

- 6) Prusiner SB: Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13363-13383, 1998
- 7) Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K: NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23-231). *FEBS Lett* **413**: 282-288, 1997
- 8) Prusiner SB: Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**: 1515-1522, 1991
- 9) Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, et al: Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10962-10966, 1993
- 10) Prusiner SB: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136-144, 1982
- 11) Prusiner SB: Early evidence that a protease-resistant protein is an active component of the infectious prion. *Cell* **116**: S109, 1 p following S113, 2004
- 12) Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, et al: Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**: 1339-1347, 1993
- 13) Prusiner SB, Groth D, Serban A, Koehler R, Foster D, et al: Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10608-10612, 1993
- 14) Sakaguchi S, Katamine S, Shigematsu K, Nakatani A, Moriuchi R, et al: 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**: 7586-7592, 1995
- 15) Manson JC, Clarke AR, McBride PA, McConnell I, Hope J: PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration* **3**: 331-340, 1994
- 16) Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C: *In vitro* generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**: 195-206, 2005
- 17) Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, et al: Structural clues to prion replication. *Science* **264**: 530-531, 1994
- 18) Lansbury PT: Mechanism of scrapie replication. *Science* **265**: 1510, 1994
- 19) Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, et al: The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**: 257-261, 2005
- 20) DeArmond SJ, Prusiner SB: Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am J Pathol* **146**: 785-811, 1995
- 21) Pattison IH: Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. *Vet Rec* **77**: 1388-1390, 1965
- 22) Williams ES: Chronic wasting disease. *Vet Pathol* **42**: 530-549, 2005
- 23) Campana V, Sarnataro D, Zurzolo C: The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol* **15**: 102-111, 2005
- 24) Leucht C, Simoneau S, Rey C, Vana K, Rieger R, et al: The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP (Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep* **4**: 290-295, 2003
- 25) Trevitt CR, Collinge J: A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain* **129**: 2241-2265, 2006
- 26) Sakaguchi S: Recent developments in therapeutics for prion diseases. *Expert Opin Ther Patents* **18**: 35-59, 2008
- 27) Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, et al: Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**: 871-874, 2003
- 28) Daude N, Marella M, Chabry J: Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J Cell Sci* **116**: 2775-2779, 2003
- 29) Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, Hofmann A, Mitteregger G, et al: Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest* **116**: 3204-3210, 2006
- 30) Sakaguchi S: Molecular biology of prion protein and its first homologous protein. *J Med Invest* **54**: 211-223, 2007
- 31) Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, et al: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* **412**: 739-743, 2001
- 32) Enari M, Flechsig E, Weissmann C: Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9295-9299, 2001
- 33) Kim CL, Karino A, Ishiguro N, Shinagawa M, Sato M, et al: Cell-surface retention of PrPC by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. *J Gen Virol* **85**: 3473-3482, 2004
- 34) Perrier V, Solassol J, Crozet C, Frobert Y, Mourton-Gilles C, et al: Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPC degradation. *J Neurochem* **89**: 454-463, 2004
- 35) Song CH, Furuoka H, Kim CL, Ogino M, Suzuki A, et al: Effect of intraventricular infusion of anti-prion protein monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice. *J Gen Virol* **89**: 1533-1544, 2008
- 36) Lefebvre-Roque M, Kremmer E, Gilch S, Zou WQ, Feraudet C, et al: Toxic effects of intracerebral PrP antibody administration during the course of BSE

