

PrP^{Sc}. Vet Immunol Immunopathol 133: 33-39,
2010

- 6) Horiuchi N, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N,
Kimura K, Shinagawa M: Generation of
monoclonal antibody that distinguishes PrP^{Sc}
from PrP^C and neutralizes prion infectivity.
Virology 394:200-207, 2009.

2. 学会発表

- 1) Sassa Y, Yamasaki T, Horiuchi M, Inoshima Y,
Ishiguro N: PrP^{Sc} degradation pathway in
macrophages. NeuroPrion 2009, September 2009,
Greece.

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

6. ヒト型プリオン蛋白ノックインマウスを用いた vCJD プリオンの感染実験

研究分担者 北本 哲之 東北大学大学院 医学系研究科

研究要旨 ヒト型プリオン蛋白を導入したノックインマウスを用いて vCJD プリオンの感染実験を行っている。昨年度の報告は、プリオンの腹腔内投与による感染を脾臓を用いて評価したが、今年度は脳内投与による発病・脳の病理変化をもとに感染性を評価した。驚くべきことに、プリオンの脳内投与ではコドン 129V/V のヒト型ノックインマウスでも高率に感染することが明らかとなった。また、昨年度報告した Heterozygous inhibition が、脳内投与における感染でも認められることが明らかとなった。

A. 研究目的

我が国のヒトのプリオン蛋白多型性には、以下のような遺伝子型が存在する。コドン 129 に関しては、129M/M, 129M/V, 129V/V という遺伝子型があり、コドン 219 に関しては、219E/E, 219E/K, 219K/K がある。現時点までの遺伝子解析の結果、コドン 129 とコドン 219 の関係に関しては、コドン 129M のプリオン蛋白の中にコドン 219E と 219K が存在し、コドン 129V のプリオン蛋白は全てコドン 219 に関しては 219E である。この遺伝子型のプリオン蛋白が vCJD プリオン感染に対して感受性をもつのかは、vCJD プリオンの輸血などの 2 次感染を考える上で必要な情報である。この感受性検討に関して、直接ヒト型のプリオン蛋白遺伝子の多型性を導入したノックインマウスを作製して、vCJD プリオンに対する感受性を検討するのが本研究の主な目的である。

B. 研究方法

【材料】 感染因子として、2 例の vCJD 剖検脳乳剤 (10%) を用意した。実験動物として以下の遺伝子型のマウスを用意した。遺伝子型は、HuPrP129M/M, 129M/V, 129V/V, 219K/K というマウスである。

【方法】 感染は脳内に 10% 脳乳剤を 20 μ l 投与後、マウスの発病または寿命いっぱい経過を観察した。マウスの脳の半分を免疫染色検査 (Kitamoto et al, 1991) に、残りの半分を Western blot 検査 (Asano et al, 2006) に利用した。

C. 研究結果

今年度の脳内投与の実験結果は以下のようまとまる。

ヒト遺伝子型	潜伏期間
Ki-Hu129V/V	733 \pm 10 日(4/5)
Ki-Hu129M/V	805 \pm 39 日 (4/4)
Ki-Hu129M/M	645 \pm 73 日(7/7)

Ki-Hu219K/K 435 \pm 46 日(4/4)

組織学的には、ほとんど全ての感染陽性と判断したマウスでアミロイド斑の存在が認められた。アミロイド斑がまず認められ、より病状が進んだマウスでシナプス型の沈着が見られるという傾向であった。しかし、アミロイド斑のほとんど検出されないマウスも稀ながら存在した。

vCJD プリオンに対する感受性を潜伏期間のみから判断すると、codon 219K/K, codon 129M/M, codon 129V/V, codon 129M/V という順で感受性が高い (感染しやすい) ことが明らかとなった。

D. 考察

昨年度報告した腹腔内投与における濾胞樹状細胞での感受性のデータと感受性に関してはほぼ一致していたが、もっとも異なる結果になったのはコドン 129V/V の結果である。FDC での感染感受性試験においては、コドン 129V/V は感染に対して抵抗性を示した唯一の遺伝子型であったが、残念ながら、脳内投与においては発病することが明らかになった。これは、脳内投与の実験でコドン 129V/V のノックインマウスを使用した英国のグループの発病率が 1/16 という低頻度ではなく、我々の実験では 4/5 という高頻度で認められることが明らかとなった。この頻度の差は、我々の実験の観察期間が、900 日以上と長期観察を行った結果と思われる。また、FDC と脳での感受性の異なる結果に関しては、プリオン蛋白の発現量の多い脳で感受性が高まった可能性が考えられる。事実、過剰発現のトランスジェニックマウスの方が、正常発現のノックインマウスより同じ遺伝子型のコドン 129V/V でも感受性が高いことが報告されている。我々の用いたノックインマウスの脾臓と脳でのプリオン蛋白の発現量には大きな差が存在し、それによって脾臓の FDC での感染が成立しなかったものと思われる。

次に、昨年度 FDC で認められたコドン 129M/V

とコドン 219E/K などで感染に対して抵抗性をしめすという heterozygous inhibition は、今年度の脳内投与でのコドン 129M/V の感受性（潜伏期間）に関しても同様に認められた。プリオン蛋白のヘテロ抑制効果は、脳内感染でも証明されたことになり、昨年度提唱した石垣モデルは脳内感染でも有効であった。

今年度の報告でコドン 129V/V のヒトが vCJD になる可能性が高いことを見出したが、問題はコドン 129V/V のヒトが sCJD を発病するとタイプ 2 の異常型プリオン蛋白をもち、アミロイド斑が多数みられるので sCJD なのか vCJD なのかを正確に鑑別できる方法の開発が急務であることがわかった。

