

タイン種の牛の末梢血より樹立された培養細胞であり、1990年代後半に組織培養に馴化され、10年以上液体窒素タンク内に保存されていた培養株である。培養性状や形態等に関しては分離当初と変わらない。Bo120株は10%FCS加DMEMにて培養が可能であり、培養には特別な増殖因子などは必要としない。Bo120の培養と継代は、トリプシンにて培養細胞をはがし、DMEMにて洗浄後、2倍希釈にて細胞を継代培養した。

2) Bo120の性状解析

マクロファージ本来の性状を確認する目的で、FITCで標識した1 μ mラテックス粒子を用いてBo120の貪食能を間接蛍光抗体法で検査した。Bo120株の表面抗原は、抗牛MHC-I抗体、抗MHC-II抗体、抗牛CD14抗体、抗牛CD21抗体を用いてFACSにて解析を行った。マクロファージの表面抗原の誘導は、培養液にLPSを100 μ g/mlになるように添加し、3日間培養後、FACS解析を行った。また、マウスリコンビナントIFN- γ (100 ng/ml)にても表面抗原の誘導を行った。

3) 間接蛍光抗体法によるPrP^CとPrP^{Sc}の解析

マクロファージBo120株のPrP^Cの細胞表面の発現を間接蛍光抗体法(IFA)で検査した。使用した一次抗体は、マウスと牛のPrP^Cに反応するmAb44B1とマウスPrP^Cにのみ反応するmAb31C6である。二次抗体はAlexa488標識の抗マウスFab抗体を用いた。

1%脳乳剤添加後のBo120株へのPrP^{Sc}の取り込み能の検査は、培養細胞に1%脳乳剤を添加し、24時間培養後、浮遊している脳乳剤を取り除いた後に2種の抗プリオン抗体(44B1と31C6)でIFAを行った。

4) ウェスタンブロット(WB)解析によるBo120株のPrP^{Sc}の取り込みと分解の解析

ウェスタンブロット解析は常法に従って行った。使用した抗プリオン抗体は、mAb44B1とmAb31C6であり、抗マウス α -tubulin抗体は、コントロールの α -tubulinの検出に用いた。

Bo120株によるPrP^{Sc}の取り込みと分解能の検査は以下の2方法により検査した。

4-1) 代謝法：マクロファージは外界の異物を取り込み消化し、放出する機能が旺盛であることから、6cmシャーレ(細胞数1~1.5 $\times 10^5$)に1%マウススクレイピー帯広株50 μ l添加し、培養して経時的(時間と日数)に培養上清と細胞を回収し、培養後に残存しているPrP^{Sc}量をWBで解析した。

4-2) 吸着法：培養マクロファージBo120(主に6cmシャーレ、時には10cmシャーレを使用)に1%脳乳剤を添加し、2時間吸着培養後、上清を除去してDMEMにて一度洗浄し、培養液を加えて培養した。経時的にシャーレから培養細胞を回収し、WB解析により培養後のPrP^{Sc}の残存量をWB法にて解析した。

LPSの誘導による細胞の活性化や培養液のFCS量を変えることによる細胞の生細胞数や活性化によるPrP^{Sc}の分解能への影響も検討した。培養細胞の継代によるPrP^{Sc}分解能の活性化は、10センチシャーレに1%脳乳剤を200 μ l加えて10日間ごとに培養継代して、PrP^{Sc}の残存量をWBで検査した。

(倫理面への配慮)

マウスへのスクレイピー株の接種と採材は岐阜大学応用生物科学部の実験動物委員会の許可の基に行っており、マウスの飼育はP3レベルの施設にて行っている。したがって倫理上問題は無い。

C. 研究結果

1) 培養牛マクロファージの性状

牛の末梢血より樹立したマクロファージBo120株の貪食能の有無をFITC標識したラテックスの取り込みにより検査した。図1に示すごとくBo120株はFITC標識ラテックスを高率に貪食することが明らかとなった。

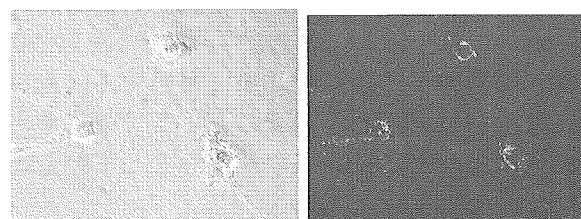


図1 Bo120細胞でのFITCラテックスの取り込み

マクロファージのマーカである分化抗原 MHC-II, CD14, CD21 を FACS 解析したが、培養系のマクロファージ Bo120 株では分化抗原の発現は観察されなかった。しかし、LPS にて誘導した場合は、分化抗原 MHC-II, CD14, CD21 の発現が顕著に誘導され、Bo120 株はマクロファージの性状を示した。

2) Bo120 株での PrP^C の発現

培養マクロファージ Bo120 株での PrP^C の発現を WB 解析と IFA で解析した。その結果、Bo120 株は PrP^C を発現していることが明らかとなった。図 2 は mAb31C6 と 44B1 を用いた WB の結果を示す。mAb44B1 はマウスと牛の PrP^C に反応するが、mAb31C6 はマウスにしか反応しないことから、細胞の PrP^C の発現に影響することなく、培養細胞中に添加したマウス PrP^{Sc} を検出するのに有効であった。

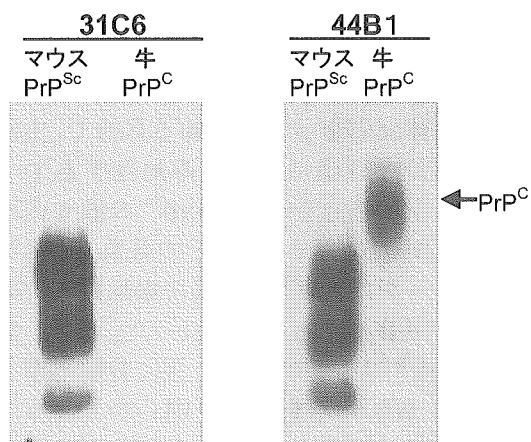


図2 Bo120 株での PrP^C の発現

図 3 は Bo120 株に発現している PrP^C 像と 1% 脳乳剤を添加した時の Bo120 細胞での PrP^{Sc} の取り込み像を示す。Bo120 株では PrP^C の発現が均一に観察される、一方、脳乳剤を添加した場合には、添加した脳乳剤中の PrP^{Sc} が細胞質に顆粒状に検出され、マクロファージの旺盛な取り込み像が観察される。

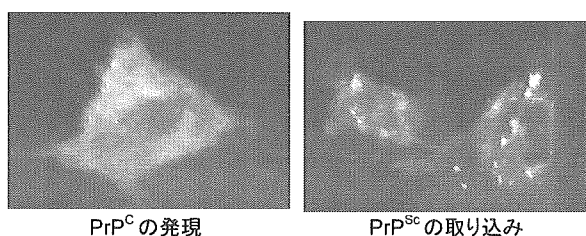


図3 Bo120 細胞の IFA

3) Bo120 株での PrP^{Sc} の分解

マクロファージ Bo120 株による PrP^{Sc} の分解能を WB で解析した。マクロファージは旺盛な取り込み能と分泌能を有していることから、1% 脳乳剤を添加後、経時的に培養細胞と上清（代謝法）中に残存している PrP^{Sc} 量を WB で解析した。添加後、8 日までの PrP^{Sc} 残存量を図 4 に示した。PrP^{Sc} は添加後、徐々に減少し、

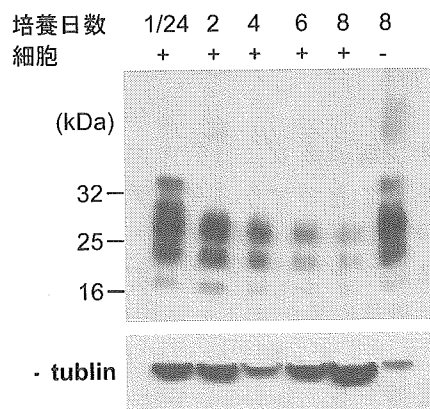


図4 Bo120 株による PrP^{Sc} の分解

4 日後で顕著な減少がみられ、8 日間の培養で、WB でわずかに検出できるまでに減少することが明らかとなった。一方、コントロールに用いた α -tubulin の WB 濃度はほとんど減少していないことから、添加した脳乳剤が特異的に分解されたものと考えられる。Bo120 株が培養されていないシャーレではほとんど PrP^{Sc} は減少していないことから、今回観察された PrP^{Sc} の減少は PrP^{Sc} の自然分解による結果ではないことを示している。

さらに、Bo120 株による PrP^{Sc} の分解能を正確に知る目的で、脳乳剤を添加後、余分な上清を除去し細胞に取り込まれたり、細胞に吸着した PrP^{Sc} の分解能に関して検討した。図 5 はその結果を示すが、添加後、4 日を過ぎた頃から PrP^{Sc} の減少は顕著になり、10 日目頃には僅かに PrP^{Sc} のバンドが検出されるまでに減少した。また、培養液に LPS や IFN- γ 等を添加して Bo120 株を活性化して PrP^{Sc} の分解能を検討したが、LPS 添加による PrP^{Sc} 分解能の活性化は観察されなかった。