- infection in mice. *Prion* **1**: 198-206, 2007
- 37) Solforosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, et al: Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis *in vivo*. *Science* **303**: 1514-6, 2004
  - 38) Meier P, Genoud N, Prinz M, Maissen M, Rulicke T, et al: Soluble dimeric prion protein binds PrP (Sc) *in vivo* and antagonizes prion disease. *Cell* **113**: 49-60, 2003
  - 39) Genoud N, Ott D, Braun N, Prinz M, Schwarz P, et al: Antiprion prophylaxis by gene transfer of a soluble prion antagonist. *Am J Pathol* **172**: 1287-1296, 2008
  - 40) Kimberlin RH, Walker CA: The antiviral compound HPA-23 can prevent scrapie when administered at the time of infection. *Arch Virol* **78**: 9-18, 1983
  - 41) Gilch S, Winklhofer KF, Groschup MH, Nunziante M, Lucassen R, et al: Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP (Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J* **20**: 3957-3966, 2001
  - 42) Supattapone S, Wille H, Uyechi L, Safar J, Tremblay P, et al: Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol* **75**: 3453-3461, 2001
  - 43) Caughey B, Race RE: Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by Congo red. *J Neurochem* **59**: 768-771, 1992
  - 44) Caspi S, Halimi M, Yanai A, Sasson SB, Taraboulos A, et al: The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J Biol Chem* **273**: 3484-3489, 1998
  - 45) Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, et al: Styrylbenzazole derivatives for imaging of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Neurochem* **99**: 198-205, 2006
  - 46) Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, et al: 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**: 12889-12898, 2007
  - 47) Forloni G, Iussich S, Awan T, Colombo L, Angeretti N, et al: Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10849-10854, 2002
  - 48) Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B: Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12117-12122, 1998
  - 49) Ertmer A, Gilch S, Yun SW, Flechsig E, Klebl B, et al: The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrPSc in prion-infected cells. *J Biol Chem* **279**: 41918-41927, 2004
  - 50) Nordstrom EK, Luhr KM, Ibanez C, Kristensson K: Inhibitors of the mitogen-activated protein kinase 1/2 signaling pathway clear prion-infected cells from PrPSc. *J Neurosci* **25**: 8451-8456, 2005
  - 51) Kuwata K, Nishida N, Matsumoto T, Kamatari YO, Hosokawa-Muto J, et al: Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11921-11926, 2007
  - 52) Doh-ura K, Ishikawa K, Murakami-Kubo I, Sasaki K, Mohri S, et al: Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* **78**: 4999-5006, 2004
  - 53) Rainov NG, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Vighetto A, Doh-Ura K: Experimental treatments for human transmissible spongiform encephalopathies: is there a role for pentosan polysulfate? *Expert Opin Biol Ther* **7**: 713-726, 2007
  - 54) Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, Furukawa H, Takahashi, M et al: Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **17**: 158-163, 2004
  - 55) Dhar S, Bitting RL, Rylova SN, Jansen PJ, Lockhart E, et al: Flupirtine blocks apoptosis in batten patient lymphoblasts and in human postmitotic CLN3- and CLN2-deficient neurons. *Ann Neurol* **51**: 448-466, 2002
  - 56) Perovic S, Schroder HC, Pergande G, Ushijima H, Muller WE: Effect of flupirtine on Bcl-2 and glutathione level in neuronal cells treated *in vitro* with the prion protein fragment (PrP106-126). *Exp Neurol* **147**: 518-524, 1997
  - 57) Otto M, Cepek L, Ratzka P, Doehlinger S, Boekhoff I, et al: Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD: A double-blind study. *Neurology* **62**: 714-718, 2004

#### お知らせ

本誌は「脳と神経」誌、「神経研究の進歩」誌の統合誌です。雑誌略称は、和文欧文とも「Brain Nerve」になります。  
「BRAIN and NERVE」編集部

# 班会議プログラム

# 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 21 年度班会議プログラム

開催日	平成 22 年 1 月 9 日 (土)
時間	14:00~18:00
場所	鹿児島大学工学部 稲盛会館会議室 〒890-8580 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24
プ ロ グ ラ ム	
14:00~	—開会挨拶— 調 漸 先生 (長崎大学)
—成果報告— *1人発表時間・20分+質疑応答・10分の合計30分予定	
14:10~	藤田 浩司 先生 (徳島大学疾患酵素学研究中心神経変性疾患研究部門) 研究協力者 「抗プリオン抗体発現ミクログリアを接種したプリオン感染マウスの解析」
14:40~	橋口周平 先生 (鹿児島大学大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻) 分担研究者 「プリオンの結晶解析に向けたβ型プリオン蛋白特異的ヒト抗体の調製法の検討」
15:10~	山中 仁木 先生 (長崎大学先端生命科学研究支援センター比較動物医学分野) 「DNA ワクチンおよび新規免疫源を用いたプリオン病の予防および治療法の検討」
15:40~15:50	【 休 憩 】
15:50~	石橋 大輔 先生 (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 「プリオンは宿主の自然免疫機構を回避することで持続感染する」
16:20~	佐藤 克也 先生 (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 「ヒトプリオン病における免疫反応」
16:50~	新 竜一郎 先生 (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 「Real-time QUIC 法 (QUaking-Induced Conversion) によるクロイツフェルト・ヤコブ病患者由来髄液中の PrP <sup>Sc</sup> の検出」
17:05~	布施 隆行 先生 (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 「プリオン株における細胞指向性」
17:20~	—討議— 調 漸 先生 「今後の研究展開について」
17:50~	—閉会挨拶— 杉村 和久 先生 (鹿児島大学)

