

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

(牛海綿状脳症対策研究分野)

異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山崎 壮

平成16年(2004年)4月

## 目次

I.	総括研究報告書	
	異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発 山崎 壮	1
II.	分担研究報告書	
1.	異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞の開発に関する研究 山崎 壮	7
2.	プリオン蛋白質の細胞内動態に関する研究 －免疫アッセイの標準品として用いる Proteinase K 処理 抵抗性プリオン蛋白質の調製－ 菊池 裕	12
3.	異常型プリオン蛋白質結合性分子プローブの開発に関する研究 －異常型プリオンタンパク質特異的分子プローブのプリオン 感染性に対する影響－ 堀内 基広	15
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV.	研究成果の刊行物・別刷	21

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
総括研究報告書

異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発

主任研究者 山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

研究要旨

プリオン病病原体であるプリオン（異常型プリオン蛋白質、PrP<sup>Sc</sup>）の検出法としては、バイオアッセイ法とイムノアッセイ法があるが、それぞれ一長一短がある。しかし、迅速性、簡便性、高感度の3条件がそろったPrP<sup>Sc</sup>検出法はなく、その開発が求められている。そこで、本研究では、インビトロ検出法の特徴である迅速性と簡便性を持ちながら現在のイムノアッセイ法よりも高感度な検出法をめざして、培養細胞を用いたバイオアッセイ法およびPrP<sup>Sc</sup>に特異的に反応する分子プローブを用いたインビトロ検出法を開発を試みた。両者の結果を統合することで、PrP<sup>Sc</sup>のインビトロ高感度検出法を開発することをめざした。

本年度は、(1) 昨年度までにウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にして BoPrP cDNA 遺伝子を導入したトランスフェクタント細胞株を作製したが、昨年調べたトランスフェクタント株クローンの PrP<sup>C</sup> 発現量が低かったため、さらに多くのクローンの PrP<sup>C</sup> 発現量を RT-PCR とイムノブロットングで解析した。トランスフェクタント株の PrP mRNA 発現量は、宿主の BCE C/D 細胞と比較して、同程度から多いものまでクローンによる違いが認められた。PrP mRNA 発現量の多いクローンを選択し、PrP（蛋白質）発現を調べたが、2種類の発現ベクターを使ったトランスフェクタント株のいずれでも、宿主細胞と同様に蛋白質の発現が認められなかった。RT-PCR 産物の DNA 塩基配列を解析したが、トランスフェクタント株では導入 cDNA 配列が確認され、宿主細胞株でも同一配列であった。

(2) PrP<sup>Sc</sup>の易伝達性細胞によるインビトロ高感度検出法を開発を目的とし、長期間の培養により PrP<sup>Pres</sup> を産生するヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G の特異性を、抗ヒト PrP モノクローナル抗体 6H4 を用いたイムノブロット法および間接蛍光抗体法で解析した。T98G 細胞が PrP<sup>Pres</sup> を産生する条件下で PrP は細胞膜上に存在し、細胞質画分では検出されなかった。また、T98G 細胞が産生する PrP<sup>Pres</sup> は非イオン性界面活性剤に可溶性であった。PrP<sup>Sc</sup> は細胞質画分に存在して非イオン性界面活性剤に不溶とされているが、T98G 細胞が産生する PrP<sup>Pres</sup> は異なった特異性を示した。

(3) これまでの研究から、PrP<sup>Sc</sup>と反応するが PrP<sup>C</sup>とは反応しないモノクローナル抗体 mAb 6H10、および環状ペプチド c-KPHPYL を樹立・同定してきた。今年度はこれら PrP<sup>Sc</sup>特異的分子プローブと感染性を有するプリオンとの関連性を明確にするために、これら分子プローブのプリオン中和活性について検討した。mAb 6H10 とプリオンを混合後にバイオアッセイ用 ICR マウスに接種した場合、陰性対照となる抗体と比較して潜伏期が平均 19 日延長した。これは約 95%の感染価の低下に相当した。従って、mAb 6H10 はプリオン中和活性を有することが明らかになった。しかし、c-KPHPYL は陰性対照として使用した逆配列の環状ペプチドと比較して潜伏期の延長は認められなかった。

研究班全体の3年間の研究成果として、培養細胞を用いたバイオアッセイ法およびPrP<sup>Sc</sup>に特異的に反応する分子プローブを用いたインビトロ検出法を統合した、PrP<sup>Sc</sup>のインビトロ高感度検出法を開発するという最終目標までには至らなかった。しかし、今後のBSE研究への貢献が期待できる研究結果が得られた。T98G細胞の研究成果から、T98G細胞のPrP<sup>Pres</sup>様式の研究は、PrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Pres</sup>への変化が細胞内にPrP<sup>Sc</sup>が蓄積していく過程を研究する有用なモデル系として利用可能であることが示唆された。今後、PrP<sup>Sc</sup>が感染しやすい細胞の樹立やプリオン病におけるPrP<sup>Sc</sup>の産生様式の解明に寄与すると期待できる。実用可能なPrP<sup>Sc</sup>特異的分子プローブの開発研究では、少なくとも9種の異なるエピトープを認識する抗マウスPrPモノクローナル抗体のパネル、および、PrP<sup>Sc</sup>と反応するがPrP<sup>C</sup>とは反応しないモノクローナル抗体および環状ペプチドを樹立した。これらPrP<sup>Sc</sup>特異的分子プ

ローブおよび一連の抗 PrP モノクローナル抗体群は、BSE 検査およびプリオン病研究にきわめて価値が高い。また、今後同様の手法を用いて、BSE 検査およびプリオン病研究に待望されている PrP<sup>Sc</sup> 特異分子プローブの作製が可能になると期待できる。PrP<sup>Sc</sup> 特異分子プローブの開発手法に道を開いた。

#### 分担研究者

菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部 主任研究官

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 教授

#### A. 研究目的

伝達性海綿状脳症（プリオン病）の原因物質である異常型プリオン蛋白質（PrP<sup>Sc</sup>、プリオン病原体）の検出法としては、現在、バイオアッセイ法とイムノアッセイ法とがあるが、それぞれ一長一短がある。しかし、迅速性、簡便性、高感度の 3 条件がそろった PrP<sup>Sc</sup> 検出法はなく、その開発が求められている。また、これまでに報告されているイムノアッセイ法は、プリオン病に罹った生体の PrP<sup>Sc</sup> が蓄積した組織を試料としたプリオン病診断用である。食品、医薬品、化粧品、医療品の検査には感度などの点で満足のものではない。そこで、本研究では、インビトロ検出法の特徴である迅速性と簡便性を持ちながら現在のイムノアッセイ法よりも高感度な検出法をめざして、培養細胞を用いたバイオアッセイ法および PrP<sup>Sc</sup> に特異的に反応する分子プローブを用いたインビトロ検出法を開発を行い、得られた結果を統合することで、PrP<sup>Sc</sup> のインビトロ高感度検出法を開発をめざした。

これまで、ごく限られた培養細胞株しかプリオン感染せず、多くの培養細胞株はプリオン感染に抵抗性であることが知られている。しかし、プルシナーら(2000 年)が、特定のマウス継代プリオン株に対してのみではあるが、プリオン感染に高感受性の培養細胞サブクローンを樹立し、細胞内に PrP<sup>Sc</sup> が蓄積することを検出することで PrP<sup>Sc</sup> のバイオアッセイができる可能性を示した。しかし、この方法論は実用化に向けた研究があまり行われていない。そこで、インビトロバイオアッセイ法の可能性をさ

ぐる検討を行うことにした。正常型プリオン蛋白質（PrP<sup>C</sup>）を発現している培養細胞を用い、外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの細胞表面への結合やそれらが誘起する細胞内での反応を解析することによって、感染初期に判定可能な PrP<sup>Sc</sup> の検出法を開発をめざした。また、ヒトおよびウシの PrP<sup>Sc</sup> に対して高感受性の培養細胞株の開発をめざした。

