

細胞質型 PrP^C による神経細胞死機構の解明

研究分担者：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

ミトコンドリアが関与する正常型プリオンタンパク質(PrP^C)依存性の神経細胞死にかかわる様々な因子を同定し、その機序を解明した。(1)PrP^Cによるアポトーシスに際し、PrP^Cがミトコンドリアへ異所性に輸送されるが、それにはPrP^Cが通常輸送される小胞体の輸送系から外れて細胞質に漏出し、されにそれをミトコンドリアへと輸送する際には、細胞質因子としての14-3-3タンパク質が必須であること、(2)ミトコンドリア外膜上のPrP^C受容体として、70kDaの分子が関わること、(3)PrP^Cがミトコンドリア内へ入ったのち、PrP^Cの特定のアミノ酸配列が、特異的にミトコンドリアの呼吸鎖複合体IVに含まれる酵素を阻害し電子伝達系を停止させ、結果的に神経細胞死に導くこと、を見出した。ここで解析された結果は、プリオン病あるいはPrP^Cとミトコンドリアとの関連についての新しい知見を提示すると考えられる。

A. 研究目的

合成された細胞内のタンパク質が本来の機能を発揮するためには、適切なコンパートメントに適切なタイムスケールで輸送される必要がある。細胞内輸送のシステムは大きく分けて、1. 小胞体で合成されゴルジ体を経て、細胞膜上もしくは細胞外に分泌される分泌タンパク質の輸送系、2. 細胞質で合成されてから、輸送因子によって目的のオルガネラへと運ばれる細胞質の輸送系、の二つが知られている。2のシステムには、ミトコンドリアやペルオキシソームなどのオルガネラが関わっている。これら二つの輸送系は、各々独立したシステムで、それぞれに特異的な細胞質の輸送因子や、膜透過チャネルなどが秩序だてて機能しており、例えば分泌タンパク質は分泌系の輸送システムへ、ミトコンドリアタンパク質はミトコンドリアの輸送システムへと振り分けられ運ばれていく¹⁻³⁾。

正常型プリオンタンパク質(PrP^C)は典型

的な分泌タンパク質で、ミトコンドリアへの輸送系と接点はないと考えられてきた反面、プリオン病やPrP^Cのoverexpression syndromeにおける神経細胞死のみならず、プリオン感染にもミトコンドリアが関与することを推測させる報告も認められる^{4,5)}。今回我々は、この過程にかかわる様々な因子を同定し、その機序を解明することを目的とした研究を行った。

B. 研究方法

PrP^C過剰発現マウスで確認された、ミトコンドリアとPrP^Cが関与する神経細胞死機構を解析するために、まず、マウス由来N2a細胞を用いて再構成系を構築した。次に、この系を用いて、蛍光抗体法によりPrP^Cの局在を解析し、免疫沈降法や試験管内輸入実験によりPrP^Cのミトコンドリアへの輸送にかかわる因子群を同定した。さらに、PrP^Cが局在しているミトコンドリアを単離後、遠心分

画法、免疫電顕法およびミトコンドリア呼吸活性の測定により、PrP^Cが直接ミトコンドリア呼吸鎖複合体と相互作用していることを確認した。

(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

我々は、主に培養細胞を用いて、ミトコンドリアが関与する PrP^C 依存性の神経細胞死を再構成し、この過程にかかわる様々な因子を同定し、その機序を解明した。すなわち、(1) PrP^C によるアポトーシスに際し、PrP^C がミトコンドリアへ異所性に輸送されるが、それには PrP^C が通常輸送される小胞体の輸送系から外れて細胞質に漏出し、されにそれをミトコンドリアへと輸送する際には、細胞質因子としての 14-3-3 タンパク質が必須であること、(2) ミトコンドリア外膜上の PrP^C 受容体として、70kDa の分子が関わること、(3) PrP^C がミトコンドリア内へ入ったのち、PrP^C の特定のアミノ酸配列が、特異的にミトコンドリアの呼吸鎖複合体 IV に含まれる酵素を阻害し電子伝達系を停止させ、結果的に神経細胞死に導くこと、に要約される。

D. 考察

ここで解析された結果は、プリオン病あるいは PrP^C とミトコンドリアとの関連についての新しい知見を提示するのみならず、「オルガネラごとに正確に振り分けられる細胞内輸送系」という従来の概念に対し、新しい視点を提示するものであると考えられる。

E. 結論

ミトコンドリアが関与する PrP^C 依存性の

神経細胞死を再構成し、この過程にかかわる様々な因子を同定し、その機序を解明した。

[参考文献]

- 1) Hachiya N, Alam R, Sakasegawa Y, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *Embo J.* 12(4) : 1579-86, 1993
- 2) Hachiya N, Komiya T, Alam R, Iwahashi J, Sakaguchi M, Omura T, Mihara K. MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *Embo J.* 13(21) : 5146-54, 1994
- 3) Hachiya N, Mihara K, Suda K, Horst M, Schatz G, Lithgow T. Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature.* 376(6542) : 705-9, 1995
- 4) Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. *Neurosci Lett.* 374(2) : 98-103, 2005
- 5) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 327(3) : 894-9, 2005

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2008/4/1~2009/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Omi K, Hachiya NS, Tanaka M, Tokunaga K, Kaneko K. 14-3-3zeta is indispensable for aggregate formation of polyglutamine-expanded huntingtin protein. *Neurosci Lett.* 431 : 45-50, 2008
- 2) Hachiya NS, Kozuka Y, Kaneko K. Mechanical stress and formation of protein aggregates in neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses.* 70(5) : 1034-7, 2008
- 3) Ogasawara D, Hachiya NS, Kaneko K, Sode K, Ikebukuro K. Detection system based on the conformational change in an aptamer and its application to simple bound/free separation. *Biosens Bioelectron.* 24(5) : 1372-6, 2009

2. 学会発表

- 1) Hachiya NS, Nishijima K, Kaneko K. A novel strategy for cell biology with the fluoro-laser microdissection system (F-LMD). 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, 2008.12.13-17
- 2) 八谷如美, 田中真由美, 今川美登里, 西島佳奈, 小塚芳道, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質(PrPC)の細胞内輸送異常で生じる凝集体形成機構(1). 2008年プリオン研究会. 旭川, 2008.8.29-30

