

分担研究者：堀内基広 北海道大学大学院獣医学研究科

1. 研究目的

プリオン細胞内増殖や細胞間伝播の解析は、プリオンの増殖機構や伝播機構を標的としたプリオン病治療薬の開発に有用な情報を提供すると考えられる。そこで、プリオンの細胞間伝播機構について検討する。

抗 PrP 抗体や硫酸化糖のように、異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の産生を阻害する物質はプリオンの治療薬の候補となる。培養細胞レベルで PrP^{Sc} 産生阻害活性を有する物質は数多く報告されているが、作用機序が明らかでないものが多い。そこで、硫酸化糖と抗 PrP 抗体による PrP^{Sc} 産生阻害機構を明らかにするとともに、プリオン感染マウスを用いてこれらのプリオン病治療効果について検討する。

また、プリオン病の治療には、プリオンの増殖抑制に加えて、神経保護作用あるいは神経修復作用が期待できる方法の併用が必要である。そこで、再生医療の技術がプリオン病の治療に応用できないかについて検討する。

2. 研究方法

当研究室で樹立したマウス神経芽腫細胞 N2a のサブクローン N2a-3 にプリオン Chandler 株が持続感染した ScN2a-3 は、細胞への感染実験で容易に検出できるレベルのプリオンを培養上清中に放出する。ScN2a-3 の培養上清中に放出されるプリオン感染性の生化学性状、物理化学性状を、PrP^{Sc} の検出、および細胞を用いた感染性評価試験により解析した。また、プリオンの細胞間伝播効率が大きく異なる ScN2a-3 と ScN2a-5 の遺伝子発現比較解析から、プリオンの細胞間伝播に関与する宿主因子を探索した。

部位特異的に硫酸基を導入した人工合成硫

酸化糖を使用して、硫酸化糖の構造とプリオン増殖抑制活性の関係を解析した。

抗 PrP 抗体および硫酸化糖を、浸透圧ポンプを用いてプリオン感染マウスの脳室内に持続投与して、病気の進行、プリオンの増殖、および神経病変の形成に及ぼす影響を解析した。

骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は脳梗塞などの損傷や神経変性性疾患の病変部に集積して、神経栄養因子の産生等により神経保護・再生作用を発揮することが知られている。そこで、プリオン感染マウスに不死化ヒト MSC を移植して MSC がプリオン病の神経病変部に集積するかを調べた。

(倫理面の配慮)

動物実験は、北海道大学動物実験指針を遵守し、同大学獣医学研究科の動物実験委員会により承認された実験計画書に記載されたプロトコールに従って実施した。

3. 研究結果及び考察

ScN2a-3 の培養上清中を非感染 N2a-3 に接種すると、その細胞は PrP^{Sc} 陽性となることから、培養上清中に感染性プリオンを放出していることが明らかとなった。

ScN2a-3 の培養上清中のプリオン感染性の 80% 以上は 10,000 x g の遠心で沈殿する画分に存在した。また、大部分は 200nm の孔径を通過しなかったことから、エクソソームよりも大きい粒子がプリオンの細胞間伝播に関与する可能性が示唆された。

グリコシド配糖体の 2 位のアセチル基と、および 4 位あるいは 6 位の硫酸基の存在が、プリオン増殖抑制活性と関連することが明らかとなった。

抗 PrP 抗体をプリオン Chandler 株感染マ

ウスの脳室内に持続投与した場合、発症期に投与を開始した場合でも、PrP^{Sc}の蓄積、神経病変形成の進行を遅らせた。また、生存期間が8%程度延長した。

潜伏期にあるプリオン感染マウスにMSCを移植した場合でも、MSCは神経病変部に集ぞくして、そこで長期間生残した。

4. 評価

1) 達成度について

プリオンの細胞間伝播機構に關与する宿主側の因子に関しては、候補は見つかっているものの、同定には至っていない。この点は目的を達成していないが、候補の絞り込みに至った点、およびエクソソーム以外の因子がプリオン伝播に關与することを見出したことは評価できる。

抗PrP抗体のin vivoにおける作用、硫酸化糖の作用機序については、当初の目的をほぼ達成できたと考える。また、in vivoで抗PrP抗体の作用機序を解析する過程で、神経保護・修復作用の必要性を認識し、MSCの応用を試み、発展性のある成果を得たことも評価できる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

プリオンの細胞間の伝播にはエクソソーム(直径~100nm)の關与が報告されている。今回の結果はエクソソームよりも大きい粒子がプリオンの細胞間伝播に關与することを示すものであり、新たな発見と思われる。

抗PrP抗体を臨床期のプリオン感染マウスに投与した場合でも、延命効果が認められたことから、抗PrP抗体がプリオン病治療に応用できる可能性がある。

MSCがプリオン病の病変部に集ぞくすることが明らかになったことから、再生医療によるプリオン病治療法の具体的なモデルとなる可能性がある。

3) 今後の展望

プリオンの細胞間伝播の解析を継続し、その分子機構を明らかにする。

MSCがプリオン病病変部に集ぞくすることから、MSCが抗体など、抗プリオン活性を有する蛋白遺伝子のデリバリーに使用出来る可能性がある。抗PrP抗体や変異PrPなど、プリオン増殖阻害活性を有する蛋白遺伝子を発現するMSCを作製し、プリオン病治療効果を検討する。

プリオン病の病変部位から産生される液性因子が、MSCに神経栄養因子の放出を促すか、MSCの分化を誘導するか、について検討し、再生医療を併用したプリオン病治療法のモデルを構築する。