演 者： ○藤田 浩司, 坂口 末廣

所 属： 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

演題名： 抗プリオン抗体発現ミクログリアを接種したプリオン感染マウスの解析

#### 【目的】

Sh3.9 抗プリオンモノクロナル抗体は、プリオン感染細胞において抗プリオン活性を示す。従って、Sh3.9 抗体はプリオン病の治療に有効であると考えられる。しかし、抗体は分子サイズが大きいため、Sh3.9 抗体を感染マウスの脳室内に直接注入しても、脳室周辺の病変が改善するのみで、生存期間の延長は認められない。従って、抗体を脳全体にデリバリーするシステムの開発が必要である。ミクログリアはプリオン病の病変に集積する。このことは、ミクログリアが抗体の脳内デリバリーの担体として有用である可能性を示唆している。そこで我々は、Sh3.9 抗体 single chain Fv (Sh3.9scFv) を発現するミクログリア細胞株を樹立し、その抗プリオン活性についてプリオン感染マウスを用いて検討した。

#### 【方法】

Sh3.9scFv 発現ミクログリア細胞株 (Ra2) の樹立：レンチウイルスベクターを用いて Sh3.9scFv と GFP 遺伝子を Ra2 に導入した scFv/GFP-Ra2 を樹立した。コントロールとして、GFP 遺伝子のみを導入した GFP-Ra2 を樹立した。

抗プリオン活性の解析：Chandler または 22L プリオンの異なる感染時期 (感染前、感染中期、感染後期) に Ra2、GFP-Ra2、scFv/GFP-Ra2、及び PBS を脳内に接種し、その生存期間を観察した。

#### 【結果・考察】

scFv/GFP-Ra2 をプリオン感染前に脳内に接種すると、Ra2 及び GFP-Ra2 に比して、Chandler 株感染マウスの生存期間は有意に延長した。しかし、22L 株感染マウスの生存期間は延長しなかった。Chandler 株は脳を病変の主座とするが、22L 株は小脳を主にターゲットとする。従って、脳に接種した scFv/GFP-Ra2 は病変の主座が脳である Chandler 株には効果を発揮したが、小脳を主座とする 22L 株には効果がなかった可能性が考えられる。一方、感染中期及び後期における scFv/GFP-Ra2 の接種では、Chandler 株及び 22L 株感染マウスともに生存期間の延長は認められなかった。これは、scFv/GFP-Ra2 における Sh3.9scFv の発現量が十分でなかったために、感染が進行した中期及び後期では抗プリオン活性が認められなかったと考えられた。実際、scFv/GFP-Ra2 では、Sh3.9scFv mRNA の発現は検出できたが、蛋白発現は確認できていない。以上の結果は、scFv/GFP-Ra2 では Sh3.9scFv の低発現のために僅かな抗プリオン活性しか認められなかったが、ミクログリア細胞株を用いた抗プリオン抗体の脳内デリバリーは有効である可能性を示した。しかし、感染前及び中期に Ra2 を接種された Chandler 株感染マウスの生存期間は、PBS 接種に対して有意に短縮した。この結果は、Ra2 がプリオンの病原性を増悪させる可能性を示した。

#### 【結論】

ミクログリア細胞株 Ra2 を用いて脳内にデリバリーした Sh3.9scFv は、Chandler プリオンに対して抗プリオン効果を発揮した。しかし、Ra2 はプリオン病を増悪させる可能性があり、今後、プリオンの病原性を増悪させない新規の担体の検索が必要である。

