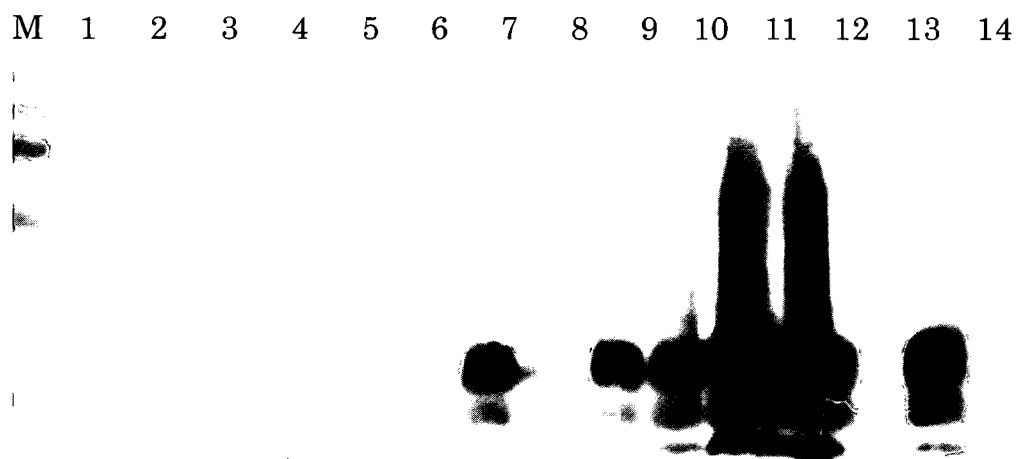


表 2 腹腔内接種後早期におけるハムスター骨格筋、坐骨神経の感染性

	発症数 / 接種総个体数	潜伏期間 (観察期間)
肩甲周囲筋	0 / 4	(~335dpi)
肋間筋	0 / 4	(~524dpi)
大腿(背面)筋	2 / 4	193, 200dpi (>630dpi)
ヒラメ筋	4 / 4	181, 226, 320, 465dpi
坐骨神経	0 / 4	(>546dpi)
坐骨神経(6w)	0 / 4	(>546dpi)
坐骨神経(8w)	0 / 4	(>546dpi)

dpi : days post inoculation, ~335dpi:335 日で観察を終了し全て免疫組織化学、WBにて検査済み。 >546dpi, >630dpi:観察続行中。
 週数の表示がないものはすべて腹腔内接種 4 週目の材料を使用している。

図1 ハムスター骨格筋接種後の脳における PrP^{res}



M: 分子マーカー

1:肩甲周囲筋接種 200dpi, 2:同接種 250dpi, 3:同接種 284dpi

4:肋間筋接種 200dpi, 5:同接種 250dpi, 6:同接種 524dpi

7:大腿(後面)筋接種 200dpi, 8:同接種 250dpi

9:ヒラメ筋接種 200dpi, 10:同接種 250dpi, 11:同接種 328dpi,12:同接種 468dpi,

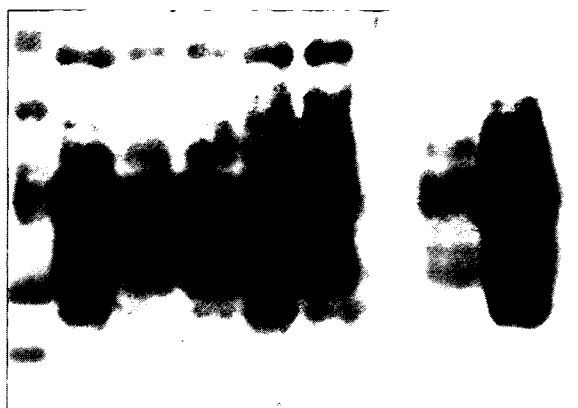
13:非感染ハムスターヒラメ筋接種 200dpi, 14:263K 脳接種(陽性コントロール)

脳乳剤はいずれも proteinase K にて 1 時間消化し、1 次抗体は 3F4 を用いた。

図2 BSE 感染牛 VNO からの PrP^{res} 検出

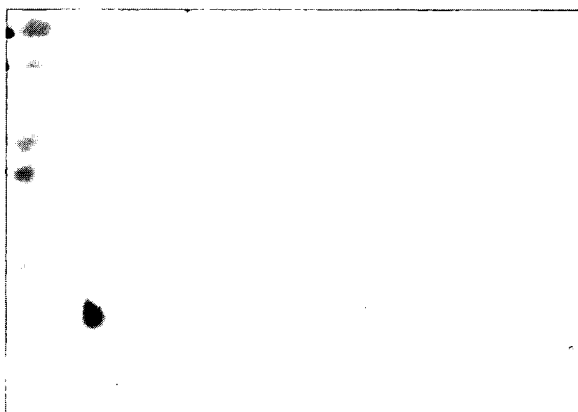
PK-

M 1 2 3 4 5 6 7 8



PK+

M 1 2 3 4 5 6 7 8



M: 分子量マーカー

1: BSE 接種(i.c.)19 ヶ月後(No.3955)

2: BSE 接種(i.c.)16 ヶ月後(No.2601)

3: BSE 接種(i.c.)25 カ月後(No.3217)

4: BSE 接種(i.c.)23 カ月後(No.5523)

5: BSE 接種(i.c.)6 カ月後、未発症

6:(empty)

7:非感染牛 20 ヶ月齢 VNO

8:非感染牛 20 ヶ月齢小脳

1 次抗体は T2 を用いた。

血液中の分子を指標としたプリオン病の生前診断に関する研究

分担研究者：横山 隆 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究協力者：Seong Soo A. An PeopleBio, Inc

研究要旨

血液を用いたプリオン病の生前診断法を確立するには、各動物種における血液中のプリオンの動態の差異を明らかにする必要がある。Multimer Detection System(MDS)法を用いて、スクレイピー感染羊の血液からの PrP^{Sc} の検出について検討した。MDS は同一または近似したエピトープを認識する抗体を用いたサンドイッチ固相酵素免疫測定法（ELISA）で、多量体 PrP(PrP^d)のみを選択的に検出することが可能となる。MDS 法によりスクレイピー感染羊の血漿から PrP^d と考えられるシグナルが認められた。

A. 研究目的

プリオン病の感染動物では宿主の正常プリオン蛋白質(PrP^C)の構造異性体である異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})が認められる。PrP^{Sc}は現在までのところ唯一のプリオン病特異マーカーであるが、その蓄積は中枢神経系や一部のリンパ組織に限局している。

変異型ヤコブ病(vCJD)患者の疫学調査および牛海綿状脳症(BSE)実験感染羊を用いた研究から、輸血によるプリオン病の伝達の危険性が示唆された。プリオンの血液中での動態を明らかにすることは、輸血に伴うプリオン感染の問題解決のために重要である。プリオン感染マウス、ハムスター、羊を用いて、血液中からの PrP^{Sc} の検出を試み、あわせて各動物種でのプリオンの体内動態を明らかにする。

