

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 福田茂夫. 「牛への牛海綿状脳症 (BSE) 実験感染と臨床症状」 農林水産技術研究ジャーナル 2007. Vol.30, No.3, 11-14.
- 2) 福田茂夫. 「BSE 実験感染牛の臨床症」 Dairy Japan 2007. 8, 21-25.
- 3) 福田茂夫. 「牛への脳内接種法の確立と BSE プリオン実験感染牛を用いた研究」 臨床獣医 2007. Sep. Vol.25, No.9, 15-18.

2. 学会発表

- 1) 福田茂夫、二階堂聡、尾上貞雄、松井義貴、舛甚賢太郎、葭葉幸子、岩丸祥史、今村守一、岡田洋之、横山隆、扇勉：脳内接種による牛海綿状脳症プリオン感染牛の異常プリオン蛋白質の分布. 第 143 回日本獣医学学会学術集会（つくば）2007. 4.3-5

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

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

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院 獣医学研究科 教授

研究協力者 瓜生匡秀、中満智史、黒川 彩 (北大大学院・獣医学研究科)

研究要旨 我々は昨年度、プリオン持続感染細胞では、proteinase K 抵抗性 PrP (PrP-res) の量が、細胞密度に依存して変化する可能性を指摘した。そこで、本年度は細胞密度と PrP-res 量の関係を詳細に解析した。一定量のプリオン持続感染マウス神経芽細胞 ScN2a-3 と、種々の細胞数のプリオン非感受性細胞 N2a-1 を一定時間共培養した後、PrP-res 量を調べたところ、共培養に用いた N2a-1 の細胞数の増加に伴い PrP-res 量は増加した。しかし、N2a-1 の培養上清を ScN2a-3 に添加した場合は PrP-res 量は増加しなかった。また、固定した N2a-1 と共培養した場合は、PrP-res 量は増加しなかった。以上の結果から、細胞密度に伴う細胞間の直接接触により生じる細胞の変化が、プリオン持続感染細胞における PrP-res 量の変動に影響することが明らかとなった。また、22L 株感染 N2a-3 (22L-N2a-3) と非感染 N2a-3 における遺伝子発現レベルを DNA マイクロアレイ法により比較解析した。その結果、22L-N2a-3 では Growth hormone の発現が 1/4 程度に低下していること、さらに Growth hormone により発現調節を受ける遺伝子群の発現も変化することを見出した。この結果は、22L 感染マウスの病態を考える上で非常に興味深い知見と考えられる。

A. 研究目的

プリオン持続感染細胞は、プリオン感染性を有し、持続的に異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の指標となる proteinase K (PK) 抵抗性 PrP (PrP-res) を産生することから、PrP^{Sc} の増殖機構の解析や、プリオン増殖阻害薬のスクリーニングなどに汎用されてきた。培養細胞を用いた実験系は、PrP-res を指標にプリオン感染やプリオン増殖を評価する実験系であることから、感染細胞における PrP-res の動態を十分に理解しておく必要がある。

我々は昨年度、プリオン持続感染細胞における PrP-res 量が一定ではなく、継代後急速に減少し、細胞密度の増加に伴い増加することを報告した。今年度は細胞密度と PrP-res 増殖の関係を明らかにするために、人工的に細胞密度が異なる条件を作出し、PrP-res 量の変化について調べた。

また、昨年まで、プリオン感染に伴う細胞の変化を解析する目的で、Chandler 株が感染した ScN2a-3 と非感染細胞にける遺伝子発現の比較解析を行ってきた。しかし、プリオン 22L 株が持続感染した N2a-3 (22L-N2a-3) は ScN2a-3 よりも、5～10 倍程度多い PrP-res を産生することから、プ

リオン感染に伴う変化がより顕著となる可能性がある。そこで、本年度は、22L-N2a-3 と非感染 N2a-3 の遺伝子発現の比較解析も行った。

B. 研究方法

1) **細胞**：マウス神経芽細胞 N2a のプリオン感受性サブクローン N2a-3、および非感受性サブクローン N2a-1 と N2a-24 を用いた。N2a-24 は PrP^C の発現が非常に低いクローンである。N2a-3 に Chandler 株が持続感染した ScN2a-3 および 22L 株が持続感染した 22L-N2a-3 を用いた。

2) **共培養**：種々の細胞数の N2a-1 を 24 穴プレートに播種し 24 時間培養した。その後、一定量の ScN2a-3 を添加し、72 時間共培養した。その後、以下に述べる方法で dot-blot により PrP-res を検出した。PHK-labeling kit (Sigma) を用いて生細胞を蛍光標識した。

3) **PrP-res の検出**：PrP-res および α -tubulin の検出はドットプロットにより行なった。細胞を 200 μ l の lysis buffer に溶解し、低速遠心により除核した。上清を DNase I で処理した後、 α -tubulin の検出用に、100 μ l の lysate を Bio-dot (Bio-Rad) にて吸引

しながら PVDF 膜にドットした。残りの 80 μ l の lysate は Proteinase K (20 μ g/ml) で 37 $^{\circ}$ C、1 時間処理後に、Pefabloc を終濃度 5 mM になるように加えた。これを Bio-dot にて吸引しながら PVDF 膜にドットした。 α -tubulin は抗 α -tubulin モノクローナル抗体(mAb)により検出した。PrP-res の検出には、PVDF 膜を 3M GdnSCN で処理した後、ブロッキングし、mAb 31C6 により検出した。抗原抗体複合体は ECL Western blotting detection system (Amersham bioscience)を用いて化学発光法により検出した。検出には LAS-3000 (Fuji film) を使用し、定量解析を行なった。

4) DNA マイクロアレイ解析 : 細胞から Torizlo 試薬 (Invitrogen) により total RNA を回収し、Message amp II biotin enhanced (Ambion) にて biotin 化標識 cRNA を作製した。DNA マイクロアレイ解析は、GeneChip system により行なった。DNA マイクロアレイチップは mouse 430 2.0 (Affymetrix) を用いた。データは、GCOS (Affymetrix) および Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて解析した。

5) 定量 RT-PCR : 個々の遺伝子発現の定量解析は定量 RT-PCR により行なった。Total RNA から First Strand cDNA Synthesis Kit (GE healthcare) を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型として、TaqMan probe および TaqMan Master Mix からなる反応液を作製して、ABI7900 リアルタイム PCR 装置を用いて、定量解析を行なった。TaqMan probe は Gene Expression Analysis (Applied Biosystem) のライブラリーより購入した。内在性マーカーとして Gapdh を使用した。

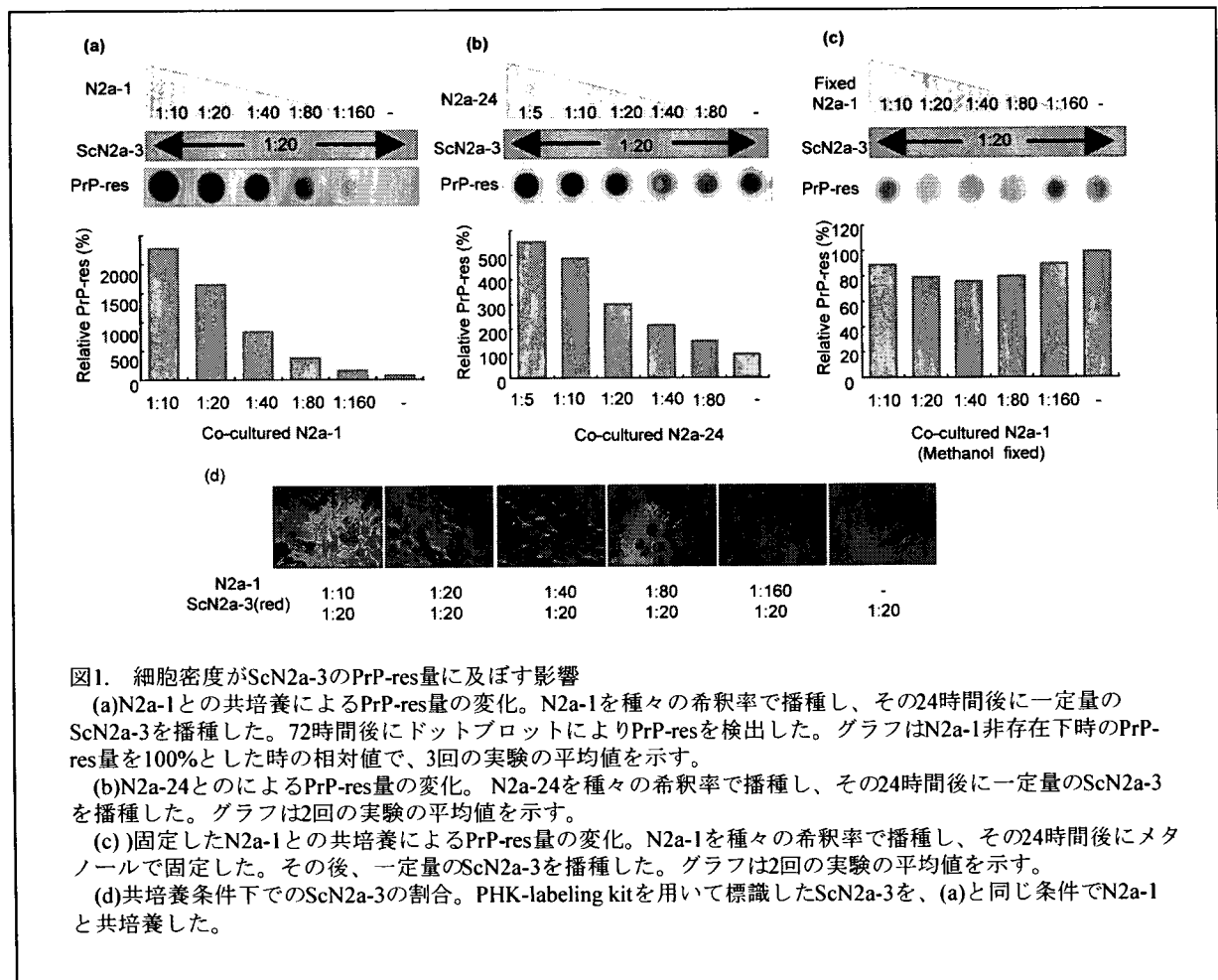


図1. 細胞密度がScN2a-3のPrP-res量に及ぼす影響

(a) N2a-1との共培養によるPrP-res量の変化。N2a-1を種々の希釈率で播種し、その24時間後に一定量のScN2a-3を播種した。72時間後にドットプロットによりPrP-resを検出した。グラフはN2a-1非存在下時のPrP-res量を100%とした時の相対値で、3回の実験の平均値を示す。

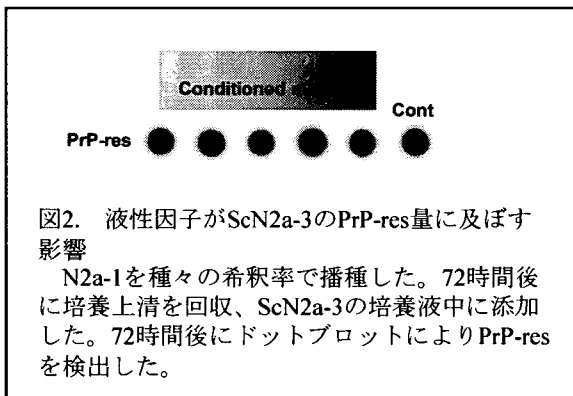
(b) N2a-24との共培養によるPrP-res量の変化。N2a-24を種々の希釈率で播種し、その24時間後に一定量のScN2a-3を播種した。グラフは2回の実験の平均値を示す。

(c) 固定したN2a-1との共培養によるPrP-res量の変化。N2a-1を種々の希釈率で播種し、その24時間後にメタノールで固定した。その後、一定量のScN2a-3を播種した。グラフは2回の実験の平均値を示す。

(d) 共培養条件下でのScN2a-3の割合。PHK-labeling kitを用いて標識したScN2a-3を、(a)と同じ条件でN2a-1と共培養した。

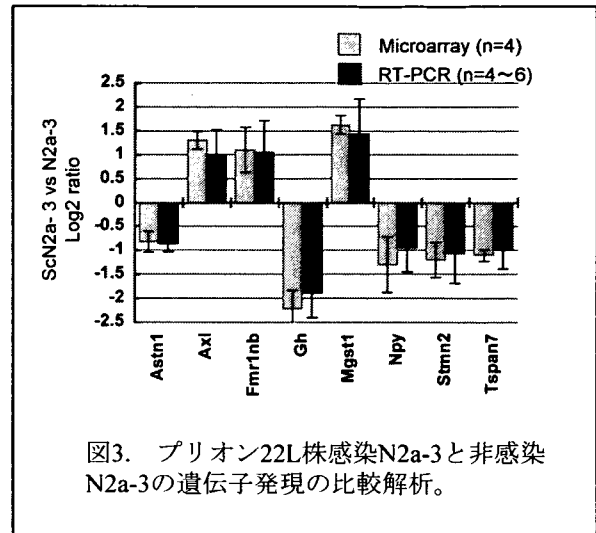
C. 研究結果

図 1a に、ScN2a-3 と N2a-1 の共培養による ScN2a-3 の PrP-res 量の変化を示した。N2a-1 はプリオン非感受性であることから、この実験系で検出される PrP-res は ScN2a-3 由来である。加えた ScN2a-3 の細胞数、および共培養した時間が同じであるにもかかわらず、N2a-1 の細胞数の増加に応じて、検出される PrP-res 量が多くなった。同様の実験を PrP^C の発現量が著しく低い N2a-24 を用いて行った場合でも、N2a-24 の細胞数の増加に伴い PrP-res 量が増加した (図 1b)。細胞数が多い条件下で、ScN2a-3 の増殖速度が変化し、ScN2a-3 の細胞数が多くなった結果、PrP-res が増加したように見える可能性を否定するために、PHK-labeling kit で蛍光標識した ScN2a-3 を N2a-1 と共培養した。共培養する N2a-1 の細胞数が増加しても、標識された ScN2a-3 が多くなるという傾向は認められなかった (図 1d)。従って、細胞密度の増加に伴い ScN2a-3 内で PrP-res 量が増加することが明らかとなった。



液性因子による PrP-res 量の増加の可能性を調べるために、播種数を変えて一定時間培養した N2a-1 の培養上清を ScN2a-3 の培養液中に添加した。N2a-1 のコンディショントメディウムを添加しても、ScN2a-3 の PrP-res 量は増加しなかったことから、N2a-1 との共培養で認められた ScN2a-3 中の PrP-res 量の増加は、液性因子によるものではなく、細胞同士の直接接触が関与すると考えられた (図 2)。

一方、N2a-1 を事前にメタノールで固定後に ScN2a-3 と共培養した場合は、PrP-res 量の増加が認められなかったことから、PrP-res 量の増加には、生きて細胞との直接接触が必要であると考えられた (図 1c)。



当教室で作製したプリオン 22L 持続感染細胞 22L-N2a-3 は、Chandler 株が持続感染した ScN2a-3 よりも多くの PrP-res を産生することから、プリオン感染に伴う宿主細胞の変化が、より顕著となる可能性がある。そこで、22L 持続感染 N2a-3 と非感染 N2a-3 の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により解析した。独立した 4 回の実験の結果から同じ変化を示す遺伝子を選抜した。それらの発現を、定量 RT-PCR により確認した。その結果、22L 株の感染により、図 3 に示す遺伝子の発現が変化していた。この中では growth hormone 遺伝子 (Gh) の発現の変化が最も大きく、非感染 N2a-3 の 25%程度にまで低下していた。Growth hormone により発現が正に制御される Neuropeptide Y 遺伝子 (Npy) の発現が低下しており、また、負に制御される Microsomal glutathione S-transferase 遺伝子 (Mgst1) の発現が亢進していることから、22L-N2a-3 では、Growth hormone の発現低下に伴う何らかの生理学的な変化が生じている可能性が示唆された。

D. 考察

我々は昨年度、プリオン持続感染 N2a では PrP-res の量は一定ではなく、細胞の増殖とともに変動することを見出した。継代から 24 時間以内に PrP-res 量は顕著に減少し、培養と続けると、再び細胞当たりの PrP-res 量が増加すること、播種細胞数を少なくすると、PrP-res の増加が遅れることから、播種後の時間よりも細胞密度の増加が PrP-res 量の増加と関係すると考え、プリオン非感受性の N2a-1 との共培養により、細胞密度の異なる培養条件を人工的に再現した。その結

果、ScN2a-3 の PrP-res 量の増減は、細胞密度の増加に伴う細胞間の直接接触により生じる何らかの細胞生理学的な変化により左右されることが示唆された。細胞間の直接接触により生じる微小環境と PrP-res の増殖・分解の関係の解析は今後の課題であるが、細胞内におけるプリオンの増殖を考える上で、非常に興味深い知見と思われる。

また、プリオン 22L 株が持続感染した N2a-3 で、非感染 N2a-3 と比較して発現が変化した遺伝子を同定した。3 ヶ月程度の期間に独立した実験群として、計 4 回 DNA マイクロアレイ解析を行った。結果の共通性から候補遺伝子を絞り込み、定量 RT-PCR により遺伝子の発現を確認する、という方法で解析を進めた結果、発現が変化した遺伝子を十数個同定できた。IPA 解析から、Growth hormone とそれに関連する幾つかの遺伝子の発現が変化していることが明らかとなった。また、Tetraspanin 7 (Tspan7) は Chanlder 株感染 ScN2a-3 と 22L-N2a-3 でともに発現が低下していた。Tspan7 は X 染色体にリンクした精神遅延に関与することが知られている。現在、22L 株感染マウスの中樞神経組織におけるこれら遺伝子の発現について解析を進めている。

E. 結論

細胞密度の増加に伴う細胞間の直接接触により生じる細胞側の要因が、プリオン持続感染細胞における PrP-res 量の変動に影響することを明らかにした。また、DNA マイクロアレイ法により、プリオン 22L 株感染 N2a-3 では Growth hormone およびその関連遺伝子の発現が変化していることを明らかにした。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuoka, H., Yabuzoe, A., Horiuchi, M., Tagawa, Y., Yokoyama, T., Yamakawa, Y., Shinagawa, M., and Sata, T. Species-specificity of a panel of prion protein antibodies for the immunohistochemical study of animal and human prion diseases. *J Comp Pathol.*, 136: 9-17, 2007.
- 2) Uryu, M., Karino, A., Kamihara, Y., and Horiuchi, M. Characterization of prion susceptibility in

Neuro2a mouse neuroblastoma cell subclones. *Microbiol. Immunol.*, 51: 661-667, 2007.

- 3) Ohara, J., Tokari, T., Kurokawa, A., Maeda, J., Ishiguro, N., Furuoka, H. and 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.*, 69 : 1325-1329, 2007.
- 4) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, Kinjo M. Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Anal Biochem.*, 370: 131-141, 2007.
- 5) Watanabe, Y., Hiraoka, W., Shimoyama, Y., Horiuchi, M., and Kuwabara, M. Instability of familial spongiform encephalopathy-related prion mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 366: 244-249, 2008.
- 6) 堀内 基広 プリオン 臨床とウイルス, 35: 293-300, 2007.
- 7) 中満 智史、堀内 基広 牛海綿状脳症 臨床とウイルス, 35: 301-310, 2007.
- 8) 堀内 基広、中満 智史 ヒト以外のプリオン病 -特にウシ海綿状脳症について- 日本臨床, 65: 1513-1520, 2007.

2. 学会発表

- 1) Song, C.-H., Furuoka, H., Suzuki, A., Ogino, M., Horiuchi, M. Effect of intraventricular infusion of anti-PrP mAbs on the disease progression in scrapie-infected mice. *NeuroPrion 2007* (2007, 9/26-28, Edinburg, UK)
- 2) Nakamitsu, S., Kurokawa, A., Uryu, M., Horiuchi, M. Cell-density-dependent fluctuation of PrP-res in prion-infected Neuro2a cells. *NeuroPrion 2007* (2007, 9/26-28, Edinburg, UK)
- 3) Horiuchi, M. Prion propagation and its inhibition. The 14th International Symposium for Zoonosis Control. -Prescription for fighting against zoonoses- (2007, 10/31, Sapporo, Japan)
- 4) 進藤亮、山河芳夫、佐多徹太郎、横山隆、古岡秀文、堀内基広 日本で発生した BSE 由来 PrP^{Sc} の生化学的性状の解析 2007 年プリオン研究会 (2007, 8/25-26, 新潟)

- 5) 中満智史、黒川、彩、瓜生匡秀、堀内基広
プリオン持続感染細胞内における異常型プリ
オン蛋白質の量的変動 第 55 回日本ウイルス
学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
- 6) 宋昌鉉、古岡秀文、鈴木章夫、長谷部理絵、
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の治療効果 第 55 回日本
ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
- 7) 瓜生匡秀、堀内基広 神経芽腫細胞 Neuro2a
サブクローンにおけるプリオンの細胞間伝播
第 55 回日本ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札
幌)
- 8) 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 (2007, 10/21-23, 札幌)

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

13. 異常型プリオンの免疫系における増殖・伝播機構の研究

分担研究者 大西 和夫 国立感染症研究所免疫部

研究協力者 樋口好美、佐多徹太郎（感染研・感染病理部）

中村優子、萩原健一、山河芳夫（感染研・細胞化学部）

研究要旨 BSE 牛由来の食物を摂取することにより体内に侵入した異常型プリオン蛋白質は、長期潜伏期間ののち脳に海綿状脳症(TSE)を引き起こす。この異常型プリオン蛋白質が腸から脳へ伝播する機序については未だに不明であるが、免疫系細胞が重要な役割を担っていることがマウスを用いた実験から強く示唆されている。本研究は、免疫系細胞がどのように異常型プリオン蛋白質の脳への伝播に関与するかを知ることを目的としている。今年度は、免疫系細胞における異常型プリオン蛋白質の伝播能を調べるため、各種免疫系細胞株に標識プリオン遺伝子を導入してそのプリオンの動態を観察する *in vitro* 実験系の構築を試みた。その結果、プロB細胞株とマクロファージの前駆細胞株で高いプリオン蛋白質発現・保持能を認めた反面、FDC 様細胞株にはそれを認めなかった。この結果は、プロB細胞とマクロファージの前駆細胞が局在する骨髄において異常プリオン蛋白質の伝播が進む可能性を示唆し、BSE 発症牛の骨髄が感染性部位であることの説明の一つとなる。今後、骨髄における異常プリオン蛋白質の動態に着目する必要があると考える。

A. 研究目的

BSE 牛由来の食品から体内に入った異常型プリオン蛋白質が、腸管から中枢神経系へ伝播する際に免疫系細胞群が関与することが知られている。「Bリンパ球を欠損するマウスでは末梢に異常型プリオン蛋白質を接種しても中枢神経系へ伝達されず海綿状脳症 (TSE) は発症しない」という 1997 年の Aguzzi 等の報告は、Bリンパ球が濾胞樹状細胞 (FDC) の分化誘導を行い、FDC 上の異常型プリオン蛋白質が中心静脈の交感神経を經由して中枢神経系に受け渡されるという仮説を提出した。しかし、その後、FDC と中心静脈交感神経が物理的に密な接触を持ちそうもないこと、また、TNFR1 (腫瘍壊死因子受容体 1) 遺伝子欠損マウスでは、FDC の分化が強く阻害されるにも関わらず中枢神経系への伝播が起こる、等の知見からこれまで知られていない免疫系細胞の関与が指摘されている。食品から体内に入った異常型プリオン蛋白質の増殖が何処で起こるのかといった基本的な問題も、未だにはっきり解決していない。本研究では、免疫系細胞群におけるプリオン蛋白質の動態と、それがどのように異常型プリオン蛋白質の形成に関わり、脳への伝播に関与するかを知る目的で研究を進めている。

前年度まで2年間の主な結果として、1) TSE

発症マウスの免疫系において CD21⁺B220⁺細胞 (B細胞、マクロファージ、濾胞樹状細胞 (FDC)、ストロマ細胞を含む分画) に異常型プリオン蛋白質を検出した、2) B細胞と腸管上皮に発現する細胞接着分子 (BILL カドヘリン) の遺伝子欠損マウスでは TSE 発症時期に有意な差がある、3) 免疫系と神経系に共通に発現する分子で異常型プリオン蛋白質形成に関与する因子を分子表面電荷を指標に検討した結果 S100 ファミリー分子にその活性を認めた、ことなどを明らかにした。

今年度は、免疫系細胞の異常型プリオン蛋白質伝播能を調べる目的で、これまで準備を進めてきた実験系、すなわち、各種免疫系細胞株に標識プリオン遺伝子を導入してそのプリオンの動態を観察する *in vitro* system の構築を試みた。その結果、骨髄に局在するプロB細胞と未熟マクロファージの細胞株に高いプリオン蛋白質発現・保持能力を認めたため、その初動的解析を行った。

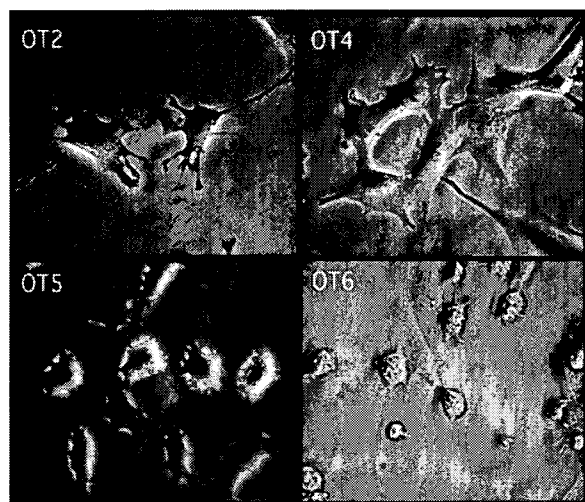
B. 研究方法

1) 免疫系細胞株パネルの作成：以下の各種免疫細胞株を用いてパネルを作製した。

イ) B細胞系列の細胞株；B220⁺のB細胞株として、38B9 (プロB細胞)、NFS5.3、70z3 (とも

にプレB細胞)、WEHI231(未熟B細胞)、A20(成熟B細胞)。ロ)マクロファージ細胞株;P388D1(未熟マクロファージ)、RAW264.7(成熟マクロファージ。ハ)ミクログリア細胞株;Ra2(名古屋大学・澤田誠博士より供与)。ニ)その他、脾臓ストロマ細胞、FDC様細胞、マクロファージ細胞の株化を以下の方法で行った。マウス脾臓より、各種培養条件を変えることにより、細胞株の樹立を試みた。検討する培養条件として、(i)基本培地(RPMI1640、DMEM、 α MEM他)、(ii)ステロイド系化合物(プレドニゾン等、リンパ球の増殖を抑制するため)、(iii)細胞外基質タンパク質(コラーゲンゲル、フィブロネクチン等)、(iv)各種サイトカイン(M-CSF、GM-CSF、等)、(v)フィーダー細胞(3T3、L cell等)。これらの細胞株は総じて増殖速度が遅かったが、脾臓DC/FDCを含む細胞分画をSV40-oriでトランスフォームしたDC/FDC様細胞株、OT2、OT4、OT5、OT6は増殖速度も速く、後述する遺伝子導入実験に適していた。これらの細胞株はCD21マーカーを発現し、樹状細胞様の形態を保つことから、FDCの性質を少なくとも一部保持していると考えられる。

[図1]



2) 標識プリオン遺伝子の導入: ヒト・プリオンの配列を標識として持つMHM2_{prion}遺伝子をIRES配列を挟んでEGFP遺伝子とともにpCI-neo発現ベクターに組み込んだ(pCI-neo-MHM2/IRES/EGFP)。この発現ベクターをリポフェクトアミン試薬により、上述した免疫系細胞株に導入した。これによりEGFPとMHM2の2つの標識により、導入したプリオン蛋白質を追跡することができる。遺伝子導入後、

初期のプリオン蛋白質発現をフローサイトメトリ法により検出するとともに、導入遺伝子を安定して発現するGFP陽性細胞をセルソーターにより選別・濃縮した。この操作を繰り返すことにより、導入プリオン遺伝子を安定に長期間発現できる細胞株とそうでない細胞株を判定することができる。

3) 標識プリオン導入細胞株を用いた異常プリオン形成のin vitro実験系: マウス神経芽細胞株N2aはプリオン蛋白質を安定して発現し、その亜株であるScN2aは異常型プリオン蛋白質を安定して保持している。N2aとScN2aを共培養するとN2a上の正常プリオン蛋白質が異常型に変換することが知られている。そこで、上述した、標識プリオン蛋白質を発現させた免疫系細胞株とScN2a細胞を共培養することにより、免疫系細胞上での異常プリオン蛋白質形成の可能性を検討することができる。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト由来材料を用いず、研究用に確立された細胞株、プリオン株、マウス系統を用い、倫理上問題になる実験を含まない。

C. 研究結果

1) 免疫系細胞パネルの作成と異常プリオン蛋白質形成のin vitro実験系: [図2]に示した免疫細胞株のパネルの各細胞株にpCI-neo-MHM2/IRES/EGFPを遺伝子導入すると、Ra2を除くすべての細胞に一過性のMHM2-プリ

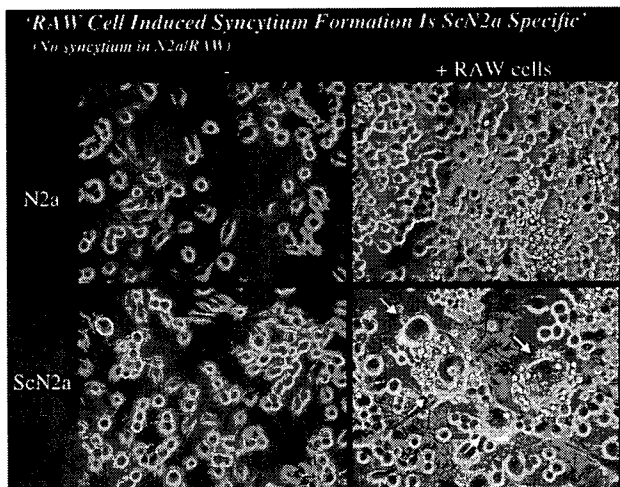
[図2]

Immune Cell Line Panel	
<u>B cell lines</u>	
38B9	proB cell
NFS5.3	preB cell
70z/3	preB cell
WEHI324	B cell
<u>Macrophage cell lines</u>	
P388D1	M ϕ /B cell
RAW264.7	M ϕ
<u>Microglia cell line</u>	
Ra2 (Dr. Sawada)	
<u>FDC</u>	
OT2	spleen LDC
OT4	Langerhans'
OT5	spleen LDC
OT6	spleen LDC

オン蛋白質の発現が認められた。その陽性率は各細胞ごと、繰り返し実験ごとにばらついたが、安定して長期間にわたり標識プリオン蛋白質を発現する細胞株をセルソーターにより、分離・選別した。これと並行して、各細胞株と ScN2a との共培養を行い、異常プリオン蛋白質の伝播能に関する実験を行った。この過程で次項 2) に述べる興味有る現象を観察した。

また、本実験系作製時の副次的な知見として以下の現象を見つけた。すなわち、ScN2a 細胞上で、遺伝子導入した MHM2 プリオン蛋白質が異常型に変換する過程を検討する実験系で、ある種の高分子ポリフェノール化合物 (MAF) が、異常型プリオン蛋白質の形成を強く抑制した。

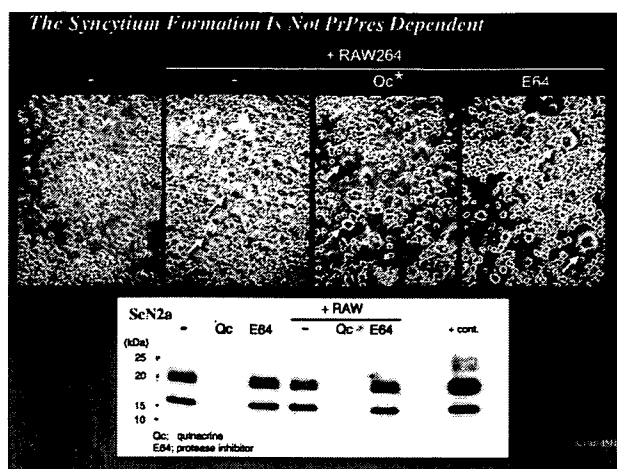
2) RAW264.7 株による ScN2a 細胞の攻撃 : マクロファージ株である RAW264.7 を ScN2a 細胞と共培養した際、RAW264.7 が ScN2a を攻撃して多核細胞を形成した。[図 3]



この多核細胞形成は、他の細胞との組み合わせでは起こらず、また、異常プリオン蛋白質を発現しない亜株である N2a 細胞とも起こらないことから、RAW 細胞が、ScN2a 上の異常プリオン蛋白質を認識することが引き金となって攻撃する可能性が考えられた。そこで、この現象が異常プリオン蛋白質に直接的に引き起こされるか否かを検討するために、ScN2a に保持されている異常プリオン蛋白質をキナクリン処理により排除してその影響を検討した。[図 4]

キナクリン (1 μ M、2 週間) 処理によって、ScN2a 上の PK (プロテイナーゼ K) 抵抗性異常型プリオン蛋白質は消失したが、RAW 細胞の攻撃による多核細胞形成は変わらなかった。このことか

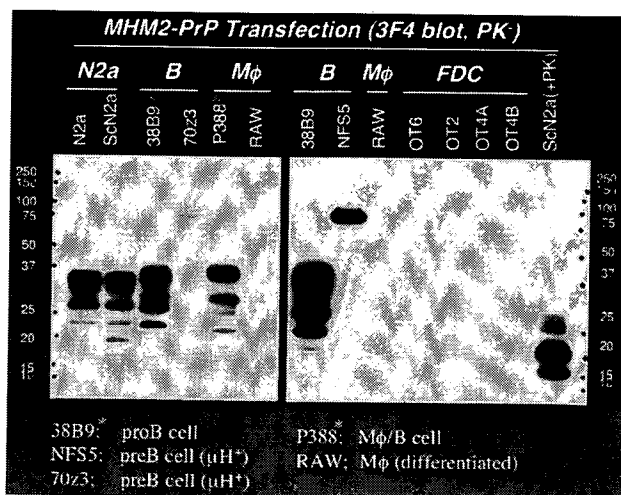
ら、RAW 細胞による ScN2a 細胞特異的な攻撃は、



[図 4]

ScN2a 細胞上の異常型プリオン蛋白質を直接認識して引き起こされるのではなく、より間接的に ScN2a 特異的な分子を認識する機序によるものと考えられた。

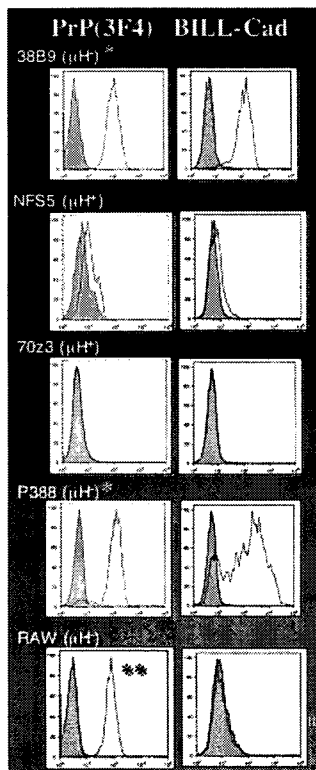
3) B 前駆細胞 (プロ B 細胞) および幼若マクロファージ細胞株における導入プリオン蛋白質の長期安定保持能 : 免疫系パネル細胞株への標識プリオン遺伝子導入と発現細胞のセルソーターによる選別・濃縮操作によって、長期に安定して標識プリオン蛋白質を発現・保持する細胞株は、38B9 (プロ B 細胞株) と P388 (幼若マクロファージ細胞) のみであった。この 2 つの免疫系に発現するプリオン蛋白質の分子量は、神経系細胞株である N2a 細胞とは異なっており、糖鎖修飾の違いを反映しているものと考えられた。今回パネルとして用いた分化の進んだ B 細胞株、マクロファージ株及び FDC 様細胞株は、遺伝子導入直後の一過性の標識プリオンの発現は認められたが、それを長期にわたって維持する能



力はなかった。[図 5]

このことは、この2つの細胞株に、プリオン蛋白質をその細胞表面に安定して発現するメカニズムが存在しており、FDC様細胞株を初めとするその他の細胞株にはそれがないことを示唆している。ここで特記すべき事は、プロB細胞である 38B9 株と他の2つのプレB細胞株の差異は、免疫グロブリンH鎖 (IgH 鎖) の発現の有無 (NSF5.3 と 70z3 で発現している) であり、IgH 鎖の発現が細胞表面のプリオン蛋白質の安定な発現を抑制している可能性が推測された。また、プリオン蛋白質を安定して発現する 38B9 と P388 細胞株に共通した性質として、BILL カドヘリンの高発現性が挙げられる[図 6]。BILL カドヘリンは、本研究でこれまでプリオン蛋白質と相互作用する因子として着目してきた Ca^{2+} 依存性細胞接着分子で、おそらくその分子表面の強い陰性電荷を介してプリオン蛋白質と結合性を有するものと考えている。これらの結果は、プリオン蛋白質-IgH 鎖-BILL カドヘリン蛋白質の間に機能的な相関があることを示唆している。そこで、推測される機能連関を検討する目的で以下の実験を行った。

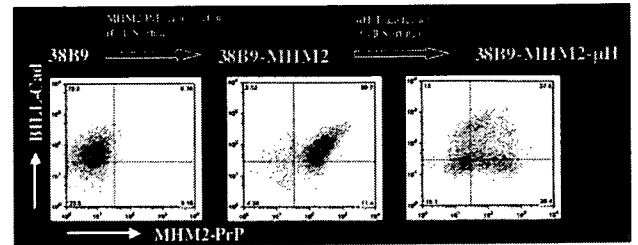
[図 6]



すなわち、1) 38B9 細胞上に発現する標識プリオン蛋白質の発現と BILL カドヘリンの発現の間に相関があるか、2) 38B9 に IgH を発現させると

標識プリオン蛋白質の発現が低下するか、を確認するために 38B9 細胞に MHM2 プリオン遺伝子と IgH 遺伝子を2段階に分けて導入し、プリオン蛋白質の動態を観察した。

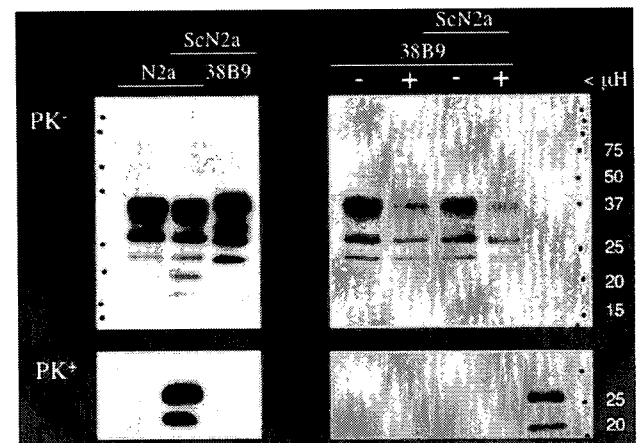
[図 7]



その結果、1) 38B9 上の MHM2 プリオン蛋白質量のばらつきと BILL カドヘリン発現量のばらつきの間に正の相関があること (図 7 中央)、2) さらに IgH を強制発現させると MHM2 プリオン蛋白質の発現量が低下し、BILL カドヘリンとは相関しない発現様式が現れること (図 7 右)、が明らかになった。

この、38B9 細胞表面に安定して長期に発現する MHM2 プリオン蛋白質が、ScN2a 細胞との共培養で異常型プリオンに変換するかを検討した。

[図 8]



この実験は現在まだ進行中であるが、少なくとも3週間の共培養では、38B9 細胞に異常プリオン蛋白質は検出されていない。今後、この *in vitro* 実験系を用いて、38B9 細胞上に安定して発現する MHM2 プリオン蛋白質を異常型に変換するためにどのような誘導が必要かを検討することにより、免疫系細胞上での異常型プリオン蛋白質形成機構を解明して行きたい。

D. 考 察

昨年度までの研究で、TSE発症マウスの脾臓において異常型プリオン蛋白質を保持しているB220⁺CD21⁺の細胞群は主にB細胞亜群からなり、マクロファージの一部とFDCを含む事を明らかにしている。このうち、B細胞分画をハイブリドーマ法を用いて株化した細胞では、初期には異常型プリオン蛋白質が検出されるにもかかわらず1ヶ月後には検出限界以下に低下した。このことからB細胞ハイブリドーマは異常型プリオン蛋白質を短期間保持するが、長期的に維持(増殖)する因子を欠損していると考察した。

この点の解析を進めるために、これまで作成を進めてきた免疫系細胞パネルを用いて、異常プリオン蛋白質形成の*in vitro*実験系の確立を試みた。

成熟マクロファージ細胞株であるRAW264.7はScN2a細胞を攻撃して多核細胞を形成した。この現象はScN2a細胞特異的で、異常プリオン蛋白質を保持しないN2a細胞では起こらなかった。このことから、RAW細胞がScN2a上の異常プリオン蛋白質を特異的に認識して攻撃する可能性が考えられたが、キナクリンを用いて異常型プリオン蛋白質を消す実験の結果から、RAW細胞がScN2a細胞上の異常型プリオン蛋白質を直接認識して引き起こされるのではないことが明らかになった。この現象は、異常型プリオン蛋白質の発現によってScN2a細胞に引き起こされた2次的な変化を認識する、より間接的な機序によるものと考えられたが、マクロファージによる異常型プリオン蛋白質脂質保有細胞の認識・排除機構を解析する上で有用なモデルになり得ると考える。

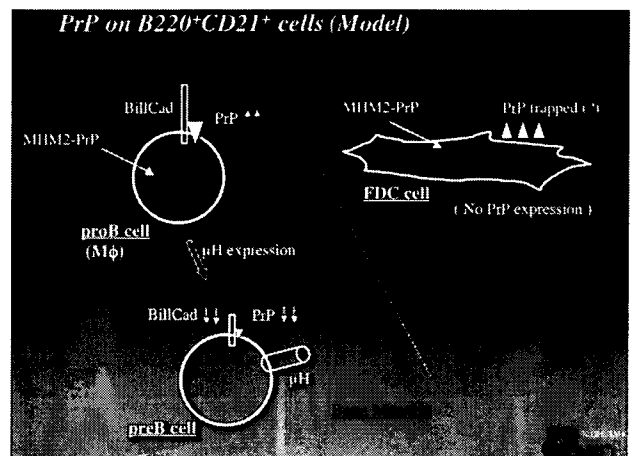
内在的に発現するMHM2プリオン蛋白質を長期に渡り安定して発現・保持する細胞株は、38B9(プロB細胞株)とP388(幼若マクロファージ細胞)のみであり、FDC様細胞株を含むその他の細胞株にはその能力がなかった。この2つの細胞株を特徴づける性質として、BILLカドヘリンの高発現性が挙げられる。また、IgH鎖の発現が細胞表面プリオン蛋白質の安定な発現を抑制している可能性が示唆された。実際に、プロB細胞株である38B9細胞にMHM2プリオン遺伝子とIgH遺伝子を2段階に分けて導入し、プリオン蛋白質の動態を観察すると、MHM2プリオン蛋白質量とBILLカドヘリン発現量の間には正の相関があり、IgH強制発現によりプリオン蛋白質の

発現量が低下したことから、プリオン蛋白質-IgH鎖-BILLカドヘリンの間に機能的な相関があることが明らかになった。

以上の結果をまとめると、プロB細胞株と幼若マクロファージ細胞株において、細胞表面に内因性プリオン蛋白質を高レベルで発現する分子機構が備わっており、今回用いたFDC様細胞株を含むそのほかの細胞株にはそれが無い。TSE発症マウスの脾臓では、FDC細胞上に高濃度の異常型プリオン蛋白質が検出される。このFDC上の異常型プリオン蛋白質の由来・起源については、1)FDC細胞自体が発現するプリオン蛋白質が異常型に変換した、または、2)FDC上の補体受容体またはFc受容体を介して、体内を循環する異常型プリオン蛋白質が捕捉・濃縮された、とする2説有るが、本研究の結果は後者を支持する。このことは、プリオン蛋白質が正常型から異常型へ変換する過程がFDC以外の細胞で起こることを示し、本研究の結果はそれがプロB細胞またはそれと近縁である幼若マクロファージ細胞である可能性を示唆している(図9)。

プロB細胞、幼若マクロファージ細胞とも骨髄に局在することが知られており、上記観察は、BSE牛の骨髄に低レベルの感染性があることを説明できる。特記すべき事は、最近の研究で、脳内ミクログリア細胞が骨髄由来であり、ミクログリア前駆細胞が常に骨髄から脳へ流入しているとする報告である。このことは、一つの可能性として、ミクログリア前駆細胞が、異常型プリオン蛋白質を脳へ運ぶシャトルの役割を演じている可能性を提議する。この点も含めて、今後、骨髄における異常プリオン蛋白質の動態を詳細に見て行く必要があると考える。

[図9]



E. 結 論

BSE 牛由来食物の摂取により体内に侵入した異常型プリオン蛋白質が腸から脳へ伝播する機序について、免疫系細胞がどのように関与するか検討している。各種免疫系細胞株に標識プリオン遺伝子を導入してそのプリオンの動態を観察する *in vitro* 実験系の構築を試みた結果、B細胞とマクロファージの前駆細胞株で高いプリオン蛋白質発現・保持能を認めた。しかし、従来、異常型プリオン蛋白質を高濃度保持するとして着目されてきたFDC様細胞株にはその内在性プリオン蛋白質の発現・保持能力を認めなかった。この結果は、FDC上の異常型プリオン蛋白質が補体受容体またはFc受容体を介して捕捉・濃縮されたものであることを示唆し、むしろ、内在的なプリオン蛋白質を細胞表面に安定して保持する能力のあるプロB細胞とマクロファージ前駆細胞において異常型プリオン蛋白質の伝播が進む可能性を示唆している。今後、プロB細胞・マクロファージ前駆細胞が局在する骨髄における異常プリオン蛋白質の動態を詳細に検討する必要があると考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 大西 和夫、山口沙由理

「異常型プリオン蛋白質の免疫系における増殖・伝播に関与する因子」

BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)、横浜 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「異常型プリオン蛋白質の形成抑制剤」

出願番号：特願 007-196599

出願日：2007年7月27日

発明者：大西 和夫、沼田 治、小澤 哲夫

出願者：国立感染症研究所、国立大学法人筑波大学、三井農林株式会社

2. 実用新案登録

なし

1 4. BSE リスク解明を目的としたプリオン蛋白質構造変換改変による構造変換機序解析に関する研究

分担研究者 堂浦克美 東北大学大学院 医学系研究科 教授

研究協力者 逆瀬川裕二 (東北大学大学院・医学系研究科)

研究要旨 我々はヒートショック蛋白質 Hsp90 がインビトロにおいてリコンビナント正常型プリオン蛋白質(rPrP)の構造変換を促進することを報告している。今回、1) Hsp90 がマウス神経芽細胞腫由来 N2a 細胞の細胞膜上に局在すること、2) 新規に見出した Hsp90 構造変換活性阻害剤(化合物 A)が、N2a 細胞において正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の一次代謝産物 C1 ペプチドの産生および、3) RML および 22L プリオン株に持続的に感染した N2a 細胞において異常感染型プリオン蛋白質(PrPres)の産生を抑制することを見出した。これらの結果は、Hsp90 が PrP^C の代謝および PrPres の産生に関与する可能性を示している。

A. 研究目的

Hsp90 の正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の代謝およびプリオン持続性感染細胞における異常感染型プリオン蛋白質(PrPres)の産生への関与を調べた。

B. 研究方法

1) インビトロ PrP^C 高次構造変換試験系

100ng のリコンビナントプリオン蛋白質(rPrP)と Hsp90 を含む 20 μ l の反応液[50 mM Hepes-KOH (pH7.5)、2 mM MgCl₂、2 mM ATP] 中にて 16°C、15 分間保温した。1 μ g/ml になるようにトリプシンを添加し、さらに 20 分間消化反応を行った。消化産物は、SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜にトランスファーした後、3F4 抗体によって検出した。

2) リコンビナント Hsp90(rHsp90)の精製

マウス Hsp90 α を N 末端側に His6 タグを付加するようにマウス cDNA ライブラリーより PCR 法によって増幅し、大腸菌蛋白質発現ベクター-pET11 に導入した。上記発現プラスミドにて形質転換した大腸菌 Rosetta2 を 0.1mM IPTG を含む培地で 18°C、一晚培養することによって rHsp90 を発現誘導し、細胞破碎液上清から HIS-Select (Sigma) および UNO-Q (Bio-Rad) により精製した。

3) 間接蛍光抗体法による Hsp90 の局在の観

察

ガラスボトムディッシュ上に培養した N2a 細胞を PBS(-)で洗浄後、パラホルムアルデヒド固定した。1 次抗体に抗 Hsp90 抗体 α 、 β (Neo Markers)あるいは抗 PrP 抗体(M-20, Santa Cruz)、2 次抗体に Alexa488 結合抗ウサギ IgG 抗体、Alexa596 結合ヤギ IgG 抗体(Invitrogen)を用いて、コンフォーカル顕微鏡システム FV300(Olympus)にて観察した。

4) 培養細胞における C1 ペプチドの検出

マウス神経芽細胞腫細胞 N2a(7x10⁵ 細胞)を 12 ウェルプレートに添加し、2 日間培養した後、化合物 A あるいは DMSO を添加し、さらに 12 時間培養した。PBS(-)にて細胞を洗浄した後、200 μ l の Lysis 緩衝液[0.5% NP-40、0.5% Na Deoxycholate、PBS(-)、1 mM EDTA、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque、動物細胞用)]に溶解し、5,000 g 上清を回収した。上清 100 μ l に 0.2U PNGase を添加し、37° C、12 時間糖鎖消化処理した。消化産物は、SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜にトランスファーした後、SAF83 抗体により正常型 PrP を検出した。

5) 培養細胞における異常感染型プリオン蛋白質 (PrPres) の検出

プリオン持続性感染細胞 Sc84 あるいは N167(7x10⁵ 細胞)を 12 ウェルプレートに添加し、

2 日間培養した後、化合物 A あるいは DMSO を添加し、さらに 12 時間培養した。PBS(-)によって細胞を洗浄した後、200 μ l の Lysis 緩衝液[0.5% NP-40、0.5% Na Deoxycholate、PBS(-)]に溶解し、5,000 g 上清を回収した。上清 100 μ l に 20 μ g/ml となるように Proteinase K を添加し、37° C、30 分間消化処理した後、SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜にトランスファーした後、SAF83 抗体により PrPres を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んでいない。

C. 研究結果

1) Hsp90 の細胞内局在

間接蛍光抗体法を用いて、N2a 細胞の細胞膜表面に Hsp90 が局在するか否か調べた。その結果、Hsp90 の α および β アイソフォームのいずれも細胞膜上にドット状に局在することが判明した。細胞膜上に局在する Hsp90 の一部は、細胞膜上の PrP と共局在していた。

2) 正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の代謝への影響

当研究室では、インビトロ PrP 高次構造変換試験系によるスクリーニングによって Hsp90 が示す rPrP の高次構造変換活性を阻害する化合物を見出している。そこで、この化合物(化合物 A)を用いて、Hsp90 が PrP^C の合成および代謝に与える影響を調べた。化合物(200 μ M)を含むメEDIUM中にて 12 時間培養した N2a 細胞の破碎液を回収し、PrP^C の糖鎖を PNGase F にて消化し、無糖鎖の PrP^C を SDS-PAGE によって分離し、イムノブロット法により検出した。その結果、未処理の細胞に比して、PrP^C の一次分解産物と考えられる C1 ペプチドの産生が減少していた。また、化合物 A による PrP^C の発現の影響は認められなかった。

3) 異常感染型プリオン蛋白質の複製への影響

2 つのプリオン株 RML および 22L に持続的に感染した N2a 細胞を化合物 A を含むメEDIUM中にて 2 日間培養し、PrPres の産生に与える影響を調べた。その結果、いずれのプリオン

株に感染した細胞においても、化合物 A は濃度依存的に PrPres の産生を抑制した。

D. 考察

昨年度、ヒートショック蛋白質 Hsp90 ファミリー蛋白質が、リコンビナント正常型プリオン蛋白質(rPrP)の構造変換を促進すること、さらに、銅結合型 PrP をヌクレオチド依存的に構造変換し、そのシャペロン活性の本体は 2 つあるシャペロンドメインの内、C 末側シャペロンドメインであることを報告した。本年度は、1)Hsp90 の細胞内局在、2)正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の代謝への影響、3)異常感染型プリオン蛋白質の複製への影響を検討した。

従来、Hsp90 はサイトソルあるいは核内に局在し、ステロイドホルモンレセプターやチロシンキナーゼなどの活性化あるいは安定化に働いていることが報告されている。最近になって、細胞外マトリクスに局在する Hsp90 の α アイソフォームは、細胞外マトリクスメタロプロテアーゼの活性化に働き、がん細胞の転移に関与することが報告された。今回、抗 Hsp90 抗体を用いた間接抗体法によって N2a 細胞の細胞膜表面上に結合する Hsp90 α および β の存在を確認することに成功した。細胞膜上の Hsp90 は PBS による洗浄では除かれないことから、細胞膜上に一定の結合力で結合していると考えられる。一部の Hsp90 は細胞膜上の PrP^C と共局在しており、Hsp90 と PrP^C は直接相互作用する可能性がある。

Hsp90 は rPrP の分子中央部を構造変換すると考えられ、Hsp90 によって構造変換された rPrP はトリプシン消化によって 2 つのペプチド(N1、C1 様ペプチド)に切断される。この結果は、生体内で観察されている PrP^C の代謝産物、C1 ペプチドの産生に Hsp90 が関与することを予想させる。そこで、Hsp90 の rPrP に対する構造変換活性の新規阻害剤(化合物 A)を用いて、C1 ペプチドを測定したところ、化合物 A によって処理した N2a 細胞の C1 ペプチドの産生はコントロールに比べて強く抑制された。

また、化合物 A は 2 つのプリオン持続性感染細胞において、PrPres の産生を抑制した。

これらの結果は、Hsp90 が PrPC の代謝および PrPC から PrPres への構造変換に関与する可能性を示唆している。今後は、化合物 A の基

質特異性や阻害作用のメカニズムを明らかにすることによって、Hsp90あるいは他の細胞内因子がPrP^Cの代謝およびPrPresの産生に関与するか明らかにする必要がある。

E. 結論

ヒートショック蛋白質 Hsp90 は、N2a 細胞においてサイトソルだけでなく細胞膜上に局在すること、また、インビトロにおいて Hsp90 の rPrP 構造変換活性の阻害剤、化合物 A は、PrP^Cの代謝産物 C1 の産生を抑制し、また、プリオン持続性感染 N2a 細胞において PrPres の産生を抑制した。Hsp90 は PrP^Cの代謝および PrPres の産生に関与する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-Ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y: Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. *J. Neurol.*, in press, 2007
- 2) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, Doh-Ura K: Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J. Virol.*, 81(23):12889-12898, 2007
- 3) Hao HP, Doh-Ura K, Nakanishi H: Impairment of microglial responses to facial nerve axotomy in cathepsin S-deficient mice. *J. Neurosci. Res.*, 85(10):2196-2206, 2007
- 4) Doh-Ura K, Kuge T, Uomoto M, Nishizawa K, Kawasaki Y, Iha M: Prophylactic effect of dietary seaweed Fucoidan against enteral prion infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(6):2274-2277, 2007
- 5) Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y: Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both antiprion activity and brain endothelial permeability than quinacrine. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 27(3):303-316, 2007
- 6) 堂浦克美: 神経感染症の治療の進歩と将来の展望 プリオン病への治療アプローチ。神経治療学、24(3):280、2007
- 7) 逆瀬川裕二, 堂浦克美: プリオン病の診断支援・治療への試み。日本臨床、65(8):1417-1422、2007
- 8) 逆瀬川裕二, 堂浦克美: プリオン病の分子標的治療。神経研究の進歩、59(4):405-414、2007

2. 学会発表

- 1) Doh-ura K: Amyloidophilic chemicals for therapeutics of prion diseases. CJD2007, Vancouver, November 5-6, 2007
- 2) Teruya K, Yamada Y, Nishimura T, Suda Y, Doh-ura K: Characterization of the interaction between prion protein and heparin. Prion2007, Edinburgh, September 26-28, 2007
- 3) Kimura T, Ishikawa K, Nishimura Y, Schatzl HM, Doh-ura K: Screening for endogenous factors involved in the formation of protease resistant prion protein. Prion2007, Edinburgh, September 26-28, 2007
- 4) Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K, Doh-ura K: HSP90 family proteins modify the conformation of copper-loaded prion protein in a nucleotide-dependent manner. Prion2007, Edinburgh, September 26-28, 2007
- 5) Doh-ura K: Development of potential therapeutics for prion diseases. CJD Foundation Family Conference, Washington DC, July 6-9, 2007
- 6) 堂浦克美: ヤコブ病克服プロジェクトの成果と残されている課題ー治療・発症機序研究。食と医療の安全に関する市民講座「プリオンから見た食の安全と医療の安全: プリオンはもう怖くないの? ウシ海綿状脳症(BSE)とヤコブ病(CJD)」、東京、2007年12月16日
- 7) 堂浦克美: プリオン病ー診断・治療研究の

- 最近の進歩と課題一。第12回 SRL 感染症フォーラム、東京、2007年12月15日
- 8) 篠原正将、海野昌喜、照屋健太、酒井隆一、堂浦克美、佐々木 誠、齋藤正男：ヒト由来のグルタミン酸受容体 GluR5 リガンド結合部位の結晶構造解析。第80回日本生化学会大会、横浜 2007年12月11~15日
- 9) 照屋健太、山田有希、西澤桂子、堂浦克美：C 末端をコレステロールで修飾した蛋白質の半合成と細胞膜への結合。第44回ペプチド討論会、富山市、2007年11月7-9日
- 10) 堂浦克美：プリオン病の治療の試み。第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007年10月21日~23日
- 11) 木村朋寛、石川謙介、西村有起、Schatzl HM、堂浦克美：プロテアーゼ抵抗性プリオン蛋白質産生に関与する内因性因子のスクリーニング。2007年プリオン研究会、津南(新潟)、2007年8月25日、26日
- 12) Sakasegawa Y, Hachiya NS, Kaneko K, Doh-ura K: The C-terminal chaperone domain of heat shock protein 90 kDa is responsible for the conformational modification of copper-loaded recombinant prion protein. 2007年プリオン研究会、津南(新潟)、2007年8月25日、26日
- 13) 篠原正将、海野昌喜、照屋健太、酒井隆一、堂浦克美、佐々木 誠、齋藤正男：ヒト由来のグルタミン酸受容体 GluR5 リガンド結合部位の結晶構造解析。第22回生体機能関連化学シンポジウム「若手フォーラム」、仙台、2007年9月28-29日
- 14) 照屋健太、山田有希、隅田泰生、堂浦克美：ヘパリンとプリオン蛋白質相互作用のキャラクターゼーション。2007年プリオン研究会、津南(新潟)、2007年8月25日、26日
- 15) 濱中大一、堂浦克美：抗プリオン活性を持つ担子菌成分に関する研究。2007年プリオン研究会、津南(新潟)、2007年8月25日、26日
- 16) 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美：ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与療法の臨床研究-11例の臨床経過と問題点。2007年プリオン研究会、津南(新潟)、2007年8月25日、26日
- 17) 末吉 真、樋口隆一、堂浦克美、宮本智文：フェオフィチン類の異常型プリオンタンパク質産生阻害機構の解明。2007年プリオン研究会、津南(新潟)、2007年8月25日、26日
- 18) 川崎ゆり、河原佐智代、宮澤正顕、堂浦克美：末梢で異常型プリオン蛋白質の形成に関与するリンパ球サブセット。2007年プリオン研究会、津南(新潟)、2007年8月25日、26日
- 19) 野村幸子、宮庄 拓、戸邊美智子、志賀康弘、前田尚之、堂浦克美、横田 博：ウシ海綿状脳症罹患牛血清に検出されたグリア線維性酸性蛋白質に対する自己抗体。2007年プリオン研究会、津南(新潟)、2007年8月25日、26日
- 20) 堂浦克美：プリオン病への治療アプローチ。第25回日本神経治療学会総会、仙台、2007年6月21日、22日
- 21) 照屋健太、魚本 幸、藤田智司、堂浦克美：プリオン感染細胞からの迅速な PrPres 回収法。第7回日本蛋白質科学会年会、仙台、2007年5月24-26日
- 22) 山口恭史、三浦隆史、照屋健太、堂浦克美、竹内英夫：銅イオンにより誘起されるプリオンタンパク質の構造変化。第7回日本蛋白質科学会年会、仙台、2007年5月24-26日
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 1) 堂浦克美：コンフォメーション病医薬組成物。国際出願 PCT/JP2007/058566、2007年4月20日
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

15. サルに伝播された BSE プリオンの生体内分布と 生化学的性状の解析

分担研究者 山河 芳夫 国立感染症研究所細胞化学部

研究協力者 寺尾恵治、小野文子（独立行政法人 基盤研 霊長類センター）
萩原健一、大内史子、中村優子（感染研・細胞化学部）
飛梅実、佐藤由子、佐多徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

研究要旨 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) のモデルとして、霊長類であるカニクイザル(Cynomolgus macaque)へのウシ海綿状脳症 (BSE) の伝達を試みた。BSE 検査で陽性と判定されたウシ (BSE/JP6 和歌山) の 10% 脳乳剤、0.2ml を幼若カニクイザルに脳内接種したところ、3 頭中 2 頭(#7,#10)で接種後 26 ヶ月目頃より驚愕・過敏反応等の行動異常が認められ、次いで、振戦や麻痺などの神経症状が顕著となった。起立不能となった終末期に安楽殺して PrP^{Sc} の組織分布及び沈着状態をウェスタンブロット法 (WB) と免疫組織化学的手法 (IHC) で、組織の病理変化をヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色で検討した。その結果、vCJD に特徴的な免疫組織染色像である PrP^{Sc} の花弁状沈着 (florid plaque) が大脳皮質において認められた。一方、視床部位では BSE の場合と同様の線状、顆粒状に PrP^{Sc} の沈着が認められた。脳及び中枢神経組織のウェスタンブロットで vCJD/BSE プリオンと同様の 2B 型 (4 型) の糖鎖型を呈する PrP^{Sc} の大量の蓄積が検出された。末梢の組織・臓器について WB 法で詳細に PrP^{Sc} を検索したところ、#7 で座骨神経や正中神経などの末梢神経の一部及び顎下リンパに極微量 (脳の 1/1000 以下) の蓄積が認められた。しかし、#10 の末梢組織にはプリオンを検出する事は出来なかった。なお、いずれのサルにおいても vCJD において PrP^{Sc} の蓄積または感染性が報告されている脾臓、扁桃等のリンパ組織に PrP^{Sc} を検出することは出来なかった。

A. 研究目的

変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) はウシ海綿状脳症 (BSE) の原因物質である BSE プリオンを摂取する事により惹起されたと考えられているヒトのプリオン病である。vCJD では WB により観察される PrP^{Sc} の糖鎖型が BSE プリオンのそれと近似した 2 糖鎖型が優勢な 2B/4 型である事や花弁状沈着と呼ばれる特徴的な PrP^{Sc} の凝集が IHC で認められることに加え、BSE では PrP^{Sc} が検出されない脾臓や扁桃などのリンパ系組織に PrP^{Sc} が蓄積するなどの特徴がある。現在までに、200 名を超える患者がイギリスを中心に発生しており、わが国でも EU 滞在中に感染したと考えられる男性 1 名が発症し、死亡している。報告されている vCJD 患者はいずれもプリオンタンパク (PrP) の 129 位のアミノ酸がメチオニン/メチオニン (MM) 型の遺伝子型の保有者であるが、

イギリスなどの EU 諸国ではこの型を持つ人の比率が低いことが知られており、この様な統計から PrP129MM 型の保有者は遺伝的に BSE 由来のプリオンに感受性が高く、vCJD を発症し易いことが示唆されている。PrP129MM 多型が多数を占めるわが国では BSE のリスクは欧米に比べて高いと想像することができる。本研究では、vCJD の発症モデルとしてヒトと近縁な霊長類であるカニクイザルに BSE プリオンを接種することによりプリオン病を発症させ、その発症様式をおよび、PrP^{Sc} の生化学的性状や組織の病理変化を vCJD のそれと比較することにより vCJD の研究に資することを目的とする。本報告では、脳内接種によりプリオン病を発症したサルの PrP^{Sc} の性状や分布および病理検索の結果などについて報告する。

B. 研究方法

1) プリオンタンパクの多型

研究に供したカニクイザルの血液を用いてプリオンタンパクの塩基配列を調べたが、いずれの個体もプリオン病への感受性や病態の進行に関与すると考えられている部位のアミノ酸多型は 129M/M,219E/E であり、ヒト（日本人）に最も多いプリオンタンパクの遺伝子型と同一であった。

2) ウェスタンブロッティング (WB)

細切組織をPBS中で2mmΦのジルコニアビーズとともに攪拌(2500rpm,5min)して5-10%乳剤を作成した。乳剤はBSE確認検査マニュアルに準じて、界面活性剤存在下にDNase,コラーゲナーゼおよびPKで消化した後にPrP^{Sc}をアルコール沈殿(2-BuOH:MeOH=5:1;1/3 vol.)で濃縮・精製して少量のSDS-サンプルバッファーに溶解して試料とした。マニュアルに準じて電気泳動、PVDF膜への転写を行ない、一次抗体にはmAb 3F4または6H4を、2次抗体には抗マウスIgG-HRP-標識抗体を用いてプリオンタンパクをECLplus試薬で化学発光検出を行なった。プロットはLAS3000 Image Reader(Fuji Film)で記録し、陽性バンドの定量は付属のソフトウェア(Image Guage)でおこなった。

3) 免疫組織化学染色(IHC)および組織染色(HE)

組織のIHCおよびHE染色ルマリン固定はBSE確認検査マニュアルに準じて、パラフ

イン包埋および抗原の賦活化を行なった。IHCには感染研作成のC-末ペプチド由来の抗プリオン抗体(T4)を用いた。

4) ELISA法によるPrP^{Sc}の検出・定量
脳、中枢神経系に存在するPrP^{Sc}は市販のBSE検査キット(TeSe BSE, BioRad)を用いて発色させ、A450nmの吸高度で定量した。

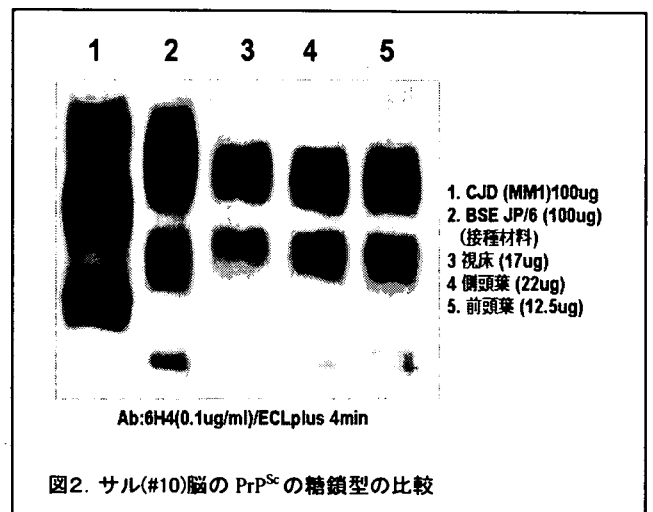
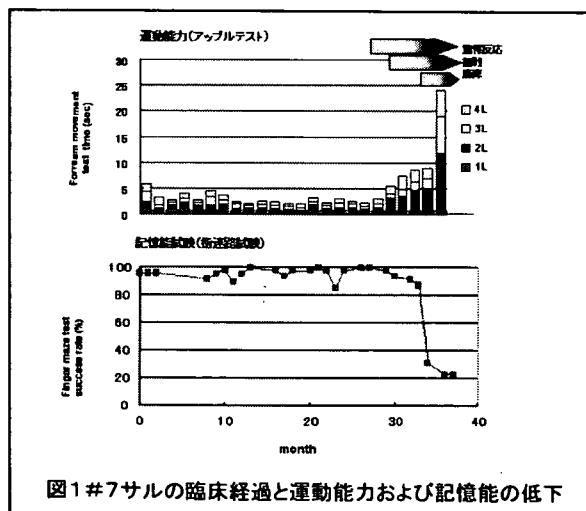
C. 結果

1) 潜伏期間と臨床経過

BSEプリオンを接種した3頭のカニクイザルのうち2頭(#7,10)が接種後26-29ヶ月で音や光に対する過敏・驚愕反応などを示し、次いで振戦や麻痺などのプリオン病でよく見られる神経症状を呈して、30ヶ月前後で起立不能となった。臨床経過の詳細については本研究班の寺尾等が別に報告しているのでここでは#7の経過について図1に簡単に記した。

2) 脳におけるPrP^{Sc}の検出と糖鎖型

図2.に#10サルの脳内の各部に蓄積したPrP^{Sc}のWB像を示した。視床、側頭葉および前頭葉のいずれの部位においてもPrP^{Sc}の糖鎖型は接種材料であるBSEプリオン(lane2)と同様に2糖鎖分子の含量が多く、非糖鎖分子もBSEプリオンと同じ位置に泳動されていた。このようなPrP^{Sc}のWB像はlane1に示したヒト孤発性CJD MM1型プリオンとは明らかに異なっており、BSEやvCJDで見られる2B/4型に酷似するもので、サルが示した異常挙動や神経症状はプリオン病に起因するもので、BSEがサル



に伝播したことを示すものである。なお、#7のサルの大脳の各所においても同様の糖鎖型を持つ PrP^{Sc} が蓄積していた。(図6参照)

3) PrP^{Sc} の免疫組織化学的染色と組織染色

図3にサル脳の PrP^{Sc} の IHC および組織の HE 染色の結果を示した。いずれのサルの脳においても HE 染色 (図3-5,6) により高度の海綿状変性を確認することが出来た。また、IHC で検出される PrP^{Sc} の沈着様式は(A)空砲の回りに多数巨大プラークが存在する花弁状プラーク(図3-1,2),(B)粗大顆粒/プラーク状(図3-3)および(C)微細顆粒沈着(図3-4)の3様式に大別することができた。これらのうち、(I)の花弁状プラークは vCJD に特異的な PrP^{Sc} の沈着様式であり、微細顆粒は BSE において通常見られる沈着様式である。

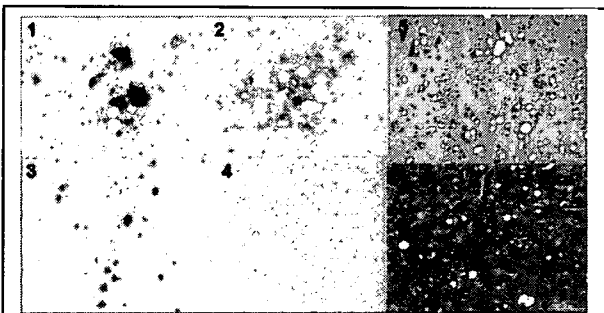


図3 サル脳に見られる PrP^{Sc} の蓄積(1-4)と海綿状変性(5-6)
1,2: 花弁状沈着(#7、#10 側頭葉)、3: 粗大顆粒状沈着(プラーク)(#10 大脳皮質)、4: 微細顆粒状沈着(#10 視床)、5,6: 海綿状変性(HE)(#7,10 側頭葉)

