることを目的とした。プリオン持続感染細胞 I3/I5-9 は Opti-MEM で培養するとプリオンの感染を維持できるが、D-MEM で培養するとプリオン非感受性となる。I3/I5-9 のプリオン感受性に関連する培地成分を同定するために、D-MEM に種々の培地成分を加えてプリオン感受性を調べたところ、脂肪酸混合物 CDLC を添加した場合、Opti-MEM で培養したときの 10-20%の PrP^{Sc} を産生するようになった。また、I3/I5-9 がプリオン増殖を許容する培養条件と許容しない培養条件下での遺伝子発現の比較を 2 種類の方法で解析した。その結果、これまでに、2 種の解析法に共通して変化が認められた遺伝子断片を 2 つ同定した。さらに、マウス PrP^C を過発現するマウス神経芽腫細胞 N2a および NB41A3、筋芽細胞 G8 および NOR10、肝細胞 NMuLi、副腎皮質由来細胞 Y1 のプリオン感受性を、1) マウススクレイピー持続感染細胞 I3/I5 との共培養によるプリオン感染成立、および、2)脳乳剤の接種によるプリオン感染成立、の 2 通りの方法で調べた。その結果、供試した細胞中 N2a のみがプリオン感受性であった。

A. 研究目的

プリオンの複製に関与する宿主因子の同定、およびプリオン複製機構の解明は、プリオン複製過程を標的としたプリオン病治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。しかし、プリオンの複製に関与する宿主因子は、PrP 遺伝子以外には殆ど明らかとなっていない。神経由来細胞でプリオンが増殖するプリオン持続感染細胞が樹立できることから、培養細胞レベルでプリオン感受性、非感受性を論じる意味はある。プリオン感受性および非感受性細胞の比較解析は、プリオン複製に関与する因子の発見・同定につながる可能性がある。本研究では、1)I3/I5-9 のプリオン感受性に関連する培地組成の探索、2)I3/I5-9 のプリオン感受性/非感受性培養条件下での遺伝子発現の比較解析、3)マ

ウス由来株化細胞のプリオン感受性について検討した。

B. 研究方法

I3/I5-9 プリオン持続感染細胞を Opti-MEM(プリオン感受性条件)および D-MEM(プリオン非感受性条件)で培養した。D-MEM に N-2 (インシュリン、トランスフェリン、プロゲステロン、亜セレン酸塩などを含む)、非必須アミノ酸(NEAA)、G-5(EGF, EGF などを含む)、CDLC(コレステロール、リノレイン酸、リノール酸、ミリスチン酸、トコフェロール酢酸などの脂質を含む)を添加して、プリオン感受性が回復するか否かを調べた。

プリオン感受性条件下および非感受性条件下における遺伝子発現の比較解析は、

cDNA 固相化マイクロビーズを用いた網羅的遺伝子発現解析法(MPSS)、および DNA マイクロアレイ法により解析した。

マウス神経芽腫細胞 N2a および NB41A3、筋芽細胞 G8 および NOR10、肝細胞 NMuLi、副腎皮質由来細胞 Y1 を実験に使用した。これらの細胞に、マウス PrP 発現ベクター pEF-MoPrP を導入して、ネオマイシン耐性、かつマウス PrP^C を過発現するクローンを樹立して実験に用いた。プリオン持続感染細胞として、マウス chandler 株感染神経芽腫細胞を再クローニングした I3/I5-9 を使用した。

各種細胞株のプリオン感受性を検討するために、I3/I5 株(由来は chandler 株)感染マウス脳乳剤を接種して、24 時間培養した。その後、培地を交換し、3~4 日毎に継代を繰り返した。一定継代毎に、PrP^{Sc} の有無をウエスタンブロットにより調べた。

プリオン感染細胞とレシピエント細胞を共培養させることで効率良くプリオンが伝播できるという報告があることから、I3/I5-9 プリオン持続感染細胞を PrP^C 過発現細胞株と共培養してネオマイシン存在下で 2 週間連続継代した。この期間内で I3/I5-9 は死滅して PrP^C 過発現細胞のみが生存する。ドナーとなる I3/I5-9 が死滅した後に、レシピエント細胞における PrP^{Sc} の有無をウエスタンブロットにより調べた。

(倫理面への配慮)