4) 研究内容の効率性について

プリオン病の潜伏期が長いことから、プリオン感染マウスを用いる実験は、時間と場所の制限が生じる。しかし、可能な限り計画的にプリオン感染マウスを飼育し、効率的に研究を進めた。

5. 結論

プリオンの細胞間伝播にエクソソームよりも大きな粒子が關与することを見出した。

グリコシド配糖体のプリオン増殖抑制活性の構造活性相関の一部を明らかにした。

抗PrP抗体の脳室内投与により、プリオン感染マウスの生存期間を延長した。

プリオン病の治療に再生医療を応用できる可能性があることを、プリオン感染マウスを使って示した。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表：12件

原著論文による発表：7件

それ以外(レビュー等)の発表：7件

そのうち主なもの

論文発表

1. Ohara J, Tokari T, Kurokawa A, Maeda J, Ishiguro N, Furuoka H, Horiuchi, M. Frequencies of PrP genotypes in meat breeds of Japanese sheep and trail of selective breeding in experimental sheep flock. J Vet Med Sci 2007 : 69 ; 1325-1329.
2. Uryu M, Karino A, Kamihara Y, Horiuchi M. Characterization of prion susceptibility in Neuro2a mouse neuroblastoma cell subclones. Microbiol Immunol 2007 : 51 ; 661-667.

学会発表

1. 堀内基広. プリオンの増殖とその抑制. 第 55 回日本ウイルス学会. 札幌, 2007, 10.21-23.
2. 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.

2) 海外

口頭発表 : 3 件

原著論文による発表 : 7 件

それ以外(レビュー等)の発表 : 0 件

そのうち主なもの

論文発表

1. Watanabe Y, Hiraoka W, Shimoyama Y, Horiuchi M, Kuwabara M. Instability of familial spongiform encephalopathy-related prion mutants. Biochem Biophys Res Commun. (in press)
2. Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, and Kinjo M. Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy

and fluorescence cross-correlation spectroscopy. Anal Biochem. 2007 : 370 ; 131-141.

3. Furuoka H, Yabuzoe A, Horiuchi M, Tagawa Y, Yokoyama T, Yamakawa Y, Shinagawa M, Sata T. Species-specificity of a panel of prion protein antibodies for the immunohistochemical study of animal and human prion diseases. J Comp Pathol 2007 ; 136 : 9-17.
4. 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.

学会発表

1. Horiuchi, M. Prion propagation and its inhibition. The 14th International Symposium for Zoonosis Control. -Prescription for fighting against zoonoses- Sapporo, Jpn, 2007.10.31.
2. Horiuchi M. Inhibition of PrP^{Sc} formation by anti-PrP antibody in vitro and in vivo, Symposium on emerging and reemerging infectious diseases. Tokyo, 2005.3-4.

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

発明の名称 : ヒトプリオン病を処置するための組成物

発明者 : 堀内基広, 本望 修, 地子徳幸.

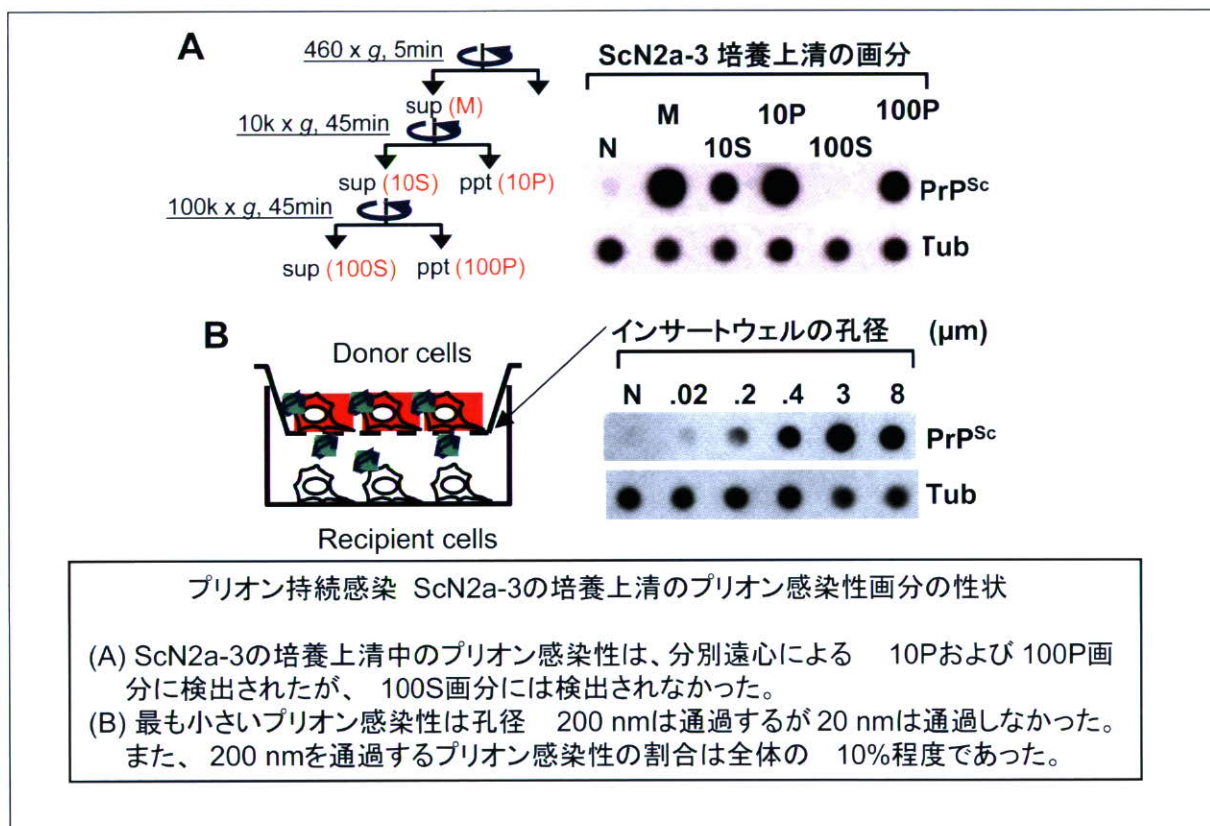
出願人 : 国立大学法人 北海道大学, 北海道, NCメディカルリサーチ株式会社. 出願日 : 平成 18 年 3 月 24 日. 特願 2006-82037.