E. 結論

プリオンの脳内投与ではコドン 129V/V のヒト型ノックインマウスでも高率に感染することが明らかとなった。また、昨年度報告した Heterozygous inhibition が、脳内投与における感染でも認められることが明らかとなった。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Human Prion Protein (PrP) 219K is converted to PrPSc but shows heterozygous inhibition in variant Creutzfeldt-Jakob disease infection. *J Biol Chem*. 2009, 284: 3603-3609
- 2) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Medical procedures and risk for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis*. 2009 Feb;15(2):265-71.
- 3) Hiraga C, Kobayashi A, Kitamoto T. The number of octapeptide repeat affects the expression and conversion of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 382:715-719.
- 4) Kobayashi A, Hizume M, Teruya K, Mohri S, Kitamoto T: Heterozygous inhibition in prion infection—The stone fence model. *Prion* 2009, 3:27-30
- 5) Shinde A, Kunieda T, Kinoshita Y, Wate R, Nakano S, Ito H, Yamada M, Kitamoto T, Nakamura Y, Matsumoto S, Kusaka H. The first Japanese patient with variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). *Neuropathology* (in press)
- 6) Hama T, Iwasaki Y, Niwa H, Yoshida M, Hashizume Y, Kitamoto T, Murakami N, Sobue G. An autopsied case of panencephalopathic-type Creutzfeldt-Jakob disease with mutation in the prion protein gene at codon 232 and type 1 prion protein. *Neuropathology*. 2009 (in press)
- 7) Shimizu H, Yamada M, Matsubara N, Takano H, Umeda Y, Kawase Y, Kitamoto T, Nishizawa M, Takahashi H. Creutzfeldt-Jakob disease with an M232R substitution: report of a patient showing slowly progressive disease with abundant plaque-like PrP deposits in the cerebellum. *Neuropathology*. 2009 (in press)
- 8) Iwasaki Y, Kizawa M, Hori N, Kitamoto T, Sobue G. A case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the P105L prion protein gene mutation presenting with ataxia and extrapyramidal signs without spastic paraparesis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009 Sep;111(7):606-9.
- 9) Yamada M, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H. Dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan: Clinicopathological and molecular characterization of the two distinct subtypes. *Neuropathology*. 2009 29:609-618
- 10) Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T. A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection. *Neuropathology*. 2009 29:619-624
- 11) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. The risk of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease through medical and surgical procedures. *Neuropathology*. 2009, 29:625-631
- 12) Ikawa M, Yoneda M, Matsunaga A, Nakagawa H, Kazama-Suzuki A, Miyashita N, Naiki H, Kitamoto T, Kuriyama M. Unique clinicopathological features and PrP profiles in the first autopsied case of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease with codon 219 lysine allele observed in Japanese population. *J Neurol Sci*. 2009 (in press)
- 13) Yoshida H, Terada S, Ishizu H, Ikeda K, Hayabara T, Ikeda K, Deguchi K, Touge T, Kitamoto T, Kuroda S. An autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I mutation of the PrP gene and Alzheimer-type pathology. *Neuropathology*. 2009 (in press)
- 14) Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-Ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K. Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular

pentosan polysulphate. Acta Neurol Scand. 2009
(in press)

15) Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S,
Aguzzi A, Kitamoto T. Experimental verification
of a traceback phenomenon in prion infection. J.
Virol. (in press) 2010

16) Hizume M, Kobayashi A, Mizusawa H, Kitamoto
T. Amino acid conditions near the GPI anchor
attachment site of prion protein for the
conversion and the GPI anchoring. Biochem.
Biophys. Res. Commun. 2010 (in press)

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

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 舛甚賢太郎、舒 宇静、岩丸祥史、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)の感受性宿主域を調べる目的で、マウス型プリオン蛋白質(PrP)、ハムスター型 PrP および両者のキメラ PrP を発現するマウスへの伝達試験を行った。BSE/JP24 は TgHaNSE マウスに伝達認められたが、tga20, MHM2, MH2M, ICR マウスへの伝達性は認められなかった。野生型ハムスターに BSE/JP24 を脳内接種したところ、576.8 日の潜伏期で伝達認められた。

A. 研究目的

定型 BSE(C-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。

B. 研究方法

非定型 BSE(BSE/JP24)を、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 (マウス PrP[tga20]、ハムスター PrP[TgHaNSE]、マウス-ハムスターキメラ PrP[MH2M, MHM2]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。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

C-BSE プリオンは ICR, MHM2, tga20 マウスには伝達したが、MH2M, TgHaNSE マウスへの伝達性は認められなかった。一方、BSE/JP24 プリオンは TgHaNSE に 2/3 (潜伏期:567, 853 日) で伝達したが、tga20, MHM2, ICR マウスへの伝達性は認められなかった。MH2M は 2/5 (潜伏期: 696, 853 日) でマウスが死亡したが、PrP^{Sc} の蓄積は認められなかった。以上の結果から、BSE/JP24 プリオンは、C-BSE プリオンとは異なる感受性宿主域を示し、ハムスター型 PrP に対する伝達性が示された。

この結果を確かめるために、ハムスターへ BSE

プリオンおよび BSE/JP24 プリオンの接種を行った。C-BSE プリオン (初代) を接種したハムスターの脳内に PrP^{Sc} の蓄積は認められなかったが、BSE/JP24 プリオンは潜伏期 576.8 ± 127.8 日(4/4) でハムスターへの伝達性が確認された。BSE/JP24 プリオンを伝達したハムスターの脳内の PrP^{Sc} の蓄積は前頭葉および頭頂部に顕著であった。プロテイナーゼ K 消化後の PrP^{Sc} の糖鎖型は、スクレイピー由来 PrP^{Sc} と類似していたが、その分子量はやや小さく、BSE/JP24 の性状を保持していた。

D. 考察

わが国の非定型 BSE (BSE/JP24) プリオンの感受性宿主域は C-BSE プリオンとは異なっており、そのリスク評価の必要性が示された。また BSE/JP24 は C-BSE とは異なる起源と考えられる。

E. 結論

わが国の非定型 BSE(BSE/JP24)は、C-BSE とは異なる感受性宿主域を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Fukuda, Y. Iwamaru, M. Imamura, K. Masujin, Y. Shimizu, Y. Matsuura, Y. Shu, M. Kurachi, Y. Murayama, S. Onoe, K. Hagiwara, T. Sata, S. Mohri, T. Yokoyama, H. Okada: (2009) Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. *Microbiol. Immunol.* 53: 704-707.
- 2) K. Masujin, Yujing Shu, H. Okada, Y. Matsuura, Y.