プリオン感染培養細胞は帯広畜産大学および北海道大学の BSL2 実験施設にて行なった。

C. 研究結果

昨年度、I3/I5-9 は Opti-MEM-10%FBS で維持・培養すると、PrP^{Sc} は維持されるが、培地を D-MEM-4%FBS に変更すると、PrP^{Sc} の産生は急速に減少して数代の継代後には PrP^{Sc} は検出されなくなることを報告した。まず、現象が血清濃度の差ではなく、培地組成の違いに起因することを確認するために、I3/I5-9 を D-MEM-10%FBS で培養した。その結果、血清濃度にかかわらず、D-MEM で培養すると PrP^{Sc} の産生が低下することが

確かめられた(図 1)。D-MEM に 4 種類の添加物(G-5, N-2, NEAA, CDLC)を加えて、プリオン感受性の回復を調べた結果、CDLC を加えた場合に、Opti-MEM で培養した時の 10-20%プリオン増殖が認められた(図 2)。また、NEAA や N-2 の添加はプリオン感受性に影響を及ぼさなかった(図 2)。

Opti-MEM-10%FBS および D-MEM-4%FBS で培養した時の遺伝子発現レベルの変化を MPSS 法により解析した。その結果、Opti-MEM で発現が高いもののうち、複数回出現したものが 20 断片(うち既知遺伝子 12)、一回出現したものが 19 断片(うち既知遺伝子 9)、D-MEM で発現が高いもののうち、複数回出現したものが 20 断片(うち既知遺伝子 12)、一回出現したものが 40 断片(うち既知遺伝子 13)、存在した。

MPSS に使用した細胞は、培地以外にも血清濃度に違いがあった。図 1 で示したように、血清濃度の違いはプリオン感受性にほとんど影響しないと考えられたことから、I3/I5-9 を Opti-MEM-10%FBS および D-MEM-10%FBS で培養し、遺伝子発現の変化を Affimetrix mouse gene chip 430A DNA マイクロアレイにより解析した。MPSS 法で Opti-MEM で培養した場合に高発現が認められた 20 遺伝子断片(複数回出現したもの)のなかで、gene chip 430A に含まれていたものは 12 断片あり、そのうち 2 つの遺伝子が DNA マイクロアレイ法でも Opti-MEM > D-MEM の発現を呈していた。一つは solute carrier family 3, member 2 (Slc3a2) 遺伝子、もう一つは未同定の遺伝子であった。

I3/I5 感染マウス脳乳剤をマウス各種培養細胞に接種した場合、Neuro2a では、0.4% および 2%脳乳剤のいずれにおいても、3 代および 6 代継代後ともに PrP^{Sc} が検出された。NOR10 では、2%脳乳剤を接種した場合、3 代継代後では PrP^{Sc} が検出されたが、6 継代後では、PrP^{Sc} のバンドが検出されないことから、3 代継代で検出されたバンドは接種物の残存によるものと考えられた。使用した細胞のうち Neuro2a がプリオン感受性と判定できた(図 3)。共培養による伝達試験においても、PrP^{Sc} 陽性となったのは Neuro2a

だけであった(図4)。

D. 考察

I3/I5-9 は D-MEM で培養するとプリオン非感受性となる。D-MEM に種々の添加物を加えた結果、脂質混合物である CDLC を加えると、Opti-MEM の 10-20%ではあるが、PrP^{Sc} の産生がおこることから、脂肪酸の存在が I3/I5-9 のプリオン感受性に関与することが示唆された。プリオン持続感染 Neuro2a では、D-MEM で培養してもプリオン感受性が維持されることから、I3/I5-9 は脂肪酸の代謝経路に異常があり、それがプリオン感受性/非感受性と関係しているのかもしれない。Opti-MEM の成分組成は公表されていないが、インビトロジェン社から構成要素に関する情報を得ているので(秘守条件付き)、今後はプリオン増殖に関与する個々の成分の同定を進める予定である。

MPSS 法と DNA アレイ法の 2 種の遺伝子発現比較解析により、両方で共通に Opti-MEM > D-MEM の発現を示す遺伝子断片を 2 個見いだした。現在は Opti-MEM > D-MEM の遺伝子を主眼に解析を進めているが、Opti-MEM < D-MEM の発現を示す遺伝子についても解析する必要がある。今回同定した Slc3a2 はタイプ II の膜貫通蛋白質で、中性アミノ酸の輸送に関与する。PrP^C から PrP^{Sc} への転換は、細胞膜を含め細胞膜上に発現した PrP^C の分解経路の過程でおこると考えられていることから、膜蛋白質が候補として挙がってきたことは興味深い。今後、プリオン増殖への関与の有無を明らかにする必要がある。