B. 研究方法

スクレイピー実験感染羊、マウス、ハムスターの血液（白血球、血漿）から PrP^{Sc} の検出を試みる。本年度は multimer detection system (MDS) 法を用いた疾病特異的な多量体プリオン蛋白質 (PrP^d) の検出法について検討する。

（倫理面への配慮）

プリオン感染動物および材料の取り扱いには動物衛生研究所内のバイオセーフティレベル（BSL）3 実験施設にて行い、汚染物は 135°C、30 分間のオートクレーブ処理等により不活化した。すべての実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会、実験動物委員会の許可を受けて実施している。

C. 研究結果

昨年度までの研究でマウス、ハムスターの血液中からウエスタンブロット法では PrP^{Sc} が検出されなかった。ハムスターでは protein misfolding cyclic amplification(PMCA)法により血液中より PrP^{Sc} を検出することが可能であったが、他の動物種由来 PrP^{Sc} の増幅には至っていない。本年度は、スクレイピー感染ハムスターおよび羊の血漿より凝集体 PrP(PrP^d)の検出法の開発と応用について検討した。現行の PrP^{Sc} の検出法は PrP^C と PrP^{Sc} のプロテイナーゼ K(PK)抵抗性の差異を利用している。すなわち、試料に PK 処理を行い、残存する PrP を PrP^{Sc} として抗体により検出している。一方、PrP^{Sc} は不

溶化し、凝集体を形成することが知られている。この凝集体を特異的に検出する方法は、PK 処理を省略した、簡便な疾病由来 PrP^dの検出法として期待される。

同一の抗体または近似した PrP の領域をエピトープとして認識する 2 種類の抗体によるサンドイッチ固相酵素免疫測定法(ELISA)により、多量体 PrP を特異的に検出する MDS 法を確立した(図 1)。

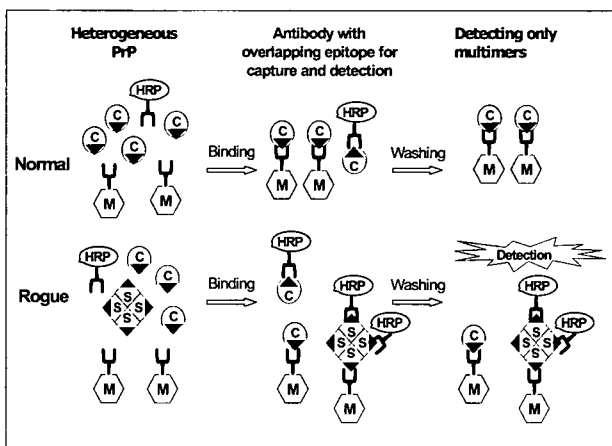


図 1 MDS 法の原理

MDS 法を用いて、スクレイピー感染羊及び非感染羊(健康家畜)の血漿から PrP^dの検出を試みた。PrP 遺伝子型 MARQ/MARQ のスクレイピーから PrP^dと考えられるシグナルが検出されたが、正常羊に PrP^dのシグナルは認められなかった(図 2)。

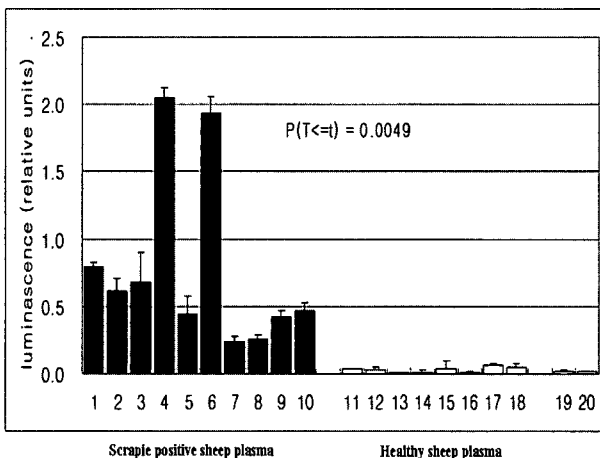


図 2 MDS による羊血漿からの PrP^d 検出

D. 考察

スクレイピー羊の血漿から PrP^dのシグナルが検出された。供試した羊はいずれも臨床症状期の個体であり、PrP^dの出現時期やその動態の解明が必要である。検出された PrP^dは PK 感受性であったことから、プリオン病の発病および PrP^{Sc} への変換の際の役割および意義についても明らかにする必要がある。その他の遺伝子型のスクレイピー羊における PrP^dの動態も検討することが必要である。また、羊以外の動物種の血液からの PrP^d検出法としての応用性についての検討も必要である。特に BSE 牛では、他のプリオン病と異なり、PrP^{Sc}の蓄積がほぼ中枢神経系に限局している。BSE 感染牛の血液中の PrP^dの動態に関する検討は、牛の体内でのプリオンの伝播ならびに発病機構の解明につながるものと期待される。

E. 結論

多量体 PrP^dを検出するための MDS 法を確立した。本法を用いてスクレイピー感染羊の血液(臨床症状期)より PrP^dのシグナルが検出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokoyama T, Shimada K, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Ushiki Y.K, Kimura K.M, Itohara S, Shinagawa M. Both host prion protein 131-188 subregion and prion strain characteristics regulate glycoform of PrP^{Sc}. Arch Virol. (in press)

2. 学会発表

1. An S. S. A. et al., Detection of PrP^{Sc} in plasma from sheep using a multimer detection system-3D. NeuroPrion 2006, Italy, Oct, 2006.

2. Yokoyama T. et al. Alteration in the biological characteristics of BSE prion monitored by their incubation period in transgenic mice. NeuroPrion 2006. Italy ,Oct,2006.
 3. Yokoyama T. Biological characteristics and species barrier of BSE prion. BSE seminar towards the control of prion diseases- 2006. Tokyo ,2006,10.
 4. 横山隆. プリオンの脅威：牛海綿状脳症 (BSE)の危険性を考える 第80回日本感染症学会,2006.4.
- 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

ヒトプリオン病診断のためのモノクローナル抗体の応用

分担研究者：松田 治男 広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学

研究要旨

本研究では、これまでに得られた抗体を CJD をはじめとするヒトプリオン病の診断に応用展開するため、HRP 標識抗 PrP ニワトリ組換えモノクローナル抗体（2種の組み合わせ抗体）の有用性を確認した。さらに、プリオン病の診断のマーカーとして heart fatty acid binding protein (H-FABP) を選び、組換え H-FABP を作製するとともに、これを免疫原として抗 H-FABP ニワトリモノクローナル抗体を新規に作製し、拮抗 ELISA 法による H-FABP の検出系の構築を試みた。

