

7. 非定型 BSE プリオンの「種の壁」の解析

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 舩基賢太郎、舒 宇静、岩丸洋史、今村守一、岡田洋之、毛利資郎
(動物衛生研究所 プリオン病研究センター)

研究要旨 わが国の非定型 BSE 症例(BSE/JP24)を牛型マウス(TgBoPrP)へ伝達を行った。TgBoPrP での潜伏期は 223.5 日であり、定型 BSE (C-BSE) に比べて短かった。TgBoPrP の脳内に蓄積した異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の性状は C-BSE 由来の PrP^{Sc} と異なっており、脳内での病変分布、PrP^{Sc} の蓄積も C-BSE とは異なっていた。以上のことから非定型 BSE(BSE/JP24)は C-BSE とは異なるプリオンに起因すると考えられた。

A. 研究目的

BSE およびマウス継代 BSE プリオンについて、各種トランスジェニックマウスでの潜伏期を指標としたプリオンの生物学的性状の解析ならびに異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の生化学的性状の変化を解析する手法を開発した(Yokoyama et al., 2009)。この手法を用いて、非定型 BSE(BSE/JP24)の各種マウスへの伝達試験を行い、非定型 BSE プリオンの性状を明らかにし、定型 BSE との相違点を明確にする。

本研究により、わが国の非定型 BSE の性状が明らかとなり、リスク管理のための重要な知見が得られる。すなわち、現行の BSE 対策は定型 BSE のみを対象としているが、非定型 BSE に対して特別な対策 (特定危険部位の範囲の見直し、検査月齢の見直しなど) が必要か否かを明らかにするための一助となる。

B. 研究方法

非定型 BSE を牛 PrP、マウス PrP、ハムスター PrP、マウス-ハムスターキメラ PrP 過剰発現マウスに伝達試験を行い、潜伏期、病変分布、PrP^{Sc} の性状解析を行う。当研究所で繁殖・維持しているトランスジェニックマウスへの脳内接種試験を行う。BSE 感染動物の飼育およびプリオンの解析は、動物衛生研究所内動物衛生高度研究施設 (BSL3) にて実施する。

C. 研究結果

1) 牛型 PrP 発現マウスに対する伝達性

定型 BSE(C-BSE)を接種した牛型 PrP 過剰発現マウス(TgBoPrP)は、223.5 日 (初代)、214.9 日 (2

代)の潜伏期で伝達認められた。BSE/JP24 を接種した TgBoPrP は、197.7 日 (初代) および 152.2 日 (2 代) の潜伏期で伝達性を示した。BSE/JP24 では継代に伴う潜伏期の短縮が認められた (表 1)。

2) 野生型マウス(ICR)に対する伝達性

C-BSE は ICR に 408.6 日の潜伏期で伝達認められたが、BSE/JP24 は現在までのところ ICR への伝達性は認められていない (表 1)。

Transmission of C-BSE and BSE/JP24

Inoculum	Mice	No. diseased/ no inoculated	Incubation period (days \pm SD)
C-BSE			
1st passage	TgBoPrP	11/11	223.5 \pm 13.5
2nd passage	TgBoPrP	15/15	214.9 \pm 4.8
1st passage	ICR	5/5	408.6 \pm 28.2
BSE/JP24			
1st passage	TgBoPrP	10/10	197.7 \pm 3.4†
2nd passage	TgBoPrP	10/10	152.2 \pm 3.1†
1st passage	ICR	0/23	<650
2nd passage	ICR		ongoing

† significantly different between the first and the second passaged BSE/JP24 ($p < 0.05$)

3) TgBoPrP マウスに蓄積した PrP^{Sc}

C-BSE および BSE/JP24 を伝達した TgBoPrP の脳内に蓄積した PrP^{Sc} の生化学的性状を解析した。BSE/JP24 を接種した TgBoPrP の脳内の PrP^{Sc} は BSE/JP24 の症例 (牛) と類似の糖鎖型を示した (図 1)。BSE/JP24 に由来する PrP^{Sc} の糖鎖型は C-BSE とは明瞭な差が認められた。BSE/JP24 の PrP^{Sc} は、C-BSE に比べて、蛋白質分解酵素 (PK) に対する抵抗性が弱い傾向が認められた。

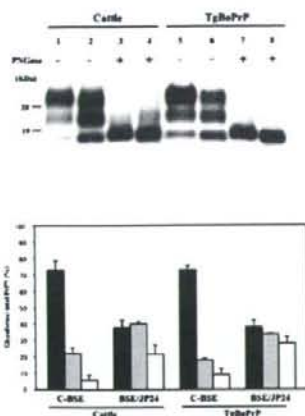
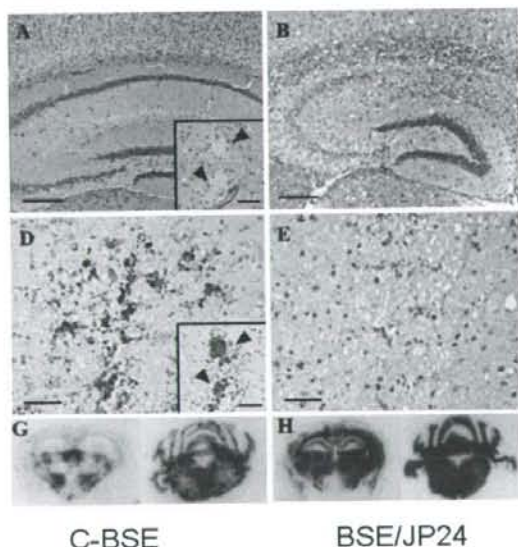


図1 C-BSEとBSE/JP24の糖鎖型の比較

4) BSE/JP24 伝達 TgBoPrP の病理学的検査

C-BSE および BSE/JP24 を伝達した TgBoPrP の脳について空胞変性の程度、PrP^{Sc} の脳内の蓄積を比較検討した。BSE/JP24 を伝達した TgBoPrP では強い空胞変性が認められ、び漫性の PrP^{Sc} の蓄積が脳全体に認められた。C-BSE を伝達した TgBoPrP では PrP 斑が顕著であったが、BSE/JP24 では PrP 斑の出現は認められなかった。



C-BSE

BSE/JP24

図2 C-BSEとBSE/JP24を接種したTgBoPrPの病態解析

D. 考察

BSE/JP24 は生物学的性状、生化学的性状、病理学的性状が C-BSE とは異なるプリオンに起因し

ていると考えられた。BSE/JP24 は TgBoPrP での継代に伴って潜伏期の短縮が認められ、これは BSE/JP24 プリオンが TgBoPrP に馴化する過程を示していると考えられる。BSE/JP24 プリオンの起源の解明が残された課題の一つと考えられる。PrP 斑は C-BSE を接種した TgBoPrP に認められたが、BSE/JP24 を接種した TgBoPrP では認められなかった。これは BSE/JP24 と BSE の牛症例とは、逆転の関係にある。脳内における PrP 斑の出現は PrP 蛋白質遺伝子のみで規定されないことが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S and Yokoyama T. Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2008, 2: 123-128.
- Yokoyama T, Masujin K, Iwamaru Y, Imamura M, Mohri S. Alteration of the biological and biochemical characteristics of bovine spongiform encephalopathy prions during interspecies transmission in transgenic mice models. *J. Gen. Virol.* 2009, 90: 261-268.
- Yokoyama T, Mohri S. Prion diseases and emerging prion diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15: 912-916.
- Yamamoto T, Uhiki Y, Hara S, Hall WW, Tsukagoshi HN, Yokoyama T, Tagawa Y, Sata T, Yamakawa Y, Kinoshita N, Hattori S, Irie S. An advantageous new method utilizing the BioMasher and a sensitive ELISA to accurately detect bovine spongiform encephalopathy from brain tissue. *J. Virol. Methods*, 2008, 149: 316-325.
- Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Murayama Y, Mohri S, Okada H, Yokoyama T. Bovine lactoferrin induces retention of the prion protein on the cell surface and inhibits prion accumulation. *Neurosci. Letters* 2008, 107: 636-646.
- Takenouchi T, Iwamaru Y, Sato M, Yokoyama T, Kitani H. Establishment of a SV40 large T antigen-immortalized bovine cell line and its neuronal differentiation by dibutyryl cyclic AMP. *Cell Biol. Int.* 2008 (in press).