今回使用した 6 種のマウス株化細胞のうち、プリオン感受性であったのは Neuro2a のみであり、他はプリオン非感受性であった。今回使用した I3/I5 株は Neuro2a で増殖可能であったが、Obihiro 株、G1 株は Neuro2a で増殖しないことから(結果は示さず)、プリオン感受性を規定する機構として、宿主因子とプリオンの相互作用を考慮する必要がある。

E. 結論

プリオン持続感染細胞 I3/I5-9 は Opti-

MEM で培養するとプリオンの感染を維持できるが、D-MEM で培養するとプリオン非感受性となる。I3/I5-9 のプリオン感受性に関連する培地成分を同定するために、D-MEM に種々の培地成分を加えてプリオン感受性を調べたところ、脂肪酸混合物 CDLC を添加した場合、ある程度プリオン感受性が回復した。I3/I5-9 がプリオン増殖を許容する培養条件と許容しない培養条件下での遺伝子発現の比較を 2 種類の方法で解析した結果、これまでに、2 種の解析法に共通して変化が認められた遺伝子断片を 2 つ同定した。一つは solute carrier family 3 member 2 (Slc3a2) 遺伝子、もう一つは未同定の遺伝子であった。また、マウス由来株化細胞のプリオン感受性を調べたところ、供試した細胞中 Neuro2a のみがプリオン感受性であった。

F. 健康危険情報

感染性を有するプリオンを使用した実験は、BSL2 実験施設内で行ない、汚染物は 800 度以上の焼却処理、あるいは、135℃30 分のオートクレーブ処理により不活化した。実験室内感染、外部への病原体の拡散などの事故は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S., and Katamine, S. Cellular prion protein promotes Brucella Infection into macrophages. *J. Exp. Med.* 198: 5-17, 2003.

Gombojav, A., Shimauchi, I., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Kitamoto, T., Ichiro Miyoshi, I., Mohir, S., and Takata, M. Susceptibility of Transgenic Mice Expressing Chimeric Sheep, Bovine and Human PrP Genes to Sheep Scrapie. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 341-347, 2003.

Okamoto, M., Furuoka, H., Horiuchi, M.,

Noguchi, T., Hagiwara, K., Muramatsu, Y., Tomonaga, K., Tsuji, M., Ishihara, C., Ikuta, K., and Taniyama, H. Experimental Transmission of Abnormal Prion Protein (PrPsc) in the Small Intestinal Epithelial Cells of Neonatal Mice. *Vet Pathol.* 40: 723-727, 2003.

Kim, C-L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., and Horiuchi, M. Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies. *Virology* 320: 41-52, 2004.

堀内 基広 抗 PrP 抗体によるプリオン増殖抑制とプリオン病治療の可能性 最新医学 58(12): 2802-2808 (2003)

堀内 基広 牛海綿状脳症問題に関する最近の動向 老人精神医学 14: 1488-1494 (2003)

2. 学会発表

堀内 基広、梅谷 淳、工藤 聡子、石黒 直隆、横山 隆、品川 森一： BSE スクリーニング用 ELISA(ORF ELISA)の開発とその性能評価 第 135 回日本獣医学会

大林 浩二、堀内 基広、石黒 直隆、品川 森一： プリオン蛋白質と結合するペプチド性リガンドの探索 第 135 回日本獣医学会

田村 勇耕、堀内 基広、石黒 直隆、古岡 秀文、品川 森一： 尿崩症を誘発するマウス順化スクレイピー株の分離と解析 第 135 回日本獣医学会

金 チャンラン、品川 森一、石黒 直隆、堀内 基広： 抗 PrP 抗体パネルによる正常プリオン蛋白質の細胞内局在マッピング 第 51 回日本ウイルス学会

前田 秋彦、金 チャンラン、田村 勇耕、品川 森一、堀内 基広： オクタペプチドリピートを認識する抗 PrP 抗体による BSE とスクレイピー自然例の識別 第 51 回日本ウイルス学会

菊池 宏明、品川 森一、石黒 直隆、堀内 基広： プリオン感受性・非感受性細胞の選別 第 51 回日本ウイルス学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
該当なし