A. 研究目的

BSE の免疫学的診断のための各種モノクローナル抗体を作製してきたが、それらの抗体のなかには CJD をはじめとするヒトプリオン病へ応用出来る優れた抗体もある。そのため、本研究ではそれらの抗体を用いたヒトプリオン病の診断のための基礎実験として HRP 標識抗 PrP ニワトリ抗体を用いた直接法によるスクレーパー感染マウス脳やヒト sCJD 脳を材料とした PrP^{sc} の検出、さらに、CJD の有用なマーカーとなる H-FABP^{1,2)}を一抗体法で検出可能な拮抗 ELISA 系構築を行うことを目的とした。なお、本年度の研究においては H-FABP に主眼をおいた。

B. 研究方法

1. PrP^{sc} の検出：

BSE の免疫学的診断のための研究経験を生かして、これまでに当研究室で作製した抗 PrP ニワトリパネルモノクローナル抗体から選抜した抗体2種（Ab3-15 および Ab4-19）について、これらの抗体を HRP 標識して、ウエスタンブロットによるスクレーパー感染マウス脳やヒト sCJD 脳を用いた PrP^{sc} の検出を行うことで抗体の評価を行った。なお、ヒト sCJD 脳（扁桃

体）を用いた実験は九州大学大学院神経病理学で実施した。

2. H-FABP の検出：

大腸菌で作製した組換えヒト H-FABP を抗原として、これを高度免疫した HB-15 純系ニワトリの脾細胞を出発材料として、抗 H-FABP ファージ抗体ライブラリーを作製した。これから真核系細胞で発現させた二価抗体（IgY 型抗体）を作製し、これを固相化したプレートとビオチン標識 H-FABP を活用して、H-FABP の検出のための拮抗 ELISA の系を構築した。

本研究に用いた H-FABP は、GST 融合タンパクとして作製し、グルタチオン・セファロース 4B を用いて H-FABP 標品を得た。H-FABP のビオチン標識は、Biotin Peroxidase Labeling Kit-NH₂ を用いて、添付の使用説明書に従って行った。なお、ビオチン標識 H-FABP の確認は ELISA 及びウエスタンブロットにて行った。

拮抗 ELISA は、ビオチン標識 H-FABP（500 倍~4000 倍）と検体（本年度は CJD 患者試料の代わりに心筋梗塞患者血清を活用した）30 μl を混合させた後、本研究で作製した抗 H-FABP 二価抗体（抗体濃度は 0.5 μg/ml ~125

ng/ml) を固相化したイムノプレートに加えて反応・洗浄後に HRP 標識 streptavidin を反応させ、TMB 発色液を用いて 450 nm の吸光度を測定した。結果は標準試料 (組換え H-FABP) によるビオチン標識 H-FABP の結合阻害を元にした標準曲線から算出した。

心筋梗塞患者の血清サンプルは、(独) 国立病院機構東広島医療センターの循環器科より同センター及び患者の同意を得て使用した。健康人サンプルは、広島大学保健管理センターで採血した学生ボランティアから得た血清・血漿を用いた。

ファージ発現抗体の二価抗体化 (IgY 型化) は、VH および VL 遺伝子を当研究室で作製した H 鎖用および L 鎖用発現ベクター³⁾に挿入し、CHO 細胞または HEK293F 細胞に co-transfect させ、その培養上清から調整した。

C. 研究結果

1. HRP 標識ニワトリモノクローナル抗体を用いた PrP^{sc} の検出

スクレーパー感染マウス脳およびヒト sCJD 扁桃体を用いたウエスタンブロッティングを実施した。スクレーパー感染マウス脳については 100~1.6 mg/lane、sCJD 扁桃体については 500~7.8 mg/lane で PK 処理材料を SDS-PAGE に供した。使用した抗体は、HRP 標識 Ab-3-15、HRP 標識 Ab4-19、両標識抗体の混合液ならびにマウスモノクローナル抗体 (3F4) を用いた。その結果、スクレーパー感染マウス脳については、2 種の HRP 標識抗体を混合液は供試最低濃度まで PrP^{sc} を明瞭に検出し得た (図 1)。また、sCJD 扁桃体についても供試最低濃度まで PrP^{sc} を明瞭に検出し得た (図 2)。

2. 組換えヒト H-FABP の作製とビオチン標識 H-FABP

組換えヒト H-FABP は、Glutathione Sepharose 4B を用いて精製した。GST 融合 H-FABP を精製し、その後 H-FABP を精製する

2 段階の精製を行った。まず Glutathione Sepharose 4B にて GST 融合 FABP をアフィニティー精製し、すべての溶出画分で分子量約 40 kDa の位置に GST 融合 H-FABP のバンドが確認した。続いて Glutathione Sepharose 4B にて H-FABP をアフィニティー精製し、溶出画分に分子量約 14~15 kDa の位置に H-FABP のバンドが確認した。溶出画分に H-FABP のバンドが確認されたので、混合して PBS に透析後、タンパク質濃度を測定した。結果、LB 培地 600 ml に対して約 6.4 mg の H-FABP を回収できた。ビオチン標識 H-FABP は、ウエスタンブロッティングによって確認した。

3. ファージ抗体ライブラリーとパニング選択

組換え H-FABP を免疫したニワトリの脾細胞より合成した cDNA より、VH 及び VL 遺伝子を増幅し、リンカー遺伝子とアッセムブリー、再増幅した結果、約 780 bp の scFv 型抗体遺伝子が確認された。この scFv 型抗体遺伝子は、ファージ抗体発現用ベクター pPDS にクローニング後、大腸菌 XL1-Blue に形質転換し、ファージ抗体ライブラリーを調製した。調製したファージ抗体ライブラリーのライブラリーサイズは 2.6×10^7 cfu/ μ g plasmid DNA であった。

ファージ抗体ライブラリーからの抗原特異的ファージ抗体は、ビオチン標識 H-FABP を抗原としたパニング選択を行い、4 回パニング選択後のファージ抗体ライブラリーで最も高い反応性を示したことから、4 回パニング選択後のファージ抗体ライブラリーを用いて、ファージ抗体クローンを発現させた。得られたクローンは塩基配列及びアミノ酸配列の解析から 4 クローンに収束していた。

4. H-FABP 特異的ニワトリ IgY 型抗体の作製

H-FABP 特異的 IgY 型抗体 (HUFa1、HUFa2、HUFa3 および HUFa4) は調整したニワトリ IgY 型抗体発現ベクターを真核細胞に遺伝子導入することで発現させた。導入 72 時

間後に培養上清を全量回収し、培養上清中のニワトリ IgY 型抗体を Probond Purification System を用いてアフィニティー精製した。精製後の各画分を SDS-PAGE 及び CBB 染色した結果、溶出画分にそれぞれ約 200 KDa の単一バンドが検出された。全ての溶出画分でニワトリ IgY 型抗体が確認できた。4 種培養上清の抗体濃度は $10 \mu\text{g/ml}$ ~ $300 \mu\text{g/ml}$ であった。4 種の IgY 型抗体の特異性をビオチン標識 H-FABP を抗原とした ELISA で調べ、以下の拮抗 ELISA 用抗体として HUFa1 を選択した。

