

20030836

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 金子 清俊

平成16(2004)年 3月

## 目 次

I.	統括研究報告	
	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.	分担研究報告	
	1. 硬膜移植後プリオン病モデルマウスの作成と 防御型プリオンタンパク (recPrP <sup>218K</sup> ) の発症遅延効果	7
	川原信隆 西島正弘	
	2. 遺伝子導入法の確立	12
	武田伸一	
	3. 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	16
	北條浩彦	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	19

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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）

研究協力者 八谷如美（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部）

逆瀬川裕二（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部）

研究要旨

日本でのプリオン病の特徴として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) の集積が明らかとなっている。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、プリオン病に対する社会的関心の高まりとともに、治療法の開発が期待されている。昨年度までに、我々は抗プリオン抗体、ドミナントネガティブ効果を有する組み換えプリオン蛋白質の効果検討とともに、我々は、正常に folding された分子を認識し解きほぐす活性を検出する系を確立した結果、出芽酵母において新しいシャペロン様分子を同定し、“アンフォルジン”と命名した。アンフォルジンは、正常に folding された分子を標的にし得るのみならず、プリオン蛋白質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-synuclein などの異常凝集体の高次構造を解きほぐす活性も有していた。この極めてユニークな解きほぐし活性をプリオン病の治療法開発に応用するため、その活性調節機構についての検討を行った結果、(1) 出芽酵母分裂期において、アンフォルジンが分裂溝に集積すること、(2) 分裂溝に集積したアンフォルジンが極めて高い活性を示すこと、(3) その活性には ATP の結合が関与していること、を明らかにした。これらの活性調節機構を適用することで、プリオン病のみならず、いわゆる蛋白質凝集病における新しい治療法開発の可能性が示唆された。

A. 研究目的

プリオン蛋白質 (PrP)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。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。特に我が国では 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、この硬膜移植が原因と考えられる医原性 CJD が大きな社会問題となってきた。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高い。こういった背景の中で、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た検討を行っている。

CJD の発症機構として、PrP<sup>Sc</sup>を鋳型とした PrP<sup>C</sup>から PrP<sup>Sc</sup>への高次構造変換がその基盤にあると

されているが、その過程の中で、いったん PrP<sup>C</sup>が解きほぐされる段階を経ると考えられている。我々は、この解きほぐし分子の同定を目指している。これは、PrP<sup>Sc</sup>への変換に関与する分子シャペロン様分子、いわゆる X 因子と相同である。

これらの解きほぐし活性は正常に folding された PrP<sup>C</sup>を標的とすると考えられるため、従来から知られている misfolding 蛋白質を標的とする一般的な分子シャペロンの範疇には該当しない。我々は、このような正常分子に対し unfolding 活性を発揮する新規分子シャペロンが実際に存在するかどうかを、まず出芽酵母の系において検討した結果、新しいシャペロン様分子を同定し、“アンフォルジン”と命名した。アンフォルジンは、正常に folding された分子を標的にし得るのみならず、プリオン蛋白質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-synuclein などの異常凝集体の高次構造を解きほぐす活性も有していた。この極めてユニークな解きほぐし活

性をプリオン病の治療法開発に応用するため、その活性調節機構についての検討を行った。

## B. 研究方法

既に我々は、出芽酵母細胞からこのような解きほぐし活性を持つ分子を精製するために、トリプシン感受性を利用した独自の試験管内アッセイ系を確立した。精製標品の分子量は58キロダルトンで、試験管内で蛋白質の高次構造をほぐす活性からアンフォルジンと命名した。アンフォルジンを高純度に精製し電子顕微鏡を用いて一分子の形態を低角度回転蒸着法により観察したところ、直径約10nm、中央に約2nmのホールを持つリング状構造が観察された(図1)。

さらに試験管内では、アンフォルジンは正常にfoldingされた分子を標的にし得るのみならず、プリオン蛋白質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-synucleinなどの異常凝集体の高次構造を解きほぐす活性も有していた(図2)。

そこで、この極めてユニークな解きほぐし活性をプリオン病の治療法開発に応用するため、その活性調節機構についての検討を行った。

### (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

我々は、まずアンフォルジンの細胞内局在とその活性が、細胞周期によって変化していることを見出した。すなわち、(1) 出芽酵母分裂期において、アンフォルジンが分裂溝に集積すること(図3)、(2) 分裂溝に集積したアンフォルジンが極めて高い活性を示すこと(図4)が確認された。さらに、その活性にはATPの結合が関与していることを明らかにした。試験管内においては、アンフォルジンの活性には基質特異性がなく、ATP存在下では調べた限りすべての基質に結合しその高次構造を解きほぐすことができた。

## D. 考察

アンフォルジンには試験管内での基質特異性が認められないにもかかわらず、細胞内においては、細胞周期依存性に活性調節機構が存在しており、それにはATPの結合が関与していると示唆された。このATP結合調節には、おそらく未知の因子が関与していることが推測されるため、現在のATP結合調節因子の同定を試みている。

この活性調節機構を今後さらに詳細に検討し治療法開発に応用することで、プリオン病のみならずいわゆる蛋白質凝集病における新しい治療法開発の可能性が示唆された。

## E. 結論

アンフォルジンはプリオン蛋白質、アミロイドβペプチド(1-42)、α-synucleinの高次構造を試験管内で解きほぐし、トリプシン感受性をあげる事ができた。酵母細胞内においては、細胞周期依存性にアンフォルジン活性調節機構が存在することを明らかにした。これらのアンフォルジン活性調節機構を踏まえることで、プリオン病のみならず、いわゆる蛋白質凝集病における新しい治療法開発の可能性が示唆された。