文 献：なし

演 者： ○橋口周平, 久保田俊也, 濱添勇太, 朝田俊秀, 杉村和久

所 属： 鹿児島大学 大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻

演題名： プリオンの結晶解析に向けた $\beta$ 型プリオン蛋白特異的ヒト抗体の調製法の検討

抄 録：

【目的】ヒト一本鎖 (scFv) 抗体を提示しているファージディスプレイライブラリーを用いて作製された $\beta$ 型プリオン蛋白 (b-PrP) に特異的ヒト抗体 (PRB7) と b-PrP 複合体の X 線結晶構造解析等の構造解析を行うために、PRB7 scFv 抗体から IgG 抗体へのエンジニアリングとその発現系の構築を試みた。

【方法】PRB7 の VH 遺伝子を IgG1, IgG2 および IgG3 鎖の定常領域と連結、VL 遺伝子は $\kappa$ 鎖の定常領域と連結させ、作製した PRB7 の H 鎖遺伝子および L 鎖遺伝子を、動物細胞発現ベクターである pcDNA3.1 (Invitrogen 社) に組み込んだ。抗体発現系には、ヒト胎児腎細胞由来である Free-style-293F 細胞 (Invitrogen 社) を用いた。

【結果および考察】H 鎖 (IgG1, IgG2 および IgG3) 発現ベクターと L 鎖発現ベクターをモル比 1:1 で Free-style 293F 細胞にトランスフェクト後、経時的に細胞および培養上清を回収し、dot-blotting 法により H 鎖および L 鎖の発現を解析した。その結果、すべての IgG クラスにおいて、細胞溶解液中および培養上清中双方において経時的な H 鎖および L 鎖の発現が認められた。細胞内での発現は3日目をピークに減少し、培養液中での H 鎖の発現は培養 5-7 日目がピークであった。ゲルろ過カラムを用いて培養上清から精製した IgG 抗体の性状を解析したところ、全ての IgG サブクラスで、ジスルフィド結合を介さない多量体が認められた。一方、ELISA 法にて精製した PRB7 IgG 抗体の結合特異性を解析したところ、PRB7 IgG1 抗体が $\beta$ 型プリオン蛋白のみに結合し、高い特異性を示した。

PRB7 scFv 抗体を大腸菌の封入体として発現させた昨年度の結果では、リフォールディングにより正しくフォールディングした scFv 抗体を作製できたが、PRB7 の特異性があいまいになり、 $\beta$ 型プリオン蛋白だけでなく、正常型プリオン蛋白質への結合も認められた。これまでの抗体構造と特異性の研究から、抗体の定常領域が微小な抗原特異性の変化に寄与することが明らかとなっている (Trends Immunol 29, 91-7, 2008) が、以上の結果より、PRB7 の VH 遺伝子を IgG1 の定常領域、VL 遺伝子を $\kappa$ 鎖の定常領域と連結させることで、 $\beta$ 型プリオン蛋白への特異性、選択性の高い PRB7 IgG1 抗体の大腸菌による発現系を確立できることが示唆された。

文 献：なし

演 者： ○山中仁木<sup>1)</sup>， 西田教行<sup>2)</sup>， 新竜一郎<sup>2)</sup>， 石橋大輔<sup>2)</sup>， 佐野和憲<sup>2)</sup>

所 属： 1) 長崎大学 先端生命科学研究支援センター 比較動物医学分野  
2) 感染分子解析学分野

演題名： DNA ワクチンおよび新規免疫源を用いたプリオン病の予防および治療法の検討

抄 録：

近年、抗プリオン抗体産生誘導を目的としたプリオンワクチン開発がなされてきた。しかし生体内には正常型プリオン蛋白 (PrP-sen) が発現しており、免疫寛容機構が働いているため、有効なワクチンはまだ得られていない。今回我々は DNA ワクチンと ProteinaseK 抵抗性リコンビナント PrP (rPrP-res) に注目した。