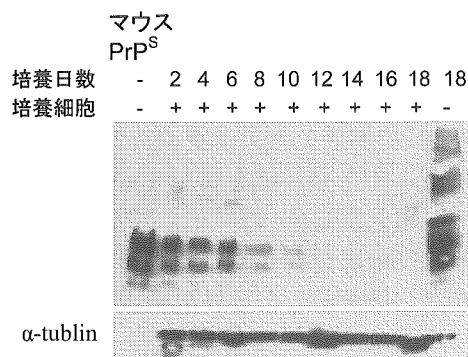


図5 Bo120 株による PrP^{Sc} の経時的分解

D. 考 察

プリオン病の成立には宿主の免疫系細胞が必要であることがマウスをモデルとしたプリオン病研究で明らかになっている。特にプリオンの増殖部位として FDC や FDC ネットワークが重要な役目を果たすことが知られている。現に、マウスプリオン病では FDC 内に PrP^{Sc} が早くから蓄積する。しかし、BSE 感染牛ではマウスプリオン病に観察されるような FDC 内のプリオンの蓄積は観察されることは少ない。この事実は、プリオン病の成立には宿主に依存してプリオン病感染に関与する細胞群やシステムが異なることを示唆しているが、BSE においては不明である。免疫組織化学的には、PrP^{Sc} を取り込んだマクロファージ像が局所で観察されるが、マクロファージ自身がマウスモデルでの FDC と同じ役目をしているかどうかは明らかではない。本課題は BSE 感染の初期段階で体内伝播に関与する細胞群あるいは主要因子の同定とその機能の解析である。

BSE プリオンの宿主への侵入門戸部位は腸管の M 細胞とそれに関連する細胞群であるが、実際に腸管に局在する免疫関連細胞を実験に用いることは困難であることから、本年度は培養系として樹立されている牛マクロファージ Bo120 株での PrP^{Sc} の取り込みや分解能に関して検討した。実験結果から、Bo120 株は PrP^C を発現し、PrP^{Sc} を取り込み分解することが示された。しかし、Bo120 株での PrP^{Sc} の分解は、極めてゆっくりと進行し、WB の解析では、バンドとして検出できなくなるまでに 12 日程度が必要である。まだ、どのようなメカニズムで PrP^{Sc} を分解しているのかも不明であり、今後

の課題といえる。もし、今回用いた Bo120 株のように腸管から取り込まれたプリオンがマクロファージ系の細胞で取り込まれ分解されているとすると、宿主は PrP^{Sc} に対しても排除機構を有しているのかもしれない。マクロファージが有している外来抗原排除機構と分解機構はプリオン感染に対する宿主機構としては特筆すべき防御機構といえる。今回の実験では十分な定量的検討が出来なかったことから、生細胞数や活性化等の関係も含め今後検討する必要がある。また、検査に用いたプリオンは全てマウススクレイピー由来の脳乳剤であり、BSE プリオンではない。牛由来マクロファージ Bo120 株からみて同種由来の BSE プリオンと異種のマウススクレイピー由来プリオンではどのように取り込みや分解能が異なるのか今後検討する必要がある。

E. 結 論

牛がプリオンを経口的に取り込んだ時、どのような生体反応を示すかを知る目的で、生体中で外来抗原を旺盛に取り込み処理する牛マクロファージに焦点を当て、PrP^{Sc} の取り込みと分解能に関して検討した。その結果、培養牛マクロファージは PrP^{Sc} を旺盛に細胞質内に取り込むことが IFA で明らかになった。また、取り込んだ PrP^{Sc} は時間の経過と共に分解処理されることが WB の解析により明らかとなった。この結果は、経口的に取り込まれたプリオンは宿主のマクロファージにより処理される可能性を示している。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurosaki Y, Ishiguro N, Horiuchi M and Shinagawa M.: Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan. J Vet Med Sci 67:321-323, 2005.
- 2) Kataoka N, Nishimura M, Horiuchi M. and Ishiguro N: Surveillance of chronic wasting disease in Sika deer, *Cervus Nippon*, from Tokachi district in Hokkaido. J Vet Med Sci 67:349-351, 2005.

2. 学会発表

- 1) 石黒直隆、中満智史、堀内基広：日本で飼育されているウシ、ヒツジ、ヤギの PrP 遺伝子多型. 第1回プリオン研究会（天童）
2005年8月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

10. 霊長類モデルを用いた BSE 発症リスク評価に関する研究

分担研究者 寺尾 恵治 独立行政法人医薬基盤研究所
霊長類医科学研究センター

研究協力者 小野文子 (社団法人・予防衛生協会)

研究要旨 BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与 (3 頭) および脳内接種 (3 頭) したカニクイザルと無処置の 1 頭の計 7 頭について、投与後 1~3 ヶ月毎に行動解析、記憶能解析、脳波測定を実施し、カニクイザルの BSE 発症モデルにおける機能変化を調査した。さらに、血球、血漿、髄液、尿を継時的に採取し、感染・発症に伴う BSE-P の体内動態解析用試料として保存した。投与後 2 年を経過した時点では、行動観察で搔痒感、反応性の低下、また脳内接種した 1 頭において麻酔下でのチック様痙攣の発現が観察され、脳内接種群 3 頭中 2 頭に成長の遅延が認められた。アップルテストによる前肢の運動機能と指迷路試験による記憶能には経口投与群、脳内接種群のいずれも現時点では顕著な変化は見られなかった。脳波所見では接種 16 ヶ月目に経口投与個体で大振幅偏極性の脳波が記録された。脳内接種群では接種直後から速波成分 (棘波、鋭波) が観察された。今後は定期的な神経生理学的、行動学的解析を継続することにより、カニクイザルにおける BSE 発症に伴う脳波、行動、高次脳機能の異常を抽出するとともに、脾臓、腸間膜リンパ節等の組織生検により早期確定診断のための材料を提供する予定である。

A. 研究目的

カニクイザルを用いて BSE プリオン (BSE-P) 感染モデルを作成し、変異型 CJD の病態解明および早期診断法を確立することによりヒトの BSE 発症リスク評価指標を確立するとともに、BSE-P 接種後継時的に採取した血液、髄液、主要組織を研究班共通の研究資源として提供することを目的とする。変異型 CJD 患者では行動異常、記憶力低下とともに孤発型 CJD 患者とは異なる脳波の変化が生じることが報告されている。今年度は、カニクイザルの BSE-P 感染モデルの有用性を評価する目的で、感染ザルについて行動解析、記憶能解析および脳波測定を継時的に実施し、発症に伴う高次脳機能の変化を調査した。

B. 研究方法

1. 実験群

1 歳齢の育成雄カニクイザル 6 頭を下記の 2 群に分け、BSE 感染ウシの 10%脳乳剤を、それぞれの経路で投与した。また、コントロールとして 1 頭を無処置対照群として同様の検索を行った。平成 17 年末で接種後 25 ヶ月を経過している。

経口投与 (脳乳剤 2.0 ml)	3 頭
脳内接種 (脳乳剤 0.2 ml)	3 頭
無処置対照	1 頭

2. 調査項目:

- 1) 行動解析
指定行動観察・ビデオ撮影
アップルテスト (行動評価)
- 2) 記憶能解析
指迷路試験・ビデオ撮影
- 3) 神経機能解析
大脳皮質脳波
視覚、聴覚、体性感覚誘発電位
- 4) 定期的採材項目
血液、尿、髄液

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使って、トレイ上に等間隔で置かれた 4 個の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し、報酬をつかみ取るまでの時間を計測した。

指迷路試験は長期記憶の評価を簡便におこなう装置であり、4 段の指迷路装置内に置かれた報酬を移動させ、最終的に取りだし口から獲

得する方法を学習させたうえで、無作為に報酬を置いて正解度をチェックするランダムテスト（24 試行）を 2 日連続で実施し、成功率を長期記憶の評価とした。

脳波は塩酸ケタミン-キシラジン混合麻酔下において、4 電極誘導による皮質脳波の測定および誘発脳波の測定を行った。視覚誘発脳波はフラッシュを用いランダムおよび、繰り返し刺激により誘発される脳波を測定した。聴覚脳幹部誘発電位はクリック音を用い、各強度の音圧における脳波を測定した。体性感覚誘発電位は正中神経手根部に電気刺激を行うことにより発生する脊髄および大脳感覚野の誘発脳波を測定した。

（倫理面への配慮）

BSE-P 接種動物はすべて改良型の P3 アイソレータケージ内に収容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視覚、聴覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とするよう改良した。また、材料採取および脳波測定においては麻酔下において実施した。

C. 研究結果および考察

1) 体重及び行動観察：

今回実験に供したカニクイザルは成長期にあたり、BSL3 指定実験室におけるアイソレータ内という特殊飼育環境下における実験と行動解析を行っていくうえでコントロールサルにおいて実験を進めている。接種は生後 740 日から 860 日に実施しているが、脳内接種群において3頭中2頭で接種後の体重増加率が低い傾向が認められた (Fig.1)。

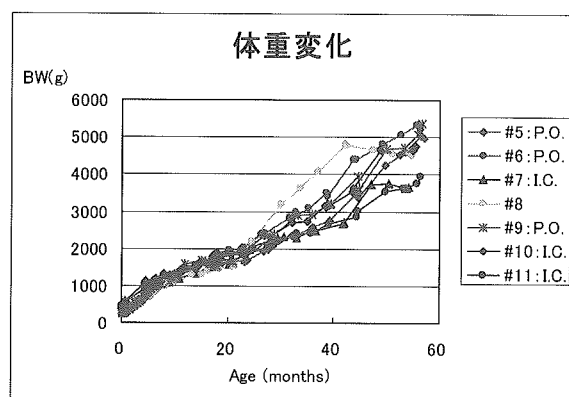


Fig.1

行動観察では経口投与群#05、#06、#09においてのみ接種後 24 ヶ月目頃より有意にあくびが観察されている。また、経口投与群の#05と脳内接種群の#07および#10において搔痒感からくると思われる搔きむしり行動が観察されている (Table 1)。