- Iwamaru, M. Imamura, S. Mohri, T. Yokoyama: (2009) Two distinct prion strains were isolated from a scrapie sheep. Arch. Virol. 154: 1929-1932.
- 3) K. Hasegawa, S. Mohri, T. Yokoyama: Fragment molecular orbital calculations reveal that the E200K mutation markedly alters local structural stability in the human prion protein. Prion (in press).
 - 4) H. Gomi, T. Yokoyama, S. Itohara: Role of GFAP in morphological retention and distribution of reactive astrocytes induced by scrapie encephalopathy in mice. Brain Research (in press).
 - 5) Y. Shimizu, Y. Ushiki-Kaku, Y. Iwamaru, T. Muramoto, T. Kitamoto, T. Yokoyama, S. Mohri, Y. Tagawa: A novel anti-prion protein monoclonal antibody and its single-chain fragment variable derivative with ability to inhibit abnormal prion protein accumulation in cultured cells. Microbiol. Immunol. (in press).
 - 6) T. Yokoyama, K. Masujin, Y. Iwamaru, M. Imamura, S. Mohri: 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.
 - 7) S.S.A. An, K.T. Lim, H.J. Oh, B.S. Lee, E. Zukic, Y.R. Ju, T. Yokoyama, S.Y. Kim, E. Welker. Differentiating scrapie-infected blood by detecting disease-associated prion proteins by multimer detection system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 (in press).
 - 4) 清水善久ら、抗プリオン蛋白質アプタマー60-3 と異常プリオン蛋白質の特異的結合、第 147 回日本獣医学会、2009 年 4 月、宇都宮
 - 5) 舒宇静ら、スクレイピー罹患ヒツジ個体から分離された 2 種類のプリオン株、第 147 回日本獣医学会、2009 年 4 月、宇都宮
 - 6) 横山隆、BSE 研究 感染経路・診断法開発、市民講座、2009 年 10 月、名古屋
 - 7) T. Yokoyama, Y. Shu, K. Masujin, H. Okada, Y. Iwamaru, M. Imamura, Y. Matsuura, S. Mohri. BSE in hamsters: An animal model lacking PrPSc accumulation in lymphoid tissues. Prion 2009, 2009.9. Greece
 - 8) T. Yokoyama, Current status of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Japan. International symposium on "strategies for technology development for ensuring agro-food safety" 2009.7. Seoul, ROK
- 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

2. 学会発表

- 1) 横山隆、牛海綿状脳症の現状－BSE と非定型 BSE－、第 20 回日本臨床寄生虫学会、大阪
- 2) 横山隆ら、同じ PrP 遺伝子型を持つ羊への伝達で生じたスクレイピープリオンの性状変化、プリオン研究会、2009 年 8 月、蔵王
- 3) 横山隆、ニホンジカのプリオン病(CWD)サーベイランスについて 第 15 回野生生物保護学会、2009 年 11 月、東京

8. 非定型 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主な目的とする。本年度は、A-BSE 由来の牛 PrP^{Sc} の PMCA 増幅に適した条件を検討し、A-BSE PrP^{Sc} 検出の高感度化を行った。また、vCJD 霊長類モデルにおける PrP^{Sc} の超高感度検出法を確立し、BSE 感染ザルの脳脊髄液、白血球分画から PrP^{Sc} を検出した。特に、発症初期における脳脊髄液 PrP^{Sc} の検出結果は、本法の vCJD 早期診断への応用可能性を示唆する。

A. 研究目的

非定型 BSE (A-BSE) は、プロテアーゼ切断点や病態、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明らかになっている。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る。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。

また、霊長類を用いた感染モデルは、C-BSE 感染による vCJD の発症機序や病態を解明する上で、優れた動物モデルである。本課題では上記目的に加えて、C-BSE 増幅法を霊長類由来 PrP^{Sc} の増幅に応用し、高効率増幅法を開発するとともに、感染ザルにおける PrP^{Sc} の分布や動態を解析し、生前診断・早期診断への応用可能性を検討することを目的とする。

本年度は、A-BSE 由来 PrP^{Sc} の増幅条件を検討するとともに、霊長類由来 PrP^{Sc} の超高感度検出法を確立し、C-BSE 実験感染ザルにおける PrP^{Sc} の分布と動態について解析した。

B. 研究方法

1) A-BSE 由来 PrP^{Sc} の増幅

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) BSE 感染カニクイザル由来 PrP^{Sc} の増幅

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで作出された BSE 実験感染ザル(#7)の 10%脳乳剤から 10 倍希釈系列を作製し、PMCA シードとして用いた。

3) BSE 感染カニクイザルにおける PrP^{Sc} の動態解析

上記 BSE 実験感染ザル(#7)から体液(血液、脳脊髄液)を経時的に採取した。安楽死後、解剖時に採材された各組織および体液類を感染研より分与・導入した。各組織から 10%乳剤を調製し、シードとして用いた。また、体液類における PrP^{Sc} の動態も解析した。

C. 研究結果

1) A-BSE 感染牛由来 PrP^{Sc} の PMCA 増幅

昨年度の解析より、C-BSE および A-BSE 由来の PrP^{Sc} の増幅条件は異なっていることが明らかになった。本年度は増幅条件を種々変更し、A-BSE 由来 PrP^{Sc} の増幅を試みたところ、有意な PrP^{Sc} の増幅を認めた。増幅反応を繰り返すごとに検出感度は約 10 倍上昇し、4 回の増幅により、10⁻⁴ 希釈サンプルから PrP^{Sc} シグナルをウエスタンブロッ

ト法により検出可能であった。

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

C-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} の超高感度検出が可能になった。感染ザル由来脳乳剤の希釈系列をシードに用いて増幅したところ、1 回目の増幅 (R1) では 10⁻⁵ 希釈まで検出されたが、PMCA 産物を希釈・再増幅を繰り返す連続 PMCA を行うと、R2, R3 では 100 倍ずつ検出感度が上昇し、R4 では 10⁻¹⁰ 希釈サンプルからも PrP^{Sc} を検出可能であった。

3) BSE 感染カニクイザルにおける PrP^{Sc} の分布・動態

末梢神経、脾臓、扁桃およびリンパ節など調べたすべての組織から PrP^{Sc} が検出された。脳脊髄液中の PrP^{Sc} は神経症状が認め始められる初期から検出され、症状の進行とともに PrP^{Sc} 量が増加することが判明した。また感染末期のみではあるが、リンパ球分画からも PrP^{Sc} が検出された。

D. 考察

非定型 BSE PrP^{Sc} 増幅の現状は、JP24 感染牛由来脳乳剤中の PrP^{Sc} を試験管内で増幅・継代でき、増幅効率は低いものの、増幅回数を増やせば高感度検出が可能になった段階である。今後、検出感度の向上を目指す。

従来 PMCA 法による vCJD 患者由来 PrP^{Sc} の検出限界は 10⁻⁷ 程度であり、超高感度検出には至っていなかった。vCJD 霊長類モデルにおける本増幅法はそれに比して約 1,000 倍の感度を有しており、脳脊髄液や血液など体液類からも PrP^{Sc} を検出した。特に発症初期における脳脊髄液 PrP^{Sc} の検出結果は、本法の vCJD 早期診断への応用可能性を強く示唆するものである。今後、感染ザル症例を追加し、またバイオプシーサンプルを解析することによって、本法の有用性、信頼性を確認する予定である。

E. 結論

A-BSE 由来 PrP^{Sc} の PMCA 増幅効率を改善し、vCJD モデルにおけるカニクイザル由来 PrP^{Sc} の超高感度検出法を確立した。BSE 感染ザルでは、発症初期から脳脊髄液 PrP^{Sc} が検出でき、本法の

vCJD 早期診断への応用可能性を示唆する。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Shimizu Y, Matsuura Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Onoe S, Hagiwara K, Sata T, Mohri S, Yokoyama T, Okada, H: Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. *Microbiol. Immunol.* 2009, 53:704-707.

