

図2 プリオン感染WTおよびCD14<sup>-/-</sup>マウスにおけるミクログリアの増生

(上) Iba1陽性ミクログリア。Chandler株を接種したWTとCD14<sup>-/-</sup>マウスの接種後60日、90日、120日、および病末期の視床における免疫組織化学像を示した。接種後60日と90日の写真の四角の部分の拡大図をそれぞれの右に示した。非感染WTの視床の免疫組織化学像を最下段に示した。スケールバーは50 μmを表す。

(下) Iba1陽性ミクログリアの定量解析。Chandler株あるいはObihiro株を接種後、90日、120日、および末期における海馬と視床でのミクログリアの増生をImage Jにより定量解析した。一定面積以上のIba1陽性領域 ( $1 \times 10^{-5} \text{ mm}^2$ ) を一個の細胞としてカウントした。各時点で、WT、CD14<sup>-/-</sup>マウスともに各2匹のマウスを解析し、2匹の結果を併記した。

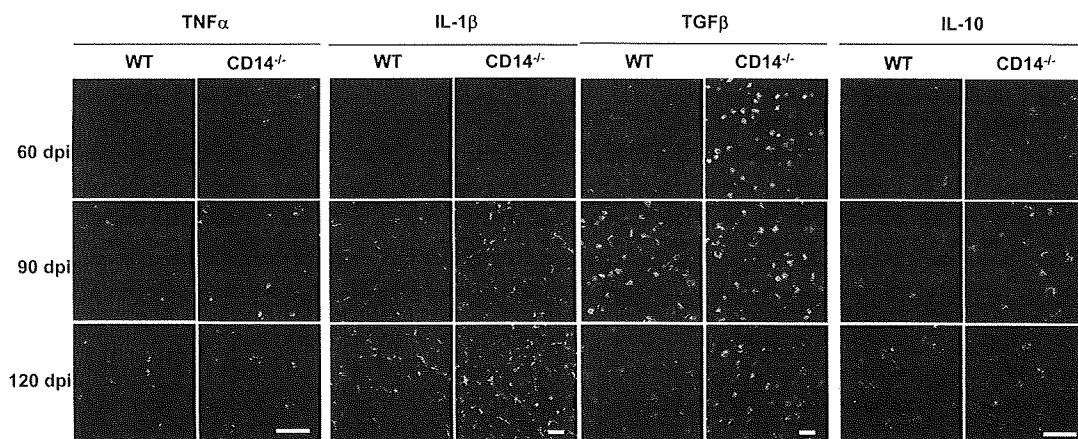


図3 プリオン感染WTおよびCD14<sup>-/-</sup>欠損マウスにおけるサイトカインの発現

炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$  とIL-1 $\beta$ )、抗炎症性サイトカイン(TGF $\beta$  とIL-10)の発現をIFAにより調べた。Chandler株を接種したWTとCD14<sup>-/-</sup>マウスの接種後60日、90日、120日、および病末期における視床の染色像を示す。スケールバーは25  $\mu$ mを表す。

## 1 2. プリオン蛋白構造変換機序の解析

研究分担者 堂浦克美 東北大学大学院 医学系研究科 教授

研究協力者 木村朋寛 (東北大学大学院・医学系研究科)

研究要旨 異常型プリオン蛋白 (プリオン) の産生に影響する宿主因子の同定を目指して、プリオン持続感染細胞において RNA 干渉技術を用いた遺伝子スクリーニングを行い、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 “LRP1” を発見した。RNA 干渉実験の特異性を確認するとともに、機能阻害タンパク質 “RAP” の影響を検討した。また、異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間での DNA マイクロアレイ解析により、新規ターゲットを見出した。

### A. 研究目的

プリオン病の病原因子とされる異常型プリオン蛋白 (プリオン) の複製・増殖機構は未だ解明されておらず、治療法の開発が遅れている。RNA 干渉による遺伝子発現抑制スクリーニング法を用いてプリオン蛋白の異常化に関与する宿主因子の探索を行い、2 候補を同定した。その中の一つ “LRP1” について、結果の特異性を確認するとともに、その関連因子の関与等に関して調査した。また、異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間での DNA マイクロアレイ解析により、プリオン蛋白の異常化に関与する新規ターゲットを見出したので、この因子について RNA 干渉による遺伝子発現抑制法を用いてプリオン蛋白の異常化への影響を調査した。

### B. 研究方法

#### 1) shRNA 発現ベクターと siRNA

各遺伝子に特異的な 21 塩基配列を標的として選択し、shRNA 用にデザインした DNA をプラスミドベクターに組み込み、shRNA 発現用コンストラクトを得た。一方、化学合成型 siRNA は Invitrogen 社の Stealth Select を用いた。

#### 2) 培養細胞への遺伝子導入

マウス神経芽腫細胞 N2a 細胞を宿主とし、RML プリオン株に持続感染した培養細胞 (ScN2a)、さらに非感染の N2a 細胞を使用した。6 穴プレートに細胞を継代した翌日に shRNA プラスミドベクターもしくは化学合成型 siRNA を細胞に導入した。培地交換を行い、3 日間培養した。