- 7) Murakami K, Nishikawa F, Noda K, Yokoyama T, Nishikawa S. Anti-bovine Prion protein RNA aptamer containing tandem GGA repeat interacts both with recombinant bovine prion protein and its Δ isoform with high affinity. *Prion* 2008, 2: 73-80.
- 8) 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.* 2008, 70: 159-165.

2. 学会発表

- 1) T. Yokoyama. Prion diseases and emerging prion diseases. *PepCon 2008*.
- 2) 長谷川浩司、横山隆. 家族性クロイツフェルト・ヤコブ病 E200K 変異がプリオン蛋白質の構造安定性に与える影響. 第35回生体分子科学討論会
- 3) K. Hasegawa, T. Yokoyama. Fragment molecular orbital calculations reveal local structural instability in the human prion protein carrying a E200K Variant. *Prion* 2008.
- 4) K. Masujin, Y. Shu, Y. Yamakawa, K. Hagiwara, T. Sata, Y. Matsuura, Y. Iwamaru, M. Imamura, M. Kurachi, Y. Shimizu, K. Kasai, H. Okada, S. Mohri, T. Yokoyama. Biological and biochemical characterization of L-type BSE prions detected in Japanese beef cattle. *Prion* 2008.
- 5) 横山隆、舛甚賢太郎、毛利資郎. 種の壁を利用した BSE プリオンの分類. 第33回草食実験動物研究会
- 6) 横山隆. BSE の今後の問題—非定型 BSE—日本獣医師会学会年次大会岩手

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

8. 定型 BSE の高感度検出法の開発

研究分担者 村山 裕一 動物衛生研究所 プリオン病研究チーム

研究協力者 吉岡 都 (動衛研・安全性研究チーム)

今村 守一、岩丸 祥史 (動衛研・プリオン病研究チーム)

研究要旨 非定型 BSE (A-BSE) は、BSE の起源や定型 BSE (C-BSE) 撲滅後のリスク管理を考える上で重要な事例である。したがって、食の安全性確保には C-BSE のみならず、A-BSE 由来異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の高感度検出技術の開発が必要である。本課題では、A-BSE PrP^{Sc} の高効率試験管内増幅法を開発することを目的とする。本年度は、C-BSE および A-BSE 由来の牛 PrP^{Sc} の PMCA 増幅の異同を検討したが、C-BSE 増幅条件下では、A-BSE PrP^{Sc} の増幅はほとんど認められなかった。一方、C-BSE 感染カニクイザルでは PrP^{Sc} が増幅可能であり、連続 PMCA により検出感度の向上が認められた。

A. 研究目的

非定型 BSE (A-BSE) は、プロテアーゼ切断点や感染力が定型 BSE (C-BSE) と異なっており、BSE の起源や BSE 撲滅後のリスク管理を考える上で重要な事例である。C-BSE が食品を介して牛からヒトに感染したと考えられる例(vCJD)の他に、A-BSE も霊長類(カニクイザル)に対して感染性を示し、その感染力は C-BSE よりも強い可能性が報告されている。したがって、畜産分野のみならず、食の安全性確保のためにも、定型、非定型両 BSE 由来異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc}) の超高感度検出技術の開発が必要であろう。本課題では、特に A-BSE PrP^{Sc} の高効率試験管内増幅法を開発することを目的とする。本年度は、C-BSE、A-BSE 由来 PrP^{Sc} の PMCA 増幅の異同を検討するとともに、vCJD 霊長類モデルにおける PrP^{Sc} の増幅についても検討した。

B. 研究方法

1) A-BSE 由来 PrP^{Sc}

我が国 24 例目(BSE/JP24)の感染個体由来脳乳剤を牛に脳内接種して得た、10%脳乳剤を希釈し、PMCA シードとして用いた。

2) PMCA 増幅条件

ハムスターおよびマウスプリオン株、あるいは C-BSE 感染牛由来の PrP^{Sc} の増幅条件を用いて A-BSE 由来 PrP^{Sc} を増幅した。

3) BSE 感染カニクイザル由来 PrP^{Sc} の増幅

C-BSE 感染脳乳剤を脳内接種し、発症したカニクイザル由来の 10%脳乳剤を PMCA シードとして用い、正常カニクイザル脳乳剤をソースに増幅を試みた。

C. 研究結果

1) A-BSE 由来 PrP^{Sc} の PMCA 増幅

C-BSE および A-BSE 由来の PrP^{Sc} をシードに C-BSE 増幅法を用いて増幅した。増幅前、両 BSE シードは、ウェスタンブロットでほぼ同程度のシグナル強度を示した。40 サイクルの増幅後、A-BSE PrP^{Sc} は C-BSE PrP^{Sc} とは異なり、 10^{-4} ~ 10^{-6} の希釈率において増幅はほとんど認められなかった。また、マウスなど他の PrP^{Sc} の増幅に有効な増幅条件を用いて検討したが、現在までの所、有意な増幅は達成できていない。

2) C-BSE 感染カニクイザル由来 PrP^{Sc} の PMCA 増幅

定型 BSE PrP^{Sc} の増幅法を応用し、増幅条件を改変することにより、カニクイザル由来 PrP^{Sc} の増幅が可能になった。1 回目の PMCA 産物を 1/5~1/100 に希釈して再増幅すると、PrP^{Sc} のシグナルは増強または維持されることから、増幅産物を希釈・再増幅する Sequential PMCA を行ったところ、検出感度の向上が認め

められた。

D. 考察

A-BSE 由来 PrP^{Sc} は C-BSE 由来 PrP^{Sc} とは異なった生化学的特性を示す。また、A-BSE は病理組織学的にも C-BSE とは異なった特性を示す。本研究で、両者は PMCA 増幅の観点においても異なっているということが明らかになった。従って、A-BSE PrP^{Sc} の効率的増幅には、新たに増幅条件を確立する必要がある。今後、超音波条件や PMCA ソース等を変更し、増幅を試みる予定である。

vCJD 感染モデルにおけるカニクイザルでは、今回初めて高感度検出に成功した。Sequential PMCA により 3 ラウンドで 10⁻⁷ 希釈サンプルからも PrP^{res} シグナルを認めた。この検出性はすでに報告されているヒト vCJD PrP^{Sc} を用いた PMCA 結果を上回るものである。今後さらなる増幅効率の改良をはかり、感染ザルにおける PrP^{Sc} の動態解析、体液などを用いた早期診断の可能性について検討する。

E. 結論

A-BSE 由来 PrP^{Sc} の PMCA 増幅には、C-BSE PrP^{Sc} 増幅法は有効ではなかった。一方、vCJD モデルにおけるカニクイザルでは、C-BSE 増幅法を応用することにより、PrP^{Sc} が増幅可能であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamaru Y, Shimizu Y, Imamura M, Murayama Y, Endo R, Tagawa Y, Ushiki-Kaku Y, Takenouchi T, Kitani H, Mohri S, Yokoyama T, Okada H: Lactoferrin induces cell surface retention of prion protein and inhibits prion accumulation. *J Neurochem* 2008, 107:636-646.

2. 学会発表

- 1) 吉岡 都、村山裕一、横山 隆、毛利資郎：異種間 PMCA による PrP^{res} 生成とその性状解析. 2008 年プリオン研究会（新得）

2008.8.29.

- 2) 村山裕一：プリオン病の診断—PMCA 法—, 平成 20 年度日本獣医師学会（盛岡）
2009.1.22.