2. 学会発表

1) 今村守一、加藤紳子、吉岡都、岡田洋之、岩丸祥史、清水善久、毛利資朗、横山隆、村山裕一：バキュロウイルス由来リコンビナント PrP^C を用いた PrP^{Sc} の生成. 2009 年プリオン研究会 (蔵王) 2009.8.30.

2) 岩丸祥史、竹ノ内敬人、今村守一、清水善久、松浦裕一、舛賢賢太郎、村山裕一、岡田洋之、横山隆、毛利資朗、木谷裕：マウス中枢神経幹細胞の分化誘導系においてプリオンは de novo に増幅する. 2009 年プリオン研究会 (蔵王) 2009.8.30.

3) 横山隆、舛賢賢太郎、岡田洋之、岩丸祥史、今村守一、松浦裕一、村山裕一、舒宇静、河西和雄、倉知恵美、清水善久、Mary Schmerr、毛利資朗：同じ PrP 遺伝子型を持つ羊への伝達で生じたスクレイピープリオンの性状変化. 2009 年プリオン研究会 (蔵王) 2009.8.30.

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 我々は、アミロイド線維の検出試薬として用いられるチオフラビンT(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、ほぼ real time に recombinant PrP fibril の増幅過程が測定可能なアッセイ系 (Real-time QUIC) を BSE に応用した高感度検査法の開発を行っている。この方法の感度・特異度を向上するため、さらなる条件検討を加え、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℃で保存し、使用直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

これまでの研究では、rPrP-sen から rPrP-res 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ると考えられていたが、CJD 脳乳剤を用いた検討により、界面活性剤や変成剤を用いない方がシードに対する検出感度、特異度が高いことを明らかにした (図 1)。

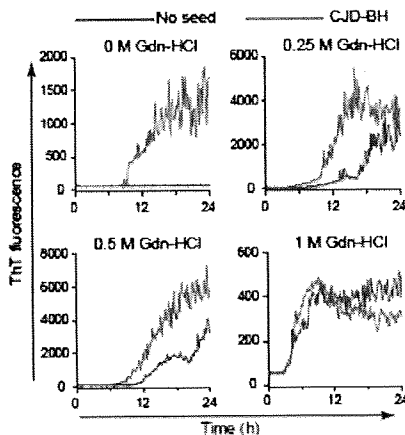


図1 Real-time QUIC法におけるCJD脳乳剤による rPrP-res形成に対するグアニジン塩酸塩の影響

そこで、BSE 感染牛脳乳剤を用いた検討においても界面活性剤、変成剤なしの条件で検討を行った。

まず、rBoPrP (recombinant bovine PrP) 濃度変化による BSE 感染牛脳乳剤の検出感度・特異度を検討した。シードは、 5×10^{-6} 希釈した BSE 感染牛脳乳剤を用いた。2.5 μ g rBoPrP を用いた場合、シードなしの条件でも自然発生的に rPrP-res が早期より形成されてしまい、検出特

異度が無かった。5, 10 μ g rBoPrP を用いた場合は、シード特異的に rPrP-res が形成され、また、5 μ g の方が検出感度、特異度も高いことが分かった (図 2)。

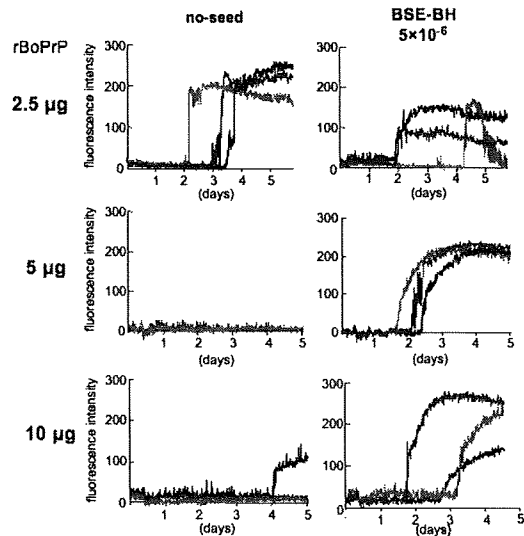


図2 Real-time QUIC法におけるrBoPrP濃度変化の影響

次に、5 μ g rBoPrP を用いて非感染牛脳乳剤の QUIC 法における影響を検討した。 5×10^{-5} 非感染牛脳乳剤は、BSE 感染牛脳乳剤と比較して時間は遅いが蛍光強度値を高めることが分かった。このことから、現在の条件では BSE 感染牛脳乳剤に対して特異度がまだ低いことが明らかとなった (図 3)。

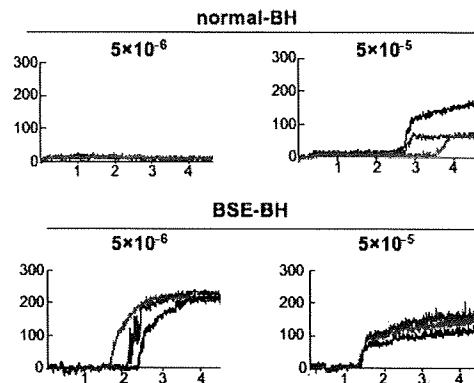


図3 Real-time QUIC法における非感染脳乳剤の影響

E. 結論

Real-time QUIC 法により、BSE 感染牛脳乳剤の検出に成功した。しかしながら、現在の条件では検出感度、特異度がまだ低いことが明らかとなった。今後は、反応液中の pH、塩濃度、EDTA などの因子の条件検討を行うことによって、検出感度、特異度を改善したいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Smirnovas V, Kim JI, Lu X, Atarashi R, Caughey B, Surewicz WK. Distinct structures of scrapie prion protein (PrP^{Sc})-seeded versus spontaneous recombinant prion protein fibrils revealed by hydrogen/deuterium exchange. J Biol Chem. 2009; 284(36):24233-41.
- 2) Fujihara A, Atarashi R, Fuse T, Ubagai K, Nakagaki T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Katamine S, Nishida N. Hyperefficient PrP^{Sc} amplification of mouse-adapted BSE and scrapie strain by protein misfolding cyclic amplification technique. FEBS J. 2009; 276(10):2841-8.