図1

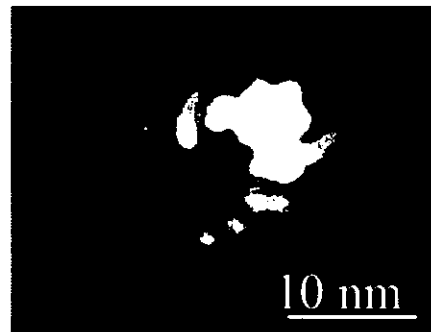


図 2

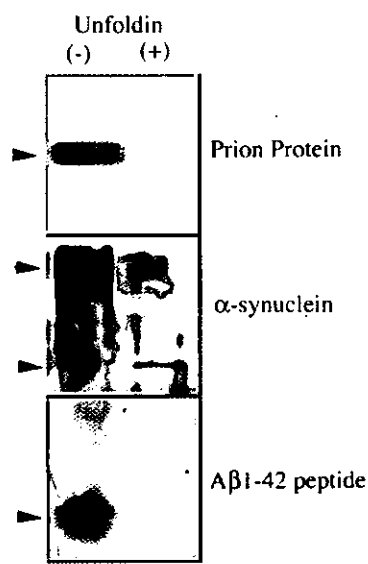


図 3

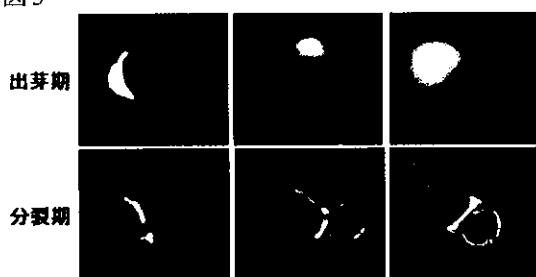
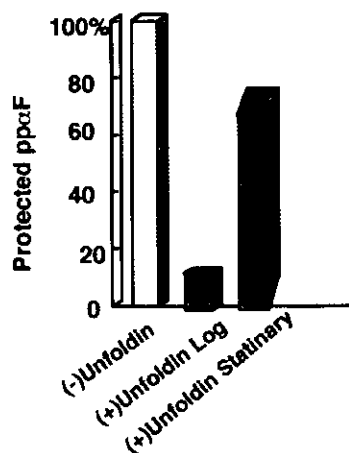


図 4



F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Prusiner SB, Legname G, DeArmond SJ, Cohen FE, Safar J, Riesner D, Kaneko K. Some Strategies and Methods for the Study of Prions. *Prion Biology and Diseases* (2nd edition), New York: Cold Spring Harbor; 857-920, 2003.
- Korth C, Kaneko K, Groth D, Heye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 4784-4789, 2003
- Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Stimulation of cellular prion protein expression by TSH in human thyrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 305: 1034-1039, 2003
- Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y: Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophys J.* 85: 1176-1185, 2003
- Sakasegawa Y, Hachiya NS, Tsukita S, Kaneko K: Ecm10p localizes in yeast mitochondrial nucleoids and its overexpression induces extensive mitochondrial DNA aggregations. *Biochem Biophys Res Commun.* 309: 217-221, 2003
- Ohkubo T, Sakasegawa Y, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K: Absence of association between codon 129/219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan. *Ann Neurol.* 54: 553-554, 2003
- Hachiya NS, Sakasegawa Y, Kaneko K:

- Therapeutic approaches in prion disease.  
*J Health Sci*, 49: 267-272, 2003
8. Sakasegawa Y, Kishida H, Sakurai M, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K:  
Lack of association between TrkA single nucleotide polymorphisms and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population.  
*Neurosci Lett*, 353: 49-52, 2003
  9. Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K:  
Microtubules-associated intracellular localization of the NH<sub>2</sub>-terminal cellular prion protein fragment.  
*Biochem Biophys Res Commun.*, 313:818-823, 2004
  10. Tremblay P, Ball HL, Kaneko K, Groth D, Hegde RS, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Safar SJ:  
Mutant PrP<sup>Sc</sup> Conformers Induced by a Synthetic Peptide and Several Prion Strains.  
*J Virol*, 78: 2088-2099, 2004
  11. Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K:  
Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 315: 802-807, 2004
  12. Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K:  
Non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP<sup>Sc</sup> replication *in vitro*.  
*Amyloid*, in press
  13. 金子清俊:  
*日本臨床 (増刊号3), 新世紀の感染症学(下)*. 日本臨床社、東京、61: 9-16, 2003.
  14. 金子清俊:  
プリオン病の治療法: 牛海綿状脳症と人変異型CJD.  
*老年医学update2003-04*. メジカルビュー社、171-176, 2003
  15. 金子清俊:  
プリオン病の謎に挑む.  
*岩波科学ライブラリー* 93巻、岩波書店、東京、2003
  16. 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: 37-44, 2003
  17. 金子清俊:  
病原体プリオンに強い遺伝子.  
*Medical Technology*, 31: 351-352, 2003
  18. 金子清俊:  
プリオン説  
*脳の科学*, 25: 365-368, 2003
  19. 金子清俊:  
プリオン病研究の歴史と最近の進歩.  
*最新医学*, 58: 959-964, 2003
  20. 八谷如美, 金子清俊:  
リコンビナント抗体によるプリオン複製阻止効果および感染細胞からの異常プリオン除去効果  
*Brain and Nerve*, 12: 4, 2003
  21. 逆瀬川裕二、八谷如美、金子清俊:  
プリオン病とラフト.  
*生体の科学*, 54: 316-320, 2003
  22. 金子清俊:  
蛋白質のフォールディングとプリオン病.  
*炎症と免疫*, 11: 30-36, 2003
  23. 八谷如美、金子清俊:  
プリオン病 最近の知見  
*老年精神医学雑誌* 14: 12, 2003
  24. 大久保卓哉、水澤英洋、金子清俊:  
変異型 Creutzfeldt-Jakob 病.  
*日本臨床* 62巻 (増刊号1)、痴呆症学2: 252-256, 2004
  25. Paul Brown, Rainer Seitz, 水澤英洋, Henry Baron, 金子清俊:  
プリオンに関する日本と欧米の現状と今後—特に血漿分画製剤に関連して—.  
*JAMA* 2: 120-121, 2004
  26. 金子清俊:  
BSE—最新の知見.  
*日本医事新報* 4165: 46-51, 2004
2. 学会発表
    1. Hachiya NS, Sakasegawa, Kaneko K.  
Unfoldin, an ATP-dependent chaperone with novel grappling mechanism in a cell

