

図2 Floatation assay (その1)

Fraction 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

83.0 -

47.5 -

32.5 -

25.0 -

16.5 -

GM1

PrP-LDLR (type 1)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

83.0 -

47.5 -

32.5 -

25.0 -

16.5 -

GM1

PrP-LDLR (type 5)

Fraction 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

83.0 -

47.5 -

32.5 -

25.0 -

16.5 -

GM1

PrP-LAT

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

83.0 -

47.5 -

32.5 -

25.0 -

16.5 -

GM1

PrP-LATdel

図3 Floatation assay (その2)

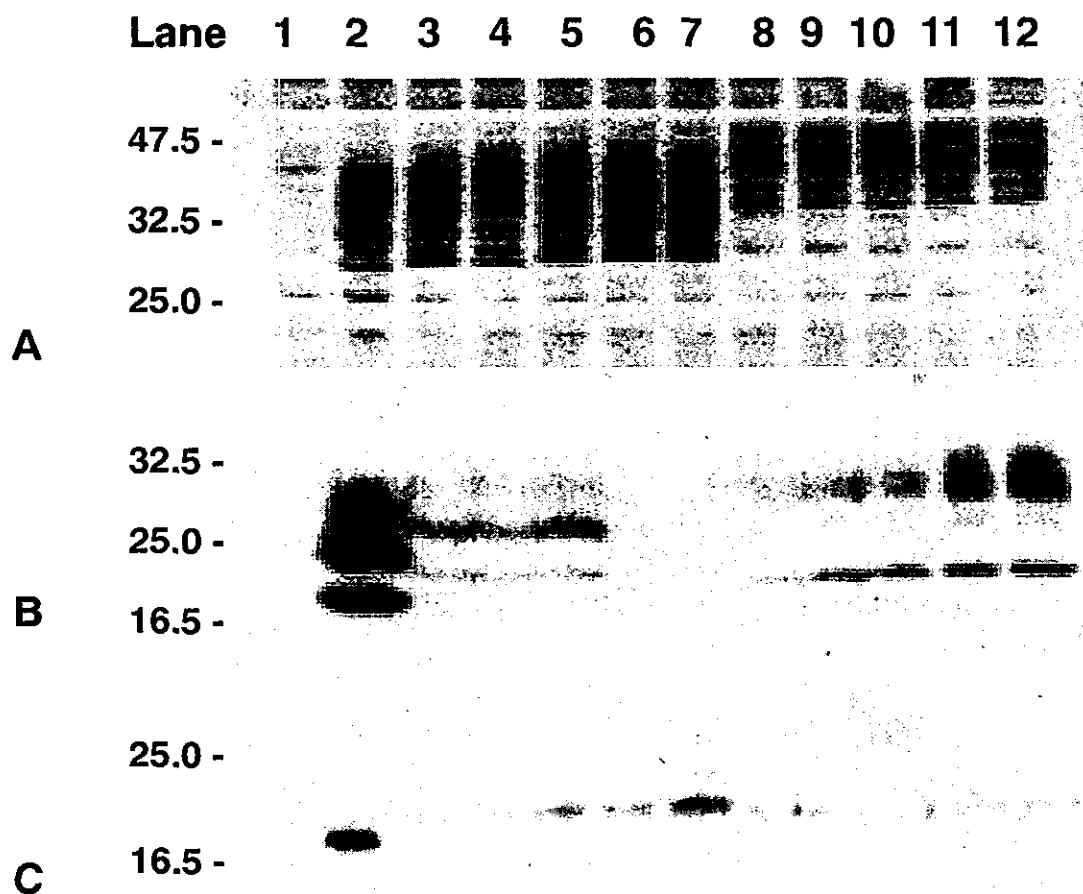


図4 ScN2a 細胞における PrP-HA と PrP-LDLR の発現と異常化

A, total lysate 中の発現蛋白 ; B, PrPSc fraction 中の発現蛋白 ; c, PrPSc fraction を deglycosylation 処理したサンプル中の発現蛋白。以下の lane の説明は A、B、C に共通。

Lane 1, vector; lane 2, PrP; lane 3, PrP-HA type 1; lane 4, PrP-HA type 2; lane 5, PrP-HA type 3; lane 6, PrP-HA type 4; lane 7, PrP-HA type 5; lane 8, PrP-LDLR type 1; lane 9, PrP-LDLR type 2; lane 10, PrP-LDLR type 3; lane 11, PrP-LDLR type 4; lane 12, PrP-LDLR type 5.

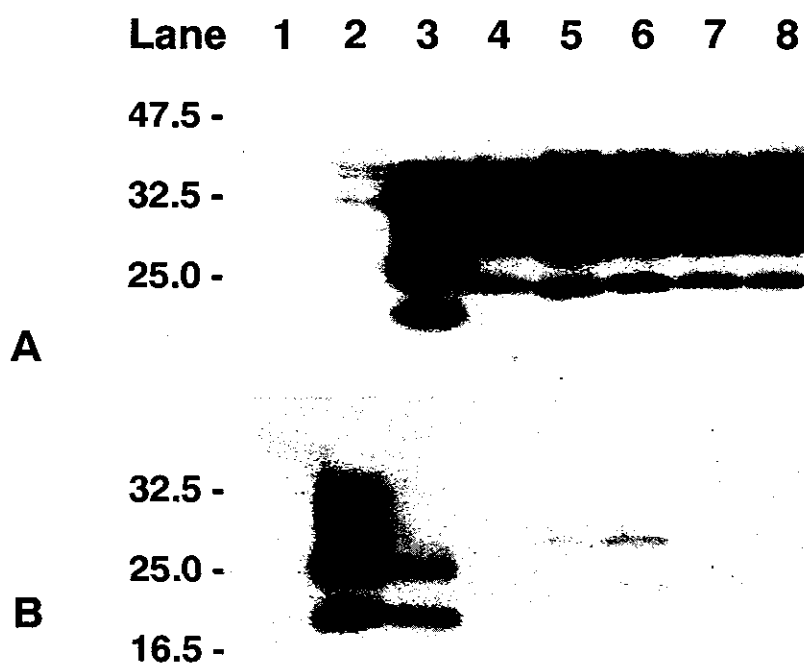


図5 ScN2a 細胞における PrPdel-HA の発現と異常化

A, total lysate 中の発現蛋白 ; B, PrPSc fraction 中の発現蛋白。以下の lane の説明は A、B に共通。Lane 1, vector; lane 2, PrP; lane 3, PrP-HA type 2; lane 4, PrPdel-HA type 1; lane 5, PrPdel-HA type 2; lane 6, PrPdel-HA type 3; lane 7, PrPdel-HA type 4; lane 8, PrPdel-HA type 5.