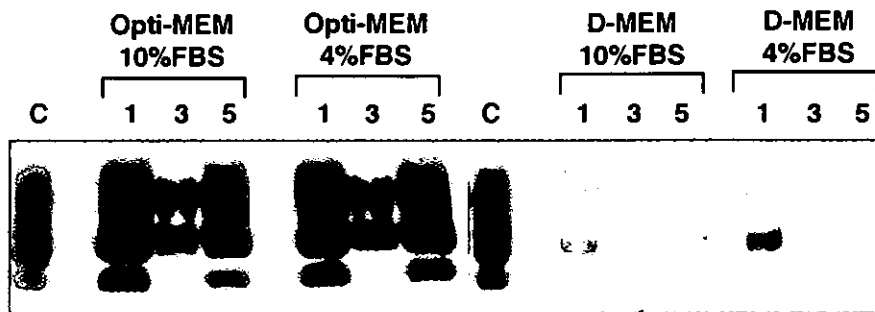


図1. I3/I5-9をD-MEMで培養した時の血清濃度がPrP^{Sc}産生に及ぼす影響。

I3/I5-9をOpti-MEM-10%FBS、Opti-MEM-4%FBS、D-MEM-10%FBS、D-MEM-4%FBS、で5代連続継代した。1、3、5代継代時のPrP^{Sc}をウエスタンブロットにより調べた。CはI3/I5-9感染細胞由来の陽性対照。

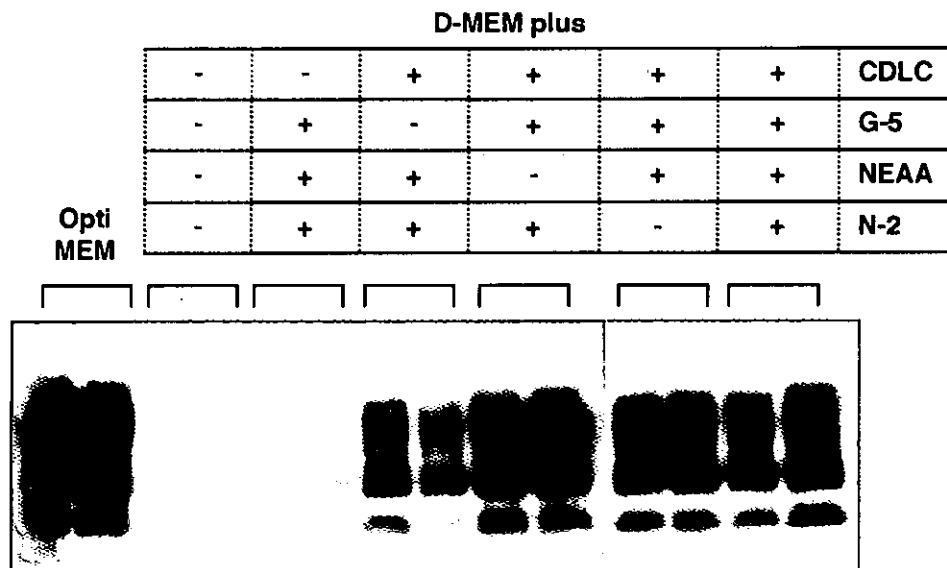


図2. 培地添加物がPrP^{Sc}産生に及ぼす影響。

D-MEMに、CDLC、G-5、NEAA、N-2を加えた培地でI3/I5-9を3代継代してPrP^{Sc}の産生量を調べた。すべてduplicateで実施した。+は添加、-は非添加を示す。陽性対象としてOpti-MEMで培養したI3/I5-9を左の2レーンに示した。