Table 1. 5 分間指定行動観察所見

		あくび*			搔きむしり行動			行動頻度**		
		Pre	16M	28M	Pre	16M	28M	Pre	16M	28M
経口投与	#5	0	1	2	-	+	-	↑	↑	↑
	#6	0	0	2	-	-	-	↑	↓	→
	#9	0	5	3	-	+	+	↑	→	↓
脳内接種	#7	0	0	0	-	-	+	↑	↑	↓
	#10	0	0	0	-	+	+	→	→	→
	#11	0	0	2	-	-	-	→	↑	↑
無処置	#8	0	0	0	-	-	-	↑	↑	↑

* :5分間行動観察中に認められたあくびの回数

** :5分間行動観察中のケージ内行動パターン

↑ ケージに登る、回転する

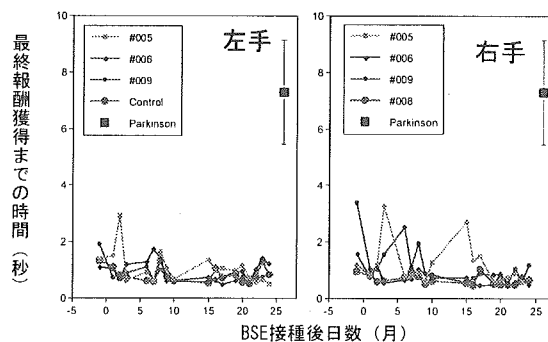
→ 起立

↓ 座位、うずくまる

2) 指迷路試験・アップル試験：

アップルテストにおいては接種後 24 ヶ月目まで報酬獲得時間に変化はみられなかったことから、脳内接種群においても接種後 2 年では手指の運動機能に異常は認められないと判断した (Fig.2)。また、記憶能を評価する指迷路

経口投与群



脳内接種群

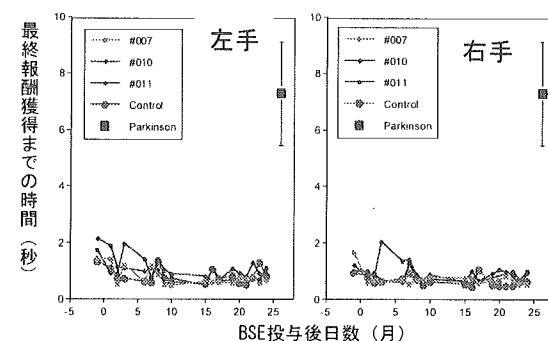


Fig.2 BSE 接種カニクイザルの運動機能変化 (アップルテスト)

試験の成功率においても有意な変化は認められなかった (Fig.3)。

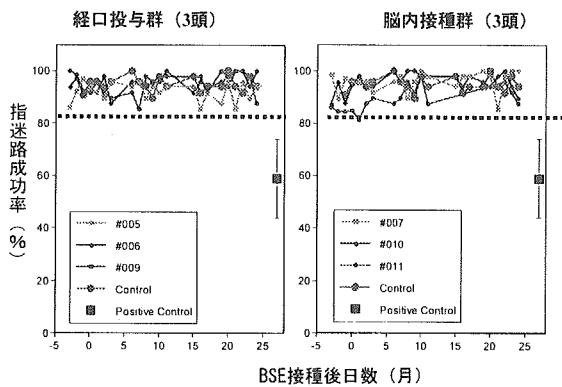


Fig.3 BSE 接種カニクイザルの高次脳機能変化 (指迷路試験)

3) 電気生理学的解析

3-1: 経口投与群の皮質脳波 (#5, 6, 9)

経口投与群では投与後7~9ヶ月目から陽性緩徐波が複数の電極に同期して出現していることからPSDと推察される。陽性緩徐波の出現部位は個体によって異なり、#05では後頭部、#06では左側全域及び右後頭部、#9では左側に認められた。26ヶ月目では#6のみに一極性の緩徐波が記録された (Fig. 4)。経口接種群での脳波の特徴としては、大振幅の1-2 Hzの偏極性脳波が観察された。

3-2: 脳内接種群の皮質脳波 (#07, #10, #11)

接種後の脳波は対照 (#08) と異なり、接種後16ヶ月目においても、高振幅の波が観察され、左右の対称性が維持されていた。16ヶ月目頃より塩酸ケタミン麻酔後にチック様痙攣症状が観察された#7では、26ヶ月目に非常に低振幅であるが高周波成分がより多く含まれており、同様な傾向は#10にも認められた (Fig. 4)。脳内接種群の脳波の特徴として、速波成分 (棘波、鋭波) が接種後16ヶ月までに観察され、脳内接種後の脳波抑制の経過が他群と異なることを示している。

以上、BSE 発症ウシ脳乳剤を経口または脳内接種したカニクイザルでは、投与後2年を経過した時点で一部の個体でチック様行動や、脳波の変化が認められるものの、行動及び高次脳

機能には多く名変化が生じていない。我々の行ったリスザルへのスクレイプープリオン接種実験では接種後33~48ヶ月目に行動的異常および、脳波異常所見が認められている。また、Lasmezas ら (Nature 381:743, 1996, Lancet 365:781, 2005) によると、カニクイザルへのBSE-P 伝播実験では経口投与で5年の潜伏期で1/2が発症、脳内接種で2~3年の潜伏期であることが報告されている。本研究では、詳細な観察及び神経生理学的指標から発症に至る病態を評価できている可能性が示唆され、発症後に詳細な解析を行うためのデータの蓄積がなされており、継続して経過を追跡し、発症初期の病態解析を行うことにより早期診断が可能となると考えられる。

E. 結論

BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与 (3頭) および脳内接種 (3頭) したカニクイザルと無処置の1頭の計7頭について、投与後1~3ヶ月毎に行動解析、記憶能解析、脳波測定を実施し、カニクイザルのBSE 発症モデルにおける機能変化を調査した。さらに、血球、血漿、髄液、尿を継時的に採取し、感染・発症に伴うBSE-Pの体内動態解析用試料として保存した。投与後2年を経過した時点では、行動観察で搔痒感、反応性の低下、また脳内接種した1頭において麻酔下でのチック様痙攣の発現が観察され、脳内接種群3頭中2頭に成長の遅延が認められた。アップルテストによる前肢の運動機能と指迷路試験による記憶能には経口投与群、脳内接種群のいずれも現時点では顕著な変化は見られなかった。脳波所見では接種16ヶ月目に経口投与個体で大振幅偏極性の脳波が記録された。脳内接種群では接種直後から速波成分 (棘波、鋭波) が観察された。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

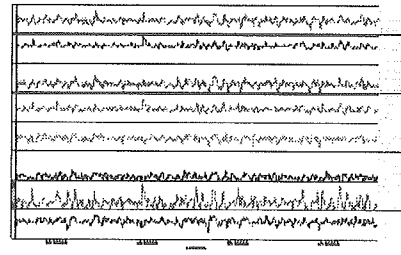
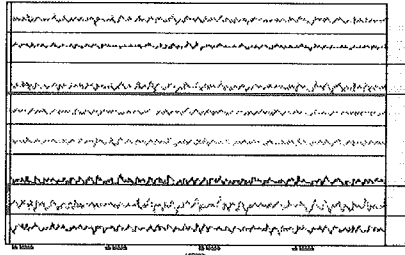
なし

Fig.4 BSE接種カニクイザルの脳波変化

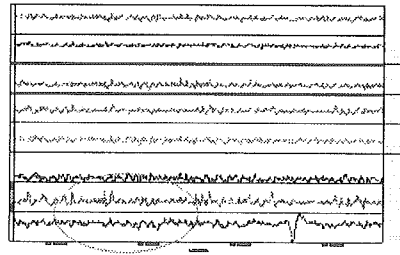
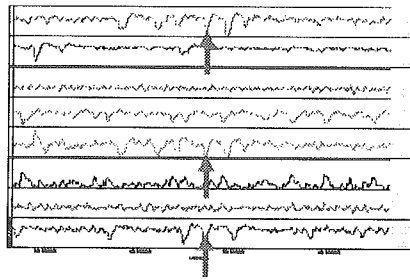
#006(経口投与)

#007(脳内接種)

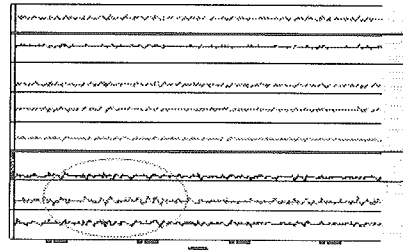
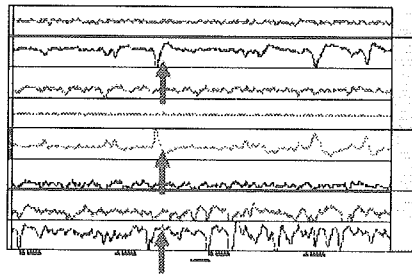
Pre