## ヒト型異常プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体作製(続報)

班 長:水澤英洋(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態学)

研究協力員:田中智之(堺市衛生研究所)

研究協力員: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)

研究協力員:北本哲之(東北大学大学院医学系研究科病態神経学分野)

### [研究要旨]

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。凍結切片による免疫染色、Western blotting によるスクリーニングの結果、#4KT34, #5KT55 の 2 抗体が、可能性のある抗体として作製され、腹水化された。IgG サブクラスはいずれも IgG1 であった。免疫染色陽性、Western blotting 陰性のクローンも併せて作製された。これらの抗体について、エピトープの解析が進行中である。

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

Tomoyuki TANAKA<sup>1)</sup>, Noritoshi KITAMOTO<sup>2)</sup>, Shirou MOHRI<sup>3)</sup> and Tetsuyuki KITAMOTO<sup>4)</sup>

Sakai City Institute of Public Health<sup>1)</sup>, Department of Humanities and Environmental Policy and Technology, Himeji Institute of Technology<sup>2)</sup>, Laboratory of Biomedicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University<sup>3)</sup> and Department of Neurological Science, Tohoku University Graduate School of Medicine<sup>4)</sup>

### ABSTRACT

Establishment of monoclonal antibodies which have specific reaction with human abnormal prion protein(PrP<sup>sc</sup>) was performed previously reported and total fourteen clones were obtained. Among them two clones, #4KT34 and #5KT55 showed positive reactions both with immunohistological staining and western-blotting. Other 12 clones were positive with immunohistological staining but not with western-blotting.

An epitope mapping of these antibodies have to analyze, however, antibodies have the possibility which recognize the human abnormal prion proteins.

### [はじめに]

ヒト型プリオン蛋白(Hu-PrP)に対するモノクローナル抗体はプリオン病の病因解析には不可欠である。これまで大腸菌発現による Hu-PrP を用いていくつかのモノクローナル抗体を作製してきた。これらの中には MAb#41 は、Hu-PrP の fragmentation の意義を解析して行く上に重要な抗体である事も分かった。

昨年度は、本研究班の研究目的としてヒト型異常型プリオン蛋白(Hu-PrP<sup>sc</sup>)を認識する抗体作製を試みた。今回、作製されたいくつかの抗体について Hu-PrP<sup>sc</sup> を特異的に認識している可能性について検討した。

### [目的]

ヒト型異常型プリオン蛋白を免疫源として作製されたモノクローナル抗体の性状について検討する。もし、これらの抗体が Hu-PrP<sup>sc</sup> を特異的に認識する抗体であれば、今後、プリオン病の病因究明および体外

診断系の構築を試みる。

#### 〔材料と方法〕

モノクローナル抗体作製は平成 15 年度研究報告書に報告している。概略すれば、孤発性 CJD 患者の剖検脳を detergent 処理後、不溶性分画をプロテアーゼ処理したものを PrP<sup>Sc</sup> 免疫原として PrP 遺伝子欠損マウス(Mo PrP<sup>0/0</sup>)に免疫し、定法に従って、P3 ミエローマ細胞と細胞融合した。スクリーニングは、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 ]のヒト小脳組織および大脳灰白質の凍結切片をセットとして免疫染色を行った。陽性細胞は、サブクローニングの後、腹腔内投与し腹水を得た。

ウェスタン・ブロッティング(WB)によるモノクローナル抗体の解析は、定法に従って行った。すなわち、上記の免疫源材料を 20ug/ml PK 処理後電気泳動し、1,500 あるいは 1:1,000 希釈の腹水と反応させた。二次抗体として HRPO-anti-Mouse IgG 抗体にて反応後、ECL キットによる処理、フィルムに感光し現像した。

パラフィン切片による免疫組織化学染色には、種々の濃度の塩酸処理と共に、北本らの報告に準じて行った。

#### 〔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〕

サブクローンを含めた 14 種の腹水を得た。これらの中で、2 種類の抗体、#4KT34, #5KT55 が WB で反応生成物が認められた。2 抗体のサブタイプはいずれも IgG1 であった。WB では、三本の反応シグナルが認められ、#4KT34, #5KT55 抗体は、コントロールに用いた市販の 3F4 抗体と類似のシグナルが認められた(図 1)。その他の抗体では、#1391 抗体に、一本の反応シグナルが認められたが非特異的反応と考えられた。残りの 11 検体には、シグナルは認められなかった。

一方、免疫染色では、#4KT34, #5KT55 と 3F4 にはいずれも類似した染色性を示したが、微妙に染色性の差が認められた(図 2)。#1391 抗体の染色性はほとんど認められなかった。

#### 〔考察〕

異常型プリオン蛋白に対する特異的な抗体はヒトプリオン病の病理学的解析には重要である。解析手段の一つとしてヒト型異常プリオン蛋白を免疫源としてモノクローナル抗体の作製を試みた。2 種類が WB にて反応シグナルが認められ、残りの 12 種のモノクローナル抗体には認められなかった。免疫染色がいずれも陽性クローンとしてスクリーニングを行ってきたが、この差異については、さらに詳しい解析が必要である。とくに#1391 抗体は、凍結切片では糸くず状の染色性を認めたが、WB では非特異的反応と考えられる反応生成物で、また、パラフィン切片での染色性も極めて低かった。この抗体を含めて 12 種類の抗体については、アフィニティカラムなどを用いたさらなる解析が必要と考える。

2 種類の抗体については、今後、エピトープの解析がなさなければならない。

これらの抗体がヒト型異常プリオン蛋白を認識していれば、これまで確立されたいくつかのクローンと共に、中枢神経系組織の免疫染色のみならず体液中に存在する異常プリオン蛋白との反応性の有無について体外診断系の構築が可能と考えられる。