5. 拮抗 ELISA の構築

拮抗 ELISA における固相化抗体濃度及びビオチン標識 H-FABP 濃度は、抗体固相化濃度が 500 ng/ml 、 250 ng/ml 、 125 ng/ml の 3 条件、ビオチン標識 H-FABP 濃度が 500 倍希釈、1000 倍希釈、2000 倍希釈及び 4000 倍希釈の 4 条件検討した。抗原には未標識 H-FABP を用いた。その結果、最適の条件は、固相化抗体濃度は 500 ng/ml 、ビオチン標識 H-FABP 濃度は 2000 倍希釈であった。また、一次反応の温度及び時間は $37^\circ\text{C} \cdot 60 \text{ 分}$ 、二次反応の温度及び時間は室温・10 分がそれぞれ最適であった。これらの最適化条件で組換え H-FABP を定量したところ、ビオチン標識 H-FABP による組換え H-FABP の結合阻害 (80%阻害) 条件で、H-FABP の約 1~10 ng/well であった (図 3)。

6. 心筋梗塞患者の血清中の H-FABP の検出

心筋梗塞患者血清を H-FABP 検査試料として、設定条件で拮抗 ELISA を実施した。心筋梗塞患者血清は 2 検体 (うち女性 1 検体、男性 1 検体) でそれぞれ女性が心筋梗塞発症 1 時間後、7 時間後、14 時間後の血清 (3 サンプル)、男性が入院時と心臓カテーテル検査直前の血清 (2 サンプル) を用いた。健常人試料を含め全てのサンプルで H-FABP が検出された (図 3)。特に心筋梗塞患者血清については、病態変化とほぼ一致して数値の上昇が観察された。

D. 考察

筆者らは、これまでにニワトリモノクローナル抗体作製技術を駆使して PrP を認識する多様な抗体をパネル抗体として樹立している。さらに、ファージ発現抗体を IgY 型抗体に組み換える技術も構築することで、PrP 検出の高感度および安定的利用を可能としてきた。今回は、これまでのマウス感染脳や BSE 脳を利用した実績から、パネル抗体から Ab3-15 と Ab4-19 の 2 種の抗体を選び HRB 標識して使用した。特に Ab4-19 抗体は二糖鎖型 PrP と反応しないこと、無糖鎖型 PrP を比較的強く認識するという特徴を生かして、標識 Ab3-15 と標識 Ab4-19 を混合して利用することによる検出の相乗効果を意識して実施した。その結果、2 種の標識抗体単体のみでも PrP^{sc} のシグナルを検出し得たが、2 種抗体の混合利用による PrP 検出の相乗効果は、感染マウス脳のみならず sCJD 脳においても確認された。本研究で活用した 2 種の標識抗体については、今後ヒト CJD 脳のみならず、CJD 患者等の脳脊髄液他に活用していきたい。一方、近年 CJD の診断法は急速な進展を見せ、特に CSF 中の 14-3-3 タンパク質の検出は sCJD を高い感度で特異的に診断できるとされている。しかしその後の研究で擬陽性・擬陰性共に高い確率で出現することが指摘されてもいる。そこで、本研究では新たなプリオン病診断マーカーとしてその有用性が示唆されている H-FABP に着目し、H-FABP の検出法を構築した。

まず H-FABP の検出法を構築するために H-FABP 特異的抗体の作製を行い、最終的に HUFa1 抗体を選抜するとともに IgY 型抗体に組み換え、H-FABP 検出のための拮抗 ELISA 系を構築した。著者らは、すでに PrP ペプチド拮抗 ELISA による PrP^{sc} の高感度検出系の構築に成功しているが、本実験では得られた抗体のエピトープが決定されていないことから、本研究では H-FABP をビオチン標識して用いた。

本研究での拮抗 ELISA での H-FABP 検出限界は約 1-10 ng/well であった。

本研究では、ヒト H-FABP 検出のための検体を心筋梗塞患者の血清として使用した。H-FABP は心筋梗塞のマーカーとしての有用性が確立しており、H-FABP を免疫学的に測定する簡易 H-FABP 測定キットがすでに発売されている。こうした背景から、CJD 患者の CSF のモデルサンプルとして利用できると考えた。東広島医療センターより分与を受けた血清サンプルは 2 検体（うち女性 1 検体 3 サンプル、男性 1 検体 2 サンプル）であり、心筋梗塞発症 1 時間の女性サンプル（約 16 ng/ml）を除く検体で有意な H-FABP が検出された（84 ng~136 ng/ml）。Steinacker ら（2004）は、CJD 患者 14 名（平均 73 歳）の血清 H-FABP レベルが約 4 ng/ml、CSF の H-FABP レベルが約 7.3 ng/ml と算出している。このことから、CJD 患者 CSF から H-FABP を検出するためには、心筋梗塞の症例とは異なり、より低濃度の H-FABP を検出することが望まれる。本研究で最適化した拮抗 ELISA の検出限界が約 1-10 ng/well であったことから、今後、拮抗 ELISA 系に用いるビオチン標識 H-FABP をビオチン標識 H-FABP ペプチドに切り替えることで更に検出感度の向上が図れると思われる。そのために、供試抗体（HUFa1）の認識エピトープ解析は不可避であろう。

（倫理面への配慮）

sCJD 患者脳材料を用いたウエスタンブロッティングは、すべて九州大学大学院神経病理学研究室で岩城・佐々木両博士の指導下で実施された。一方、供試したヒト H-FABP サンプルとしての心筋梗塞患者血清は、（独）国立病院機構東広島医療センター（旧国立療養所広島病院）ならびに患者の同意を得て使用した。

E. 結論

Ab3-15 ならびに Ab4-19 の PrP 特異的ニワ

トリモノクローナル抗体を sCJD 患者脳 PrPsc 検出に有効に利用することができた。また、本研究において作製した組換え H-FABP をニワトリに高度免疫して抗 H-FABP ニワトリモノクローナル抗体を作製した。IgY 型に組換えた 4 種の抗体から 1 種（HUFa1）を選択して、本抗体を固相化したマイクロプレートを用いる拮抗 ELISA 系を構築した。本アッセイ系の H-FABP 検出感度は約 1 ng/well であった。

【参考文献】

1. Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard P R, Hochstrasser D F, Sanchez J-C . A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics*2003;3:1495-1499.
2. Steinacker P, Mollenhauer B, Bibl M, Cepek L, Esselmann H, Brechlin P, Lewezuk P, Poser S, Kretzschmar H A, Wiltfang J, Trenkwalder C, Otto M. Heart fatty acid binding protein as a potential diagnostic marker for neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett* 2004;370:36-39.
3. Shimamoto T, Nishibori N, Aosasa M, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H. Stable production of recombinant chicken antibody in CHO-K1 cell line. *Biologicals* 2005;33:169-174.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyamoto K, Shimamoto T, Aosasa M, Nakamura N, Okubo Y, Yokoyama T, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H. Development of recombinant chicken IgY

from single chain fragment of variable H. 知的財産権の出願・登録状況
region for diagnosis of BSE. Biologicals. なし
2007;vol35(1):31-34.

