

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. München, 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

〔知的所有権の取得状況〕

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

抗 PrP 抗体を用いたプリオン感染動物摘発法の高度化

班 員：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究科・プリオン病学講座）
研究協力者：小門 善正（帯広畜産大学・獣医公衆衛生、(株)ベネシス）

〔研究要旨〕

PrP^{Sc} 検出を指標としたプリオン感染動物スクリーニング法の高感度化を目的として、我々が確立した PrP^{Sc} 検出用 captured-ELISA(OFR-ELISA)の改変を試みた。発色法による検出を、高感度化が期待できる化学発光法、あるいは時間分解蛍光法(TRF)に変更して、プリオン感染動物脳組織から PrP^{Sc} 検出の高感度化が可能か否かについて検討した。西洋わさびペルオキシダーゼの発光基質として Supersignal femto (PIERCE)、アルカリフォスファターゼの発光基質として CSPD/EM (TROPIX)を用いた。また、TRF にはヨーロピウム標識抗体を用いて、発色基質 TMB を使用する OFR-ELISA との検出感度の比較を行った。スクレイピー感染マウス脳を非感染マウスで希釈した試料から PrP^{Sc} 分画を調整して、それぞれの検出系における検出限界を調べた。その結果、TMB を使用する OFR-ELISA では 4⁻⁷ 希釈、Supersignal femto で 4⁻⁷ 希釈、CSPD/EM では 4⁻⁸ 希釈、TRF で 4⁻⁶ 希釈まで PrP^{Sc} が検出可能であった。化学発光基質 CSPD/EM の導入により、PrP^{Sc} の検出感度が 4 倍程度上昇することが判明した。使用したスクレイピー感染脳組織は 5 x 10⁵ LD₅₀/mg の感染価を有していることから、約 7LD₅₀/mg 以上のプリオンを含む脳組織を摘発可能である。さらに、試料調製法にリンタングステン酸法を使用すると、4 倍感度が上昇し、4⁻⁹ 希釈まで PrP^{Sc} を検出可能であった。BSE 感染牛脳からの PrP^{Sc} 検出に於ても、CSPD/EM を使用した化学発光法が OFR-ELISA よりも 4 倍程度高感度であった。

Improvement of screening method for prion-infected animals using anti-PrP antibody

Motohiro HORIUCHI¹ and Yoshimasa Kokado^{2,3}

¹Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, ²Laboratory of Veterinary Public Health, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, ³Benesis Co. Ltd.

ABSTRACT

In order to improve a sensitivity of screening method for prion-infected animals, in this study, we attempted to modify an OFR-ELISA, captured-ELISA system recently developed by ourselves, by substituting of a colorimetric substrate for light-emission substrates. We used Supersignal femto (PIERCE) as substrates for peroxidase, and CSPD/EM (TROPIX) as substrates for alkaline phosphatase. We also attempted a time resolved fluorescence assay (TRF) by using Europium conjugated anti-PrP monoclonal antibody. Sensitivity of each system was assessed by using serially diluted brain homogenates of scrapie-infected mice. The detection limits of the assay systems using TMB, CSPD/EM, Supersignal femto, and TRF were 4⁻⁷, 4⁻⁸, 4⁻⁷, and 4⁻⁶ dilution, respectively. Thus, the substitution of colorimetric substrate TMB to light-emission substrate CSPD/EM could accomplish 4-fold increase in the sensitivity of OFR-ELISA. The infectivity of scrapie-infected mice contained 5 x 10⁵ LD₅₀ per mg brain tissue by bio-assay, so OFR-ELISA with CSPD/EM could disclose brain tissues containing prion infectivity ~ 7 LD₅₀/mg. Furthermore, the introduction of phosphotungstic acid precipitation in sample preparation, together with the immuno-detection with CSPD/EM,

resulted in further 4-fold increase in sensitivity. The introduction of CSPD/EM could also improve the sensitivity to 4-fold in detection of PrP^{Sc} from the brains of BSE-affected cattle.

【はじめに】

現在、日本の BSE スクリーニング検査では、Bio-Rad 社の PLATELIA BSE DETECTION KIT を使用している。本キットは 1999 年の欧州委員会による BSE 検査キットの評価では、エントリーした 4 キット中最高の感度を有する(1, 2)。我々は独自に開発してきた試料調製法を用いて ELISA による PrP^{Sc} の検出法の開発を行ってきた(3)。最近我々は、感度・精度ともに PLATELIA BSE DETECTION KIT と同等もしくはそれ以上の OFR-ELISA を確立した。OFR-ELISA は現行 BSE スクリーニング検査には十分な性能を有するが、一方では、輸血用血液や医薬品原料などのプリオン汚染を検出可能な、超高感度 PrP^{Sc} 検出法の開発が求められている。

【目的】

微量のプリオンの存在を検出可能な超高感度 PrP^{Sc} 検出法は、輸血用血液、血液製剤、医薬品原料などのプリオン汚染の摘発法の開発にとっても重要な課題である。今後、PrP^{Sc} 検出法の改良・開発は、目的に応じて別個に考える必要がある。例えば、BSE 検査などの迅速診断が求められる場合は、一定の感度を維持しつつ如何に簡便化できるかが問題である。一方、輸血用血液や医薬品原料のプリオン汚染を想定した場合、多少煩雑・高価であっても高感度化を追求する必要がある。OFR-ELISA は発色基質 TMB により PrP-抗体複合物を検出するが、化学発光法、時間分解蛍光測定法などの導入により、高感度化が達成できる可能性がある。そこで本研究では OFR-ELISA の検出系に、発光・蛍光測定法を導入することで、操作性を損なうことなく PrP^{Sc} 検出の高感度化が可能となるか否かを試みた。

【材料と方法】

スクレイピー感染マウスの脳、および BSE 感染牛の延髄から OFR-ELISA のプロトコールに従って試料を調製した。検出感度を比較するために、スクレイピー感染マウス脳乳剤を非感染マウス脳乳剤で 4 倍段階希釈した疑似試料から、プロトコールに従って試料を調整した。BSE 感染牛脳については非感染牛の延髄で 4 倍段階希釈した疑似試料を使用した。リンタングステン酸法による PrP^{Sc} 画分の調整は Safar ら(4, 5)の方法に従い、以下のように行なった。スクレイピー感染マウス脳を 4% Sarkosyl を含む PBS でホモゲナイズし、5 μ g/ml の proteinase K(PK)で 37 $^{\circ}$ C、30 分消化した。Pefabloc を 2 mM になるよう加えた後に、最終濃度が 0.32%になるようにリンタングステン酸を加えて 30 分間放置した。その後、14,000 x g、20 分遠心して PrP^{Sc} 粗画分を得た。

OFR-ELISA では capture 用抗体による抗原の捕捉と、標識抗 PrP 抗体による PrP の検出を 1 段階で行なうので、HRP 標識 mAb72、AP 標識 mAb72、および Eu 標識 mAb72 を作製した。抗体の Eu 標識は Wallac 社の Eu labeling kit を用いた。

化学発光基質として Pierce 社の Supersignal femto(HRP の発光基質)、Tropix 社の CSPD/EM (以上 AP の発光基質)を使用した。発光および TRF の測定は ARVO-1420(Wallac 社)を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

牛の脳は特定部位として焼却処分されることとなっている。今回用いた牛延髄は、BSE スクリーニング検査陰性であった個体であり、北海道に特定部位使用申請書を提出して、研究目的での使用を許可されている。