#### 〔結論〕

ヒト異常型プリオン蛋白に対して反応性のあるモノクローナル抗体が 2 種類作製された。今後エピトープの解析と共に更なる解析が必要である。

#### 〔参考文献〕

- 1) Curine SV, Bresjanac M, Popovic M, Pretnar HK, Galvani RR, Cernilec M, Vranac T, Hafner I, Jerala R.: Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain. *J Biol.Chem.* 279(5):3694-3698, 2004
- 2) Feraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert YF, Creminon C, Vilette D, Lehmann S, Grassi J. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPsc replication in infected cells. *J.Biol.Chem.*23:2004
- 2) Liu WG, Brown DA, Fraser JR.: Immunohistochemical comparison of anti-prion protein(PrP) antibodies in the CNS mice infected with scrapie. *J Histochem Cytochem.* 51(8): 1065-1071, 2003
- 3) White AR, Enever P, Tayebi M, Mushens R, Linehan J, Brandner S, Anstee D, Collinge J, Hawke S. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature.* 422(6927):80-83, 2003
- 4) Bellon A, Seyfert-Brandt W, Lang W, Baron H, Groner A, Vey M: Improved conformation-dependent immunoassay:suitability of human prion detection with enhanced sensitivity. 84, 1921-1925, 2003