(スクレーピー感染マウス脳サンプル($\mu\text{g} / \text{lane}$))

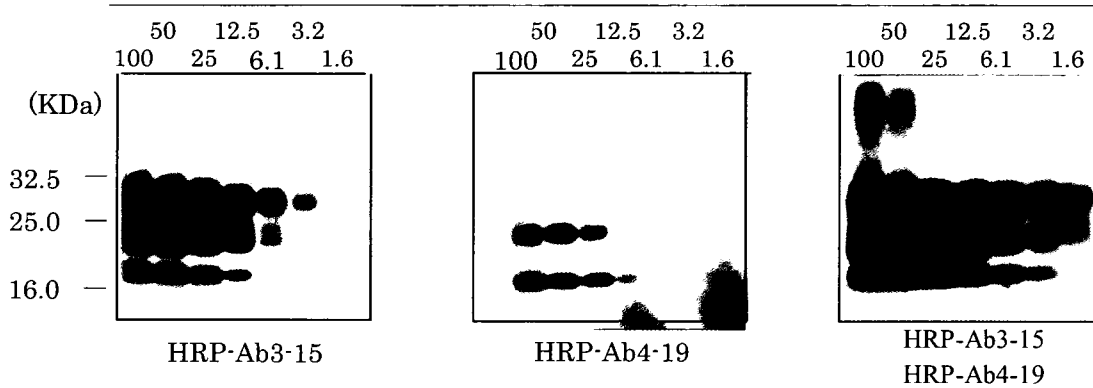


図 1. HRP 標識組換え IgY 型抗 PrP ニワトリ mAb による PrPSc 検出

sCJD 患者の扁桃体(PK 処理サンプル) (mg brain / lane)

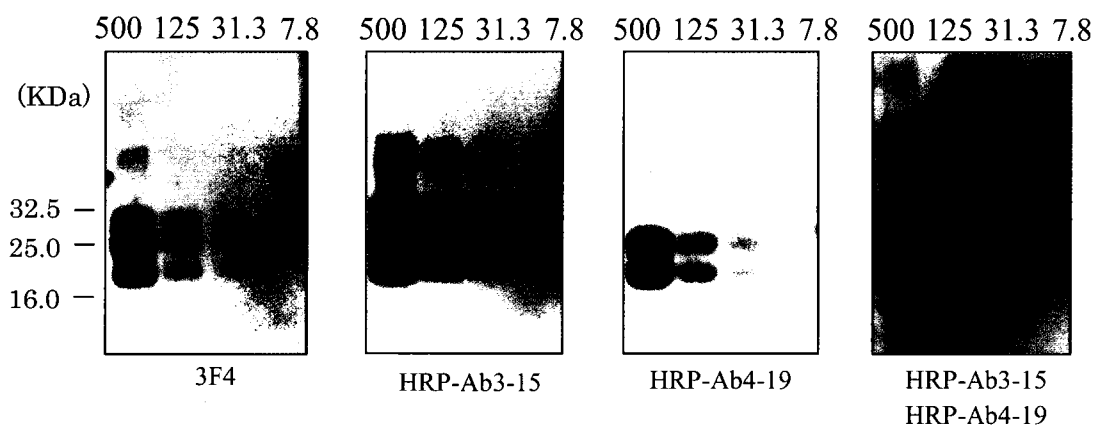


図 2. HRP 標識組換え IgY 型抗 PrP ニワトリ mAb による PrPSc 検出

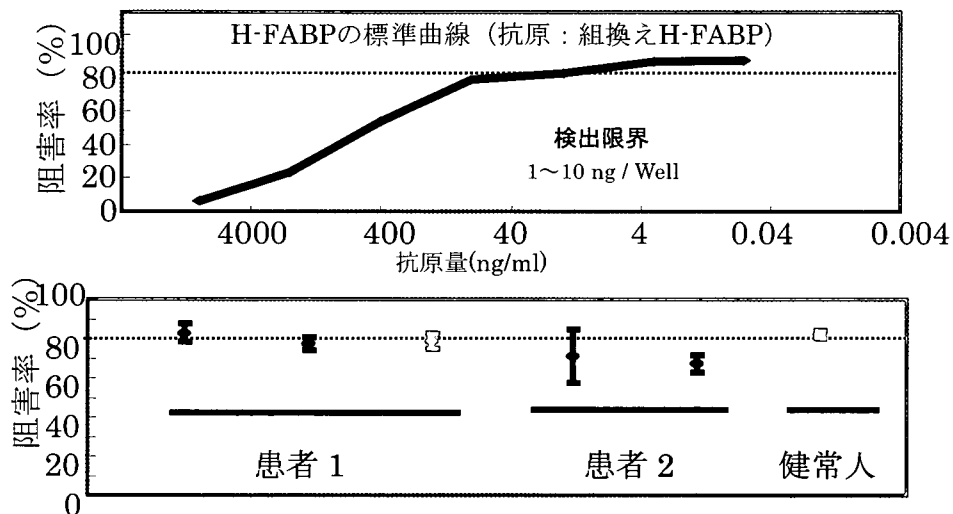


図 3. H-FABP 標準曲線と心筋梗塞患者からの H-FABP 検出

伝達性海綿状脳症におけるシナプス関連蛋白質の解析

分担研究者：岩城 徹 九州大学大学院医学研究院神経病理

研究協力者：佐々木健介 九州大学大学院医学研究院神経病理

研究要旨

伝達性海綿状脳症モデルマウスの検討により、異常プリオン蛋白の沈着に伴いシナプス関連蛋白の発現が低下して、神経伝達機能の障害に関与している可能性があり、特にシナプス開口分泌がより早期から低下する可能性が示された。また、軸索輸送の障害により、シナプス関連蛋白の分布異常を来してより広範囲な機能異常を呈しうると考えられた。

A.研究目的

伝達性海綿状脳症(TSE)におけるシナプス関連蛋白の発現に関して、主に synaptophysin (SYP)の発現低下が報告されている¹が、シナプス分子の機能と局在にもとづいた総括的かつ経時的解析はほとんど報告がない。ヒト剖検脳を用いた検討では、SYPとSNAP-25の染色性を比較してSNAP-25のほうが相対的に強く発現低下している傾向があり、その逆のパターンを示す症例も見られ一定しなかったが、シナプス関連蛋白の発現変化は病期および機能局在によって異なると考えられた。そこで本年度は、モデルマウスを用いてシナプス関連蛋白発現の経時的变化を中心に検討した。