- 3) 西島佳奈, 八谷如美, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質(PrPC)の細胞内輸送異常で生じる凝集体形成機構(2). 2008年プリオン研究会. 旭川, 2008.8.29-30

- 4) 西島佳奈, 田中真由美, 今川美登里, 小塚芳道, 八谷如美, 金子清俊. レーザーダイセクションシステムおよび蛋白質解きほぐし分子 Unfoldin/Aip2p 多量体を用いた Pick 小体構成成分の網羅的解析. 第31回日本分子生物学会第81回日本生化学会合同大会. 神戸, 2008.12.9-12
- 5) 田中真由美, 八谷如美, 西島佳奈, 小塚芳道, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質(PrPC)の細胞内輸送異常で生じる凝集体形成機構(1). 第31回日本分子生物学会第81回日本生化学会合同大会. 神戸, 2008.12.9-12
- 6) 八谷如美, 田中真由美, 今川美登里, 小川ひとみ, 西島佳奈, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質(PrPC)の細胞内輸送異常で生じる凝集体形成機構(2). 第31回日本分子生物学会第81回日本生化学会合同大会. 神戸, 2008.12.9-12

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 生細胞・生細胞内の構造物等の単離及び採取方法. 日本 patent 出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン病における酸化ストレス関与に関する研究

研究分担者：作道 章一 大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫

研究協力者：小野寺 節 東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫

研究協力者：生田 和良 大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫

研究要旨

本研究では、(I)新しいプリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損細胞の作製と(II)マウスへのプリオン感染時の酸化ストレスマーカー変化について解析を行った。これまでに我々はPrP 遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株(HpL)を樹立し、このHpLが無血清培地下においてアポトーシスを起こすと同時に、PrP 遺伝子の再導入により細胞内 Superoxide dismutase(SOD)活性上昇およびアポトーシス抑制が観察されることを報告してきた。正常型 PrP(PrP^C)は神経細胞に最も高い発現が見られるが、脳のグリア細胞にも高く発現していることが知られている。そこで、本研究では、PrP 遺伝子欠損マウス(Zrch1)から、SV40 large T 抗原遺伝子をもちいた不死化により、PrP 遺伝子欠損アストログリア細胞株(GpL)を作製し、その無血清培地下での性状解析を行った。その結果、GpL は血清除去により細胞死を起こし、PrP 遺伝子の再導入により細胞死の程度が緩和された。また、PrP 遺伝子の再導入は GpL の SOD 活性を上昇させることが明らかとなった。したがって、HpLおよびGpLを用いたこれらの結果から、PrP^Cは神経細胞においてだけでなく、アストログリアにおいても酸化ストレス制御に関わっていることが示唆された。さらに、最近の研究報告では、プリオン感染時の脳内では異常型 PrP(PrP^{Sc})の増加と PrP^Cの減少が生じていることが示されつつあり、これにより脳内の酸化ストレス動態が変化することが考えられることから、次に、マウスへのプリオン感染時の脳内酸化ストレス動態の解析を行った。その結果、DNA 酸化損傷、脂質酸化損傷、蛋白質酸化損傷のいずれの酸化ストレスマーカーについても、プリオン感染により増加していることが明らかとなった。以上の結果から、PrP^Cは脳内において酸化ストレス制御に重要な役割を果たしているとともに、プリオン感染時にはその機能の破綻が生じていることが考えられた。

A. 研究目的

正常型プリオン蛋白質(PrP^C)の機能は明らかになっていない。これまでに我々はプリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株(HpL)を樹立し、このHpLが無血清培地下においてアポトーシスを起こすと同時に、PrP 遺伝子の再導入により酸化ストレス活性が上昇しアポトーシス抑制が観察されることを報告してきた^{1,2)}。PrP^Cは神経細胞

に最も高い発現が見られるが、脳のグリア細胞にも高く発現していることが知られている。そこで、本研究では、PrP 遺伝子欠損マウスから、PrP 遺伝子欠損アストログリア細胞株(GpL)を作製し、性状解析を行った³⁾。加えて、プリオン感染動物の酸化ストレス状態の解析も行った。これらの解析から、プリオン病発症および PrP 機能発現メカニズムにおける酸化ストレス代謝の関与について検討を行った。

B. 研究方法

PrP 遺伝子欠損マウス (Zrch1) から、SV40 large T 抗原遺伝子をもちいた不死化により、PrP 遺伝子欠損アストログリア細胞株 (GpL) を作製し、その無血清培地下での性状解析を行った。また、プリオン感染マウスの組織を経時的に回収し、DNA 酸化損傷、脂質酸化損傷、蛋白質酸化損傷の観点から酸化ストレスマーカーの解析を行った。

(倫理面への配慮)

プリオン感染サンプルは大阪大学微生物病研究所バイオセイフティー委員会の規定、DNA 実験は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 (カルタヘナ法) および大阪大学組換え DNA 実験実施規則に従い行った。動物実験は微生物病研究所動物委員会の規定に従い行った。

C. 研究結果

GpL は glial fibrillary acidic protein (GFAP) を発現する一方、microtubule-associated protein 2 (MAP2) や neurofilament (NF)-H,M,L を発現しておらず、アストログリア様細胞であることが明らかとなった (図 1)。GpL は血清除去により細胞死を起し、PrP 遺伝子の再導入により細胞死の程度が緩和された (図 2)。また、PrP 遺伝子の再導入は GpL の superoxide dismutase (SOD) 活性を上昇させることが明らかとなった (図 2)。さらに、マウスへのプリオン感染時の脳内酸化ストレス動態解析の結果、DNA 酸化損傷マーカー (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine : 8-OHdG)、脂質酸化損傷マーカー (4-Hydroxy-2-nonenal : 4-HNE ; hexanoyl-lysine : HEL)、蛋白質酸化損傷マーカー (dityrosine : DT ; Methylglyoxal : MG) のいずれの酸化ストレスマーカーについても、プリオン感染により増加しているこ

とが明らかとなった。

D. 考察

GpL を用いたこれらの結果から、PrP^C は神経細胞においてだけでなく、アストログリアにおいても酸化ストレス制御に関わっていることが示唆された。さらに、プリオン感染脳において酸化ストレスマーカーの上昇が見られたことから、PrP^C は脳内において酸化ストレス制御に重要な役割を果たしているとともに、プリオン感染時にはその機能の破綻が生じていることが考えられた。

