

図 3. 相対的 PrP^{Sc} 蓄積量

各々の siRNA を ScN2a-5 細胞株へトランスフェクトし、PrP^{Sc} 蓄積量をイムノブロットにより解析した

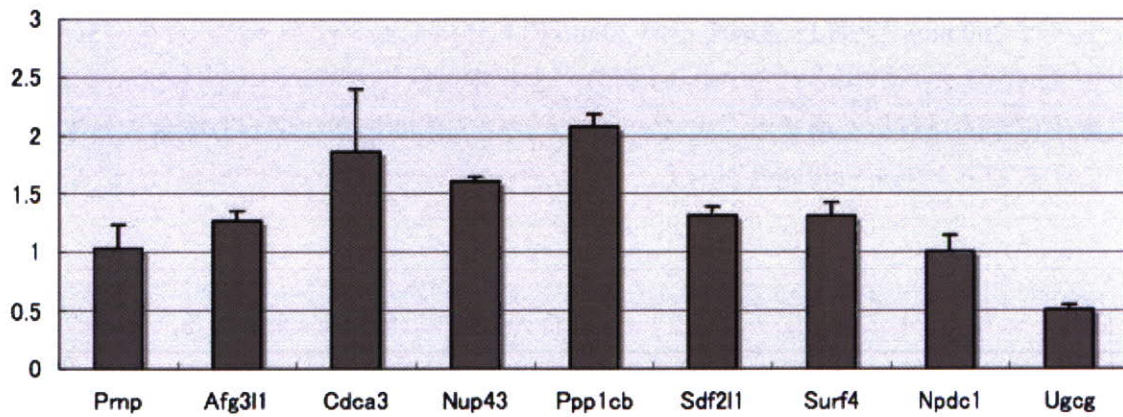


図 4. Ugcg siRNA 添加による各 mRNA 発現への影響

Ugcg siRNA を ScN2a-5 細胞株へトランスフェクトし、各々の mRNA の発現を Real time-PCR により定量的に解析した

Neuro2a サブクローン間でのプリオンの細胞間伝播効率

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

研究協力者：瓜生 匡秀 北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座

研究要旨

マウス神経芽細胞腫 Neuro2a(N2a)サブクローンの比較解析から、細胞間でプリオンが容易に伝播する ScN2a-3 と、細胞間伝播効率が悪い ScN2a-5 の存在を見出した。両細胞ともに細胞内で PrP-res が持続的に産生され、培養上清中にも PrP-res が検出された。ScN2a-3 の培養上清を非感染細胞に接種した場合、プリオンは効率よく伝播した。一方、ScN2a-5 の培養上清は非感染細胞へのプリオン伝播効率が非常に悪かった。また、非感染細胞と共培養した場合でも、ScN2a-5 が産生するプリオンの細胞間伝播効率は非常に悪かった。培養上清の分別遠心の結果から、ScN2a-3 の培養上清中には ScN2a-5 と比較して、凝集サイズの小さい PrP-res もしくは小さな小胞に付随した PrP-res が含まれることが示唆された。また、ScN2a-3 から放出されるプリオン感染性を担う粒子のうち、小さいものは 200 nm の孔径は通過するが 20 nm の孔径は通過しなかった。今後、ScN2a-3 および ScN2a-5 から放出される PrP-res 画分の生化学性状の解析、および N2a-3 と N2a-5 の細胞生化学的な解析を進めることで、プリオンの細胞間伝播に関わる機構の一端を明らかにすることが出来る可能性がある。

A. 研究目的

プリオンが神経を介して末梢から中枢神経系組織に侵入するには、数回細胞間を移動する必要がある。プリオン持続感染細胞から PrP^{Sc} がエクソソームに付随して細胞外に放出されることから、エクソソーム放出とプリオンの細胞間伝播の関連が示唆されている^{1,2)}。しかし、プリオンの細胞間伝播機構の詳細は不明である。我々はこれまでに、プリオン感受性の Neuro2a(N2a)マウス神経芽細胞から、プリオン感受性と非感受性 N2a サブクローンを樹立して、プリオン感受性に関わる諸因子の解析を行ってきた。この解析を進める過程で、プリオンの細胞間伝播効率が大きく異なるプリオン感受性 N2a サブクローンが存在することを見出した。これらは、プリオンの細胞間伝播機構解

析のための良いツールとなることが期待される。そこで本研究では、これら N2a サブクローンにおける PrP^{Sc} の産生とプリオンの細胞間の伝達について解析した。

B. 研究方法

細胞：N2a サブクローン N2a-3 および N2a-5 を使用した。また、これらにマウス順化プリオン Chandler 株が感染したプリオン持続感染細胞 ScN2a-3 と ScN2a-5 を用いた。さらに、G418 耐性遺伝子を安定発現する N2a-3^{NeoR} および N2a-5^{NeoR} を用いた。

培養上清からの PrP-res の検出とプリオン感染性の測定：プリオン持続感染細胞の培養上清を 460 x g, 15 min、10k x g, 15 min、続いて 100k x g, 1 hr の順に分別遠心を行い、遠心上清ある

いは沈殿から、ウェスタンブロット(WB)により Proteinase K (PK)抵抗性の PrP (PrP-res)を検出した。また、各分画を Recipient 細胞に接種し、接種後 Recipient 細胞を 8 継代まで連続継代した。4 および 8 代目に PrP-res をドットブロットにより検出した。

細胞間のプリオン伝播：プリオン持続感染細胞(ScN2a-3 あるいは ScN2a-5)と G418 耐性のプリオン非感染細胞(N2a-3^{NeoR} あるいは N2a-5^{NeoR})を種々の比率で共培養した。最初の 2 週間は G418 存在下で細胞を培養した。4 および 8 代目に PrP-res をドットブロットにより検出した。

インサートウェルを用いた分離培養：孔径 20 nm から 8 μ m のインサートウェルを用いた。インサートウェルの内側にプリオン持続感染細胞、外側に Recipient 細胞を入れ、4 日間培養した。その後、recipient 細胞を連続継代し、4 および 8 代目に PrP-res をドットブロットにより検出した。

DNA マイクロアレイ：Affymetrix Gene Chip Mouse 430_2 を使用した。ビオチン化標識 cRNA は One Cycle cRNA Synthesis Kit を用いて作製した。N2a-3 および N2a-5 の遺伝子発現の比較は独立した 3 回の実験結果から解析した。また、ScN2a-3 と ScN2a-5 の遺伝子発現の比較解析は独立した 2 回の実験結果から解析した。

(倫理面への配慮)

プリオン持続感染細胞を用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている (実験番号 2006-1-41)。また、実験は北海道大学病原微生物安全管理取扱マニュアルを遵守して行った。

C. 研究結果

ScN2a-3 および ScN2a-5 の培養上清を N2a-3 および N2a-5 に接種して、プリオンの伝達を調べたところ、ScN2a-3 の培養上清を接種した場合は N2a-3 および N2a-5 とともに PrP-res 陽性となったことから、ScN2a-3 の培養上清中にはプリ

オン感染性が存在することが判った。しかし、ScN2a-5 の培養上清を接種した N2a-3 および N2a-5 は PrP-res 陽性とならなかったことから、ScN2a-5 の培養上清中のプリオン感染性は非常に低いと考えられた(図 1)。