16M



28M



1 1. BSE 脳内感染実験牛のプリオン体内分布

分担研究者 扇 勉 北海道立畜産試験場畜産工学部

研究協力者 福田茂夫、二階堂 聡、松井義貴、陰山聡一、
尾上貞雄（北海道立畜産試験場・畜産工学部）、
横山 隆、岡田洋之（動衛研・プリオン病研究センター）

研究要旨 2004年2月よりBSE感染脳乳剤の脳内接種によるBSE実験感染を行っている。2005年6月に消化器疾患により予後不良となった供試牛（2004年7月接種）について、病理解剖を行い、プリオンの体内分布を解析した。脳組織および網膜からPrP^{Sc}を検出した。脳組織中では、接種した部位である中脳に最も高濃度にPrP^{Sc}の蓄積が見られ、橋、延髄、小脳海馬、線状体などにも蓄積が見られた。さらにデータを蓄積し精査しなければならないが、BSE野外例などとの比較検討を行うことにより、BSEの病態解明と食品の安全維持に寄与できるものと思われる。

A. 研究目的

2001年9月に我が国で初めてBSEが確定診断されて以来、これまでに22例のBSEが発生している。現在、BSE検査は、食肉衛生検査所における全頭検査および家畜保健衛生所BSE検査室における24ヶ月齢以上の死亡牛の全頭検査が行われており、また、耳標装着の個体管理識別による生産履歴（トレーサビリティ）システムも実施されているが、消費者から安全安心な生産物がますます強く求められている。この本病の人へのリスクを軽減するためには、BSEの感染および発症機構を解明しなければならない。しかし、我が国では、これまで牛を用いた感染実験による試験研究はほとんど行われていない。

本研究は、BSE感染牛由来材料を牛に脳内接種し、実験感染牛の諸臓器におけるプリオンの体内分布を解析する。本年度は、観察途中に消化器疾患で予後不良となった1例についてプリオン体内分布を解析する。

B. 研究方法

1) 供試動物

2004年2、7および9月に、18頭のホルスタイン種子牛（2-4ヶ月齢）に対し、脳内接種により10%のBSE感染脳乳剤1mlを投与した。また3頭にBSE陰性脳乳剤を同様に投与した。これらの牛について、臨床症状の変化

によりBSE発症の有無を観察した。なおBSE感染脳乳剤接種牛の内3頭は肺炎等の理由で接種後100日以内に死亡し、当场で焼却処分した。

2004年7月にBSE感染脳乳剤を接種した1頭について、2005年6月に慢性的な下痢と食欲不振を呈し、背湾姿勢を頻繁にとり、聴診により腸管内にガスの貯留を認めたため、予後不良と診断した。2005年7月、動物衛生研究所プリオン病研究センターにおいて、病理解剖を行った。

2) ウシ組織の保存と処理

病理解剖時に各組織を採取した。採取した組織は、生化学検査用に-80℃冷凍庫内に、また病理・免疫組織化学検査用にホルマリン固定し、一時保管した。

各脳組織および脊髄について、それぞれ200±20mgを2mlチューブに入れ、そこにジルコニア製φ1mmビーズおよび800μlの100mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.6)を加え、マルチビーズショッカーで4,000rpm、60秒間破碎処理し、20%脳乳剤とした。

作製した20%脳乳剤とDetergent buffer (4% Zwittergent3-14, 1% Sarkosyl, 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.6))をそれぞれ250μlずつ1.5mlチューブに加え、40mg/ml collagenase 6.25μlおよび10mg/ml DNase 2μlと混合し、

37°C で 30 分間消化処理した。25 µl 2-Butanol を加え、混和した後、20 mg/ml のプロテアーゼ K 1 µl によりさらに 37°C で 30 分間消化処理した。0.4 M の Pefabloc 2.5 µl を加え、混合し、butanol-Metnol solution を 250 µl 加え混和し、15000 rpm, 10 分間で遠心した。上清を捨て、沈渣を軽く乾燥させた後、SDS sample buffer を 100 µl 添加し、100°C、6 分間ボイルした。軽く遠心し上清をウェスタンブロット用のサンプルとした。

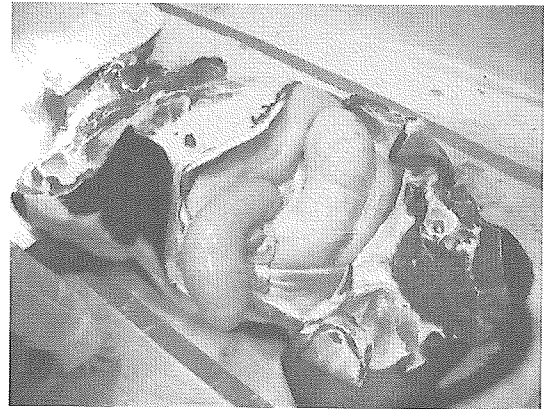
また脳以外の組織は、Shimada ら (Microbiol Immunol 48(8), 2005) の方法を用いた。すなわち 200±20 mg をハサミで細切した後、2 ml チューブに移しメタルコーン (安井器械) 入れた。800 ml の LN buffer (2% Triton X-100, 0.5% Sarkosyl, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl) を加え、さらに 5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 20 mg Collagenase, 10 µg DNase を添加し、37°C、2 時間転倒混和した。55 µl の butanol を添加し、80 µg のプロテナーゼ K を入れ 1 時間転倒混和した。2 mM の Pefabloc で反応を停止させた。40000 rpm、20 分間遠心分離し、沈渣を 6.25% Sarkocyl/TE 900 ml を加え、1 時間転倒混和し、沈渣を十分溶解させた。さらに 10,000 rpm、5 分間遠心し、上清を 1.5 ml チューブに移した。4% Na-PTA 70 µl を加え、37°C、2 時間転倒混和し、15,000 rpm、30 分間遠心した。沈渣を 20 µl SDS sample buffer に添加し、100°C、6 分間ボイルした。軽く遠心し上清をウェスタンブロット用のサンプルとした。

3) SDS-PAGE およびウェスタンブロット

SDS-PAGE は NuPAGE 12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) を用い、それぞれのサンプルを 10 µl/well (脳組織 5 mg/well、他の組織 100 mg/well) 添加した。200V、40 分間の電気泳動を行った。ウェスタンブロットはタンク式装置を用い、90V、1 時間で PVDF メンブレンに転写した。転写後、ブロッキングおよび洗浄を行い、mAb T2-HRP を 5000 倍希釈で添加し、1 時間、室温で反応させた。化学発光試薬 (PIERCE) により発光させ、Alpha Ease FC により検出を行った。

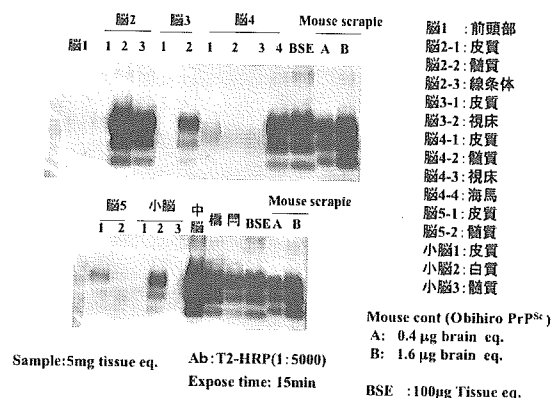
C. 研究結果

病理解剖したこの消化器疾患のウシは、直腸において 2 カ所の絞扼を認めた。絞扼箇所から上流の結腸および盲腸までガスの貯留が顕著であった。(図 1)



(図 1)

ウェスタンブロットの結果から、中枢神経系においては、中脳から最も高い濃度で異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) が検出された。大脳髄質、線条体、海馬、橋、延髄門部においても PrP^{Sc} 検出が明瞭であった。(図 2)

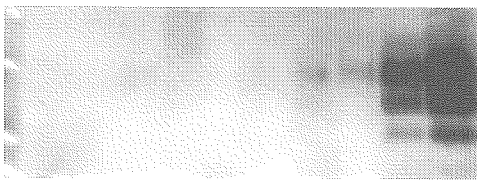


(図 2)

馬尾、三叉神経節、下垂体においてはわずかに PrP^{Sc} ラシキバンドが検出されたが(図 3)、再検査したところ、バンドの検出はできなかった。

また腹腔各臓器では、空腸および回腸にバンドが見られたが、コントロールと比較しサイズが大きく、再検査において PrP^{Sc} のバンドは検出できなかった(図 4)。網膜においては陽性であった。(図 5)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



No.1: mAb T2 x5,000, Exposure 20 min

- | | |
|----------------|----------------------------|
| 1 See Blue 5ul | 7 視神経 |
| 2 脊髄(頸部) | 8 三叉神経節 |
| 3 脊髄(胸部) | 9 下垂体 |
| 4 馬尾 | 10 Mo PrPSc 4 ⁺ |
| 5 脊髄神経節(頸部) | 11 Mo PrPSc 4 ⁺ |
| 6 脊髄神経節(胸部) | |

(図3)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

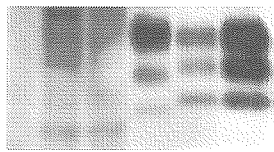


No.5: mAb T2 x5,000, Exposure 30 min

- | | |
|----------------|----------------------------|
| 1 See Blue 5ul | 9 回腸(ハイエル板) |
| 2 脾臓 | 10 直腸 |
| 3 脾臓 | 11 子宮 |
| 4 副腎 | 12 卵巣 |
| 5 腎臓 | 13 咬筋 |
| 6 盲腸(回盲部) | 14 最長筋 |
| 7 盲腸(盲腸尖) | 15 Mo PrPSc 4 ⁺ |
| 8 空腸 | 16 Mo PrPSc 4 ⁺ |