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

9. 食肉検査における高感度検査法の開発

研究分担者 新竜一郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染分子解析学
研究協力者 佐野和憲、西田教行（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

研究要旨 アミロイド線維の検出試薬として用いられる ThT 試薬と攪拌装置付の蛍光プレートリーダーを組み合わせるにより、ほぼ real time に recombinant PrP fibril の増幅過程が測定可能なアッセイ系を開発することに成功した (Real-time QUIC)。今後この方法を BSE に応用するため、さらに条件検討を加え、最適化を図る予定である。

A. 研究目的

感染性ではなく孤発性に発症すると考えられている非定型 BSE の存在が明らかとなり、BSE によるヒトへの感染の危険性はいまだ完全に無くなっていない状況である。本研究では、分担研究者らが新規に開発した異常型プリオンタンパク試験管内増幅法 (QUIC 法: QUaking-Induced Conversion) を用いて、BSE 感染牛の組織・髄液・血液などに含まれる、通常では検出できない微量の異常型プリオンタンパク (PrP^{Sc}) を検出が容易なレベルまで増幅することにより、BSE の高感度検査法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) リコンビナント PrP (rPrP) の精製

ウシ PrP 配列の発現ベクターを作製後、大腸菌に transformation し、発現誘導する。PrP の N 末側には銅結合領域があり、ヒスチジンタグがなくても金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製可能である。大腸菌に rPrP を発現させると封入体を形成するため、6M のグアニジン塩酸で溶解した後、Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) を用いてグアニジン塩酸濃度を 6M から 0M まで徐々に勾配させて rPrP を refold させた後、イミダゾールにより溶出する。イミダゾールは透析により除去する。精製した rPrP は小分けして急速凍結し -80°C で保存し、使用前に融解して用いる。

2) BSE に対する QUIC 反応の最適化

これまでの研究により QUIC 法では、rPrP-sen (Protease-sensitive rPrP) から rPrP-res

(Protease-resistant rPrP) への変換が高い効率で起こるには界面活性剤や変成剤を一定量加える必要があり、その種類と濃度が大きな影響を与えることを分担研究者らは見出している。これらの結果は rPrP-sen が部分的に unfold した状態の場合に rPrP-res への変換が促進されることを示すものと考えられる。また間欠的な超音波処理や攪拌を行うことで PrP-res 凝集体が断片化され、増幅反応の核 (シード) の量が増え反応が劇的に促進されることも判明した。病原体プリオンには同種の動物に接種しても潜伏期の長さや病理像の異なる“株”が存在することが知られており、それぞれの株の PrP-res の構造の違いがその主因であるとする仮説が有力である。分担研究者らは異なるプリオン株 (ハムスター、マウス由来) では変換への最適条件 (前述したような界面活性剤・変成剤の種類や濃度、超音波・攪拌の強さや継続時間など) が違うことを発見している。そのため、BSE でもすでに増幅に成功したハムスタープリオン 263K 株の系とは異なる条件が要求されることが予想されるため、様々な試行を行い、反応のパラメーターを決めていく必要がある。また、アミロイド線維と結合すると強い蛍光を発するチオフラビン T (ThT) はアミロイド線維の検出試薬として用いられるが、分担研究者らは、ThT が rPrP-res にも反応することを確認している。この ThT 試薬と攪拌装置付の蛍光プレートリーダーを組み合わせて用いれば、ほぼ real time に rPrP-res の増幅過程が測定可能なアッセイ系を開発することが可能となる (Real-time QUIC)。

最適条件検討の際には、反応のシードとして BSE 感染牛脳乳剤を用い、negative control として非感染牛脳乳剤を用いる。最適条件決定の後には BSE 感染牛由来の髄液中の PrP^{Sc} の検出を試みる。

(倫理面への配慮)

BSE 感染牛脳乳剤は、国立感染症研究所感染病理部より、髄液は北海道立畜産試験場基盤研究部より共同研究として提供される。それらは牛海綿状脳症特別措置法にもとづく研究用検体として申請し、許可を得たものである。

C/D. 研究結果と考察

今期研究では rBoPrP (recombinant bovine PrP) の精製までに止まり、BSE 脳乳剤をシードに用いて QUIC 反応の条件検討を行うことはできなかったが、rHuPrP (recombinant human PrP)、CJD での条件検討を詳細に行うことができた。それによって得られた知見は BSE の場合にも活用できると考えられる。

我々は研究方法で記述したような、ThT の蛍光強度測定による簡便でかつ real-time に rPrP-res を検出できるアッセイ系 (real-time QUIC) の開発を試みた。QUIC 法では間欠的に攪拌を繰り返すことにより rPrP-res の増幅反応を促進するが、攪拌装置付の蛍光プレートリーダーを使用することによっても増幅可能かどうか、まず検証した。その結果すでに以前の論文 (Nature Methods. 2008 Mar; 5(3):211-2.) で報告した SDS を含む反応条件では蛍光プレートリーダーの攪拌機能が十分でなく、増幅できないことがわかった。つまり SDS を含む反応条件の場合、より強い攪拌が必要であった。そこで SDS 以外の条件で効率よく増幅される条件を探索した。その結果、尿素やグアニジン塩酸を加えた場合に rPrP-res の増幅が容易に起こることが判明した。しかし、シードなしの条件でも自然発生的に rPrP-res がかなり早期より形成されてしまい (spontaneous formation)、検出感度を上げることが困難であった (図 1、condition A)。そこで様々な反応条件、特に反応溶液の組成 (変性剤の濃度、pH、添加物など) を変えて real-time QUIC を行い、spontaneous formation は抑制するが、シード依存的な増幅反応は抑制しない条件を探索した。その結果、

検出感度を大きく高めることに成功した (図 1、condition B)。

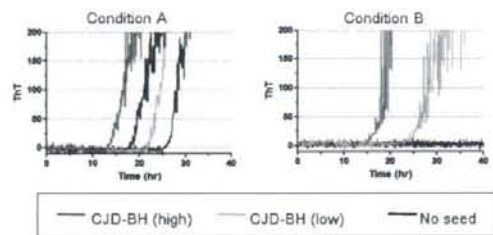


図1 Real-time QUIC法によるCJD brain homogenate中のPrP^{Sc}の増幅反応(異なる2種類の条件で施行)

E. 結論

ThT 試薬と攪拌装置付の蛍光プレートリーダーを組み合わせることにより Real-time に rPrP-res の増幅過程が測定できる real-time QUIC 法の開発に成功した。今後は BSE における最適条件を検討し、BSE 感染牛由来髄液を入手したい、髄液中の PrP^{Sc} を増幅し検出できるかどうか試みる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. Nature Methods. 2008 Mar; 5(3):211-2.

2. 学会発表

- 1) 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年10月28日 岡山 一般公演 演題名「PMCA法によるマウスプリオン株の高効率の増幅」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

10. プリオンの細胞および組織における病理学的研究

研究分担者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所・感染病理部)

研究協力者 飛梅 実、佐藤 由子、下ノ原 望 (同上)

松田 潤一郎 (医薬基盤研究所・実験動物開発研究室)

研究要旨 感染・伝達性を有する PrP^{Sc} およびその正常型である PrP^C の性状に関する知見は蓄積されつつあるが、その機能の解明には至っていない。本研究では、PrP^{Sc} に対し高感受性を有する細胞株と非感受性細胞株を用いた比較検討から、PrP^{Sc} の取り込み及び感染成立に関与する生体側因子の同定を進める。外来 PrP^{Sc} の取り込みに関与する分子を同定することは、感染初期の防御法を開発する上で非常に重要であり、解析が待たれている。また、同定した分子を組み込んだトランスジェニックマウスを作成し、迅速な病原性診断への応用を図る。

A. 研究目的

感染・伝達性を有する PrP^{Sc} およびその正常型である PrP^C の性状に関する知見は蓄積されつつあるが、その機能の解明には至っていない。また、さまざまな細胞種をノックアウトしたマウスの解析から特定の細胞種・分子が外来 PrP^{Sc} の取り込み及び感染成立に必要なことが推察されているが、その分子の同定には至っていない (Nature 390, 687-690, Klein et al)。これらに関与する分子を同定することは、感染初期の防御法を開発する上で非常に重要であり、解析が待たれている。本研究では、PrP^{Sc} に感受性および非感受性細胞株を用いた比較解析から PrP^{Sc} への感受性に関与する分子の同定を進め、PrP^{Sc} の細胞内への取り込みから感染成立までの機序の解析を行う。さらに、同定した分子を組み込んだトランスジェニックマウスを作成し、迅速な病原性診断への応用を図る。

B. 研究方法

マウス神経芽細胞腫由来細胞株である N2a 細胞は、外来 PrP^{Sc} の感染成立および増幅が可能な細

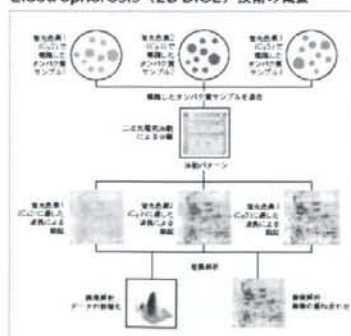
胞株として知られている。この N2a 細胞のサブクローンである N2a-1 および N2a-5 細胞は、PrP^{Sc} に対し非感受性または高感受性細胞株として北大・堀内教授らのグループにより樹立された。本研究では、これらの細胞株を用いた比較検討から PrP^{Sc} の感染成立に関与する生体側分子を同定し、その作用機序について解析する。