次に、培養上清中の PrP-res の検出を試みた。培養上清の低速遠心後の上清を、10k x g, 45 min、続いて 100k x g, 1 hr の分別遠心を行い、各々の画分の PrP-res を調べた(図 2)。両細胞ともに培養上清の低速遠心後の上清には PrP-res が存在したが、ScN2a-5 の培養上清中に存在する PrP-res は 10k x g, 45 min の遠心で殆どが沈殿したのに対し、ScN2a-3 の培養上清中に存在する PrP-res の一部は、10k x g, 45 min の遠心では沈殿せず、100k x g, 1 hr の条件で沈殿から検出された。この結果から、ScN2a-3 および ScN2a-5 の培養上清中に PrP-res は検出されるが、その生化学性状は必ずしも同一ではないことが示唆された。

次に、前述した分別遠心により回収した画分のプリオン感染性を調べた(図 3)。各々の画分を N2a-3 および N2a-5 に接種した後、細胞を連続継代し、4 および 8 継代時にドットブロットにより PrP-res を検出した。その結果、ScN2a-3 では、プリオン感染性は PrP-res の存在と一致して、10k x g の上清および沈殿、および 100k x g の沈殿にも検出された。また、N2a-3 に接種した時のほうが N2a-5 に接種した場合に比べて感染効率が高かった。一方、ScN2a-5 の培養上清の分別遠心の分画から PrP-res が明瞭に検出されたにもかかわらず、N2a-3 および N2a-5 へのプリオンの伝達は認められなかった。

これまでの結果から、ScN2a-5 の培養上清中には PrP-res が存在するが、プリオン感染性が非常に低いと考えられた。そこで、ScN2a-5 から recipient 細胞へのプリオン伝達を、プリオン感染細胞と非感染細胞の共培養により検討した(図 4)。ScN2a-3 を N2a-3 と共培養した場合は、doner 細胞が 10 個の場合まで PrP-res が検出された。また、ScN2a-3 と N2a-5 と共培養した場合

は、donor 細胞が 10^3 個の時まで PrP-res が検出された。従って、ScN2a-3 から N2a-3 のプリオン伝達効率は、N2a-5 への伝達効率に比べて、100 倍程度効率が良いことが判明した。一方、ScN2a-5 を donor 細胞とした場合は、共培養後に N2a-3 および N2a-5 のどちらも PrP-res 陽性とはならなかった。同様に実験を 3 度実施したところ、1 回の実験で ScN2a-5 から N2a-3 および N2a-5 にプリオンが伝達したことが確認できた。しかし、その効率は非常に悪く、donor 細胞が 10^5 の場合に僅かに PrP-res が検出されただけであった(結果は示さず)。

ScN2a-3 の培養上清中に存在するプリオン感染性を担う粒子のサイズを推定するために、孔径 8–0.02 μm のトランスウェルを用いた分離培養により、プリオンの伝達試験を行った。その結果、プリオン感染性を有する粒子の最小のものは、0.2 μm の孔径は通過するが 0.02 μm は通過しないことが判明した(結果は示さず)。

これまでの成績から、ScN2a-3 と ScN2a-5 ではプリオンの細胞間伝播の性状が大きく異なることが明らかとなった。そこで、この違いに関与する宿主因子の探索を目的として、N2a-3 および N2a-5 の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により比較した。その結果、いずれの実験においても N2a-3 で 2 倍以上高発現すると判定された遺伝子が 48 個(既知の遺伝子のみ)、N2a-3 で発現が低下している遺伝子が 78 個(既知の遺伝子のみ)存在した。これらのうち、シナプス小胞、脂質ラフトに関与する遺伝子、アクチンフィラメントや細胞骨格に関与する遺伝子、G 蛋白シグナル伝達系に関与する遺伝子を表 1 に示した。これらの遺伝子の一部について TaqMan assay を行い遺伝子発現レベルを確認した結果、DNA マイクロアレイの結果は(計 5 回の実験結果を総合したもの)、再現性が高いことが確かめられた。今後、これらの遺伝子を中心に、N2a-3 と N2a-5 で認められたプリオンの細胞間伝播効率の違いに関与する遺伝子群の同定を進める予定である。

D. 考察

N2a のサブクローンである ScN2a-3 および ScN2a-5 は、Chandler 株を接種した場合、ともに PrP-res 陽性となることからプリオン感受性細胞と言える。しかし、ScN2a-3 と ScN2a-5 が産生するプリオンの細胞間伝播効率は大きく異なっていた。プリオンの細胞間伝播に PrP-res が付随するエクソソームの関与が示唆されていることから^{1,2)}、培養上清中の PrP-res の検出を行った。ScN2a-3 および ScN2a-5 の培養上清中には PrP-res が検出されたことから、PrP-res の放出の有無では、細胞間伝播効率の違いを説明できなかった。しかし、ScN2a-3 と ScN2a-5 から放出される PrP-res の粒子、あるいは PrP-res が付随する小胞の生化学性状が同一でないことが明らかとなった。ScN2a-3 では 10k x g の遠心上清に残存する PrP-res が ScN2a-5 に比べて多いことから、ScN2a-3 ではエクソソームのような小胞に付随する PrP-res が ScN2a-5 と比較して多いのかもしれない。小胞に付随した PrP-res は、膜に付随していない PrP-res と比較して細胞への感染効率が高いことから^{3,4)}、現在、ScN2a-3 および ScN2a-5 の培養上清中に存在する PrP-res 画分のシヨ糖密度勾配遠心による解析を進めている。

また、プリオン感染細胞と非感染細胞の共培養により、効率良くプリオンの細胞間伝播が起こることから⁵⁾、共培養により、ScN2a-3 と ScN2a-5 のプリオン伝達性を調べたところ、培養上清中のプリオン感染性と同様に、ScN2a-5 は共培養によっても、recipient 細胞にプリオンを効率よく伝達することは出来なかった。ScN2a-3 から N2a-3 へのプリオン伝播に比べ、ScN2a-3 から N2a-5 へは効率は悪いながらも伝播した。一方、ScN2a-5 から N2a-3 および N2a-5 へのプリオンの伝播は非常に効率が悪かった。従って、ScN2a-3 と ScN2a-5 で認められたプリオンの細胞間伝播効率の違いは、主に ScN2a-5 が産生するプリオンの生化学性状の違いに起因すると考えられた。

E. 結論

プリオン感受性 N2a サブクローンの比較解析から、細胞間でプリオンが容易に伝播する ScN2a-3 と、細胞間伝播効率が悪い ScN2a-5 の存在を見出した。両細胞ともに細胞内で PrP-res の産生が起こり、培養上清中にも PrP-res が放出されるが、ScN2a-5 が産生するプリオンは細胞間伝播効率が悪いことから、ScN2a-3 および ScN2a-5 から放出される PrP-res 画分の生化学性状の解析、および N2a-3 と N2a-5 の細胞生化学的な解析を進めることで、プリオンの細胞間伝播に関わる機構の一端を明らかにすることが出来る可能性がある。

[参考文献]

1. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. Cells release prions in association with exosomes. Proc. Natl. Acad Sci USA 2004;101: 9683-968.
2. Leblanc P, Alais S, Porto-Carreiro I, Lehmann S, Grassi J, Raposo G, Darlix JL. Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. EMBO J 2006;25:2674-2685.
3. Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP^{Sc}) into contiguous membranes. EMBO J 2002;21:1031-1040.
4. Baron GS, Magalhaes AC, Prado MA, Caughey B. Mouse-adapted scrapie infection of SN56 cells: greater efficiency with microsome-associated versus purified PrP-res. J Virol 2006;80:2106-2117.
5. Kanu N, Imokawa Y, Drechsel DN, Williamson RA, Birkett CR, Bostock CJ, Brockes JP. Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. Curr

Biol 2002;12:525-530.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamitsu S, Miyazawa T, Horiuchi M, Onoe S, Ohoba Y, Kitagawa H, Ishiguro, N. Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). J Vet Med Sci 2006;68:27-33.
2. Yamaguchi S, Nishida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim, C-L, Ishiguro N, Nagatsuka T, Uzawa H, Horiuchi M. Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic *O*-sulfated glycopyranosides and their polymers. Biochem Biophys Res Commun 2006;349:485-491.
3. Watanabe Y, Inanami, Horiuchi M, Hiraoka W, Shimoyama Y, Inagaki F, Kuwabara M. Identification of pH-sensitive regions in the mouse prion by the cysteine-scanning spin-labeling ESR technique. Biochem Biophys Res Commun 2006;350:549-556.