{研究発表}

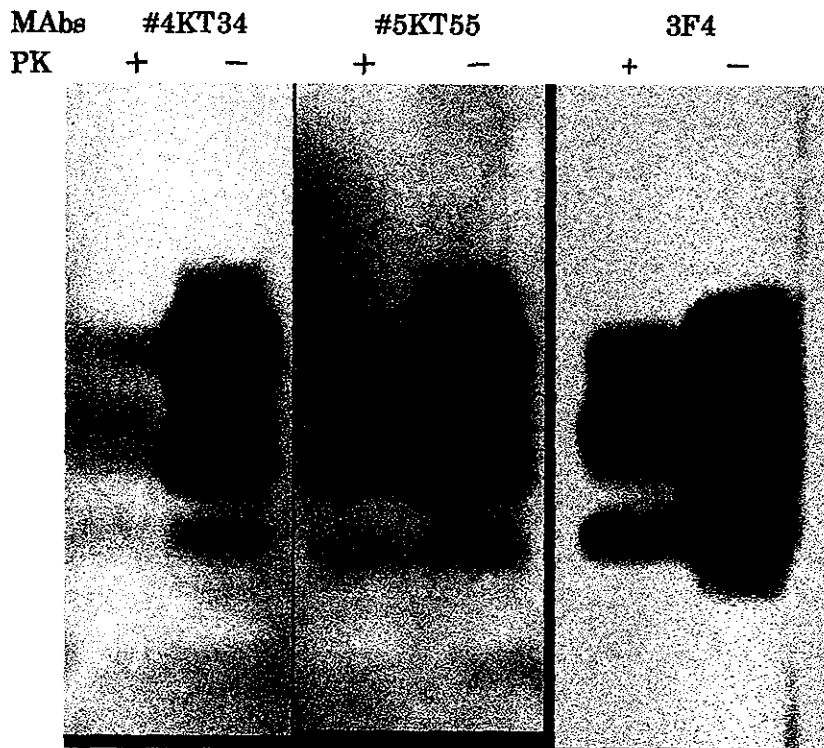
なし

{知的所有権の取得状況}

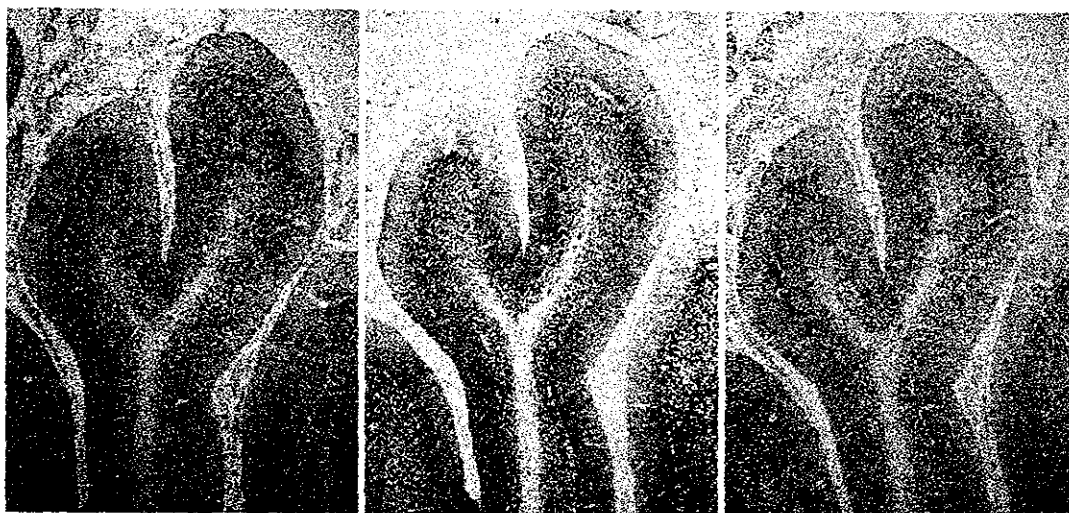
なし

研究成果一覧

なし

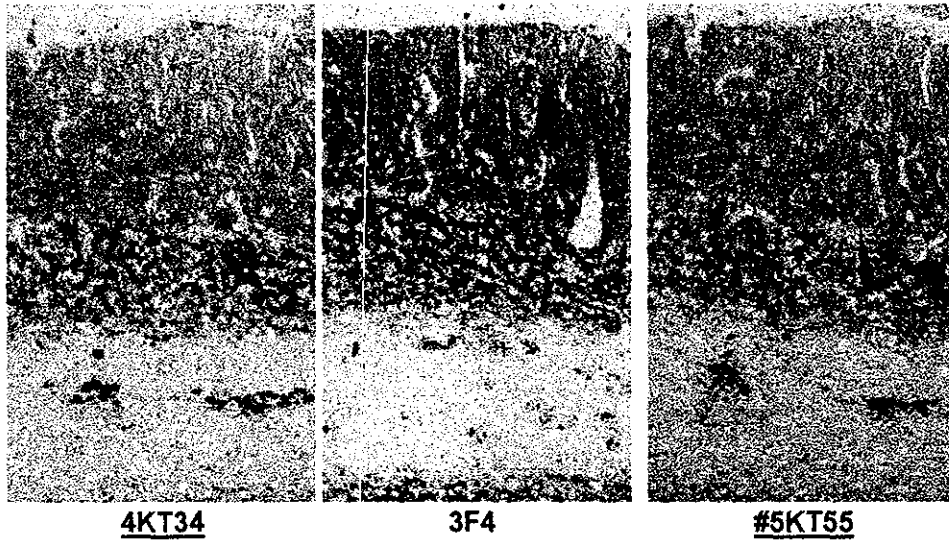


**Fig. 1** Westerning blotting with MAbs and PrPsc with or w/- PK



**Fig. 2** Immunostaining with paraffin section and #4KT34(left), 3F4(middle) and #5KT55(right) monoclonal antibodies





**Fig. 3 Immunostaining with paraffin section and #4KT34, 3F4 and #5KT55 monoclonal antibodies**

## プリオン蛋白はN-末領域で宿主蛋白と結合する

班 員：坂口 末廣（長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態）

研究協力者：尹 載宇（長崎大学・大学院医歯薬・感染分子病態）

### 【研究要旨】

プリオン蛋白結合分子を同定するために、まず alkaline phosphatase (AP)-tag を有する PrP 融合蛋白(AP-PrP)を作製し、神経細胞、繊維芽細胞、上皮細胞などの様々な培養細胞と反応させた。その結果、全ての細胞で強い AP 染色が観察された。この結果は、PrP との結合分子が様々な細胞で発現していることを示した。次に、PrP のどの領域がこの結合に関与しているのかを検討するために、PrP の様々な領域を欠損する融合蛋白を作製し同様な実験を行った。その結果、大変興味深いことに、細胞は球状の高次構造をとる C 末領域との融合蛋白では染色されず、特異的な構造を有しない N 末領域との融合蛋白にて染色された。また、N 末領域に存在するオクタペプチド・リピートを除いたアミノ酸残基 23-50 と 90-120 の二つの領域が結合に必要であることも分かった。

Identification of binding sites in prion protein with a yet identified host molecule

Suehiro SAKAGUCHI and Jaewoo YOON

Department of Molecular Microbiology and Immunology  
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

### ABSTRACT

We screened cultured cell lines, including those of neuronal, fibroblastic, and epithelial cells, for the presence of molecules binding to prion protein (PrP) using alkaline phosphatase-tagged prion protein (AP-PrP). AP itself did not stain these cells. However, PrP23-231 fused with AP positively stained these cells, with especially strong staining detectable in the peri-nuclear region. Similar staining was also observed with AP-PrP23-120 but not with AP-PrP121-231, suggesting that the binding sites in PrP were present in the N-terminal region. AP-PrP23-120 lacking the residues 51-90 corresponding to the octapeptide repeat region could still bind to these cells. However, both AP-PrP23-90 and AP-PrP51-120 showed no AP staining. These results suggest that both flanking domains of the octapeptide repeat are important for PrP to bind to a yet identified host molecule.

### 【はじめに】

正常型プリオン蛋白 (PrP<sup>C</sup>) は、プリオン病の病原体“プリオン”の複製やプリオン病の病態形成に深く関与する宿主蛋白である。当研究室をはじめ他の研究室でも PrP 遺伝子欠損マウスが作製され、PrP<sup>C</sup> の正常機能の解明が行われてきた。その結果、これらのマウスは神経細胞死、記憶障害、睡眠障害、脱髄といった異常を呈し<sup>1-4)</sup>、PrP<sup>C</sup> が神経細胞の生存維持や脳の高次機能に深く関与していることが明らかとなった。また大変興味深いことに、これらの異常はプリオン病の病態と非常に類似しており、PrP<sup>C</sup> の機能消失がプリオン病の病態に関与していることも強く示唆された。しかし、PrP<sup>C</sup> の分子レベルにおける正常機能は十分に解明されていない。そこで、我々は、PrP<sup>C</sup> の分子レベルにおける正常機能を解明するために、PrP<sup>C</sup> との会合分子の同定を試みることにした。まず我々は、alkaline phosphatase (AP) と PrP の融

合蛋白 (AP-PrP) を培養細胞に発現させ、これをプローブとして PrP 結合蛋白を検索することにした。本年度の班会議では、これまでに得られた結果について報告する。

#### 【目的】

PrP<sup>C</sup>の分子レベルにおける正常機能を解明するために会合分子の同定を行う。

#### 【材料と方法】

##### (1) AP-PrP 発現コンストラクトの作製

マウス PrP のアミノ酸残基 23-231、23-120、オクタペプチドリ・ピート (OR) を欠失する 23-120、23-90、50-120、121-231 をコードする cDNA を、polymerase chain reaction にて増幅し pAPtag-5 ベクター (GenHunter Co.) に挿入した。

##### (2) AP-PrP の発現

それぞれの AP-PrP コンストラクトを 293T 培養細胞にトランスフェクションし、3 日後に AP-PrP を含む上清を回収した。

##### (3) AP-PrP binding assay

培養細胞を TBS (20 mM Tris-HCl, 138 mM NaCl, pH 7.6) にて洗浄した後、4.5% フォルマリンにて固定し、0.1% TritonX-100 を含む HBAH (Hank's Balanced Salt Solution, 0.5 mg/ml BSA, 20 mM HEPES, pH 7.0) にて 15 分間透過処理した。このように処理した細胞に AP-PrP を含む上清を 90 分間反応させ、その後 HBAH にてよく洗浄した。この反応のあと、65% アセトン-8% フォルマリンにて 15 秒間さらに固定した。内因性の AP 活性は、65°C、100 分間の処理にて失活させた。最後に、AP の基質である BCIP/NBT を加えて染色した。

#### (倫理面への配慮)

今回行った実験には動物実験は含まれていない。

#### 【結果と考察】

今回実験に用いた AP-PrP 融合蛋白のコンストラクトを図 1 に示す。pAPtag-5 ベクターは、AP の上流にシグナルペプチド (SP) が挿入されているため、リコンビナントの融合蛋白は培養上清中に分泌される。実際、これらのコンストラクトを 293T 細胞に導入した結果、それぞれの融合蛋白が培養上清中に認められた (図 2)。

次に、これらの融合蛋白を神経細胞、繊維芽細胞、上皮細胞などの様々な培養細胞と反応させ AP の基質を加えて染色した結果、全ての細胞で強い染色が観察された (図 3)。この結果は、PrP<sup>C</sup> との結合分子が様々な細胞で発現していることを示した。また、この特異的な染色は核周囲に強く認められ、小胞体に PrP<sup>C</sup> との結合蛋白が発現していることが示唆された。

さらに、PrP<sup>C</sup> のどの領域がこの結合に関与しているのかを検討するために、AP-PrP23-120、AP-PrP23-120 ΔOR、AP-PrP23-90、AP-PrP51-120、及び AP-PrP121-231 を同様に反応させた。その結果、大変興味深いことに、球状の高次構造をとる C 末領域との融合蛋白 AP-PrP121-231 では染色されず、特異的な構造を有しない N 末領域との融合蛋白 AP-PrP23-120 にて染色された。さらに、PrP にのみ存在する N 末領域の OR を欠損する AP-PrP23-120 ΔOR でも同様な染色が観察された。しかし、AP-PrP23-90 と AP-PrP50-120 では、反応が認められなかった。つまりこれらの結果は、PrP<sup>C</sup> の結合領域は N 末に存在し、OR を除いた 23-50 と 90-120 の二つの領域が結合に必要であることを示した。