【結果】

スクレイピー感染マウス脳からの PrP^{Sc} の検出結果を図 1 に示した。発色基質 TMB を使用した OFR-ELISA の検出限界は 920ng 感染マウス脳組織当量であり、化学発光基質 CSPD/EM を使用した

場合は 230n 感染マウス脳組織当量であった。従って化学発光基質 CSPD/EM を導入することで PrP^{Sc} 検出感度が 4 倍上昇した。しかし、Supersignal femto あるいは TRF では、感度の上昇は得られなかった。CSPD/EM を用いた場合の変動係数(CV 値)は 10%以下であることから、再現性にも問題はないと考えられる。図 1 の実験に於て、1 ウェル当りの脳組織当量は 15mg であるので、TMB を使用した場合は、4⁷ 希釈まで、CSPD/EM を使用した場合は 4⁸ 希釈まで PrP^{Sc} を検出可能であったことになる。試験に使用したスクレイピー帯広株感染マウス脳は脳組織 1mg 当り約 5 x 10⁵LD₅₀ の感染価を有している。従って、プリオン感染価に換算すると TMB を使用した場合は約 30LD₅₀/mg、CSPD/EM を使用した場合は約 7LD₅₀/mg のプリオンを含む脳からの PrP^{Sc} が検出可能となる(表 1)。

Safar らは、リタングステン酸が PrP^{Sc} の濃縮に有効であることを報告している(4,5)。そこで、リタングステン酸法により被験試料を調整し、CSPD/EM を使用した OFR-ELISA により、PrP^{Sc} の検出限界を調べた。リタングステン酸法では、遠心後の沈殿物が多くなる傾向があったことから、沈殿物の変性に、8M Urea (OFR-ELISA で使用)と 6M GdnHCl の 2 種を使用した。変性操作後、免疫反応時には Urea は 2.6M、GdnHCl は 0.4M まで希釈した。双方の変性剤ともに、スクレイピー感染マウス脳 4⁹ 希釈まで陽性となった(図 2)。従って、試料調製法としてリタングステン酸沈殿法を使用すると、PrP^{Sc} 検出感度がさらに 4 倍上昇したことになる。これをプリオン感染価に換算すると、約 2LD₅₀/mg のプリオンを含む脳から PrP^{Sc} の検出が可能となる。

BSE 検査の対象となる牛延髄では髄鞘由来の脂質が非常に多い。そこで試料による差が検出系に与える影響を考慮して、BSE 感染牛脳からの PrP^{Sc} 検出に於ても、同様の高感上昇が得られるかについて検討した(表 2)。その結果、使用した英国由来 BSE3 検体中 2 検体で、CSPD/EM で TMB よりも検出感度が 4 倍高く、BSE 感染牛脳由来の試料にも適応可能であることが確かめられた。

【考察】

昨年度の研究から、抗原として rPrP を使用した場合、化学発光法や時間分解蛍光測定法の導入により 10-20 倍程度の高感度化が達成可能であることが示された。そこで本年度は、プリオン感染動物の脳からの PrP^{Sc} 検出を高感度化するために、発色法を化学発光法や時間分解蛍光測定法に置き換えて、検出感度の比較を行なった。しかし予想に反して、rPrP を抗原としたときに得られた感度上昇には至らず、CSPD/EM を使用したときに 4 倍程度感度が上昇したにすぎなかった。プリオン感染動物組織から PrP^{Sc} 検出を高感度に検出するためには、1)PrP^{Sc} の濃縮操作を含む試料調整法、2)濃縮した PrP^{Sc} の変性と抗原抗体反応時の変性剤濃度、3)高感度検出系の導入、の検討が必要と考えられる。特に試料調製法は、対象となる組織によって、適切な方法を確立する必要がある。Safar らは、リタングステン酸が PrP^{Sc} の濃縮に有効であることを報告している(4,5)。そこで、リタングステン酸法により被験試料を調整し、CSPD/EM を使用して PrP^{Sc} の検出を行なったところ、さらに 4 倍感度が上昇した。このことは、試料調製法から検出系まで全ての工程に改良を加えることで、さらなる高感度化が可能であることを示している。本研究で最高感度が得られた検出法ではプリオン感染価約 10LD₅₀ を検出可能であった。今後、対象となる試料からの試料調整・PrP^{Sc} 濃縮法を精査することで、輸血用血液、血液製剤、医薬品原料などのプリオン検査法が確立できるかもしれない。同時に、これらの材料については、プリオン汚染に関する安全性の評価基準を設定し、検査法が備えるべき感度を明確にする必要があると考えられる。

【結論】

HRP の発色基質 TMB を用いる OFR-ELISA の検出系を、化学発光基質 CSPD/EM に置換すると、スクレイピー感染マウスおよび BSE 感染牛脳からの PrP^{Sc} 検出感度が 4 倍上昇した。この検出限界は、スクレイピー感染マウス脳で感染価に換算すると約 7LD₅₀/mg であった。さらに、試料調整にリタングステン酸沈殿法を使用して、抗原抗体反応を化学発光基質 CSPD/EM で検出すると、感度がさらに 4 倍上昇した。検出限界は、スクレイピー感染マウス脳で感染価に換算すると約 2LD₅₀/mg であつ

た。

【参考文献】

- 1) European Commission (1999) The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. <http://europa.eu.int/comm/index.html>
- 2) Deslys J.P., Comoy E., Hawkins S., Simon S., Schimmel H., Wells G., Grassi J., and Moynagh J.: Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*. 409:476-478, 2001.
- 3) Grathwohl K.-W., Horiuchi M., Ishiguro N., and Shinagawa, M.: ELISA as a sensitive method for the detection of PrP^{Sc} in tissues of scrapie-affected mice. *J. Virol. Method*. 64: 205-216, 1997
- 4) Safar J., Wille H., Itri V., Groth D., Serban H., Torchia M., Cohen F. E., and Prusiner S. B.: Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med*. 4:1157-1165, 1998
- 5) Safar J. G., Scott M., Monaghan J., Deering C., Didorenko S., Vergara J., Ball H., Legname G., Leclerc E., Solfrosi L., Serban H., Groth D., Burton D. R., Prusiner S. B., and Williamson R. A.: Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat. Biotechnol*. 20: 1147-1150, 2002