2. 学会発表

1. Karino A, Furuoka H, Kimura K, Shinagawa M, Horiuchi M. Generation of mAb that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. NeuroPrion2006, Turin, Italy, Oct 4-6,2006.
2. Yamaguchi S, Nishida Y, Sasaki K, Kambara M, Kim C-L, Nagatsuka T, Uzawa H, Horiuchi M. Inhibition of PrP^{Sc} formation by synthetic *O*-sulfated glycopyranoside and their polymers. NeuroPrion2006, Turin, Italy, Oct 4-6, 2006.
3. Horiuchi M. Propagation and inhibition of

- PrP^{Sc} formation in vitro and in vivo. The 9th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine, Sapporo, Japan, Sep 7, 2006.
4. 宋昌鉉,古岡秀文,金チャンラン,鈴木章夫,前田秋彦,堀内基広. 抗 PrP 抗体の脳室内投与によるプリオン病治療効果の評価. 2006年プリオン研究会, 岩手, 2006.9.2-3.
 5. 中満智史,瓜生匡秀,堀内基広. プリオン感受性・非感受性 Neuro2a サブクローンを用いたプリオン増殖関連宿主因子の探索. 第 54 回日本ウイルス学会, 名古屋, 2006.11.21-23
 6. 瓜生匡秀,堀内基広. マウス神経芽腫細胞 Neuro2a(N2a)サブクローンで検出される異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の相違. 第 54 回日本ウイルス学会, 名古屋, 2006.11.21-23.
- 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

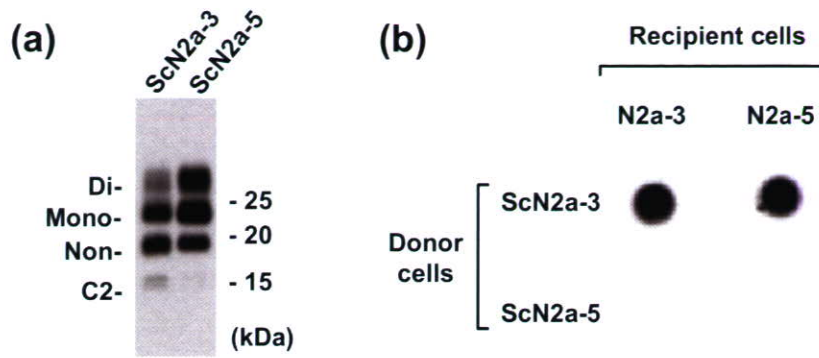


図1 ScN2a-3 および ScN2a-5 の PrP-res と培養上清中のプリオン伝達性
 (a) ScN2a-3 および ScN2a-5 からの PrP-res の検出。
 (b) 培養上清中のプリオン伝達性。Donor 細胞(ScN2a-3 および ScN2a-5)の培養上清を recipient 細胞(N2a-3 および N2a-5)に接種して、連続継代後にドットブロットにより PrP-res を検出した。

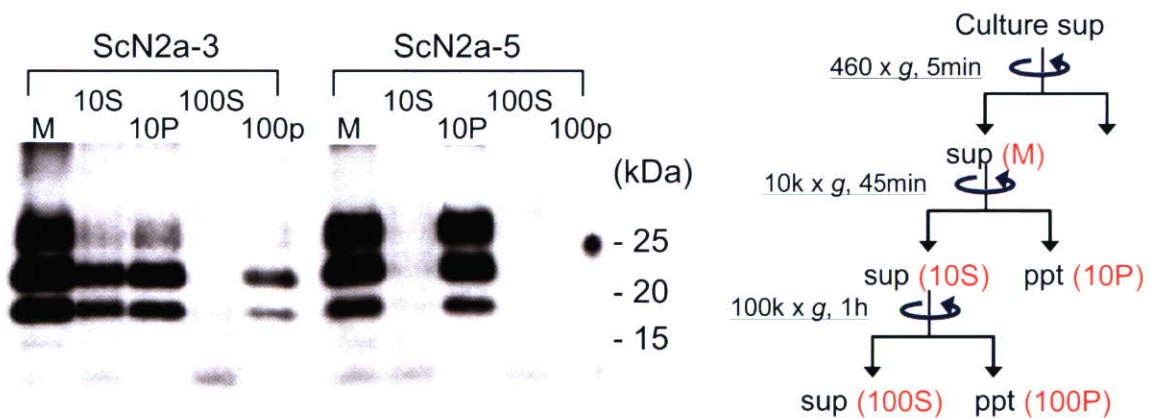


図2 プリオン持続感染細胞の培養上清からの PrP-res の検出
 ScN2a-3 および ScN2a-5 の培養上清を、右図に示すような条件で分別遠心により分画した。各画分を PK 処理した後に、WB により PrP-res を検出した。

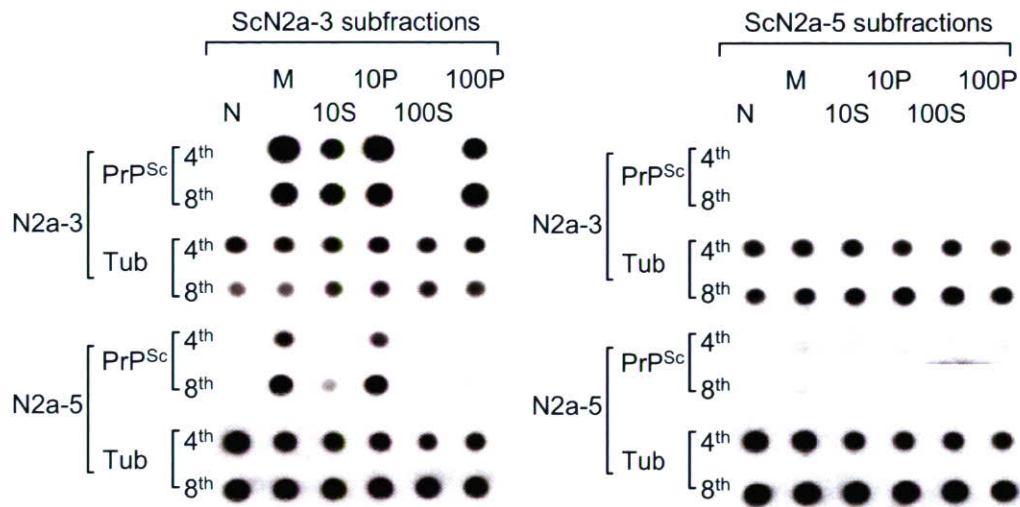


図3 プリオン持続感染細胞培養上清の画分中の PrP-res

ScN2a-3 および ScN2a-5 の培養上清を図2で示したように分別遠心により分画した。各画分(M, 10S, 10P, 100S, 100P)を N2a-3 または N2a-5 に接種後、細胞を連続継代し、4 および 8 継代毛目にドットプロットにより PrP-res を検出した。