N 末領域に結合する分子として、heparan sulfate<sup>5)</sup>、stress-inducible protein 1<sup>6)</sup>、neuronal cell adhesion molecule<sup>7)</sup> が報告されている。しかし、これらの分子の結合部位は今回我々が同定した部位と異なり、新規の PrP 結合分子の存在を強く示唆した。

## 【結論】

PrP<sup>C</sup>のORを除いたN末領域に結合する新規宿主分子の存在の可能性を示した。

## 【参考文献】

- 1) Sakaguchi S., Katamine S., Nishida N., Moriuchi R., Shigematsu K., Sugimoto T., Nakatani A., Kataoka Y., Houtani T., Shirabe S., Okada H., Hasegawa S., Miyamoto T., Noda T.: Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted *PrP* gene. *Nature*. 380: 528-531, 1996
- 2) Collinge J., Whittington MA., Sidle KC., Smith CJ., Palmer MS., Clark AR., Jefferys JG.: Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*. 370: 295-297, 1994
- 3) Tobler I., Gaus SE., Deboer T., Achermann P., Fischer M., Rulicke T., Moser M., Oesch B., McBride PA., Manson JC.: Altered circadian rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*. 380: 639-642, 1996
- 4) Nishida N., Tremblay P., Sugimoto T., Shigematsu K., Shirabe S., Petromilli C., Erpel SP., Nakaoka R., Atarashi R., Houtani T., Torchia M., Sakaguchi S., DeArmond SJ., Prusiner SB., Katamine S.: A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from Purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest*. 79: 689-697, 1999
- 5) Warner RG., Hundt C., Weiss S., Turnbull JE.: Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem*. 277: 18421-18430, 2002
- 6) Hundt C., Peyrin JM., Haik S., Gauczynski S., Leucht C., Rieger R., Riley ML., Deslys JP., Dormont D., Lasmezas CI., Weiss S.: Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J*. 20: 5876-5886, 2001
- 7) Zanata SM., Lopes MH., Mercadante AF., Hajj GN., Chiarini LB., Nomizo R., Freitas AR., Cabral AL., Lee KS., Juliano MA., Oliveira Ed., Jachieri SG., Burlingame A., Huang L., Linden R., Brentani RR., Martins VR.: Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J*. 21: 3307-3316, 2002

## 【研究発表】

### 1.論文発表

- 1) Atarashi R., Sakaguchi S., Shigematsu K., Katamine S.: The absence of prion-like infectivity in mice expressing prion protein-like protein. *EXCLI J*. 3: 82-90, 2004
- 2) Sakaguchi S.: Antagonistic roles of prion protein and prion protein-like protein in neurodegeneration. *Recent Res Devel Exp Med*. 1: 47-61, 2004
- 3) Nishimura T., Sakudo A., Nakamura I., Lee DC., Taniuchi Y., Saeki K., Matsumoto Y., Ogawa M., Sakaguchi S., Itohara S., Onodera T.: Cellular prion protein regulates intracellular hydrogen peroxide level and prevents copper-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 323: 218-222, 2004
- 4) Yamaguchi N., Sakaguchi S., Shigematsu K., Okimura N., Katamine S.: Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 319: 1247-1252, 2004

### 2.学会発表

- 1) 山中仁木, 石橋大輔, 辻孝雄, 坂口末廣: 大腸菌易熱性下痢毒素サブユニット B 融合プリオンタンパク (PrP) の抗 PrP IgG および IgA 誘導能の検討. 第 34 回 日本免疫学会学術集会 (札幌) 2004
- 2) 石橋大輔, 山中仁木, 片峰茂, 坂口末廣: マウスにおける異種プリオン蛋白の抗原性の検討. 第 52 回 日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2004

- 3) 尹載宇、坂口末廣、山口尚宏、片峰茂：血清除去による N2a 細胞の神経突起形成の分子機構の解明. 第 27 回 日本分子生物学学会 (神戸) 2004
- 4) Yamanaka H., Ishibashi D., Tsuji T., Sakaguchi S.: Mucosa immuneogenicity of prion protein fused with heat-labile enterotoxin B subunit. International Symposium, Prion Diseases, Food and drug safety, Sendai, Japan, 2004
- 5) Hashiguchi S., Yamamoto M., Kitamoto S., Nakashima T., Yamanaka H., Ishibashi D., Sakaguchi S., Katamine S., Ito Y., Sugimura K.: Prion-conformation-specific human antibodies established from phage display library. International Symposium, Prion Diseases, Food and drug safety, Sendai, Japan, 2004

[知的所有権の取得状況]