2. 学会発表

- 1) 新竜一郎 「Real-time QUIC法によるクロイツフェルトヤコブ病患者由来髄液中のPrP^{Sc}の検出」 2009年プリオン研究会 ラフォーレ蔵王・宮城県刈田郡 平成21年8月30日
- 2) 新竜一郎 「正常型から異常型へのプリオンタンパク構造変換プロセスの解析」 第82回日本生化学会(シンポジウム:プリオンの感染と進化-プリオンはどこまで分かったか?-) 平成21年10月22日

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、黒澤 明日香 (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} の性状に関する知見は蓄積されつつあるが、生体への感染、伝播機序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 (N2a-5) と非感受性細胞株 (N2a-1) 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た。その結果、N2a-5 で N2a-1 に比べ優位に発現量が多い細胞因子 *Peripherin* を同定した。N2a-5 および N2a-1 培養液中に PrP^{Sc} を添加した場合、N2a-5 では PrP^{Sc} の細胞内への取り込み量が N2a-1 に比べて優位に多く、N2a-1 に *Peripherin* を強発現させた場合、PrP^{Sc} 取り込み量が増加することが明らかとなった。また、細胞内での *Peripherin* の局在が PrP^{Sc} の添加により大きく変化することが明らかとなった。これらのことから、*Peripherin* は PrP^{Sc} の細胞内への取り込みに関与することが示唆された。現在、CAG プロモーターにより強発現する *peripherin* トランスジェニックマウスを作出し PrP^{Sc} の感染実験を行っており、病態進行と *Peripherin* の関係について今後検討する。

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、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堀内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) プリオン高感受性細胞に高発現している分子の同定

解析には Fluorescence 2D Difference Gel Electrophoresis (2D DIGE) (ファルマシア社) system を用いた。蛍光色素 Cy2 で標識された N2a-1 細胞溶解液、Cy3 で標識した N2a-5 細胞溶解液、および cy5 により標識された等量の N2a-1 および N2a-5 細胞溶解液を調整し 2 次元電気泳動を行った。タンパク質スポットの蛍光輝度を指標として、N2a-1 および N2a-5 細胞間で発現に差異のあるタンパク質を検索した。アミノ酸配

列の検索には LC/MS 解析を行った。

同定された分子の各 N2a 細胞での発現について WB 法を用いて確認した。

2) プリオン取り込み量との関係

N2a 細胞の外来 PrP^{Sc} 取り込み量に与える Peripherin の関与について検討した。添加する PrP^{Sc} として、3F4PrP^c 発現 N2a 細胞を作成し、スクレーパー由来 PrP^{Sc} を感染させ、3F4 エピトープを有した PrP^{Sc} を含む細胞破砕液を調整した。調整した細胞破砕液を N2a-1 および N2a-5 細胞へ添加し 6 時間、12 時間、24 時間後の取り込まれた 3F4 PrP^{Sc} 量を測定した。また、N2a-1 細胞に Peripherin 発現プラスミドのトランスフェクションにより過剰発現させた細胞を作成し、同様に取り込まれた 3F4 PrP^{Sc} 量を測定した。

3) プリオン感染成立に与える影響

Peripherin がプリオン感染成立に与える影響について検討した。Peripherin 高発現細胞である N2a-5 及び低発現細胞である N2a-1、また N2a-1 細胞に Peripherin 発現ベクターをトランスフェクションし Peripherin 過剰発現 N2a-1 細胞にプリオンを添加した。添加後 7 日目に細胞を回収し、プリオンの検出を行った。

4) プリオン添加時における細胞内での Peripherin の動態

Peripherin 発現プラスミドを構築した。生細胞内での局在を観察するため、蛍光分子 YFP と Peripherin が融合タンパク質として発現するプラスミドを構築した。作成したプラスミドを 293T 細胞、N2a 細胞へトランスフェクションし、Peripherin 分子の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、プリオン添加時の局在の変化を検討するため、YFP 融合 Peripherin をトラン

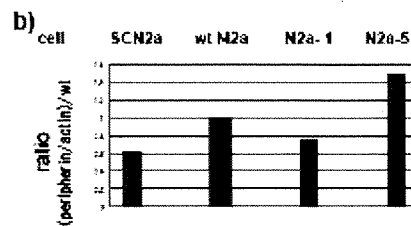
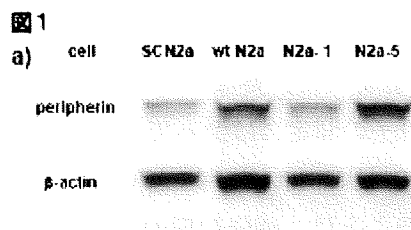
スフェクションした 293T 細胞および N2a 細胞へ PrP^{Sc} を含む細胞破砕液を添加し、同様に観察した。加えて、プリオン持続感染細胞での局在を検討するため SCN2a 細胞へ YFP 融合 Peripherin をトランスフェクションした。

5) Peripherin TG mouse への BSE 由来プリオンの投与

CAG プロモーターにより発現誘導される Peripherin 発現ベクターを作成し、マウスへ導入した。ウエスタンブロット法により Peripherin 発現量を確認し、Peripherin 発現量の異なる TG マウス 4 系統を選別した。感染材料として本邦で発生した BSE 和歌山株をマウスで 3 代継代した脳乳剤を用いた。2% 脳乳剤を生後 6 週の TG マウス脳内へ 20ul 接種し、病態進行に与える Peripherin の影響について観察を行った。

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 Peripherin 分子を同定した。Peripherin の発現は N2a-5 細胞で多く、N2a-1 では少ない。N2a 親細胞での Peripherin

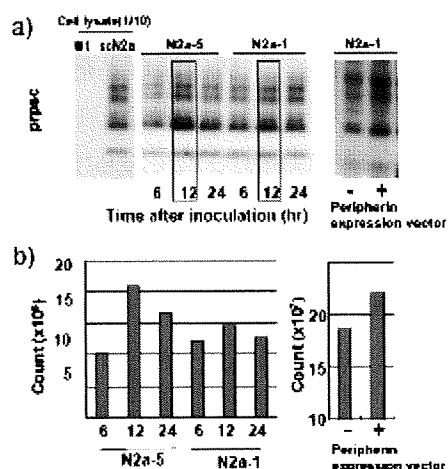


a) 各N2a細胞におけるperipherin発現量
b) N2a親細胞の発現量を1とした場合での各細胞での発現量の比較

発現量は N2a-5 と N2a-1 の中間に位置していた。また N2a 親細胞にプリオンが持続感染した scN2a 細胞での Peripherin 発現量は N2a-1 細胞と同程度であった。結果を図 1 に示す。