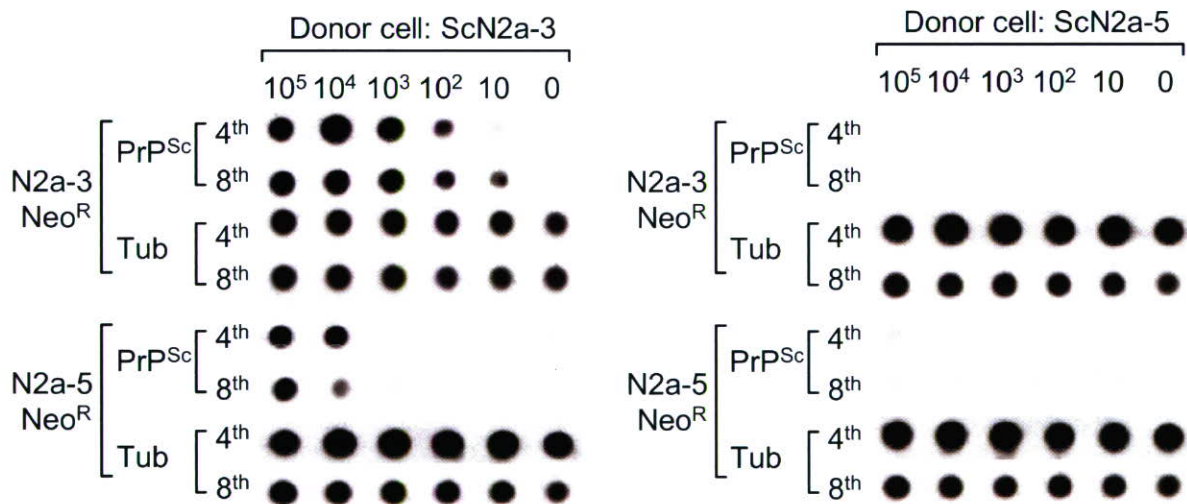


図4 共培養によるプリオンの細胞間伝達

ScN2a-3 および ScN2a-5 をプリオン(PrP-res)の donor 細胞として、G418 耐性の N2a-3Neo^R または N2a-5 Neo^R と共培養した。Recipient の細胞(N2a-3Neo^R または N2a-5 Neo^R)10⁵ 個に対して、図上に示すように、0~10⁵ 個の donor 細胞を加え共培養した。最初の 2 週間は G418 存在下で細胞を培養した。連続継代 4 および 8 代目でドットプロットにより PrP-res を検出した。

表1 DNA マイクロアレイ法による N2a-3 と N2a-5 の遺伝子発現の比較

		Fold change (2 ⁿ)		TaqMan
		Av	SD	
<i>Synapse/post synapse/lipid raft/exosomes</i>				
synapsin II	Syn2	2.2	0.2	3.2
synaptogyrin 1	Syng1	1.3	0.2	3.7
proline rich membrane anchor 1	Prima1	1.3	0.1	NT
Glutamate receptor interacting protein 1	Grip1	-5.5	2.2	NT
synaptotagmin IV	Syt4	-2.7	0.8	NT
RAB32, member RAS oncogene family	Rab32	-1.8	0.6	NT
<i>Actin/cytoskeleton organization</i>				
actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	Acta2	2.9	1.1	NT
drebrin 1	Dbn1	1.3	0.3	NT
PDZ and LIM domain 7	Pdlim7	2.3	0.2	NT
myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic	Myh3	-1.2	0.2	NT
<i>G-protein coupled receptor protein signaling pathway</i>				
guanine nucleotide binding protein, gamma 4 subunit	Gng4	4.6	1.5	38
hypocretin (orexin) receptor 1	Hcrtr1	2.3	0.4	20
pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	P2ry6	1.5	0.3	NT
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	Ptger4	3.3	0.8	10.8
leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5	Lgr5	-6.1	1.4	NT
regulator of G-protein signaling 4	Rgs4	-5.7	1.3	NT
slit homolog 2 (Drosophila)	Slit2	-5.6	0.6	NT

プリオンの凝集体及びアミロイド形成に関する研究

分担研究者：桑田 一夫 岐阜大学人獣感染防御研究センター

研究協力者：山口 圭一 岐阜大学人獣感染防御研究センター

研究要旨

異常型プリオン PrP^{Sc}の発生機構を調べるために、プリオンの全領域に渡り部分ペプチドを作製して、アミロイド線維形成について調べた。その結果、PrP^Cのヘリックス B、C と疎水クラスター領域のペプチドがよくアミロイド様線維を形成した。これらの領域は一次配列上で疎水性が高い領域と一致しており、線維形成には疎水性が高い C 末側が重要であると考えられる。また、ペプチドの種類により、異なる構造と形態の線維を形成することが分かった。

A. 研究目的

正常型プリオン PrP^Cは、異常型 PrP^{Sc}を鋳型として α ヘリックスから β シートへ構造変換することで PrP^{Sc}に変化する。PrP^Cには、 α ヘリックス領域が3つと β シート領域が2つ、また、PrP^Cで疎水性がもっとも高い疎水クラスターと呼ばれる領域が存在する。本研究では、PrP^Cから PrP^{Sc}への構造変換を調べるために、プリオンの全領域に渡り部分ペプチドを作製して、それぞれの役割に注目してアミロイド線維形成について調べた。

B. 研究方法

ペプチド断片は、ペプチド合成機を用いて、目的の配列を作製した。アミロイド線維は、蛍光スペクトル（チオフラビンTの蛍光ラベルによる）、円偏光二色性（CD）スペクトル、及び電子顕微鏡を用いて観察した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

プリオン全領域のうち、C 末側のヘリックス

B（アミノ酸 172~194 残基）とヘリックス C（200~227 残基）領域のペプチドと、疎水クラスター（106~126 残基）領域のペプチドがアミロイド様線維を形成した。この3つの領域は、一次配列上で疎水性が高い領域と一致する。また、プリオンの N 末側のペプチドは全く線維を作らなかった。よって、線維形成には疎水性が高い、球状構造をとった C 末側が重要であると考えられる。また興味深いことに、ペプチドの種類によって形成されるアミロイド線維の構造と形態がかなり異なっていた。疎水クラスター領域やヘリックス B のように針状の線維を形成するものもあれば、ヘリックス C のようにグネグネした凝集体を形成するものもあった。部分ペプチドを使った実験ではあるが、全長 PrP^{Sc}の構造も一つではなく、いくつかの構造、形態があることが考えられる。

実際、全長の PrP^Cを用いて、*in vitro*で線維形成について調べると、界面活性剤 SDS 存在下では針のような線維ではなくオリゴマー状の凝集体がよくできた。しかし、超音波を断続的にあてると、オリゴマーとは二次構造が異なる線維が出来た。