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

プリオン感染細胞培養上清中のプリオン感染性画分の物理化学性状

分担研究者：堀内基広 北海道大学大学院獣医学研究科



プリオンの細胞間伝播機構の解析を目的として、プリオン持続感染マウス神経芽腫細胞 ScN2a-3 から放出されるプリオン感染性画分の物理化学性状を調べた。分別遠心によりプリオン感染性は主に、10Pおよび 100P画分から検出されたが、100S画分からは検出されなかった。100P画分のプリオン感染性は10P画分の20%程度であった(A)。培養上清中に存在するプリオン感染性のうち、最も小さい粒子サイズのものは、孔径 200nm を通過するが 20nm は通過しなかった。また、200nm を通過するプリオン感染性は全体の10%程度であった。従って、培養上清中のプリオン感染性の大部分は、エクソソーム(直径 40~100nm 程度)よりも大きい粒子に付随していると考えられる。

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

1. 研究目的

プリオン病では、正常プリオン蛋白 (PrP^C) が異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) に構成的に構造変換することにより、PrP^C は機能障害を起こしていると考えられている。従って、PrP^C の正常機能を解明することは、プリオン病の病態を理解するのに重要である。

我々は、独自に作製した PrP 欠損マウス (N_{gsk} PrP^{-/-}マウス) に認められたプルキンエ細胞死のメカニズムを解析した結果、PrP^C の機能消失と PrP 遺伝子の下流に存在する PrP 類似蛋白 (PrPLP/Dpl) 遺伝子の脳内異所性過剰発現の両者が必要であることを見出した。また我々は、PrP^C の N 末領域アミノ酸 23-88 に PrPLP/Dpl によるプルキンエ細胞死を抑制する重要な領域が存在することを明らかにした。この領域には、PrP に特異的に存在するオクタペプチドリピート (OR) 領域が存在する。また、OR よりさらに N 末領域 (preOR) も PrP^C の細胞内局在を決定する重要な領域であることが報告されている。そこで本研究では、PrPLP/Dpl によるプルキンエ細胞死の抑制には、PrP^C のどの領域が重要なのか明らかにし、さらに PrP^C の細胞死抑制のメカニズムについても解析を行った。

2. 研究方法

1) トランスジェニック (tg) マウスの作製

N 末アミノ酸 25-50 を欠損する PrP^Δ preOR、51-90 を欠損する PrP^Δ OR、及び PrP の 1-124 と PrPLP/Dpl とを融合させた PrPN-PrPLP/Dpl を、ハムスター PrP のプロモーターの下流に挿入したコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを C57BL/6 マウスの受精卵に注入し、tg (PrP^Δ

preOR)、tg (PrP^Δ OR) 及び tg (PrPN-PrPLP/Dpl) マウスを作製した。次に、tg (PrP^Δ preOR)、tg (PrP^Δ OR) 及び tg (PrPN-PrPLP/Dpl) マウスを Zrch I PrP^{-/-}バックグラウンドに PrPLP/Dpl を神経細胞に発現する tg (NSE-PrPLP/Dpl) 32PrP^{-/-}マウスと交配しダブル tg マウスを作製した。

2) Yeast Two-Hybrid 法

マウス PrP²³⁻¹²⁰ を pGBKT7 (TaKaRa-Clontech) に挿入し pGBKT7-PrP²³⁻¹²⁰ を作製した。pGBKT7-PrP²³⁻¹²⁰ を酵母 AH109 株に導入し、マウス脳 cDNA ライブラリーを導入した酵母 Y187 (TaKaRa-Clontech) と振とう培養し有性生殖を行った。交配した酵母をアミノ酸要求性寒天培地 SD (-Trp/-Leu/-His) に塗布し、一次スクリーニングを行い、さらに選択性の高いアミノ酸要求性寒天培地 SD (-Ade/-Trp/-Leu/-His/+X-α gel) を用いて二次スクリーニングを行った。これらの酵母からプラスミドを抽出し、インサート遺伝子の塩基配列を決定した。

3) ツニカマイシン処理

ツニカマイシンを PrP^C 欠損神経細胞株 (Hpl3-4) と Hpl3-4 に PrP 遺伝子を導入した細胞株 (Hpl3-4TR) の培養液中に混入した。それぞれの細胞の生存率は WST-8 法にて調べた。

(倫理面の配慮)