1) 比較 2 次元電気泳動法を用いた N2a-1 および N2a-5 細胞株の解析

解析には Fluorescence 2D Difference Gel Electrophoresis (2D DIGE) (ファルマシア社) system を用いた。等量の N2a-1 および N2a-5 細胞溶解液を作成し、それぞれ蛍光色素 Cy2 および Cy3 で標識した。またコントロールとして半量の N2a-1 と N2a-5 細胞溶解液を混合し、Cy5 により標識した。これら標識された細胞溶解液を、同じ 1 次元および 2 次元電気泳動ゲルにより展開した。また、Cy2 および Cy3 で標識される細胞溶解液を変え、同様にゲル上に展開した。泳動後のゲルをファルマシア社製 Typhoon のシステムにより、蛍光輝度を蛋白量として解析し、N2a-1 と N2a-5 細胞で発現に有意の差のあるタンパク質を検索した。図 1 に 2D DIGE system の概要を示す。

図1

Fluorescence 2D Difference Gel Electrophoresis (2D DIGE) 技術の概要



2) N2a-1 と N2a-5 細胞で発現に有意の差が存在した分子の同定

1) の解析により、両細胞間で発現に差異の存在した分子のゲル上のスポットを回収し、ゲルからタンパク質を精製・回収した。回収したタンパク質をトリプシン処理後、LC/MS 解析により含まれるアミノ酸配列から分子の同定を行った。

3) 同定された分子の N2a 細胞での発現量の確認

ウエスタンブロット法により上記2) で同定された分子の発現について、各 N2a 細胞での発現量の確認を行った。

4) 同定した分子の生体での発現部位の検討

上記3) で確認した分子のマウス生体での発現部位について、免疫組織学的方法を用いて検討した。

5) PrP^{Sc} 添加による細胞内候補分子の動態

各 N2a 細胞への外来 PrP^{Sc} 添加による細胞内候補分子の動態について検討した。添加する PrP^{Sc} として、PrP^{Sc} 持続感染細胞である scN2a 細胞の細胞溶解液を用い、コントロールとして非感染 N2a 細胞溶解液を用いた。添加する scN2a 細胞溶解液量および添加後の時間経過を変化させ、細胞

内の候補分子の量的動態をウエスタンブロット法を用いて検討した。

6) PrP^{Sc} 添加による細胞内候補分子の消失機序の検討

PrP^{Sc} を含む N2a 細胞溶解液添加により特異的に誘導される候補分子の消失機序について検討するため、プロテアソームおよびライソソームの機能阻害剤を用いて検討した。MFb2, E64D, ALLN, Lactasystin, Pepstatin A を scN2a 培養液中に添加し、その後に PrP^{Sc} を含む N2a 細胞溶解液を加えた。候補分子の動態の検出には候補分子特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法を用いた。

7) 候補分子過剰発現トランスジェニックマウス作成

候補分子が細胞中に多いほど PrP^{Sc} の感受性が高いことが上記研究で推察される。候補分子を PrP^{Sc} の病原性の迅速判定に用いるため候補分子高発現トランスジェニックマウスを作成した。ベクターには CAG プロモーターにより候補分子の発現が誘導される pCAGGS ベクターを用いた。

C. 研究結果

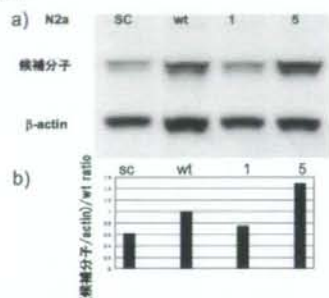
1) 2D DIGE を用いた検討の結果、N2a-1 および N2a-5 細胞間で発現に有意な差異のあるスポットを 68 検出した。

2) 回収したスポットに含まれるタンパク質を溶出し、LC/MS によりアミノ酸配列の決定を行い、data base 上でのマッチングを行った。その結果、N2a-5 細胞で発現が N2a-1 細胞に比べ発現が有意に高い 10 タンパク質が同定できた。

3) 同定可能であった 10 候補分子のうちの 1 候

補について、N2a-1、N2a-5 細胞とこれらの親細胞株である N2a および PrP^{Sc} 持続感染細胞 scN2a 細胞中での発現量を検討した。候補分子特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法を用いた。細胞数の補正には β -actin に対する抗体を用いて β -actin を検出し補正した。結果、2D DIGE で認められた結果と同様に N2a-5 細胞では N2a-1 細胞に比べ有意に高い発現であった (図 2)

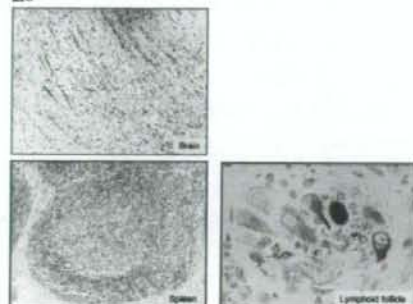
図2



さらに、親株である N2a 細胞は N2a-1 に比べ発現量は有意に高いが、その PrP^{Sc} 持続感染細胞である scN2a 細胞での候補分子の発現は N2a-1 細胞レベルであった。a) において実際のウエスタンブロットの結果を、b) ではコントロールである β -actin 量で補正した候補分子の発現量を示す。

4) 上記 3) において検討した候補分子特異的な抗体を用いた免疫組織染色の結果を図 3 に示す。候補分子は脳神経系で発現が強いことが明らかとなった。また、神経組織以外では、脾臓のリンパ濾胞の胚中心においても発現が確認された。

図3

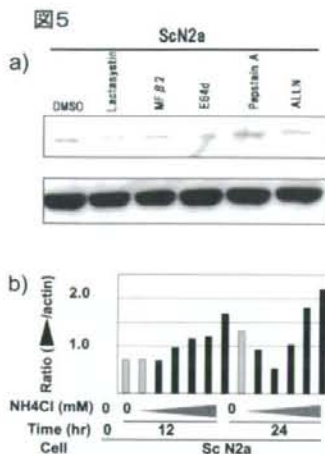


5) PrP^{Sc} を含む細胞溶解液添加後の候補分子の動態を図 4 に示す。PrP^{Sc} 持続感染細胞 scN2a 細胞の溶解液を作成し、N2a-5 および N2a-1 細胞培養液中に添加した。添加後 24、36、48 時間後の候補分子の量をウエスタンブロット法にて確認した。その結果、N2a-5 および N2a-1 細胞共に scN2a 細胞溶解液添加後の時間経過と共に候補分子の減少が認められた。候補分子は添加する scN2a 細胞溶解液量依存的に減少した。

図4

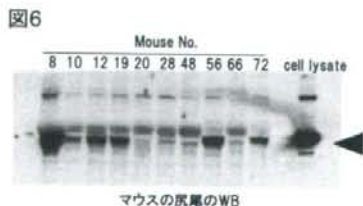


6) 上記 5) で認められた scN2a 細胞溶解液添加による候補分子の消失機序について検討した。scN2a では候補分子が N2a 細胞に比べ減少していることが明らかとなったため、プロテアソームおよびライソソームの阻害剤添加により scN2a での候補分子量が回復するか否かについて調べた。結果、ライソソームの阻害剤である pepstatin A 存在下で scN2a 細胞の候補分子量が回復することが明らかとなった (図 5 a)。また、pepstatin A とは別機序によりライソソームの活性を阻害する NH₄Cl を用いた実験でも、添加する NH₄Cl 濃度依存的に候補分子の量が回復することが明らかとなった (図 5 b)。



7) 上記までの研究により候補分子量が多いほど PrP^{Sc} に対する感受性が増強されることが明らかとなった。また、候補分子は PrP^{Sc} の細胞への取り込みに際し細胞内で消化されることが明らかとなり、PrP^{Sc} の感染に重要な働きを有することが示唆された。候補分子を PrP^{Sc} の病原性の迅速判定に用いるため候補分子高発現トランスジェニックマウスを作成した (図6)。

候補分子の発現には CAG プロモーターを用いた。マウス尻尾より抽出した細胞成分のウェスタンブロット法により候補分子の発現確認を行った。結果、候補分子の発現が有意に高いマウスを作成することができた。これらのマウスには異常は認められず、正常に発育することを確認した。