- cycle-dependent manner.  
43th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec 13-17, 2003.
2. 金子清俊  
牛海綿状脳症と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病.  
徳島県病院薬剤師会. 徳島. 4.9,2003
  3. 金子清俊.  
牛海綿状脳症と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病.  
兵庫県病院薬剤師会. 神戸. 4.17,2003
  4. 金子清俊  
プリオン病の免疫療法.  
第11回神経免疫フォーラム. 金沢. 4.19,2003
  5. 金子清俊.  
プリオン蛋白質関連因子としての unfolding chaperone.  
第44回日本神経学会総会. 横浜. 05.16, 2003.
  6. 金子清俊  
プリオン蛋白質代謝に関与する因子(群)の同定.  
BSE等プリオン病の制圧のための技術開発プロジェクト. つくば. 6.30, 2003
  7. Kaneko, K.  
Therapeutic Approaches in Prion Disease.  
The 2nd Plasma Protein Therapeutics Association (PPTA), Tokyo, Sep 5, 2003.
  8. 金子清俊  
牛海綿状脳症と人変異型クロイツフェルト・ヤコブ病.  
日本赤十字社特別講演会. 東京. 9.8, 2003
  9. 金子清俊  
牛海綿状脳症と人への感染.  
(社)日本臨床検査薬協会主催学術講演会.  
東京. 9.26, 2003
  10. 金子清俊  
正常型プリオンタンパク質のバイオイメーキング.  
早稲田大学理工学部セミナー「システムとしての脳の働きを探る」. 東京. 10.1, 2003
  11. 金子清俊  
Conformation modulating factor and prion replication.  
第76回日本生化学会大会. 東京. 10.16, 2003
  12. 金子清俊  
クロイツフェルト・ヤコブ病.  
国際ヤコブデー. 東京. 11.12, 2003
  13. 金子清俊.  
Prion protein and the conformation modifying activity.  
分子研研究会 生体分子ダイナミクスと機能・立体構造形成研究会. 岡崎. 12.22, 2003
  14. 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.  
第10回原子力安全シンポジウム. 東京. 2.7, 2004
  15. 金子清俊  
欧州の食のリスクコミュニケーション.  
食のリスクコミュニケーション意見交換会.  
東京. 2.16, 2004
  16. 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.  
食の安全安心フォーラム. 大阪. 3.4, 2004
  17. 金子清俊  
BSEとその食へのリスク.  
食のリスクコミュニケーション講演会. 東京. 3.13, 2004
  18. 岸田日帯, 逆瀬川裕二, 山河芳夫, 黒岩義之, 八谷如美, 金子清俊:  
遺伝子多型を用いたプリオン病の治療開発に向けた培養細胞による検討(第二報).  
第44回日本神経学会総会. 東京. 5.15, 2003
  19. 戸田宏幸, 逆瀬川裕二, 有馬邦正, 黒岩義之, 金子清俊  
神経変性疾患にみられる神経内封入体の構成蛋白質の解析.  
第44回日本神経学会総会. 東京. 5.16, 2003
  20. 八谷如美, 渡邊光太, 川端真紀子, 逆瀬川裕二, 金子清俊  
Microtubule dependent intracellular traffic of prion protein.  
第76回日本生化学会大会. 東京. 10.16, 2003

21. 八谷如美, 定塚昌子, 逆瀬川裕二, 金子清俊  
Making of F-actin ring formation through the Unfoldin's activity in vitro.  
第76回日本生化学会大会. 東京. 10.18, 2003
22. 逆瀬川裕二, 八谷如美, 金子清俊  
Purification of an ATP-dependent protein unfolding activity from mouse neuroblastoma N2a cells.  
第76回日本生化学会大会. 東京. 10.16, 2003
23. 岸田日帯, 逆瀬川裕二, 山河芳夫, 西島正弘, 黒岩義之, 八谷如美, 金子清俊  
Combination treatment with the recombinant prion protein (rPrP-Q218K) reduced cytotoxicity of quinacrine in mammarian culture cells.  
第76回日本生化学会大会. 東京. 10.16, 2003
24. Iwanami N, Sankawa U, Saido TC, Yamakawa Y, Nishijima M, Kaneko K.  
Screening study of prion binding agents and their inhibitory effect on the conversion of prion protein.  
第76回日本生化学会大会. 東京. 10.16, 2003
25. 渡邊 光太, 八谷 如美, 逆瀬川 裕二, 金子清俊  
蛋白質高次構造を unfold するシャペロン: Unfoldin による病因性蛋白質凝集体の unfolding.  
第26回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.11, 2003
26. 渡邊 光太, 八谷 如美, 逆瀬川 裕二, 金子清俊  
Microtubule-dependent anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein.  
第26回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.11, 2003
27. 逆瀬川裕二, 岸田日帯, 桜井総子, 朝田隆, 木之下徹, 後藤雄一, 木村英雄, 黒岩義, 八谷如美, 金子清俊  
日本人における NGF レセプター遺伝子 TrkA の一塩基多型とアルツハイマー病発症リスクとの関連性について.  
第26回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.13, 2003
28. 大久保卓哉, 逆瀬川裕二, 朝田隆, 木之下徹, 後藤雄一, 木村英雄, 水澤英洋, 八谷如美, 金子清俊.  
Absence of association between codon 129 / 219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan.  
第26回日本分子生物学会年会. 神戸. 12.11, 2003
29. 八谷如美, 大久保卓哉, 川端真紀子, 渡邊光太, 逆瀬川裕二, 金子清俊.  
細胞質に蓄積したプリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) によって惹起されるミトコンドリア由来アポトーシス機構の解析.  
第3回ミトコンドリア学会年会. 福岡. 12.19, 2003
- 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（難治性疾患克服研究事業）