特になし

図1. AP-PrPの蛋白構造

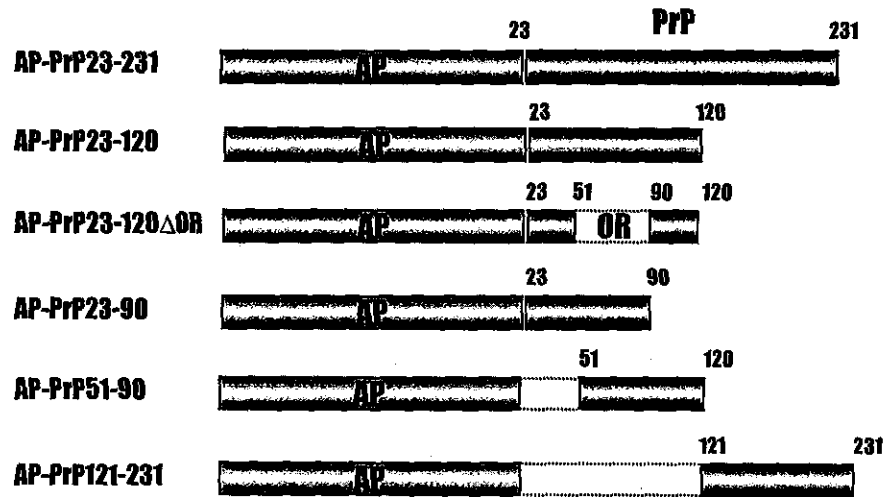
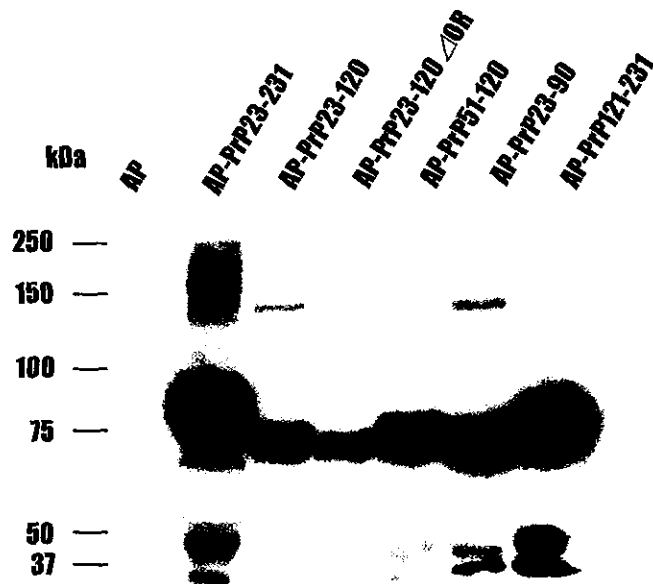
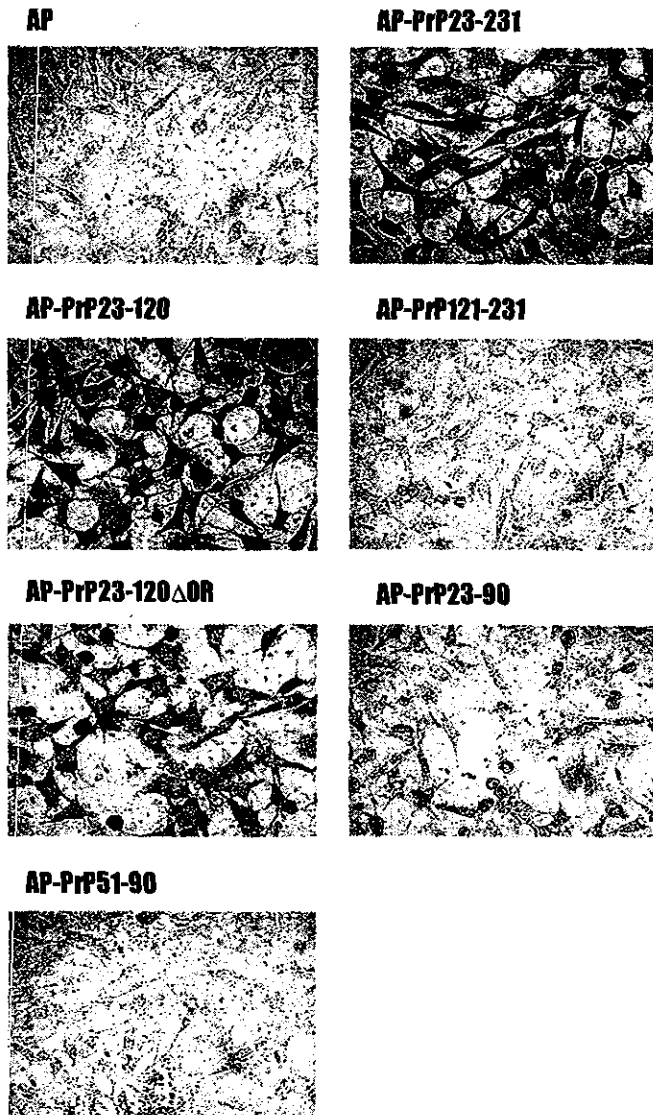


図2. AP-PrPの発現



AP-PrPコンストラクトを導入した293T細胞の培養上清を、抗PrP抗体にてウェスタンブロッティングを行った。

図3. AP-PrPの結合



PrP欠損マウス海馬神経細胞（東京大学、小野寺教授より分与）とそれぞれのAP-PrP融合蛋白を反応させ染色した。

## 末梢組織生検によるプリオン病生前早期診断の試み

班 員：古川 ひさ子（長崎大学・大学院医・神経感覚薬理学）

研究協力者：片峰 茂（長崎大学・大学院医・感染分子解析学）

研究協力者：横山 隆（独立行政法人 動物衛生研究所・プリオン病研究センター）

研究協力者：丹羽 正美（長崎大学・大学院医・神経感覚薬理学）

### [研究要旨]

プリオン病確定診断には異常型プリオン蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)の存在を証明することが必須であるが、非侵襲的にこれを証明する方法はいまだ確立されていない。我々は、神経組織を含み中枢神経に連絡する生検可能な器官として鋤鼻(じょび)器官に着目した。

鋤鼻器官 vomeronasal organ (VNO) は爬虫類をはじめとして広く哺乳類にもみられ、フェロモン受容器官として機能すると考えられている。解剖学的に VNO は鼻中隔前方に存在する管腔状の構造物で、内腔を覆う神経感覚上皮から発した鋤鼻神経は副嗅球でシナプスを形成した後に扁桃体に至る。しかしながらヒトをはじめとした primate では VNO の存在・機能が明らかではないため、我々は牛海綿状脳症(BSE)の診断を目標として VNO 生検法の有用性に関する研究を開始した。

今年度我々は、ハムスターおよびマウスの VNO では脳に比べて 20~25%程度の正常型プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)が発現していることを確認した。また、20 カ月齢ホルスタイン種ウシの VNO においても同様に高レベルな PrP<sup>C</sup> の発現を確認した。263K スクレイピー株感染ハムスターの一部では発症に先立って proteinase K(PK)抵抗性プリオン蛋白が蓄積していたことから、VNO 生検が BSE 生前診断に有用である可能性が示された。

### Diagnostic usefulness of peripheral organ biopsy in prion diseases

Hisako FURUKAWA<sup>1</sup>, Shigeru KATAMINE<sup>2</sup>, Takashi YOKOYAMA<sup>3</sup>, Masami NIWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology 1, <sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, <sup>3</sup>Prion Disease Research Center, National Institute of Animal Health

### Abstract

A definite diagnosis of prion diseases relies on the detection of abnormal isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>). And there is no well-established non-invasive technique to detect PrP<sup>Sc</sup> up to now. In 2003, Zanusso et al. reported that PrP<sup>Sc</sup> accumulated in olfactory epithelium of patients affected with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Although the accumulation was also found in olfactory epithelium of living patients, the technique didn't become popular because of the great risk of bleeding. Based on the reports by Zanusso et al., we turned our attention to vomeronasal organ (VNO) as a target tissue of biopsy.