D. 考察

Anfinsen の仮説によれば、タンパク質の立体構造はアミノ酸配列により一義的に決まる。そのようなタンパク質は、単独でフォールディング出来るように、アミノ酸配列が進化をしてきたと考えられる。しかし、全く別のメカニズムでフォールディングを行うタンパク質が存在している。それらは、他のタンパク質分子と非特異的に結合しやすく、溶液中でも不安定である。時間がたつと、ある低い確率で核が形成される。このような核は溶液中のモノマー分子を取り込み、大きな凝集体へと成長する。プリオンの凝集体形成には疎水領域が重要であり、その構造は一義的ではなく、環境の違いにより変化すると考えられる。プリオンの疎水性クラスターを含む部分ペプチド PrP106-126 においても、このようなオリゴマー形成が見られ、その構造が決定されている。それは、メチル基間の疎水性相互作用によるものであり、極めて安定な分子間 β シート構造が出来上がる¹⁾。

E. 結論

プリオンの部分ペプチドが形成するアミロイド線維形成能は、部位によりまちまちであるが特にヘリックス B, C において強い傾向が認められる。また、全長プリオンの線維形成には親水的な N 末側より、疎水的な C 末側が重要であることが示された。

[参考文献]

1. Kuwata et al. NMR-detected hydrogen exchange and molecular dynamics simulations provide structural insight into fibril formation of prion protein fragment 106-126. Proc Natl Acad Sci USA, 2003;100(25):14790-14795.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura K, Nagaki M, Nishihira J, Kuwata K, Moriwaki H. Role of macrophage migration inhibitory factor for CTL-induced liver injury in hepatitis B transgenic mice. Clin Vaccine Immunol 2006;13(3):415-419.
2. Kimura K, Moriwaki H, Nagaki M, Saio M, Nakamoto Y, Naito M, Kuwata K, Francis V Chisari. Pathogenic role of B cells in anti-CD40 caused necroinflammatory liver disease. Am J Pathol 2006;168(3):786-95.
3. 桑田一夫. バイオインフォーマティクスによるプリオン病治療薬の開発. 化学療法の領域 2006;22:87-93.
4. 桑田一夫. 連載“話題のウイルス” NO.12 プリオン 桑田一夫 Drug Delivery System (DDS) 2006;Vol.21,No2:156-157.
5. 桑田一夫. 20 世紀の 2 大発見—量子力学と分子生物学, In: 桑田一夫 編著, 論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ, 東京, 共立出版, 2006:9-24.
6. 桑田一夫. フーリエ変換とタンパク質・核酸の基本立体構造, In: 桑田一夫・編著, 論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ. 東京, 共立出版, 2006:25-49.
7. 桑田一夫. タンパク質・核酸の構造ダイナミクス. In: 桑田一夫 編著. 論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ. 東京, 共立出版. 2006:91-108.
8. 桑田一夫. 計算機実験の基礎. In: 桑田一夫・編著, 論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ. 東京, 共立出版, 2006:137-145.
9. 桑田一夫. 分子構造と生理機能. In: 桑田一夫・編著, 論理的創薬入門—構造生物学に基づくアプローチ, 東京, 共立出版, 2006:168-181.

10. 桑田一夫. タンパク質の構造異常, In: 桑田一夫・編著, 論理的創薬入門－構造生物学に基づくアプローチ, 東京, 共立出版, 2006:182-194.
11. 桑田一夫. タンパク質のコンホメーション制御－分子手術法, In: 桑田一夫・編著, 論理的創薬入門－構造生物学に基づくアプローチ, 東京, 共立出版, 2006:195-209.
12. 山口圭一, 松本友治, 児玉耕太, 岸直人, 桑田一夫. プリオン病の発症と伝播機構－特集 アミロイドの謎は解けるか?: プリオン病・アルツハイマー病・透析アミロイドーシスなどの病態を紐解く－. 細胞工学 2007;Vol.26:151-155.
13. 後藤祐児, 桑田一夫, 関島良樹, 田中元雅, 内木宏延, 永井義隆, 松崎勝巳, 樋口京一. アミロイドーシス発症の分子機構解明を目指して: 現状と展望, 夢－特集 アミロイドの謎は解けるか?: プリオン病・アルツハイマー病・透析アミロイドーシスなどの病態を紐解く－ 細胞工学 2007;Vol.26(2):181-185.
14. Sukegawa-Hayasaka K, Kato Z, Nakamura H, Tomatsu S, Fukao T, Kuwata K, Orii T, Kondo N. Effect of Hunter Disease(mucopoly saccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase : Enzymatic activity, protein processing and structural analysis. J Inherit Metab Dis 2006;29:755-761.
2. 学会発表
1. Kuwata K. EMBO-FEBS Workshop on Amyloid Formation. Italy, Mar 25-28, 2006.
2. Kuwata K. Dynamics Based Drug Design for Prion Diseases. 5th East Asia Biophysics Symposium & 55th Ann Meeting of the Biophysical Society of Japan. Okinawa, Nov 12-16, 2006.
3. Kuwata K. Dynamics Based Drug Design for Prion Diseases. 5th East Asia Biophysics Symposium & 55th Ann Meeting of the Biophysical Society of Japan. Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan, Nov 12-16, 2006.
- 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
3. その他 なし

霊長類モデルを用いた BSE 発症リスク評価に関する研究

研究協力者：佐多徹太郎 国立感染症研究所感染病理部
研究協力者：小野 文子 国立感染症研究所感染病理部
研究協力者：斉藤 直之 社) 予防衛生協会
研究協力者：田勢 直美 社) 予防衛生協会
研究協力者：寺尾 恵治 医薬基盤研霊長類医科学研究センター
研究協力者：山河 芳夫 医薬基盤研霊長類医科学研究センター
研究協力者：高橋 秀宗 国立感染症研究所

研究要旨

プリオン病早期診断法を確立していく上で、検出技術の高感度化および感染発症機構に関する研究が様々な解析手段を用いて進められている。我々はカニクイザルへの BSE 伝播実験を行い、行動学的、神経生理学的病態解析を行うとともに、生体材料からの異常プリオン検出について検索を行った。

幼若カニクイザルに BSE 発症牛脳乳剤を脳内接種した 3 頭中 2 頭において接種後 26 ヶ月目頃より神経症状が認められ、振戦、驚愕反応、失調症状が観察され緩徐進行性に経過し約 1 ヶ月後に起立不能となり、安楽死を行った。運動機能評価において、発症動物で報酬回収時間の遅延が認められた。記憶能試験では神経症状発現初期において成功率に顕著な変化は認められなかったが、迷路実施中の折り返し操作の増加傾向が観察された。また症状進行に伴い急激な成功率の低下が認められた。安楽死後に撮影した MRI では視床枕に T1 強調画像で高信号領域が認められた。病理組織検索においてはヒト vCJD と同様の florid plaque に相当すると考えられる免疫染色像が認められ、神経組織の WB においても、vCJD の異常型プリオンと同様の 2B 型(4 型)のバンドが検出された。

BSE 感染カニクイザルにおいて高次脳機能の評価系及び生体材料を用いた早期診断系を確立することにより、治療、予防研究に寄付するとともに、移植、輸血等生物製剤由来医原性感染のリスク評価に有用と考えられる。

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 患者とは異なる臨床症状、脳波の変化、MRI 像および、病理所

見が報告されている。BSE-P を接種したカニクイザルの臨床診断及び病理学的解析を行い、霊長類を用いた BSE-P 感染モデルの有用性について検討した。

B. 研究方法

1. 研究材料

動物は医薬基盤研霊長類医科学研究セン

ターで出生した育成雄カニクイザルを用いた。接種は国内 BSE 感染牛の 10%脳乳剤を用いた。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。