動物実験は長崎大学動物実験委員会の指針の範囲内で行われた。

3. 研究結果及び考察

我々は、プルキンエ細胞抑制に重要な領域を決定するために、tg(PrP Δ preOR)とtg(PrP Δ OR)マウスを、以前作製したtg(NSE-PrPLP/Dpl)32PrP $^{-/-}$ マウスと交配させた。tg(NSE-PrPLP/Dpl)32PrP $^{-/-}$ マウスは、Zrch I PrP $^{-/-}$ バックグラウンドにPrPLP/Dplを神経細胞特異的に発現するマウスで、生後60日でプルキンエ細胞死を呈する。また、Zrch I PrP $^{+/+}$ バックグラウンドでは、300日の観察期間内には何ら神経学的異常を呈しない。PrP Δ ORを導入したtg(NSE-PrPLP/Dpl)32PrP $^{-/-}$ マウスでは、プルキンエ細胞死が認められなかった。この結果は、PrP C のプルキンエ細胞死抑制にはOR領域は重要でないことを示した。また、PrP Δ preORもtg(NSE-PrPLP/Dpl)32PrP $^{-/-}$ マウスのプルキンエ細胞死を抑制した。以前我々は、N末アミノ酸23-88にプルキンエ細胞死の抑制に重要な領域が存在することを示した。従って、これらの結果から、preORまたはORがそれぞれ独立してPrP C の神経細胞死抑制の機能に関与していることが明らかとなった。またPrPN-PrPLP/Dplは、おそらくその発現が弱いため、プルキンエ細胞死を不完全であるが抑制した。この結果は、PrP C のN末領域はPrPLP/Dplの神経毒性をトランスのみでなくシスにも抑制することを示した。

小胞体ストレスは神経細胞の変性死の主要なメカニズムの一つである。そこで我々は、PrP C が小胞体ストレスによる細胞死を抑制するのか検討した。ツニカマイシンは小胞体ストレスをもたらす代表的な薬物である。この薬物をHpl3-4とHpl3-4TRの培養液中に混入した結果、興味深いことに、Hpl3-4TRはHpl3-4と比べて有意にツニカマイシンに耐性で高い生存率を示した。

さらに我々は、N末領域23-120に結合する分子をyeast two-hybrid法を用いて同定することにした。1次スクリーニングで128個の

陽性コロニーを、2次スクリーニングで75個の陽性コロニーを得た。この陽性コロニーからプラスミドを抽出しインサート遺伝子の塩基配列を決定した結果、36個がin-frameで遺伝子が挿入されていた。これらの遺伝子の中には、既にPrPと結合することが知られている分子(Dnaja3 protein)も含まれていた。さらに、シナプス小胞の輸送、蛋白分解、及び電気シグナルに関与する遺伝子が複数個同定された。今後は、同定した遺伝子がPrP C の細胞死の抑制機能に関与するのか検討したい。

4. 評価

1) 達成度について

当初の計画した目的は、PrPLP/Dplによるプルキンエ細胞死を抑制するのに重要なPrP C の領域を決定し、さらにyeast two-hybrid法を用いてPrP結合分子の同定を行うことであった。今回我々は、PrPLP/Dplによるプルキンエ細胞死を抑制するのに重要なPrP C の領域を決定することができた。また、yeast two-hybrid法を用いて、PrP結合分子の同定を行った。さらに、PrP C が小胞体ストレスによる細胞死の抑制に関与することを見出した。従って、当初計画した目的を80%近く、またはそれ以上達成できたと考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでの多くの研究は、OR領域がPrP C の神経保護機能に重要である可能性を指摘してきた。しかし我々は、本研究にて、PrPLP/Dplによる神経細胞死の抑制にはOR領域は必要でないことを明らかにすることができた。この結果は、OR以外の領域も神経保護機能に関与していることを示し、学術的・国際的に高い評価を受けている。また我々は、PrP C が小胞体ストレスによる細胞死の抑制に関与していることを明らかにした。この発見は世

界に先駆けたものであり、学術的・国際的にも高い評価が得られるものと考えている。この成果は、プリオン病の病態を理解する上にも、また治療薬の開発にも重要な知見を与えらるると考えられる。

3) 今後の展望

PrP^Cの小胞体ストレス緩和機能について、その分子メカニズムを解明が進み、プリオン病における神経細胞死のメカニズムが解明されていくと考えられる。

4) 研究内容の効率性について

ある程度効率よく研究を遂行できたと考えている。

5. 結論

PrPLP/Dplによるプルキンエ細胞死の抑制には、PrP^CのN末領域が重要でシス及びトランスに抑制することを明らかにした。またその抑制には、PrP^CのN末領域のpreORまたはORがそれぞれ独立して関与することも明らかにした。また我々は、PrP^Cが小胞体ストレスによる細胞死の抑制に関与していることを明らかにした。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表：13件

原著論文による発表：0件

それ以外(レビュー等)の発表：5件

そのうち主なもの

論文発表

1. 坂口末廣. プリオンタンパク質の正常機能とプリオン病における役割. 生化学. 2007: 79; 843-852.
2. 坂口末廣. プリオン伝播(プリオン蛋白異常化)のメカニズム. 日本臨床. 2007: 65; 1391-1395.
3. 坂口末廣. プリオン病. 感染症 The

infection. 2006: 36; 9-13.

4. 坂口末廣. プリオン蛋白質の生理機能. 化学療法の領域. 2006: 22; 56-62.

学会発表

1. 坂口末廣. プリオン病: その発症から治療、そして予防まで. 第18回日本臨床微生物学会総会. 長崎市, 平成19年2月17-18日.
2. 坂口末廣. プリオン病におけるプリオン蛋白の役割. 第23回中国四国ウイルス研究会. 松山市道後, 平成19年6月16-17日.
3. 坂口末廣. プリオン病におけるプリオン蛋白の役割. 第4回公開シンポジウム「蛋白質機能制御と疾患治療戦略」. 長井記念ホール(徳島大学蔵本キャンパス), 平成19年11月22日.
4. 坂口末廣. プリオン蛋白とプリオン病. 第20回日本環境感染学会総会「アフタヌーンセッション11」. 神戸, 平成17年2月.
5. 石橋大輔, 山中仁木, 片峰 茂, 坂口末廣. 異種プリオン蛋白によるプリオン感染抑制効果. 第52回日本ウイルス学会学術集会「ワークショップ」. 横浜, 平成17年11月20-22日.
6. 石橋大輔, 山中仁木, 坂口末廣. 異種プリオン蛋白によるプリオン病の予防: プリオンワクチンの可能性. 第35回日本免疫学会学術集会「ワークショップ ウイルス感染とその制御」. パシフィコ横浜, 平成17年12月13-15日.