PrP<sup>Sc</sup> のみを認識する実用的抗体がまだ報告されていないことから、PrP<sup>C</sup> には反応せず、PrP<sup>Sc</sup> に反応する高親和性プローブの開発が求められている。PrP<sup>C</sup> の除去操作が不要となり、極微量のプリオン検出に威力を発揮すると考えられる。そこで、PrP<sup>Sc</sup> に特異的に結合するモノクローナル抗体および蛋白質、ペプチドなどのリガンドを探し、それを分子プローブとして無細胞系で簡便に検出する方法の開発をめざした。

#### B. 研究方法

##### 1. 異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞の開発に関する研究

昨年度までにウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にして BoPrP cDNA 遺伝子を導入したトランスフェクタント細胞株を作製したが、今年度は多くのクローンの PrP<sup>C</sup> 発現量を RT-PCR とイムノブロットングで解析した。

##### 2. プリオン蛋白質の細胞内動態に関する研究

長期間の培養により proteinase K 耐性型 PrP (PrP<sup>res</sup>) を産生するヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G の特性を、抗ヒト PrP モノクローナル抗体 6H4 を用いたイムノブロット法および間接蛍光抗体法で解析した。

##### 3. 異常型プリオン蛋白質結合性分子プローブの開発に関する研究

昨年度までに、PrP<sup>Sc</sup> と反応するが PrP<sup>C</sup> とは反応しないモノクローナル抗体および

環状ペプチドを樹立・同定してきた。今年度はこれら PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブと感染性を有するプリオンとの関連性を明確にするために、これら分子プローブのプリオン中和活性について検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究計画は、文部科学省「組換え DNA 実験指針」および文部科学省、厚生労働省、経済産業省の 3 省共同「ヒトゲノム・遺伝子解析解析に関する倫理指針」を遵守して研究を行った。本研究計画で用いるヒト由来の試料に関する研究は、一般的な研究用試料等として分譲されている細胞、DNA 等の匿名化された試料又は遺伝情報を用いて行った。また、本研究計画の動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験倫理委員会、帯広畜産大学動物実験委員会および北海道大学大学院の動物委員会が定めた動物実験倫理規定および実験指針に従って実施した。

### C. 研究結果

#### 1. 異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞の開発に関する研究

昨年度までにウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にして BoPrP<sup>C</sup> 遺伝子を導入したトランスフェクタント細胞株を作製したが、昨年調べたトランスフェクタント株クローンの PrP<sup>C</sup> 発現量が低かったため、さらに多くのクローンの PrP<sup>C</sup> 発現量を RT-PCR とイムノブロットングで解析した。トランスフェクタント株の PrP mRNA 発現量は、宿主の BCE 細胞と比較して、同程度から多いものまでクローンによる違いが認められた。PrP mRNA 発現量の多いクローンを選択し、PrP 発現を調べたが、2 種類の発現ベクター (pcDNA3.1、pDEST12.2) を使ったトランスフェクタント株のいずれでも、宿主細胞と同様に蛋白質の発現が認められなかった。RT-PCR 産物の DNA 塩基配列を解析したが、トランスフェクタント株では導入 cDNA 配列から予想された設計通りの配列が確認され、宿主細胞でも同一配列であった。

プリオン病原体の感染には種の壁があることが知られており、BSE 病原体のインビトロ感染実験にはウシ PrP<sup>C</sup> を発現する培養細胞が必要である。しかし、ウシ PrP<sup>C</sup> また

は PrP<sup>Sc</sup> を発現するウシ培養細胞株が現在報告されていない。そこで、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にして、ウシ PrP<sup>C</sup> を発現するトランスフェクタント細胞株を作製し、外来性 PrP<sup>Sc</sup> によって PrP<sup>C</sup> が PrP<sup>res</sup> に転換するか、あるいはすでに報告されている T98G 細胞のように何らかの培養条件下で PrP<sup>C</sup> が自発的に PrP<sup>res</sup> に転換するかを、ウシの培養細胞で検討する研究につなげていくことを試みた。しかし、今回樹立したトランスフェクタント細胞株では宿主細胞株 BCE C/D-1b と同様に、PrP の mRNA は発現しているが蛋白質発現が認められなかったことから、この BCE C/D-1b 細胞株はプリオン蛋白質発現系に使う宿主細胞としては適切でない可能性が示唆される。現在公的細胞株分譲機関から入手して利用可能なウシ培養細胞株が限られていて細胞株の選択の余地がないことを考えると、感染実験目的に合う性状の細胞株を得るには、トランスフェクタント細胞株の樹立をめざす戦略よりも、PrP 発現が認められるウシ正常細胞を不死化するなどの方法による新たなウシ細胞株の樹立をめざす戦略を試みる必要があると思われる。

#### 2. プリオン蛋白質の細胞内動態に関する研究

PrP<sup>Sc</sup> の易伝達性細胞によるインビトロ高感度検出法の開発を目的とし、長期間の培養により proteinase K 耐性型 PrP (PrP<sup>res</sup>) を産生するヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G の特性を、抗ヒト PrP モノクローナル抗体 6H4 を用いたイムノブロット法および間接蛍光抗体法で解析した。T98G 細胞が PrP<sup>res</sup> を産生する条件下で PrP は細胞膜上に存在し、細胞質画分では検出されなかった。また、T98G 細胞が産生する PrP<sup>res</sup> は非イオン性界面活性剤に可溶性であった。PrP<sup>Sc</sup> は細胞質画分に存在して非イオン性界面活性剤に不溶とされているが、T98G 細胞が産生する PrP<sup>res</sup> は異なった特性を示した。

培養細胞を用いたバイオアッセイ法の開発をめざしたこれまでの研究で、ヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G が PrP<sup>C</sup> を高発現すること、また長期培養後に PrP<sup>res</sup> が検出されることを見出した。また、その細胞内分布を解析した。長期間継代後に長期間培養し

た T98G 細胞が PK 抵抗性を示したことから、PK 抵抗性を指標とした易感染性細胞としての使用には利用できなかった。しかし、PrP<sup>C</sup> が PrP<sup>Sc</sup> に転換する際には PrP<sup>Pres</sup> の状態を経るとの仮説もあることから、T98G 細胞は PrP<sup>C</sup> の産生と PrP<sup>Pres</sup> への変化する機構を研究する有用なモデル系として利用可能と考えられる。T98G 細胞における PrP<sup>Pres</sup> の産生過程を解析することで、細胞内での反応を指標にした感染初期に判定可能な PrP<sup>Sc</sup> の検出法の開発につながることを、および、PrP<sup>Sc</sup> 易伝達性細胞の樹立に寄与することが期待される。また、PK 処理を含む PrP<sup>Sc</sup> イムノアッセイの PK 耐性標準タンパクとして T98G 細胞由来 PrP<sup>Pres</sup> が利用可能であることが示唆された。

### 3. 異常型プリオン蛋白質結合性分子プローブの開発に関する研究

これまでの研究から、PrP<sup>Sc</sup> と反応するが PrP<sup>C</sup> とは反応しないモノクローナル抗体 mAb 6H10、および環状ペプチド c-KPHPYL を樹立・同定してきた。今年度はこれら PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブと感染性を有するプリオンとの関連性を明確にするために、これら分子プローブのプリオン中和活性について検討した。mAb 6H10 とプリオンを混合後にバイオアッセイ用 ICR マウスに接種した場合、陰性対照となる抗体と比較して潜伏期が平均 19 日延長した。これは約 95% の感染価の低下に相当した。従って、mAb 6H10 はプリオン中和活性を有することが明らかになった。しかし、c-KPHPYL は陰性対照として使用した逆配列の環状ペプチドと比較して潜伏期の延長は認められなかった。