D. 考察

PrP^{Sc} に高感受性の N2a-5 および非感受性の N2a-1 細胞の比較検討から、発現に差異のある分子として 1 分子を同定し、その機能解析を行った。結果、候補分子の発現が多いほど PrP^{Sc} に対し感受性が高いことが明らかとなった。また、候補分子は PrP^{Sc} の感染に際し、その発現量が低下すること、また PrP^{Sc} の持続感染ではその発現が絶えず抑制されていることが明らかとなった。この PrP^{Sc} 感染による候補分子の発現低下はライソソームによる消化に由来することも明らかとなり、PrP^{Sc} の感染・維持に重要な機能を果たしていることが示唆される。

E. 結論

PrP^{Sc} の感染成立に重要な機能を果たすと考えられる分子を同定した。この候補分子の PrP^{Sc} の感染の成立とそれに続く維持における作用機序の解明には至っておらず、今後明らかにする。また、同定した分子を組み込んだトランスジェニックマウスの感染実験を早期に行い、PrP^{Sc} 病原性の早期診断系としての可能性について評価を行う。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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.* 2008, 366:657-63.
- Yamamoto T, Ushiki Y, Hara S, Hall WW, Tsukagoshi-Nagai H, Yokoyama T, Tagawa Y,

Sata T, Yamakawa Y, Kinoshita N, Tamura F, Hattori S, Irie S.: An advantageous method utilizing new homogenizing device BioMasher and a sensitive ELISA to detect bovine spongiform encephalopathy accurately in brain tissue. *J Virol Methods*. 2008, 149: 316-325.

- 3) Hosokawa T, Ono F, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Zanusso G, Takahashi H, Sata T, Sakudo A, Suguira K, Baj A, Toniolo A, Yoshikawa Y, Onodera T.: Distinct immunohistochemical localization in Kuru plaques using novel anti-prion protein antibodies. *Microbiol Immunol*. 2008;52:25-9.
- 4) Takada N, Horiuchi M, Sata T, Sawada Y.: Evaluation of methods for removing central nervous system tissue contamination from the surface of beef carcasses after splitting. *J Vet Med Sci*. 2008;70:1225-30.
- 5) Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S, Yokoyama T.: Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion*. 2008 Jul;2(3):123-8.
- 6) Kato K, Sawada Y.: Distribution of the Lingual Tonsils of Cattle Designated as Specified Risk Materials. *J. Vet. Med. Sci*. 70(3): 251-254, 2008

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし。

2. 実用新案登録

なし。

11. プリオン病の病態解析と マーカータンパクに関わる研究

研究分担者 山河芳夫 国立感染症研究所 細胞化学部

研究協力者 萩原健一、大内史子 (国立感染症研究所 細胞化学部)
寺尾恵治、小野文子 (医薬基盤研 霊長類研究センター)

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 BSE プリオンを接種したカニクイザルの体液 (血液、脳脊髄液及び尿) 中のタンパク質を網羅的に解析/同定し、vCJD/プリオン病の指標となるマーカータンパクを検索・同定あるいは分子病態解析を行う為に必要な技術の検討を行なった。検討事項とその結果を以下に列記した。1) アルブミン、IgG など体液中に大量に常在してプロテオーム解析の妨害となるタンパク質の除去法について検討し、複数の抗体を充填した multi-affinity カラムが有効であることが分かった。2) 常在タンパクを除去した血清/血漿を液相の等電点電気泳動装置で分画することで、タンパク質が比較的均等に分画され、効率的なプロテオーム解析が可能となることが期待された。3) トリプシン分解を $H_2^{18}O$ 中で行なう事により 2 個の ^{18}O を簡便に高効率でペプチドの C-末端に導入することが出来た。 H_2O 中でトリプシン分解を行なった異なる試料と混合して質量分析を行なう事により、異なる試料中の成分の相対含量の推定を簡単に行なう事が可能となった。

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に惹起されたと考えられているヒトのプリオン病である。本研究班の寺尾らは、vCJD の発症モデルとして霊長類 (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 のそれと比較しつつある。BSE プリオンを脳内接種された 3 匹のサルは接種から 2-4 年の潜伏期を経て発症して死亡した。いずれのサルもプリオン病に特有の神経症状を呈し、脳には vCJD に特有の 4 型の PrP^{Sc} の沈着が認められる事からこれらのサルが BSE の感染によってプリオン病を発症したことは明らかである。

本研究ではそれらのサルから経時的 (ほぼ 6 ヶ月おき) に採取し、保存した血液、脳脊髄液および尿などの試料中のタンパク質を網羅的に解析し、相互に比較することによって vCJD あるいはプリオン病の生前診断に有効な特異的なマーカー分子を探索する事、及び、プリオ

ン病の病態を分子論的に明らかにすることなどを目的とする。

B. 研究方法

1) 血漿・血清および脳脊髄液

医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにおいて BSE プリオンを接種したカニクイザルから、接種から発症/死にいたるまでほぼ 6 ヶ月おきサンプリングされた血漿・血清および脳脊髄液を用いた。

2) サンプル中の常在タンパクの除去

体液に多量に存在してプロテオーム解析の妨害となるアルブミン、IgG 等の常在タンパクはベックマン社のプロテオームラボ (マルチ抗体充填カラム) に吸着せしめて除去した。

3) タンパク質の予備分画

Invitrogen 社の液相等電点電気泳動分画装置 (zoom IEF fractionator) を用いて血清タンパク予備分画を行ない、pI 値の異なる (12/9.1, 9.1/7.0/, 0/6.2, 6.2/5.4, 5.4/4.6, 4.6/3.0) 6 つの分画に分離した。

4) 質量分析によるタンパク質の同定

タンパク質は、常法に従って、SH基を還元アルキル化した後にトリプシンで分解し、得られたペプチド混合物を LC-MS/MS で分析して同定した。なお、LCには 0.1mm X 150mm のキャピラリー-ODS カラム (G Lサイエンス社)、質量分析計は LCQ Deca(イオントラップ型 ESI-MS; Thermo-Fisher Sie.)を用いた。データの解析およびサーチは BioWorks (v.3.1)で行なった。

5) 質量分析における相対含量の比較

試料間における特定成分の含量を相対的に決定するために一方の試料については $H_2^{18}O$ 中でトリプシン分解を行なう事により (^{18}O Proteome Profiler; Sigma 社)ペプチドのC-末端に2個の ^{18}O を取り込ませ、通常に分解した試料と混合して質量分析を行なった。これにより、異なる資料中の同一成分の量比を4マス違いのピーク高の比として推定する事ができる。

C. 結果

1) multi-affinity column(Proteome-Lab)を用いる血漿中の常在タンパクの除去

カニクイザルの血漿(250 μ l)または脳脊髄液(100 μ l)を multi-affinity column (Proteome Lab: ベックマン社)のプロトコールに従って処理してカラムへの吸着/非吸着画分に分画し、それぞれについて SDS-PAGE (図1) で常在タンパク質除去効果のを検討した。図1に示す様に、いずれの試料においても血清アルブミンや IgG などの常在タンパクはカラム吸着画分に認められ、非吸着画分ではこれらのタンパク質は認められないか極端に減少していることがわかった。表1には脳脊髄液について、カラム吸着/非吸着画分に存在するタンパク質を LC-MS/MS で解析した結果について記した。その結果、カラム処理前のサンプルでは21種のタンパク質が同定されたが、その殆どはアルブミンや抗体などの常在タンパクに由来するものであった。しかし、非吸着画分を同様に分析すると、50~100種のタンパクが同定された。ちなみに、この中には血液の常在タンパクは含

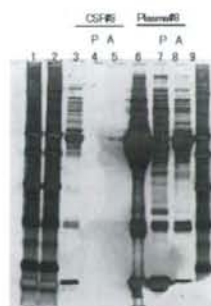


図1. 抗体充填カラムによるカニクイザルの血漿、脳脊髄液の除去効果
1,2,9: MWマーカー、3: カニクイザル脳脊髄液、4: 脳脊髄液非吸着画分、5: 脳脊髄液吸着画分、6: 血漿、7: 血漿非吸着画分、8: 血漿吸着画分

Sample	Volume (μ l)	Number of Identified proteins ¹⁾
CSF	5	21 (Alb, IgG etc.)
pass through fraction	15 ¹⁾	88
	30 ¹⁾	98
absorbed fraction	5 ¹⁾	15 ¹⁾

表1 常在タンパクの除去によるカニクイザル脳脊髄液中のタンパクの同定数の改善

吸着画分				
Protein	Score	Accession	Peptide (F/M)	
AP001001	101.2	U01001	46 (21/25)	
AP001002	99.1	U01002	7 (3/4)	
AP001003	85.1	U01003	2 (1/1)	
AP001004	78.1	U01004	2 (1/1)	
AP001005	75.1	U01005	1 (1/0)	