B.研究方法

TSE動物モデルとして、NZWマウスに福岡1株を脳内接種した後、0.5ヶ月から4.5ヶ月(病末期)まで経時的に採取した脳標本を用いて、免疫染色およびウェスタン・ブロットによる解析を行った。シナプス関連蛋白は、SYP、SNAP-25の他、syntaxin(STX)、synaptobrevin (SYB)、synaptotagmin (SYT)、synapsin (SYN)の発現変化を検討した。また、海綿状変化の程度について画像ソフトを用いて検討し、プリオン蛋白の免疫染色とウェスタン・ブロッ

トで異常プリオン蛋白沈着の程度を比較した。

(倫理面への配慮)

特記すべきことはない。

C.研究結果

SNAP-25とSTXはプリオン蛋白沈着部位(視床外側、大脳白質)での局所的な染色性低下が目立っていた。SNAP-25では大脳皮質を含む広範囲な染色性低下を認めたが、STXの大脳皮質での染色性低下は比較的軽度であった。SYBとSYPは、プリオン蛋白沈着部位に限らず全脳性に染色性が低下していたが、SYBのほうがより早期から低下している傾向が見られた。SYTとSYNは染色性が弱く評価困難であった。視床外側の海綿状変化の検討で、接種後3.0ヶ月から空胞形成が顕著となっていた。ウェスタン・ブロットによる蛋白発現の経時的变化の解析では、プロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白は3.5ヶ月から著明に増加するのに対して、シナプス関連蛋白は一過性の発現増加の後、SYBとSNAP-25が早期から(2.5-3.0ヶ月)、SYPは遅れて(3.5ヶ月)発現低下し、STXは発現量の変化が少ないことが示された。

D. 考察

シナプス関連蛋白の機能局在として、SNAP-25 と STX はシナプス終末の細胞膜に存在する t-SNARE、SYB はシナプス小胞に存在する v-SNARE として、また SYT は Ca²⁺ イオンセンサーとして開口分泌に関与する。SYP はシナプス終末の膜陥入、シナプス小胞の再形成に関わり、SYN はシナプス小胞の貯蔵に関与していると考えられている^{2,3}。これらの蛋白の発現低下が神経伝達機能の障害に関与している可能性があり、特にシナプス開口分泌がより早期から低下する可能性が示された。マウス脳白質のプリオン蛋白沈着は、軸索輸送の障害を反映している可能性があり、シナプス関連蛋白の供給異常を来すなどして、より広範囲な機能異常を呈しうると考えられた。病初期のシナプス蛋白発現量の一過性増加は、アルツハイマー病症例の検討で報告されたデータ⁴と一致しており、その意義は未だ不明であるが、シナプス蛋白免疫染色の染色性パターンが症例により一定しないことの原因の一つと考えられた。

E. 結論

TSE における機能局在の異なるシナプス関連蛋白の発現変化の違いが明らかとなり、早期から神経伝達機能の障害を来す可能性が示された。

[参考文献]

1. Kitamoto T. et al. Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 1992;140:1285-1294.
2. Martin TF. Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation. *Nat Cell Biol* 2000;2:E9-E11.
3. Thiele C. et al. Cholesterol binds to

synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2000;2:42-9.

4. Mukaetova-Ladinska EB. et al. Staging of Cytoskeletal and β -Amyloid Changes in Human Isocortex Reveals Biphasic Synaptic Protein Response during Progression of Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* 2000;157:623-36.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K. Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathy. *J Neurochem* 2006;99:198-205.
2. Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K. Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull* 2006;29:927-932.
3. Noda K, Sasaki K, Fujimi K, Wakisaka Y, Tanizaki Y, Wakugawa Y, Kiyohara Y, Iida M, Aizawa H, Iwaki T. Quantitative analysis of neurofibrillary pathology in a general population to reappraise neuropathological criteria for senile dementia of the neurofibrillary tangle type (tangle-only dementia): The Hisayama study. *Neuropathology* 2006;26:508-518.
4. Sasaki K, Doh-ura K, Ironside JW, Mabbott N, Iwaki T. Clusterin expression in follicular dendritic cells associated

with prion protein accumulation. J Pathol. 2006;209:484-491.

5. 佐々木健介. CJDの病理学的評価基準. Clin Neurosci 2006;24:327-330.

2.学会発表

1. Sasaki K, Iwaki T. Expression of synapse-related proteins in the transmissible spongiform encephalopathies. 16th International

Congress of Neuropathology, San Francisco, Sep 11-15.2006.

2. 佐々木健介, 岩城徹: 伝達性海綿状脳症における病理学的マーカーとしてのシナプス関連タンパク発現の解析, 第47回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, 2006.5.24-26

H 知的財産権の出願・登録状況
なし

正常型プリオン蛋白質の細胞内輸送機構の解明

分担研究者：金子 清俊 東京医科大学神経生理学講座

研究協力者：八谷 如美 東京医科大学神経生理学講座

研究要旨

これまでに我々は、マウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞および GFP 融合正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) を用いて、生細胞内での trafficking を解析し、PrP^C が微小管依存性に局在・移動していること、また、順方向性輸送がキネシン依存性、逆行性輸送はダイニン依存性であることを見出している。また、神経成長因子 NGF 依存性分化応答細胞株である PC12 細胞を用い、分化誘導前後での PrP^C の細胞内輸送を解析した結果、PC12 細胞の細胞体内においては、分化誘導に関わらず、N2a 細胞とほぼ同様に、順行性に 150 nm/sec、逆行性に 1 μm/sec での移動が観察されたが、NGF による分化誘導後の樹状突起内においては、順行性輸送速度の平均がほぼ 50 nm/sec と著明な輸送速度の低下が見られた。同じ樹状突起内においても、逆行性輸送速度には変化は見られなかった。以上の結果をさらに詳細に解析するために、今年度我々は、N 末端標識 GFP 融合 PrP^C、C 末端標識 DsRed 融合 PrP^C の持続発現 PC12 細胞株を樹立した。今回我々が樹立した細胞株を用いた検討により、分化誘導に伴い形成される樹状突起内において、(1) 細胞体内と異なり順行性細胞内輸送において PrP^C が局在している輸送小胞が少なくとも 2 種類存在しているのか、(2) PrP^C を含む同一の輸送小胞が細胞体内から樹状突起に移動する際に異なるモーター蛋白質への乗換えが生じているのか、いずれが正しいかを明らかにすることが期待される。

A. 研究目的

感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) 生成に関する膨大な研究成果と異なり、正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) の細胞内での動態についてはほとんど研究されていない現状を踏まえ、以前より我々は、細胞内可視化の系を用いて PrP^C のマウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞内挙動を観察することにより、N2a 生細胞内での trafficking を解析し、以下に挙げる新しい事実を見出してきた。