E. 結論

最近の研究報告では、プリオン感染時の脳内では異常型 PrP (PrP^{Sc}) の増加と PrP^C の減少が生じていることが示されつつあり、これにより脳内の酸化ストレス動態が変化することが考えられる⁴⁾。

[参考文献]

- 1) 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*. 400 : 225-226, 1999
- 2) Sakudo A, Onodera T, Sukanuma Y, Kobayashi T, Saeki K, Ikuta K. Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini-Rev Med Chem*. 6 : 589-601, 2006
- 3) Nishimura T, Sakudo A, Xue G, Ikuta K, Yukawa M, Sugiura K, Onodera T. Establishment of a new glial cell line from hippocampus of prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 377 : 1047-1050, 2008
- 4) Sakudo A, Ikuta K. Prion protein

functions and dysfunction in prion diseases. *Curr Med Chem.* 16 : 380-389, 2009

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2008/4/1~2009/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Nishimura T, Sakudo A, Xue G, Ikuta K, Yukawa M, Sugiura K, Onodera T. Establishment of a new glial cell line from hippocampus of prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 377 : 1047-1050, 2008
- 2) Hosokawa T, Ono F, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Zanusso G, Takahashi H, Sata T, Sakudo A, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Yoshikawa Y, Onodera T. Distinct immunohistochemical localization in Kuru plaques using novel anti-prion protein antibodies. *Microbiol Immunol.* 52 : 25-29, 2008
- 3) Hosokawa T, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Tagawa Y, Kimura KM, Nakamura I, Wu G, Sakudo A, Casalone C, Mazza M, Caramelli M, Takahashi H, Sata T, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Onodera T. A monoclonal antibody (1D12) defines novel distribution patterns of prion protein (PrP) as granules in nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 366 : 657-663, 2008
- 4) 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. *Arch Virol.* 153 : 1007-1012, 2008

- 5) Sakudo A, Onodera T, Ikuta K. PrPSc level and incubation time in a transgenic mouse model expressing Borna disease virus phosphoprotein after intracerebral prion infection. *Neurosci Lett.* 431 : 81-85, 2008
 - 6) Sakudo A, Ikuta K. Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. *Curr Med Chem.* 16 : 380-389, 2009
 - 7) Sakudo A, Ikuta K. Fundamentals of prion diseases and their involvement in the loss of function of cellular prion protein. *Protein Pept Lett.* 16, 2009 (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) 作道章一, 阿野泰久, 小林孝徳, 小野寺節, 生田和良. 可視・近赤外分光法によるマウススクレーパー感染病態解析. 第146回日本獣医学会学術集会. 宮崎, 2008.9.24-26
 - 2) 阿野泰久, 作道章一, 梶村佳史, 生田和良, 小野寺節, スクレーパー感染マウス脳における酸化ストレス障害. 第147回日本獣医学会学術集会. 栃木, 2009.4.2-4
 - 3) Ano Y, Sakudo A, He XJ, Sato Y, Yukawa M, Ikuta K, Yokoyama T, Nakayama H, Onodera T. DNA damage through oxidative stresses in the prion-infected mouse brain. The 14th International Congress of Virology, Istanbul. Turkey, 2008.8.10-15
 - 4) Ano Y, Nakayama H, Sato Y, Sakudo A, Manabe N, Yukawa M, Onodera T. Uptake of amyloid protein in the murine and bovine intestines before and after weaning : a model for the

enteric invasion of infectious prion protein. Prion 2008. Madrid, 2008.10.8-10

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

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

GpLはアストログリア細胞のマーカーを発現している

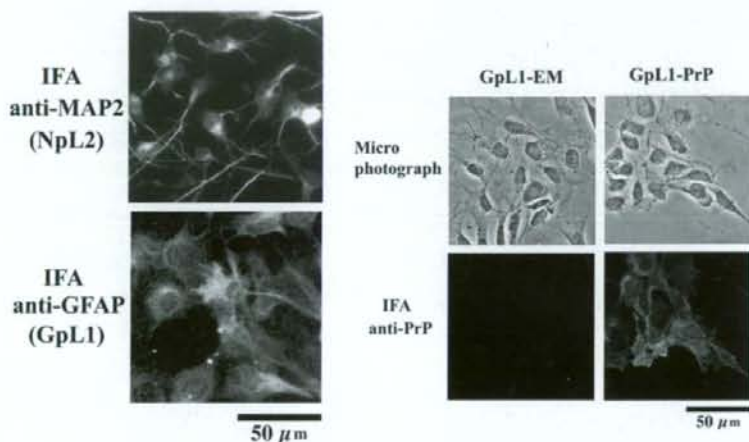


図 1

PrPはアストログリア細胞においても生存維持に寄与している(抗酸化ストレス)

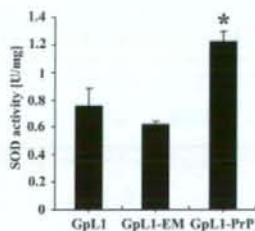
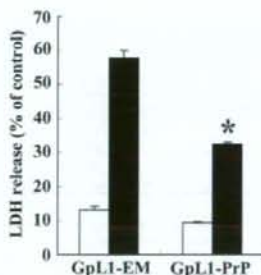
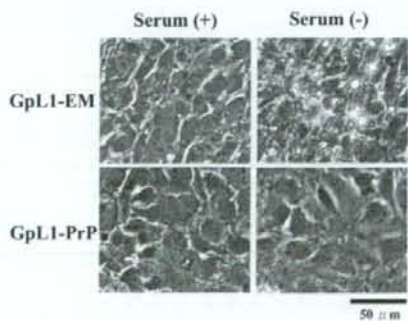


図 2

プリオン蛋白の過剰発現と細胞死

研究分担者：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：松田 真実 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

我々は、培養細胞 HEK293T に正常プリオン蛋白 (PrP^C) を過剰発現させると著明なアポトーシスが誘導され、HEK293T 細胞が死に至ることを見出した。興味深いことに、PrP^Δ25-50 は全長 PrP^C と同様な細胞毒性を示したが、オクタペプチドリピート領域 (OR) を欠損する PrP^Δ23-88 及び PrP^Δ51-90 の細胞毒性は低下していた。また、細胞膜結合領域を欠いた PrP^ΔGPI は細胞毒性を示さなかった。さらに我々は、PrP^C の過剰発現が p38 MAP キナーゼのリン酸化を促進し、p38 MAP キナーゼの阻害剤が PrP^C の過剰発現による細胞死を抑制することも見出した。つまりこれらの結果は、細胞膜に結合した PrP^C が過剰発現すると、p38 MAP キナーゼが活性化され、細胞死が誘導されることを示した。また、OR は PrP^C の細胞毒性を調節している可能性が考えられた。