これまで、抗体に限らず、実用可能な PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブはなかった。そこで、新規プリオン病診断法およびプリオン汚染医薬品・食品の検査法確立のために、PrP<sup>Sc</sup> を特異的に認識する分子プローブの作製とその性状解析を行った。PrP<sup>Sc</sup> と反応するが PrP<sup>C</sup> とは反応しないモノクローナル抗体および環状ペプチドを樹立・同定した。さらにその過程で、少なくとも 9 種の異なるエピトープを認識する抗マウス PrP モノクローナル抗体のパネルを作製した。これら PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブおよび一連の抗 PrP モノクローナル抗体群は、BSE 検査

およびプリオン病研究にきわめて価値が高い。次に、これら PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブのプリオン中和活性について検討した結果、PrP<sup>Sc</sup> 特異抗体はプリオン中和活性を有することから、プリオン感染性と PrP<sup>Sc</sup> の相関の解析に有用と考えられる。PrP<sup>Sc</sup> 特異的環状ペプチドはプリオンの感染性には影響しないが、PrP<sup>Sc</sup> の構造解析などに有効なプローブである。本研究で作製した PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブは、プリオン病新規診断法やプリオン汚染検査法に応用可能か否かの結論を出すに至らなかったとはいえ、複数の方法で PrP<sup>Sc</sup> 特異分子プローブが作製可能なことが判明したので、今後同様の手法を用いて、PrP<sup>Sc</sup> 特異分子プローブのパネルの作製が可能になると思われる。方法論として将来性が期待できる。また、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> を識別可能な分子プローブが応用可能ならば、現在行われているプリオン病の免疫生化学的診断法に代わる、新たな技術に基づいた診断法の開発が可能となる。

### D. 考察

研究班全体の最終目標は、培養細胞を用いたバイオアッセイ法および PrP<sup>Sc</sup> に特異的に反応する分子プローブを用いたインビトロ検出法の開発を行い、得られた結果を統合して PrP<sup>Sc</sup> のインビトロ高感度検出法を開発することであったが、残念ながら最終目標の達成までには至らなかった。しかし、下述のように、培養中に蛋白質分解酵素処理抵抗性をもつプリオン蛋白質を産生する培養細胞株の研究、および異常型プリオン蛋白質を特異的に認識する分子プローブの作出は世界的にもユニークであり、今後の研究の進展によって、BSE 検査法開発とプリオン病研究への寄与が期待できる。本研究によって、今後の BSE 研究への貢献が期待できる研究結果が得られたと考える。

T98G 細胞の研究結果から、T98G 細胞の PrP<sup>Pres</sup> 様式の研究は、PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Pres</sup> への変化が細胞内に PrP<sup>Sc</sup> が蓄積していく過程を研究する有用なモデル系として利用可能であることが示唆された。今後、PrP<sup>Sc</sup> が感染しやすい細胞の樹立やプリオン病における PrP<sup>Sc</sup> の産生様式の解明に寄与すると期待できる。

実用可能な PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブの開発研究では、少なくとも 9 種の異なるエ

ピトーブを認識する抗マウス PrP モノクローナル抗体のパネル、および、PrP<sup>Sc</sup>と反応するが PrP<sup>C</sup>とは反応しないモノクローナル抗体および環状ペプチドを樹立した。これら PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブおよび一連の抗 PrP モノクローナル抗体群は、BSE 検査およびプリオン病研究にきわめて価値が高い。実際に、一部の抗体は日本の BSE 確定検査および BSE 研究にも利用されている。また、今後同様の手法を用いて、BSE 検査およびプリオン病研究に待望されている PrP<sup>Sc</sup> 特異分子プローブの作製が可能になると期待できる。PrP<sup>Sc</sup> 特異分子プローブの開発手法に道を開いた。

#### E. 結論

1) ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にして BoPrP cDNA 遺伝子を導入したトランスフェクタント細胞株の PrP<sup>C</sup> 発現量を RT-PCR とイムノブロットングで解析した。トランスフェクタント細胞株では宿主細胞株 BCE C/D-1b と同様に、PrP の mRNA は発現しているが蛋白質発現が認められなかった。

2) 長期間の培養により PrP<sup>res</sup> を産生するヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G の特異性を、抗ヒト PrP モノクローナル抗体 6H4 を用いたイムノブロット法および間接蛍光抗体法で解析した。PrP<sup>Sc</sup> は細胞質画分に存在して非イオン性界面活性剤に不溶とされているが、T98G 細胞が産生する PrP<sup>res</sup> はそれとは異なった特異性を示した。

3) 昨年度までに、PrP<sup>Sc</sup> と反応するが PrP<sup>C</sup> とは反応しないモノクローナル抗体および環状ペプチドを樹立・同定してきた。今年度はこれら PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブと感染性を有するプリオンとの関連性を明確にするために、これら分子プローブのプリオン中和活性について検討した。PrP<sup>Sc</sup> 特異的モノクローナル抗体にはプリオン中和活性が認められた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 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. 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.
  3. 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<sup>Sc</sup>) in the Small Intestinal Epithelial Cells of Neonatal Mice. *Vet Pathol.* 40: 723-727, 2003.
  4. 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: 40-51, 2004.
  5. 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)
  6. 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)
  7. Kikuchi, Y., Kakeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Sawada, J. Propagation of a protease-resistance form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G、投稿中
2. 学会発表
1. Kikuchi, Y., Kakeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Sawada, J.: In vitro propagation of a sporadic CJD-like form of PrP<sup>res</sup> in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. *Keystone Symposia: Molecular*

Aspects of Transmissible Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases), April, 2003, Breckenridge, Colorado, USA

2. 菊池裕、掛谷知志、高鳥浩介、中村尚登：In vitro propagation of a sporadic CJD-like form of PrP<sup>res</sup> in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. 第 76 回日本生化学会大会、2003 年 10 月、横浜
3. 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
4. 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
5. 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ビー株の分離と解析 第 135 回日本獣医学会

6. 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
7. 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 とスクレイビー自然例の識別 第 51 回日本ウイルス学会
8. 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  
なし



異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞株の開発に関する研究  
分担研究者 山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

研究要旨

本研究では、外来性の異常型プリオン蛋白質に対する感染性、細胞表面への結合性、細胞内に誘起される反応などを指標にして、異常型プリオン蛋白質に対して高感受性の培養細胞株（トランスフェクタント）の開発を行うことを目的に、これまで培養細胞での感染実験系がないウシプリオンに適用できる培養細胞系の開発をめざした。昨年度までは、ウシ培養細胞株としてウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にしてウシ正常プリオン蛋白質発現トランスフェクタント細胞株の作製を行った。昨年調べた BCE トランスフェクタント株クローンの PrP<sup>C</sup> 発現量が低かったため、今年度は、さらに多くのクローンの PrP<sup>C</sup> 発現量を RT-PCR とイムノプロットングで解析した。トランスフェクタント株の PrP mRNA 発現量は、宿主の BCE 細胞と比較して、同程度から多いものまで認められた。PrP mRNA 発現量の多い細胞株を選択し、PrP（蛋白質）発現を調べたが、2 種類の発現ベクターを使ったトランスフェクタントのいずれでも、宿主細胞と同様に蛋白質の発現が認められなかった。RT-PCR 産物の DNA 塩基配列を解析したが、トランスフェクタントでは導入 cDNA 配列が確認され、宿主 mRNA でも同一配列であった。トランスフェクタントでは PrP mRNA は発現しているが PrP（蛋白質）発現が行われていないと考えられた。