The VNO is a receptor organ of pheromones and widely found in reptiles, amphibian, and nonprimate mammals. It located at the base of nasal cavity, has appearance of a paired tubular structure divided by nasal septum. The vomeronasal nerve arises from chemosensory epithelium that lines lumen and projects to the hypothalamus and amygdala. Since the existence of functional vomeronasal system is not unclear in humans, we attempt to evaluate the diagnostic usefulness of VNO biopsy in BSE-affected cattle, not in human prion diseases.

Up to now, we found that considerable amount of normal cellular isoform of prion protein (PrP<sup>C</sup>) was expressed in VNOs in mouse, hamster and 20 months-old cattle. We also found the accumulation of proteinase K-resistant PrP in the VNO of 263K-inoculated hamster at 2 weeks before the clinical onset. These findings may suggest the possible usefulness of VNO biopsy in the antemortem diagnosis of BSE.



## [はじめに]

プリオン病生前確定診断のための非侵襲的検査方法確立のために、末梢組織生検の有用性を検討した。2003年に Zanusso らはヒト散発性 CJD において嗅粘膜上皮に PrP<sup>Sc</sup> が蓄積することを剖検例で証明し、翌年には生検でも PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を Western blot および免疫組織化学的に検出し報告した。しかしながら、嗅粘膜は鼻腔上方奥の毛細血管に富む部位に位置する為、ファイバースコープ下で採取した場合に出血が多く、生検に失敗することが少なくない。また止血困難な点も問題となり、広く臨床応用されるには至っていない。我々は嗅粘膜上皮と同様に神経組織を含みしかも中枢に投射する末梢器官である鋤鼻器官(VNO)に着目し、同器官の生検による BSE 診断の可能性を検証するため本研究を開始した。

## [目的]

VNO 生検組織からプリオン蛋白検出を行い、これによる BSE 診断が可能か否かを検討する。

## [材料と方法]

### 1. シリアン・ハムスター、ddY マウスを用いた実験

#### PrP<sup>C</sup> 発現レベルの確認

マウス VNO の解剖学的位置を図 1 に示す。Ichikawa らの方法に従い、マウスおよびハムスターは麻酔下に生理食塩水で灌流した後下顎を除去し、上口蓋を露出する。上口蓋ヒダを剥離すると正中に鼻中隔が観察される。VNO は軟骨に包まれて鼻中隔前方のふくらみを形成する。VNO をこの軟骨と共に一塊として採取した後実体顕微鏡下に VNO を取り出し、10%中性ホルマリン液で固定（組織学的観察用）あるいは冷却したイソペンタンに浸して急速に凍結させる。こうして得られた材料を用いて、組織化学的に VNO であることを確認する。また、VNO における PrP<sup>C</sup> 発現レベルを Western blot 法で確認する。比較対照として脳・脾臓をおき、1 次抗体はハムスターに対しては抗 PrP 特異抗体である 3F4 を、マウスに対しては SAF32 を用いる。

#### 感染実験

シリアン・ハムスターに 263K スクレイピー株（ハムスター馴化型ヒツジスクレイピー株）を 10%脳乳剤として 100 $\mu$ l 腹腔内投与し、発症の 4 週間前から 2 週毎に脳・脾臓・VNO における PK 抵抗性 PrP の検出を Western blot 法を用いて試みる。また、3F4 による免疫組織化学的検査を行うとともに感染性を確認するために各臓器の乳剤をハムスターに脳内接種する 2 次伝播実験を行う。

### 2. ウシを用いた実験

#### PrP<sup>C</sup> 発現レベルの確認

非感染ホルスタイン（20 月齢）の頭部から VNO を採取し、組織化学的に同定する。また、同部位における PrP<sup>C</sup> 発現について抗 PrP 特異抗体 T2 を 1 次抗体とした Western blot 法で確認する。VNO 採取は鼻翼などを除去して行うだけではなく、生検を想定して外鼻孔から生検用パンチで採取することも試みる。

#### 感染実験

動物衛生研究所の協力により実験的 BSE 感染牛の VNO を取り出し、Western blot 法・免疫組織化学染色・感染実験などを用いて VNO における PrP<sup>Sc</sup> の蓄積を様々な病期で検討する。

（倫理面への配慮）

動物実験は、長崎大学の動物実験委員会の指針に従って行われた。ウシ頭部（脳を含む）は特定危険部位であるため、長崎県知事の許可を得た上で長崎食肉衛生検査所にて BSE 検査を終了した個体の頭部を用いている。

## [結果]

### ハムスターおよびマウス VNO における PrP<sup>C</sup> 発現

マウスおよびハムスターの VNO と脾臓、脳の Western blot の結果を図 2 に示す。マウス VNO は脳のおよそ 1/4 程度のレベルで PrP<sup>C</sup> を発現していた。ハムスターの blot では、脳のシグナルが強すぎて正確な比較はできないが、VNO では脾臓に比べて明らかに高いレベルの PrP<sup>C</sup> 発現が認められた。

## ハムスター感染実験で得られている結果

263K を腹腔内投与したハムスターは接種後 14 週で発病する。図 3 には 12 週目（無症状）に採取した脳、VNO、脾臓の Western blot を示す。PK 処理により脾臓由来の PrP は完全に消化されるが、VNO では 25-30kDa 近傍に 3F4 に反応する PK 抵抗性シグナルが（脳に比べればかなり弱いものの、）認められた。

## ウシ VNO 同定と同器官における PrP<sup>C</sup> 発現

ウシ頭部の下顎を除去し、上口蓋の口蓋ヒダを剥離し（図 4 左）長さおよそ 15cm の VNO を採取した（図 4 中）。外鼻孔から約 7cm の部分の横断面 HE 染色標本で VNO の管腔構造を確認した（図 4 右）。図 5 下に示すように反対側 VNO を Western blot 用に採取した。3 箇所のおいずれにおいても、小脳に比較して約 1/6 のレベルで PrP<sup>C</sup> の発現が確認された。

## [考察]

実験に用いたいずれの動物においても VNO が同定され、また高いレベルでの PrP<sup>C</sup> 発現が見られた。これまでの報告によれば、PrP<sup>C</sup>-rich な組織では PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が起りやすい傾向があるため、BSE においても VNO に PrP<sup>Sc</sup> が蓄積する可能性が高いと予想される。また、まだ少数での観察ではあるが感染ハムスターにおいて早期から VNO に PK 抵抗性 PrP が沈着していることも支持的なデータであると考えられる。