A. 研究目的

プリオン病は、神経細胞に発現する正常プリオン蛋白 (PrP^C) が異常プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) に変化することにより起こる疾患である。実際我々は、PrP^C 欠損 (PrP^{-/-}) マウスがプリオンに感染せずプリオン病を発症しないことを明らかにした¹⁾。しかし、PrP^C から PrP^{Sc} への構造変換がどのようにプリオン病の病態形成に関与するのか、詳細なメカニズムは不明である。PrP^C から PrP^{Sc} への構造変換は、PrP^{Sc} の過剰な脳内蓄積をもたらす。従って、蓄積した PrP^{Sc} が細胞毒性に作用する可能性が示唆されている。

今回我々は、ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞に PrP^C を過剰発現させたところ、顕著なアポトーシスによる細胞死が誘導されるという興味深い現象を見出した。これらの結果は、PrP^{Sc} の過剰産生が PrP^C の過剰発現による細胞死シグナルと同様な細胞死シグナルを産生し、神経細胞死を起こしている可能性を示唆

しているのかもしれない。本研究では、PrP^C 過剰発現による細胞死のメカニズムについて解析した。

B. 研究方法

1. 細胞毒性の検出

全長 PrP^C 及び変異 PrP をコードする DNA 断片を PCR 法により増幅した後、発現ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen) に挿入し、それぞれの発現プラスミドを作製した。これらのプラスミドを HEK293T 細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションし、48 時間後に生細胞数をカウントし、細胞毒性を評価した。p38 キナーゼ阻害剤 (PD169316, Calbiochem) は、トランスフェクション 30 分後から 48 時間培養上清に添加し、生細胞数をカウントした。

2. ウェスタン・ブロッティング

トランスフェクション 48 時間後の HEK 293T 細胞を細胞溶解液 (0.5% Triton X-100,

0.5% Sodium deoxycholic acid, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.5)にて溶解した後、抗 PrP SAF32 抗体(SPIbio)、anti-p38 抗体(Cell Signaling)、及び anti-phospho p38 抗体(Cell Signaling)を用いて、ウェスタン・ブロッティングを行った。

(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

我々は、HEK293T 細胞に PrP^C 発現ベクターをトランスフェクションしたところ、ベクターのみを導入したコントロールの HEK293 細胞と比べて、24 時間以内に著明な細胞死がもたらされ、細胞数が極端に減少していることを見出した(図 1A)。実際に、トランスフェクション 48 時間後に、それぞれの細胞をトリパンブルーで染色し生細胞数を比較した結果、PrP^C を過剰発現させた細胞の生細胞数が、コントロールに対して 60% 近く減少していた(図 1B)。次に、トランスフェクション 48 時間後に、蛍光標識したアネキシン V を用いてアポトーシス細胞をフローサイトメーターで検出した。その結果、アネキシン V 陽性細胞がコントロールでは 2.90%(M1 領域)に対して、PrP をトランスフェクションした細胞では 15.98% と高値であった(図 2)。これらの結果は、PrP^C 過剰発現により誘導される細胞死がアポトーシスによるものであることを示した。

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーの一つである p38 キナーゼは、アポトーシス・シグナルに関連した分

子である²⁾。興味深いことに、PrP^C を過剰発現させた細胞ではコントロールに比べて p38 のリン酸化レベルが増加していた(図 3A)。また、PrP^C の過剰発現による細胞死が、p38 キナーゼ阻害剤(PD169316) 処理によって抑制された(図 3B)。これらの結果は、PrP^C の過剰発現による細胞死に、p38 キナーゼが関与することを示唆した。

我々は、N 末領域に欠損を有する 3 つの異なる欠損変異 PrP(PrP Δ 25-50, PrP Δ 51-90, PrP Δ 23-88) を作製した。OR 領域を欠損させた PrP Δ 51-90 と OR 領域の大部分を欠損させた PrP Δ 23-88 では、全長 PrP^C による細胞死と比べて、細胞死の程度が抑制された(図 4)。一方、OR 領域を有する PrP Δ 25-50 は、野生型 PrP^C と同様に、細胞死を誘導した(図 4)。これらの結果は、PrP^C の過剰発現による細胞死に OR 領域が重要な役割を担っていることを示した。また、C 末領域の GPI アンカーシグナル領域を欠損する PrP Δ GPI は細胞死を誘導できなかった(図 4)。

D. 考察

本研究において、我々は、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞に PrP^C を過剰発現させると、著明なアポトーシスが誘導され、HEK293T 細胞は細胞死をきたすことを見出した。また我々は、GPI アンカーを欠損する PrP Δ GPI が細胞死を誘導しないことを明らかにした。この結果は、PrP^C の過剰発現により誘導される細胞死には、PrP^C が GPI アンカーを介して細胞膜に結合することが重要である可能性を示した。さらに OR 領域を完全に欠いた PrP Δ 51-90 や OR 領域の大部分を欠いた PrP Δ 23-88 の細胞毒性は、全長の PrP^C と比べて、低下していたが、OR 領域を有する PrP Δ 25-50 は全長の PrP^C と同様に強い細胞毒性を示した。これらの結果は、OR 領域が PrP^C の過剰発現による細胞毒性を調節する機能を有する可能性を示した。

我々は、PrP^Cの過剰発現により p38 キナーゼのリン酸化が増強されること、p38 キナーゼの阻害剤により PrP^Cの過剰発現による細胞死が抑制されることを明らかにした。p38 キナーゼは、物理化学的ストレスに反応し活性化され、アポトーシスを引き起こすことが知られている²⁾。つまりこれらの結果は、PrP^Cの過剰発現により、何らかのストレスがもたらされ、その結果 p38 キナーゼが活性化され細胞死がもたらされる可能性を示した。