経口投与（脳乳剤 2.0ml） 3 頭

脳内接種（脳乳剤 0.2ml） 3 頭

無処置対照 1 頭

実験に使用したカニクイザル 7 頭についてプリオンタンパク質遺伝子のコドン 129 について遺伝子型の検索を行った。

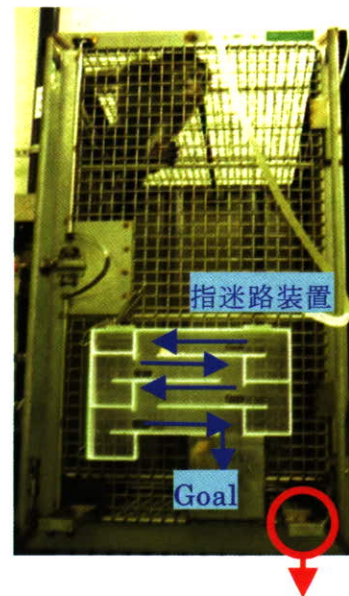
2. 解析方法：

1) 行動解析

運動機能評価の指標としてアップルテストを経時的に行った。アップルテストは手を使って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し、報酬を得るまでの時間を計測した。トレイの近い位置から順番に 4 段階に薄切りリンゴをおき左右各 4 試行計 32 試行を実施し、トレイ入り口から手を出して報酬をつかみ、ケージ内に手を引き込むまでの時間を計測し各段階の平均値を求めた。

2) 指迷路試験

指迷路試験は長期記憶の評価を簡便におこなう方法であり、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いうで、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。



アップルテスト用トレイ

Fig.1 指迷路試験装置およびアップルテスト試験装置

3) 神経機能解析

皮質脳波は塩酸ケタミン-キシラジン混合麻酔下において、皮質脳波の測定を行い経時的变化について解析を行った。

4) MRI 撮像

BSL3 感染実験であることから、現状では感染動物の実験区からの搬出は不可能である。そのため、発症後安楽死を行った 2 頭について、安楽死後、アクリル製密封型コンテナに動物を保定して MRI 撮像室への移動を行った。MRI 撮像は 3T MRI 装置 (MAGNETOM Allegra [Siemens 社]) を用いた。カニクイザルの脳撮像に際し、空間分解能・解像度を上げるために撮像視野を小さくし、高い S/N を持つ撮像条件を設定し、ヒト用ヘッドコイルの CP 型コイルを用いて T1, T2, プロトン強調画像、Flair 画像を撮像した。

5) 蛋白解析

発症し安楽死を行った 2 頭について、血液、

脳脊髄液及び全臓器についてプロテアーゼ抵抗性を獲得した異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) について、ウエスタンブロット (WB) 法により検索を行った。

6) 病理検索

発症し安楽死を行った 2 頭について、脳神経系、リンパ系及び全臓器について病理検索を行い、異常型プリオン発現細胞における異常型プリオン蛋白質の局在について免疫組織学的解析を行った。

(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。臨床症状発現後は症状に応じて、健康状態を維持すべく給餌方法の対応及び輸液療法等による維持管理をおこなった。

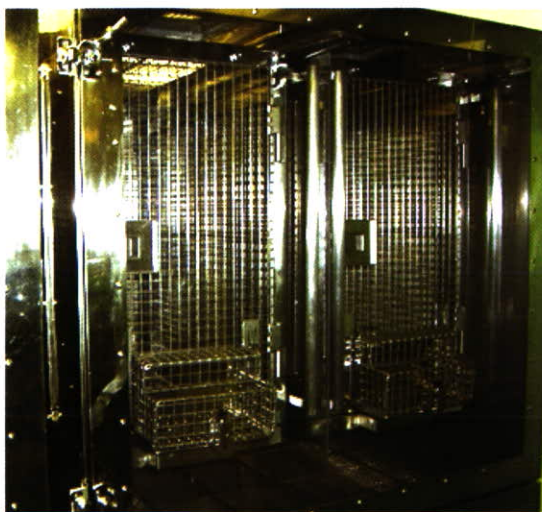


Fig.2 2頭飼育方式によるBSL3動物飼育アイソレーター

安楽死は塩酸ケタミンによる鎮静後、ペントバルビタール静脈内投与による深麻酔

状態で実施した。肋間より経皮的に心臓に穿刺し全採血による放血を行い、最後に過剰量のペントバルビタールを投与し死亡を確認した。

C. 研究結果

(1) 遺伝子型の検索

実験群 7 頭のカニクイザル末梢血を用いてプリオンタンパク質遺伝子のコドン 129 解析を目的として nest PCR、direct sequence を行ったところ、全て Met/Met であった。

実験に用いたカニクイザルは全て TPC で育成した 2 世代もしくは 3 世代カニクイザルである。脳内接種を行い発症した 2 頭はフィリピン現産家系であり、未発症動物はマレーシア現産家系であった。また経口投与群及びコントロール個体はマレーシアおよびインドネシア現産家系カニクイザルであった。

(2) 体重及び行動観察：

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(#7、#11)で、接種後の体重増加率が低い傾向が認められた。#10 は他群と同様の成長を示したが、神経症状発現後体重の減少が認められた(Fig.3)。

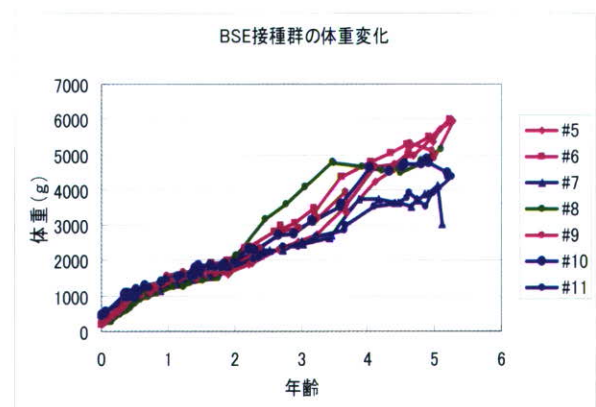


Fig.3 BSE 接種カニクイザルの体重変化

行動観察では脳内接種群の 2 頭において明らかな神経症状の発現が認められた。

#7: 接種後 27 ヶ月目頃散発的な食欲不振が認められた。30 ヶ月目に食欲不振とともに過敏行動（外界や隣ケージサルからの刺激による驚愕反応）が観察された。32 ヶ月目に、振戦、四肢の麻痺が観察され症状は進行し、36 ヶ月目に起立不能となり、全麻痺を伴い、横臥した。意識は鮮明で口元に餌を持っていくと咀嚼、嚥下運動には異常は認められなかったため、青果及び流動食の直接経口投与と輸液管理により 10 日間維持し症状観察後安楽死とした。

#10: 接種後 26 ヶ月目に突発的な振戦が観察された。28 ヶ月目に#7 と同様の過敏行動が観察されると共に、間断的な振戦が認められた。驚愕反応は顕著に進行し、四肢の不全麻痺が観察されているにもかかわらず、外界刺激に対して全身を使っての逃避行動を示した。30 ヶ月目には、自力による起立が困難となり、手でケージをつかんで起立を行う状態となった。33 ヶ月目に全身の持続的な振戦が観察され 35 ヶ月目に安楽死を実施した。

(3)運動機能評価：アップルテスト

アップルテストにおける報酬獲得時間を経時的に測定したところ、脳内接種群で発症が認められた 2 頭(#7,#10)について、神経症状発現後、左右前肢とも報酬獲得時間の遅延が認められた。発症がまだ認められ