(図4)

1 2 3 4 5 6



No.7: mAb T2 x5,000, Exposure 10 min

- | | |
|---------------------------|---|
| 1 See Blue 5ul | |
| 2 空腸 | 各サンプルを[メタルコーン
→Na-PTA]で抽出。4網膜
でPrPScを検出。2空腸、3
回腸では陰性と判断。 |
| 3 回腸 | |
| 4 網膜 | |
| 5 Mo PrPSc 4 ⁺ | |
| 6 Mo PrPSc 4 ⁺ | |

(図5)

D. 考察

今回解剖・検査した試験牛は、直腸の絞扼に起因する消化器不全であった。当場に導入当初より背湾姿勢を時折みせており、これらの症状は、BSE と関連のないものと思われた。

この試験牛は BSE 感染脳乳剤の投与から 345 日目で剖検し、中脳を中心に PrP^{Sc} を検出したことから、脳内接種 11 ヶ月経過した時点ですでに脳内で検出可能な量の PrP^{Sc} が蓄積していることが明らかとなった。2006 年 1 月

現在において、本課題における BSE 脳内接種牛の BSE 様臨床症状の出現時期は接種後およそ 19 ヶ月から 22 ヶ月である。これまでにウシにおける BSE 発症時期と PrP^{Sc} 検出可能時期の関連は報告が少なく、さらにデータを蓄積し精査する必要があると思われた。

脳幹部において、PrP^{Sc} は接種部位とした中脳に最も蓄積し、野外例における延髄門部とは異なる結果であった。脳内接種牛のプリオン分布と野外例のそれを比較検討することで、プリオンの体内伝播様式の解明につながると思われる。

また網膜から PrP^{Sc} が検出されたが、視神経からは検出できなかった。脳から網膜への伝播経路は不明であるが、早い段階で移行していることが明らかとなった。

E. 結論

BSE 脳乳剤脳内接種後 11 ヶ月(345 日経過)のウシから PrP^{Sc} を検出した。野外例と異なり、中脳で最も高濃度の PrP^{Sc} が蓄積していた。末梢神経および末梢各組織からは PrP^{Sc} を検出しなかったが、網膜から PrP^{Sc} 検出した。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

とくになし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

12. プリオンの標的細胞特異性決定機構とプリオン蛋白質の細胞内分解に関する研究

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科

研究要旨 プリオン感受性細胞とプリオン非感受性細胞の比較は、プリオン増殖に関与する宿主因子や微細環境の同定につながると考えられる。本研究では、プリオン非感受性細胞で発現が亢進している遺伝子の産物が、PrP^{Sc}の分解に関与する可能性を考え、プリオン感受性 N2a サブクローン (N2a-3, N2a-5) と非感受性サブクローン (N2a-1) の網羅的遺伝子発現比較解析を実施して、プリオン非感受性細胞で高発現する遺伝子群の同定を試みた。DNA マイクロアレイ解析および、定量 PCR による遺伝子発現の定量解析から、プリオン非感受性細胞で高発現する遺伝子を 18 同定した。これらは、機能や局在から、蛋白分解に関連する遺伝子、小胞輸送関連遺伝子、フォスファチジルイノシトールシグナル伝達/代謝関連遺伝子、メチオニン代謝関連遺伝子、膜蛋白質、その他 (転写因子など) に分類されたが、特徴的なクラスターは形成しなかった。プリオン非感受性 N2a-1 における遺伝子の発現を、siRNA によりノックダウンした状態でプリオンを感染させ、PrP^{Sc}の産生が起こるか否かについて検討した。8 遺伝子について実験が終了したが、PrP^{Sc}の産生を生じる遺伝子は見つからなかった。残りの 10 遺伝子については、PrP^{Sc}産生に及ぼす影響の検討を継続している。

A. 研究目的

細胞におけるプリオンの増殖は、その主要構成要素である異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})を指標に解析することが可能である。細胞における PrP^{Sc}の蓄積は、蓄積と分解の平衡関係が蓄積側に偏っていると考えられる。PrP^{Sc}の分解に関与する宿主因子を同定することは、プリオンの細胞内複製機構の理解につながる。また、プリオンの分解過程を標的にした、プリオン病治療開発へも寄与すると考えられる。

我々は、これまでに、プリオンが増殖可能な細胞 (プリオン感受性細胞) と増殖しない細胞 (プリオン非感受性細胞) の同定を進めてきた。その過程で、プリオン感受性のマウス神経芽細胞 Neuro2a サブクローンと非感受性サブクローンを得た。プリオン非感受性サブクローンにプリオン感染マウス脳乳剤を接種した場合、PrP^{Sc}はプリオン感受性細胞と同様に結合するが、プリオンの増殖が起こらないことから、プリオン非感受性細胞では、PrP^{Sc}の合成に関わる細胞機能の低下、もしくはプリオンの分解過程が亢進している可能性がある。そこで、本研究では、プリオン非感受性細胞で高発現する遺

伝子群を同定して、それらのプリオン複製への関与を解析することを目的とした。

B. 研究方法

マウス神経芽細胞 Neuro2a (N2a) をクローン化して得た、プリオン感受性サブクローンの N2a-3 および 5、プリオン非感受性サブクローンの N2a-1 を用いた。細胞から Torizlo 試薬 (Invitrogen) により totalRNA を回収し、one-cycle IVT labeling kit (Affimetrix) にて biotin 化標識 cRNA を作製した。DNA マイクロアレイ解析は、GeneChip system により行なった。DNA マイクロアレイチップは mouse 430 2.0 (Affimetrix) を用いた。また、ABI1700 DNA マイクロアレイシステムも使用した。データは、GCOS (Affimetrix) および Avadis を用いて解析した。

個々の遺伝子発現の定量解析は定量 RT-PCR により行なった。Total RNA から First strand cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型として、TaqMan probe および TaqMan master Mix からなる反応液を作成して、ABI7900 リアルタイム PCR 装置を用いて、定

量解析を行なった。TaqMan probe は Gene Expression Analysis (Applied Biosystem) のライブラリーより購入した。内在性マーカーとして GAPDH を使用した。まず、標準曲線法により標的遺伝子の増幅が確認できたものについては、 $\Delta\Delta C_T$ 法により、遺伝子発現の比較定量解析を実施した。

siRNA は Darmachom 社のライブラリーより購入した。トランスフェクションには lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いた。35 mm に細胞を撻撒後、24 時間後に培養液を Opti-MEM に換えた。

α -tublin および PrP^{Sc} の検出はドットプロットにより行なった。24 well plate 内の細胞を 200 μ l の lysis buffer に溶解した。Lysate を 96 well に移し、低速遠心により除核した後、DNase I で処理した。 α -tublin の検出用に、100 μ l の lysate を Bio-dot (Bio-Rad) にて吸引しながら PVDF 膜にドットした。PrP^{Sc} の検出用に、80 μ l の lysate は Proteinase K (20 μ g/ml) で 37°C、1 時間処理後に、Pefabloc を終濃度 5 mM になるように加えた。これを Bio-dot (Bio-Rad) にて吸引しながら PVDF 膜にドットした。 α -tublin 検出用の PVDF 膜は、ブロッキング後に、抗 α -tublin モノクローナル抗体 (mAb) により免疫染色した。PrP^{Sc} の検出には、PVDF 膜を

3MGdnSCN で 30 分間、室温で処理した。膜をブロッキングした後、mAb31C6 により免疫染色した。抗原抗体複合体は ECL Western blotting detection system (Amersham bioscience) を用いて化学発光法により検出した。検出には LAS-3000 を使用し、定量解析を行なった。

C. 研究結果

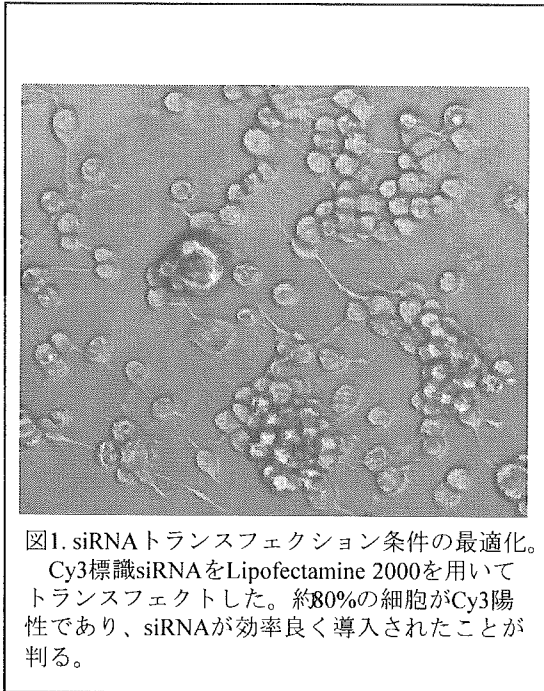
DNA マイクロアレイの結果から、N2a-5 (プリオン感受性) と比較して、N2a-1 (プリオン非感受性) で 2 倍以上発現が高い遺伝子を選抜した。特に、GeneChip および ABI1700 の両方の結果が一致する遺伝子で、遺伝子産物が明らかな 18 遺伝子を第一候補とした (表 1)。18 遺伝子が N2a-1 サブクローンで高発現することは、TaqMan probe を用いた定量 PCR により確認した (表 1)。18 遺伝子は、機能や局在から、蛋白分解に関連する遺伝子、小胞輸送関連遺伝子、フォスファチジルイノシトールシグナル伝達/代謝関連遺伝子、メチオニン代謝関連遺伝子、膜蛋白質、その他 (転写因子など) に分類された。クラスタリング解析を実施したが、特徴的なクラスターの形成は認められなかった。