A. 研究目的

プリオン病病原体であるプリオン（異常型プリオン蛋白質、PrP<sup>Sc</sup>）の検出法としては、バイオアッセイ法とイムノアッセイ法がある。バイオアッセイ法は高感度で信頼性のある方法であるが、迅速性と簡便性に欠ける。一方、イムノアッセイ法は迅速で簡便であるが検出感度が劣る。それぞれ異なる長所と短所があり、現在は目的に応じて使い分けられている。しかし、迅速性、簡便性、高感度の 3 条件がそろった PrP<sup>Sc</sup> 検出法はなく、その開発が求められている。そこで、本研究班では、PrP<sup>Sc</sup> の迅速、簡便で高感度なインビトロ検出法の開発をめざした。その中で筆者らは、培養細胞を用いたバイオアッセイ法の開発をめざして、外来性の PrP<sup>Sc</sup> に対する感染性、細胞表面への結合性、細胞内に誘導される反応などを指標にして、ウシ PrP<sup>Sc</sup> に対して高感受性の培養細胞株（トランスフェクタント）の開発研究を分担した。

昨年度までに、ウシ培養細胞株である BCE C/D-1b 細胞（ウシ角膜上皮細胞株）にウシプリオン蛋白質（BoPrP）をコードする cDNA を遺伝子導入し、トランスフェクタント細胞株を得た。今年度は、昨年調べた BCE トランスフェクタント細胞株ク

ローンの正常型プリオン蛋白質（PrP<sup>C</sup>）発現量が低かったため、さらに多くのクローンの PrP<sup>C</sup> 発現量を RT-PCR とイムノプロットングで解析した。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ウシ PrP<sup>C</sup> 発現トランスフェクタント細胞株クローンは、昨年度までに以下の方法で調製した。ウシ PrP コード領域 cDNA（BoPrP cDNA）をほ乳類動物発現用ベクターである pcDNA3.1 ベクターと pDEST12.2 ベクターに挿入して作製したプラスミドを、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b（JCRB9129、ATCC CRL-2048 由来）に導入し、2 種類のトランスフェクタントを作製した。それらを、96 穴プレートを用いた限界希釈法によるクローニングを行った。

細胞は 5%FCS 添加 D-MEM で培養した。8 日ごとに継代し、途中 4 日目に培地を交換した。なお、トランスフェクタント細胞は、0.4 mg/ml Geneticin 存在下で培養した。

2. RT-PCR 法による PrP mRNA 発現の解析

培養細胞から RNeasy（Qiagen 社）と DNase I を用いて total RNA を抽出した。

2.5 µg の total RNA から oligo-dT primer で逆転写反応を行った。逆転写反応 (RT) 産物を鋳型にして、BoPrP cDNA のコード領域全体を増幅する PCR 反応を行った。PCR 産物 (設計値 847bp) をアガロースゲル電気泳動で解析した。

また、同じ RT 産物を鋳型にして、ウシ β-actin のコード領域の一部を増幅する PCR 反応 (産物鎖長設計値 353bp) を行った。

RT-PCR 産物の塩基配列解析を、タカラバイオ社に依頼した。その際、PCR プライマーをシーケンシングプライマーとして用いた。

3. イムノプロット法による PrP 発現の解析  
培養細胞に protease inhibitor cocktail を添加した可溶化 buffer (RIPA) を加えて細胞破碎した後、遠心分離 (10,000× g, 15 min) して得た上清を細胞可溶化物 (whole cell lysate, WCL) とした。陽性対照試料としては、ウシ大脳皮質ホモジネート由来 10,000 × g 沈殿画分 (P2 画分) を用いた。試料 (50 µg protein / lane) を SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜に転写した。抗 BoPrP モノクローナル抗体 BSPX54 と HRP 標識 2 次抗体を用いたイムノプロット法を行い、化学発色法で PrP を検出した。

### C. 研究結果

#### 1. RT-PCR 法による PrP mRNA 発現

pcDNA3.1 ベクターを使ったトランスフェクタント株 (TF-C シリーズ) 12 クローンと pDEST12.2 ベクターを使ったトランスフェクタント株 (TF-D シリーズ) 12 クローン、および宿主細胞株である BCE 細胞を培養した後 total RNA を抽出して、RT-PCR 法により PrP mRNA 発現を調べた。

なお、すべての RT 産物は、ウシ β-actin の PCR 反応を行い、電気泳動でバンドを確認した。また、逆転写酵素なしで行った RT 産物からは対象の PCR 産物が生成しないことを確認した。

宿主細胞株である BCE 細胞における PrP mRNA 発現を培養 2 日~12 日の期間で比較したが、RT-PCR 産物の電気泳動のバンド強度で見ると、total RNA 量あたりでは培養期間に関係なくほぼ一定の発現量であった (Fig.1)。

トランスフェクタント株における PrP

mRNA 発現を培養 4 日と 8 日の細胞で調べた。RT-PCR 産物の電気泳動のバンド強度で見ると、total RNA 量あたりでは、宿主の BCE 細胞と比較して、同程度から多いものまで認められた。TF-C シリーズと TF-D シリーズで比較すると、BCE 細胞と比較してバンド強度の強かったクローンは TF-D シリーズに多かった。また、培養 4 日と 8 日では、両者で大差ない例もあったが、8 日目の方がバンド強度の強い例が多かった。Fig.2 と Fig.3 に分析例を示す。

#### 2. イムノプロット法による PrP 発現の解析

トランスフェクタント細胞株のうち、BCE 細胞と比較して PrP mRNA 発現量の多かったクローンから TF-C シリーズと TF-D シリーズからそれぞれ 3 つずつ選び、宿主 BCE 細胞とともに、イムノプロット法により PrP (蛋白質) 発現を調べた。その結果、2 種類の発現ベクターを使ったトランスフェクタント細胞株 TF-C シリーズと TF-D シリーズのいずれでも、宿主細胞と同様に蛋白質の発現が認められなかった (Fig.4)。

#### 3. トランスフェクタント株で発現している PrP mRNA コード領域の配列

蛋白質発現を調べたクローンのうち、TF-C シリーズ、TF-D シリーズからそれぞれ 1 クローン (C1C2、D3A4) を選び、宿主 BCE 細胞とともに、RT-PCR 産物の DNA 配列を解析した。その結果、3 者の配列は同一であった。つまり、トランスフェクタントでは導入 cDNA 配列が確認され、宿主でも同一のコード領域配列であった。従って、トランスフェクタント株には PrP cDNA のコード領域だけを遺伝子導入したが、宿主の BCE 細胞が持っているゲノム DNA 中の PrP 遺伝子から転写されプロセッシングを経て作られる PrP mRNA のコード領域と同じ塩基配列を持つ mRNA が、細胞内で発現していたと考えられる。PrP mRNA は発現していても蛋白質発現が起こっていないと考えられる。

### D. 考察

本研究では、新たな原理によるインビトロ検出法の開発の試みとして、培養細胞を用いたバイオアッセイ法の開発をめざした。

これまで、ごく限られた培養細胞株しかプリオン感染せず、多くの培養細胞株はプ

リオン感染に抵抗性であることが知られている。しかし、プルシナーら(2000年)が、特定のマウス継代プリオン株に対してのみではあるが、プリオン感染に高感受性の培養細胞サブクローンを樹立し、細胞内に PrP<sup>Sc</sup> が蓄積することを検出することで PrP<sup>Sc</sup> のバイオアッセイができる可能性を示した。この方法論は実用化に向けた研究があまり行われていない。そこで、インビトロバイオアッセイ法の可能性をさぐるために、正常型プリオン蛋白質 (PrP<sup>C</sup>) を発現している培養細胞を用い、外来性のプリオン蛋白質やプリオン蛋白質ペプチドの細胞表面への結合やそれらが誘起する細胞内での反応を解析することによって、感染初期に判定可能な PrP<sup>Sc</sup> の検出できるかもしれないと考えて研究を立案した。本研究では、これまで培養細胞での感染実験系がないウシプリオンに適用できる培養細胞系の開発をめざした。そのために、まず PrP<sup>Sc</sup> に対して感受性の培養細胞株として PrP<sup>C</sup> を高発現するトランスフェクタント細胞株を開発する研究を進めた。

プリオン病原体の感染には種の壁があることが知られており、BSE 病原体のインビトロ感染実験にはウシ PrP<sup>C</sup> を発現する培養細胞が必要である。しかし、ウシ PrP<sup>C</sup> または PrP<sup>Sc</sup> を発現するウシ培養細胞株が現在報告されていない。そこで、ウシ角膜上皮細胞株 BCE C/D-1b を基にして、ウシ PrP<sup>C</sup> を発現するトランスフェクタント細胞株を作製し、外来性 PrP<sup>Sc</sup> によって PrP<sup>C</sup> が PrP<sup>res</sup> に転換するか、あるいはすでに報告されている T98G 細胞のように何らかの培養条件下で PrP<sup>C</sup> が自発的に PrP<sup>res</sup> に転換するかを、ウシの培養細胞で検討する研究につなげていくことを試みた。しかし、今回樹立したトランスフェクタント細胞株では宿主株 BCE C/D-1b と同様に、PrP の mRNA は発現しているが蛋白質発現が認められなかったことから、この BCE C/D-1b 細胞株はプリオン蛋白質発現系に使う宿主細胞としては適切でない可能性が示唆される。現在公的細胞株分譲機関から入手して利用可能なウシ培養細胞株が限られていて細胞株の選択の余地がないことを考えると、感染実験目的に合う性状のものを得るには、トランスフェクタント細胞株の樹立をめざす戦略よりも、PrP 発現が認められるウシ正常細胞を不死化するなどの方法による新

たなウシ細胞株の樹立をめざす戦略を試みることが必要と思われる。

#### E. 結論

昨年調べた BCE 株トランスフェクタント細胞株の PrP<sup>C</sup> 発現量が低かったので、さらに多くのクローンの PrP<sup>C</sup> 発現量を RT-PCR とイムノブロットングで解析した。トランスフェクタント細胞株では宿主株同様に、PrP の mRNA は発現しているが蛋白質発現が認められなかった。この BCE C/D-1b 細胞株はプリオン蛋白質発現系トランスフェクタント作出に使う宿主細胞としては適切でない可能性が示唆される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kikuchi, Y., Takeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Sawada, J. Propagation of a protease-resistance form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G, 投稿中

##### 2. 学会発表

1. Kikuchi, Y., Takeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Sawada, J.: In vitro propagation of a sporadic CJD-like form of PrP<sup>res</sup> in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. Keystone Symposia: Molecular Aspects of Transmissible Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases), April, 2003, Breckenridge, Colorado, USA
2. 菊池裕、掛谷知志、高鳥浩介、中村尚登、In vitro propagation of a sporadic CJD-like form of PrP<sup>res</sup> in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. 第76回日本生化学会大会、2003年10月、横浜

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

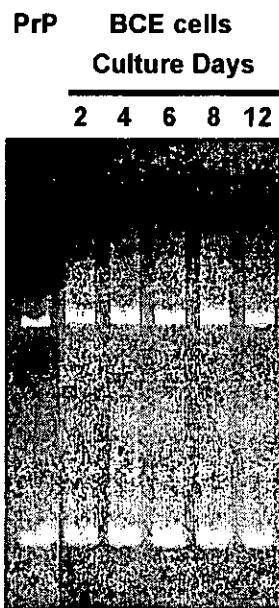


Fig.1 Expression of bovine PrP mRNA in BCE C/D-1b cells as host cells. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified using primers for bovine PrP cDNA from total RNA extracted from host cell line BCE C/D-1b. Templates for PCR: PrP: Bovine PrP cDNA coding region obtained from bovine brain cortex; positive control sample for PCR. BCE cells: cDNAs obtained from BCE C/D-1b cells cultured for 2, 4, 6, 8, and 12 days.

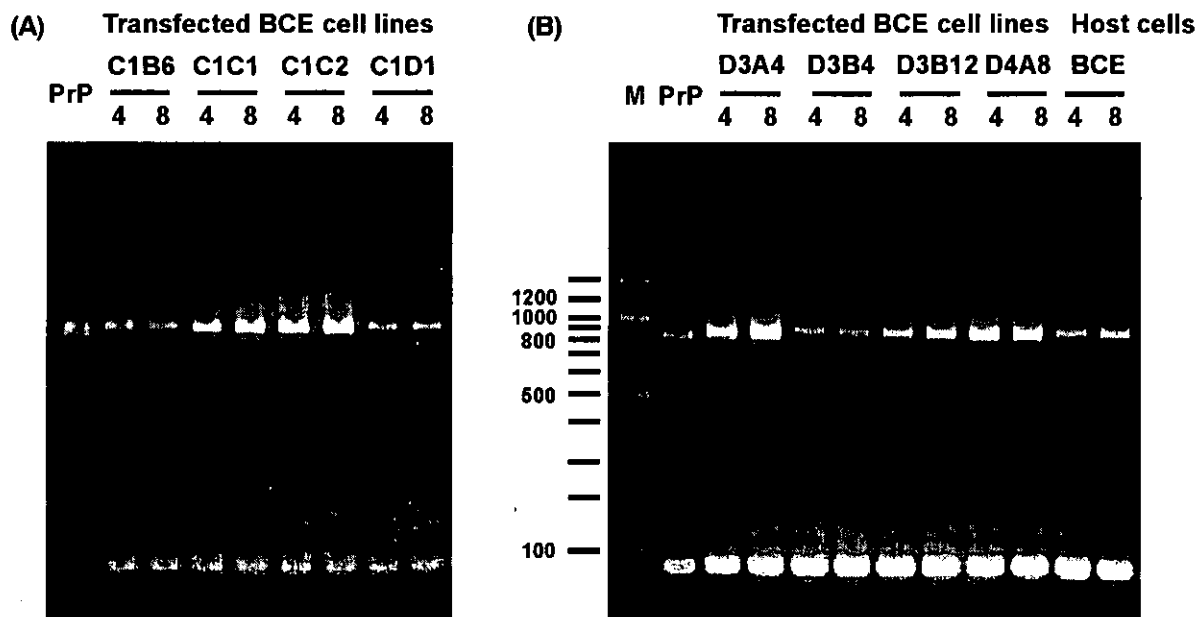


Fig.2 Expression of bovine PrP mRNA in transfected BCE cell lines. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified using primers for bovine PrP cDNA from total RNA extracted from the cell lines, TF-C series (A) and TF-D series (B). Templates for PCR: PrP: Bovine PrP cDNA coding region obtained from bovine brain cortex; positive control sample for PCR. Transfected BCE cell lines: cDNAs obtained from transfected BCE cells cultured for 4 and 8 days. C1B6, D3A4 and other names mean cell line clones. Numbers 4 and 8 mean culture days. Host cells BCE: cDNAs obtained from BCE C/D-1b cells cultured for 4 and 8 days. M: 100bp DNA ladder. 1517, 1200, and 1000 to 100.

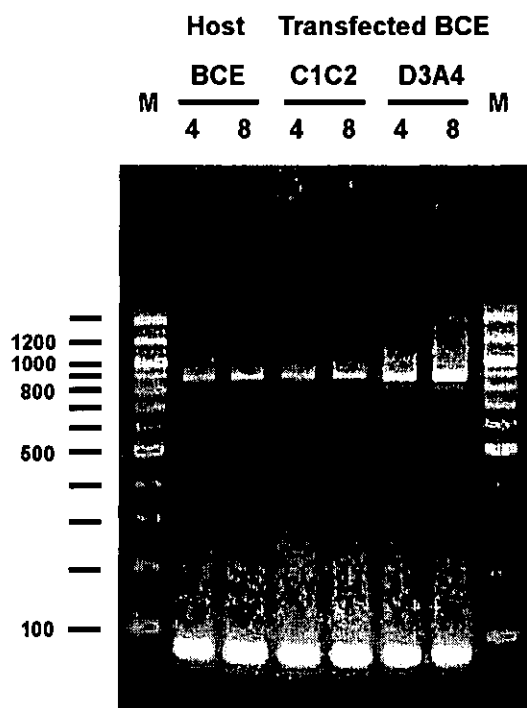


Fig.3 Expression of bovine PrP mRNA in host BCE cells and transfected BCE cell lines.

Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified using primers for bovine PrP cDNA from total RNA extracted from the cells.

Cells: BCE, untransfected BCE C/D-1b cells; Transfected BCE, C1C2 (TF-C series) and D3A4 (TF-D series).

Templates for PCR: cDNAs obtained from cells cultured for 4 and 8 days. Numbers 4 and 8 mean culture days.

M: 100bp DNA ladder. 1517, 1200, and 1000 to 100.

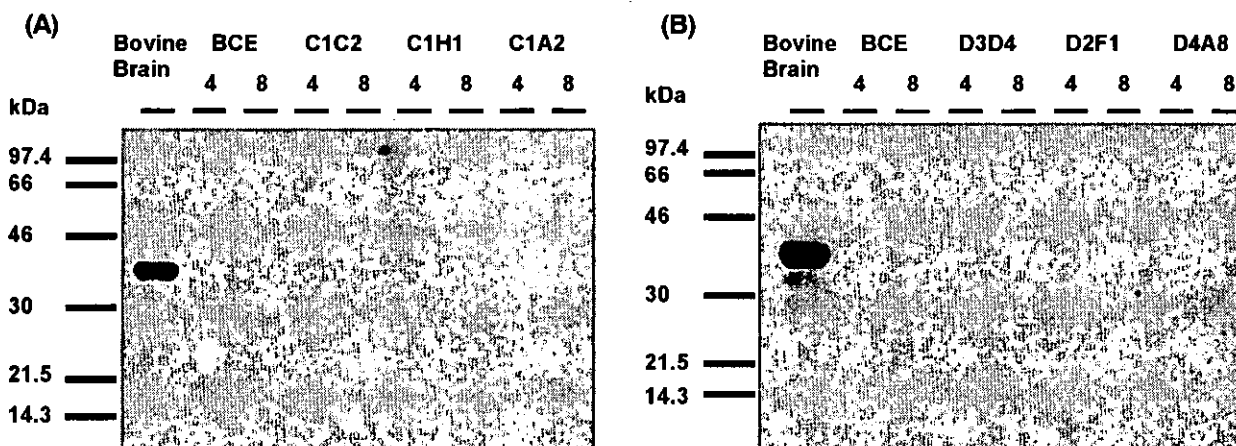


Fig.4 Expression of bovine PrP in host BCE cells and transfected BCE cell lines cultured for 4 and 8 days.

Immunoblotting of whole cell lysates from the cell lines, TF-C series (A) and TF-D series (B).

Cells: BCE, untransfected BCE C/D-1b cells; Transfected BCE, C1C2, C1H1 and C1A2 (TF-C series) and D3A4, D2F1 and D4A8 (TF-D series). Numbers 4 and 8 mean culture days.

Bovine Brain: 10,000 × g precipitation fraction from bovine brain cortex homogenate (P2 fraction).

Anti-PrP antibody: BSPX-54.

## 研究要旨

異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の易伝達性細胞によるインビトロ高感度検出法の開発を目的とし、長期間の培養により蛋白質分解酵素proteinase K処理抵抗性プリオン蛋白質(PrP<sup>Res</sup>)を産生するヒトグリオブラストーマ細胞株T98Gの特異性を解析した。

プリオン蛋白質(PrP)のT98G細胞内分布を調べるため、抗PrPモノクローナル抗体6H4を用いた間接蛍光抗体法およびイムノプロット法を行った。長期間の培養によりT98G細胞がPrP<sup>Res</sup>を産生する条件下ではPrPは細胞膜上に存在し、細胞質画分では検出されなかった。また、T98G細胞が産生するPrP<sup>Res</sup>は非イオン性界面活性剤に可溶性であった。PrP<sup>Sc</sup>は細胞質画分に存在して非イオン性界面活性剤に不溶とされているが、T98G細胞が産生するPrP<sup>Res</sup>は異なった特異性を示した。

正常PrPからPrP<sup>Res</sup>への変化は細胞内にPrP<sup>Sc</sup>が蓄積していく過程で重要なことから、T98G細胞のPrP<sup>Res</sup>様式の研究は、PrP<sup>Sc</sup>易伝達性細胞の樹立に寄与すると考えられる。

## A. 研究目的

医薬品、医療用具及び食品等の安全性を確保するため、伝達性海綿状脳症の原因物質である異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の簡便・迅速な検出法の開発が望まれている。

本研究ではPrP<sup>Sc</sup>の易伝達性細胞によるインビトロ高感度検出法の開発を目的とし、長期間の培養により蛋白質分解酵素proteinase K (PK)処理抵抗性プリオン蛋白質(PrP<sup>Res</sup>)を産生するヒトグリオブラストーマ細胞株T98Gの特異性を解析した。

## B. 研究方法

### 1. 間接蛍光抗体法

カバーガラス上に培養したT98G細胞をホルマリンで固定後、第1抗体と第2抗体にそれぞれ抗PrPモノクローナル抗体6H4及びAlexa 594-ヤギ抗マウスIgG抗体を用いた間接蛍光抗体法を行い、PrPの細胞内分布を調べた。

### 2. 細胞分画法

T98G細胞を培養後に破碎して細胞懸濁液を調製し、遠心分離後(100,000 × g, 4°C, 60分間)に上清として細胞質画分を、沈殿物として膜画分を得た。

### 3. イムノプロット法

試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体と第2抗体にそれぞれ6H4及びHRP-ヤギ抗マウスIgG抗体を用いたイムノプロット法を行い、化学発光法でPrPを検出した。

### 4. 蛋白質分解酵素消化

試料をPKで消化し(10 µg/ml, 37°C, 30分間)、イムノプロット法を行い、PrPの蛋白質分解酵素抵抗性を調べた。

## C. 研究結果

### 1. PrPのT98G細胞内分布

T98G細胞をPrP<sup>Sc</sup>の易伝達性細胞として用いる事を目的とし、その特異性を調べた。細胞を40回の継代後に播種し、40日後に間接蛍光抗体法を行うと、PrPは細胞膜状に分布し、細胞質及び核内には認められなかった(Fig. 1)。

同様に培養したT98G細胞を破碎し、得られた細胞懸濁液から膜画分と細胞質画分を調製してイムノプロット法を行った。細胞を40回の継

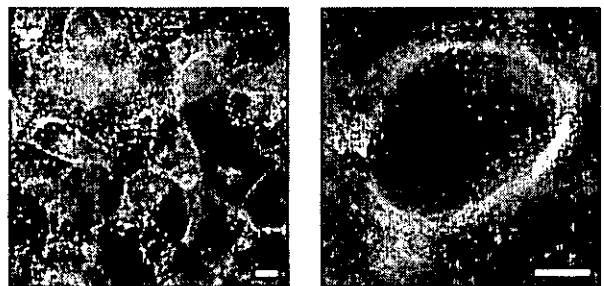


Fig. 1. Subcellular localization of PrP in long-term cultured T98G cells. T98G cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 for 40 days after 40 passages. T98G cells on a 15-mm glass coverslip were subjected to indirect immunofluorescence staining with the 6H4 antibody. Scale bars, 10 µm.

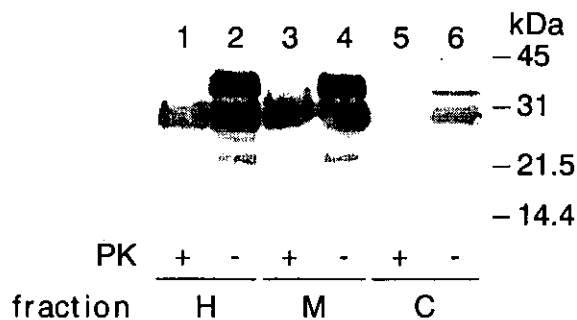


Fig. 2. Subcellular localization of PrP<sup>res</sup> in long-term cultured T98G cells. T98G cells were incubated with 10% FCS-RPMI 1640 for 40 days after 40 passages T98G cells were scraped into PBS-2.5 mM EDTA and sonicated. Homogenates (H) were centrifuged at 100,000 × g for 60 min at 4°C to obtain a membrane fraction (M) and a cytosolic fraction (C). Methanol precipitated lysates (50 μg protein) were treated with PK at 10 μg ml<sup>-1</sup> at 37°C for 30 min (lanes 1, 3, and 5) or left undigested (lanes 2, 4, and 6). The PK-treated samples were boiled for 10 min and subjected to immunoblotting with the 6H4 antibody.



Fig. 3. Detergent solubility of PrP<sup>res</sup> in long-term cultured T98G cells. T98G cells were scraped into PBS-2.5 mM EDTA and sonicated. Homogenates (H) of 50 μg protein were dissolved in 9 volumes of 0.5% NP-40-0.5% deoxycholate-PBS and centrifuged at 100,000 × g for 60 min at 4 °C to obtain a nonionic detergents-insoluble pellet and a soluble supernatant fraction. The pellet fraction (P) and the methanol-precipitated supernatant fraction (S) were resuspended in the same volume of lysis buffer. Homogenates (lane 1), pellet fraction (lane 2), and supernatant fraction (lane 3) (50 μg protein each) were subjected to immunoblot with the 6H4 antibody.

代後に播種して40日後に得た細胞懸濁液には6H4が認識するPrPが存在し、PK処理に抵抗性な31 kDaのバンドを示した(Fig. 2., lane 1-2)。これらのPrPは膜画分に回収され、細胞懸濁液と同様なPK処理に抵抗性な31 kDaのバンドを示したが(Fig. 2., lane 3-4)、細胞質画分にはPrP<sup>res</sup>が認められなかった(Fig. 2, lane 5-6)。

## 2. PrP<sup>res</sup>の非イオン性界面活性剤に対する溶解性

次に、T98G細胞が産生するPrPの非イオン性界面活性剤に対する溶解性を調べた。40回の継代後に播種して40日後にT98G細胞を破碎し、非イオン性界面活性剤に溶解後に遠心分離し、得られた上清と沈殿物のイムノブロット法を行った。細胞懸濁液(Fig. 3, lane 1)と同様に、非イオン性界面活性剤可溶画分には6H4が認識するPrPが存在するが(Fig. 3, lane 3)、不溶性画分ではPrPが検出されなかった(Fig. 3, lane 2)。

## D. 考察

医薬品、医療用具及び食品等のPrP<sup>Sc</sup>の汚染を防ぐために、高感度なPrPの検出法を確立する必要がある。現在、国内の屠畜場では全ての牛を対象とし、延髄の門部位を検体としてプラテリアBSEキットを用いたスクリーニング検査を行っている。陽性になった検体は、イムノブロット法、免疫組織化学検査及び病理組織検査の結果を基に確定診断を行っている。しかし、現状では生検等を含めた有効な診断法はなく、プリオン病の生前診断法の開発が望まれている。

本研究はPrP<sup>Sc</sup>の易感染性細胞を利用したインビトロ高感度検出法の開発を目的とし、併せてPrP<sup>Sc</sup>の産生機構の解明を行ってきた。先に、ヒトグリオーマ細胞株T98GはPrPを産生し<sup>1)</sup>、長期間培養するとPK処理抵抗性のPrP<sup>res</sup>を産生することを報告した<sup>2)</sup>。そこで、本年度はT98G細胞が産生するPrP<sup>res</sup>の特異性の検討を行った。

PrP<sup>C</sup>はGPIアンカー型蛋白質として細胞膜上に存在し、ヒツジのスクレイピー型PrP<sup>Sc</sup>が持続的に感染したマウスニューロblastoma細胞ScN2a等では主に細胞質のリソソーム等に分布するが<sup>3)</sup>、一部は細胞膜上にも局在している事が報告されている<sup>4, 5)</sup>。長期間培養したT98G細胞が産生するPrP<sup>res</sup>は細胞膜上に存在し、細胞質画分では検出されなかった。また、PrP<sup>Sc</sup>は非イオン性界面活性剤に不溶性だが、T98G細胞が産生するPrP<sup>res</sup>は可溶性で、PrP<sup>Sc</sup>とは異なった特異性を示した。一方、家族性プリオン病に由来する一次構造に変異を有するPrP<sup>res</sup>には、T98G細胞が産生するPrP<sup>res</sup>と同様に非イオン性界面活性剤に可溶なものの報告がある<sup>6)</sup>。本研

究でも、全てのPr<sup>Pres</sup>が不溶性ではない事が示唆された。

以上のように、T98G細胞が産生するPr<sup>Pres</sup>は、Pr<sup>PSc</sup>とは若干異なる特異性を示した。これら特異性の差に関する研究を続ける事により、プリオン病の生前診断に繋がる新たな生化学的な知見の収得が期待される。また、今後の課題として散発性ヒトプリオン病由来のPr<sup>PSc</sup>をT98G細胞に感染実験等を行い、易伝達性細胞として利用の可否を調べる必要がある。

#### E. 結論

平成15年度は、Pr<sup>Pres</sup>を産生する条件下でT98G細胞を培養し、PrPの細胞内分布を調べた。正常PrPからPr<sup>Pres</sup>への変化は細胞内にPr<sup>PSc</sup>が蓄積していく過程で重要なことから、T98G細胞のPr<sup>Pres</sup>産生様式の研究は、Pr<sup>PSc</sup>易伝達性細胞の樹立に寄与すると考えられる

#### F. 参考文献

- 1) Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Takatori, K., Tanimura, A., Tanamoto, K., Sawada, J. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 728-733 (2002)
- 2) 菊池裕、平成14年度厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業H14-BSE-003）分担研究報告書
- 3) Taraboulos, A., Serban, D., Prusiner, S. B. *J Cell Biol* 110, 2117-2132 (1990)
- 4) Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G., Taraboulos, A. *J Biol Chem* 272, 6324-6331 (1997)
- 5) Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A., Prusiner, S. B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14945-14949 (1996)
- 6) Capellari, S., Parchi, P., Russo, C. M., Sanford, J., Sy, M. S., Gambetti, P., Petersen, R. B. *Am J Pathol.* 157, 613-622 (2000)

#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 研究発表

##### 1. 学会発表

1. Kikuchi, Y., Kakeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Sawada, J.: *In vitro* propagation of a sporadic CJD-like form of Pr<sup>Pres</sup> in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. Keystone

Symposia: Molecular Aspects of Transmissible Spongiform

Encephalopathies (Prion Diseases), April, 2003, Breckenridge, Colorado, USA

2. 菊池裕、掛谷知志、高鳥浩介、中村尚登、松田治男、山崎壮、棚元憲一、澤田純一：  
*In vitro* propagation of a sporadic CJD-like form of Pr<sup>Pres</sup> in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. 第76回日本生化学会大会、2003年10月、横浜

##### 2. 論文発表

1. Kikuchi, Y., Kakeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Sawada, J. Propagation of a protease-resistance form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G、投稿中