DNA ワクチンは容易に作製することができ、また生体内で Th1 および Th2 免疫反応を長期に誘導することが期待される。まず抗原性の向上を目的として、変異 PrP をコードした DNA プラスミドを用いて、その免疫誘導能について検討した。致死性家族性不眠症を発症するアミノ酸変異 D177N (ヒトでは D178N)、家族性クロイツフェルト・ヤコブ病を発症する D177N+M128V (ヒトでは M129V) 二重変異マウス (mo) PrP をそれぞれ作製した。これらを発現するプラスミド DNA ワクチンをマウスへ筋肉内投与し、野生型 moPrP 発現プラスミドを投与した場合と抗体産生誘導能を比較検討した。その結果、変異 moPrP 発現 DNA ワクチン投与群では、野生型 moPrP 発現 DNA ワクチン投与群と比較して血清中抗 moPrP-IgG 価は同等であった。つまり、変異 moPrP の抗原性は変化しないことが示唆された。しかし、DNA ワクチン投与により弱いながらも抗体価が有意に上昇したことから、DNA ワクチンは寛容機構を回避して効率よく免疫反応を誘導できる可能性が示唆された。

次に、末梢リンパ組織に存在する樹状細胞およびマクロファージと脳内ミクログリア細胞の活性化を左右する二つのサイトカイン (IL-12、TGF $\beta$ ) に注目し、異種動物 PrP (ウシ PrP) と二つの内いずれかのサイトカインを同時に発現するプラスミド DNA をそれぞれ作製した。そこで、これらのプラスミド DNA ワクチンをマウスへ筋肉内投与し、特異的抗体産生誘導能とサイトカイン発現による免疫反応誘導能、そしてプリオンの末梢感染モデルにおける感染防御能について検討することにした。現在は、作製した DNA ワクチンをマウスの筋肉内に投与し、その抗体産生誘導能について調べている。

一方、試験管内において QUIC 法により、シード非存在下で rPrP-res を作製し、その高次構造と免疫反応誘導能の関連を検討することにした。現在、rPrP-res の作製条件を検討し、作製した rPrP-res を用いてマウスにおける免疫反応を調べている。

上記ワクチン開発に関する免疫誘導能と感染防御能の検討について、これまでに得られている結果を提示し、その有用性について議論する。

文 献：なし

演 者： ○石橋 大輔, 西田 教行

所 属： 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染分子解析学分野

演題名： プリオンは宿主の自然免疫機構を回避することで持続感染する

抄 録：

【目的】プリオン病では、異常型プリオン蛋白質自身が病原体であるとされてきた。しかしながら病原体の単離は未だ成されておらず、リコンビナント PrP だけの感染成立はまだ定かでない。さらに、詳細な感染経路も不明なままであり、病原体の特定としては仮説の域を出ていない。近年、プリオン感染においてウイルス感染時に特徴的な干渉現象が見られることやレトロウイルスによりプリオン感染が促進されることなどの報告がなされている。また、自然免疫機構の因子 (TLR4, IL-10) がプリオン感染に対し抑制的に作用しているとする報告がある。しかしながら、これまでプリオン研究の世界では、TLR signaling pathway の関与についての詳細な報告は数少ない。そこで本研究では、プリオン感染における各種自然免疫関連因子との相互作用について検討した。

【方法】マウス由来神経芽細胞腫 (N2a) 由来のプリオン持続感染細胞における MyD88-independent pathway の自然免疫関連因子 TLR3、RIG-I やその下流に位置する転写因子 IRF3 ならびに IFN-I の発現について RT-PCR にて検討した。また、自然免疫関連因子過剰発現の異常型プリオン蛋白質に対する影響について検討した。さらに、プリオン非感染細胞を用いた *in vitro* の系、および IRF3 ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 系においてプリオン感染実験を行い MyD88-independent pathway のプリオン感染に対する影響について検討した。

【結果および考察】プリオン非感染細胞に比べ、プリオン持続感染細胞において、TLR3、RIG-I、IRF3、IFN-beta 遺伝子の発現が減少していた。また、これらの因子の過剰発現によりプリオン感染細胞における異常型プリオン蛋白質の減少が認められた。さらに、*in vitro* におけるプリオン感染実験において IFN-I の前処理や IRF3 の過剰発現させた細胞ではプリオン感染に対し抵抗性を示した。In vivo の実験において IRF3 ノックアウトマウスではプリオン感染が促進し、潜伏期間の短縮等を認めた。これらの結果は、TLR signaling pathway がプリオン感染に強く関わることを示唆しており、MyD88-independent pathway の機能不全がプリオン持続感染成立の要因の一つと考えられる。