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

硬膜移植後プリオン病発症モデルマウスの作成と

防御型プリオンタンパク（recPrP<sup>218K</sup>）の発症遅延効果

分担研究者： 西島正弘（国立感染症研究所 細胞化学部） 川原信隆（東京大学 医学部）

協力研究者： 山河芳夫（国立感染症研究所 細胞化学部） 古屋一英（東京大学 医学部）

研究要旨：

1. 汚染硬膜移植によるプリオン病の発症モデル動物を作成することを目的として、コラーゲン膜に病原体（プリオン病発症マウスの脳ホモゲネート）を染み込ませたものを汚染硬膜の代用として用いて病原体の脳表からの接種を試みた。その結果（1）病原体を脳（室）内に直接接種したものに比べて約 20 日の遅れをもって全てのマウスが発症、死亡した。これらのマウス脳には異常型プリオンタンパク質（PrP<sup>Sc</sup>）の蓄積がウエスタンブロット法あるいは免疫染色法により確認された。（2）マウス脳の海綿状態及び PrP<sup>Sc</sup> が強く免疫染色される部位は PrP<sup>Sc</sup> を接触させた脳表面と、同側の視床および反対側の小脳である。これらのことから、PrP<sup>Sc</sup> の侵入経路は脳表からの経神経線維性による伝播の可能性が高く、本法によりプリオン病を発症せしめたマウスはヒト汚染硬膜移植後プリオン病の発症モデル動物となりうると考えられた。
2. 上記の発症モデルマウスを用いて、防御型プリオンタンパク質（リコンビナントプリオン 218 K：recPrP<sup>218K</sup>）を浸透圧ポンプで脳室内に連続投与して、その治療／発症延伸効果について検討した。その結果、非治療群（n=11）で病原体接種後 117±7.7 日で 50% のマウスが死亡したが、接種後 30 日目に治療を開始した群（n=7）では 129.4±12 日で 50% のマウスが死亡し、これら二群の間では recPrP<sup>218K</sup> の延命効果に関して有意差（0.02）が認められた。一方、病原体接種後 60 日で治療を開始した群（n=9）では 121±12.8 日で 50% のマウスが死亡し、非治療群と比べて、recPrP<sup>218K</sup> の効果は認められなかった。（0.41）

A. 研究目的：

弧発性クロイツフェルトヤコブ病（CJD）は稀な伝達性の致死性神経変性疾患であり、100 万人に 1 人の割合で自然発症する。その他にも医療行為が原因で伝達したと考えられるクロイツフェルトヤコブ病患者の発生（医原性 CJD）が国内外で報告されている。我が国では乾燥硬膜が病原体に汚染されていたことが原因と考えられる CJD 患者の数が 1985 年の調査以来約 100 名に上っており、社会的にも大きな関心事となっている。CJD の有効な治療法は無いが、汚染硬膜によるケースでは PrP<sup>Sc</sup> は

脳表からの接触感染に限られている。したがって、感染初期であれば、脳表からの薬剤の投与により PrP<sup>Sc</sup> を無害化して、その発症を遅延させる、あるいは治療することが可能であると考えられる。

本研究では、汚染硬膜移植によるプリオン病発症モデルマウスを作成し、異常型プリオン持続感染培養細胞株（scN2A 株）で異常型プリオンタンパクの産生を抑制することが知られている防御型プリオンタンパク（recPrP<sup>218K</sup>）の治療効果について検討した。

## B. 研究方法

### プリオン病原体:

プリオン感染材料はマウス順化スクレイピー(帯広1株)発症マウス(Tg(Mo PrP-A)B4053)の脳ホモジネート(10%/50mMTris-HCl/0.1MNaCl)を用いた。

### RecPrPの精製・純度:

pET11a ベクター(Novagen)にクローニングしたrecPrPを大腸菌BL21(DE3)pLysS株で発現させ、recPrPを含む封入体を0.1%メルカプトエタノールを含む8M尿素で可溶化し、PrPを①8M尿素を含む50mMTris-HCl buffer pH8.0で平衡化したCM-Sepharose カラムに吸着せしめ、②同緩衝液で洗浄後プリオンタンパクを6M Guanidiniumで溶出し、最終的に③6M Guanidinium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(図1-A参照)、Fr.No.28-36を集めてPBSに透析してGuanidiniumを除いた後に-80°Cで凍結保存した。精製標品はSDS-PAGE(図1)で1本のバンドとして泳動されており、その均一性が確認された。また、精製分子の質量分析をMALDI-TOFで確認した所、理論値と良い一致をしめた。(理論値23148.6, 実測値23147.5)。また、精製標品は5-5'ジチオビス-安息香酸と反応せず、質量分析でもモノマーの質量が得られることから、分子内に2個存在するSH基は分子内で架橋されているものと考えられる。

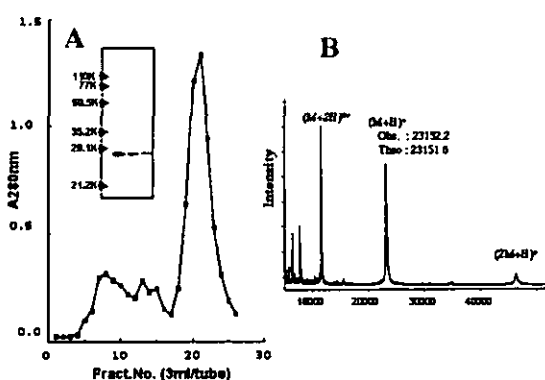


図1. 防御型プリオンタンパク(recPrP<sup>218K</sup>)のHPLC(ゲルろ過)による精製と精製標品のSDS-PAGE(A)及び質量分析による検定

マウス: カリフォルニア大学のブルシナー教授より恵与されたプリオン過発現トランスジェニックマウスTg(MoPrP-A)B4053を用いた。なお接種時のマウスの週齢は8-13週齢である。

### 感染モデルマウスの作成:

8週齢から13週齢のマウス一群5匹を用いた。マウスにハロセン吸入後、ケタミン0.3mgを腹腔内投与し無痛、無動化の後、マウス用ステレオ固定器に固定し正中線に沿って1cmの切開をおいた。右側の頭蓋骨のBregmaとLambdaの間に一辺4mmの正方形の開窓をおき硬膜を切開、除去し、30ゲージ針にて2mmの長さの皮質切開線を0.5mm間隔にて3本作成後、ヒト脳神経外科手術の際用いられる止血用コラーゲンスポンジ(インスタット)3x3mm大を脳表に接着させ、PrP<sup>Sc</sup>を発症したマウス脳の10%ホモジネート溶液を5μlしみこませた後、創部を縫合した。(図2参照)