ていない脳内接種群の 1 頭、経口投与群及びコントロール群では報酬獲得時間に変化は認められなかった。報酬獲得時間の遅延は報酬までの距離と明らかな相関が認められておらず、動作全体の緩慢傾向よりも動作開始時及び、つかみとり行動時の異常によるものと考えられた (Fig.4)。

(4)高次脳機能評価：指迷路試験

脳内接種後神経症状が認められた 2 頭について症状発現初期では正答率の低下は認められなかったが、症状発現とともに、試験中にリングを左右に折り返して成功のルートに悩む動作や試行中に装置から手を放す停止行動が頻繁に観察されるようになり、成功率の如何に関わらず折り返し回数が高い傾向が認められた。症状の進行とともに、2 頭とも正答率の急激な低下が認められた。(Fig.4)。

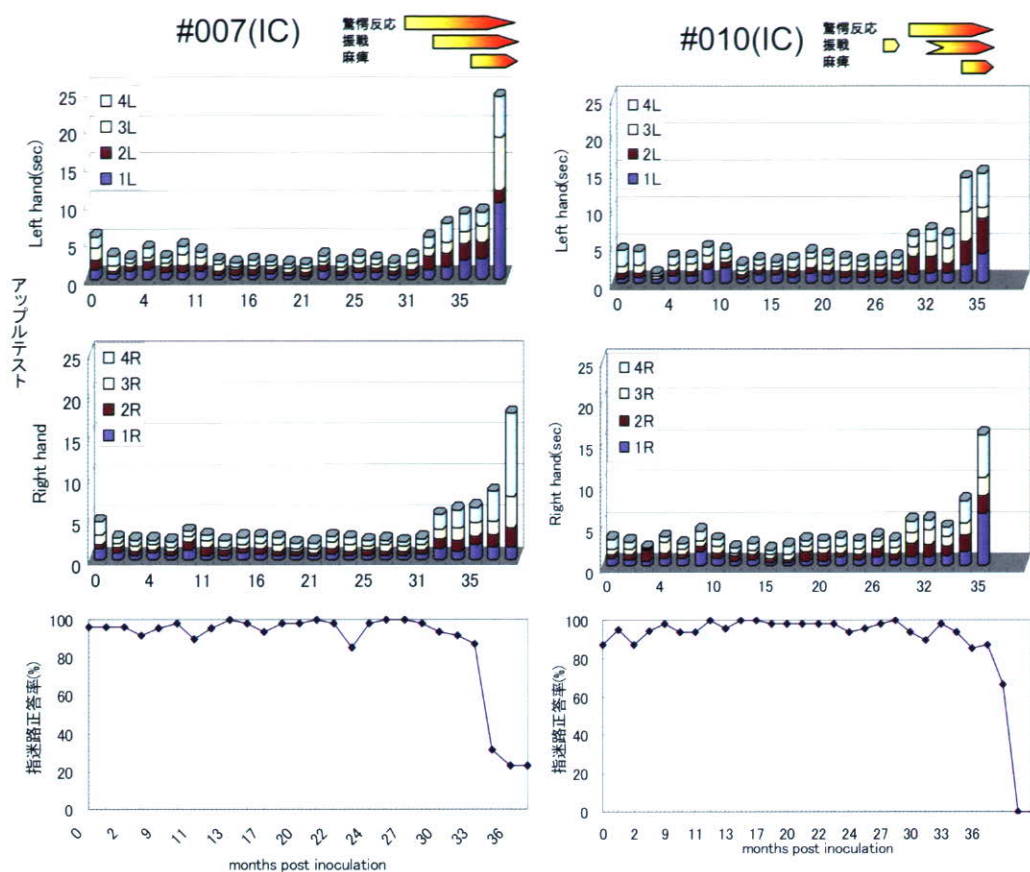


Fig.4 脳内接種後発症カニクイザルにおける神経症状、運動機能試験(アップルテスト)及び高次脳機能試験(指迷路試験)経過

(5)皮質脳波

全頭において経時的に脳波の低振幅化が認められたが、これはサルの成長に伴う皮膚、筋の発達に対応して電極環境(抵抗の増大)の変化によるものと考えられる。

#7: 接種後 16 ヶ月目 δ 波の群発射の周期性に変化(持続時間の変化、周期の不規則性)が認められ、26 ヶ月目では δ 波の群発射の持続時間は延長し、周期も長くなっていった。36 ヶ月目ではその所見が著しくなり、 δ とより周期の速い 10Hz の成分の振幅を比較すると Pre から時間を経るにしたがって小さくなっていることから、 δ 成分の低振幅化が進行していると考えられた。

#10: 接種後 7 ヶ月目頃より低周波成分(δ)の周期的出現がより不明瞭であった。16 ヶ月目も同様の所見が観察され、極性の偏った波が認められた。28 ヶ月目では δ 波は疎、