文 献：なし



演 者：○佐藤 克也<sup>1)</sup>， 調 漸<sup>2)</sup>

所 属：1) 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染分子解析学

2) 長崎大学医学部歯学部附属病院 へき地病院再生支援・教育機構

演題名：ヒトプリオン病における免疫反応

抄 録：

【目的】ヒトプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の病態における宿主免疫系の役割は不明な点が多い。異常プリオン蛋白に対する抗体産生、細胞性免疫誘導はないとされている。一方で感染マウスの罹患脳組織では著明なグリオーシスにともない TNF- $\alpha$  が高くなるとの報告がある。さらに石橋らのモデルマウスなどにおける検討により、MyD88 非依存性自然免疫応答がなんらかの役割を担っていることがわかってきた。しかし、現在までヒトプリオン病におけるサイトカイン産生等の免疫反応についてはほとんど解析されていない。今回、我々はヒトプリオン病の血清における各種サイトカイン、さらに髄液中のサイトカインの測定を行い、他の神経変性疾患あるいは脳炎・髄膜炎との比較検討を行った。骨髄間葉系細胞の一部は血液脳関門 (BBB) を超えて脳内に入り、ミクログリアに分化する。感染マウスではこの細胞移行性が高まっているとの報告があり、BBB の破綻の可能性が示唆されている。そこで BBB の破綻の指標となるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP9) 等の血清蛋白についてもあわせて検討した。

【方法】CJD (n=41), 脳炎/髄膜炎 (n=18), 多発性硬化症 (n=19), アルツハイマー型認知症 (DAT) (n=16), コントロール (CTL) (N=18) において髄液中の INF- $\alpha$ ・ $\beta$ ・ $\gamma$  及び各種サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-8, IL-10) について検討した。又同時に血清中の MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  を測定した。

【結果および考察】興味深いことに、各種サイトカインの検討で髄液中 IL-8 および IL-10 が他の神経疾患と比べ優位に高い値を示した。INF- $\alpha$ ・ $\beta$ ・ $\gamma$  では明らかな差は認められなかった。又 CJD 患者において MMP-9/TIMP-1 が脳炎・髄膜炎・MS に比べ有意に低下していたが、血清中の MMP-2/TIMP-2 の上昇を認めた。髄液中の IL-8, IL-10 の高値はヒトプリオン病でも自然免疫反応が惹起され NF-kappaB 活性化を介してサイトカイン産生が起こっていることを示唆していると考えられる。又 CJD 患者では血清マーカーの検討から BBB の不可逆性破壊がないと考えられ、CJD の血中診断マーカーが非常に困難であることを裏付ける結果となった。

文 献：なし

演 者： ○新竜一郎, 佐藤克也, 佐野和憲

所 属： 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染分子解析学分野

演題名： Real-time QUIC 法 (QUaking-Induced Conversion) によるクロイツフェルトヤコブ病患者由来髄液中の PrP<sup>Sc</sup> の検出

抄 録：近年、試験管内で異常型プリオンタンパク (PrP<sup>Sc</sup>) を増幅する方法が開発され、新たなプリオン病の診断法への応用が摸索されている。代表的なものに PMCA 法 (Protein Misfolding Cyclic Amplification) があり、すでにマウス、ハムスターなどのげっ歯類を用いたプリオン病感染モデル系でごく微量の PrP<sup>Sc</sup> を増幅・検出することに成功している。しかし、いまだクロイツフェルトヤコブ病 (CJD) を始めとするヒトのプリオン病での高感度な PrP<sup>Sc</sup> 検出の成功例は報告されていない。