図2. 硬膜移植プリオン病発症モデルマウスの作成

### 防御型プリオンタンパク質(recPrP<sup>218K</sup>)の投与:

上記の様に病原体を感染させたマウスに対して接種後、30、60日に麻酔下に背部皮下に精製recPrP<sup>218K</sup>を充填した浸透圧ポンプ本体(ALZET社製)を挿入し、ポンプ部から細管を通してrecPrP<sup>218K</sup>を直接脳室に導入した(図3)。なお、ポンプの容量は0.2ml、recPrP<sup>218K</sup>の濃度は約200ug/ml(in PBS)で、注入速度は約1μl/hrである。

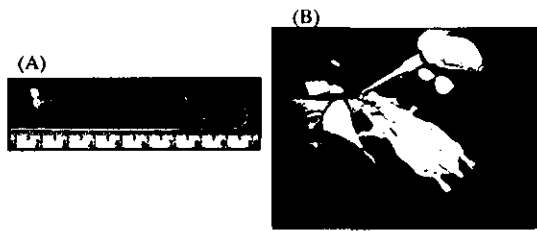


図-3 浸透圧ポンプ(A)とマウスへの挿入(B)

(倫理面への配慮)

本実験は国立感染症研究所の実験動物委員会及びバイオセフティー委員会の講習会を受講したものが実施した。

また、実験計画はそれぞれの委員会で審議の上、了承を受けたものである。

C. 研究成果

1. モデルマウスの発症

上記実験条件では図-4 に示す様に、即ち 120 日前後でマウスが発症、死亡した。

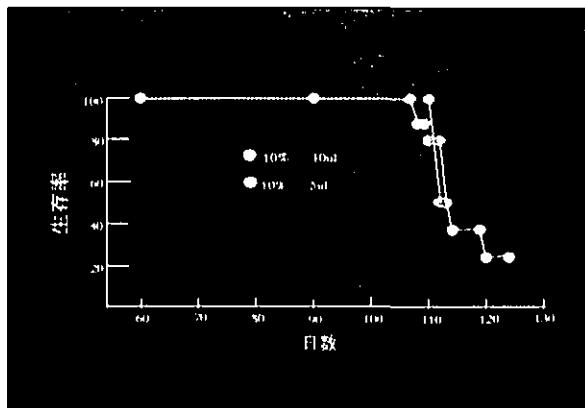


図-4. モデルマウスの発症

2. モデルマウスにおける異常型プリオンの蓄積

2-1. ウエスタンブロット法による解析

ウエスタンブロット法では異常型プリオンタンパク質の脳への蓄積は接種後 90 日以降で顕著に認められる様になり (図 5)、瀕死あるいは、死亡した全てのマウス脳には PrP<sup>Sc</sup> の強度の蓄積があることがウエスタンブロット法、免疫染色法によって確認された。

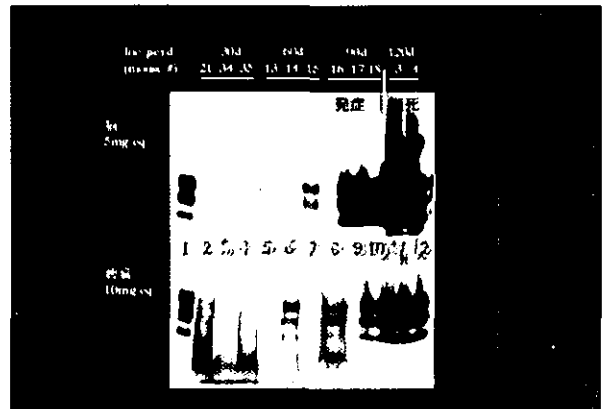


図-5. モデルマウスへの PrP<sup>Sc</sup> の蓄積

2-2. 異常型プリオンの蓄積部位の免疫組織化学的解析

図-6、7 に示す様に発症マウスあるいは発症直前のマウス脳の海綿状態及び PrP<sup>Sc</sup> の沈着部位は PrP<sup>Sc</sup> を接触させた脳表面と、同側の視床および反対側の小脳であった (図 6、7)。

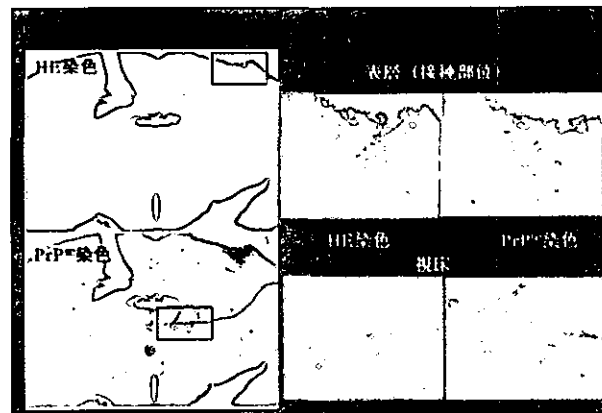


図-6. モデルマウスの PrP<sup>Sc</sup> の蓄積と病変 (大脳)

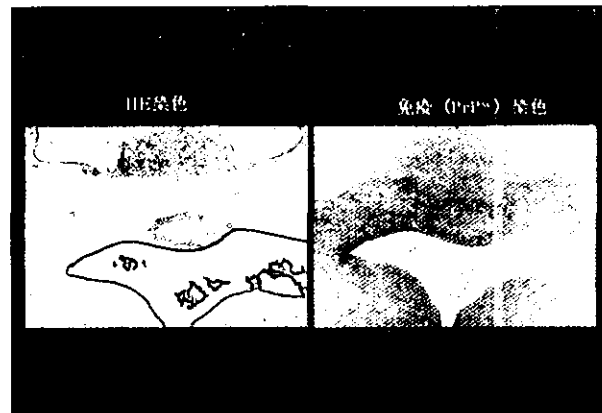


図-7. モデルマウスの小脳における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積と病変

### 3. 防御型プリオン recPrP<sup>23K</sup>の治療/発症延伸効果

上記の発症モデルマウスに対して、病原体接種後それぞれ30日目、60日目に防御型プリオンを投与してその治療効果を見たところ、図-8及び表1に示す様に、30日後に防御型プリオン投与を開始した群では死亡までの日数が12日程度延伸した(全経過の10%)が、感染後60日経過後に防御型プリオン投与した群ではそのような効果は認められ無かった。