【研究発表】

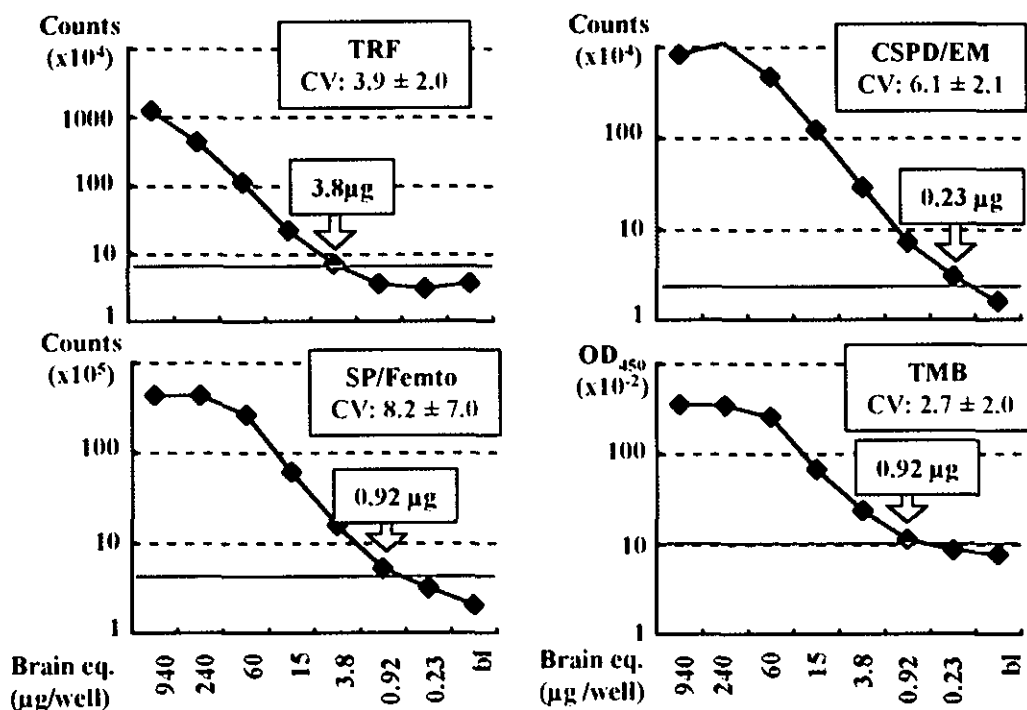
1.論文発表

- 1) 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.
- 2) 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 (PrP^{Sc}) in the Small Intestinal Epithelial Cells of Neonatal Mice. *Vet Pathol*. 40: 723-727, 2003.
- 3) 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.

2.学会発表

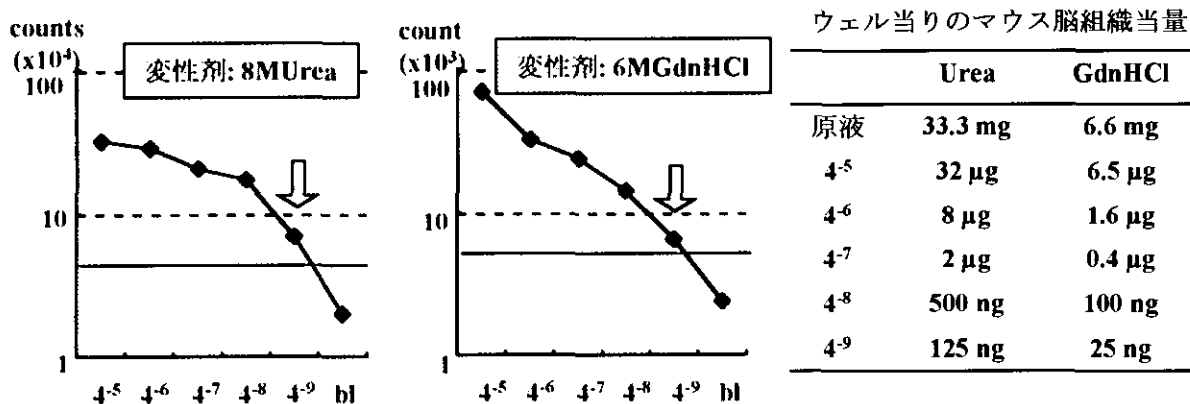
- 1) 金 チャンラン、品川 森一、石黒 直隆、堀内 基広： 抗 PrP 抗体パネルによる正常プリオン蛋白質の細胞内局在マッピング 第 51 回日本ウイルス学会
- 2) 前田 秋彦、金 チャンラン、田村 勇耕、品川 森一、堀内 基広： オクタペプチドリピートを認識する抗 PrP 抗体による BSE とスクレイピー自然例の識別 第 51 回日本ウイルス学会
- 3) 菊池 宏明、品川 森一、石黒 直隆、堀内 基広： プリオン感受性・非感受性細胞の選別 第 51 回日本ウイルス学会

図1. スクレイピー感染マウス脳からのPrP^{Sc}の検出限界



スクレイピー感染マウス脳乳剤を非感染マウス脳乳剤で4倍段階希釈した試料からOFR-ELISAの試料調整プロトコールに従い試料を調整して、PrP^{Sc}の検出を行った。ウェル当り、15mg脳組織由来の試料を添加し、グラフ下にはその中に含まれる感染マウス脳組織当量を示した。4ないし5回の独立した実験の平均値をグラフに示した。赤線はカットオフ値を示す。

図2. リンタングステン酸法による試料調整とCSPD/EMの組合わせによるPrP^{Sc}検出



スクレイピー感染マウス脳乳剤を非感染マウス脳乳剤で4倍段階希釈した試料から、リンタングステン酸沈殿法により試料を調整した。変性剤としてUreaを使用した場合は2.6Mまで、GdnHClを使用した場合は0.4Mまで希釈した後、ELISAに用いた。赤線はカットオフ値を示す。それぞれの変性剤を使用したときの、ウェル当りのスクレイピー感染マウス脳組織当量を表に示した。両方の変性剤ともに4⁹希釈した試料でもPrP^{Sc}の検出が可能であった。プリオン感染価に換算すると、2LD₅₀/mg以上のプリオンを含む脳組織を陽性と判定できる検出感度を有する。また、25ng脳組織当量が陽性となることから、ウェル当りのプリオン検出限界は約10LD₅₀である。

表1. 各種検出法のPrP^{Sc}検出感度(プリオン検出感度)の比較

基質	検出法	検出限界		
		感染マウス 脳組織当量 ¹⁾	脳組織感染価 LD ₅₀ /mg ²⁾	LD ₅₀ /well ³⁾
TMB	発色	~920 ng	~ 30	~ 4 x 10 ²
CSPD/EM	化学発光	~230 ng	~ 7	~ 1 x 10 ²
SP/femto	化学発光	~ 920 ng	~ 30	~ 4 x 10 ²
DELFLIA	時間分解蛍光	~3.8 µg	~ 120	~ 1.6 x 10 ³

¹⁾ウエル当りの脳組織当量(15mg)中に含まれる感染マウス脳組織当量

²⁾感染マウス脳組織の希釈率から算出した。これ以上のプリオンを含む脳組織を陽性と検出可能

³⁾ウエル当りの絶対感度

表2. BSE感染牛脳からのPrP^{Sc}検出感度¹⁾

BSE検体 ²⁾	検出系		
	CSPD/EM	TMB	TRF
BSE#4	8 µg ³⁾	8 µg	33 µg
BSE#5	8 µg	33 µg	130 µg
BSE#7	8 µg	33 µg	130 µg

¹⁾BSE感染牛脳を非感染牛脳で希釈した試料からPrP^{Sc}を検出した

²⁾英国BSE検体

³⁾検出限界を試料中に含まれるウエル当りのBSE脳組織当量で示した

ヒト異常プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体作製の試み

研究協力者:田中智之(堺市衛生研究所)

研究協力者:北元憲利(姫路工業大学環境人間学部)

班 員:毛利資郎(九州大学大学院動物実験施設実験動物学)

研究協力者:北本哲之(東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野)

sCJD 患者剖検脳から抽出したヒト型異常プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。剖検小脳凍結切片陽性、パラフィン切片陰性あるいは染色性低下をスクリーニング判定条件とした。#5KT および#131KT クローンが条件を満たした。クローンの腹水化とともに Western blotting を含めたさらなる解析が進行中である。

Establishment of monoclonal antibodies which reacts specifically with human abnormal prion protein.