PMCA 法の増幅効率には種やプリオン株に依存し、また①Brain homogenate を大量に必要とする、②超音波処理がやや煩雑、③検出は PMCA 反応後に Western blot 等の方法を行う必要がある、などの欠点がある。そこでそれらを克服するため、我々は、大腸菌から精製した rPrP (rPrP-sen) を試験管内で異常型 (rPrP-res) に高い効率で変換する方法を開発した。この方法は、多量の rPrP-sen とごく少量の感染動物由来の PrP<sup>Sc</sup> を混合し、間欠的に攪拌を繰り返すことにより、rPrP-sen から rPrP-res への変換反応を試験管内で劇的に促進させることができる (Quaking-Induced Conversion; QUIC 法)。さらに我々は、この QUIC 法をプログラム可能な攪拌機能のついた蛍光プレートリーダーとアミロイドフィブリル生成のモニターに使用されるチオフラビン T (ThT) を組み合わせることにより、ほぼ real-time で rPrP-res の増幅過程を測定可能な系を確立した (real-time QUIC 法)。

この real-time QUIC 法を用いて、CJD 由来髄液 20 症例の反応を行ったところ、16 症例で陽性であった。一方、陰性コントロールとして用いた CJD 以外の疾患由来の髄液 20 症例はすべて陰性であった。これらの結果は、real-time QUIC 法は CJD の診断に有用性が高いことを示すものであると考えられる。

文 献：なし

演 者： ○布施 隆行, 西田 教行

所 属： 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染分子解析学分野

演題名： プリオン株における細胞指向性

抄 録：

【目的】プリオン株は、遺伝子的背景が同一の固体に対して、プリオン罹患組織を接種した場合に見られる固有の表現型（潜伏期間、臨床症状、病理像、異常型 PrPres の蓄積部位や PK 切断パターン）として定義されている。プリオン仮説では、病原体を異常型プリオンタンパク質（PrP<sup>sc</sup>、又は PrPres）とし、株の特性は PrPres の立体構造に起因すると考えられているが立体構造ならびに分子機構について未だ解明されていない。

本研究では、動物個体で示されるプリオン株の特性の一つである細胞指向性（脳内での増殖部位の違い）について、数種の神経培養細胞を用いて、*in vitro* においても株による選択性を示すか検討した。さらに培養細胞における感染の分子機構を明らかにする事を目的に、各株における培養細胞への結合性について評価した。

【方法】プリオン株は Scrapie 由来の 22L 株、ヒト Gerstmann-Straussler-Scheinker 由来の Fukuoka-1 (FK-1) 株、BSE を使用した。それぞれの株は ddY マウスへ脳内接種し発症後、脳組織を摘出し脳乳剤を作製し使用した。標的細胞には神経前駆細胞である IC11 細胞、視床下部由来の GT1-7 細胞、Neuroblastoma 由来の N2a 細胞、さらに N2a 細胞にマウス PrP (WT) を遺伝子導入した N2a58 細胞を使用した。

プリオン感染の成否は、培養細胞に種々の濃度の脳乳剤を処理した後、継代数に応じて PrPres の蓄積を確認する事で評価した。さらに樹立した持続感染細胞における PrPres の PK 抵抗性を脳組織と比較する事で、PrPres と感染性について評価した。プリオン株における培養細胞への結合性については、N2a58 細胞へ脳乳剤を 3 時間処置した後、細胞膜タンパク質を抽出し、結合した PrPres をした。

【結果および考察】GT1-7 細胞は多くの株の感染を許したが、N2a58 細胞は 22L のみが効率よく感染するものの他の株が感染しない、株による細胞指向性を示した。さらに FK-1 株は N2a58 細胞に感染効率が低いものの、わずかに単離された 1 クローンについて評価すると、FK-1 株は N2a58 細胞内で増殖するものの他の非感染細胞へ感染が広がらない事がわかった。これらの結果は、株の指向性が感染の初期、細胞内への進入までの過程において影響する事が示唆された。そこで各株における細胞への結合性を比較すると、N2a58 細胞に対して、プリオン株は 22L 株 > FK-1 株 > BSE 株のように結合性が異なる事がわかった。さらに膜タンパク質を精製し評価すると、同様に 22L が最も良く膜タンパク質に結合していた。これらの結果は、プリオン株の感染が、細胞膜上の膜タンパク質への結合によって選択されている可能性が示唆された。

文 献：なし