	生存日数 平均±SD	P
非治療群 (n=11)	117.7 ± 7.7	—
30日治療群 (n=7)	129.4 ± 12	0.02
60日治療群 (n=9)	121.4 ± 12.8	0.41

表-1. 防御型プリオンタンパク recPrP<sup>23K</sup>の治療効果

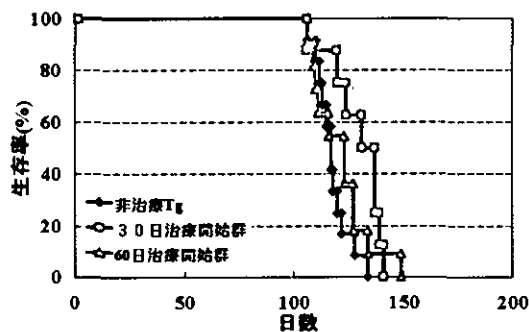


図-8. 防御型プリオンタンパク recPrP<sup>23K</sup>の治療効果

### D. 考察 / 結論

発症モデルマウスにおいて PrP<sup>Sc</sup>の感染経路として浸潤性、血行性、経脳脊髄液性、経神経線維性の4つが考えられるが、大脳皮質と視床との間に連続した染色性が認められないことから、大脳皮質と同側の視床を結びつけるのに矛盾しない説明は経神経線維での伝播である。大脳皮質には同側の視床からの投射繊維が存在しているため PrP<sup>Sc</sup>の逆行性取り込みによる軸索経由での視床神経細胞体への輸送が起きているのかも知れない。今後、この可能性を検証する必要があるが、本法により発症せしめたマウスはヒト硬膜移植によるプリオン病の発症モデル動物となりうると考えられる。

モデルマウスを使った治療実験では、感染後30日以内であれば防御型プリオンタンパク質の投与により、若干の致死延伸効果が期待できるが、60日ではもはや延伸効果は認められなかった。高濃度の防御型プリオンタンパクを用いることや、容量の大きなポンプでさらに長期間投与を続けることも考えられるが、プリオンタンパクの溶解度やマウスへの負荷を考えると何れも技術的に困難である。一方、本モデルマウスで発症、即ち、神経症状(異常挙動)を臨床的に観察することができるのは、接種から少なくとも90日が必用であり、生化学的に最も早期に感染の成立が確認できるウエスタンブロット法でも感染の有無を確認するのに60日を要し、30日では不可能である。すなわち、このような治療方法を有効にするためには、高感度な生前診断法の開発と防御型プリオンタンパク質の PrP<sup>Sc</sup>蓄積部位へのより効率的な輸送法についても考慮する必用が有るものと思われる。

### E. 健康危機情報

プリオン病原体に汚染されたマウス、器具は 135℃ 1時間のオートクレーブあるいは 1N-NaOH への浸漬などの処理により不活化した。また、実験期間中に感染につながる事故は無かった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

(1) Effects of  $\beta$ -sheet breaker peptide polymers on scrapie-infected mouse neuroblastoma cells and their affinities to prion protein fragment PrP(81-145)

T.Oishi, K.Hagiwara, T.Kinumi, Y.Yamakawa, M.Nishijima, K.Nakamura and H.Arimoto  
Org.Biomol.Chem., 2003,1,2626-2629

(2) Atypical Proteinase K Resistant Prion Protein (PrP<sup>Res</sup>) observed in an apparently healthy 23month Old Holstein Sterer.

Y.Yamakawa, K.Hagiwara, K.Nohtomi, Y.Nakamura, M.Nishijima, Y.Higuchi, Y.Sato, T.Sata and the Expert committee for BSE diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan

Jpn.J.Infect.Dis., (in press)

2. 学会発表

- (1) A synthetic Peptide Fragment from Prion Protein  
Inhibits the Accumulation of Proteinase K resistant Prion  
Protein

Y.Nakamura, K.Hagiwara, F.Ohuchi, K.Nohtomi,  
M.Nishijima and Y. Yamakawa

第76会日本生化学会大会 (横浜) 2003. 10月

- (2) Tissue distribution of Protease Resistant Prion Protein in  
Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) using Western  
Blotting Assay

Y. Yamakawa, K.Hagiwara, M.Nishijima, K. Nohtomi  
and T.Sata.

第76会日本生化学会大会 (横浜) 2003. 10月

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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・神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部
研究協力者	鈴木友子	国立精神・神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部
	岸田日帯	国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第七部
	吉村まどか	国立精神・神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部
	石井亜紀子	筑波大学神経内科

研究要旨

1. 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。
2. 孤発性CDJ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

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遺伝子を効率よく、硬膜及び神経細胞に導入するための遺伝子導入法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 変形型プリオン蛋白を組み込んだレトロウイルスベクターの作成

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。

2. 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。

### 3. センダイウイルスベクターへの治療遺伝子の挿入と、ベクターの産生と導入

DNAVECとの共同研究により、天然型センダイウイルスベクターに種々のサイズのマイクロジストロフィン (CS-1, AX-II, M-3) を導入したウイルスベクター (SeV/CS1, SeV/AX2, SeV/M3) を構築した。次に、これらのセンダイウイルスベクターをマウス骨格筋細胞株であるC2C12細胞、C57BL/10マウス及びC57BL/10-mdxマウスの前脛骨筋に導入し、経時的にマイクロジストロフィン及びlacZの発現と筋変性に対する治療効果を検討した。