siRNA を用いて候補遺伝子発現をノックダウンして、PrP^{Sc} の産生に及ぼす影響を検討す

表 1. N2a-1で高発現していた遺伝子、およびN2a-5との遺伝子発現の比較定量。

Gene Symbol	Gene title	N2a-5に対する 発現量の相対値
<i>Protease/peptidase</i>		
Ctso	cathepsin O	4.1
Capn6	calpain 6	8.0
Ace	angiotensin converting enzyme	6.5
<i>Vesicle transport</i>		
Vamp5	vesicle-associated membrane protein 5	9.9
Vamp8	vesicle-associated membrane protein 8	4.1
<i>PI signaling/Inositol phosphate metabolism</i>		
Itpr1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1	1.7
Impa2	inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	2.2
<i>Methionine biosynthesis</i>		
Cbs	cystathionine beta-synthase	5.6
<i>Focal adhesion</i>		
Parva	parvin, alpha	2.7
<i>Membrane/extracellular proteins</i>		
Igfbp1b	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1b	15.1
Chrna5	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 5	10.7
Islr	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	4.0
Klrb1d	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1D	7.6
Fcgrt	Fc receptor, IgG, alpha chain transporter	4.1
Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	3.2
Sparc11	SPARC-like 1 (mast9, hevin)	7.5
<i>Others</i>		
Hrsp12	heat-responsive protein 12	2.7
Tcea3	transcription elongation factor A (SII), 3	6.2

るために、まず、Cy3 標識 siRNA を用いて、siRNA の導入条件について検討した。最終的に80%以上の細胞に siRNA が導入可能な条件を決定できた (図 1)。この条件で、候補遺伝子



の siRNA をトランスフェクトして、候補遺伝子の発現低下が生じるかについて検討した。その結果、Capn6 以外では siRNA のトランスフェクションにより、当該遺伝子の発現が約 50% あるいはそれ以下に低下することが確認できた (表 2)。また、Vamp5 および Fcgrt の siRNA をトランスフェクトした場合、2 回の実験ともに細胞増殖が陰性対象の 50% 以下であったことから、これらの遺伝子のノックダウンは細胞増殖に影響すると考えられた。Igbp1p, Tce3, Capn6, Klr1d, Igfbp4, Impa2 は 2 回の実験のうち、一回で細胞増殖効率の低下が認められたことから、これらの遺伝子のノックダウンもある程度細胞増殖に影響すること考えられた。

候補遺伝子に対する siRNA を N2a-1 に導入した後に、I3/I5 株感染マウス脳乳剤を接種して、5 代まで連続継代を行い、N2a-1 が PrP^{Sc} 陽性となるかについて検討した。連続継代の 2 および 4 代目でも siRNA のトランスフェクションを実施した。現在まで、8 遺伝子のノックダウンを実施しているが、N2a-1 を PrP^{Sc} 陽性にする siRNA は見つかっていない。

表2. siRNAによる標的遺伝子の発現抑制効率と細胞増殖への影響

Gene symbol	Effect of siRNA on N2a-1			
	Target mRNA reduction		Cell growth	
	ex 1	ex 2	ex 1	ex 2
Igbp1b	0.21	0.15	*	
Capn6	1.16	1.90	*	
Tcea3	0.13	0.03	*	
Chrna5	0.11	0.10		
Islr	0.15	0.10		
Klr1d	0.51	0.54	*	
Cbs	0.61	0.54		
Vamp5	0.54	0.43	*	*
Parva	0.14	0.12		
Fcgrt	0.09	0.10	*	*
Igfbp4	0.16	0.09	*	
Sparcl1	0.21	0.24		
Ctso	0.35	0.24		
Ace	0.20	0.14		
Hrsp12	0.20	0.12		
Itr1	0.31	0.32		
Impa2	0.08	0.11	*	
Vamp8	0.09	0.06		

*陰性対照siRNAをトランスフェクトした細胞に比べて50%以上の細胞増殖抑制が認められた

D. 考 察

プリオン非感受性細胞で高発現する遺伝子を DNA マイクロアレイ解析および定量 PCR による遺伝子発現定量解析の結果から、18 遺伝子に絞り込んだ。これらの遺伝子は機能や細胞内局在から分類することは可能であった。このうち 16 遺伝子は膜/分泌蛋白もしくは蛋白分解酵素であった。PrP^{Sc} の産生は、脂質ラフトのような細胞膜上のマイクロドメインやエンドサイトーシスの過程で起こると考えられていることから、絞りこまれた遺伝子の中に、膜蛋白質をコードする遺伝子が多いことは興味深い。しかし、絞りこまれた遺伝子の中に、PrP^C との結合が示唆されている蛋白や、PrP^C あるいは PrP^{Sc} の分解に関与することが示唆されている蛋白をコードする遺伝子は含まれていない。また、これらは特徴的なクラスターは形成しなかったことから、現時点では、相互の関連について言及することはできない。

これらの遺伝子産物が機能的に PrP^{Sc} の生合成に関与するか否かを検証する必要がある。siRNA により遺伝子発現をノックダウンして、プリオン非感受性細胞が、プリオン感受性を示

すかについて検討しているが、これまで、プリオンの増殖・分解に係わる遺伝子が同定できていない。プリオンの感受性/非感受性は複数の遺伝子により規定されることも予想されることから、複数の遺伝子を同時にノックダウンすることも視野に入れる必要がある。

E. 結論

プリオン感受性 N2a サブクローンと非感受性サブクローンの網羅的遺伝子発現解析の結果から、プリオン非感受性細胞で高発現する遺伝子を 18 同定した。これらは、機能や局在から、蛋白分解に関連する遺伝子、小胞輸送関連遺伝子、フォスファチジルイノシトールシグナル伝達/代謝関連遺伝子、メチオニン代謝関連遺伝子、膜蛋白質、その他(転写因子など)に分類されたが、特徴的なクラスターは形成しなかった。プリオン非感受性 N2a-1 におけるこれらの遺伝子の発現を、siRNA によりノックダウンして PrP^{Sc} の産生が起こるか否かについて検討した。8 遺伝子について実験が終了したが、PrP^{Sc} の産生が認められるようになった遺伝子は見つからなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horiuchi M, Furuoka H, Kitamura N, Shinagawa M: Gut-associated lymphoid tissues are essential for prion infection via the oral route. *Jpn J Vet Res.* (in press)
- 2) Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M, Sata T: Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals. *Acta Neuropathol* 109:263-271, 2005.
- 3) Kataoka N, Nishimura M, Horiuchi M, Ishiguro N: Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, *Cervus nippon*, from Tokachi district in Hokkaido. *J Vet Med Sci* 67:349-351, 2005.
- 4) Kurosaki Y, Ishiguro N, Horiuchi M,

Shinagawa M: Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan. *J Vet Med Sci* 67:321-323, 2005.

- 5) Inanami O, Hashida S, Iizuka D, Horiuchi M, Hiraoka W, Shimoyama Y, Nakamura H, Inagaki F, Kuwabara M: Conformational change in full-length mouse prion: A site-directed spin-labeling study. *Biochem Biophys Res Commun* 335:785-792, 2005.
- 6) 堀内基広: 異常型プリオン蛋白質の生合成と伝達. *膜* 30:78-83, 2005.
- 7) 堀内基広: BSE 診断法の開発と現状. *Virus Report* 2:20-27, 2005.
- 8) 堀内基広: 人獣共通感染症としてのプリオン病. *ウイルス* 55:45-55, 2005.
- 9) 堀内基広: 動物由来感染症としてのプリオン病. *日本臨床* 63:2213-2220, 2005.

2. 学会発表

- 1) 金チャンラン、堀内基広: 培養細胞における正常プリオン蛋白質の新たな細胞内局在. 2005年プリオン研究会(山形) 2005.8.25-26.
- 2) 瓜生匡秀、堀内基広: マウス神経芽腫細胞 Neuro2a のプリオン感受性は PrP^C 以外の因子により規定される. 2005年プリオン研究会(山形) 2005.8.25-26.
- 3) 堀内基広、品川森一: 蛍光相関分光法による未変性条件下での異常型プリオン蛋白質の検出. 第53回日本ウイルス学会(横浜) 2005.11.20-22.
- 4) Kim C-L, Shinagawa M, Maeda M, Horiuchi M: Unique intracellular PrP^C localization in mouse neuroblastoma cells and NGF-responsive PC-12 cells. The 9th International Symposium for Zoonosis Control. Sapporo, Japan, August, 2004.
- 5) Yamaguchi S, Uzawa T, Nishida Y, Horiuchi M: Inhibition of PrP^{Sc} by artificially-sulfated glycosides and their polymers. The 9th International Symposium for Zoonosis Control. Sapporo, Japan, August, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