Tomoyuki TANAKA¹⁾, Noritoshi KITAMOTO²⁾, Shirou MOHRI³⁾ and Tetsuyuki KITAMOTO⁴⁾

Sakai City Institute of Public Health¹⁾, Department of Humanities and Environmental Policy and Technology, Himeli Institute of Technology²⁾, Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University³⁾ and Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine⁴⁾

ABSTRACT

Establishment of monoclonal antibodies which have specific reaction with human abnormal prion protein(PrPsc) was performed and two clone, #5KT and #131KT clones were obtained. Immunohistological reaction patterns of monoclonal antibodies with frozen sections of cerebellum obtained from sporadic Creutzfeldt-Jakob disease(sCJD) and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome(GSS) were diffuse, like wired-string and these reaction products were located at cortex. Staining patterns with paraffin section were faded or negative immunohistological products. These clones may have specificities to human PrPsc, however, it needs more critical analyses like Western blotting.

【はじめに】

プリオン病の病因の解析や診断にはヒトプリオン蛋白(Hu-PrP)を特異的に認識する、とくにモノクローナル抗体が不可欠である。これまで色々なモノクローナル抗体が作製され報告されているが、正常型プリオン蛋白(PrPc)のみならず異常型プリオン蛋白(PrPsc)を認識しているものが大部分である。

我々も大腸菌発現した Hu-PrP に対するモノクローナル抗体の作製を試み、プリオン蛋白の解析に寄与できるいくつかの抗体を作製した。しかし、これらの抗体も Hu-PrPsc 特異的な抗体ではなかった。本研究では Hu-PrPsc を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製が可能か否かについて検討した。

【目的】

ヒト異常型プリオン蛋白を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を試み、これらの抗体が、プリオン蛋白解析、プリオン病の病因究明および診断的価値の可能性について検討することを目的とした。

〔材料と方法〕

モノクローナル抗体作製のための抗原には、孤発生 CJD 患者の剖検脳を detergent 処理し、さらに不溶性分画をプロテアーゼ処理したものを PrPsc 免疫原とした。

免疫マウスは PrP 遺伝子欠損マウス(Mo PrP0/0)を用いた。PrPsc 抗原は腹腔内にアジュバントと共に週一回投与し、細胞融合 4 日前にブースター免疫を行った。脾細胞との融合には PAI ミエローマ細胞を用い、定法に従って行った。

融合細胞のスクリーニングは、ヒト小脳組織および大脳灰白質の凍結切片による免疫染色にて行った。スクリーニングに用いた CJD 患者の背景は、sCJD[84Y/F, codon 129 M/M, codon 219 E/E], 硬膜移植後 CJD(dCJD) [66Y/F, codon 129 M/M, codon 219 E/E], GSS[61Y/M, codon 129 M/M, codon 219 E/E, codon 102 P→L]である。陰性コントロールとして Alzheimer 小脳をもちいた。

抗体の比較対象には、我々が作製した TNT#41 抗体と市販の 3F4 抗体を用いた。

一方、作製されたモノクローナル抗体が、Hu-PrPsc を特異的に認識するものであること条件として、(1)陰性コントロール切片で染色反応が見られない、(2)凍結切片で小脳皮質に糸くず状の染色態度をとる抗体、(3)オートクレーブ処理パラフィン切片上では染色性を示さない、(4)原則的に PrP プラークは染色性を示さないか、或いはコントロール抗体による染色性と比較して染色性が軽減しているもの、とした。

(倫理面への配慮)

抗体作製に用いられたマウスは、動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

〔結果〕

上記の免疫染色条件を満たす 2 つのクローンが得られた。しかし、dCJD や GSS では PrP プラークは、染色分布や染色態度は異なるものの、染色された。

図 1 はモノクローナル抗体#5KT によるスクリーニングの染色性を示す。1a は sCJD 小脳の染色性で、小脳皮質に可染された。1b はパラフィン切片の染色性で陰性であった。1c はコントロールの Alzheimer 病剖検小脳との染色性で、陰性であった。図 2 は、#5KT 抗体と GSS、sCJD 及び dCJD との染色性である。2a では GSS 小脳の白質を除いて、とくに分子層に染色性がみられた。皮質では PrP プラークの染色もみとめられた。2b は sCJD の染色性で、スクリーニングのそれと類似している。2c は dCJD の灰白質の染色性であるが、その判読は困難であった。しかし、一部にプラーク様染色性を示した。図 3 は GSS 症例小脳パラフィン切片を用いた#5KT との染色性であるが、プラークの染色性の低下が見られた。

コントロール抗体として用いた 3F4 抗体との染色性を図 4 に示した。4a は GSS、4b は sCJD、4c は dCJD の凍結切片である。図 2 の#5KT との染色性に類似しているが、一致しているものではないことが推測された。図 5 は dCJD 大脳灰白質の#131KT クローンをを用いた凍結切片の免疫染色を示す。糸くず状の染色性がみとめられた。この#131KT クローンは現在サブクローニングを行っている。

〔考察〕

プリオン病の病理学的解析には、異常型プリオン蛋白に対する特異的な抗体が必要不可欠である。しかし、市販あるいは研究機関で作製された抗体の殆どは異常型プリオン蛋白を認識するだけでなく、正常型プリオン蛋白も認識する抗体である。よく使用されている 3F4 抗体も同様である。プリオン病研究のキーである抗体を得るために、CJD 患者から粗精製されたヒト異常型プリオン蛋白に対してこの蛋白を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を試みた。CJD 患者の脳組織の凍結切片を用いた免疫染色によるスクリーニング検査で 2 個の可能性の高いクローンが得られた。この抗体は小脳組織の分子層に染色性を示した。これらの抗体がヒト異常型プリオン蛋白を特異的に認識しているか否かの結論は困難である。プリオン蛋白の設定条件を満たすのみならず、これらの抗体がウエスタン・ブロッティングによる反応性の解析など生化学的な解析が必要である。

〔結論〕

ヒト異常型プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体の作製を試み可能性のある 2 クローンが得られたが、今後特異性を求めて更なる解析が必要である。

〔参考文献〕

- 1) Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schultz-Schaeffer W, Kretzschma H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K and Oesch B; Prion(prPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*. 390:74, 1997
- 2) Tamaki Muramoto, Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Chiharu Sato, Yushi Hayashi, Tomoko Kutomi, Chikao Yutani, Tetsuyuki Kitamoto: Analysis of Gerstmann-Strussler syndrome with 102Leu219Lys using monoclonal antibodies that specifically detect huma prion protein with 219Glu. *Neuroscience Letters*. 288:179, 2000
- 3) Kitamoto T, Mohri S, Ironside JW, Miyoshi I, Tanaka T, Kitamoto N, Itohara S, Kasai N, Katsuki M, Higuchi J, Muramoto T, Shin RW: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 294:280, 2002
- 4) Katsuya Sato, Tamaki Muramoto, Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamote, James W.Ironside, Kazuo Nagashima, Masahito Yamada, Takeshi Sato, Shiro Mohri and Tetsuyuki Kitamoto. Association of an 11-12kDa protease-resistant prion protein fragent with subtype of dura graft-associated Creutzfeldt-Jacob disease and other prion diseases. *J.Gen.Virol*. 84:2885, 2003

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Sato K, Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Ironside LW, Nagashima K, Yamada M, Sato T, Mohri and Kitamoto T ; Association of an 11-12kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. *J.Gen.Virol*.84:2885, 2003