非吸着画分				
Protein	Score	Accession	Peptide (F/M)	
AP001006	100.2	U01006	26 (21/5)	
AP001007	98.2	U01007	18 (14/4)	
AP001008	95.2	U01008	6 (5/1)	
AP001009	92.2	U01009	5 (3/2)	
AP001010	89.2	U01010	3 (2/1)	
AP001011	86.2	U01011	2 (1/1)	
AP001012	83.2	U01012	1 (1/0)	
AP001013	80.2	U01013	1 (1/0)	
AP001014	77.2	U01014	1 (1/0)	
AP001015	74.2	U01015	1 (1/0)	
AP001016	71.2	U01016	1 (1/0)	
AP001017	68.2	U01017	1 (1/0)	
AP001018	65.2	U01018	1 (1/0)	
AP001019	62.2	U01019	1 (1/0)	
AP001020	59.2	U01020	1 (1/0)	

表2 カニクイザル脳脊髄液中のタンパクの定数(一部)

まれていなかった。(表2)

このような同定効率の大幅な改善は大量の常在タンパクが除かれた結果、微量のタンパクに由来するシグナルが検出できるようになった事によるものである。(図2)

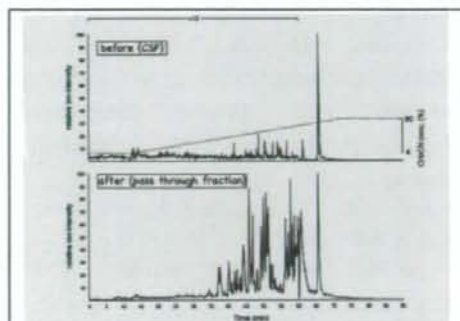


図2 常在タンパク除去による LC-MS/MS シグナルの改善

上: 脳脊髄液 5ul 相当のシグナル
下: 脳脊髄液 30ul 相当のシグナル

2) 血漿タンパクの液層等電点電気泳動

血清/血漿については、常在タンパクを除去したタンパク質をさらに液層の等電点電気泳動

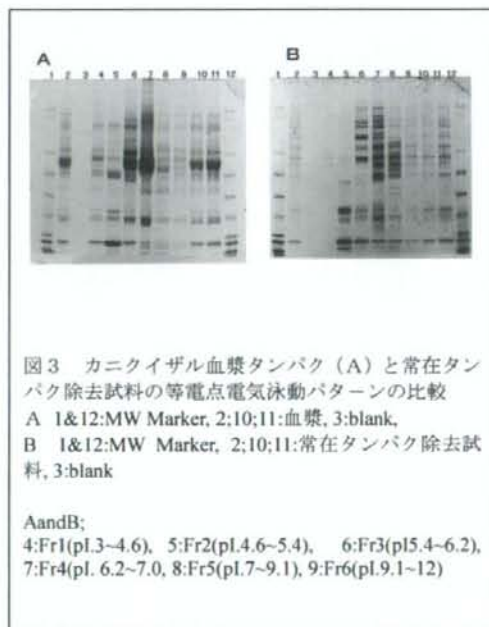


図3 カニクイザル血漿タンパク (A) と常在タンパク除去試料の等電点電気泳動パターンと比較

A 1&12:MW Marker, 2;10;11:血漿, 3:blank,
B 1&12:MW Marker, 2;10;11:常在タンパク除去試料, 3:blank

AandB;
4:Fr1(pI.3~4.6), 5:Fr2(pI.4.6~5.4), 6:Fr3(pI5.4~6.2),
7:Fr4(pI. 6.2~7.0, 8:Fr5(pI.7~9.1), 9:Fr6(pI.9.1~12)

動で pI 値に分画する事をこころみた。図3に示した様に、血清中に大量に存在していたアルブミンや免疫グロブリンなどが除かれた結果各画分にタンパク質が散在するようになり、解析に適した試料が調整できた。

3) proteome profiler による相対含量の比較

ペプチド C-末端 ^{18}O 導入試薬キット (proteome profiler) に添付のマニュアルにしたがって脳脊髄液を H_2^{18}O 存在/非存在でトリプシン分解を行ない、それぞれ 1:1, 3:1, 10:1 の混合物を Lc-MS/MS で分析し、定量性を検討した。その結果、図4に結果の一部をしめした。含量が低いペプチドの場合には量比の推定に若干の問題があるものの、多くの場合、混合比に応じたシグナルを与え、簡便な相対含量の推定が行なえる事が判った。

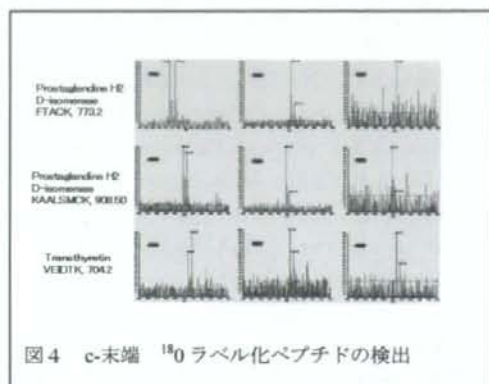


図4 c-末端 ^{18}O ラベル化ペプチドの検出

D/E. 考察・結論

プロテオーム解析は病態指標タンパクの検索・同定に有効な方法であるが、血液や脳脊髄液中に大量に常在するタンパク質に由来するペプチドが LC-MS/MS でタンパクを同定する際の妨げになっている。特に、血清ではアルブミンや免疫グロブリンなどの常在タンパク質は総タンパクの 90% に及んでおり、これらの常在タンパクの簡便で効率的な除去法が求められている。本年度は、血清注の 12 種の常在タンパクに対する抗体を充填した multi-affinity カラムによる一括除去を試みた。その結果、カラムへの非吸着画分の SDS-電気泳動法や質量分析による分析では常在タンパクの殆どが除かれており、multi-affinity カラムが血清の常在タンパクを高効率で簡便に除去する方法として有効なことが判った。さらに、常在タンパクを除去した血清タンパク質を液相の等電点電気泳動泳動で分画することで再現性良く pI 値に応じて分画する事が可能となった。このことは、常在タンパクの除去する効果と相俟って、試料中の指標タンパクの相対濃度を高めるこ

とになり、目的タンパク検出の確立を高めるものと考えられる。また、一方の試料を $H_2^{18}O$ 中でトリブシン分解を行ない、 H_2O 中で分解した試料中の同一成分のピークと比較する事により相対含量が簡単に比較できる事もわかった。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T.Yamamoto, Y.Ushiki, S.Hara, W.W.Hall, H.Tsukagoshi-Nagai, T.Yokoyama, U.Tagawa, T.Sata, Y.Yamakawa, N.Kinoshita, F.Tamura, S.Hattori and S.Irie: An advantageous method utilizing new homogenizing device BioMasher and a sensitive ELISA to detect bovine spongiform encephalopathy accurately in brain tissue. *J.Virological Methods*, 149:316-325, 2008.
- 2) Y.Nakamura, Y.Yamakawa, K.Hanada, K.Tanaka, M.Miura, I.Tanida, N.Nishizima, K.Hagiwara: Synthetic fibril peptide promotes clearance of scrapie prion protein by lysosomal degradation. *Microbio Immunol*, 52: 357-365,2008
- 3) K.Masujin, Yujing Shu, Y.Yamakawa, K.Hagiwara, T.Sata Y.Matsuura, Y.Iwamura, M.Imamura, H.Okada, S.Mohri and Y.Yokoyama: Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in japanese black beef cattle. *Prion* 2:3, 123-128,2008.

2. 学会発表

- 1) K.Masujin, Yujing Shu, Y.Yamakawa, K.Hagiwara, T.Sata Y.Matsuura, Y.Iwamura, M.Imamura, M.Kurauchi, Y.Shimizu, K.Kasai, H.Okada, S.Mohri and Y.Yokoyama: Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in japanese black beef cattle. *Prion* 2008, October8-11,

Madrid.