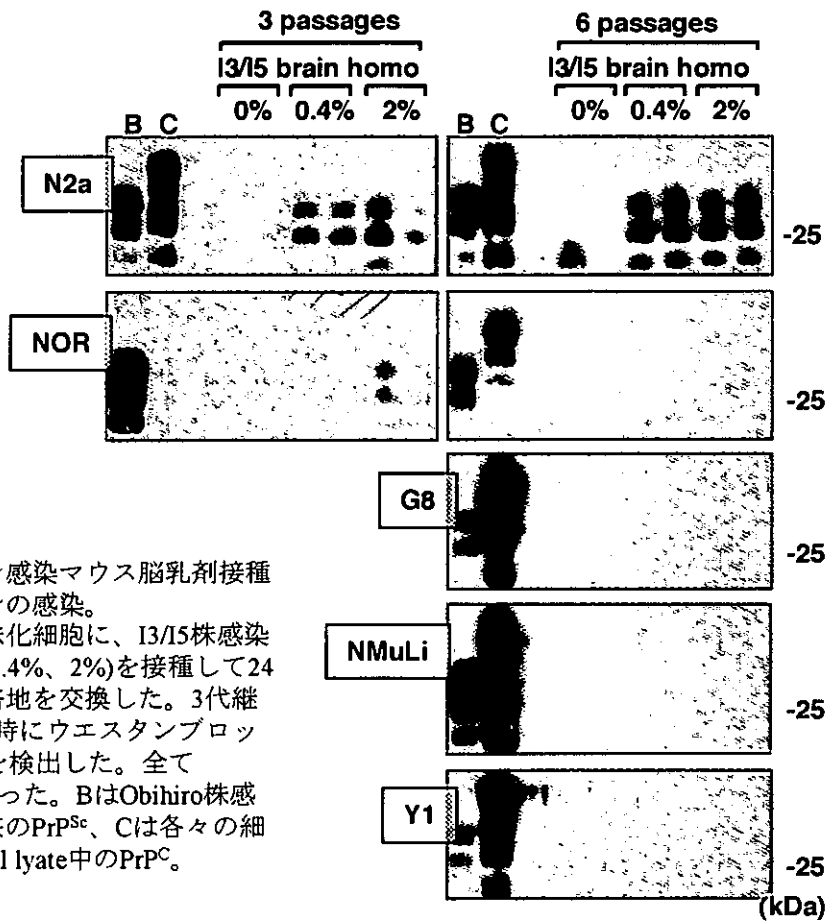


図3. プリオン感染マウス脳乳剤接種によるプリオンの感染。
 マウス由来株化細胞に、13/15株感染マウス脳乳剤(0.4%、2%)を接種して24時間培養後に培地を交換した。3代継代後、6代継代時にウエスタンブロットによりPrP^{Sc}を検出した。全てduplicateで行なった。BはObihiro株感染マウス脳由来のPrP^{Sc}、Cは各々の細胞(非感染)のcell lyate中のPrP^C。

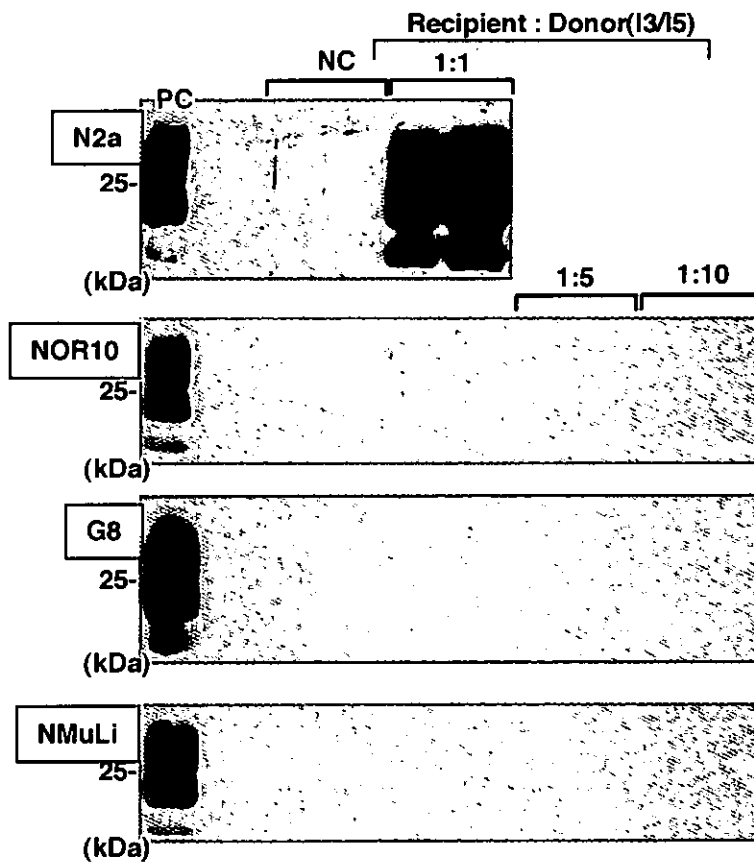


図4. 共培養によるプリオンの伝達。
 各々のPrP^C過発現株化細胞(レシピエント)と13/15-9(ドナー)を1:1、1:5、1:10の割合で混合して共培養した。4代継代後にウエスタンブロットによりPrP^{Sc}を検出した。NCはドナーを加えていないPrP^C過発現株化細胞、PCは13/15-9のPrP^{Sc}を示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	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
堂浦克美	プリオン病研究の進歩	杉田秀夫、高橋清久	脳科学研究の現状と課題	じほう社	東京	2003	311-315