13. プロテオーム解析によるプリオン病のマーカー分子の検索と同定—PrP 結合タンパクの検索—

分担研究者 山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部

研究協力者 中村優子、大内史子、萩原健一（感染研・細胞化学部）、

研究要旨 プリオンタンパク質 (PrP^C) の機能を知ることが目的として精製用のタンデムタグ (Myc-Tev-Flag: MEF-tag) を N-末端に付した MEF-tagPrP (MHM) を N2a 細胞 (マウス神経芽細胞) に発現せしめた。持続発現細胞の MEF-tagPrP (MHM) を PI 特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLaseC) で細胞膜から遊離せしめ、Myc タグに対する抗体と TEV-protease に依る切断で MEF-tagPrP (MHM) を精製し、これに付随して精製されるタンパク質を SDS-PAGE で分画し、各々のタンパク質のトリプシン分解ペプチドを LC-MS/MS で解析する事により PrP 結合タンパクを同定した。その結果、シャペロンタンパクである Hsp70 及び細胞骨格タンパクのアクチンとこれに結合する事が知られている neurabin2, debrin, peripherin 等の細胞内タンパクが同定された。F-アクチンと neurabin2 及び peripherin が共局在する場として、神経細胞の樹状突起に存在して神経軸索からの情報の授受を行う為の特殊な構造体である“スパイン”が知られているが、N2a 細胞の樹状突起様部位や Cell-Cell junction においてアクチンと PrP^C が共局在している事が蛍光抗体法を用いて観察された。本来、膜表面に発現する PrP^C が細胞内に存在するタンパク群とどのように相互作用しているのか今後の検討課題であるが、PrP^C が細胞間の情報伝達に参与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

プリオン病/伝達性海綿状脳症の原因物質であるプリオンは宿主の神経組織に多量に発現するプリオンタンパク質 (PrP^C) の構造異性体で、プロテアーゼ部分抵抗性を獲得した異常型プリオンタンパク質 (PrP^{SC}) の会合体であると信じられている。プリオン病の確定診断はウェスタンブロット(WB)法や免疫組織化学的 (IHC) な手法で脳組織に沈着する PrP^{SC} を検出する事によって行われている。いずれの方法でも PrP^{SC} の蓄積量が増加する潜伏期末期/発症の直前の時期でなければ PrP^{SC} を検出する事は不可能である。また、これらの診断は脳を検査対象とする故に生前診断には極めて不適である。

本研究では、(1)実験感染動物 (マウス) の血液やリンパ組織などを用いて、感染から発症に至る間に変動するプリオン病に特異的な病態指標タンパク (群) を網羅的検索する事や (2)プリオンタンパクの細胞内での機能を

る事等を目的として PrP^C に特異的に結合するタンパク質群を機能プロテオミックスの手法を用いて検索同定する事等を目的とした。(1)についてはマウス順化スクレイパー(帯広1株)をマウスに接種し、発症末期(180日)まで30日毎の感染マウスの脳、脾臓及び血液(血清、白血球)を確保して比較解析を行いつつある。本年度は(2)の結果について報告するものとする。

B. 研究方法

1. プラスミドのデザインと作成及び持続発現細胞の選別

PrP の N-端側に MEF-tag、中央部に 3F4 認識 tag を付した MEF-tagPrP (MHM) の配列を pCI-Neo プラスミドの CMV Enhancer/Promoter の下流に挿入し (図 1)、リポフェクトアミン 2000 を用いて N2a 細胞にトランスフェクトした。Flow-Cytometry で Myc 及び 3F4 陽性細胞を選別し、持続発現細胞を実験に供した。

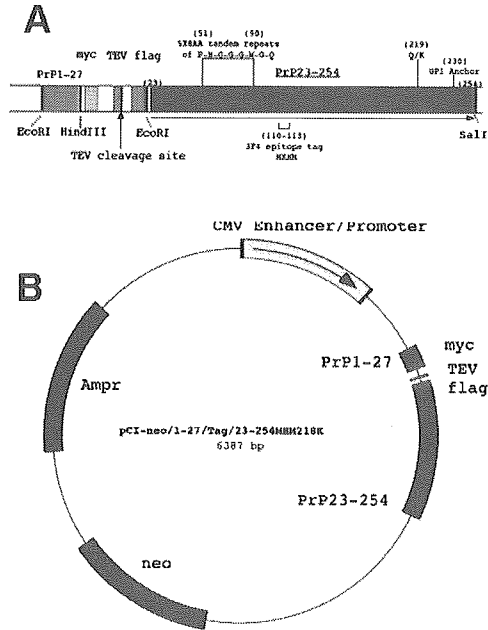


図1. MEF-tagPrP の構造(A)と発現プラスミド(B)

2. MEF-タグを利用した recPrPC の精製

MEF-tagPrP (MHM) 持続発現細胞を 10%FCS を含むダルベッコ DMEM 培地に 4 日培養した。通常 150 mm シャーレ 10 枚分の細胞をスクレイパーで集め、PBS で洗浄した後に 0.025% のトリトン X100 を含む PBS 中 PI 特異的 PLaseC により PrP を膜から遊離せしめ、遠心上清 (1000g) の MEF-tagPrP (MHM) を Myc 抗体結合アガロースで補足・濃縮した後に TEV-Protease によって Flag-PrP (MHM) を溶液中に回収した。(図 2)

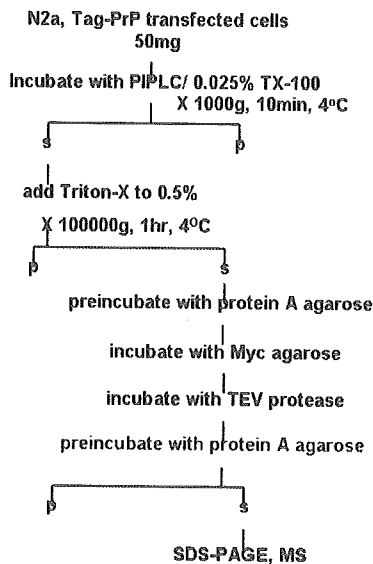


図2. MEF-tagPrP (MHM) の精製

当初は Tev-protease の除去を目的として、Flag-抗体アガロースビーズに依る精製も行う予定であったが期待した結果が得られなかったため、試料は多量の TEV-protease を含むが、TCA で沈殿濃縮した後に SDS-PAGE (10%ゲル) で分析した。

3. タンパク質の同定

シプロルビーで染色、可視化したタンパク質を常法に従って in gel digestion を行い、得られたトリプシンペプチドを質量分析 (LC-Q) で分析した。なお、検索エンジンは MASCOT 及び SEQUEST (BIOWORKS) をもちいた。

4. PrP^C 及び F-アクチンの蛍光観察

細胞膜の PrP^C 及び F-アクチンは抗プリオン抗体 (6H4) / 抗マウス IgG 抗体 (Alexa488 標識) とローダミン標識ファロイジンでそれぞれを染色し、蛍光顕微鏡で局在部位を観察した。

C. 研究結果

1. recPrP 発現の確認

細胞株が期待した、MEFtag-PrP (MHM) を持続発現しているか否かについてウエスタンブロット法で確認した。図 3 に代表的な 2 つの株について検討した結果を示した。目的タンパクが泳動される事が予想される分子量 37K 付近に Myc 及び 3F4 に対するいずれの抗体もと反応するバンドが確認された。なお recPrP は 2,1 及び非糖鎖型が存在して解釈が複雑となるので、試料は PNGase 処理で非糖鎖型として分析した。図には示さないが、このタンパク質は低温でトリトン X100 に不溶性で、1%サポニン

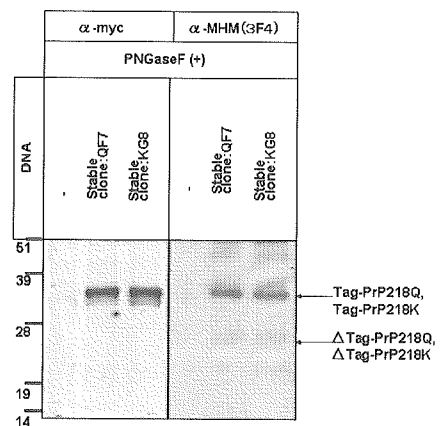


図3. WB 法による MEF-tagPrP (MHM) の発現の確認

に可溶性である事から endogenous の PrP と同様に膜ラフトに特異的に発現している事が確認された。

2. PI-PLase C によって遊離した分画からのタグをもちいた recPrP^C の精製と結合タンパクの分離同定

細胞の内在性タンパクとの非特異的な相互作用の可能性を極力避ける為に、図2に示した方法で recPrP 複合体を精製し、SDS-電気泳動で構成タンパクを分離した。その結果及び質量分析で同定する事ができたタンパクを図4に示した。

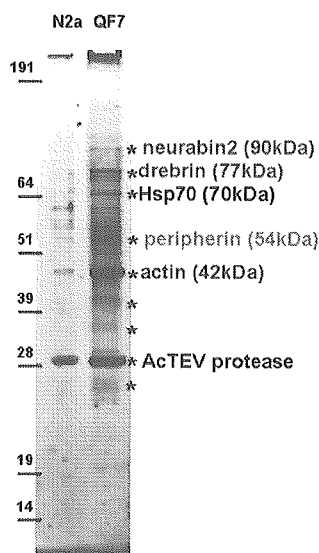


図4. MEF-tagPrP(MHM)結合タンパク質の SDS-PAGE による分離と質量分析による同定

3. 同定タンパクの性質

表1に同定した PrP 結合タンパク質に関する情報を整理して記載した。同定されたタンパク質は、HSP70 を除き、何れも細胞質のタンパクで、アクチンとの結合能を持つものであった。