2) 海外

口頭発表：3件

原著論文による発表：11件

それ以外(レビュー等)の発表：4件

そのうち主なもの

論文発表

1. 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 ; 169-76.
2. Kim CK, Hirose Y, Sakudo A, Takeyama N, Kang CB, Taniuchi Y, Matsumoto Y, Itohara S, Sakaguchi S, Onodera T. Reduced response of splenocytes after mitogen-stimulation in the prion protein (PrP) gene-deficient mouse : PrPLP/Doppel production and cerebral degeneration. *BBRC* 2007 : 358 ; 469-474.
 3. Jiabin Dong, Aimin Li, Naohiro Yamaguchi, Suehiro Sakaguchi, David A. Harris. Doppel induces degeneration of cerebellar Purkinje cells independently of Bax. *Am J Pathol* 2007 : 171 ; 599-607.
 4. Nishimura T, Sakudo A, Hashiyama Y, Yachi A, Saeki K, Matsumoto Y, Ogawa M, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T. Serum withdrawal-induced apoptosis in Zrch I prion protein (PrP) gene-deficient neuronal cell line is suppressed by PrP, independent of Doppel. *Microbiol Immunol* 2007 : 51 ; 457-66.
 5. Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Sakaguchi S, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H. Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochem Cell Biol* 2007 : 127 ; 291-301.
 6. Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S. Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine* 2007 : 25 ; 985-992.
 7. Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S. Newly established in vitro system with fluorescent proteins shows that abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA. *Gene* 2007 : 386 ; 139-146.
 8. 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.
 9. Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Arakawa T, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine* 2006 : 24 ; 2815-2823.
 10. Sakurai-Yamashita Y, Sakaguchi S, Yoshikawa D, Okimura N, Masuda Y, Katamine S, Niwa M. Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* 2005 : 136 ; 281-287.
 11. Arima K, Nishida N, Sakaguchi S, Shigematsu K, Atarashi R, Yamaguchi

N, Yoshikawa D, Yoon J, Watanabe K, Kobayashi N, Mouillet-Richard S, Lehmann S, Katamine S. Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently-infected cell cultures. *J Virol* 2005 : 79 ; 7104-7112.

学会発表

1. Sakaguchi S. Antagonistic interaction between prion protein and its homologue, PrPLP/Dpl, in neurodegeneration. AACL-Nagasaki Symposium, ASIAN AGING 2006 : The Regional Aging Connection and the Future. Nagasaki, Jun 17, 2006.
2. Sakaguchi S, Ishibashi D, Yamanaka H. Efficient Induction of Prophylactic antibodies against Prion Disease in Mice. 24th International Congress of Chemotherapy. Symposium 34 :

Emerging and re-emerging infectious diseases in the Western Pacific. Philippine International Convention Center, Manila, Philippine, Jun 4-6, 2005.

3. Sakaguchi S : Prion protein and prion diseases. 2005 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium. San Jose, CA. Nov 3-5, 2005.

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

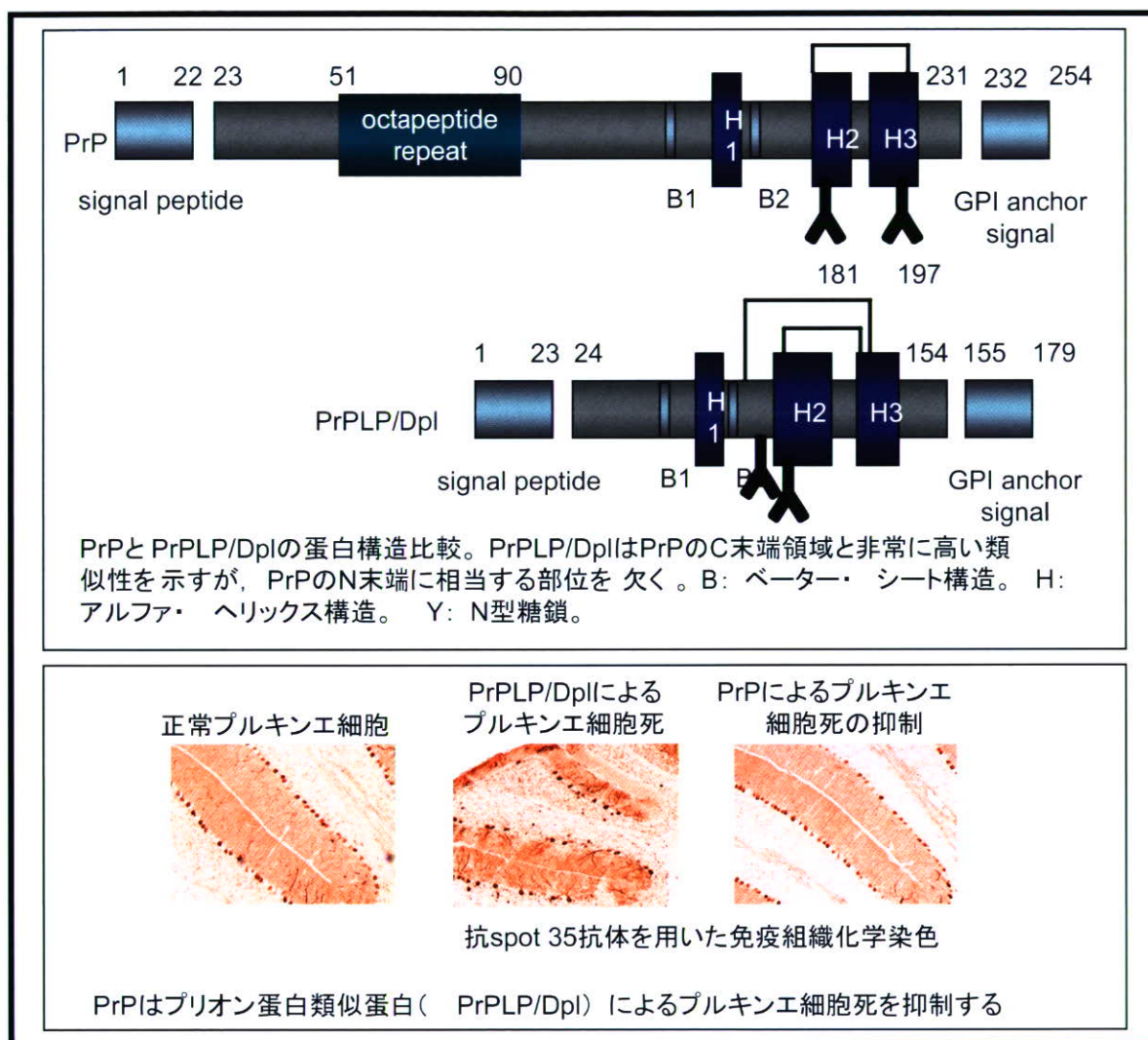
1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

