

は PK 感受性で、グアニジンによる反応性の増強も認められなかったことから、プリオン病の発病および PrP<sup>Sc</sup> への変換への意義および感染性との関係について明らかにする必要がある。また、羊以外の動物種の血液への応用性について検討が必要である。

#### E. 結論

多量体 PrP<sup>d</sup>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より PrP<sup>d</sup>のシグナルが検出された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Masujin K, Shimada K, Kimura KM, Imamura M, Yoshida A, Iwamaru Y, Mohri S, Yokoyama T. Applicability of current bovine spongiform encephalopathy (BSE) diagnostic procedures for chronic wasting disease (CWD). *Microbiol Immunol* 2007, 51: 1039-1043.
2. Yokoyama T, Masujin K, Yamakawa Y, Sata T, Murayama Y, Shu Y, Okada H, Mohri S, Shinagawa M. Experimental transmission of two young and one suspended bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases to bovinized transgenic mice. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60: 317-320.
3. Masujin K, Matthews D, Wells GA, Mohri S, Yokoyama T. Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform

encephalopathy-affected cattle. *J Gen Virol* 2007; 88: 1850-1858.

##### 2. 学会発表

1. An SSA, Lim KT, Oh HJ, Lee BS, Fabre G, Segarra C, Ju YR, Schmerr MJ, Yokoyama T, Kim SY, Andreoletti O, Coste J. Detection of PrP<sup>Sc</sup> in plasma from scrapie sheep in preclinical stage using a Multimer Detection System-3D. *Prion* 2007. Edinburgh, Sept 2007.
2. T. Yokoyama, K. Masujin, Y. Shu, Y. Iwamaru, M. Imamura, S. Mohri. Characterization of an abnormal isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in the bovine spongiform encephalopathy (BSE) resistant animals. *Prion* 2007, Edinburgh Sept 2007.
3. Masujin K, Wells GAH, Matthews D, Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Shimizu Y, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Prions in peripheral nervous system tissues in bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Prion* 2007, Edinburgh, Sept 2007.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

## 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

### ーヒト FABP 特異的ニワトリモノクローナル抗体の作製と FABP 検出系の構築ー

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

ニワトリは哺乳類高度保存分子を認識する抗体を作製する上で有用な動物である。

本研究では、ニワトリモノクローナル抗体作成技術を活用してヒトプリオン病の免疫学的診断に係る研究として、BSE 診断に有用な抗プリオンタンパクニワトリモノクローナル抗体を CJD 患者脳材料に適用することと、CJD 患者脳脊髄液中に特異的に出現することが報告されている H-FABP に特異的なモノクローナル抗体を作製することを試みた。組換え Ab3-15 および Ab4-19 の 2 種の抗プリオンタンパクニワトリモノクローナル抗体による、CJD 患者脳材料（扁桃体）を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、対照として用いた 3F4 抗体と比較して、極めて強い陽性所見を得た。一方、H-FABP の検出のために、H-FABP に特異的なマウスモノクローナル抗体（1 種、6A1）およびニワトリモノクローナル抗体（27 種、HUFa1～27）を作製することに成功した。これらの抗体のうち、HUFa2 と HUFa26（または HUFa27）の組み合わせによって、組換え H-FABP を検出できることを明らかにした。また、既知の H-FABP 検出用キットを用いたヒトプリオン病患者脳脊髄液中の H-FABP 検出を試み、効率よく検出できることを確認した。ニワトリモノクローナル抗体の優位性を考慮すると、本研究で作製したニワトリモノクローナル抗体を活用することで、従来よりも高感度な H-FABP 検出系を構築できるものと思われる。

#### 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ピー感染マウス脳やヒト sCJD 脳を材料とした PrPsc の検出、さらに、CJD の有用なマーカーとなることが予想される H-FABP (1, 2) の検出用抗体の作製とアッセイ系の構築等を試みた。

#### B. 研究方法

1. PrPsc 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（1）から選抜した抗体 2 種（Ab3-15（2）および Ab4-19）について、これらの抗体を HPR 標識して、ウエスタンブロットによるスクレーピー感染マウス脳やヒト sCJD 脳を用いた PrPsc 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 の検出のための競合 ELISA の系を構築した。また、二抗体法 (サンドイッチ ELISA) でも H-FABP が検出できるように抗 H-FABP 特異的マウスモノクローナル抗体も作製した。

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-NH<sub>2</sub>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ティングにて行った。

競合 ELISA は、ビオチン標識 H-FABP (500 倍~4000 倍) と検体 (18 年度の研究では CJD 患者試料の代わりに心筋梗塞患者血清を活用) 30 $\mu$ l 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 $\mu$ g/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 streptoavidin 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。

H-FABP 検出の別法として、サンドイッチ ELISA 法のための実験も実施した。すなわち、組換え H-FABP をマウスならびにニワトリに免疫し、マウスは細胞融合法で、ニワトリはファージディスプレイ法でモノクローナル抗体を作製した。ニワトリについては、非免疫ニワトリから作製したナイーブライブラリーも利用した。

H-FABP の検出法については、心筋梗塞患者の検査法としてサンドイッチ ELISA およ

びイムノクロマト法 (Rapicheck) キットがあることからこれらも活用して、CSF 中の H-FABP の検出も実施した。

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。健常人サンプルは、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。

さらに、H-FABP の新たなアッセイ系の構築のために、新規の抗ヒト H-FABP マウスモノクローナル抗体の作製を試みた。

#### (倫理面での配慮)

研究に使用する実験動物は、広島大学実験動物取扱規定に遵守して取り扱った。

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の岩城・佐々木両博士の指導下で実施され、また、ヒトプリオン病他の脳脊髄液を用いた H-FABP の検出は長崎大学の佐藤博士に依頼した。一方、広島大学で供試したヒト 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。

#### C. D. 研究結果と考察

HRP 標識ニワトリモノクローナル抗体を用いた PrPsc の検出

スクレーピ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。スクレーピ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PrPscを明瞭に検出し得た。また、sCJD扁桃体についても供試最低濃度までPrPscを明瞭に検出し得た(図1)。

### 1. 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。

### 2. 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ンブリー、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 $2.6 \times 10^7$  cfu/ $\mu$ 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。

### 3. 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 $\mu$ g/ml~300 $\mu$ 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、以下の競合ELISA用抗体としてHUFa1を選択した。

### 4. 競合ELISAの構築

競合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°C・60 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。

#### 5. 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。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。

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 PrPsc 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 CSF 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 中のタウタンパク質や 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。一方、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 について、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、HUFa1 抗体を選抜するとともに IgY 型抗体に組み換え、H-FABP 検出のための競合 ELISA 系を構築した。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。

拮抗 ELISA における検査は、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競合 ELISA の検出限界が約 1~10 ng/well であったことから、

今後、競合 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考えたが、HUFa1 抗体が立体構造認識抗体であったことから、新たな抗体の作製が必要となった。

19 年度の実験において、抗 H-FABP 抗体を新たにマウスとニワトリを用いて作製した。最終的にマウス抗体 (6A1, IgG1) とニワトリモノクローナル抗体 (HUFa5~HUFa27) を作製した。これまでのニワトリモノクローナル抗体 (HUFa1~4) を加えて、様々な組み合わせでサンドイッチ ELISA 系に活用の可能性を精査し、最終的に HUFa2 と HUFa26 (または HUFa27) の組み合わせが最も適していることを見出した。現在、HUFa26 (または HUFa27) については、scFv から IgY に組換えている途上である。

一方、既製の H-FABP 検出キットを活用して CJD 患者の CSF 中における H-FABP の検出を試み、その結果を図 2 にまとめた。この結果は、既報 (4, 5) のように、CJD の診断に H-FABP 検出が有効であることが確認された。前述の通り、H-FABP は心臓型の脂肪酸結合蛋白である点で興味深い。

#### [参考文献]

1. Nakamura N, Shuyama A, Shimokawa M, Miyamoto K, Hojyo S, Horiuchi H, Furusawa S, Matsuda H. Establishment of a chicken monoclonal

antibody panel against mammalian prion protein. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 807-814.

2. 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 region for diagnosis of BSE. *Biologicals* 2007; 35: 31-34.
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.
4. Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard P R, Hochstrasser D F, Sanchez J-C. A potential cerebral spinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 2003; 3:1495-1499.
5. 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.

## 異常型プリオンタンパク試験管内増幅法を用いた プリオン病の早期診断法の開発

研究協力者：新 竜一郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学

### 研究要旨

プリオン病疾患モデル動物の一つであるハムスターの系で、多量の正常脳乳剤とごく少量のプリオン感染脳乳剤を混ぜ合わせて試験管内で変換反応を行い、そこに間欠的な超音波処理をすることにより、異常型プリオンタンパク（PrP）を高効率で増幅することが可能であることが 2001 年に報告された。一方、大腸菌等から精製したリコンビナント PrP（rPrP）を、反応基質として用いる異常型 PrP 試験管内増幅法は、アミロイド凝集体を認識するチオフラビン T 等を用いることでより簡便な検出法を行うことができるなどの利点があるため、その開発が強く望まれてきた。我々は、rPrP を用いて異常型 PrP を増幅する方法を、開発することに成功した。

### A. 研究目的

プリオン病感染組織・体液を検体として、その中に含まれる検出困難な微量の異常型プリオンタンパクを、容易に検出できるレベルまで試験管内で増幅できるアッセイを開発し、いまだ困難なプリオン病の早期確定診断の確立を目指す。

### B. 研究方法

#### （倫理面の配慮）

本研究課題では、プリオンに感染している試料を用いるのに対し、すべての実験はバイオハザード実験室にて執り行い、感染性物質の外部への搬出等ないよう細心の注意を払って行った。

### C. D. 研究結果及び考察

プリオン病疾患モデル動物の一つであるハムスターの系で、多量の正常脳乳剤とごく少量のプリオン感染脳乳剤を混ぜ合わせて試験管内で変換反応を行い、そこに間欠的な超音波処理をすることにより、異常型プリオンタ

ンパク（PrP-res）を高効率で増幅することが可能であることが報告されていた。しかし、脳ホモジネートではなく大腸菌等から精製したリコンビナントプリオンタンパク（rPrP）を変換反応の基質として用いることは、その正常型 PrP から PrP-res への変換過程の分子メカニズムを解明する上でも実際の診断法に応用する上でも大きな利点があると考えられるが、これまで成功例はなかった。我々は最近、脳乳剤を用いた場合以上の高効率で rPrP がプロテアーゼ抵抗性の凝集体へ変換される条件を見出した。具体的な方法としては、まずハムスター（SHa）PrP（23-231）配列を大腸菌に発現させ、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製した SHa rPrP とハムスタープリオン（263K）感染脳から精製した PrP-res あるいはプリオン感染脳乳剤を少量の detergent 存在下で混合し 37℃ で変換反応を行わせた。そこに間欠的に超音波処理して反応を促進させ、反応終了後プロテアーゼ K (PK) 処理し、抗 PrP 抗体で Western Blot を行って PK 抵

抗性の rPrP[rPrP-res (Sc)] を検出した。その結果、rPrP-res (Sc) への変換反応は detergent (SDS, TritonX-100) の濃度に強く依存することが判明した。さらに超音波による Fibril 破碎効果により、脳乳剤を用いた場合と同様な強い促進効果が見られることも明らかになった。一方で超音波を繰り返すことにより PrP-res を全く加えない条件でも自然発生的に PK 抵抗性の凝集体[rPrP-res (spon)] が形成されたが、rPrP-res (Sc) とは PK 切断パターン、FTIR によるスペクトルが異なるなど明確に両者を区別することができた。またこの方法を用いてプリオン感染ハムスターの髄液中の PrP-res を検出することに成功した。さらに超音波処理よりも簡便な方法である攪拌を間欠的に繰り返すことによっても変換反応が促進されることを見出し、この方法を QUIC 法 (QUaking-induced Conversion) と名付けた。

## E. 結論

新たにリコンビナントプリオンタンパクを用いた異常型プリオンタンパク増幅法を開発した。

## 参考文献

1. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature 2001 Jun 14; 411 (6839) :810-813.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Atarashi R, Wilham JM, Christensen L,

Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. Nature Methods. 2008; 5 (3) : 211-212.

2. Atarashi R, Moore RA, Sim VL, Hughson AG, Dorward DW, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. Nature Methods 2007; 4 (8) : 645-650.

## 2. 学会発表

1. 新竜一郎. リコンビナントプリオンタンパクを用いた異常型プリオンタンパク試験管内増幅法. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2007.10.
2. 新竜一郎. リコンビナントプリオンタンパクを用いた異常型プリオンタンパク試験管内増幅法. 2007年プリオン研究会, 津南, 2007.8.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

新竜一郎. US Patent Application No. 60/961,364.

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし



## 末梢組織生検によるプリオン病生前早期診断の試みと骨格筋感染性の検討

研究協力者：古川ひさ子 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学  
特別医療法人栄光会栄光病院神経内科・神経難病センター  
研究協力者：片峰 茂 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学  
研究協力者：横山 隆 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生  
研究所プリオン病研究センター  
主任研究者：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病態学

### 研究要旨

比較的低侵襲な手技で生検可能な神経含有組織である鋤鼻（じょび）器官（vomeronasal organ : VNO）に着目し、プリオン病の生前早期診断方法開発研究を行った。263K プリオン株感染ハムスターを用いた実験系では発症前から VNO に異常プリオンが蓄積し感染性も認められたが、感染後超早期にはこれらは認められなかった。一方同実験系において感染超早期骨格筋の一部に明らかな感染性が確認された。ウシ BSE においては発症後末期においても VNO に異常プリオンの蓄積は検出されず、BSE の早期診断ツールとしての有用性は否定的であった。

### A. 研究目的

プリオン病感染個体の VNO から異常プリオン（PrP<sup>Sc</sup>）を検出し、BSE をはじめとするプリオン病の生前診断あるいは発症前診断が可能かを検討する。

### B. 研究方法

1) 263K プリオン株感染ハムスターを用いた実験

6 週齢のシリアンハムスターに 263K 感染脳乳剤（10% 200 $\mu$ L）を腹腔内接種する。接種後 4 週・6 週・8 週目に安楽死させ、VNO、脳、坐骨神経を採取して 10%乳剤を調製し 20 $\mu$ L をインジケーターハムスターに脳内接種し感染性を評価した。骨格筋については腹腔内接種後 4 週目のヒラメ筋、大腿（後面）筋、肩甲骨周囲筋、肋間筋を採取して同様に評価した。

2) BSE 感染牛を用いた実験

動物衛生研究所にて国内発症の BSE 牛および同 BSE を脳内接種した（発症あるは発症前）牛の VNO を採取し、Western blot 法を用いてプロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白の検出を試みた。検出感度を向上させるために VNO 乳剤はリンタングステン酸で沈澱させたあとに SDS-PAGE で展開した。1 次抗体は動物衛生研究所より供与された T2 を用いた。

### （倫理面への配慮）

すべての動物実験は長崎大学動物実験委員会の指針に従って行われた。BSE 感染材料については動物衛生研究所の分与規定に従って受領・保管し実験後の処理を行った。

### C. 研究結果

1) ハムスター実験系

VNO は感染早期には PrP<sup>Sc</sup> 蓄積の場とならな

い

263K プリオン株は腹腔内投与後約 14 週で発症する実験系である。表 1 に示すように、発症より 4 週程度早い時期（接種後 10 週目）から感染性を獲得したが、2 年間の観察を経た結果、それ以前の早期の VNO に感染性は確認できなかった。比較として脳で検討したところ 4 週後から半数のハムスターが発症した（免疫組織化学的に PrP<sup>Sc</sup> の脳への沈着を確認している）。

#### 一部の骨格筋は感染早期から PrP<sup>Sc</sup> 蓄積の場となる

表 1 からわかるようにヒラメ筋で早期から感染性が認められたため他の筋（肩甲周囲筋、肋間筋、大腿後面筋）についても腹腔内投与後 4 週目の感染性を評価した。また、支配神経として坐骨神経についても同様に検討した。結果を表 2 に示す。肩甲周囲筋、肋間筋には長期観察の結果感染性は認められず、大腿後面筋では半数のハムスターが 200 日前後で発症し、ヒラメ筋投与群は 181 から 465 日の間にすべてが発症した。一方これら下肢筋の支配神経である坐骨神経を接種したハムスターは発症しなかった。坐骨神経については腹腔内投与後 6 週・8 週のものも検討したが長期観察にもかかわらずまったく発症しなかった。

#### 2) BSE 牛

昨年度報告した結果と同様、国内発症牛・実験的 BSE 牛ともに VNO から PrP<sup>Sc</sup> は検出されなかった。

#### D. 考察

263K 株感染ハムスターでは VNO が PrP<sup>Sc</sup> の蓄積の場となるが、10 週以降であり脳のように早期からではないことが明らかになった。

また BSE 感染牛においては感染・発症後期に至っても VNO は PrP<sup>Sc</sup> 蓄積の場とならず、早期診断ツールとしての有用性はないと考えられた。

一方 263K 株感染ハムスターでは（今回検討した範囲では）下肢骨格筋が極めて早期から 263K 株プリオン蓄積の場となり、支配神経である坐骨神経ではむしろ spare されている結果と対照的であった。末梢神経細胞と骨格筋細胞の PrP<sup>Sc</sup> に対する感受性の違いを示すものと考えられた。

#### E. 結論

VNO 生検の BSE 早期診断における有用性はないことが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 学会発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

表 1

感染材料の 採取時期 (i.p.後)	感 染 材 料		
	VNO	脳	ヒラメ筋
4W	>730 (0 / 8)	403 (2 / 4)	298 (4 / 4)
6W	>730 (0 / 8)	>730 (0 / 4)	
8W	>581 (0 / 8)	97.0 (4 / 4)	
10W	112.7 (3 / 4)	81.8 (4 / 4)	119.8 (4 / 4)
12W	129.0 (3 / 4)	80.5 (4 / 4)	99.3 (4 / 4)
14W	107.0 (4 / 4)	84.3 (4 / 4)	107.0 (3 / 4)
Terminal	98.0 (4 / 4)	64.0 (4 / 4)	106.0 (4 / 4)

表の数字は潜伏期間（日）を、カッコ内は 発症数 / 接種総個体数を示す

表 2. ハムスター骨格筋の感染性

感染材料はいずれも腹腔内投与 4 週目に採取した骨格筋・神経

	発症数 / 接種個体総数	潜伏期間（観察期間）
肩甲周囲筋	0 / 4	(600dpi)
肋間筋	0 / 4	(730dpi)
大腿（後面）筋	2 / 4	193, 200dpi (730dpi)
ヒラメ筋	4 / 4	181, 226, 320, 465dpi
坐骨神経	0 / 4	(730dpi)

## 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

蛍光標識正常型プリオンタンパク質（PrP<sup>C</sup>）を用いて、生細胞内での trafficking を解析し、(1) PrP<sup>C</sup> が微小管依存性局在・移動していること、(2) 順方向性輸送がキネシン依存性（150 nm/sec）、逆行性輸送はダイニン依存性（1 $\mu$ m/sec）であること、(3) 神経成長因子 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 50 nm/sec と著明に低下していたが、逆行性輸送速度には変化は見られなかったこと、(4) siRNA を用いた実験により、この樹状突起内での移動速度低下の現象には、キネシンスーパーファミリーである KIF5C が関与していることを見出した。これらの結果より、PrP<sup>C</sup> 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可能性が推察された。

### A. 研究目的

感染型プリオンタンパク質（PrP<sup>Sc</sup>）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<sup>C</sup>）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、PrP<sup>C</sup> の細胞内輸送機構の解明を目的とし、蛍光標識 PrP<sup>C</sup> の細胞内可視化系を用いた検討を行った。

### B. 研究方法

- 1) PrP<sup>C</sup> 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<sup>C</sup> 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<sup>C</sup> 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<sup>C</sup> の細胞内挙動、輸送される PrP<sup>C</sup> の最終目的地に関する検討を通じ、PrP<sup>C</sup> の生理機能の解明を試みた。

### (倫理面への配慮)

本研究は、患者や動物を対象としていないため、特段の配慮は必要ない。必要な場合には、東京医科大学並びに関連施設の倫理規定に従って対応する。

### C. 研究結果

- 1) 微小管阻害剤であるノコダゾールにより、PrP<sup>C</sup> 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<sup>C</sup> 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<sup>C</sup> 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<sup>C</sup> 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<sup>C</sup> 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、PrPC 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 PrPC 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) PrPC 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 PrPC 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 mm/sec での移動が観察された。
- 6) PrPC の細胞内輸送をさらに詳細に解析するために、我々は PrPC の N 末端に GFP を融合したキメラ蛋白質 (GFP-PrPC) 発現プラスミドを構築し、N2a 細胞において発現後、薬剤耐性によるスクリーニングを経て、安定にキメラ蛍光タンパク質を発現する細胞株を樹立した。
- 7) この GFP-PrPC 安定発現 N2a 細胞を用いて、デルタビジョンセクション顕微鏡により、分化前後での輸送速度のタイムラプス測定を行った結果、核から細胞膜方向への順行性の輸送において、細胞体内における GFP-PrPC の移動速度が 140 nm/sec であったのに対し、樹状突起内では 50 nm/sec と、ほぼ 1/3 にまで低下していることを見出した。一方、ダイニン依存性の逆行性輸送においては速度の違いは観察されなかった。
- 8) SiRNA を用いた実験により、この樹状突起内での移動速度低下の現象には、キネ

シンスーパーファミリーである KIF5C が関与していることを見出した。

- 9) これらの観察結果は同じコンストラクトのキメラ蛋白質を一過性に発現した PC12 細胞においても同様に認められた。以上の観察結果から、GFP-PrPC 安定発現 N2a 細胞においては、核から細胞膜方向への順行性輸送の際、細胞体から樹状突起に至る過程で輸送機構の変化が生じていることが明らかになった

#### 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。

我々が樹立した N 末端標識 GFP 融合 PrPC, C 末端標識 DsRed 融合 PrPC の持続発現 PC12 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、PrPC 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可能性が示唆された。

PrPC の細胞内動態の検討を通じ、PrPC 分解酵素の同定と作用機序解明を目的とする。これらの成果は、プリオン病の治療法開発のみならず、PrPC が蛋白質分解酵素と反応する際にその関与が示唆される分子シャペロン様分子の同定への貢献も期待される。

#### E. 結論

我々が樹立した N 末端標識 GFP 融合 PrPC, C 末端標識 DsRed 融合 PrPC の持続発現 PC12 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、PrPC 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可能性が示唆された。

## [参考文献]

特になし

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表 (2007/4/1~2008/3/31 発表)

### 1. 論文発表

1. Hachiya NS, Kaneko K. Investigation of laser-microdissected inclusion bodies. *Methods Cell Biol* Vol. 82, Berns M, Greulich KO ed. Academic Press (San Diego), 2007: 355-375.
2. 八谷如美, 金子清俊. 正常プリオン蛋白とその機能. プリオン病と遅発性ウイルス感染症. *日本臨床*. 2007: 65 (8); 1385-1390.
3. 八谷如美, 金子清俊. プリオン病. アルツハイマー病 -基礎研究から予防・治療の新しいパラダイム- Vol.4, 平井俊策 ed. 日本臨床社 (東京), 印刷中
4. 八谷如美, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質の機能. プリオン病と遅発性ウイルス感染症 Vol. 水澤英洋 ed. 金原出版 (東京), 印刷中

### 2. 学会発表

1. Hachiya NS, Nishijima K, Yoshimichi K, Kaneko K. Diagnostic and therapeutic use of a novel unfolding chaperone, oligomeric actin-interacting protein 2 (Aip2p), for neurodegenerative diseases. 3rd Annual Therapeutic Strategies against Neurodegenerative Conditions. San Francisco, Sept 20-21, 2007.
2. 金子清俊. プリオン病の早期診断と治療法の進歩. 平成 18 年度難治性疾患克服研究推進事業研究成果発表会. 東京, 2007.2.26.
3. 金子清俊. プリオン病と分子シャペロン. 第 2 回臨床ストレス応答学会. 福岡, 2007. 11.30-12.1.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. 金子清俊. 高効率抗体スクリーニング方法. 日本 patent 第 4022367 号. 10.5 2007.

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## プリオン蛋白産生に影響する遺伝子の発現解析

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・  
食の安全研究センター

研究協力者：日下部守昭 東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
食の安全研究センター

### 研究要旨

プリオン蛋白（PrP）の機能としては、アポトーシス抑制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。今年度は、PrP 欠損細胞とマウス PrP 発現細胞を用いて通常培養時における各種遺伝子発現について定量 PCR を用いて解析した。107 遺伝子を選択してリアルタイム PCR によって解析した結果、マウス PrP 発現細胞と比較して PrP 欠損細胞では、interferon, alpha-inducible protein 27 (Ifi27) 遺伝子および tenascin C (TNC) 遺伝子遺伝子発現の低下（80%および 75%）が認められた。

### A. 研究目的

これまで PrP のアポトーシス抑制部位について研究を行ってきたが、今年度は、PrP 産生に伴うその他遺伝子の発現影響を調べることを目的とした。

### B. 研究方法

マウス 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、マウス PrP 発現細胞を樹立した。また、ベクターのみを導入して作製した細胞を PrP 欠損細胞として用いた。PrP の発現は、抗 PrP 抗体を用いてウェスタンブロット法および間接蛍光抗体法で解析した。各細胞株より全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。105 遺伝子について合成プライマーを作製し、リアルタイム PCR によって

遺伝子の発現について比較した。内在遺伝子発現コントロールとして、Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)、porphobilinogen deaminase (PBGD)、succinate dehydrogenase complex subunit A (Sdha)、hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1) の 4 遺伝子を用いた。

### (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保に関する法律」および大学内規定を遵守して実施した。

### C. 研究結果

マウス PrP 発現細胞および PrP 欠損細胞からそれぞれ調製した cDNA を用いて、107 遺伝子（表 1）について定量 PCR を行った結

果、72 遺伝子について発現の定量比較が行えたが、35 遺伝子については発現が確認できない、または発現が極めて低くて定量性に欠ける結果を得た。定量比較のできた 72 遺伝子中、4 遺伝子 (Ifi27 および TNC) において PrP 欠損によって遺伝子発現が減少することが示された (表 2.70 および 105-107)。TNC についてはスプライスバリエーションについても解析を行ったが、短いタイプの mRNA (106 番) よりも長いタイプの mRNA (105 番) においてより発現が低下していることが示唆された。105 に対する 106 の発現割合は約 10 分の 1 であった。

#### D. 考察

これまでに一部アミノ酸配列欠損 PrP を用いた研究により、PrP の N 末端領域のアミノ酸配列 53-94 や 95-132 の欠損によってアポトーシス抑制がなくなるが、124-146 の欠損によってはアポトーシス抑制が認められることから PrP アミノ酸配列 1-124 (PrP1-124) が、血清除去後に誘導されるアポトーシス抑制に重要であると報告してきた (1)。また、この PrP1-124 を PrP 様蛋白である Dpl に融合させると、Dpl 自体にはアポトーシス抑制は認められないが、PrP1-124-Dpl 融合蛋白を発現させるとアポトーシス抑制が認められることから、PrP1-124 にアポトーシス抑制活性の部位が存在すると報告した (2)。

アポトーシス誘導過程で、PrP 欠損細胞は、マウス PrP 発現細胞と比較して、早期に細胞の球形化および凝集が起り、培養デッシュ面からの剥離が認められる (3)。本研究では、これらの細胞変化に注目し、主に細胞表面分子 (細胞接着分子、ホルモン/成長因子レセプター、細胞外マトリックス分子等) の遺伝子発現について解析を行った。

遺伝子発現変化の認められた TNC は、1980 年代に神経細胞の病理学者、形態学者等

それぞれの立場から発見された分子であり、最近においては癌と TNC の産生の関係について研究がなされている。一方で PrP は神経細胞において発現が高い分子として知られ、細胞の癌化 (不死化) との関連が疑われている。

また、発現変化の認められた Ifi27 はインターフェロン産生に関係する分子として知られている。以前我々の行った研究では、ウイルス感染に伴うタイプ I インターフェロンの産生応答が PrP 欠損細胞で低いことが示唆されている (4) 以上のことから TNC と PrP およびインターフェロン産生と PrP の関連を研究していくことは、PrP の機能解明につながるかもしれない。

#### E. 結論

細胞株を用いた研究により、Ifi27 および TNC は、PrP 欠損によって遺伝子発現の影響を受ける。

#### [参考文献]

1. Sakudo A, Lee DC, Nishimura T, Li S, Tsuji S, Nakamura T, Matsumoto Y, Saeki K, Itohara S, Ikuta K, Onodera T. Octapeptide repeat region and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein (PrP) mediate PrP-dependent activation of superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326(3): 600-606.
2. Lee DC, Sakudo A, Kim CK, Nishimura T, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Chen SG, Itohara S, Onodera T. Fusion of Doppel to octapeptide repeat and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein confers resistance to serum deprivation. *Microbiol Immunol.* 2006; 50(3): 203-209.



3. Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 1999; 400(6741): 225-226.
4. Nakamura Y, Sakudo A, Saeki k, Kaneko T, Matsumoto Y, Toniolo A, Itohara S, Onodera T. Transfection of prion protein gene suppresses coxsackievirus B3 replication in prion protein gene-deficient cells. *J Gen Virol* 2003; 84(12); 3495-3502.
- in ZrchI Prion Protein (PrP) Gene-Deficient Neuronal Cell Line Is Suppressed by PrP, Independent of Doppel. *Microbiol Immunol.* 2007; 51(4):457-466.
2. Kim CK, Sakudo A, Taniuchi Y, Shigematsu K, Kang CB, Saeki K, Matsumoto Y, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T. Late-onset olfactory deficits and mitral cell loss in mice lacking prion protein with ectopic expression of Doppel. *Int J Mol Med* 2007; 20(2):169-176.

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表.

1. Nishimura T, Sakudo A, Hashiyama Y, Yachi A, Saeki K, Matsumoto Y, Ogawa M, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T. Serum Withdrawal-Induced Apoptosis

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

表 1. 定量 PCR 解析に用いた遺伝子

No	name	No	name	No	name
1	amphiregulin	38	Fibronectin-1	75	MMP14 (matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) )
2	BRCA1	39	GAPDH	76	MMP1a (matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase) )
3	BRCA2	40	G-CSF R (granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor low-affinity subunit )	77	MMP2 (matrix metalloproteinase 2 (interstitial collagenase) )
4	breast carcinoma amplified sequence 1 (BCAS1)	41	glucocorticoid receptor	78	MMP9 (matrix metalloproteinase 9 (interstitial collagenase) )
5	breast carcinoma amplified sequence 2 (BCAS2)	42	granulocyte colony-stimulating factor receptor	79	NCAM-1/CD56
6	breast carcinoma amplified sequence 3 (BCAS3)	43	heat shock 70kDa protein 1B (HSPA1B), mRNA	80	NCAM-2
7	Cadherin E, E-Cadherin, uvomorulin, Cell-CAM120/80, L-CAM, Arc-1	44	Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF),	81	NME1 non-metastatic cells 1
8	calcitonin receptor (Calcr)	45	HGF (hepatocyte growth factor)	82	Osteopontin
9	Catenin alpha 1, Ctnna1	46	homeo box C11 (HOXC11)	83	platelet-derived growth factor receptor alpha (Pdgfra)/CD140a
10	Catenin beta 1, Ctnnb1	47	HSPA9	84	platelet-derived growth factor receptor beta (Pdgfrb)/CD140b
11	Catenin delta1	48	HspB1/HSP 27/SRP27/Estrogen-regulated 24 kDa protein	85	prion protein
12	Ctnnd2, catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein)	49	ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), CD54	86	Progesterone receptor (Pgr)
13	CCR4 (chemokine (C-C motif) receptor 4)	50	insulin-like growth factor 1 receptor, CD221	87	S100 calcium binding protein A10, S100a10
14	CD100 /Leukocyte Semaphorin	51	insulin-like growth factor 2 receptor, CD222	88	Tenascin-W
15	CD155 /PVR (Poliovirus Receptor)	52	Integrin alfa-1/CD49a	89	Transforming growth factor, beta receptor I (Tgfr1)
16	CD26 / DPP IV / ADA-Binding Protein/adenosine deaminase complexing protein 2/dipeptidyl peptidase IV	53	Integrin alfa-2/itga2	90	Transforming growth factor, beta receptor II (Tgfr2)
17	CD31 / PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1)	54	Integrin alfa-3/CD49c	91	Transforming growth factor, beta receptor III (Tgfr3)
18	CD38	55	Integrin alfa-4/CD49d (variant 1)	92	Transforming Growth Factor-a (TGF-a)
19	CD48/Blast-1/HuLy-m3/BCM1 (in mouse)/OX-45 (in rat)	56	Integrin alfa-5/CD49e	93	tumor necrosis factor II receptor (TNFR-2)
20	CD6	57	Integrin alfa-6/CD49f	94	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a (Tnfrsf1a)
21	CD81/TAPA-1	58	Integrin alfa-9	95	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b (Tnfrsf1b)
22	CEA (carcinoembryonic antigen) -related cell adhesion molecule 1/Ceacam1	59	Integrin alfa-V/CD51	96	vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)/Flk-1
23	c-erbB-2 / HER-2 / neu	60	Integrin alfa-X/CD11c (variant 2)	97	VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1)
24	CK19(cytokeratin 19)	61	Integrin alfa-X/CD11c (variant 1)	98	VEGF (vascular endothelial growth factor ) A, variant 1
25	Connexin 43 (exon1A-1E )	62	integrin Beta-1 /CD29/gp11a	99	VEGF (vascular endothelial growth factor ) C
26	ELAM-1(Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1) /CD62E	63	Integrin Beta-2/CD18	100	WT1
27	Epidermal Growth Factor Receptor / EGFR (transcript variant 1)	64	Integrin Beta-3/CD61/gpIIIa	101	PGK1(Phosphoglycerate kinase 1)
28	Epidermal Growth Factor/ EGF	65	Integrin Beta-4	102	PBGD(porphobilinogen deaminase)
29	Epithelial Membrane Antigen/EMA/CA15-3/MUC-1	66	Integrin Beta-5	103	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) (Sdha),
30	estrogen receptor 1 (alpha)	67	Integrin Beta-6	104	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1),
31	estrogen receptor 2 (beta)/Esr2, variant1	68	Integrin Beta-7	105	tenascin C, variant 1(mTNC1)
32	Fgfr1 oncogene partner (Fgfr1op)	69	Integrin Beta-8	106	tenascin C, variant 2(mTNC2)
33	FGFR1 oncogene partner 2 (Fgfr1op2)	70	interferon, alpha-inducible protein 27, Ifi27	107	tenascin C, variant 1,2共通(mTNC3)
34	fibroblast growth factor receptor 1(FGFR-1)	71	L1 Cell Adhesion Molecule, L1cam		
35	fibroblast growth factor receptor 2(FGFR-2)	72	Laminin Receptor (34/67 kDa laminin receptor)		
36	fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR-3)	73	laminin, alpha 4 (Lama4)		
37	fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR-4)	74	macrophage scavenger receptor type I, Msrl		

表 2. 遺伝子発現 PrP 欠損細胞/マウス PrP 発現細胞 (PrP-/PrP+)