〔知的所有権の取得状況〕

なし

図 1a #5KT 抗体を用いた sCJD 小脳凍結切片の免疫染色



図 1b #5KT 抗体を用いた sCJD 小脳のパラフィン切片免疫染色

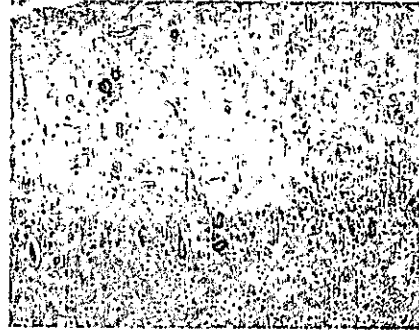


図 1c #5KT 抗体を用い Alzheimer 小脳凍結切片の免疫染色

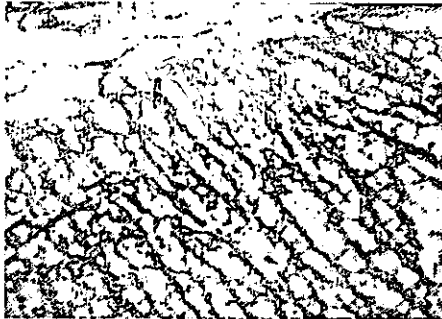


図 2a #5KT 抗体と GSS 小脳凍結切片の免疫染色



図 2b #5KT 抗体と sCJD 小脳凍結切片の免疫染色

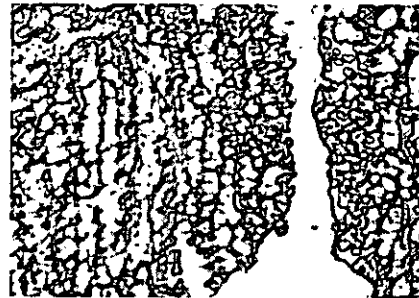


図 2c #5KT 抗体と dCJD 大脳灰白質凍結切片の免疫染色

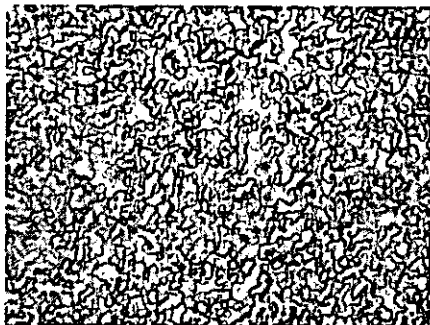


図3 #5KT抗体とGSS小脳パラフィン切片の免疫染色



図4a 3F4抗体とGSS小脳凍結切片の免疫染色

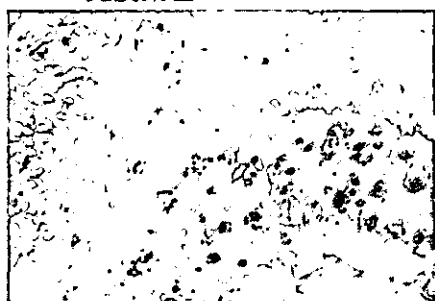


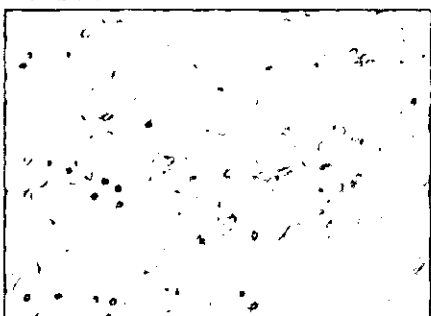
図4b 3F4抗体とsCJD小脳凍結切片の免疫染色



図4c 3F4抗体とdCJD大脳灰白質凍結切片の免疫染色



図5 #131抗体とdCJD大脳灰白質凍結切片の免疫染色



プリオン病モデルマウスとヒト・プリオン伝達試験（2）

班 員：毛利資郎（九州大学・大学院医・実験動物学）

班 員：三好一郎（名古屋市立大学・大学院医・実験動物研究教育センター）

研究協力者：松浦裕一（九州大学・大学院医・実験動物学）

研究協力者：北本哲之（東北大学・大学院医・創生応用医学・プリオン蛋白研究部門）

【研究要旨】

われわれの開発したヒト/マウスキメラ型遺伝子ノックインプリオン病モデルマウス（Ki-ChM）はヒト・プリオンに対して高い感受性を示し、濾胞樹状細胞（FDC）における異常プリオン蛋白の早期沈着を検出することによる新しいバイオアッセイ法を提供した。しかしながら、硬膜移植によるとされているにもかかわらずクロイツフェルト・ヤコブ病のプラーク型など、このマウスでは検出できないプリオンの存在も明らかになった。本年度は、感染性検出のさらなる向上を目指して作られたヒト型プリオン蛋白を産生するノックインマウス（Ki-Hu129M）に対して、硬膜移植後 CJD プラーク型プリオン接種をおこなった。その結果、FDC に異常なプリオン蛋白沈着が認められ、脳内接種による伝達も確認され、Ki-ChM マウスでは検出できなかった硬膜移植後 CJD プラーク型プリオンも検出できるようになった。このことにより、硬膜移植後 CJD は2タイプとも感染性のプリオン病であることが明らかになった。

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

Shirou MOHRI¹, Tetsuyuki KITAMOTO², Ichiro MIYOSHI³ and Yuich MATSUURA¹

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

Our knock-in mice with human/mouse chimeric transgene (Ki-ChM) have provided a new detection system for infectivity to human prion that accumulation of abnormal prion protein could be detected in follicular dendritic cells in spleen of the mice on the early stage of infection. It was easy to detect abnormal prion protein after intraperitoneal or intracerebral inoculation with non-plaque type iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease (iCJD) caused by cadaveric dura mater grafts. Any accumulation of abnormal prion protein, however, could not be detected after inoculation with plaque type prion of iCJD. To detect infectivity of plaque type prion of iCJD, another knock-in mice expressing full length human prion gene (Ki-Hu129M-) were employed in transmission. As a result, it came to be able to detect the abnormal prion protein not only in FDCs but also in the brain of Ki-Hu129M mice, which had not been detected in Ki-ChM mice.

This result showed that there were infectious in CJD after all dura mater grafts had been transplanted.

【目 的】

ヒト/マウスキメラ型遺伝子ノックインプリオン病モデルマウス（Ki-ChM）はヒト・プリオンに対して高い感受性を示し、濾胞樹状細胞（FDC）における異常プリオン蛋白の早期沈着が検出できることを昨年度に報告した。しかしながら、ヒト・プリオン病の中で硬膜移植に原因するとされているクロイツフェルト・ヤコブ病のプラーク型については、Ki-ChM

による濾胞樹状細胞 (FDC) における異常プリオン蛋白の早期沈着検出は困難であった。硬膜移植により CJD が引き起こされたとするならば、硬膜移植後 CJD プラーク型プリオン病も感染性プリオン病であり、感染性が証明されなければならない。

そこで、硬膜移植後 CJD プラーク型プリオン病の感染性を証明するために、ヒト型プリオン蛋白を産生する新たなノックインマウス (Ki-Hu129M) を用いて伝達試験を行った。その結果に加えて、昨年度に中途まで報告した Ki-ChM マウスにおけるヒト・プリオンの腹腔内接種ならびに脳内接種成績の最終結果も報告する。