プリオン蛋白のプルキンエ細胞死抑制機

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



プリオン蛋白類似蛋白(PrPLP/Dpl)はプリオン蛋白(PrP)のC末領域のホモログ分子で、PrPと同様にGPIアンカーにて膜に結合した膜蛋白である。さらにPrPのC末領域と同様に、PrPLP/Dplは3つの α -ヘリクス構造と2つの短い β -シート構造からなる球状の分子である。また、2カ所にジスルヒド結合とN型の糖鎖が存在する。PrPLP/Dpl

がプルキンエ細胞に異所性に発現すると変性死を来す(下段の中央図)。しかし、PrPはPrPLP/Dplの神経毒性を阻害し、プルキンエ細胞死を抑制する(下段の右図)。また、このPrPによるPrPLP/Dplの抑制には、PrPのオクタペプチド領域とそれよりN末よりの領域がそれぞれ独立して関与する。

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

1. 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 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。

2. 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 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 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-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 ml 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 mg/ml ~125 ng/ml) を固相化した免疫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。

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 および免疫クロマト法 (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。

3. 研究結果及び考察

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 100~1.6mg/lane、sCJD 扁桃体については 500~7.8mg/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、スクレーピ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。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 1)。

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 600ml に対して約 6.4mg 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センブリー、再増幅した結果、約 780bp 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/mg 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、以下の競合 ELISA 用抗体として HUFa1 を選択した。

5. 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 500ng/ml、250ng/ml、125ng/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 500ng/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。

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。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 1~10ng/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 16ng/ml)を除く検体で有意な H-FABP が検出された(84ng~136ng/ml)。Steinacker ら(2004)は、CJD 患者 14 名(平均 73 歳)の血清 H-FABP レベルが約 4ng/ml、CSF の H-FABP レベルが約 7.3ng/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 1~10ng/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。

4. 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 PR, Hochstrasser DF, Sanchez J-C. A potential cerebrospinal fluid and plasma 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.