不明瞭になりその周期は延長、持続時間が延長し、35 ヶ月目ではさらに低振幅化が進行した (Fig5)。

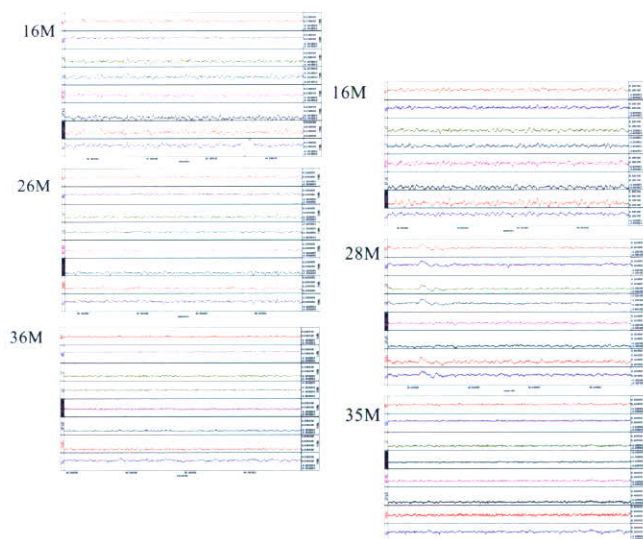


Fig.5 脳内接種後発症カニクイザルの皮質脳波の経時的変化

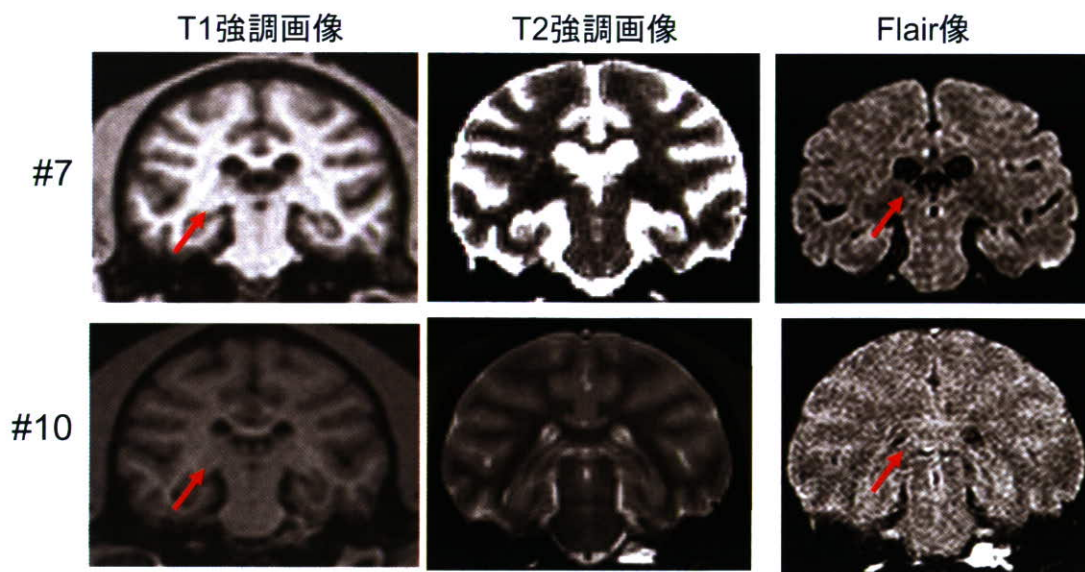


Fig.6 発症カニクイザル安楽死後の MRI 像

(6)MRI 所見

安楽死直後に密封コンテナ内に頭部を固定し P3 感染実験区より MRI 室へ動物を移動して撮像を行った。安楽死後の他症例の所見と比較したところ、視床枕において T1 強調像および FLAIR 画像で高信号領域が観察され、小脳皮質において境界明瞭な高信号領域が見られた。しかし、T2 強調画像では低信号の所見を示していた。全身麻痺症状を示し 10 日間生存した#7 では脳室の拡大が認められた (Fig.6)。

(7)蛋白解析

発症し安楽死を行った 2 頭について、血液、脳脊髄液及び全臓器についてプロテアーゼ抵抗性を獲得した異常型プリオン蛋白質 (PrPsc) について、ウェスタンブロット (WB) 法により検索を行った結果、中枢神経組織から高い濃度で異常型プリオン蛋白質が検出された。検出されたバンドは vCJ の異常型プリオン 2 B 型に属し、非糖鎖型分子は BSE のそれと同一サイズであっ

た (Fig.7)。

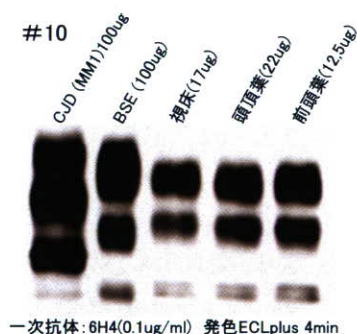


Fig.7 WB 法による PrPsc の検出 (#10)

(8)病理検索

発症し安楽死を行った 2 頭について、末梢神経を含む脳神経系、リンパ系、消化器系等全臓器について病理検索を行い、異常型プリオン発現細胞における異常型プリオン蛋白質の局在について免疫組織学的解析を行ったところ小脳、視床に従来の BSE と同じ細顆粒状のプリオンの陽性像がみられ、大脳皮質には florid plaque に相当すると考えられる免疫染色像が認められた。海綿状変性も観察された (Fig.8)。

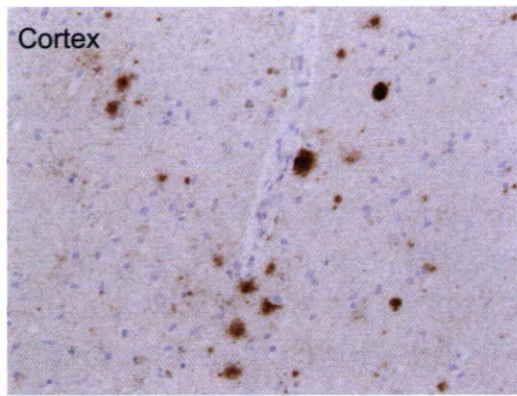


Fig.8 免疫組織検索による PrPsc の検出 (#10)

D. 考察

BSE 感染ウシ脳乳剤を脳内接種したカニクイザル 3 頭中 2 頭において接種後 26～27 ヶ月目頃より神経症状が観察され、35～36 ヶ月目に安楽死を実施した。

経過は緩徐進行性で 2 頭とも約 10 ヶ月の罹患期間を有した。症状は驚愕反応を伴う過敏反応、運動機能障害、記憶障害が認められた。また 2 例とも進行性の失調症状が観察され振戦は症状進行に伴い持続的に観察されるようになった。これらの臨床症状はヒト vCJD に認められる症状と類似していた。

脳波所見では症状が進行した状態においても特徴的な異常所見は観察されなかったが、今後、詳細な周波数解析とともに視覚、聴覚及び体性感覚誘発電位の解析を行い発症初期の異常の有無について検討をすすめていく。

MRI 画像では、T1 強調画像で視床枕に高信号領域が観察された。ヒト vCJD において拡散強調画像や FLAIR 画像で視床枕に高信号領域が認められている所見（視床枕徴候：pulvinar sign）に相当している可能性が示唆された。また、小脳皮質にも境界明瞭な顕著な高信号領域が観察された。しかし、今回の撮像は BSL3 感染実験中の

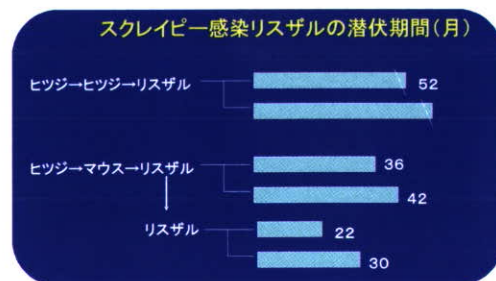
動物であり、P3 感染実験施設からの生体の搬出ができないため、安楽死後の撮像であった。死後変化の影響の可能性について検討が必要であるとともに、近年ヒトのプリオン病早期診断で用いられている Diffusion 画像は死後の撮像は不可能であることから、現在、呼吸器付き密封コンテナの開発を進めている。今後は BSE 感染カニクイザルを用いた MRI 早期診断を可能としたい。

ウエスタンブロット (WB) 法による異常型プリオン蛋白質の検索においては 2 例とも中枢神経系に高濃度の分布が認められた。また、全身麻痺症状を示した後 10 日間維持した # 7 では末梢神経からも検出されたことから、異常型プリオン蛋白が神経向性に遠心的に広がっていると考えられ、臨床症状の進行と合致していた。また、その広がりはかなり急速であることが示唆された。

病理検索においては、中枢神経系において海綿状変性ととも異常型プリオン蛋白が広範に検出され、その形状は BSE 及びヒト vCJD と同様の florid plaque に類似していた。

E. 結論

カニクイザルを用いたプリオン病発症モデル系の確立は高次脳機能、画像診断による評価系確立と生体材料を用いた早期診断系を確立することにより、治療、予防研究に寄付するとともに、移植、輸血等生物製剤由来医原性感染のリスク評価に有用と考えられる。



リスザルを用いたスクレイピー感染実験において発症サル脳乳剤を伝播したところ、潜伏期間が著しく短縮したことから、発症サル由来脳乳剤を用いた感染モデルを作成することにより、治療薬開発研究に有用な早期発症モデル系を確立することが可能と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

1. 小野文子, 田勢直美, 冷岡昭雄, 大山篤, 土

田順子, 和田直己, 山河芳夫, 佐多徹太郎, 寺尾恵治. カニクイザルを用いた BSE 発症モデル系の確立. 第 142 回日本獣医学会, 山口, 2006.10.

2. 小野文子, 田勢直美, 冷岡昭雄, 大山篤史, 川崎勝義, 土田順子, 村松慎一, 佐多徹太郎, 寺尾恵治. アップルテストによるカニクイザルの神経疾患モデルの機能解析. 第 22 回日本霊長類学会, 大阪, 2006.7.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし