

200833048A

厚生労働科学研究費補助金

—こころの健康科学研究事業—

プリオン病における免疫反応の解明とそれに
基づく診断・治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 片峰 茂

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

—こころの健康科学研究事業—

プリオン病における免疫反応の解明とそれ
に基づく診断・治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 片峰 茂

平成21(2009)年 3月

—目 次—

I. 総括研究報告	
プリオン病における免疫反応の解明とそれに基づく診断・治療法の開発 (長崎大学・学長) 片峰 茂	1
II. 分担研究報告	
1. 干渉の機構解明と予防・治療応用 (長崎大学・院・医歯薬総合・感染分子) 片峰 茂・西田教行	7
2. プリオン病患者における髄液中での免疫反応 (長崎大学・医歯附属病院・へき地病院再生機構) 調 漸	10
3. Lentivirus vectorを用いた抗プリオン抗体 single chain Fv の細胞内導入 (徳島大学・疾患酵素学研究センター・神経変性疾患) 坂口末廣	13
4. 組み換え型抗体作製とプリオン特異性判定に関する研究 (鹿児島大学・工学部・生体工学科) 杉村和久	16
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23
V. 班会議プログラム	97

總括研究報告

プリオン病における免疫反応の解明とそれに基づく診断・治療法の開発

総括責任者 片峰 茂 長崎大学・学長(前 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授)

研究要旨

前年度までに、プリオン持続感染細胞株では自然免疫系の機能が低下しており、RIGI-IRF3 シグナル伝達系の賦活化がプリオン持続感染細胞における異常型 PrP の発現を抑制できることを明らかにした。本年度では、プリオン感染と自然免疫系 IRF3 との関与についてより詳細に検討を行い、プリオン感染は I 型 IFN を誘導する転写因子 IRF3 の機能が宿主へのプリオン感染に重要な役割を果たしているという結果を得た。抗体治療を目指した研究計画については、前年度に引き続き、異常型 PrP に対して抑制作用を持つ抗 PrP 抗体 Sh3.9 についてのより実用化に向けた検討ならびにヒト抗体ファージライブラリーを用いた β シート構造の組み換えヒト PrP に特異的に結合する新たな scFv (ヒト単鎖抗体) の作製について詳細な検討を行った。Sh3.9 抗体由来の血液脳関門を通過させるために分子量を小さくした single chain Fv (Sh3.9scFv) については、抗プリオン活性について検討後、中枢へのデリバリーを目的としたマイクログリアに Sh3.9scFv を恒常発現する細胞の作製を行った。また、ヒト単鎖抗体については、ヒト PrP を特異的に認識する PRB7、30 の 2 つの候補抗体を同定し、リフォールディング、IgG サブタイプの抗体エンジニアリングについて検討した。さらに、ヒトプリオン病における抗体治療を目指す上で、早期診断法の確立は必須である。今日まで病態における確定的な早期診断のマーカーがないため、プリオン患者髄液中のサイトカインについて検討し、新たな早期診断のマーカーの探索について検討した。

A 研究目的

有効な臨床治療手段がないクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) をはじめとするプリオン病では、プリオン病分子機構の解明に基づく診断・治療法の開発が急務となっている。

本研究では、これまでほとんど顧みられないことのなかった免疫系を利用した新たなプリオン病予防・治療法の確立を目指し、具体的には自然免疫賦活物質と抗体の臨床応用へ向けた基盤を確立することを達成目的としている。

前年度に引き続き、本年度では以下の項目に焦点を置き、画期的な予防・治療方策について検討した

- (1) プリオン病原体における干渉の機構解明と予防・治療応用 (西田、片峰担当)。
- (2) プリオン病患者における髄液中

での免疫反応 (調担当)

- (3) Lentivirus vector を用いた抗プリオン抗体 single chain Fv の細胞内導入 (坂口担当)
- (4) 組み換え型抗体作製とプリオン特異性判定に関する研究 (杉村担当)

B 研究方法

- (1) 干渉の機構解明と予防・治療応用：プリオン持続感染細胞における各種自然免疫関連因子 (IRF3、TLR3、RIG-I) の遺伝子発現を特異的 RNAi にてノックダウンさせ、異常型 PrP の発現について検討した。また、I 型 IFN についても同様の検討を行った。さらに、IRF3 遺伝子欠損マウスに各種プリオン株を感染させ、バイオアッセイについて検討した。
- (2) プリオン病患者における髄液中での免疫反応：ヒトプリオン病における

髄液中のサイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , PGE2) について ELISA を用いて検討した。

(3) Lentivirus vector を用いた抗プリオン抗体 single chain Fv の細胞内導入: Sh3.9scFv-myc-IRES-hrGFP 遺伝子を lentivirus 発現 vector に挿入した construct を 293T 細胞に導入し、ウイルスが存在する培養上清を回収した。次に、Microglia へ Sh3.9scFv が挿入されたウイルスを感染させ、subcloning を行い、RT-PCR 法、Western blotting を用いて、Sh3.9scFv の発現について検討した。

(4) 組み換え型抗体作製とプリオン特異性判定に関する研究: PRB7 抗体の可変部領域と共に、ヒト末梢血リンパ球由来のイムノグロブリン H 鎖、L 鎖を挿入したベクターを構築し、高等動物および大腸菌における蛋白発現ならびに抗体の機能について検討した。特にヒト単鎖抗体 PRB7 については、組み換えヒトプリオン蛋白との結合能を解析後、タンパク分子の立体構造について原子間力顕微鏡、CD スペクトルを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、国の組換え実験指針ののっとり所属施設の許可のもとで行った。また、動物実験については、所属施設の許可のもと動物愛護に配慮して行った。プリオン感染実験は長崎大学に完備した BSL3 レベル実験室で行った。

C 研究結果

プリオン感染と自然免疫との関係における検討では、プリオン持続感染細胞において発現低下が特異的に認められる事、それらを過剰発現させることで異常型 PrP (PrP-res) を減少させることができることをすでに昨年度報告した。本研究では、RNAi を用いて MyD88 非依存的経路の自然免疫系シグナル分子 (IRF3、TLR3、RIG-I) の因子の発現をさらに抑制することで異常型 PrP が増加することを確認した。また非感染細胞にあらかじめ IRF3 恒常的過剰発現により、プリオ

ン感染に対して抵抗性であることを見だし、かつプリオン感染後、異常型 PrP の増加に伴いこれらの因子の発現が次第に抑制されていくことを見いだした。IRF3 欠損マウスに Fukuoka-1 感染、22L 感染実験を行ったところ、野生型マウスに比べ早く発症した。また、組織学的にも感染早期の脾臓における異常型 PrP の蓄積が強いことが観察された。すなわち、予想した通り、IRF3 を介する IFN 産生が、感染初期にはプリオンの感染、増殖をある程度抑制的に制御しているものと思われる。

プリオン病早期診断へのアプローチにおいて患者髄液中のサイトカインに着目した検討では、プリオン病患者において多発性硬化症 (MS)、脳炎・脳症などの他の疾患患者に比べ、IL-8 の発現だけが有意に高かったことより、プリオン病患者における新たな診断マーカーになりうると思われる。

抗体医療を目指した研究については、293T 細胞を用いて作製した Sh3.9scFv-myc-IRES-hrGFP 遺伝子を有する lentivirus は microglia 細胞への遺伝子導入が可能であり、subcloning によって樹立された細胞において Sh3.9scFv の mRNA の発現が確認された。しかし、培養上清中の Sh3.9scFv は、Western blot 法において検出できなかった。

また、大腸菌を用いて発現・精製した PRB7 単鎖抗体は、 β プリオン蛋白に特異的結合活性を示した。しかしながら、この発現系では、収量が極めて低いため、大腸菌の封入体に発現させる系を試みたが、リフォールディングに問題があったため大量発現した PRB7 抗体に抗体活性が認められなかった。新たに PRB7 のヒト IgG1、IgG2 および IgG3 への抗体エンジニアリングを行い発現系の確立を試みた結果、Cos7 細胞にて発現させた IgG3 に変換した PRB7 抗体に β 型プリオン蛋白への結合が認められたことより、今後、この PRB7 抗体の大量精製が可能になると考えられる。

D 考察

プリオン感染と自然免疫シグナル伝達系とは、密接な関係があると考えられ、I型IFNsは確かに異常PrPを減少させるがその効果は限定的である。すなわち、RIG-I-IRF3系の活性化による抗プリオン効果は、最終的には他の因子が関与している可能性があると考えられるため、今後、詳細なメカニズムについて追求する。

ヒトプリオン病患者における髄液中のサイトカインにおいて、ニューロン由来の炎症性サイトカインの発現は、ほとんど認められないが、アストロサイト・ミクログリア由来のサイトカイン(IL-8)の発現が著明に高かったこと、また、これまでのプリオン病の病理学的知見から、ヒトプリオン病患者のIL-8はアストロサイトの活性化と増生を示唆しているものと思われる。

Lentivirusを用いてSh3.9scFv遺伝子をmicrogliaに導入し、subcloningした細胞において、Sh3.9scFvの産生が、Western blottingでは検出限界以下であった。しかし、mRNAの発現は確認されたため、微量のSh3.9scFvが産生されていると示唆される。今後、この細胞がプリオン病の治療に有用であるか、in vitro及びin vivoで検証する。

SARSスパイクプロテインレセプターに結合する単鎖抗体とPRB7単鎖抗体とは、ホモロジーがある。このホモロジー抗体の結晶構造解析を基にして、ホモロジーモデリングを行った。プリオン蛋白の結合は、VH領域のCDRループが主に寄与していることが示唆された。また、PRB7の22番目と96番目、161番目と226番目のシステイン残基間でジスルフィド結合が形成されていることが示唆された。つまり、VL領域のシステイン残基のアミノ酸置換による分子間の架橋抑制が、抗体のリフォールディングに繋がると考えられる。近年、イムノグロブリンの定常部位が、抗体の特異性に影響することが報告されている。本研究によりPRB7のヒトIgG1、IgG2およびIgG3への抗体エンジニアリングの結果、H鎖お

よびL鎖の発現が認められた。今後、作製した組み換え型抗体とプリオン特異性を解析し、実用化に向けた検討を行う。

E 結論

1. MyD88非依存性自然免疫系因子はプリオン感染増殖に抑制的に作用し、その効果は限定的ではあるが、おそらくI型IFNsの産生を介するものと思われる。プリオンの持続感染成立に伴って自然免疫系因子の発現抑制が起こっていることより、プリオン感染には何か他の因子の関与があると考えられる。
2. ヒトプリオン病患者におけるヒトプリオン病の免疫系の反応の主役はアストロサイトであり、IL8が新たな診断のマーカーとなる可能性が示唆された。
3. Sh3.9scFv遺伝子を挿入したウイルスベクターを作製し、GFP陽性Ra2 microgliaの樹立に成功した。今後、Sh3.9scFvを大量に産生するmicrogliaクローンの樹立を行うと共に、プリオン感染マウスにおける治療効果を検証していく。
4. ヒトPrPを特異的に認識し、抗プリオン活性を有すると考えられるヒト単鎖抗体PRB7についてリフォールディング、IgGサブタイプの抗体エンジニアリングについて検討し、大量精製に向けての条件検討を確立した。

F. 研究発表

(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* Mar; 5(3):211-2, 2008
2. Daisuke Yoshikawa, Naohiro

Yamaguchi, Daisuke Ishibashi, Hitoki Yamanaka, Nobuhiko Okimura, Yoshitaka Yamaguchi, Tsuyoshi Mori, Hironori Miyata, Kazuto Shigemats, Sigeru Katamine, Suehiro Sakaguchi. Dominant-negative Effects of the N-terminal Half of Prion Protein on Neurotoxicity of Prion Protein-like Protein/Doppel in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(35). 2008.

3. Yuka Takakura, Naohiro Yamaguchi, Takehiro Nakagaki, Katsuya Satoh, Jun-ichi Kira, Noriyuki Nishida. Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377:957-961,2008

4. Sakaguchi S: Antagonistic roles of the N-terminal domain of prion protein to doppel. *Prion* 2(3), 107-111, 2008

5. Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, Sakudo A, Nakajima K, Ano Y, Sugiura K, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T: Cellular prion protein prevents brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice. *Archives of Virology* 153(6): 1007-1012, 2008.

6. Sakaguchi S: Recent development in therapeutics for prion diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 18(1): 35-59, 2008

(学会発表)

1. 中垣岳大、プリオン病における Tacrolimus の治療効果、第 33 回長崎感染症研究会、平成 21 年 2 月 28 日、長崎大学医学部 (良順会館)
2. 新 竜一郎、PMCA 法によるマウスプリオン株の高効率の増幅、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月 28 日、岡山コンベンションセンター
3. 布施隆行、異常型 PrP (PrPres) の感染性、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月 28 日、岡山コンベンションセンター
4. 中垣岳大、プリオン病における tacrolimus の治療効果、第 45 回日本ウイルス学会九州支部総会、平成 20 年 10 月 4 日、熊本大学医学部附属病院山崎記念会館
5. 石橋大輔、プリオン持続感染細胞におけるウイルス感染に対して働く自然免疫機構関連因子の関与、第 32 回長崎感染症研究会、平成 20 年 3 月 29 日、長崎大学医学部 (良順会館)
6. 松原岳大、異常型プリオン蛋白質による神経細胞変性死における mGluR1 の役割とプリオン蛋白質との相互作用、日本薬理学会年会、平成 21 年 3 月 16 日、パシフィコ横浜
7. 佐藤克也、調 漸、江口勝美:プリオン病患者脳脊髄液中診断マーカーの比較検討 日本神経学会総会横浜 2008. 05. 15-17
8. 六倉和生、佐藤克也、辻野 彰、本村政勝、調 漸、江口勝美:クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者における簡易診断キットの有効性 日本神経学会総会 横浜 2008. 05. 15-17

9. 坂口末廣 プリオン病におけるプリオン
蛋白の役割 シンポジウム「急性脳炎・脳症」
第 56 回日本ウイルス学会学術集会 岡山
岡山コンベンションセンター 2008,
10/26-28

10. 坂口末廣 「タンパク質・プリオン」 徳
島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
市民講座、日本農芸化学会中四国支部第 11
回市民フォーラム「なにをどれだけ食べるべ
きか？」-栄養素・食品の機能と安全性の科学
-徳島大学蔵本キャンパス臨床第 2 講堂
2008, 12/6

11. ヒト β プリオン蛋白特異的なヒト抗体の
確立の試み、第 31 回日本分子生物学会年会、
第 81 回日本生化学大会合同大会、2008 年 12
月、神戸

12. 全長プリオン遺伝子発現で作製した α 型
と β 型プリオンの電気泳動分離条件検討、第
31回日本分子生物学会年会、第81回日本生
化学大会合同大会、2008年12月、神戸

13. ヒト β プリオン蛋白特異的なヒト抗体と
直接検出法、プリオン研究会、2008年8月、北
海道

H. 知的所有権の出願・登録状況

ヒト抗プリオン抗体および該抗体フラグメン
ト、 PCT/JP2005/015121

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

干渉の機構解明と予防・治療応用

分担研究者：西田 教行 長崎大学医歯薬学総合研究科感染免疫学講座
研究協力者：石橋 大輔 長崎大学医歯薬学総合研究科感染免疫学講座

研究要旨

プリオン持続感染細胞における宿主自然免疫関連因子の解析を行い、TLR3, RIG-1, IRF3の発現が感染細胞で有意に低下していること、細胞への感染後の異常PrPの産生増加に伴いIRF3発現量が減少し、プリオン持続感染はIRF3経路の不活化を伴って成立することを見いだした。この減少が細胞クローンに於ける偶発的な事象ではなく、生体において認められるかを、IRF3欠損マウスを用いた感染実験にて検討した。IRF3欠損マウスではプリオンの潜伏期間が4週間ほど短縮し、特に末梢（脾臓）における異常プリオン蛋白の蓄積が早まることがわかった。これらのことから、MyD88非依存性自然免疫系因子がプリオン感染初期にプリオン増殖に対し抑制的に作用していること、そして宿主応答の抑制がプリオン持続感染にともなって起こることが明らかになった。さらに本研究において、少なくとも細胞培養系ではType I IFNsがプリオンの増殖を抑制しうることを見いだしたことより、今後In vivoでの詳細な検討を行う。

A. 研究目的

干渉現象における自然免疫系の関与を解明し、インターフェロンなど自然免疫賦活物質の抗プリオン効果を検討し臨床応用につなげる。

B. 研究方法

1. プリオン持続感染細胞における各種自然免疫関連因子（IRF3, TLR3, RIG-I）発現を特異的RNAiを用いてノックダウンし、プリオン増殖における作用を詳細に調べた。I型インターフェロンの抗プリオン効果を、持続感染細胞に於いて検討した。また前処理した非感染細胞に対するプリオン感染実験について検討した。

2. MyD88非依存的経路のシグナル分子の中心に位置するIRF3遺伝子のホモ欠損マウス（谷口ら）の分与を受け繁殖後、Fukuoka-1株、22L株、BSE株の感染実験を行った。コントロール群としてはC57Bl/6Jを用いた。

（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

MyD88 非依存的経路の自然免疫系シグナル分子 (IRF3, TLR3, RIG-I) の発現低下が持続感染細胞特異的に認められる事、それらを過剰発現させることで異常型 PrP (PrP-res) を減少させることができることをすでに昨年度報告した。今回 RNAi を用いてこれらの因子の発現をさらに抑制することで PrP-res が増加することを確認した。また非感染細胞にあらかじめ IRF3 の恒常的発現を高めておくと、プリオン感染をチャレンジした際、コントロール細胞と比し、少量の PrP-res が産生されることを見だし、かつ PrP-res の増加に伴いこれらの因子の発現が次第に抑制されていくことを見出した。IRF3 欠損マウスは Fukuoka-1 感染、22L 感染実験を行ったところ野生型マウスと比べ約 4 週間、早く発症し、組織学的には早期の脾臓 FDC への PrP-res の蓄積が強いことが観察された。すなわち、予想した通り、IRF3 を介する IFN 産生が、感染初期にはプリオンの感染、増殖をある程度抑制的に制御しているものと思われた。

D. 考察

I 型 IFNs は確かに異常 PrP を減少させるがその効果は限定的である。すなわち、RIG-I-IRF3 系の活性化による抗プリオン効果は最終的には他の因子が関与している可能性があると考えられるため、今後、詳細なメカニズムについてを追求する。また、我々はオートファジー活性化作用を認めるラバマイシン、タクロリムス等薬剤処理を行うと持続感染細胞にお

ける異常プリオン蛋白が減少することをすでに見いだしており、さらに近年の報告により自然免疫系の抑制とオートファジー機能阻害が関連している可能性が考えられる。そこで、感染成立早期の宿主遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイ解析し、特に自然免疫系関連因子とオートファジー系因子の発現変化を明らかにする。

F. 結論

1. MyD88 非依存性自然免疫系因子はプリオン感染増殖に抑制的に作用し、その効果はおそらく I 型 IFNs の産生を介するものと思われる。
2. プリオン抑制効果が限定的ではあるが、有意に作用していると言える。
3. プリオンの持続感染成立に伴って自然免疫系因子の発現抑制が起こっている。
4. I 型 IFNs は感染細胞に作用しプリオンの増殖を抑制する。

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* Mar; 5(3):211-2, 2008
2. Daisuke Yoshikawa, Naohiro Yamaguchi, Daisuke Ishibashi, Hitoki Yamanaka, Nobuhiko Okimura, Yoshitaka Yamaguchi, Tsuyoshi Mori,

Hironori Miyata, Kazuto Shigemats, Sigeru Katamine, Suehiro Sakaguchi, Dominant-negative Effects of the N-terminal Half of Prion Protein on Neurotoxicity of Prion Protein-like Protein/Doppel in Mice. The Journal of Biological Chemistry. 283(35). 2008.

3. Yuka Takakura, Naohiro Yamaguchi, Takehiro Nakagaki, Katsuya Satoh, Jun-ichi Kira, Noriyuki Nishida. Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection. Biochemical and Biophysical Research Communications 377:957-961, 2008

4. 山口尚宏、布施隆行、石橋大輔、新竜一郎、西田教行：ヒトのプリオン病の病態。最新医学（新興・再興感染症（前篇））3月号（77-96）2008

2. 学会発表

1. 中垣岳大、プリオン病における Tacrolimus の治療効果、第33回長崎感染症研究会、平成21年2月28日、長崎大学医学部（良順会館）
2. 新竜一郎、PMCA法によるマウスプリオン株の高効率の増幅、第56回日本ウイルス学

会学術集会、平成20年10月28日、岡山コンベンションセンター

3. 布施隆行、異常型 PrP (PrPres) の感染性、第56回日本ウイルス学会学術集会、平成20年10月28日、岡山コンベンションセンター

4. 中垣岳大、プリオン病における tacrolimus の治療効果、第45回日本ウイルス学会九州支部総会、平成20年10月4日、熊本大学医学部附属病院山崎記念会館

5. 石橋大輔、プリオン持続感染細胞におけるウイルス感染に対して働く自然免疫機構関連因子の関与、第32回長崎感染症研究会、平成20年3月29日、長崎大学医学部（良順会館）

6. 松原岳大、異常型プリオン蛋白質による神経細胞変性死における mGluR1 の役割とプリオン蛋白質との相互作用、日本薬理学会年会、平成21年3月16日、パシフィコ横浜

H. 知的財産の出願・登録状況

特許取得 なし

実用新案登録 なし

プリオン病患者における髄液中での免疫反応

研究分担者：長崎大学保健・医療推進センター 調 漸

研究協力者：長崎大学医歯薬研究科展開医療科学(第1内科) 佐藤克也

研究要旨

ヒトプリオン病では従来、免疫系の病態への関与はほとんどないと言われてきたが、脳内の病理学的な変化としてはニューロンの減少と共に活性化アストロサイトとミクログリアの増加がよく知られている。

現在までに髄液中のサイトカインについてはほとんど報告されておらず、ヒトプリオン病における免疫反応は未だ不明な点が多い。そこで今回、我々はプリオン病の病態への免疫系の関与を明らかにする目的で髄液中のサイトカインの検索を行った。サイトカインについては末梢血中でのリンパ球・単球系のサイトカインである IL-1 β 、IL-6、TNF- α に加えミクログリア・アストロサイトに関与するサイトカインとして IL-8、PGE2 についても検討を行った。その中で髄液中の IL-8 のみが他の疾患群と比べ有意に高かった。IL-8 はアストロサイト・ミクログリアに関連するサイトカインであり、ミクログリア由来のサイトカインは正常であることからヒトプリオン病の免疫系の反応はアストロサイトが関与している可能性が示唆された。

1. 研究目的

1992年村本らはT細胞ノックアウトマウスにプリオン感染株を脳内に接種して大きな変化はなかったと報告し、また、プリオン感染マウスに脾臓内の follicular dendritic cell (FDC) に異常プリオン蛋白が沈着することを証明した。一方、スイスのグループはプリオン病とB細胞系の免疫的な関与について報告している。

しかしながら、これまでにヒトプリオン病における免疫応答の関与はあまり研究されていない。今回我々はヒトプリオン病患者の髄液におけるサイトカインの検討を行ったので報告する。

2. 研究方法

脳内の免疫系の関与を証明するためにヒトプリオン病に対する髄液中のサイトカイン(IL-1 β 、IL-6、

IL-8、TNF- α (R&D 高感度 ELISA)、PGE2 について検討した。検体はプリオン病サーベイランス委員会を通して得られたプリオン病患者髄液と長崎大学医学部第一内科(神経内科)で得られた検体を厳格な匿名化の上、実験に供した。

(倫理面の配慮)

本研究は既に長崎大学倫理委員会の承認を得ており、長崎大学の倫理規程に準拠し、その内容に則って患者検体を全て匿名化して管理している。個人情報に関しては厳重に保管し、ことに患者情報ファイルは施錠できる書庫に保管しており、生命倫理的観点からも問題はない。

3. 研究結果及び考察

1. プリオン病患者では IL-1 β 、IL-6、TNF- α については感度以下であり、IL-8 については他の疾患に比べて有意 (P<0.05) に高かった。また多発性硬化症 (MS)、脳炎・脳症患者では IL-1 β 、IL-6、TNF- α については有意に高い (P<0.01)。IL-8 については多発性硬化症 (MS)、脳炎・脳症患者ではプリオン病に比べ有意に低い、正常対照群に比べ有意に高かった。

最後に髄液中の TNF- α 、PGE2 についてはすべての群 (CJD、MS、脳炎・脳症、正常対照群) において感度以下であった。

4. 考案

髄液中のサイトカインの測定結果では発症したヒトプリオン病患者ではニューロン由来の炎症性サイトカインはほとんど認められない。しかしながらアストロサイト・ミクログリア系のサイトカイン (IL-8) は著明に高く、一方ミクログリア系サイトカインとされる PGE2 は感度以下であった。IL-8 がミクログリア、アストロサイト双方から分泌される可能性があり、PGE2 はアストロサイトからの分泌能が知られていないことを考えると、ヒトプリオン病患者の IL-8 はアストロサイトの活性化と増生を示唆しているものと思われた。

5. 結論

ヒトプリオン病患者ではニューロン由来の炎症性サイトカインはほとんど認められず、アストロサイト・ミクログリア系のサイトカインは著明に高く、ミクログリア系サイトカイン由来の PGE2 は感度以下であることよりヒトプリオン病の免疫系の反応の主役はアストロサイトである可能性が示唆された。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表

1. 佐藤克也、調 漸、江口勝美プリオン病患者脳脊髄液中診断マーカーの比較検討 日本神経学会総会

横浜 2008. 05. 15-17

2. 六倉和生、佐藤克也、辻野 彰、本村政勝、調 漸、江口勝美 クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者における簡易診断キットの有効性 日本神経学会総会横浜 2008. 05. 15-17

2) 海外

口頭発表

なし

ポスター発表

1. Katsuya Satoh (First Department of Internal Medicine, Nagasaki University), Establishment of Standardization of 14-3-3 protein assay as a Diagnostic Tool in Creutzfeldt-Jakob disease patients' CSF NeuroPrion Spain. 2008 Oct 8-10

2. Yuki Matsui (Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University), Katsuya Satoh (First Department of Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University), The useful application of rapid diagnostic screening system of heart-type fatty acid binding protein in CSF of CJD patients as a quick bed-side diagnostic tool NeuroPrion Spain. 2008 Oct 8-10

原著論文による発表

1. Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T, Satoh K, Kira J, Nishida N

Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Dec 19; 377(3):957-61

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1) 特許取得: なし

2) 実用新案登録: なし

3) その他: なし

8. マスコミ等での報告

なし

表1. 各疾患群における髄液中のサイトカイン

	IL-1 β		IL-6		IL-8	
	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range
健康人	0.53 \pm 0.35	(0.2-1.6)	<1.6	(0-1.6)	1107 \pm 212	(9-15)
CJD	2.27 \pm 0.78	(1.3-3.6)	<1.6	(0-1.6)	2738 \pm 451	(21-35)
DAT	2.11 \pm 0.72	(1.2-2.8)	<1.6	(0-1.6)	1621 \pm 245	(12-20)
脳炎・髄膜炎	5.95 \pm 2.34	(3.2-10.2)	4.62 \pm 1.89	(2.7-6.6)	1971 \pm 616	(11-29)
MS	4.78 \pm 1.98	(2.1-9.6)	2.57 \pm 0.65	(0-3.8)	1857 \pm 1.89	(172-22)

括弧内は髄液中の測定値の最大値と最小値を示す

図1. 髄液中のIL-1 β

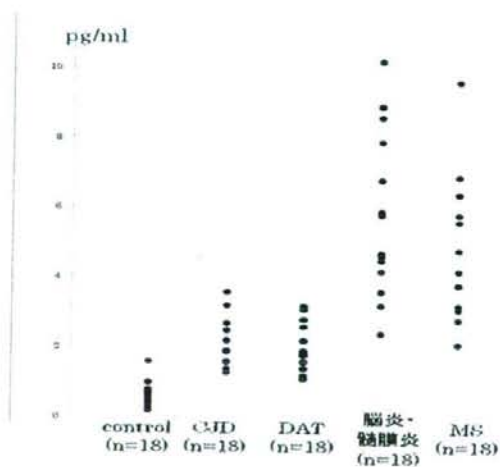


図2. 髄液中のIL-6

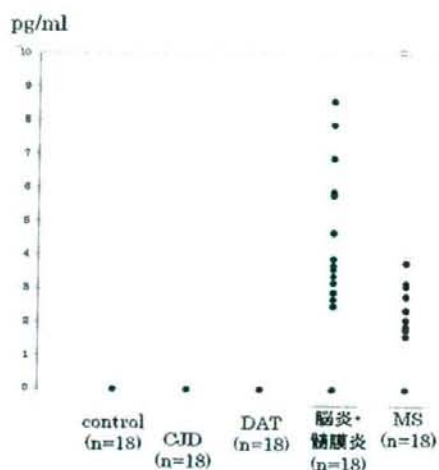
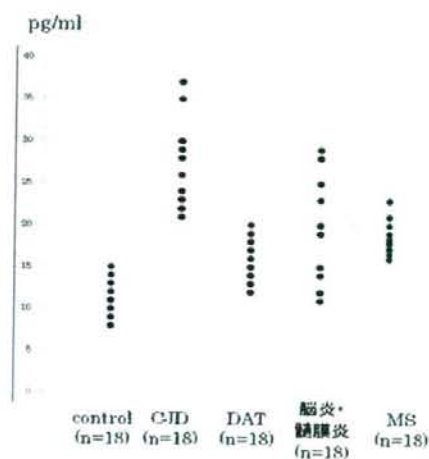


図3. 髄液中のIL-8



Lentivirus vector を用いた抗プリオン抗体 single chain Fv の細胞内導入

分担研究者：坂口 未廣 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：藤田 浩司 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

Sh3.9 抗プリオンモノクロナル抗体は、プリオン感染細胞の培養上清に混入すると抗プリオン活性を示し、異常プリオン蛋白の産生を抑制する。従って、Sh3.9 抗体はプリオン病の治療に有用であると考えられる。しかし、抗体は巨大分子であるために血液脳関門を通過できず、また脳室内に持続注入しても生命維持に重要な深部領域まで浸透できない可能性が高い。そこで前年度、より分子量の小さい Sh3.9 single chain Fv (Sh3.9scFv) を作製し、正常プリオン蛋白との結合能および抗プリオン活性を確認した。Sh3.9scFv の脳内デリバリーのための担体として、プリオン病の病変に集積する microglia が有用であると考えられた。そこで今年度、lentivirus vector によって Sh3.9scFv を microglia 細胞内に導入し、mRNA を発現する subclone を樹立した。今後、マウスへの投与による治療効果を検証する。

A. 研究目的

我々は、Sh3.9 抗プリオンモノクロナル抗体をプリオン感染マウスの脳室内に持続投与すると、脳内の異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) は減少するが、潜伏期間や生存期間は有意に延長しないことを見出した (未発表)。その理由として、抗体は分子量が大きいため生命維持等に重要な脳の深部領域まで効率よく浸透しなかったことが考えられた。そこで前年度、より分子量の小さい Sh3.9 抗体の single chain Fv (Sh3.9scFv) を作製し、正常プリオン蛋白 (PrP^C) との結合能および抗プリオン活性を確認した。

抗体をプリオン病の病変に効率よく到達させるには、抗体そのものに加えて、その投与方法にも改善が必要である。我々は、microglia が抗体の脳内デリバリーの担体

として有用な可能性があると考えた。その根拠は、プリオン病の病変には microglia が集積すること、また末梢から投与しても脳内へ侵入し長期間生着する microglia 株 (Ra2 および 6-3) が既に樹立されていること、である。そこで、lentivirus vector による Sh3.9scFv の microglia 細胞内導入を試みた。

B. 研究方法

1. Lentivirus vector の作製

Sh3.9scFv-myc-IRES-hrGFP 遺伝子を lentivirus 発現 vector に挿入した construct を作製し、293T 細胞に transfection した。24 時間後に培養上清を交換し Forskolin を添加、その 48 時間後に培養上清を回収した。

2. Microglia への遺伝子導入と subcloning

lentivirus を microglia (Ra2 および 6-3) 培養上清に添加して感染させたのち、限界希釈法にて subcloning を行った。

3. 抗体発現の検証

Subclone で得られた細胞について、mRNA の発現を RT-PCR 法にて検証した。培養した細胞の RNA を回収し、DNase I 処理を行い、SSIII RT 後、PCR を行った。陰性対照には original の Ra2 株を用いた。さらに、Sh3.9scFv 自体の発現を Western blotting (一次抗体、抗 myc 抗体; 二次抗体、抗 mouse-IgG HRP) で検出した。

(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

1. 293T 細胞を用いて作製した lentivirus は細胞への遺伝子導入を可能にする

作製した Sh3.9scFv-myc-IRES-hrGFP 遺伝子を有する lentivirus を、293T 細胞または microglia に感染させると、多数の細胞が GFP を発現した。すなわち、293T 細胞を用いて作製した lentivirus は細胞への遺伝子導入を可能にすることが示された。

2. GFP 陽性 microglia の subcloning

Sh3.9scFv-myc-IRES-hrGFP 遺伝子を有する lentivirus を microglia (Ra2 および 6-3) に感染させると、多数の細胞が GFP

を発現した。しかし限界希釈後は GFP 陽性細胞が減少した。最終的に、GFP 陽性 Ra2 の 1 クローン を樹立した (図 1)。

3. Subcloning で得られた microglia は Sh3.9scFv の mRNA を発現する

GFP 陽性 Ra2 株は、IRES-hrGFP の上流に Sh3.9scFv 遺伝子を有している。そこで Sh3.9scFv の mRNA が発現しているか検証するために、RT-PCR を行った。その結果、GFP 陽性 Ra2 株において Sh3.9scFv の mRNA を認め、陰性対照では認めなかった (図 2)。次に、GFP 陽性 Ra2 株の細胞融解液および培養上清を Western blotting に供し、Sh3.9scFv の検出を試みた。しかし、Sh3.9scFv は検出できなかった。

D. 考察

本研究では、Sh3.9scFv-myc-IRES-hrGFP 遺伝子を有する lentivirus を用いて抗プリオンモノクロナル抗体 Sh3.9scFv 遺伝子を microglia に導入し、subcloning を行った。その結果、GFP 陽性 Ra2 の 1 クローンを樹立した。この細胞を RT-PCR に供すると、Sh3.9scFv mRNA に相当するシグナルが検出できた。しかし、Western blotting では、Sh3.9scFv の産生を検出することができなかった。つまりこれらの結果は、GFP 陽性 Ra2 は Western blotting で検出できないくらいの Sh3.9scFv しか産生していないことを示した。今後、この GFP 陽性 Ra2 がプリオン病の治療に有用であるか、in vitro 及び in vivo で検証する。

E. 結論

Sh3.9scFv-IRES-GFP lentivirus vector

を作製し、GFP 陽性 Ra2 microglia の 1 クロンの樹立に成功した。今後、Sh3.9scFv を大量に産生する microglia クロンの樹立を行うと共に、プリオン感染マウスにおける治療効果を検証していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakaguchi S: Antagonistic roles of the N-terminal domain of prion protein to doppel. *Prion* 2(3), 107-111, 2008
2. Yoshikawa D, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Okimura N, Yamaguchi Y, Mori T, Miyata H, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S: Dominant-negative effects of the amino-terminal half of prion protein on neurotoxicity of PrP-like protein/doppel in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35): 24202-11, 2008.
3. Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, Sakudo A, Nakajima K, Ano Y, Sugiura K, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T: Cellular prion protein prevents brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice. *Archives of Virology* 153(6): 1007-1012, 2008.

4. Sakaguchi S: Recent development in therapeutics for prion diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 18(1): 35-59, 2008

2. 学会発表

1. 坂口末廣 プリオン病におけるプリオン蛋白の役割 シンポジウム「急性脳炎・脳症」第 56 回日本ウイルス学会学術集会 岡山岡山コンベンションセンター 2008, 10/26-28
2. 坂口末廣 「タンパク質・プリオン」 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部市民講座、日本農芸化学会中四国支部第 11 回市民フォーラム「なにをどれだけ食べるべきか？」—栄養素・食品の機能と安全性の科学—徳島大学蔵本キャンパス臨床第 2 講堂 2008, 12/6

G. 知的財産の出願・登録状況

特許取得 なし
実用新案登録 なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

組み換え型抗体作製とプリオン特異性判定に関する研究

分担研究者：杉村 和久（鹿児島大学工学部生体工学科）

研究協力者：橋口周平（鹿児島大学工学部生体工学科）

研究要旨： β シート構造のプリオン蛋白に特異的に結合するヒト単鎖抗体（PRB7, PRB30）は、プリオン蛋白の立体構造を認識する。大量のタンパク質を必要とするX線結晶構造解析等の構造解析を行うため、今年度は、1) PRB7 単鎖抗体の大量精製と不溶性で発現した単鎖抗体のリフォールディング、2) PRB7 のヒト IgG1, IgG2 および IgG3 への抗体エンジニアリングを行い発現系の確立を試みた。

A. 研究目的

本研究では、組み換えヒトプリオン蛋白を試験管内でフォールディングさせ、正常型プリオン蛋白質（PrP^C）と病原性構造異性体（PrP^{Sc}）の類似プリオン蛋白質を作製し、これらの分子にヒト抗体ファージライブラリを直接反応させ、1) 正常型プリオン蛋白質（PrP^C）と病原性構造異性体（PrP^{Sc}）を識別するヒト抗体を確立すること、2) これらの抗体を用いて、PrP^{Sc}をELISA、イムノプロットティング法により直接同定、検出、定

量する方法を確立すること、3) ヒト抗体医薬としての可能性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ヒト末梢血リンパ球から単離した mRNA を用いて、イムノグロブリンの H 鎖については、IgG1, IgG2 および IgG3 の定常領域遺伝子を、L 鎖については、 κ 鎖の定常領域遺伝子をクローニングしカセットベクターを構築した。このベクターに、PRB7 抗体遺伝子の可変部領