#### (倫理面への配慮)

本実験において、現在まではヒトの試料を使用していない。動物を用いた実験については、年度の始めに、各施設の動物実験に関する倫理規程に従い、動物実験研究計画書を作成し、委員会による審議、承認を受けた上で実施した。

### C. 研究成果

#### 1. レトロウイルスベクター

変異型プリオン蛋白の塩基配列を含むレトロウイルスベクターの作製を行うとともに、 $10^6$ cfu/ml の安定して高力価のレトロウイルスベクター液を得ることができた。

#### 2. AAV-2およびAAV-5

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。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た結果、少なくとも骨格筋に関しては2型の感染性が2週齢までの新生児マウスでは比較的低いのに対し、5型の場合には新生児マウスでも高いことが明らかになった。

### 3. センダイウイルスベクター

センダイウイルスベクターは分化導入直後の筋細胞への導入効率は低く、増殖している筋芽細胞および分化後誘導1-2日後の筋細胞に効率よく導入され、分裂後の細胞にも導入可能であることが明らかになった。また、SeV/CS1 < SeV/AX2 < SeV/M3の順でジストロフィンの発現量が多く、挿入遺伝子の大きさが関与していると考えられた。

センダイウイルスベクターを投与した mdx マウスでは28日まで dystrophin 遺伝子の発現が認められ、通常認められる壊死再生所見も軽度であった。現在、投与量及び投与時期による遺伝子導入効率の比較検討を行っている。

### D. 考察

#### 1. 変形型プリオン蛋白

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。

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長期間発現可能で細胞毒性が少なく、高い発現レベルを持つベクターの開発が重要である。AAVベクターは骨格筋に対して高い感染性を持つが、神経細胞などの非増殖性細胞においても遺伝子導入発現が可能であるため、試みるべきベクターの一つであると考えられる。本研究では更に AAVベクターの血清型によって、感染性が異なることを明らかにした。

一方、骨格筋でのプリオンの発現も確認され

ており、骨格筋・中枢神経系の両部位に遺伝子発現が可能であるセンダイウイルスベクターは有用な遺伝子導入ツールとなると考えられる。今後は投与ルートおよび組織への targeting の戦略の検討や、細胞毒性や安全性を考慮しつつ中枢神経系への導入実験を行っていききたい。

#### 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。

中枢神経系の細胞に効率よく遺伝子を導入し発現させる目的でウイルスベクターを用いた検討を行った。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。センダイウイルスベクターの骨格筋細胞への投与では 28 日まで dystrophin 遺伝子の発現が認められ、mdx マウスでの筋壊死を軽減できた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA, Vilquin JT, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Ruegg MA, Wewer UM, Engvall E :  
Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice.  
*Neuromuscul Disord* 2003 13(3):207-15
2. Kano M, Kitano T, Ikemoto M, Hirasaka K, Asanoma Y, Ogawa T, Takeda S, Nonaka I, Adams GR, Baldwin KM, Oarada M, Kishi K, Nikawa T:  
Isolation and characterization of a novel gene sfig in rat skeletal muscle up-regulated by spaceflight (STS-90).  
*J Med Invest* 50: 39-47, 2003
3. Nakada C, Tsukamoto Y, Oka A, Nonaka I, Takeda S, Sato K, Mori S, Ito H, Moriyama M :  
Cardiac-restricted ankyrin-repeated protein is differentially induced in duchenne and congenital muscular dystrophy.  
*Lab Invest* 83: 711-9, 2003
4. Shimatsu Y, Katagiri K, Furuta T, Nakura M, Tanioka Y, Yuasa K, Tomohiro M, Kornegay JE, Nonaka I, Takeda S:  
Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD<sub>1</sub>).  
*Experimental Animals* 52: 93-97, 2003
5. Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A, Motoyoshi K, Kamakura K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S:  
Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin.  
*Am J Pathol* 163: 203-15, 2003
6. Yuge L, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, Sugiyama M, Kataoka K:  
Cell differentiation and p38(MAPK) cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat.  
*In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39: 89-97, 2003
7. Yuge L, Okubo A, Miyashita T, Kumagai T, Nikawa T, Takeda S, Kanno M, Urabe Y, Sugiyama M, Kataoka K:  
Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts.  
*Biochem Biophys Res Commun* 311:32-8, 2003
8. Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, Saito K, Harada H, Arikawa-Hirasawa E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Okamoto K, Kato Y, Fujiwara T:  
Laminin alpha2 essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression.  
*J Biol Chem* [Epub ahead of print], 2003
9. Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykhholeslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, Matsuda R:  
Negamycin Restores Dystrophin Expression in Skeletal and Cardiac Muscles of mdx Mice.  
*J Biochem* (Tokyo) 134(5):751-8, 2003
10. Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I,



- Ogawa T, Adams G, Baldwin K, Yasui N, Kishi K, Takeda S:  
Skeletal muscle gene expression in space-flown rats.  
*FASEB J* 2004 Jan 8 [Epub ahead of print]
11. Munchira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K:  
alpha 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1.  
*J Biol Chem* 2004 Jan 13 [Epub ahead of print]
12. Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M:  
Identification and characterization of  $\epsilon$ -sarcoglycans in the central nervous system.  
*Mol Brain Res* (in press) 2004
13. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamomoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H:  
Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody.  
*Exp Cell Res* (in press) 2004
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
なし

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

分担研究者 北條 浩彦 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部

研究要旨

RNA interference (RNAi)による遺伝子ノックダウン方法を用いて、プリオン病原因遺伝子であるプリオン (*PrP*) 遺伝子の発現抑制を試みた。その結果、マウス内在性プリオン遺伝子に対して70～75%発現抑制を誘導する siRNA 二量体 (RNAi を誘導する短い二本鎖 RNA 分子) を設計することができた。