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
Atarashi, R., Nishida, N., Shigematsu, K., Goto, S., Kondo, T., Sakaguchi, S., Katamine, S.	Deletion of N-terminal Residues 23-88 from Prion Protein(PrP) Abrogates the Potential to Rescue PrP-deficient Mice from PrP-like Protein/Doppel-induced Neurodegeneration.	The Journal of Biological Chemistry	278	28944-28949	2003
Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S., Katamine, S.	Cellular prion protein promotes Brucella Infection into macrophages.	J. Exp. Med.	198	5-17	2003
Yukitake, M., Satoh, J., Katamine, S., Kuroda, Y.	EAAT4 mRNA expression is preserved in the cerebellum of prion protein-deficient mice.	Neuroscience Letters	352	171-174	2003
Nishida T, Tokumaru AM, Doh-ura K, Hirata A, Motoyoshi K, Kamakura K	Probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with valine homozygosity at codon 129 and bilateral middle cerebellar peduncle lesions.	Intern Med	42	199-202	2003
Sasaki K, Doh-ura K, Furuta A, Nakashima S, Morisada Y, Tateishi J, Iwaki T	Neuropathological features of a case with schizophrenia and prion protein gene P102L mutation before onset of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease.	Acta Neuropathol	106	92-96	2003
Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, Tanoue Y, Ishikawa K, Katsuragi S, Nakamura M, Sun X, Nakagawa K, Sasamoto K, Takesako K, Ishizaki T, Sasaki Y, Doh-ura K	A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis in vitro and in vivo.	Lab Invest	83	1751-1759	2003
Tsuji Y, Kanamori H, Murakami G, Yokode M, Mezaki T, Doh-ura K, Taniguchi K, Matsubayashi K, Fukuyama H, Kita T, Tanaka M	Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease: diffusion-weighted MRI and PET characteristics.	J.Neuroimaging	14	63-66	2004
Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y	Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation.	Neurology	62	502-505	2004

Murakami-Kubo I, Doh-ura K, Ishikawa K, Kawatake S, Sasaki K, Kira J, Ohta S, Iwaki T	Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies.	J Virol	78	1281-1288	2004
Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, Iwaki T	Amyloid imaging probes are useful for evaluation and treatment of transmissible spongiform encephalopathies.	J Gen Virol	in press		
Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, Race R, Iwaki T	Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models.	J Virol	in press		
堂浦克美	プリオン病治療薬の開発.	神経研究の進歩	47	109-118	2003
Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S., and Katamine, S.	Cellular prion protein promotes Brucella Infection into macrophages.	J. Exp. Med.	198	5-17	2003
Gombojav, A., Shimauchi, I., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Kitamoto, T., Ichiro Miyoshi, I., Mohir, S., and Takata, M.	Susceptibility of Transgenic Mice Expressing Chimeric Sheep, Bovine and Human PrP Genes to Sheep Scrapie.	J. Vet. Med. Sci.	65	341-347	2003
Okamoto, M., Furuoka, H., Horiuchi, M., Noguchi, T., Hagiwara, K., Muramatsu, Y., Tomonaga, K., Tsuji, M., Ishihara, C., Ikuta, K., and Taniyama, H.	Experimental Transmission of Abnormal Prion Protein (PrPsc) in the Small Intestinal Epithelial Cells of Neonatal Mice.	Vet Pathol	40	723-727	2003
Kim, C-L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., and Horiuchi, M.	Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies.	Virology	320	41-52	2004
堀内基広	抗PrP抗体によるプリオン増殖抑制とプリオン病治療の可能性	最新医学	58(12)	2802-2808	2003
堀内基広	牛海綿状脳症問題に関する最近の動向	老人精神医学	14	1488-1494	2003