プリオン病の神経細胞死には、PrP^Cが PrP^{Sc}へ変換することが必須である。PrP^Cが PrP^{Sc}へと構成的に変換すると、PrP^{Sc}が過剰に産生される。従って、PrP^{Sc}の過剰産生が神経細胞死をきたすと考えられる。しかし、PrP^{Sc}がどのような細胞死のシグナルを産生するのか、不明である。今回我々は、PrP^Cを過剰発現させると、HEK293T 細胞が p38 キナーゼの活性化を介して細胞死を起こすことを見出した。興味深いことに、p38 キナーゼがプリオン感染ハムスター脳で活性化されていることが報告されている³⁾。つまりこの結果は、PrP^Cの過剰発現による細胞死と PrP^{Sc}の過剰産生による細胞死が、同様なメカニズムを介して起こっている可能性を示唆している。従って、PrP^Cの過剰発現による細胞死のメカニズムを解明することは、プリオン病の神経細胞死のメカニズムの解明に重要であるかもしれない。

E. 結論

HEK293T 細胞における PrP^Cの過剰発現は、p38 MAP キナーゼの活性化を通してアポトーシスを誘導し細胞死をきたす。OR 領域は、PrP^Cの細胞毒性を調節している。

[参考文献]

- 1) Sakaguchi S, Katamine S, Shigematsu K, Nakatani A, Moriuchi R, Nishida N, Kurokawa K, Nakaoka R, Sato H,

Jishage K, Kuno J, Noda T, Miyamoto T. Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol* 69 : 7586-92, 1995

- 2) Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298 : 1911-2, 2002.
- 3) Lee HP, Jun YC, Choi JK, Kim JI, Carp RI, Kim YS. Activation of mitogen-activated protein kinases in hamster brains infected with 263K scrapie agent. *J Neurochem* 95 : 584-93, 2005

F. 健康危険情報

なし。

G. 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) Sakaguchi S. Prospects for Preventative Vaccines against Prion Diseases. *Protein and Peptide Letters (in press)*
- 4) 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

2) 坂口末廣. 「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—: タンパク質・プリオン. 日本農芸化学会中四国支部第 11 回市民フォーラム/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. 徳島大学蔵本キャンパス臨床第 2 講堂, 2008.12.6

2. 学会発表

1) 坂口末廣. シンポジウム「急性脳炎・脳症」: プリオン病におけるプリオン蛋白の役割. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

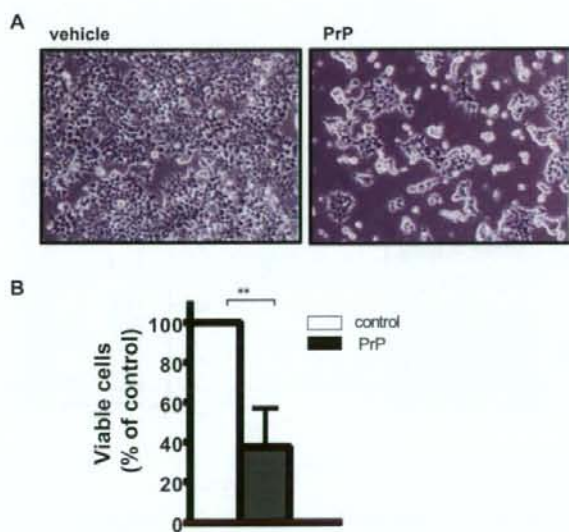


図 1 HEK293T 細胞における PrP^C 過剰発現は細胞死を誘導する

(A) PrP^C 発現ベクターをトランスフェクションして 24 時間後の HEK293T 細胞では、pcDNA3.1(-) をトランスフェクションした細胞と比べて、著明な細胞数の減少が認められた。(B) トランスフェクションして 48 時間後に、トリパンブルー染色にて生細胞を計測すると、pcDNA3.1(-) をトランスフェクションした細胞と比べて、PrP^C 発現ベクターをトランスフェクションした細胞の生細胞数が著明に減少していた ($p=0.0071$)。

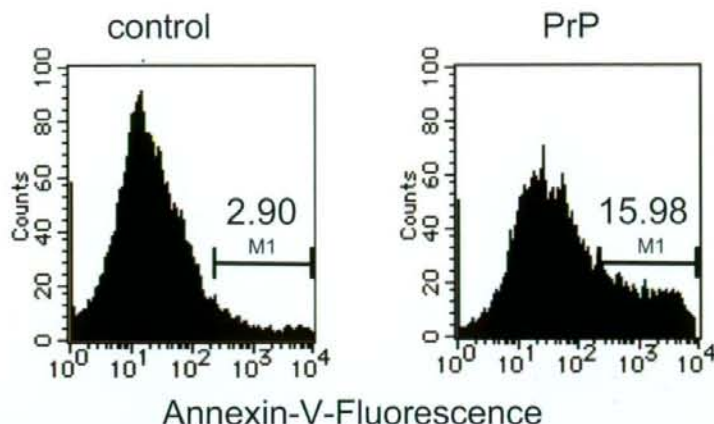


図 2 : HEK293T 細胞における PrP^C の過剰発現はアポトーシスによる細胞死をきたす

PrP^C発現ベクターをトランスフェクションして 48 時間後に、蛍光標識したアネキシン V を用いてフローサイトメーターによりアポトーシス細胞を検出した。pcDNA3.1(-)をトランスフェクションした細胞と比べて、アネキシン V 陽性を示す細胞が PrP^C発現ベクターをトランスフェクションした細胞で増加した。

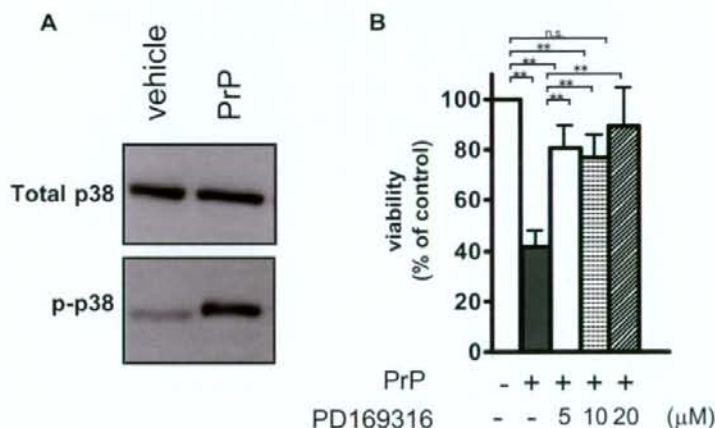


図 3 HEK293T 細胞における PrP^C 過剰発現による細胞死は p38 キナーゼを介する

(A) HEK293T 細胞に PrP^C 発現ベクターをトランスフェクションして 24 時間培養後、細胞を回収し、トータル p38 とリン酸化 p38 を特異的に認識する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、pcDNA3.1(-)をトランスフェクションしたコントロールの細胞に比べて、PrP^Cを過剰発現させた細胞では p38 のリン酸化レベルが増加していた。(B) PrP^Cを過剰発現させた HEK293T 細胞を、p38 キナーゼの選択的阻害剤 PD169316 で処理すると、PrP^C過剰発現による細胞死が抑制された。

n.s., not significant; **, $p < 0.005$.