【材料と方法】

1. ノックインマウス

Ki-ChM マウスは第3エクソンの SmaI サイト以降がヒト型プリオン蛋白遺伝子で、BstEII サイト以降のC末端が再びマウス型プリオンタンパク質遺伝子となったキメラ構造の相同組換え遺伝子を有しているヒト/マウスキメラ型プリオン蛋白を発現するノックインマウスである。それに対して Ki-Hu129M-マウスは第3エクソンの SmaI サイト以降の ORF を全てヒト型プリオン蛋白遺伝子に置き換えた全ヒト型プリオン蛋白を産生するノックインマウスである。なお、どちらも codon 129 はメチオニン型であるが、Ki-Hu129Mは24bp の Deletion があることが判っている。この、Ki-Hu129Mは同じ遺伝子構造のトランスジェニック (Tg) マウスと交配して脳内発現量が高いダブルミュータントを作製し用いた。

2. ヒト・プリオンの接種

孤発性CJD (sCJD)、医原性CJD (iCJD)、変異型CJD (vCJD)、GSS の患者由来のヒト・プリオン (10%脳乳剤) を Ki-ChM マウスに腹腔内接種 (IP) 50 μ l、もしくは脳内接種 (IC) 20 μ l をおこなった。対照として正常ヒト脳乳剤 (Normal) も同様に接種した。

IP は 75 日後、IC 後は何らかのマウスプリオン病の症状が出現するか、あるいはその他の病気、老化の兆候が激しくなった時点で安楽死の処置をおこなった。安楽死させたマウスは全て緩衝ホルマリン液に固定後、実験室内汚染防止のために蟻酸処理を行い、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 PrP N 末ウサギ血清を用いた。

3. 脳内接種による発症と腹腔内接種後の FDC 早期沈着との関連性

脳内接種後の発症もしくは発症に至らないまでも病理組織診断時の免疫組織染色で脳組織に異常なプリオン蛋白の沈着が認められた個体については Affected animals として、脳内接種による感染伝達が成立したと判定し、腹腔内接種後 75 日の FDC における異常なプリオン蛋白の早期沈着の有無と比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、九州大学大学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プリオン専用の感染動物実験室でおこなった。

【結 果】

昨年途中経過を報告したヒト/マウスキメラ型遺伝子ノックインプリオン病モデルマウス (Ki-ChM) へのヒト・プリオン接種成績は全て終了し、その結果を表 1 に示した。sCJD における異常プリオン蛋白検出については IP 接種 75 日後の FDC における異常なプリオン蛋白沈着が必発するグループ、わずかに沈着が認められるグループ、まったく沈着しないグループの 3 通りに分かれた。沈着必発のグループは IC 後も 134 日から 153 日の潜伏期間で全て発症した。わずかに沈着が認められたグループの Naka は平均 578 日で安楽死の処置がなされた結果、接種 6 頭のうち 3 頭のみ脳内に異常なプリオン蛋白の沈着が認められた。Yona は 677 日で 5 頭中 2 頭に異常なプリオン蛋白の沈着が見られた。FDC において異常なプリオン蛋白の全く検出できなかった VV2 型 (Aki) は 708 日経過しても脳組織に異常なプリオン蛋白の沈着が認めらず、感染は成立しなかった。

iCJD においても IP で異常プリオン蛋白の沈着が必発したシナプス型のケースでは、IC 後も平均 167 日で全て発症した。それに反して、プラーク型の iCJD 3 例では IP 後 75 日ですべてのマウスで異常なプリオン蛋白の沈着が認められな

かった。IC 後は Kori の脳内にわずか1頭のみ弱い異常なプリオン蛋白沈着が認められた (1/7) が、临床上はプリオン病の症状ではなく老化として処理されたものであった。vCJD では IP 接種後の FDC では比較的良く検出できたが、IC 後は3例すべてにおいて非常に長い期間かかってやっと異常なプリオン蛋白の沈着が認められた。GSS 例は IP 接種後の FDC では異常なプリオン蛋白の沈着が良く認められ、IC 後もすべての接種個体が発症したが、潜伏期間は平均 365 日とやや延長した。対照として用いた正常脳については IP 後 75 日においても、IC 後は 719 日観察においても、ともにすべてのマウスが陰性であった。

Ki-Hu129Mマウスを用いた CJD-Du プラーク型プリオンの伝達試験は病理組織診断の途中であるが、結果の得られたものについては IP 75 日後の FDC、IC 後の脳のいずれにおいても異常なプリオン蛋白の沈着が認められた。IC 後の潜伏期間は 400 日から 500 日程度と延長したが、診断が終了したものについてはいずれも明瞭なプラークが観察された。硬膜移植後 CJD のシナプス型 (non-plaque)、プラーク型 (plaque) のこれまでに報告されている特徴と合わせて表 2 に示した。

【考 察】

ノックインマウス Ki-ChM におけるヒト・プリオン腹腔内伝達試験結果が一応区切りがついたのでまとめて報告した。FDC における異常プリオン蛋白の早期沈着は、脳内接種後の発症、もしくは異常プリオン蛋白の脳組織における沈着とほぼ一致し、このマウスにおけるプリオン病の伝達性を反映していることが明らかとなった。このことはヒト・プリオン接種後にマウスが FDC 陽性となれば伝達性があるとみなし、逆に、FDC 陰性であることはそのプリオンに対してマウスの感受性が無いと判定することの妥当性を示している。実際に、sCJD-Aki (VV2 型) と iCJD の plaque 型は FDC における異常なプリオン蛋白の検出が全くできず、脳内接種後の発病も認められなかった。このことから、Ki-ChM マウスで検出できないヒト・プリオンの株の存在が明らかになった。特に、iCJD の plaque 型は医原性感染とされており、感染性が必ず認められると考えて Ki-Hu129M にも伝達試験を試みた。その結果、硬膜移植による感染とされている2つの型のプリオンにいずれも感染性があることが証明された。Ki-Hu129M は C 末まで全てヒト型の遺伝子構造であるが、24bp の Deletion も認められており、iCJD の plaque 型に対する感受性要因がどちらにあるのか、あるいは両方が要因であるかは今後の問題である。さらに、iCJD の plaque 型の病理学組織学的特徴も忠実にこのマウスに伝達されていることは非常に興味深い。

【結 論】

われわれの感受性試験でこれまで感染性を証明できなかった硬膜移植後のプリオン病患者由来の plaque 型プリオンに関して感染性を証明し以下のことが明らかにされた。

1. 硬膜移植例CJDは2タイプ共に感染性が証明された。
2. 患者の病理組織学的特徴の一つもマウスへ伝達された。

【参考文献】

- 1) 毛利資郎、三好一郎、松浦裕一、北本哲之：プリオン病モデルマウスとヒト・プリオン伝達試験。厚生労働省科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 プリオン病及び遅発性ウイルス感染に関する調査研究(班長 水澤 英洋) 平成 14 年度研究報告書：129-132, 2003
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

- 5) Kitamoto T, Mohri S, Ironside J. W., Miyoshi I, Tanaka T, Kitamoto N, Itohara S, Kasai N, Katsuki M, Higuchi J, Muramoto T, Shin R-W.: Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 294(2): 280-286, 2002
- 6) Satoh K., Muramoto T., Tanaka T., Kitamoto N., Ironside J. W., Nagashima K., Yamada M., Sato T., Mohri S., Kitamoto T. :Association of an 11-12kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion disease. *J. Gen. Virol.* 84: 2885-2893, 2003