A. 研究の目的

*PrP* 遺伝子ノックアウトマウスにプリオン病原体を摂取してもプリオン病を発病しないことが既に知られている。これは、異常型プリオン蛋白質の増幅に必要な正常型プリオン蛋白質が存在しない（発現していない）ために、発病に至る量の異常型プリオン蛋白質が細胞内に蓄積しないためと考えられる。さらに重要なことは、これらのノックアウトマウスは形態学的にも機能的にも正常マウスとほとんど差がないことである。したがって、*PrP* 遺伝子をノックアウトまたはノックダウンすることができれば、プリオン病の進行だけを抑え、さらにはその発病を予防することも可能であると考えられる。そこで、内在性の *PrP* 遺伝子の発現を簡便にノックダウンするために、近年注目されている新技術、RNA interference (RNAi)、を用いてマウス内在性 *PrP* 遺伝子の発現をノックダウンする実験を試みた。

B. 研究方法

- 1) マウス *PrP* 遺伝子 (cDNA) の塩基配列データを基に、アミノ酸をコードする領域に4箇所の small interfering RNA (siRNA) ターゲット部位を選び、siRNA 二量体を設計した。センス鎖とアンチセンス鎖の合成 siRNA は熱変成—アニーリングによって二本鎖 (siRNA 二量体) にし、RNAi のメディエーターとし

て用いた。

- 2) 得られた siRNA 二量体を JetSI トランスフェクション試薬 (Poly-plus transfection 社) を用いたリポフェクションによってマウス N2a 細胞内に導入し、48時間後、全 RNA を抽出した。得られた RNA を鋳型にオリゴ dT と逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、PCR 法によって *PrP* 遺伝子発現を調べた (RT-PCR)。正確な発現量を調べるために、さらに ABI Prism 7000 を用いたリアルタイム PCR 法による解析も行った。
- 3) 細胞内のプリオン蛋白質発現量を調べるために、PrP モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットによる解析を行った。

C. 研究結果

マウス *PrP* 遺伝子アミノ酸コーディング領域に4箇所の siRNA (siPrP-1, siPrP-2, siPrP-3, siPrP-4) を設計し、それぞれの siRNA 二量体による遺伝子ノックダウン効果を RT-PCR 法を用いて解析した。siRNA 二量体を N2a 細胞にトランスフェクションし、48時間後、全 RNA を抽出した。RT-PCR 法そして得られた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動法による解析の結果、siPrP-1 と siPrP-4 siRNA 二量体をトランスフェクションした場合に *PrP* 遺伝子発現の顕著な減少が観察された。その他の siPrP-2 と siPrP-3

siRNA 二量体を用いた場合には、コントロールの siRNA 二量体 (どの遺伝子に対してもノックダウン効果を示さない siRNA 二量体) とほぼ同じ発現量が観察された。

さらに、siPrP-1 と siPrP-4 siRNA 二量体の *PrP* 遺伝子ノックダウン効果を正確に調べるために、逆転写 (RT) 後、リアルタイム PCR 法による解析を行った。その結果、siPrP-1 と siPrP-4 siRNA 二量体を用いた遺伝子ノックダウンは、それぞれ約 70%~75% の発現抑制効果があることが明らかとなった。

次に、siPrP-1 と siPrP-4 siRNA 二量体を用いた RNAi 誘導によって細胞内の PrP 蛋白質量も減少するかどうかについて、ウエスタンブロット法を用いた解析を行った。siPrP-1 と siPrP-4 siRNA 二量体を N2a 細胞にトランスフェクションし、48 時間後、細胞抽出液を調製した。そして、SDS-PAGE、メンブレンブロッティングを行い、PrP 抗体を用いて PrP 蛋白質を検出した。その結果、RNAi 誘導に伴う PrP 蛋白質の顕著な減少が観察された。

#### D. 考察

マウス内在性 *PrP* 遺伝子をターゲットとする合成 siRNA 二量体を作製し、それらの siRNA 二量体を用いて RNAi を誘導した時、その活性に違いが観察された。この RNAi 活性の違いは、すでに他の哺乳動物 RNAi でも観察されている現象と同じであり、siRNA の配列、ターゲット mRNA の二次構造、そしてそれらに結合するタンパク質などが影響していると考えられる。

内在性 *PrP* 遺伝子転写産物の発現抑制に伴って PrP 蛋白質の減少も観察された。この結果は、PrP mRNA の減少が、即、タンパク質の減少につながることを示している。よって、RNAi を用いたノックダウンは、即効性のある PrP 蛋白質発現抑制方法であると考えられることができる。

#### E. 結論

内在性プリオン遺伝子の発現を RNAi に

よって強力にノックダウンするための合成 siRNA、siPrP-1、siPrP-4、を作製することができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Omi K., Tokunaga K., and Hohjoh H. (2004) Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS letters* 558: 89-95.
2. Hohjoh H. (2004) Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. *FEBS letters* 557: 193-198.

##### 2. 総説

1. 小見和也&北條浩彦. (2004). 神経細胞の RNAi と応用. *医学のあゆみ*, 208: 659-663.
2. 北條浩彦. (2004). RNAi-その基礎と応用、はじめに. *医学のあゆみ*, 208: 647-648.
3. 北條浩彦. (2004). 哺乳類細胞での RNA 干渉. *バイオインダストリー*, 21: 44-51.

##### 3. 学会発表

1. 小見和也、徳永勝士、北條浩彦. (2003) "Long-term effect of RNA interference (RNAi) on mammalian neurons" 第 26 回日本分子生物学会、神戸.
2. 左合典子、小見和也、田村美子、功刀浩、豊岡照彦、徳永勝士、北條浩彦. (2003) 「マウス筋芽細胞由来株 C2C12 細胞における RNA interference」第 26 回日本分子生物学会、神戸.

#### G. 知的財産権の出願

##### 1. 特許出願

特許出願番号：2003-427970  
発明の名称：改良された siRNA 分子およびこれを用いた遺伝子発現の抑制法  
発明者：北條浩彦  
特許出願人：財団法人ヒューマンサイエ

ンス振興財団

出願年月日：平成15年12月24日

【先の出願（特願2003-294504；出願日、平成15年8月18日）に基づく優先権主張】

2. 特許出願

特許出願番号：2004-041157

発明の名称：プリオン遺伝子の発現を抑制する siRNA 分子

発明者：北條浩彦

特許出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願年月日：平成16年2月18日