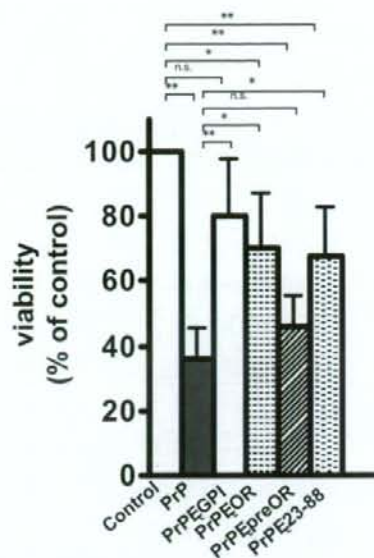


図4 欠損変異 PrP による HEK293T 細胞の細胞死

全長 PrP^C、PrP^ΔGPI、PrP^Δ51-90、PrP^Δ25-50、PrP^Δ23-88 の発現ベクターを HEK293T にそれぞれトランスフェクションし、48 時間培養後に細胞数を計測した。全長 PrP^C の過剰発現による細胞毒性と比べて、PrP^ΔGPI、PrP^ΔOR、及び PrP^Δ23-88 の過剰発現の細胞毒性は減弱していた。一方、PrP^Δpre-OR は全長 PrP^C と同程度の細胞死を誘導した。

ヒトプリオンの伝達性に関する研究 —自然発症プリオン病モデルマウスの解析—

研究分担者：毛利 資郎 動物衛生研究所 プリオン病研究センター
研究協力者：倉知 恵美 動物衛生研究所 プリオン病研究センター
研究協力者：松浦 裕一 動物衛生研究所 プリオン病研究センター
研究協力者：石川有紀子 動物衛生研究所 プリオン病研究センター
研究分担者：横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター
研究協力者：三好 一郎 名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センター
研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院医医学研究科創生応用医学研究センター

研究要旨

ヒトの家族性プリオン病であるゲルストマン・ストロイスラー症候群(GSS)モデルとして作製したマウスプリオン蛋白質遺伝子のコドン101をプロリンからロイシンに置換したトランスジェニックマウスが自然発症し、免疫組織染色で海馬、脳梁、視床、小脳皮質にブランク型の異常プリオン蛋白質の蓄積が認められた。蓄積した異常プリオン蛋白質は、ヒト GSS のマウス馴化株に比べてプロテアーゼ K(pK) 抵抗性に劣ることが判明した。さらに、自然発症マウス脳の10%ホモジネートを作製し、同じ系統の8週齢のトランスジェニックマウスの脳内に接種したところ、生後350日以内に立毛、痩せ、自発運動低下、運動失調、振戦などのマウスプリオン病の症状を呈した。病理組織検査では脳内にブランク型の異常プリオン蛋白質の蓄積と空胞変性も認められた。それに比較して、非接種のモデルマウスの自然発症は500日以上を要することから、異常プリオン蛋白質接種によりこのマウスの発病までの潜伏期間が短縮されることが明らかとなった。

自然発症モデルマウスの脳内に蓄積した異常プリオン蛋白質は、継代接種により、GSS 自然発症モデルマウスのプリオン蛋白質異常化の促進因子として働くことが考えられる。

A. 研究目的

ヒトプリオンのモデルマウスへの伝達性は宿主のプリオン蛋白質遺伝子と由来プリオンの性状のコンビネーションによることが明らかになりつつある。ヒトプリオンと遺伝子改変マウスの伝達試験により潜伏期間、病理変化、産生された異常プリオン蛋白質性状により伝達の要因について解析し、伝達性の基礎知見の集積することにより予防と治療の方策開発に資することが目的である。

B. 研究方法

1) モデルマウス

ヒト GSS のプリオン蛋白質遺伝子変異部位である codon 102 のアミノ酸に相当するマウスプリオン蛋白質遺伝子の codon101 を Proline から Leucine に置換した GSS モデルトランスジェニックマウス (Tg-MoP101L#4)

2) 臨床的に異常を呈したマウスを安楽死さ

せ、半脳を凍結保存し、残りは10%緩衝ホルマリン溶液で固定後病理組織切片を作製し、病変と異常プリオン蛋白質の蓄積を調べる。

- 3) この系統の別なライン(Tg-MoP101L#52)でもプラーク型の異常なプリオン蛋白質の蓄積が起こり自然発症することが判明しており、Tg-MoP101L#52 脳乳剤を用いて伝達試験を行う。

(倫理面への配慮)

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 動物実験委員会に動物実験計画書を提出し承認されている。(承認番号 第08-043号)

C. 研究結果

- 1) Tg-MoP101L#4 マウスは生後 300 日を超えると動きが鈍くなり、立毛、歩行不良、後肢麻痺、削瘦、振戦などの症状をとる個体が出現した。免疫組織染色により典型的なプラーク型異常プリオン蛋白質の蓄積が、海馬、脳梁、視床、小脳に認められたマウスの平均生存日数は 526 ± 78.0 日 ($n=32$)であった。一方、臨床症状を呈したマウスのうちプラーク型異常プリオン蛋白質の蓄積が認められなかったマウスの平均生存日数は 374 ± 80.5 日 ($n=10$)であった。これらのマウスの免疫組織染色では背景が強く染色される傾向があり、正常プリオン蛋白質の過剰発現による影響も考えられ、現在検索中である。
- 2) この自然発症マウスの異常プリオン蛋白質は野生型マウスに伝達された GSS マウス順化プリオン株(F-1株)に比べてプロテアーゼ K(PK)抵抗性が低く、通常のプリオンに用いる PK 処理条件後のウエスタンブロットティングでは検出できないことが明らかとなった。
- 3) 自然発症マウス Tg-MoP101L#52 の 10%