1) 微小管阻害剤であるノコダゾールにより、PrP^C の細胞内局在パターンが明らかに阻害されたことから、PrP^C の細胞内局在に

は微小管が関与していることを明らかにし、さらに試験管内の再構成実験により、PrP^C と微小管との相互作用を確認した。

2) N 末端に GFP を融合した PrP^C を発現させ細胞内の動きをタイムラプスにて詳細に観察した結果、PrP^C の微小管依存性順行性及び逆行性輸送を見出した。

3) タイムラプス計測によって得られたデータから順行性及び逆行性輸送速度を計算し、さらに各阻害剤を添加した実験から、順行性輸送はキネシンスーパーファミリーの KIF4 によって、逆行性輸送はダイニンによって行われていることを明らかにし、PrP^C のアミノ酸配列上、各輸送に関

わる部分を同定した。

- 4) N 末端、C 末端両方に蛍光蛋白質を融合したキメラプリオン蛋白質の N2a 生細胞による観察から、細胞内での PrP^C 切断を可視化し、N 末端を含む切断断片と C 末端を含む切断断片では各々の分布が異なっていることが明らかになった。
- 5) PrP^C の神経細胞内輸送を詳細に解析する目的で、神経成長因子 NGF 依存性分化応答細胞株である PC12 細胞を用い、分化誘導前後での PrP^C の細胞内輸送を解析した。分化誘導前の PC12 細胞では、N2a 細胞とほぼ同様に、順行性に 150 nm/sec、逆行性に 1 μm/sec での移動が観察された。
- 6) 他方、NGF による分化誘導後、樹状突起の伸長並びにシナプス形成を認めた PC12 細胞の細胞体内においては、それぞれ N2a 細胞とほぼ同じく、順行性の輸送速度は 100-140 nm/sec、逆行性輸送速度は 1-1.2 μm/sec であった。
- 7) しかしながら、同じ PC12 細胞の樹状突起内においては、順行性輸送速度の平均がほぼ 50 nm/sec と著明な輸送速度の低下が見られた。同じ樹状突起内においても、逆行性輸送速度には変化は見られなかった。

今年度は、さらに PrP^C の神経細胞内輸送を詳細に解析する目的で、神経成長因子 NGF 依存性分化応答細胞株である PC12 細胞を用い、N 末端標識 GFP 融合 PrP^C、C 末端標識 DsRed 融合 PrP^C の持続発現 PC12 細胞株を樹立した。

B. 研究方法

- 1) PrP^C の微小管依存性細胞内輸送の詳細な観察に向けて、安定した蛍光蛋白質標識 PrP^C の持続発現培養細胞株及び 1 週間以上に及ぶ蛍光標識 PrP^C 連続観察系の詳細な条件検討を行った後に、長期間連続し

た生細胞の持続観察を行った。

- 2) N2a 細胞を分化誘導した状態での蛍光標識 PrP^C の細胞内挙動、輸送される PrP^C の最終目的地に関する検討を通じ、PrP^C の生理機能の解明を試みた。

(倫理面への配慮)

本実験においては、市販されている培養細胞及び正常型プリオン蛋白質のみを用いたため、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

- 1) PrP^C の神経細胞内輸送を詳細に解析する目的で、神経成長因子 NGF 依存性分化応答細胞株である PC12 細胞を用い、蛍光標識 PrP^C を効率よく発現した stable transfectant の培養細胞株を初めて樹立した。
- 2) これらの PrP^C 持続発現細胞株においては、NGF 分化誘導による神経突起伸長が著明に亢進していたのみならず、神経突起の直径の増大が認められた。

D. 考察

神経機能分子と蛍光性タンパク質のキメラタンパク質は機能分子の動態・構造変化をリアルタイムで観察するうえで極めて有効であり、この方法によって従来は見落とされていた現象を明らかにすることが出来る。

今年度我々は、N 末端標識 GFP 融合 PrP^C、C 末端標識 DsRed 融合 PrP^C の持続発現 PC12 細胞株を樹立した。今回我々が樹立した細胞株を用いた検討により、分化誘導に伴い形成される樹状突起内において、(1) 細胞体内と異なり順行性細胞内輸送において PrP^C が局在している輸送小胞が少なくとも 2 種類存在しているのか、(2) PrP^C を含む同一の輸送小胞が細胞体内から樹状突起に移動する際に異なるモーター蛋白質への乗換えが生じているのか、いずれが正しいかを明らかにすること

が期待される。

以前我々は、PrP^C 過剰発現による細胞死機構：過剰発現トランスジェニックマウス脳を用いた検討を行った結果、加齢に伴い PrP^C は最終的にミトコンドリアへ標的化されアポトーシスを起こすことを見出した。さらに、N2a 細胞を用い、proteasome 阻害剤ラクタシスチンを添加することで PrP^C が細胞内に蓄積する系を構築し、同様の現象が生じることを見出した。この系において PrP^C のミトコンドリアへの標的化機構に関与する細胞質因子を調べたところ、PrP^C がミトコンドリアへ標的化するときの 14-3-3 蛋白質のアイソフォームを同定した。

実際に、遺伝性プリオン病の一型である GSS with Y145STOP、すなわち PrP コドン 145 にアンバー変異が入ったプリオン病の細胞培養モデルを作成し検討したところ、Y145STOP を発現した細胞は、ミトコンドリアアポトーシスによる細胞死を来していることが確認された。

この事実は、細胞内可視化の系を用いて PrP^C の細胞内挙動を詳細に観察することで、PrP^C の生理機能解析が進展することが期待されるのみならず、PrP^C の生理機能並びに神経細胞死との関連に関する理解を深めることができれば、例え PrP^{Sc} の増殖が防ぎきれなくとも、神経細胞死を抑制し生存させるといふ、全く新しい治療戦略を構築できる。

また、今後さらに、N 末端、C 末端の両端に蛍光分子を持つ PrP^C の持続発現細胞株を樹立することで、細胞内で PrP^C 切断に関わる酵素の同定などが可能になると期待される。