4. PrP とアクチンの細胞内共局在

図5に蛍光標識した PrP とアクチンを蛍光標識してそれぞれの細胞内での分布を検討した結果をしめした。N2a 細胞では PrP とアクチンは細胞膜周辺に多く存在するが、細胞の接着部位やデンドライト様の突起部位で両者が共局在していると思われた。

	Location	Function	Neurodegenerative diseases
neurabin2	Enriched at synapse and cadherin-based cell-cell adhesion sites. Both cytosolic and membrane-associated.	Binds to actin filaments (F-actin) and shows cross-linking activity. Interacts with F-actin and D(2) dopamine receptor.	Normal ageing decreases the levels of and neurabin
drebrin	Cytoplasmic	Drebrins might play some role in cell migration, extension of neuronal processes and plasticity of dendrites, respectively. Binds F-actin	Downregulation in Alzheimer disease and Down's syndrome
actin			
peripherin	Cytoplasmic	Peripherin are class-III neuronal intermediate filament proteins	Responsible gene of Familial ALS
HSP70	Cytoplasmic	Hsp70s stabilize preexistent proteins against aggregation and mediate the folding of newly translated polypeptides in the cytosol	

表1. PrP 結合タンパク質の性状と報告されている機能

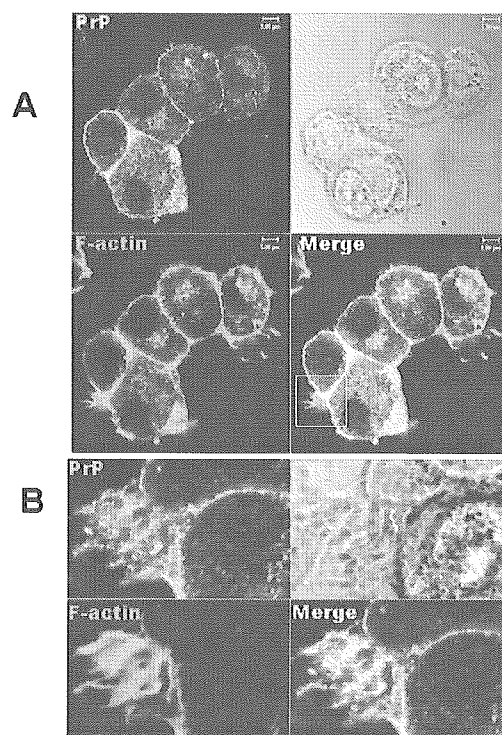


図5. N2a 細胞における PrP(endogeneous)およびアクチンの細胞内局在 (A): cell to cell junction における共局在、(B): デンドライトと様突起におけるデンドライト様共局在

D. 考察

現在までに、PrP と相互作用をする事が報告されている代表的なタンパク質には、37-kDa/67-kDa laminin receptor, Bcl-2, Hsp60 family, synapsin1b, Grb2, Pint1, N-CAMs, Stress-inducible protein1, NRAGE, heterogeneous nuclear ribonucleoproteinA2/B1, aldolaseC 等が報告されている。これらの報告は、細胞のライセートを用いる実験か、酵母の two-hybrid 法をもちいた実験から推測されたものである。前者の場合には、必ずしも生理的な条件下での相互作用

用を反映したものでは無く、後者の場合には多くの疑似反応が出るのが良く知られており、結果の解釈が難しい。我々の反応系では細胞膜の lysis を最小限に抑えた条件下で PI-特異的 PLase C で rePrP を細胞膜から遊離させており、タンパク質はより生理的な条件で精製されたものである。実際、細胞をトライトン X100 で可溶化した場合には報告されている 37k-Da/67-kDalaminin receptor が PrP^C の相互作用分子として同定されている。

今回、PrP^C がアクチンあるいはアクチン結合タンパクと相互作用をしている事を示唆する結果が得られた事に加え、N2a 細胞の cell to cell junction やデンドライト様突起の部分で PrP^C と F-アクチンが共局在している事も観察されている。今後、PrP^C が直接相互作用している相手がアクチンであるのか、幾つかあるアクチン結合タンパクの一つであるのかを明らかにするとともに、その生理的な意味について検討する予定である。

E. 結論

精製用のアフィニティータグを付した recPrP をマウス神経芽細胞 N2a に発現させ、精製 PrP と共に精製されたタンパク質群を質量分析法で同定した。その結果、PrP 結合タンパクとしてアクチン及びアクチン結合タンパク質である neurabin2、debrin、peripherin 等の細胞内タンパクが同定された。これらのタンパク質は神経細胞の樹状突起に存在し、神経軸索からの情報の授受を行う為の特殊な構造体である“スパイン”に共在することが知られており、プリオンタンパクの細胞内での機能を考えると興味深い。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M, Sata T: Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion protein in animals. Acta

Neuro Pathol 119:263-271, 2005.

- 2) 萩原健一、山河芳夫:異常型プリオンタンパク質 (PrP^{SC}) と感染性. 医学のあゆみ 215(11):887-890, 2005.
- 3) Iwata N, Sato Y, Higuchi Y, Nohtomi K, Nagata N, Hasegawa H, Tobiume M, Katano H, Nakamura Y, Hagiwara K, Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T: Distribution of PrP^{SC} in Cattle with Bovine Spongiform Encephalopathy slaughtered at Abattoirs in Japan. Jpn J Infect Dis, 2006. (in press)

2. 学会発表

- 1) Hagiwara K, Nakamura Y, Ohuchi F, Nishizima M, Yamakawa Y: Conversion of PrP^C to PrP^{SC} is prevented by inhibition of dehydrocholesterol reductase; the enzyme of the final steps in the cholesterol synthesis. 第78回日本生化学会大会(神戸)2005年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
なし

1 4. 異常プリオンの免疫系における増殖・伝播機構の研究

分担研究者 大西 和夫 国立感染症研究所免疫部

研究協力者 樋口好美、佐多徹太郎（感染研・感染病理部）

中村優子、萩原健一、山河芳夫（感染研・細胞化学部）

研究要旨 食物摂取などにより末梢から体内に侵入した異常型プリオンは、免疫系細胞を介して中枢神経系に伝播し海綿状脳症 (TSE) を引き起こすことが知られている。この時の免疫系細胞への異常型プリオン蓄積の動態を把握すると共に、免疫担当細胞培養系を用いた試験管内異常プリオン伝播モデルシステム構築を行う目的で、免疫担当細胞を磁性粒子結合抗体法を用いて分画し、免疫系細胞亜群における異常プリオンの蓄積を観察した。その結果、T細胞分画には全く蓄積がみられない反面、B細胞、マクロファージ、濾胞樹状細胞 (FDC)、ストロマ細胞を含む分画に異常プリオンを検出した。これらの細胞種の培養・株化を進め、免疫担当細胞における異常プリオン伝播モデルシステムの確立を目指している。これと並行して行った実験で、B細胞・マクロファージに発現する細胞接着分子である BILL カドヘリンの遺伝子を欠損したマウスでは異常プリオン接種後の TSE 発症に有意な遅延があることを明らかにした。このことは、BILL カドヘリンが免疫系における異常プリオンの動態に関与する分子であることを示唆しており、その関与機序について解析を進めている。

A. 研究目的

異常プリオンの末梢から中枢神経系への伝播に免疫系細胞群が関与することは、「Bリンパ球を欠損するマウスでは末梢に異常プリオンを接種しても中枢神経系へ伝達されず海綿状脳症 (TSE) は発症しない」という観察から明らかで、その関与機構については、Bリンパ球が濾胞樹状細胞 (FDC) の分化誘導を行い、FDC上の異常プリオンが中心静脈の交感神経を經由して中枢神経系に受け渡される機序が考えられてきた。しかし、FDCと中心静脈交感神経が物理的に密な接触を持ちそうもないこと、また、TNFR1 (腫瘍壊死因子受容体1) 遺伝子欠損マウスでは、FDCの分化が強く阻害されるにも関わらず中枢神経系への移行が起こることから、これまで知られていない細胞種、たとえば辺縁帯マクロファージなどが関与している可能性が指摘されている。また、末梢において、どこで異常プリオンの増殖が起こるのかも、はっきりしていない。本研究では、免疫系細胞群における異常プリオンの発現と分布を磁性粒子結合抗体法 (MACS法) を用いて検討し、異常プリオンの伝播に関与する免疫系細胞群を同定する試みを行い、さらにそのような

細胞の培養系・株化を通して、免疫系細胞における異常プリオン増殖の試験管内モデルシステムを確立することを目的としている。また、Bリンパ細胞とマクロファージに発現する細胞接着分子であるBILLカドヘリンの遺伝子欠損マウスにおける異常プリオンの動態を検討する。

B. 研究方法

1) 免疫担当細胞の分画と異常プリオンの検出: ウシ・プリオン遺伝子トランスジェニックマウスに BSE 脳乳剤を接種し、256 日後の脾臓を摘出し、コラゲネースで処理した後、MACS 法により細胞を分画した。使用した抗体は、B220 (B細胞マーカー)、CD3 (T細胞マーカー)、CD11b (マクロファージ・マーカー)、CD21 (C3bR、B細胞亜群と FDC に発現)。各カラムに保持された細胞群 (マーカー陽性) と通過した細胞群 (マーカー陰性) について、純度検定をフローサイトメトリー法で行った。各細胞分画に含まれる異常プリオンを、プロテイナーゼ K (PK) 耐性プリオンとして定法に従い検出した。