脳乳剤を作製し、生後 8 週令の Tg-MoP101L#4 マウスの脳内に接種したところ、典型的マウスプリオン病を発症し平均生存日数は 349 ± 4.7 日 ($n=7$)であった。これらのマウスには激しいプラーク型異常プリオン蛋白質の蓄積が認められた。自然発症マウスにおける平均生存日数が 526 日であることから、自然発症由来の異常プリオン蛋白質を接種されたマウスは生存期間が 177 日も短縮された。しかし、この現象のみでプラーク型異常プリオン蛋白質の伝達性の有無について議論することは早計である。

- 4) 現在、プラーク型異常プリオン蛋白質を野生型マウスに脳内接種を行い観察中である。

D. 考察

GSS モデルの遺伝子改変マウスが自然発症し、2 種類の病理変化が認められたが、遺伝子がランダムに導入されるトランスジェニックマウスであることから、遺伝子の発現量に差があることも考えられる。これについては、生後初期のマウスを用いて遺伝子とタンパクの発現量を調べる必要がある。

また、異常プリオン蛋白質の伝達性の有無については、同系統のマウス以外のマウスにおける伝達試験を行い解析する必要がある。

E. 結論

1. ヒトの GSS のマウスモデルはプラーク型の病変を伴い発症した。
2. 異常プリオン蛋白質は非常に弱い PK 抵抗性を示した。
3. 発症したマウスの脳乳剤を接種されたモデルマウスは発症までの期間が 35%短縮した。

[参考文献]

- 1) Manson JC, et al. A single amino acid

alteration (101L) introduced into murine PrP dramatically alters incubation time of transmissible spongiform encephalopathy. 18 : 6855-64, 1999

- 2) Barron RM, et al. Changing a single amino acid in the N-terminus of murine PrP alters TSE incubation time across three species barriers. The EMBO Journal, 20 : 5070-5078, 2001
- 3) Hsiao KK et al. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. Science, 250 : 1587-1590, 1990

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2008/4/1~2009/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Hizume M, et al. Human prion protein (PrP) 219K is converted to PrP^{Sc} but shows heterozygous inhibition in

variant Creutzfeldt-Jakob disease infection. Journal of Biological Chemistry, 284 : 3603-3609, 2009

- 2) Yokoyama T, et al. Alteration of the biological and biochemical characteristics of bovine spongiform encephalopathy prions during interspecies transmission in transgenic mice models. Journal of General Virology, 90 : 261-268, 2009
- 3) Yokoyama T, Mohri S. Prion diseases and emerging prion diseases. Current Medicinal Chemistry, 15 : 912-915, 2008
- 4) Iwamaru Y, et al. Lactoferrin induces cell surface retention of prion protein and inhibits prion accumulation. Journal of Neurochemistry, 107 : 636-646, 2008
- 5) Masujin K, et al. Biological and biochemical characterization of L-type BSE prion detected in Japanese beef cattle. Prion, 2 : 123-128, 2008

トレースバック実験の進展

(ブランク型硬膜移植後 CJD 実験モデルとブランク型 PrP 沈着を伴う孤発性 CJD-MM1)

研究分担者：小林 篤史 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野

研究分担者：毛利 資郎 動物衛生研究所プリオン病研究センター

研究協力者：北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科 CJD 早期診断・治療法開発分野

研究要旨

ブランク型硬膜移植後 CJD のモデルとして 129M/M の PrP ヒト型マウスで継代した孤発性 CJD-VV2 プリオンを用いて実験的にトレースバック現象を証明することをめざし、また孤発性 CJD-MM1 と診断された症例の中でブランク型硬膜移植後 CJD のように非典型的な臨床・病理像を示す症例を検索し、感染によって引き起こされた可能性があればトレースバック実験を行って感染源を同定することをめざした。ブランク型硬膜移植後 CJD モデルのトレースバック実験では潜伏期間の上ではトレースバック現象を証明できた。発病したマウスの詳細な解析を今後行っていく必要がある。ブランク型 PrP 沈着を伴う非典型的な孤発性 CJD-MM1 症例の解析では、これらの症例が感染によって引き起こされた可能性は低く、白質におけるブランク型 PrP 沈着はプリオン株の性質というよりも長期化した臨床経過により生じた白質変性が成因となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

プリオンはプリオン蛋白(PrP)のアミノ酸配列を越えた感染の後も元の配列の PrP を異常化する能力を持ち続けるという性質を利用し、その由来をたどる(トレースバック)方向への感染実験を行うことで感染性プリオン病の由来を同定することが可能になった。われわれはこれまでにトレースバック実験により、由来不明であったブランク型硬膜移植後 CJD は孤発性 CJD-VV2 プリオンが 129M/M の遺伝子型を持つ人へ感染することによって引き起こされることを明らかにしてきた¹⁾。

そこで本年度は①ブランク型硬膜移植後 CJD のモデルとして 129M/M の PrP ヒト型マウスで継代した孤発性 CJD-VV2 プリオンを用いて実験的にトレースバック現象を証明することをめざし、②孤発性 CJD-MM1 と診断された症例の中でブランク型硬膜移植後

CJD のように非典型的な臨床・病理像を示す症例を検索し、感染によって引き起こされた可能性があればトレースバック実験を行って感染源を同定することをめざした。

B. 研究方法

- ① 孤発性 CJD-VV2 プリオンを接種した 129M/M のヒト型マウスの脳をさらに 129M/M あるいは 129V/V のヒト型マウスに脳内接種し潜伏期間を比較した。
- ② これまでに東北大学で神経病理学的検索を行い孤発性 CJD-MM1 と診断された症例の中で、孤発性 CJD-MM1 には通常みられることのないブランク型の PrP 沈着が認められた 3 症例について詳細に解析した。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とした研究に際しては東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の規定に従い研究を行った。また動物実験に関しては動物衛生研究所動物実験に関する指針を遵守した。

C. 研究結果

- ① 接種材料の PrP 遺伝子型が 129M/M であるにもかかわらず 129V/V マウスは短い潜伏期間(309±3 日)で発病した(図 1)。129M/M マウスは接種後 600 日が経過しても発病していない。