E. 結論

今年度我々は、N 末端標識 GFP 融合 PrP^C,

C 末端標識 DsRed 融合 PrP^C の持続発現 PC12 細胞株を樹立した。今回我々が樹立した細胞株を用いた検討により、分化誘導に伴い形成される樹状突起内において、(1) 細胞体内と異なり順行性細胞内輸送において PrP^C が局在している輸送小胞が少なくとも 2 種類存在しているのか、(2) PrP^C を含む同一の輸送小胞が細胞体内から樹状突起に移動する際に異なるモーター蛋白質への乗換えが生じているのか、いずれが正しいかを明らかにすることができるであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohkubo T, Sakasegawa Y, Toda H, Kishida H, Arima K, Yamada M, Takahashi H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K. Three-repeat tau 69 is a major tau isoform in laser-microdissected Pick bodies. *Amyloid* 2006;13:1-5.
2. Furuya K, Kawahara N, Yamakawa Y, Kishida H, Hachiya NS, Nishijima M, Kirino T, Kaneko K. Intracerebroventricular delivery of dominant negative prion protein in a mouse model of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dura graft transplantation. *Neurosci Lett* 2006;402:222-226.
3. Ohnishi Y, Tokunaga K, Kaneko K, Hohjoh H. Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles. *J RNAi Gene silencing* 2006;2:154-160.
4. Hachiya NS, Imagawa M, Kaneko K. The possible role of protein X, a putative

- auxiliary factor in pathological prion replication, in regulating a physiological endoproteolytic cleavage of cellular prion protein. *Med Hypotheses*.(in press).
5. Hachiya NS, Kaneko K. Investigation of laser microdissected inclusion bodies. In: Berns M and Greulich KO ed . *Methods in Cell Biology* vol 82: Laser manipulation of cells and tissues , New York , Academic Press. (in press).
 6. 八谷如美, 金子清俊. プリオン蛋白質異常化の分子機構. *化学療法の領域*. 2006;22:63-68.
 7. 金子清俊. 牛海綿状脳症と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病. *TMDC MATE*.2006;242: 12-13.
 8. 金子清俊. プリオン病 - 牛海綿状脳症 (BSE)と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 -. *BRAIN*. 2006;83:4-5.
 9. 八谷如美, 金子清俊. 正常型プリオンたんぱく質の正体は?. - その推定される機能 -. *現代化学*. 2006;422:26-31.
 10. 八谷如美, 金子清俊. プリオンたんぱく質は正常人では何をしているのか?. *科学*.2006;76: 1138-1142.
 11. 八谷如美, 金子清俊. 正常Prion蛋白質の機能と異常化 (感染)のメカニズム. *Brain Medical*. 2006;18:13-19.
2. 学会発表
1. Imagawa M, Kozuka Y, Omi K, Watanabe K, Hachiya NS, Kaneko K. Ultrastructural analysis of the aberrant endoplasmic reticulum network in Huntington protein-depleted neuro2a cells. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June 18 - 23,2006.
 2. Iwanami N, Sankawa U, Yamakawa Y, Nishijima M, Kaneko K, Saido TC. Chlorophyll derivatives inhibit the conversion of prion protein. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11th FAOBMB Congress. Kyoto, June 18 - 23,2006.
 3. Hachiya NS, Watanabe K, Imagawa M, Kaneko K. More than a thousand-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric Aip2p/Dld2p. 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Prague, June 24-28, 2006.
 4. Hahciya NS, Kaneko K. Intracellular Trafficking of Fluorescent Cellular Prion Protein in Differentiated Cells: Selective but Constant Reduction of Anterograde Velocity in the Neurites. 46th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Diego, Dec 9-14, 2006.
 5. 今川美登里, 八谷如美, 小見和也, 小塚芳道, 金子清俊. 培養細胞における正常型プリオン蛋白質の挙動 - GFP 融合蛋白質安定発現株での輸送速度及び siRNA による発現阻害効果の検討について -. 2006 年プリオン研究会. 安比高原, 2006.9.2-3.
 6. 池袋一典, 小笠原大輔, 金子清俊, 早出広司. マウスプリオンアプタマーの探索とそのセンシングへの応用 (Selection of the aptamer for prion and its application to sensor system). 日本化学会バイオテクノロジー部会. 京都, 2006.9.28-30.

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

なし

各種動物由来プリオン蛋白のアポトーシス抑制能に関する研究

分担研究者：佐伯 圭一 東京大学・大学院農学生命科学研究科・応用免疫学教室

研究要旨

プリオン蛋白(PrP)の機能としては、アポトーシス経路に関係していることが明らかにされつつある。これまで本研究では PrP 遺伝子欠損マウス脳海馬領域から作製された PrP 欠損細胞とマウス PrP 発現細胞を用いて無血清培養時におけるアポトーシス誘導の違いを解析してきた。今回、ハムスターPrP 発現細胞とウシ PrP 発現細胞においてマウス PrP 発現細胞で認められたアポトーシス抑制が認められず、むしろアポトーシス促進の結果を得た。血清除去後 24 時間の培養後の細胞の形態を顕微鏡観察の結果、PrP 欠損細胞、ハムスターPrP およびウシ PrP 発現細胞は円形化し、ディッシュから剥離した細胞が多数観察された。一方、マウス PrP 発現細胞は通常培養時の付着細胞の形態をよく保持していた。血清除去後 24 時間の DNA 断片化および細胞傷害測定の結果、PrP 欠損細胞と比較してマウス PrP 発現細胞は従来の報告どおり細胞死抑制を示唆する結果を得たが、ハムスターPrP およびウシ PrP 発現細胞ではむしろ細胞死が促進されていることを示唆する結果を得た。ウエスタンブロット法によって各種 PrP の発現を解析したところ、マウス PrP では 111/112 番目で切断を受けたと考えられる産物が確認されたが、ハムスターPrP およびウシ PrP ではそのような産物が確認されなかった。以上のことから、PrP は切断された産物がアポトーシス抑制に働き、切断されない産物の代謝不具合によってアポトーシス促進に働いていると推測された。

A. 研究目的

PrP の機能解析にはプリオン蛋白遺伝子欠損マウス胎児脳の海馬領域より樹立した神経細胞株に PrP 遺伝子を再導入しアポトーシス抑制について解析を行う。これまでマウス由来 PrP 遺伝子を用いて研究を行ってきたが、本研究ではさらにハムスターおよびウシ由来の PrP 遺伝子を用い PrP 遺伝子欠損神経細胞に発現させることにより PrP の機能についてさらに多くの情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

マウス、ハムスターおよびウシ PrP 遺伝子蛋白翻訳領域を組み換えレトロウイルスベクターに組み込んだ。組み換えレトロウイルスを用いて PrP 遺伝子欠損細胞 (HpL3-4) に遺伝子導入し、

薬剤選択を行なった後に、それぞれ PrP 発現細胞を樹立した。各 PrP の発現を抗 PrP 抗体 (T2) を用いてウエスタンブロット法および間接蛍光抗体法で解析した。各細胞株を無血清培地に置換した後、0、12、24、48 時間目の細胞の形態を顕微鏡下で観察した。また、細胞傷害について細胞増殖アッセイおよびトリパンブルー色素排除試験を用いて解析した。断片化 DNA の解析は各細胞から DNA を抽出し、アーガロース電気泳動法を用いて解析した。また、断片化 DNA を ELISA に用いて解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え操作およびウイルス取り扱いに関しては P2 実験施設内で行ない、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確