2) N2a-5 および N2a-1 細胞に 3F4 エピトープを持つプリオンを含む scN2a 細胞溶解液を添加し、経時的なプリオン取り込み量を測定した結果、Peripherin 高発現である N2a-5 細胞では 12 時間にプリオン取り込み量がピークに達した。N2a-1 細胞においても 12 時間後にピークを認めたが、その量は N2a-5 細胞に比べ優位に低かった。また、N2a-1 細胞に Peripherin 発現ベクターをトランスフェクションし Peripherin を高発現にした場合プリオンの細胞への取り込み量が増加した。結果を図 2 に示す。

図 2

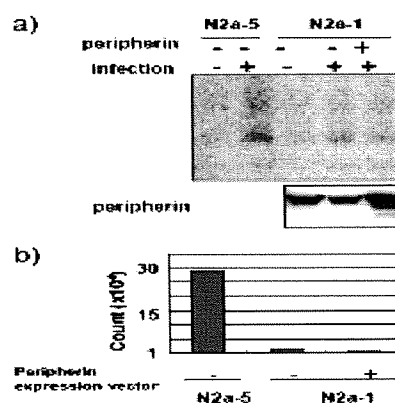


a)取り込まれた3F4エピトープを持つプリオンのプロット
b)各バンドを数値化した

3) N2a-5 及びN2a-1 細胞、また N2a-1 細胞に Peripherin 発現ベクターをトランスフェクシヨ

ンし Peripherin 過剰発現 N2a-1 細胞にプリオンを添加し、7 日後の細胞を回収した。回収した細胞中に含まれるプリオンを検出した結果、N2a-5 細胞ではプリオンを検出出来たが、N2a-1 ではほぼ検出されなかった。また N2a-1 細胞に Peripherin を過剰発現させた場合でもプリオン生成量は増加しなかった。結果を図 3 に示す

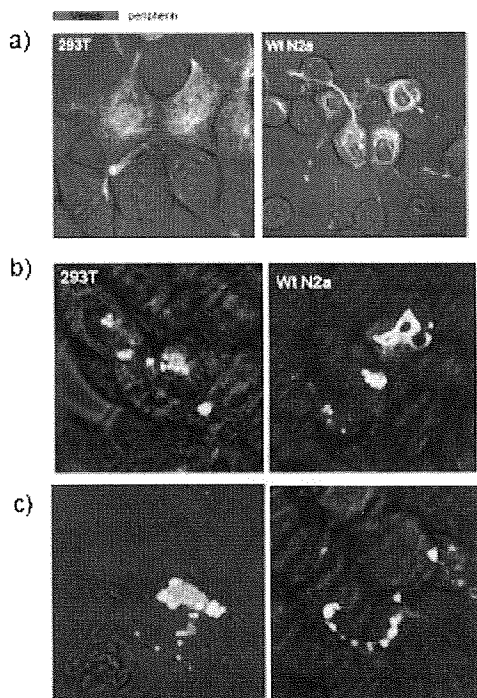
図 3



a)プリオン添加7日後の各細胞に含まれるプリオン。
b) a)を数値化したもの

4) 蛍光分子融合 Peripherin 発現ベクターを構築し、細胞内での Peripherin の局在を観察した結果、293T 細胞、N2a 細胞では Peripherin は細胞質の細胞骨格に沿った分布を示した。しかし、このような分布は細胞にプリオンを加えることで Peripherin のアグリゲーションが誘導され細胞質内で凝集塊を形成した。プリオン持続感染細胞である scN2a 細胞では細胞質での細胞骨格に沿った分布は認められず、プリオンを添加した 293T 細胞および N2a 細胞同様に細胞質内での凝集塊として認められた。結果を図 4 に示す。

図4



1) 293T細胞およびN2a細胞における
蛍光分子融合peripherinの局在
b) 293T細胞およびN2a細胞における
プリオン添加後のperipherinの局在
c)プリオン持続感染細胞scN2a細胞での
peripherinの局在

5) Peripherin 高発現 Tg マウスを作成し、本邦で分離、マウスで継代された BSE 和歌山株を脳内へ接種した。コントロールとして用いた C57BL6 マウスでは 170 日が経過した現在数頭が発症し、2 匹死亡した。Peripherin T G マウスでは死亡は確認されず、数頭の下肢の麻痺を認めるのみであった。

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 Peripherin を同定し、プリオン感染における関与について検討を行った。結果 Peripherin の発現が多いほど外来プリオンの細胞への取り込み量が増加することが分かった。し

かし、取り込み量の増加とプリオン持続感染成立の相関性は認められなかった。細胞内での Peripherin の局在はプリオンが存在しない場合、細胞質の細胞骨格に沿った局在を示した。しかし、その局在はプリオンが存在することで破綻し、アグリゲーションが誘導された。Peripherin の機能として細胞内外の分子の輸送に関与していることが報告されており、プリオンの輸送にも関与していることが示唆された。また PeripherinTG マウスの感染実験では、病期の延長と病態の変化が認められ、Peripherin のプリオン病態への関与も示唆された。

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 Peripherin を同定した。Peripherin の局在はプリオンの存在により大きく影響を受け、またその過剰発現はプリオン病の進行と病態に影響を与えていることが明らかとなった。しかしながら、その詳細な機序は解明されておらず、さらに解析を進める。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura T, Ishikawa K, Sakasagawa Y, Teruya K, Sata T, Schatzl H, Doh-Ura K.: GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells. FEBS Lett. in press, 2010 Feb 13. [Epub ahead of print].
- 2) Sato Y, Shimonohara N, Hanaki KI, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T,

Nakajima N. ImmunoAT method: an initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. J Virol Methods. in Press, 2010 Feb 9. [Epub ahead of print].

3) Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Shimizu Y, Matsuura Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Onoe S, Hagiwara K, Sata T, Mohri S, Yokoyama T, Okada H. Intraspecies transmission of L-type-like Bovine Spongiform Encephalopathy detected in Japan. Microbiol Immunol. 2009, 53:704-7.