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Nakamura, N., Miyamoto, K., Shimokawa, M., Nishida, N., Mohri, S., Kitamoto, T., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H.: Generation of antibodies against prion protein by scrapie-infected cell immunization of PrP^{0/0} mice. *Hybridoma and Hybridomics* 22(4): 263-266, 2003
- 2) Satoh K, Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Ironside JW, Nagashima K, Yamada M, Sato T, Mohri S, Kitamoto T. Association of an 11-12kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. *J. Gen. Virol*, 84:2885-2893, 2003
- 3) Taguchi Y, Mohri S, Ironside JW, Muramoto T, Kitamoto T: Humanized knock-in mice expressing chimeric PrP showed varied susceptibility to different human prions. *Am J Pathol.* 163(6): 2585-93, 2003
- 4) Gombojaz A., Shimauchi I., Horiuchi M., Ishiguro N, Shinagawa M., Kitamoto T., Miyoshi I., Mohri S. and Takata M.: Susceptibility of Transgenic Mice Expressing Chimeric Sheep, Bovine and Human PrP Genes to Sheep Scrapie. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65(3):341-347, 2003

2. 学会発表

- 1) 第26回日本医学会総会（福岡市）シンポジウム「ヒトと動物の病気」
平成15年4月4日
「ヒト・プリオン病モデルマウス」
- 2) 協和大学実験動物研究所講演会（中華人民共和国・北京）
平成16年1月12日
「Prion Disease and mouse model of Creutzfeld-Jakob disease」

表 1. Ki-ChMマウスにおけるヒト・プリオンの伝達成績

Inoculum	Type	75days post IP		Pre-terminal post IC	
		FDC positive / inoculated	Affected / tested	Euthanasia means day	
sCJD					
H-3	MM1	5/5	6/6	151	
Nara	MM1	5/5	4/4	134	
99/009	MM1	5/5	6/6	153	
Sumi	VM1	6/6	5/5	141	
Naka	MM2	1/5	3/6	578	
Yona	MM2	0/5	2/5	677	
Aki	VV2	0/5	0/5	708	
iCJD					
T-Du/synaps	non-plaque	6/6	6/6	167	
T-Du/plaque	plaque	0/5	0/6	767	
Kori	plaque	0/4	1/7	764	
Niti/plague	plaque	0/5	0/5	708	
vCJD					
vCJ96/02		5/5	6/6	706	
vCJ96/07		4/4	4/4	822	
vCJ96/45		5/6	2/4	697	
vCJ98/148		7/7	4/4	725	
GSS					
GSS/Nag	GSS102	5/5	3/3	365	
Normal	97/03	0/6	0/4	719	

IP : 腹腔内接種、 IC : 脳内接種

表 2 硬膜移植後CJDプリオン病の臨床病理学的特徴と

ノックインマウス (Ki-ChM, KiHu129M) への伝達成績

分類	EEG	発生比	Amyloid斑	Immunoblot	マウスへの伝達性	
					Ki-ChM	Ki-Hu129M
Non-plaque (MM1)	PSD+	80~90%	-	fragment +	+	on testing
Plaque (MM1)	PSD-	10~20%	+	fragment -	-	+

分泌型プリオン蛋白発現トランスジェニックマウスにおけるプリオン病の解析

班 員：村本 環（東北大学・大学院医・CJD 早期診断・治療法開発分野）
班 員：三好 一郎（名古屋市立大学・大学院医・実験動物研究教育センター）
班 員：毛利 資郎（九州大学・大学院医・実験動物学講座）
研究協力者：北本 哲之（東北大学・大学院医・CJD 早期診断・治療法開発分野）

〔研究要旨〕

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーを欠く分泌型変異プリオン蛋白 (PrP) を発現するトランスジェニックマウスを作製した。同マウスを PrP ノックアウトマウスと交配することにより野性型 PrP の発現を除いた後、プリオン接種実験を行った。プリオンを接種されたマウスの脳組織内には蛋白分解酵素耐性の分泌型 PrP の蓄積、多数の PrP アミロイド沈着、およびプリオンの増殖が認められた。一方、プリオン病の典型的所見である灰白質へのびまん性異常 PrP 沈着や海綿状変性には乏しく、マウスは接種後 400-500 日以上、典型的な神経障害症候を呈することなく生存可能であった。正常マウス脳を接種されたトランスジェニックマウスの脳組織には異常型 PrP の蓄積や PrP アミロイド沈着は検出されなかった。本研究のデータから、PrP の異常化、PrP によるプリオン形成・アミロイド形成には GPI アンカーは必要ないことが明らかとなった。一方、異常型 PrP による神経変性惹起には GPI アンカーが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

The analysis of experimental prion diseases in transgenic mice expressing the secretory variant of prion protein

Tamaki MURAMOTO¹, Ichiro MIYOSHI², Shirou MOHRI³, and Tetsuyuki KITAMOTO¹

¹Division of CJD Science and Technology, Department of Prion Research, Center for Translational and Advanced Animal Research on Human Diseases, Tohoku University Graduate School of Medicine, ²Center for Experimental Animal Science, Nagoya City University Medical School, and ³Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Abstract

We produced transgenic (Tg) mice that express a variant prion protein (PrP) without glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor on the PrP-ablated background, inoculated the Fukuoka-1 prion isolate into the mice, and analyzed the phenotype of prion diseases. The inoculated mice had remained free of typical symptoms beyond 400-500 days after inoculation. However, their brains exhibited a unique set of pathological findings that included numerous PrP amyloid deposits and the absence of both diffuse deposition of abnormal PrP in the gray matter and spongiform degeneration. There were no PrP deposits in the prion-uninfected control Tg mice. The protease-resistant abnormal isoform of the variant PrP was detected in the brain tissue of the infected mice while it was absent in the uninfected control mice. The inoculations of the brain homogenate from the infected Tg mice into NZW monitor mice caused illness at 140 days after inoculation, indicating the proliferation of prions in the Tg mice. The data indicate that GPI anchor is unnecessary for the isoform conversion of, and prion and amyloid formation by prion protein. The data provide support to the notion that neurodegeneration caused by the abnormal isoform of PrP requires the expression of PrP on the cell surface of neurons.

【はじめに】

我々は、プリオン蛋白 (PrP) の異常化、およびプリオン蛋白によるプリオン形成に必要な構造ドメインを同定するために、PrP 立体構造に含まれる各ドメインを欠損する PrP をプリオン感染培養細胞およびトランスジェニック (Tg) マウスに発現させ、その異常化能、プリオン形成能を解析してきた。今回、その一環として、「PrP 分子カルボキシル (C) 末端への glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーの付加に必要な C 末端アミノ酸配列を欠き、分泌型となる変異 PrP (図 1、2)」を発現する Tg マウスを作製し、同分子の異常化能、プリオン形成能、病変形成能を解析した。本研究は、PrP の異常化能、プリオン形成能、アミロイド形成能、病変形成能における GPI アンカーの役割を明らかにする。