Primer	PrP-/PrP+	Primer	PrP-/PrP+	Primer	PrP-/PrP+	Primer	PrP-/PrP+	Primer	PrP-/PrP+	Primer	PrP-/PrP+
1	-	19	-	37	-	55	-	73	96.2%	91	109.2%
2	112.3%	20	-	38	94.7%	56	92.7%	74	-	92	101.4%
3	102.8%	21	103.4%	39	-	57	92.1%	75	100.7%	93	96.9%
4	-	22	102.0%	40	-	58	117.4%	76	123.9%	94	104.1%
5	98.7%	23	101.1%	41	98.5%	59	108.3%	77	102.7%	95	108.5%
6	102.5%	24	-	42	98.3%	60	107.0%	78	92.7%	96	-
7	117.7%	25	99.5%	43	104.4%	61	98.2%	79	116.2%	97	116.0%
8	-	26	-	44	106.4%	62	98.0%	80	-	98	105.7%
9	99.1%	27	98.6%	45	96.1%	63	105.5%	81	91.2%	99	105.3%
10	93.9%	28	103.8%	46	92.0%	64	99.5%	82	90.8%	100	-
11	108.1%	29	105.1%	47	95.2%	65	110.9%	83	109.2%	101	102.4%
12	-	30	111.9%	48	-	66	102.4%	84	104.9%	102	100.0%
13	-	31	-	49	85.0%	67	120.2%	85	-	103	99.1%
14	-	32	103.3%	50	102.6%	68	94.3%	86	-	104	98.4%
15	96.0%	33	97.7%	51	97.7%	69	106.4%	87	104.9%	105	72.2%
16	-	34	92.2%	52	93.0%	70	79.9%	88	-	106	84.4%
17	-	35	108.1%	53	101.7%	71	57.9%	89	96.2%	107	75.0%
18	101.7%	36	104.6%	54	100.0%	72	94.4%	90	108.0%		

PrP 欠損細胞/マウス PrP 発現細胞を%で示した。内在遺伝子発現コントロールとして 102 番の PBGD を 100%として各遺伝子発現割合を示した。■ は、内在遺伝子コントロール。■ および ■ は、発現の定量が可能であった遺伝子および発現割合。■ は、遺伝子発現に変化が認められたもの。■ は遺伝子の発現が確認できない、または遺伝子発現が極めて低く定量性に欠ける遺伝子 ■ は、PrP

## プリオン蛋白による小胞体ストレス誘導神経細胞死の抑制

分担研究者：坂口 末廣 徳島大学疾患酵素学研究センター・神経変性疾患研究部門  
研究協力者：山口 仁孝 徳島大学疾患酵素学研究センター・神経変性疾患研究部門  
研究協力者：森 剛志 徳島大学疾患酵素学研究センター・神経変性疾患研究部門

### 研究要旨

正常型プリオン蛋白の機能として、神経保護作用が報告されている。今回我々は、多くの神経変性疾患の神経変性死のメカニズムのひとつである小胞体（ER）ストレスに注目し、プリオン蛋白の抗 ER ストレス能について検討した。プリオン蛋白非発現細胞（HpL3-4）および同細胞に PrP を導入した細胞（HpL3-4TR）を用いて、Tunicamycin により ER ストレスを誘導した結果、HpL3-4 は HpL3-4TR と比較して有意な細胞死を来した。また、HpL3-4 にプリオン蛋白を新たに導入することで、細胞生存率が上昇することを確認した。このことは、正常型プリオン蛋白が ER ストレスの緩和に重要な役割を担っていることを示した。

### A. 研究目的

アルツハイマー病やパーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患において、異常蛋白の蓄積に伴い小胞体（ER）ストレスが誘導され、神経細胞死が起こることが報告されている<sup>1-3</sup>。また、培養細胞を用いた実験では、異常型プリオン蛋白が ER ストレスを誘導し神経細胞死をもたらすことが報告されている<sup>4</sup>。しかしながら、これらの詳細な分子機構は未だ解明されていない。

本研究では、正常型プリオン蛋白と ER ストレスとの関係について検討した。

### B. 研究方法

プリオン蛋白ノックアウトマウス（R1kn マウス）海馬神経細胞より樹立された培養細胞（HpL3-4）および同細胞に PrP を導入した細胞（HpL3-4TR）を用いて、Tunicamycin（2  $\mu$ g/ml）を培養上清中に添加して ER ストレスの誘導を行った。また、WST-8 法により生細胞数を定量化し、コントロール

（DMSO 投与群）と比較して、Tunicamycin 処理後の細胞生存率を算出した。同時に、それぞれの細胞を Western blot に供した。

また、HpL3-4 にプラスミドベクターを用いてマウスプリオン蛋白遺伝子を新たに導入し、薬剤選択を行った後に Tunicamycin 処理を行い、同様に細胞生存率の変化を比較解析した。

### （倫理面への配慮）

遺伝子組み換え実験については、『遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律』ならびに『研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令』等の関連法令および大学内規定を遵守して実施した。

### C. 研究結果

Tunicamycin 処理によって ER ストレスを誘導したところ、プリオン蛋白非発現細胞