2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願
なし。

実用新案登録
なし。

1 1. 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 教授

研究協力者 酒井 景子、宋 昌鉉（北大大学院・獣医学研究科）

研究要旨 我々は、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、プリオン感染マウスの脳における宿主遺伝子の網羅的発現解析を進めてきた。接種後 60~74 日にかけて発現が増加した遺伝子群のなかで、LPS レセプターとして知られ、脳内ではミクログリアに発現することが報告されている CD14 に着目し、これらの遺伝子欠損マウスを用いて感染実験を行ってきた。CD14 欠損(CD14^{-/-})マウスでは、Obihiro 株および Chandler 株ともに、野生型(WT)マウスと比較して有意に潜伏期が延長したことから、特にミクログリアを中心に CD14^{-/-}マウスの脳における病態を解析した。抗 Iba1 抗体による免疫組織化学では、CD14^{-/-}マウスで WT マウスよりもミクログリアが活性化する傾向が認められた。また CD14^{-/-}マウスでは、CD11b, CD45 などの活性化ミクログリアのマーカー分子の発現も亢進していた。しかし、別の活性化ミクログリアのマーカーである Mac-2 分子の発現は、WT と CD14^{-/-}マウスで顕著な差は認められなかった。この結果から、WT と CD14^{-/-}マウスで、一部のミクログリアは活性化状態が異なることが示唆された。また CD14^{-/-}マウスで、より早期から抗炎症性サイトカインである TGF-β や IL-10 の発現が亢進しており、病態への関与が考えられた。今後、CD14 分子とミクログリアの機能の関係を詳細に解析することで、プリオン病の病態機序の一端が解明されることが期待される。

A. 研究目的

プリオン病における病態機序を解析する目的で、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宿主遺伝子の発現変化を DNA マイクロアレイ法により解析してきた。プリオン接種後比較的早期から発現が上昇した遺伝子の中から、LPS レセプターとして知られ、脳内ではミクログリアで発現する CD14 遺伝子に着目し、CD14^{-/-}マウスを用いた感染実験を行った結果、CD14^{-/-}マウスでは WT マウスと比較して有意に潜伏期が延長した。単球に発現する CD14 は、LPS 刺激に反応して炎症性サイトカインの産生に働く等、炎症反応の亢進に関与することが知られている。一方、CD14 分子はミクログリアの Aβ の貪食に関与することも報告されている。そこで、CD14 分子のプリオン病病態機序への関与を解析するために、プリオン感染 CD14^{-/-}マウスにおけるミクログリアの動態およびサイトカインの産生について調べた。

B. 研究方法

1) マウスおよびプリオン株

CD14^{-/-}マウス (congenic line) は Jackson Laboratories から購入した。対照となる 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 μl)を脳内接種した。

2) ミクログリアの検出

一次抗体として抗 Iba1 抗体を 4℃で一晩反応させた。二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ IgG を室温で 10 分間反応させた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後、DAB で発色させ、Hematoxylin で対比染色を行った。抗 Iba1 抗体で染色したミクログリアを、Image J を用いて定量解析した。

3) 間接蛍光抗体法(Indirect immunofluorescence assay, IFA)

抗 Mac-2 抗体と抗 Iba1 抗体の二重染色はパラフィン切片を用いて行った。一次抗体として抗 Iba1 抗体と抗 Mac-2 抗体を、二次抗体として Alexa Fluor 488 F (ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)、Alexa Fluor 555 goat anti-rat IgG (H+L) を用いた。VECTASHIELD MOUNTING MEDIUM FOR FLUORESCENCE (VECTOR)で封入し、蛍光レーザー顕微鏡システム C1 (Nikon)により検鏡した。Mac-2 と Iba1 の二重染色以外の

ミクログリアマーカートの染色およびサイトカイン類の染色には凍結切片を用いた。

(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 2009-1-41)。また、動物実験は北海道大学大学の実験動物委員会で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

1) CD14 分子の発現

CD14 の遺伝子発現はプリオン接種後早期(60-74 日)で上昇していたが、分子の発現を確認するために、Chandler 株感染マウスの視床における Cd14 分子の発現を IFA により調べた。非感染マウスと比べ、接種後 60 日では CD14 陽性細胞が多く存在したことから、CD14 がプリオン接種後早期から発現することが確かめられた(図 1)。また、CD14 がミクログリアのマーカートである Iba 陽性の細胞に発現することも確かめられた(結果は示さず)。

2) ミクログリアの増生

Chandler 株接種後 60 日では、数はまだ少ないものの、WT と CD14^{-/-}マウスの間で明らかな差は認められなかったが、同週齢の非感染マウスの脳と比べると、分枝した突起を伸ばしたミクログリアが認められたことから、ミクログリアがプリオンの増殖もしくは増殖に伴う何らかの宿主の変化に反応していることが示唆された。接種後 90 日では、CD14^{-/-}マウスで、より突起の分枝が明瞭なミクログリアが認められた(図 2)。この傾向は 120 日でも認められた。接種後 120 日では、Chandler 株感染マウスの海馬と視床で、WT マウスと比較して CD14^{-/-}マウスでミクログリアの数が多い傾向が認められた。また、病末期では、CD14^{-/-}マウスのミクログリアと比較して、WT マウスのミクログリアは分枝が少なくなっていることから、活性化状態が低下していることが推察された。これらの結果から、CD14 分子の欠損がミクログリアの活性化に何らかの影響を与えていることが示唆された。

また、ミクログリアのマーカートとして用いられる CD11b, CD45, F4/80, CD68 の発現は Iba1 の発現と同様の傾向が認められた。即ち、WT マウスよ

りも CD14^{-/-}マウスでより発現が亢進していた。しかし、Mac2 の発現は WT マウスと CD14^{-/-}マウスで顕著な差は認められなかった(結果は示さず)。

3) サイトカインの産生

活性化したミクログリアを始めとした細胞から産生されるサイトカインやケモカインがプリオン病の病態に関与することが示唆されている。そこで、炎症性サイトカインとして TNF α と IL-1 β 、抗炎症性サイトカインとして TGF β と IL-10 の発現について検討した。TNF α は CD14^{-/-}マウスで接種後 60 日から発現が認められ、接種後 90 日では WT マウスでも発現が認められるようになったが、CD14^{-/-}マウスで陽性細胞が多く認められた。IL-1 β は、両マウスともに、接種後 90 日から検出されるようになり、接種後 120 日では発現が増加するが、CD14^{-/-}マウスで発現が高い傾向が認められた(図 3)。TGF- β は WT と CD14^{-/-}マウスともに、接種後 60 日から発現が認められたが、CD14^{-/-}マウスで発現が亢進していた。接種後 90 日では WT マウスで TGF β の発現が増強する傾向が認められ、WT と CD14^{-/-}マウスの間で顕著な差が認められなくなった。しかし、接種後 120 日では、WT マウスで発現が減少する傾向が認められた(図 3)。また IL-10 も、TGF β と同様に 60 日から発現が認められたが、WT マウスと比較して CD14^{-/-}マウスで陽性細胞が多く認められ、接種後 90 日でも同じ傾向であった。しかし、接種後 120 日では WT と CD14^{-/-}マウスの間で顕著な差は認められなかった(図 3)。