## [結論]

鋤鼻器官を用いた BSE 生前診断方法開発研究を開始した。VNO はプリオン病において病変部位になり得る可能性が示された。今後はハムスター VNO に蓄積した PK 抵抗性 PrP の感染性の有無を確認するとともに、感染牛での剖検・生検を試みる予定である。

## [参考文献]

- 1) Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, Zampieri P, Gelati M, Fiorini M, Farinazzo A, Gardiman M, Cavallaro T, Bentivoglio M, Righetti PG, Pocchiari M, Rizzuto N, Monaco S. :Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med.* 348:711-9, 2003
- 2) Tabaton M, Monaco S, Cordone MP, Colucci M, Giaccone G, Tagliavini F, Zanusso G. :Prion deposition in olfactory biopsy of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol.* 55:294-6, 2004
- 3) Salazar I, Sanchez Quinteiro PS, Cifuentes JM. :Comparative anatomy of the vomeronasal cartilage in mammals: mink, cat, dog, pig, cow and horse. *Anat Anz.* 177:475-81, 1995
- 4) Takami S. :Recent progress in the neurobiology of the vomeronasal organ. *Microsc Res Tech.* 58:228-50, 2002

## [研究発表]

### 1. 論文発表

- 1) Prinz M, Montrasio F, Furukawa H, van der Haar ME, Schwarz P, Rulicke T, Giger OT, Hausler KG, Perez D, Glatzel M, Aguzzi A. :Intrinsic resistance of oligodendrocytes to prion infection. *J Neurosci.* 24:5974-81, 2004
- 2) Furukawa H, Doh-ura K, Sasaki K, Iwaki T. :Accumulation of prion protein in muscle fibers of experimental chloroquine myopathy: in vivo model for deposition of prion protein in non-neuronal tissues. *Lab Invest.* 84:828-35, 2004
- 3) Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono H, Ito T, Katamine S, Niwa M. :A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem.* 279:23661-7, 2004
- 4) Nakajima M, Yamada T, Kusuvara T, Furukawa H, Takahashi M, Yamauchi A, Kataoka Y. :Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 17:158-63, 2004

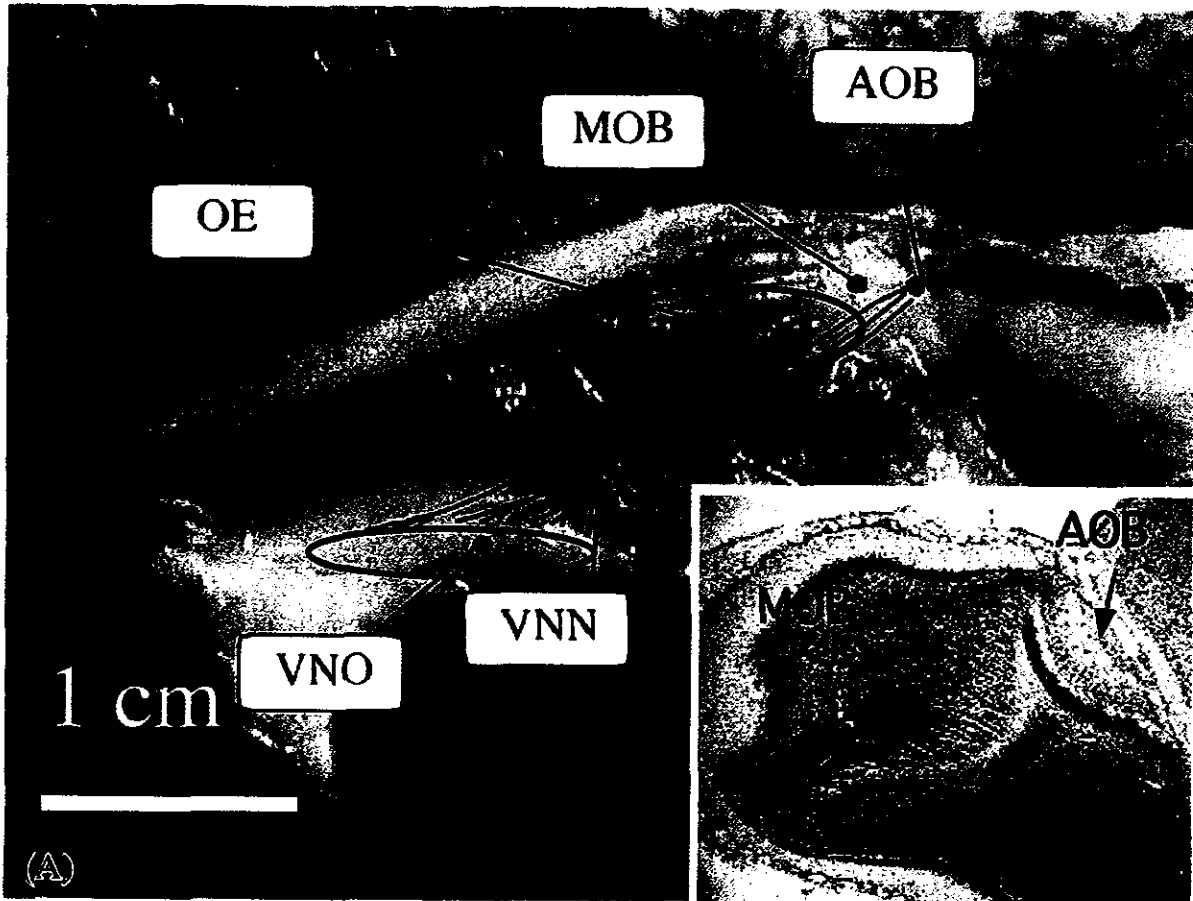
### 2. 学会発表

- 1) 古川ひさ子 他:尿中プロテアーゼ抵抗性蛋白検出によるプリオン病診断の問題点. 第 45 回日本神経学会総会. 2004 年 5 月 東京 新高輪プリンスホテル

- 2) 古川ひさ子 他：尿中プロテアーゼ抵抗性蛋白検出によるプリオン病早期診断の試み（続報）.第 23 回日本痴呆学会学術集会. 2004 年 9 月 東京 江戸川区総合区民ホール
- 3) Furukawa H. et al. : A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine: contamination with bacterial outer membrane proteins. International Symposium Prion Diseases. Food and Drug Safety. October, 2004 in Sendai, Japan

[知的所有権の取得状況]

特になし



(Ichikawa M. Zoological Science 2003 より引用、改変)

VNO: vomeronasal organ, VNN: vomeronasal nerve, AOB: accessory olfactory bulb, OE: olfactory epithelium, MOB: main olfactory bulb