4) PrP^{Sc} の脳・中枢神経系への蓄積と分布

PrP^{Sc} の大まかな脳内分布を知る事を目的として、BSE 検査に用いられている ELISA キ

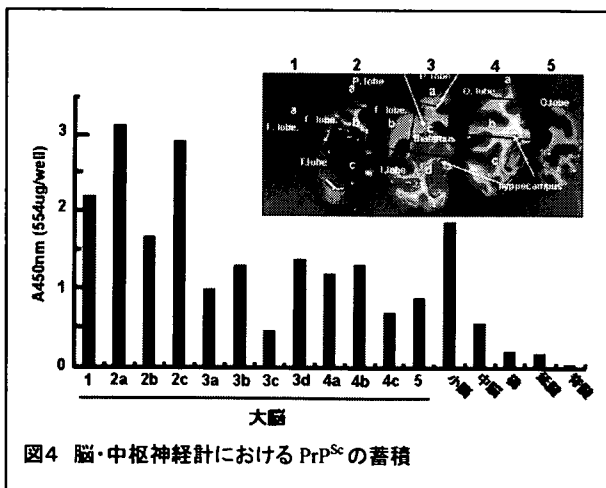


図4 脳・中枢神経計における PrP^{Sc} の蓄積

ット (TeSe BSE, BioRad) を用いて検討した。図4に大脳の切断部位と各部位に置ける ELISA 値を示した。PrP^{Sc} は大脳の前頭葉や頭頂葉と側頭葉の大脳前部などに多く蓄積し、後頭葉への蓄積は比較的少なかった。また、小脳にも高濃度の蓄積があったが、中脳や橋および延髄などの脳幹部への蓄積は少なく、脊髄への蓄積量は大脳の 1/100 程度であった。

5) 末梢神経およびリンパ節・臓器における PrP^{Sc} の検出

vCJD では中枢神経系のみならず扁桃や脾臓などのリンパ系の器官に PrP^{Sc} の蓄積がある事が報告されていることや vCJD が輸血を介して 2 次感染を起こすことなどを考慮して、末梢神経系やリンパ節・リンパ系臓器に PrP^{Sc} が分布しているか否かを WB 法によって詳細に検討した。その結果 (図5)、#7のサルの末梢神経から PrP^{Sc} を検出することが出来たが、その含量は脳の 1/100-1/1000 程度と少量であった。一方、#10のサルの末梢からは PrP^{Sc} を検出することは出来なかった。

リンパ節やリンパ系臓器の検索ではいずれの

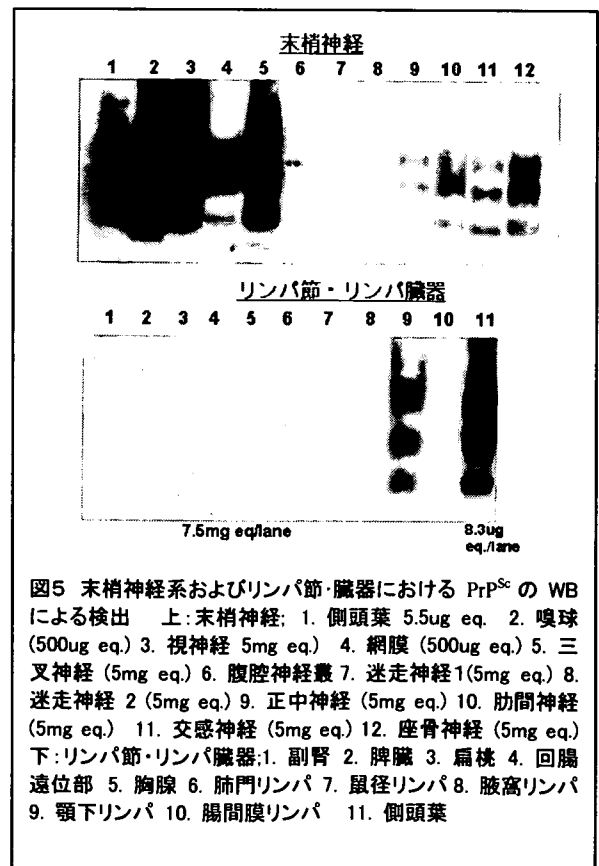


図5 末梢神経系およびリンパ節・臓器における PrP^{Sc} の WB による検出 上:末梢神経: 1. 側頭葉 5.5ug eq. 2. 嗅球 (500ug eq.) 3. 視神経 5mg eq. 4. 網膜 (500ug eq.) 5. 三叉神経 (5mg eq.) 6. 腹腔神経叢 7. 迷走神経1(5mg eq.) 8. 迷走神経 2 (5mg eq.) 9. 正中神経 (5mg eq.) 10. 肋間神経 (5mg eq.) 11. 交感神経 (5mg eq.) 12. 座骨神経 (5mg eq.) 下:リンパ節・リンパ臓器:1. 副腎 2. 脾臓 3. 扁桃 4. 回腸遠位部 5. 胸腺 6. 肺門リンパ 7. 鼠径リンパ 8. 腋窩リンパ 9. 顎下リンパ 10. 腸間膜リンパ 11. 側頭葉

サルにおいても脾臓や扁桃および、PrP^{Sc}の存在が証明されている回腸遠位部などには PrP^{Sc}の蓄積は認められなかった。さらに、各所のリンパ節について検討したところ、#7のサルの顎下リンパ節に極めて微量(脳の1/1000以下)の PrP^{Sc}の存在が認められた、しかし、他のリンパ節では検出することは出来なかった。表1にWBによる検査部位と PrP^{Sc}の検出の可否について示した。

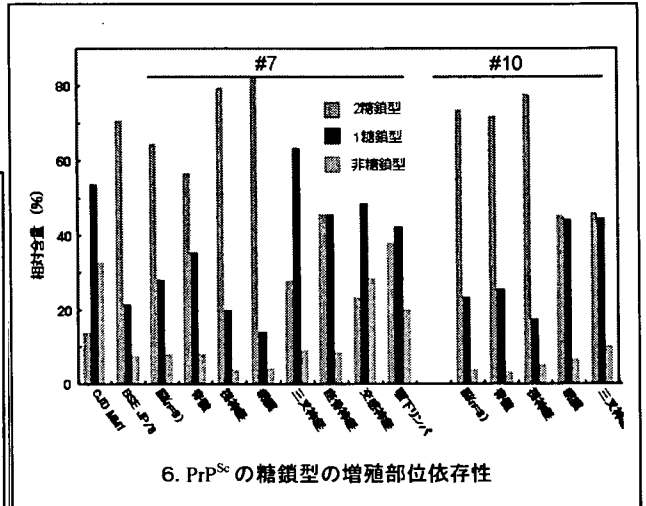
	#7	#10	#7	#10
中枢神経系			リンパ系組織	
脳	+++	+++	胸腺	-
脊髄	++	++	脾臓	-
視神経	+++	++	副腎	-
末梢神経系			扁桃	
網膜	+++	+++	回腸遠位部	-
三叉神経	++	++	リンパ節	
迷走神経	+	-	顎下リンパ	+
正中神経	+	ND	肺門リンパ	-
肋間神経	+	ND	腋窩リンパ	-
交感神経	+	ND	腸管膜リンパ	-
腹腔神経叢	+	-	鼠径リンパ	-
座骨神経	+	-	肺門リンパ	-

N.D. not done. +++-10ug. ++-200ug. +-1-10mg

6) PrP^{Sc}の糖鎖型の増殖部位依存性

体内に侵入したプリオンは宿主のプリオンタンパクを異常化して体内で増殖する。このとき、自身を鋳型とするために、増殖した PrP^{Sc}は鋳型として使用された PrP^{Sc}の生化学的な性状を反映する。vCJD ではウシのプリオンを鋳型としているので、その生化学的特長のひとつである“Glycoform;糖鎖型”は BSE プリオンの特徴である 2B/4型の糖鎖型のプリオンが増殖している。本実験においても、図2に示した様に、サル脳には 2B/4型の PrP^{Sc}が増殖しているが、図5に示した WB では末梢で増殖したプリオンの糖鎖型は必ずしも 2B/4型を示していないようにみえた。図6に2頭のサルの各部位で検出された PrP^{Sc}の 2糖鎖型分子、1糖鎖型分子および非糖鎖型分子の相対含量を定量した結果を示した。大脳の各部位においては蓄積した PrP^{Sc}は接種材料である BSE プリオンと同様に 2糖鎖型が優位な特徴をしめし、個体間でも大きな差は認められなかった。一方、脊髄、網膜および三叉神経に蓄積した PrP^{Sc}の糖鎖型は 2B/4型には分類できない PrP^{Sc}の蓄積が認

められる事のみならず同一部位を分析した場合でも個体間で相互に異なっていた。このことから、部位特異的に糖鎖型の異なる PrP^{Sc}が増幅したとは考え難く、現在のところその理由は不明である。



6. PrP^{Sc}の糖鎖型の増殖部位依存性

D/E. 考察・結論

BSEに由来する PrP^{Sc}の脳内接種によりプリオン病を発症した2頭のアカゲザルはプリオン病に特徴的な精神・神経症状を示した。PSDを認めない事や、#10で抑鬱が顕著であった事は vCJD の特徴を示していると考えられる。なお、図には示さなかったが、神経症状の発現に先立って接種後24か月頃から体重の増加率が小さくなっている事が観察されている。PrP^{Sc}は主に中枢神経系に存在するが、vCJD の特徴である花弁状の沈着は大脳の皮質で顕著であった。一方、視床や延髄の神経核においては BSE に特徴的な顆粒状、線状の PrP^{Sc}の沈着が主に認められた。

WB法による PrP^{Sc}の検索では中枢神経系以外にも#7の末梢神経や顎下リンパに極微量の PrP^{Sc}が検出されたが、#10では検出できなかった。これは、#7が起立不能となった後にも人工的に給餌して延命(約10日間)した事により PrP^{Sc}が中枢から遠心的に拡散する時間的な猶予が有ったことが理由として考えられる。vCJDで PrP^{Sc}の存在が認められている脾臓や扁桃などには PrP^{Sc}は認められなかった。これは、vCJDでは BSE プリオンに経口感染しているのに対して本実験では脳内接種により発症したサルの臓器を解析したことがその理由