D. 考察

CD14 分子量 55 kDa の GPI アンカー型膜蛋白質で、LPS のレセプターとして単球やマクロファージ上で、また脳内ではミクログリアで発現が認められている。LPS の他に、グラム陽性菌や抗酸菌の菌体の構成成分や、アポトーシスを起こした細胞成分に対しても、細胞を活性化させる経路に関わっていることが示唆されている。また、CD14 は Toll-like receptor と共に、ミクログリアが A β を認識して活性化する系路に関与することが知られている。これらの報告から、CD14^{-/-}マウスではミクログリアの活性化が低下すると予測していたが、Iba1 および活性化したミクログリアのマーカートとして用いられる CD11b、CD45、F4/80 と CD68 の発現を調べたところ、予想に反して WT マウスよりも CD14^{-/-}マウスでミクログリアはより活性化していた。ただし、Mac-2 の発現は、WT マウスと CD14^{-/-}マウスで顕著な差がなかったことから、全てのミクログリアが同じ活性化状態にあるわけではないことも

示唆された。

TGF- β を過発現させたマウスでは過発現させていないコントロールと比較して、プリオンを脳内に接種した場合に認められるミクログリアの増生が著しいことが報告されている。従って、WTマウスと比較してCD14^{+/+}マウスでTGF- β の発現が亢進していたことは、CD14^{+/+}マウスでよりミクログリアの増生が著しいことと関係しているかもしれない。

IL-10は、プリオン病の病態とともに経時的に発現が上昇すること、プリオンを接種したIL-10遺伝子欠損マウスでは、WTマウスと比較して生存期間が短縮することから、IL-10はプリオン病の病態の進行を抑制する作用があると考えられている。従って、CD14^{+/+}マウスでIL-10の発現が亢進していたことは、潜伏期の延長の要因になっている可能性がある。またLPS刺激に対する応答として、IL-10はTNF- α やIL-1 β 、IL-6といった炎症性サイトカインとそのレセプターの発現を抑えることで、これらによるシグナル調節に関わっていると考えられている。CD14^{+/+}マウスでは炎症性サイトカインの産生が亢進していたが、今後これらのレセプターの発現を調べて、炎症性サイトカインが炎症を進める方向に機能し得るかを解析する必要がある。

E. 結論

CD14^{+/+}マウスでは、WTマウスと比較して、プリオン接種後の生存期間が有意に延長する。プリオン感染CD14^{+/+}マウスでは、WTマウスよりも早期からミクログリアが活性化する傾向が認められ、また、より早期から抗炎症性サイトカインであるTGF- β やIL-10の発現が亢進していたことから、CD14分子はミクログリアの活性化や抗炎症性サイトカイン産生を制御することで、プリオン病の病態進行に促進的に働く可能性が考えられる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shindoh R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrPSc is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. *J Virol*. 2009; 83; 3852-3860.
- 2) Song C-H, Honmou O, Nakamura K, Hamada H,

Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. *J Virol*. 2009; 83; 5918-5927.

- 3) Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrPSc from PrPC and neutralizes prion infectivity. *Virology*. 2009; 394; 200-207.
- 4) Nakamitsu S, Kurokawa A, Yamasaki T, Uryu M, Hasebe R, Horiuchi M. Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol*. 2010; 91; 563-569.
- 5) Sakata, H., Horiuchi M., Takahashi, I., and Kinjo, M. Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2009; in press.

2. 学会発表

- 1) Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Identification of chemotactic factors for migration of mesenchymal stem cell to brain lesions of mice infected with prions. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 2) Yamasaki T, Nakamitsu S, Suzuki A, Horiuchi M. Recycling of PrPSc via retrograde transport pathway from endosome to TGN in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 3) Sakata H, Horiuchi M, Kinjo M. Characterization of soluble oligomers of prion protein by fluorescence correlation spectroscopy. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 4) Sassa, Y., Yamasaki, T., Horiuchi M., Inoshima, Y., and Ishiguro, N. PrPSc degradation pathway in macrophages. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 5) Horiuchi M. Intracellular localization of abnormal isoform of prion protein. Prion and Virus Infections BSJ & ABA Joint Symposium, Tokushima, Japan, Oct. 30, 2009.
- 6) 中満智史、黒川彩、山崎剛士、瓜生匡秀、長谷部理絵、堀内基広。プリオン持続感染細胞における蛋白質分解酵素抵抗性 PrP の量的変

- 動に關与する因子の解析. プリオン研究会 2009. 蔵王. 2009年8月29-30日
- 7) 坂田啓司、堀内基広、高橋泉、金城政孝. 蛍光相関分光法による可溶性 PrP オリゴマー形成過程の解析. プリオン研究会 2009. 蔵王. 2009年8月29-30日
- 8) 酒井景子、長谷部理絵、宋昌絃、堀内基広. Cd14分子のプリオン病病態への関与 第57回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
- 9) 山崎剛士、中満智史、鈴木章夫、堀内基広. クラスリン被覆構造は PrPSc のトランスゴルジネットワークへの輸送に關与する. 第57回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
- 10) 宋昌絃、長谷部理絵、堀内基広. 骨髓由来間葉系幹細胞のプリオン感染脳病変への走化に關与する因子の解析. 第57回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
- 11) 大澤夏生、宋昌絃、鈴木章夫、堀内基広. 抗 PrP 抗体の末梢投与によるプリオン病の治療効果. 第57回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
- 12) 堀内基広. 異常型プリオン蛋白の細胞内局在. 大阪大学蛋白質研究所セミナー2009「蛋白質立体構造を基盤とするプリオン現象の解明と制御」. 大阪. 2009年7月13-14日
- 13) 堀内基広. 遺伝子を持たないプリオンは変異し得るか? 第12回日本進化学会. 札幌. 2009年9月2-4日
- 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

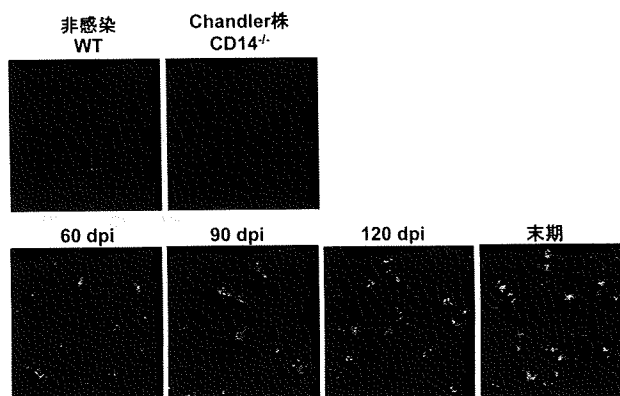


図1 Chandler株感染マウスの視床におけるCD14分子の発現。

上は非感染マウスの視床、およびChandler株感染CD14^{-/-}マウス(病末期)の視床。下はChandler株感染WTマウスの接種後60、90、120日および病末期の視床におけるCD14分子の発現を示す。