図 1 プラーク型硬膜移植後 CJD モデルのトレースバック実験

- ② いずれの症例も発症から死亡までの全経過は 2 年以上と長かったが、無動無言までは亜急性に進行した。ミオクロヌス(3/3)、EEG 上 PSD(2/3)が認められた。患者脳組織のウェスタンブロットではタイプ 1 PrP^{Sc}が検出され、タイプ 2 や中間タイプの PrP^{Sc}はみられなかった。

プラークは脳と小脳の白質に限局して認められ、コンゴレッド染色後の偏光顕微鏡観察で緑色の複屈折を示した(図 2)。灰白質はシナプス型の PrP 沈着パターンを示した。白質は長い臨床経過を反映して高度に変性しており、軸索損傷に伴ってみられるアミロイド前駆タンパク質(APP)の蓄積も多数認められた。さらにそれらの APP 蓄積とプラーク型 PrP 沈着はしばしば近接して局在していた(図 3)。

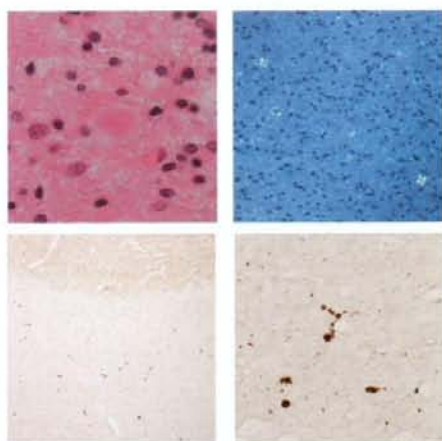


図 2 白質に限局したプラーク型 PrP 沈着 HE 染色(左上)。コンゴレッド染色(右上)。抗 PrP 抗体免疫染色(下)。

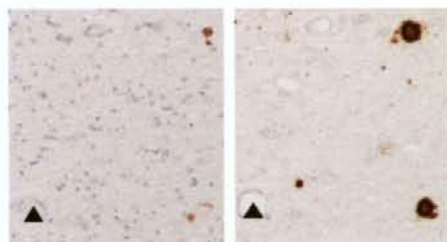


図 3 APP とプラーク型 PrP 沈着の共局在連続切片を抗 APP 抗体(左)あるいは抗 PrP 抗体で免疫染色した。▲は目印となる血管。

D. 考察

- ① ヒト型ノックインマウスをプラーク型硬膜移植後 CJD モデルとした実験においても感染源の孤発性 CJD-VV2 プリオンと遺伝子型の同じ 129V/V マウスへトレースバックすることが確認できた。全ての 129M/M マウスが発病するまで経過を観察し、病理像および蓄積している PrP^{Sc}について今後解析していく必要がある。
- ② これらの症例がプリオンの感染によって引き起こされた可能性は低く、孤発性 CJD-MM1 であるものの臨床経過の長期化によって白質が変性したために白質に限局してプラーク型 PrP 沈着を伴うようになったと考えられた。白質に出現するプ

ラク型 PrP 沈着はプリオン株の性質というよりも白質の変性を反映しており、灰白質のプラーク型沈着と成因が異なっている可能性が示唆された。

E. 結 論

白質のプラーク型 PrP 沈着は白質の変性を反映しており、プリオン株に関わらず出現する可能性がある。

[参考文献]

- 1) Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. Cross-sequence transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease creates a new prion strain. *J Biol Chem.* 282 : 30022-30028, 2007

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1~2009/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection. *Neuropathology.* 2009 (in press)
- 2) Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Human PrP 219K is

converted to PrP^{Sc} but shows heterozygous inhibition in vCJD infection. *J Biol Chem.* 2008 Dec 10 (Epub ahead of print)

- 3) Kobayashi A, Arima K, Ogawa M, Murata M, Fukuda T, Kitamoto T. Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients. *Acta Neuropathol.* 116 : 561-566, 2008
- 4) Ikeda S, Kobayashi A, Kitamoto T. Thr but Asn of the N-glycosylation sites of PrP is indispensable for its misfolding. *Biochem Biophys Res Commun.* 369 : 1195-1198, 2008

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

培養細胞におけるプリオン感染に関する研究

研究分担者：横山 隆 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究協力者：清水 善久 動物衛生研究所 プリオン病研究センター

研究要旨

スクレイピーChandler 株への感受性を指標として分離したプリオン感受性(N2aAT)、非感受性細胞(N2a0719)を用いて、7株のマウス馴化プリオンの感受性、抵抗性を調べたところプリオンは4種類に分類された。Chandler 非感受性細胞も22Lプリオンに対しては感受性を示した。プリオンの感受性は、株と細胞の組み合わせに依存すると考えられた。

A. 研究目的

一部の培養細胞でプリオンが増殖することが知られているが、その感受性を規定するメカニズムについては明らかではない。プリオンの感染細胞内における動態およびその挙動について解析し、プリオン感染の分子機構を解明する。具体的には、スクレイピー感受性および抵抗性細胞の選別とその性状解析により、細胞内におけるプリオン増幅のメカニズムを明らかにする。プリオンが感染できる細胞または、プリオンが感染するに必須な細胞側の条件を明らかにすることは、BSEにおけるプリオンの増幅部位(特定危険部位)の定義、範囲に科学的な論拠を加えることにつながる。

B. 研究方法

- (1) 細胞の感受性とプリオン株の関連から、プリオンまたは異常プリオン蛋白質の性状解明を目指す。
- (2) 様々なプリオン株に感受性の細胞株の分離を試みるとともに、プリオン株の詳細な分類のための細胞を選別する。

(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

動物衛生研究所内のバイオセーフティレベル(BSL)2(スクレイピープリオン)または3(その他のプリオン)実験施設にて行い、汚染物は135℃、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。

C. 研究結果

- (1) N2a 細胞の各ラインから Chandler 株に対して感受性、非感受性の N2a 細胞を選択した。
- (2) 検査した7株のマウス馴化プリオン株は2種類の細胞に対する感受性により4種類に分類された。
- (3) N2a 細胞に対して、スクレイピー-22L 株が最も強く、次いで Chandler 株、79A 株が伝達性を示した。
- (4) プリオンの細胞に対する感受性は、プリオン株と細胞の組み合わせに依存することが示された。

D. 考察

プリオンの感染に関わる因子の探索を目指して、感受性および非感受性細胞の確立を目