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

### 分担研究報告書

#### 異常型プリオンタンパク質特異的分子プローブのプリオン感染性に対する影響

分担研究者 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 教授

##### 研究要旨

異常型プリオンタンパク質(PrP<sup>Sc</sup>)と反応する分子プローブとして、これまでにモノクローナル抗体 mAb6H10 および環状ペプチド KPHPYTL(CPP1)を作製した。これらは、免疫生化学的手法では PrP<sup>Sc</sup> と反応するが、プリオンの感染性に及ぼす影響は明らかでない。そこで本研究では、これら PrP<sup>Sc</sup> 分子プローブのプリオン感染化中和活性について検討した。精製 PrP<sup>Sc</sup> と mAb6H10、あるいは他の抗 PrP 抗体と反応させた後に ICR マウスへ脳内接種して潜伏期の変化を調べた結果、mAb6H10 は陰性対象の抗 KLHmAb と比較して、発症までの期間を平均 24 日、病末期までの期間を平均 19 日延長した。潜伏期-感染価標準曲線から、観察された潜伏期の延長は約 95% の感染価の低下に相当した。一方、環状ペプチド KPHPYLT と PrP<sup>Sc</sup> を反応させた場合は、有意な潜伏期の延長が認められなかった。従って mAb6H10 はプリオン中和活性を有するが、環状ペプチド KPHPYLT はプリオン中和活性がないことが明らかとなった。

##### A. 研究目的

異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)がプリオン病の病原体“プリオン”の主要構成要素と考えられている。PrP<sup>Sc</sup> は宿主遺伝子にコードされる正常型プリオン蛋白質(PrP<sup>C</sup>)の構造異性体である。両 PrP は生化学的に区別可能であるが、構造など依然不明な点が多くこのさかれている。PrP<sup>C</sup> と PrP<sup>Sc</sup> を識別可能な分子プローブは、PrP<sup>C</sup> と PrP<sup>Sc</sup> の生物・生化学性状の相違を調べる上で重要な道具となる。

これまでに、我々は PrP<sup>Sc</sup> と反応するが PrP<sup>C</sup> とは反応しない、PrP<sup>Sc</sup> 選択的に反応する分子プローブの作製を行い、モノクローナル抗体の作製により mAb6H10、およびペプチドファージライブラリーのスクリーニングにより環状ペプチド KPHPYTL(CPP1)、の 2 種の PrP<sup>Sc</sup> 特異的分子プローブを樹立した。これらが PrP<sup>Sc</sup> と反応することは、免疫生化学的解析により明らかであるが、これらがプリオンの生物性状である感染性に影響する

かは明らかでない。

そこで、本研究では mAb6H10 あるいは環状ペプチド KPHPYLT を PrP<sup>Sc</sup> と反応後に、プリオンの感染価をマウスのバイオアッセイにより検討した。

##### B. 研究方法

抗 PrP モノクローナル抗体として、mAb6H10、mAb31C6 を使用した。陰性対象モノクローナル抗体として抗 KLHmAb を使用した。ハイブリドーマ無血清高密度培養の培養上清を、硫酸アンモニウムにて濃縮し、ゲル濾過にて IgG 分画を精製した。

スクレイピー帯広株感染 ICR 脳から精製した PrP<sup>Sc</sup>10 $\mu$ g と精製 mAb10 $\mu$ g を 200 $\mu$ l の PBS 中で室温、一時間反応させた後に、混合物 20 $\mu$ l を ICR マウスに脳内接種した。

マウスは感染動物飼育用 BBH アイソラックシステム内で飼育し、スクレイピーの病末期に達した時点で、エーテル麻酔下で殺処分

した。スクレイビー感染の有無は、ウェスタンブロットで、PrP<sup>Sc</sup>を検出することにより確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学動物実験委員会にて承認された実験指針に従って行なった。感染性を含む試料は帯広畜産大学BSL2, 3実験施設にて行なった。

### C. 研究結果

表1に、精製PrP<sup>Sc</sup>を抗PrPmAb31C6、あるいはPrP<sup>Sc</sup>特異抗体mAb6H10と反応後に、ICRマウスの脳内に接種した時の、病末期に至るまでの期間(潜伏期)を示した。陰性対象として、ネコパルボウイルスに対するモノクローナル抗体(P2-168)およびKLHに対するモノクローナル抗体を用いた。mAbP2-168では潜伏期が158±8日、抗KLHmAbでは161±3日、mAb31C6では166±6日であった。mAb31C6処理では陰性対象抗体と比較して潜伏期の有意な延長は認められなかった。一方、mAb6H10処理では潜伏期が180±8日であり、陰性対象の抗KLHmAbと比較して19日の潜伏期の延長が認められた。プリオン感染マウス脳乳剤の段階希釈試料をマウスに接種して得られた感染価-潜伏期の関係から(表2)、19日の潜伏期の延長は、90%以上の感染価の減少を意味することが判る。

図1に、PrP<sup>Sc</sup>単独、およびPrP<sup>Sc</sup>とCCP1を反応後に、バイオアッセイ用のICRマウスに接種した時の潜伏期を示した。高濃度(5mM)のペプチドを作用させた場合でも、有意な潜伏期の延長は観察されなかった。

### D. 考察

これまでの免疫生化学的解析から、mAb6H10やCCP1は、プリオンの構成要素であるPrP<sup>Sc</sup>と反応することが明らかとなっているが、プリオンの感染性に与える影響については不明であった。mAb6H10はプリオン感染性を中和することから、mAb6H10は感染性に関連するPrP<sup>Sc</sup>上のエピトープを認識する可能性が示唆された。

プリオン持続感染培養細胞の培養液中に抗PrP抗体を添加すると、PrP<sup>Sc</sup>の産生が阻

害されることが報告されている。この作用機序は、抗PrP抗体が細胞膜上に発現したPrP<sup>C</sup>と結合して、PrP<sup>C</sup>の代謝経路を変えるためであり、抗体のPrP<sup>Sc</sup>への直接作用ではない。本研究で明らかとなったmAb6H10のプリオン中和活性は、mAb6H10がPrP<sup>Sc</sup>に直接結合した結果である。mAb6H10はPrP<sup>Sc</sup>の生化学性状とプリオン感染性の関連を調べる上で、非常に有用な抗体と考えられる。CCP1はプリオン中和活性を示さなかったが、PrP<sup>Sc</sup>を直接検出する新規診断法などに応用可能であるかもしれない。

### E. 結論

PrP<sup>Sc</sup>と反応する分子プローブとして、これまでにモノクローナル抗体mAb6H10および環状ペプチドKPHPYTL(CPP1)を作製してきた。本研究では、これらPrP<sup>Sc</sup>特異的分子プローブと感染因子プリオンとの反応を解析する目的で、プリオン感染価中和活性能について検討した。精製PrP<sup>Sc</sup>とmAb6H10を反応後にICRマウスへ脳内接種したところ、mAb6H10は陰性対象の抗KLHmAbと比較して、発症までの期間を平均24日、病末期までの期間を平均19日延長した。潜伏期-感染価標準曲線から、観察された潜伏期の延長は約95%の感染価の低下に相当した。一方、環状ペプチドKPHPYLTとPrP<sup>Sc</sup>を反応させた場合は、有意な潜伏期の延長が認められなかった。従ってmAb6H10はプリオン中和活性を有するが、環状ペプチドKPHPYLTはプリオン中和活性がないことが明らかとなった。

### 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およびBSL3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°C30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 (PrP<sup>Sc</sup>) 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: 40-51, 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

表1 抗 PrP 抗体によるプリオン中和活性

モノクローナル抗体	発症(接種後日数)	病末期(接種後日数)
P2-168	145 ± 8	158 ± 8
Anti-KLH	139 ± 2	161 ± 4
31C6	150 ± 6	166 ± 6
6H10	164 ± 4	180 ± 8

表2 プリオン量と潜伏期の関係

脳乳剤濃度(%)	発症マウス/接種マウス	病末期(接種後日数)
1%	10/10	164 ± 6
0.1%	10/10	175 ± 6
0.01%	9/9	189 ± 18
0.001%	10/10	212 ± 12
0.0001%	9/9	244 ± 30
0.00001%	3/6	278 ± 52
0.000001%	0/5	-