- 2) H.Furuoka, H.Horiuchi, Y.Yamakawa and T.Sata: Cerebellar Pathology in Guinea Pig Infected with Bovine Spongiform Encephalopathy. *Prion* 2008, October8-11, Madrid.
- 3) 舩甚賢太郎, 舒宇静, 山河芳夫, 萩原健一, 佐多徹太郎, 松浦裕一, 岩丸祥史, 今村守一, 岡田洋之, 毛利資朗, 横山隆: わが国で認められた非定型BSE (BSE/JP24) プリオンの性状解析 2008年プリオン研究会 2008.8.29-30 新得

12. トランスクリプトームによるプリオン病の病態解析

研究分担者 堀内 基広 北海道大学大学院 獣医学研究科

研究協力者 酒井 景子、宋 昌絃（北大大学院・獣医学研究科）

研究要旨 プリオン感染動物の神経病変形成機構を解析する目的で、プリオン Obihiro 株および Chandler 株接種マウスの延髄前庭核付近における宿主遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析した。接種後 60、74、90 日における遺伝子発現の変化を調べた結果、Obihiro 株および Chandler 株接種マウスともに潜伏期が 150 日程度であり、病末期にはこの領域に著しい PrP^{Sc} の沈着が認められるにもかかわらず、宿主遺伝子の発現変化は Obihiro 株感染マウスよりも Chandler 株感染マウスでより早期から検出された。接種後 60 日から 90 日にかけて発現が増加した遺伝子群のなかで、文献的にミクログリアで発現する遺伝子を選択したところ、Ccl5, Ccl9, Cxcl10, Fcgr1, Tlr2 などモノサイト/マクロファージの M1-type の活性化のマーカーとなるケモカイン等の発現が優勢であった。また、Chandler 株感染マウスで接種後 60 日から発現が上昇していた Cd14, Obihiro 株および Chandler 株感染マウスともに接種後 74 日に発現上昇が認められた Cxcl10 の遺伝子欠損マウスを用いてプリオン感染実験を行った。その結果、Cd14 欠損マウスでは、Obihiro 株および Chandler 株ともに、野生型マウスと比較して有意に潜伏期が延長したことから、Cd14 分子は病気の進行に促進的に働くことが示唆された。また、Cxcl10 欠損マウスでは、帯広株感染マウスでのみ、潜伏期が有意に短縮した。今後、前庭核以外の領域での遺伝子発現変化を解析するとともに、Cd14 マウスでの病態解析を進める予定である。

A. 研究目的

プリオン感染動物の中樞神経系組織では、プリオンの増殖に伴い、ミクログリアおよびアストロサイトが増生し、病気の進行に伴い神経細胞の変性や神経網の空胞化が認められる。プリオンの増殖に反応して増生するグリア細胞からは、種々のサイトカインやケモカインが放出され、これらが、病態の進行に促進的あるいは抑制的に働くことが予測されるが、その実態は明らかではない。特に感染初期に起こる応答は病気の進行に抑制的に働くことが予測される。感染後期の病変部位では、神経変性が進んだ部位と、神経変性がそれほど進んでいない部位が混在するために、プリオンの増殖により引き起こされる宿主の応答、特に感染後早期におこる変化を解析することはできない。そこで、プリオン接種後、比較的早期から PrP^{Sc} の蓄積が認められる延髄前庭核に注目して、接種後 60~90 日における宿主遺伝子発現解析を実施した。また、接種後比較的早期から発現が増加した遺伝子の中から、Cd14 と Cxcl10 遺伝子に注目し、これらの遺伝子産物とプリオン病の病態との関連を解析する目

的で、これら遺伝子の欠損マウスを用いた感染実験を行った。

B. 研究方法

1) マウスおよびプリオン株: マウス順化プリオン Obihiro 株および Chandler 株感染マウスの 10% 脳乳剤 20 μ l を Jcl:ICR マウスの脳内に接種した。接種後 60、74、90 日の時点で、実態顕微鏡下で、延髄前庭核付近の領域を採材した。

Cd14, Cxcl10 欠損マウスは Jackson Laboratories から購入した。C57B6/J マウスは日本クレアから購入した。これらのマウスには Obihiro 株および Chandler 株感染 C57B6/J マウスの脳乳剤(2.5%, 20 μ l)を脳内接種した。

2) DNA マイクロアレイ解析: 採材した組織から 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。データーは、GCOS

(Affymetrix) および Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて解析した。

3) PrP^{Sc}の検出: 定法に従い、ウエスタンブロットおよび免疫組織化学により PrP^{Sc}を検出した。

(倫理面への配慮)

プリオンを用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている(実験番号 2006-141)。また、動物実験は北海道大学の実験動物委員会にて承認された動物実験計画書(実験番号 8039, 8040, 8047)に従って実施した。

C. 研究結果

図1に、Chandler 株および Obihiro 株感染マウスの延髄前庭核付近で、感染後 60-90 日にかけて発現が上昇する遺伝子のうち、ミクログリアで発現することが報告されている遺伝子を示した。Aif1 はミクログリアのマーカーとして汎用されている Iba-1 をコードする遺伝子であり、接種後 60 日の時点で、既に Aif1 の遺伝子発現は上昇していた。Chandler 株感染マウスでより早期から発現が上昇している傾向が認められた。免疫組織化学では、接種後 60 日の時点では、前庭核付近で Chandler 株と Obihiro 株感染マウスの間で Iba-1 陽性細胞に顕著な差は認められなかったが、接種後

74 日の時点では、前庭核付近における Iba-1 陽性細胞の存在は Chandler 株感染マウスで Obihiro 株感染マウスよりも多い傾向が認められた(結果は示さず)。また、アストロサイトのマーカーである Gfap 遺伝子の発現も接種後 60 日の時点で既に上昇していた。

ミクログリアで発現することが報告されている遺伝子のうち、Ccl5, Ccl9, Cxcl10, cxcl16, Fcgr1, Fcgr3, Tlr2 は M1-type のモノサイト/マクロファージの活性化の指標となる分子である。M2-type の活性化の指標となる分子(Cd14, Fcgr2b)も発現上昇が認められているが、M1-type の反応が亢進している傾向にあると考えられた。

また、感染後早期から発現に変化が認められた遺伝子のうち、Cd14 および Cxcl10 の 2 種の分子に着目し、これらの分子の病態機序への関与について検討するために、これらの遺伝子の欠損マウスを用いて感染試験を行った。Cd14 は LPS のレセプターであり、LPS 刺激によるミクログリアの活性化は神経軸索の Wallerian 変性後の炎症性反応を亢進させ、神経変性の誘因となることが知られている。また、Cxcl10 はウイルス性脳炎において神経保護作用を発揮することが知られている。これら遺伝子の欠損マウスに Chandler 株および Obihiro 株を接種したところ、Cd14 マウスでは、野生型マウスと比較して、両株ともに有意に潜伏期が延長した(表1)。病末期では Cd14 欠損マウ

Gene name	Gene symbol	Obihiro(dpi)			Chandler(dpi)		
		60	74	90	60	74	90
allograft inflammatory factor 1	Aif1	0.6	0.7	1.0	1.1	1.4	1.1
complement component 1, q subcomponent, beta	C1qb	1.0	1.3	1.4	1.8	1.4	2.0
chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	N	N	N	N	1.3	1.3
chemokine (C-C motif) ligand 6	Ccl6	N	N	0.8	N	1.3	1.3
chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	N	0.9	0.9	1.9	1.3	1.3
CD14 antigen	Cd14	N	0.6	0.9	1.0	1.6	1.1
CD44 antigen	Cd44	N	N	N	N	1.1	1.6
CD68 antigen	Cd68	N	0.8	1.2	N	1.6	1.1
Cathepsin H	Ctsh	N	N	0.6	N	1.0	1.3
Cathepsin S	Ctss	0.6	0.9	1.3	1.4	1.3	1.8
Fc gamma receptor I	Fcgr1	N	1.3	1.1	N	1.2	1.5
Fc gamma receptor IIb	Fcgr2b	N	N	1.2	N	N	1.7
Fc gamma receptor III	Fcgr3	0.7	0.9	1.2	1.1	1.4	1.8
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Cxcl10	N	1.0	1.3	N	1.8	1.6
chemokine (C-X-C motif) ligand 13	Cxcl13	N	1.0	1.0	1.5	1.3	1.1
chemokine (C-X-C motif) ligand 16	Cxcl16	N	N	N	N	N	1.6
Toll like receptor 2	Tlr	N	0.9	N	N	1.8	1.5
glial fibrillary acidic protein	Gfap	0.7	1.3	1.3	1.6	1.3	1.3