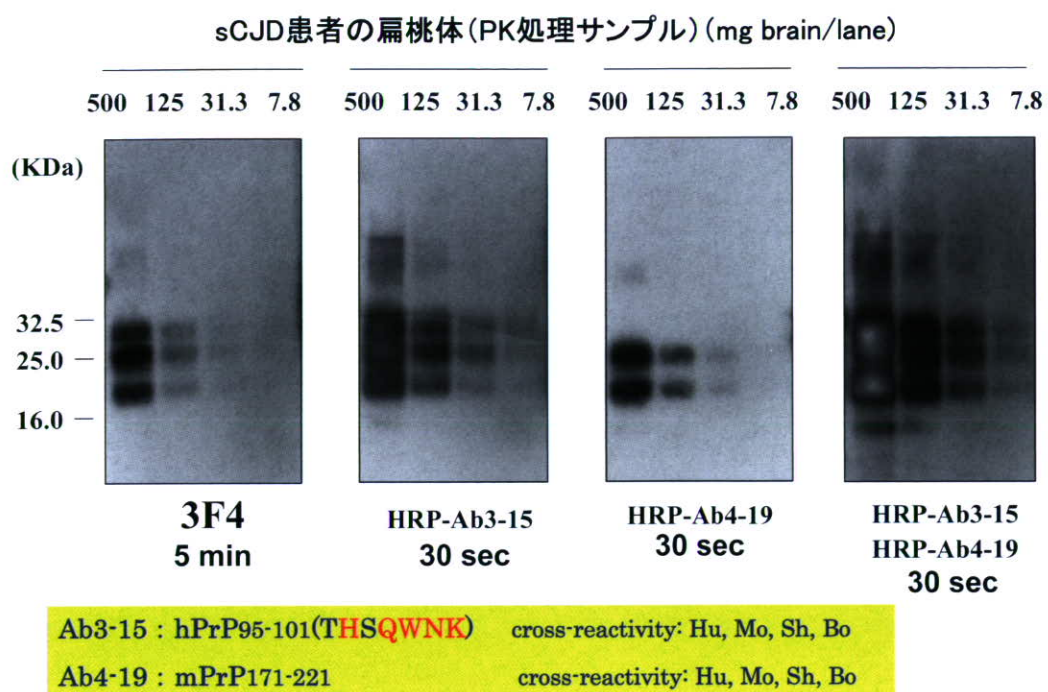


図 1 HRP 標識組換え IgY 型抗 PrP ニワトリ mAb による PrPSc の検出

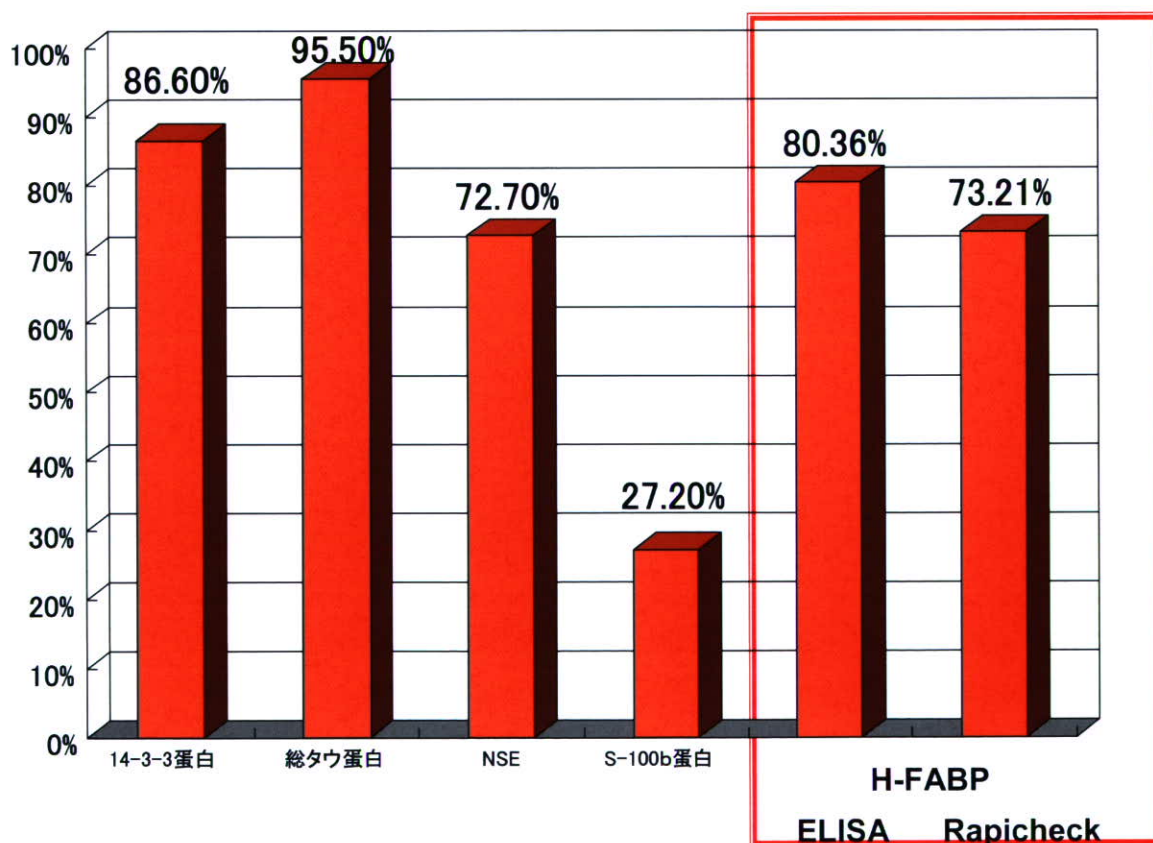


図 2 112 例の sCJD 患者脳脊髄液からの H-FABP の検出

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プリオン病研究チーム

協力研究者：Seong Soo A. An PeopleBio Inc.

1. 研究目的

変異型クロイツフェルト・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。プリオン感染動物の血液からの多量体プリオン蛋白質 (PrP^d) の検出を試みる。

2. 研究方法

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 multimer detection system (MDS) 法は、PK 処理を省略した、簡便な疾病由来の多量体プリオン蛋白質 (PrP^d) の検出法として期待される。

(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た。

3. 研究結果及び考察

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)。

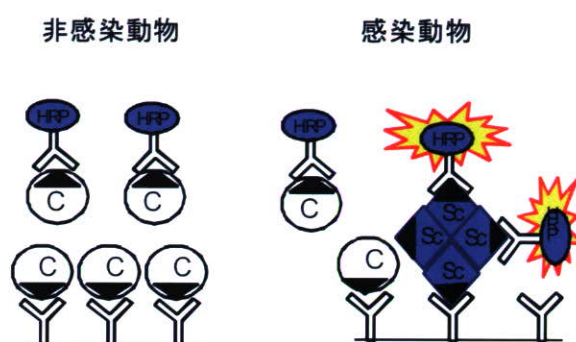


図 1 MDS 法による多量体 PrP の検出

単量体 PrP は捕捉または検出用のどちらかの抗体としか結合できないが、多量体では同一の抗体と 2 カ所以上で結合。

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 アミノ酸多型 MARQ/MARQ (PrP の 112, 136, 154, 171 を示す) のスクレイピー羊から PrP^d と考えられるシグナルが検出された。一方、正常羊の血液中には PrP^d のシグナルは認められなかった。臨床症状期および未発症期のスクレイピー羊の血液から PrP^d のシグナルが検出されている。その出現時期やその動態の解明は、今後の課題である。検出された PrP^d は PK 感受性を示したことから、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伝達性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 の動態も検討が必要である。少数例ではあるが、供試した BSE 実験感染牛の血液からは、特異的なシグ