【材料と方法】

1) トランスジェニックマウスの作製：我々が開発した、プロモーター領域を含むマウス PrP 遺伝子 (全長 24.5 kb) からなる PrP 発現コンストラクトの exon 3 に含まれる open reading frame の 231 番セリンに相当するコドンを終止コドンで置換した (図 2)。この操作により、PrP 分子は GPI アンカー付加シグナル (231-254 番残基) を欠損し、分泌型となる。この分泌型 PrP 発現コンストラクトを BDF1 マウス受精卵に microinjection した。テール DNA を用いた PCR 法とサザンプロット法による解析を用いて founder 候補マウスをスクリーニングした。導入遺伝子の存在を確認することにより founder を樹立した後、Tg マウスを C57BL/6 マウスと交配し、系統を確立した。次に同マウスを、内因性 PrP 遺伝子をノックアウトされたマウス (PrP-ablated マウス、理化学研究所 糸原重美博士より供与) と交配させ、野性型 PrP を発現せず分泌型 PrP のみを発現するマウス (分泌型 PrP 発現 Tg マウス) を樹立した。

2) 遺伝型プリオン病の一種であるゲルストマン・ストロイスラー症候群の患者より単離され、マウス脳への接種により継代され樹立されたプリオン株 (福岡 1 株、立石 潤博士より供与) を接種用プリオンとして用いた。¹⁾福岡 1 株感染発症 NZW マウスの脳乳剤を Tg マウスおよび野性型マウス (C57BL/6) に接種し、発病の観察、マウス脳の病理組織学的解析、マウス脳組織中の異常型プリオン蛋白およびプリオンの検出等を行った。対照として、上記各マウスにプリオン非感染 NZW マウスの脳乳剤を接種 (以下、正常脳接種) したものの、あるいは無処置のマウスを同様に解析した。

【結果】

1) トランスジェニックマウスの樹立：サザンプロット上で導入遺伝子量の異なる複数の founder を得た。2 匹 (#19, #24) の founder から分泌型 PrP 発現 Tg マウスを樹立した。両系統の脳組織における分泌型 PrP 発現量を、野性型マウス脳組織における野性型 PrP 発現量と比較することにより評価した。発現量の比較的多い #19 (野性型マウスの 25-50%) を実験に使用した。

2) プリオン非接種 Tg マウス脳組織における分泌型 PrP：分泌型 PrP は、その大部分が約 26kDa の「糖鎖を持たない分子種」として発現され、比較的少量の「糖鎖を持つ分子種」も存在した。糖鎖を PNGase F により除去した分泌型 PrP 分子の SDS-PAGE 上での移動度は、野性型 PrP 分子の移動度 (約 27kDa) より大きかった。

3) 野性型マウスの所見：野性型マウスはプリオン接種後 162-165 日で発症し、脳組織にはプリオン病に典型的な灰白質へのびまん性異常 PrP 沈着と海綿状変性が認められた。一方、斑状の異常 PrP 沈着は観察されなかった。これは、我々がすでに報告している福岡 1 株プリオンの特徴と合致する所見であった。²⁾発症したマウスの脳組織の生化学解析では異常型 PrP が検出された。未処置のマウスにはこれらの病理学のおよび生化学的異常所見は認められなかった。

4) Tg マウスの所見：プリオンを接種された Tg マウスは、400-500 日以上プリオン病に特徴的な症候を呈さずに生存可能であった。しかし、これらのマウスの脳組織には極めて多数のアミロイド斑が形成されていた。これらのアミロイド斑は PrP 免疫染色により強く染色された。一方、野性型マウスに認められた

灰白質へのびまん性異常 PrP 沈着や海綿状変性というプリオン病の典型的所見には乏しかった。正常脳を接種された Tg マウスの脳組織には上述の異常所見は認められなかった。生化学的にも、プリオン接種 Tg マウスの脳組織中に蛋白分解酵素耐性の異常化した分泌型 PrP が検出された。一方、正常脳を接種された Tg マウスの脳組織中には異常型 PrP は検出されなかった。

5) プリオンを接種された野性型マウスおよび Tg マウス脳組織中のプリオンの検出：プリオンを接種された後に発症し、接種後 165 日で屠殺された野性型マウス、およびプリオン接種後 433 日ないし 441 日後に屠殺された 2 匹の Tg マウスの脳乳剤を作製し、プリオン濃度測定用の NZW モニターマウスへ接種した。NZW マウスは、いずれの接種材料の場合も接種後約 140 日で発症し、プリオンを接種された野性型マウスおよび Tg マウスの脳組織中においてプリオンが増殖していたことが確認された。

〔考察〕

分泌型 PrP はマウス脳組織内でプリオン接種に依存して異常化し、プリオンを形成した。また、分泌型 PrP はプリオン接種に依存して、アミロイドを形成した。これらの観察から、GPI アンカーはプリオン蛋白の異常化、アミロイド形成、プリオン形成に不必要であることが明らかとなった。言い換えると、プリオン蛋白のペプチド部分には、少なくとも *in vivo* におけるプリオン形成に必要な条件が全て備わっていると言える。このことは、他のアミロイド形成性蛋白が一般にプリオン形成能に乏しいのは、GPI アンカーを持たないためではなく、ペプチド部分の構造がそれに適していないためであることを示唆している。この見解は、逆に「アミノ酸配列がある条件を満たせば PrP 以外の蛋白がプリオン様の振る舞いをする可能性がある」という考えを支持する。

GPI アンカーを欠く異常型 PrP の蓄積と高濃度のプリオン蓄積にも拘わらず、海綿状変性が生じなかったことは、脳組織に蓄積した異常型 PrP が神経変性を惹起する上で、GPI アンカーが重要な役割を果たす可能性を示唆している。GPI アンカーの欠損は PrP 分子の構造、局在、さらには PrP と他の分子との相互作用に影響を与える。どの要素への影響が神経変性能の低下をもたらしたかについては、さらに検討が必要である。この問題と関連して、GPI アンカーを欠く異常型 PrP が組織内、あるいは細胞内のどこに局在するかを、今後明らかにすることが重要である。免疫染色における異常 PrP 局在パターンの大きな変化は、GPI アンカーを欠く異常型 PrP が GPI アンカーを持つ異常型 PrP の場合とは異なる部位へ蓄積している可能性を示唆している。今後さらに、電子顕微鏡レベルの形態学的解析や生化学的手法を用いたラフト分画の解析等を行い、異常化した分泌型 PrP の局在についての情報を得る予定である。本研究のデータは、「異常型 PrP による神経変性の惹起には、神経細胞表面における PrP の発現が必要である」とする考えを支持する。³⁾

・本研究のデータは、GPI アンカーを欠く合成ないし組換え PrP も、至適なコンフォメーションを取った場合にはプリオン化する可能性があることを示唆しており、合成ないし組換え PrP を使って試験管内でプリオンを新生または増殖させようとする実験に理論的根拠を与える。

〔参考文献〕

- 1) Jun Tateishi, Michiya Ohta, Makoto Koga, Yuji Sato, Yoshigoro Kuroiwa: Transmission of chronic spongiform encephalopathy with Kuru plaques from humans to small rodents. *Ann Neurol* 5: 581-584, 1979
- 2) Tetsuyuki Kitamoto, Ruriko Yi, Shirou Mohri, Jun Tateishi: Cerebral amyloid in mice with Creutzfeldt-Jakob disease is influenced by the strain of the infectious agent. *Brain Res* 508: 165-167, 1990
- 3) Sebastian Brandner, Stefan Isenmann, Alex Raeber, Marek Fisher, Andreas Sailer, Yasushi Kobayashi, Silvia Marino, Charles Weissmann, Adriano Aguzzi: Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379: 339-343, 1996

〔研究発表〕

1. 論文発表