図1. プリオン感染に伴う遺伝子発現の変化

Obihiro株およびChandler株接種マウスの前庭核付近における遺伝子発現の変化を、接種後60、74、90日の時点で、DNAマイクロアレイにより解析した。数字は非感染マウス脳乳剤を接種したマウスと比較した場合の、遺伝子発現量の変化(上昇、2の累乗)を示す。Nは変化が認められなかったことを示す。Gfap以外の遺伝子は文献的にミクログリアでの発現が報告されている遺伝子。

スと野生型マウスの間で PrP^{Sc} の蓄積量は差は認められなかったが、接種後 120 日の時点では、Cd14 欠損マウスでの PrP^{Sc} 蓄積量は野生型マウスの 50-70%程度であった (図 2)。また Cxcl10 欠損マウスでは、Chandler 株で潜伏期が有意に短縮した (表 1)。Obihiro 株接種マウスでは潜伏期が短縮する傾向は認められたものの、有意な差ではなかった。従って、これらの因子はプリオン病の病態機序に、何らかの形で関与すると考えられた。

表 1. Cd14, Cxcl10欠損マウスでの潜伏期

プリオン株	マウス	n	潜伏期(日)	p	
				Log-rank	Wilcoxon
Chandler	WT	11	154.5 ± 6.0	-	-
	Cxcl10 ^{-/-}	9	149.7 ± 8.8	0.494	0.148
	Cd14 ^{-/-}	6	160.7 ± 4.0	0.012*	0.022*
Obihiro	WT	9	160.2 ± 7.1	-	-
	Cxcl10 ^{-/-}	7	153.3 ± 3.9	0.017*	0.038*
	Cd14 ^{-/-}	10	172.3 ± 4.8	<0.001*	<0.001*

D. 考察

プリオン接種後、免疫組織化学により前庭核で PrP^{Sc} が僅かに検出され始める時期である接種後 60 日に、遺伝子レベルではアストロサイトおよびミクログリアの反応が検出できたことから、プリオンの増殖に対して、宿主は感染後早期から応答していることが明らかとなった。文献的にミクログリアで発現が報告されている遺伝子を選抜したところ、この時期のミクログリアの応答は M1-type の応答が優勢であることが示唆された。現在、部位による違いや継時的な変化の解析を進めている。

Cd14 欠損マウスでは野生型マウスと比較して、Obihiro 株および Chandler 株ともに潜伏期が延長したことから、Cd14 分子は病気の進行に促進的に働くことが示唆された。Cd14 分子は LPS のレセプターであり、自然免疫のトリガーとして働く。実験的に Wallerian 変性を起こしたマウスに LPS を投与すると、IL-1β や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が増大し、神経変性が進むことが報告されている。プリオン感染後期には IL-1β や IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が上昇することから、プリオン感染のある時期にミクログリアに発現した Cd14 に何らかの刺激が入り、ミクログリアが過度に活性化して、病態が増悪する可能性がある。今後、プリオンを接種した Cd14 欠損マウスと野生型マウスからミクログリアを分離して、ミクログリアの遺伝子発現を調べ、Cd14 分子が関与するミクログリアの機能と病態との

関係について解析を進める予定である。

E. 結論

プリオン感染後の比較的早期(接種後 60 日程度)

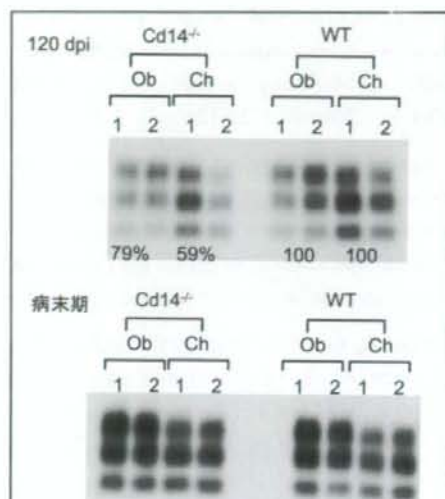


図 2. Cd14欠損マウスでのPrP^{Sc}の蓄積
接種後120日(120 dpi)と病末期におけるPrP^{Sc}の蓄積量を野生型マウスと比較した。Ob, Obihiro株; Ch, Chandler株。接種後120日では、Cd14欠損マウスでのPrP^{Sc}の蓄積量は野生型マウスと比較して少ない(Obihiro株で79%, Chandler株で58%)。

から、プリオンの増殖に応答して、ミクログリアおよびアストロサイトが活性化することが明らかとなった。この時期のミクログリアは M1-type の応答が充進していると考えられた。また、遺伝子欠損マウスを用いた感染実験の結果から、Cd14 は病気の進行に促進的に働くこと、Cxcl10 は病気の進行に抑制的に働くことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Song C-H, Furuoka H, Kim C-L, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi, M. Intraventricular infusion of anti-PrP mAb antagonized PrP^{Sc} accumulation and delayed disease progression in prion-infected mice. J. Gen. Virol. 2008;89:1533-1544.
- 2) Muramatsu Y, Sakemi Y, Horiuchi M, Ogawa T, Suzuki K, Kanameda M, Tran Thi Hanh TT, and Tamura Y. Frequencies of PRNP gene

polymorphisms in Vietnamese dairy cattle for potential association with BSE. *Zoonoses Public Health*. 2008;55:267-273.

- 3) Takada N, Horiuchi M, Sata T, and Sawada Y. Evaluation of methods for removing central nervous system tissue contamination from the surface of beef carcasses after splitting. *J. Vet. Med. Sci.* 2008;70:1225-1230.
- 4) Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H, and Watarai M. Heat shock cognate protein 70 contribute Brucella invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol.* 2008; 8:212.
- 5) Shindoh R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, and Horiuchi M. The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. *J. Virol.* in press.
- 6) 堀内 基広. プリオンの増殖とその抑制. ウイルス感染症セミナー. 2008;10:13-25.

2. 学会発表

- 1) Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, and Horiuchi M. Migration of mesenchymal stem cells to brain lesions of prion disease. *Prion2008* (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 2) Furuoka H, Horiuchi M, and Sata T. Pathology in guinea pig infected with bovine spongiform encephalopathy. *Prion2008* (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 3) Shindo R, Kim C-L, Song C-H Hasebe R., and Horiuchi M. Conformational stability and infectivity of protease-resistant prion protein derived from the Chandler strain. *Prion2008* (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 4) Yamasaki T, Uryu M, Nakamitsu S, and Horiuchi M. Localization of disease-specific prion protein in prion-infected cells. *Asian-African Research forum on Emergig and Reemerging Infection.* (Dec. 15-16, 2008, Sapporo, Japan)
- 5) Horiuchi M and Yamazaki T. Intracellular Localization of Disease-Specific Prion Protein. *Symposium on emerging and reemerging infectious diseases* (Feb. 17, 2009, Yokyo)
- 6) 宋昌鉉, 本望修, 古岡秀文, 長谷部理絵, 堀

内基広. プリオン感染マウス脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態. *プリオン研究会 2008* (2008年8月29-30日, 新得)

- 7) 山崎剛士, 瓜生匡秀, 中満智史, 堀内基広. 間接蛍光抗体法によるプリオン持続感染細胞に存在する PrP^{Sc} の検出. *プリオン研究会 2008* (2008年8月29-30日, 新得)
- 8) 鈴木章夫, 山崎剛士, 堀内基広. PrP-Fc 融合蛋白質と PrP^{Sc} の結合条件の検討. *プリオン研究会 2008* (2008年8月29-30日, 新得)
- 9) 堀内 基広, 瓜生 匡秀, 山崎 剛士, 中満智史, 長谷部 理絵. マウス神経芽腫細胞 Neuro2a におけるプリオンの細胞間伝播にはエクソソーム以外の因子が関与する. 第 146 回日本獣医学会 (2008年9月24-26日, 宮崎)
- 10) 宋昌鉉, 長谷部理絵, 堀内基広. プリオン感染マウス脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態. 第56回日本ウイルス学会 (2008年10月26-28日, 岡山)
- 11) 山崎剛士, 瓜生匡秀, 中満智史, 堀内基広. 間接蛍光抗体法によるプリオン持続感染細胞に存在する PrP^{Sc} の検出. 第56回日本ウイルス学会 (2008年10月26-28日, 岡山)
- 12) 堀内基広, 長谷部理絵. PrP^{Sc} の aa 81 - aa 137 の領域はプリオンの感染性に必須である. 第56回日本ウイルス学会 (2008年10月26-28日, 岡山)

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