ナルは検出されていない。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。血液中のPrP^dの検出は、動物の病態に大きく影響している可能性が考えられた。この点に関しても症例数を増やした検討が必要とされる。

PrP^dの性状を明らかにするためにPrP^dが検出された羊の血漿からPrPを濃縮し、ELISA法によりPK処理後のシグナルの有無およびconformation dependent immune assay (CDI)によるグアニジン添加の有無に伴う反応性の変化を調べた。PrP^dは、PK感受性であり、グアニジンによる反応性の増強が認められなかった。

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、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^{Sc}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。

4. 評価

1) 達成度について

プリオン病の長い潜伏期のため、実験動物モデルの再現には、時間を要する。マウス、ハムスターでの検討は行えたが、羊、牛での検討にはまだ時間が足りなかった。検出系の確立は達成された。BSE、羊スクレイピーの実験感染には長い期間が必要となるが、感染動物の作出を目指した長期的な取り組みの必要がある。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

血液中からのPrP^{Sc}の検出は、輸血による

伝播リスクの軽減などにつながり、世界中でしのぎが削られている。ヒトへの応用性の模索は、今後も検討が必要である。

3) 今後の展望

プリオン病の病態はプリオン株および動物種によって異なっており、病態と血液中のプリオンの有無との関連について明らかにしていくことが必要である。

4) 研究内容の効率性について

動物プリオン病の診断は動物の死後、脳を検査しなければならない。生きている動物のプリオン感染の有無を調べる方法は無い。血液を用いたプリオンの検出法の確立は、診断法の効率化につながることを期待される。

5. 結論

血液を用いたプリオン病の生前診断法を確立するために、MDS法を用いて、血液中のPrP^dの検出について検討した。本法により発症および未発症のスクレイピー感染羊、ハムスターのプラズマからPrP^dが検出された。その他の動物種の血液への応用性は今後の課題である。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表：0件

原著論文による発表：0件

それ以外(レビュー等)の発表：0件

そのうち主なもの

論文発表

特になし

学会発表

特になし

2) 海外

口頭発表：4件

原著論文による発表：5件

それ以外(レビュー等)の発表：0件

そのうち主なもの

論文発表

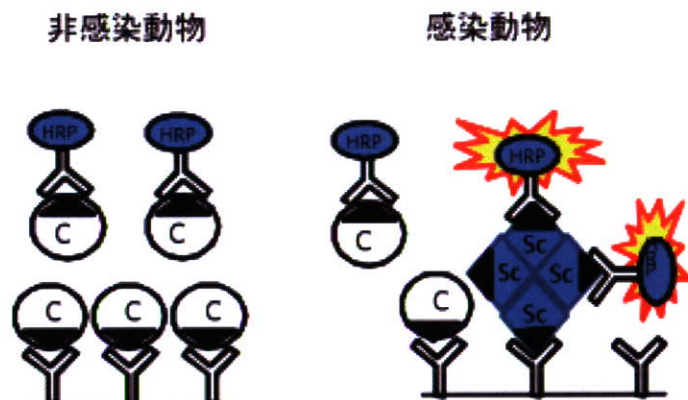
1. Suzuki SY, Takata M, Teruya K, Shinagawa M, Mohri S, Yokoyama T. Conformational change in hamster scrapie prion protein(PrP27-30) associated with proteinase K resistance and prion infectivity. *J Vet Med Sci* 2007 ; 70 : 159-165.
2. Masujin K, Shimada K, Kimura KM, Imamura M, Yoshida A, Iwamaru Y, Mohri S, Yokoyama T. Applicability of current bovine spongiform encephalopathy (BSE) diagnostic procedures for chronic wasting disease(CWD). *Microbiol Immunol* 2007 ; 51 : 1039-1043.
3. 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.
4. 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.
5. Yokoyama T, Shimada K, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Ushiki YK, Kimura KM, Itohara S, Shinagawa M. Both host prion protein 131-188 subregion and prion strain characteristics regulate glycoform of PrP^{Sc}. *Arch. Virol.* 2007 ; 152 : 603-609.

学会発表

1. An SSA, Welker E, Lim KT, Oh HJ, Lee BS, Joo YR, Schmerr MJ, Yokoyama T, Kim SY. Detection of PrP^{Sc} in plasma from sheep using a multimer detection system-3D. *Prion* 2006, Torino, 3-6 Oct, 2006.
2. An S, Lim K, Oh H, Lee B, Fabre G, Segarra C, Ju Y, Yokoyama T, Kim SY, Andreoletti O, Coste J. Detection of PrP^{Sc} in plasma from scrapie sheep in the preclinical stages using a multimer detection system-3D. *Prion* 2007, Edinburgh, 26-28 Sep, 2007.
3. Yokoyama T, Masujin K, Shu Y, Iwamaru Y, Imamura M, Mohri S. Characterization of an abnormal isoform of prion protein(PrP^{Sc}) in the bovine spongiform encephalopathy (BSE) resistant animals. *Prion* 2007, Edinburgh, 26-28 Sep, 2007.
4. 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, 2007.9.
7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
 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

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

研究協力者：動物衛生研究所プリオン病研究センター 横山 隆
PeopleBio Inc. Seong Soo A. An



プリオン病の生前診断法の開発のため、疾病特異的な凝集体PrP(PrP^C)を検出するため多量体検出法(Multimer Detection System)を開発した。MDS法により、スクレイピー感染羊の脳、血液中から PrP^Cのシグナルを検出した。血液中のPrP^Cの性状および伝達性との関連ならびに他の動物種への応用性は今後の課題である。