#### 3) 異常型プリオン蛋白の検出

遺伝子を導入した感染細胞の溶解液をプロテナーゼ K 処理後に精製し、ウエスタンブロット法により異常型プリオン蛋白産生量を検定した。シグナルは解析ソフトを用いて概ね数値化し、shRNA の場合は空ベクターを導入した細胞 (mock)、化学合成型 siRNA の場合は導入試薬のみを添加した細胞 (mock) を対照とした。

#### 4) 標的遺伝子およびプリオン蛋白遺伝子の発現解析

shRNA あるいは siRNA を導入した細胞の全 RNA を抽出し、ランダムヘキサマーにより cDNA を合成してリアルタイム PCR を用いた mRNA の発現解析を行った。内部標準に  $\beta$ -actin もしくは GAPDH を用いて相対的な定量を行った。

#### 5) LRP1 蛋白の検出

N2a 細胞の溶解液から免疫沈降により精製・濃縮した。免疫沈降に用いた抗体は、プロテイン G ビーズに結合させて BS3 で架橋させた。

#### 6) マイクロアレイ解析

N2a 細胞を宿主とし、22L プリオン株に持続感染した培養細胞 (N167) に正常型プリオン蛋白に対する siRNA もしくは導入試薬のみ (mock) を導入した。導入処理後 15 日目における導入試薬群 (mock) と siRNA 処理群との遺伝子発現量を DNA マイクロアレイで解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面に配慮する実験を含んで

いない。

### C. 研究結果

プリオン持続感染細胞 (ScN2a) において遺伝子ノックダウンスクリーニングにより異常型プリオン蛋白の産生を阻害する因子として LRP1 を同定した。

LRP1 の遺伝子ノックダウンでは、ScN2a において異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。ターゲットである LRP1 の mRNA およびタンパク質レベルでの発現抑制も確認でき、ノックダウンが働いていることが確かめられた。またプリオン蛋白の mRNA は影響を受けていなかったため異常型プリオン蛋白の産生抑制はプリオン蛋白の発現低下によるものではないと考えられる。レスキュー実験として siRNA が標的とする遺伝子配列に変異を加えた変異 LRP1 発現ベクターと siRNA を同時に導入したところ、変異 LRP1 導入細胞では異常型プリオン蛋白産生抑制効果が中和された。この結果は siRNA による効果がオフターゲットによるものでなく LRP1 遺伝子発現抑制によることを支持した。さらにこの分子に対する機能阻害タンパク質“RAP”の強制発現を検討したところ、異常型プリオン蛋白の産生抑制が見られた。以上の実験結果から、LRP1 が特異的に異常型プリオン蛋白の産生に関与していることが明らかとなった。

一方、正常型プリオン蛋白に対する siRNA を導入すると、3 日後、6 日後においては検出限界程度まで異常型プリオン蛋白が減少するが、その後再び検出されるようになり、更にそれは徐々に増加してくる。18 日後までは鋭い増加傾向を示し、その後は増加速度が鈍くなりほぼ横ばいとなった。導入 15 日後における DNA マイクロアレイ解析により、siRNA 導入群において Sparcl1 (Hevin) の発現亢進が認められた。このことはリアルタイム PCR での解析によっても確かめられた。Hevin に対して標的配列が異なる 9 種類の siRNA を試したところ、3 種類の siRNA において異常型プリオン蛋白産生抑制が認められた。また、そのうちの 2 種類の siRNA では細胞傷害性がほとんど無いことが確かめられた。

### D. 考 察

プリオン病の病原因子プリオンが感染するには、異常型と正常型のプリオン蛋白の接触が必要だと考えられている。本研究の標的であるプリオン増殖に関与する宿主因子としては、ラフトを含む細胞膜上に存在する細胞接着や受容体に関連する分子、脂質代謝に関連する分子、糖鎖関連因子などが候補となる。さらに異常型への高次構造変換により、細胞内へ何らかのシグナルが伝達される可能性も予想される。今回の遺伝子ノックダウン研究で異常型プリオン蛋白の産生阻害を示した LRP1 は、細胞膜上に存在する多機能受容体である。ノックダウン実験の結果が、siRNA のオフターゲットによるアーチファクトでないことは今回のレスキュー実験や機能阻害タンパク質“RAP”の強制発現実験の結果から支持されたが、LRP1 がプリオン蛋白の産生とどのように関係しているかを解明することについては、今後の課題である。

一方、異常型プリオン蛋白産生速度の異なると考えられる細胞間での DNA マイクロアレイ解析から見つけ出された Hevin においては、2 種類の siRNA で目立った細胞傷害を起こすことなく異常型プリオン蛋白産生が抑制された。この結果が、特異的なものであるかどうかは、レスキュー実験等により慎重に解析していく必要があるが、薬剤試験等で ScN2a 細胞に比べて効果が出にくい N167 細胞でも異常型プリオン蛋白産生抑制効果が顕著に観察されたことから、これまでに発見した GABAA 受容体  $\beta$  サブユニット 1 や LRP1 よりもプリオン蛋白構造変換において中心的な役割を担っている可能性が考えられ、創薬標的因子としても期待できる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa Y, Teruya K, Sata T, Schätzl H, Doh-Ura K. GABAA receptor subunit beta1 is involved in the formation of protease-resistant prion protein in prion-infected neuroblastoma cells. FEBS Letters. 2010; in press
- 2) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai

- H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-Ura K. In vivo detection of prion amyloid plaques using [11C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imag*. 2010; in press
- 3) 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*. 2010; 121(2):127-30.
- 4) Tsuboi Y, Doh-Ura K, Yamada T.: Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases. *Neuropathology*. 2009;29(5):632-6.
- 5) Nomura S, Miyasho T, Maeda N, Doh-ura K, Yokota H.: Autoantibody to glial fibrillary acidic protein in the sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy. *Proteomics*. 2009;9(16):4029-35.
- 6) Teruya K, Kawagoe K, Kimura T, Chen CJ, Sakasegawa Y, Doh-ura K.: Amyloidophilic compounds for prion diseases. *Infect Disord Drug Targets*. 2009;9(1):15-22.
- 7) 堂浦克美 : プリオン病の治療予防開発. *臨床神経学* 2009;49:946-8.

## 2. 学会発表

- 1) 堂浦克美 : プリオン病治療薬開発の現状. 第28回日本認知症学会学術集会、2009年11月21日、仙台
- 2) 堂浦克美 : ヤコブ病研究 治療・発症機序. 第3回食と医療の安全に関わるプリオン病の市民講座、2009年10月31日、名古屋
- 3) Okamura N, Furumoto S, Shiga Y, Tsuboi Y, Iwata R, Kudo Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [11C]BF-227 PET. *Prion 2009*, September 23-25, 2009, Thessaloniki
- 4) Okamura N, Furumoto S, Shiga Y, Tsuboi Y, Iwata R, Kudo Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [11C]BF-227 PET. 2009年プリオン研究会、2009年8月29、30日、宮城
- 5) 逆瀬川裕二、西澤桂子、高橋智子、小熊歩、木村朋寛、堂浦克美 : プリオン持続感染に関与する宿主内因子の探索. 2009年プリオン研究会、2009年8月29、30日、宮城
- 6) 堂浦克美 : プリオン病への治療予防開発. 第50回日本神経学会総会、2009年5月22日、仙台

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 北本哲之、堂浦克美、他 : 変異タンパク質の製造方法. 東北大学、株式会社ベネシス : 特願 2009-180098、2009年7月31日

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### III. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	53	704-7	2009
Arai S, Matsui Y, Fukuda S, Okada H, Onoe S	Brainstem auditory evoked potentials in experimentally-induced bovine spongiform encephalopathy.	Res Vet Sci	87	111-4	2009
Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M	Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions.	J Virol	83	5918-27	2009
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	394	200-7	2009
萩原健一、山河芳夫、花田賢太郎	ヒト・プリオン病-感染症としての変遷と新たな課題	ウイルス	59	155-166	2009
Ishiguro N, Inoshima Y, Sassa Y, Takahashi T	Molecular characterization of chicken prion proteins by C-terminal-specific monoclonal antibodies.	Vet Immunol Immunopathol	128	402-6	2009
Lwin S, Inoshima Y, Ueno H, Ishiguro N	Uptake and transport of foreign particles in Peyer's patches of both distal ileum and jejunum of calves.	Cell tissue Res	337	125-135	2009
Atoji Y, Ishiguro N	Distribution of cellular prion protein in the central nervous system of the chicken.	J Chem Neuroanatomy	38	292-301	2009

Lwin S, Inoshima Y, Atoji Y, Ueno H, Ishiguro N	Immune cell types involved in early uptake and transport of recombinant mouse prion protein in Peyer's patches of calves.	Cell Tissue Res	338	343-354	2009
Sassa Y, Inoshima Y, Ishiguro N	Bovine macrophage degradation of scrapie and BSE PrPSc.	Vet Immunol Immunopathol	133	33-39	2010
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	284	3603-9	2009
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	15	265-71	2009
Hiraga C, Kobayashi A, Kitamoto T	The number of octapeptide repeat affects the expression and conversion of prion protein.	Biochem Biophys Res Commun	382	715-19	2009
Kobayashi A, Hizume M, Teruya K, Mohri S, Kitamoto T	Heterozygous inhibition in prion infection—The stone fence model.	Prion 2009	3	27-30	2009
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	111	606-9	2009
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	29	609-18	2009



Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T	A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection.	Neuropathology	29	619-24	2009
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	29	625-31	2009
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	Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan.	Microbiol Immunol	53	704-7	2009
K. Masujin, Yujing Shu, H. Okada, Y. Matsuura, Y. Iwamaru, M. Imamura, S. Mohri, T. Yokoyama	Two distinct prion strains were isolated from a scrapie sheep.	Arch Virol	154	1929-32	2009
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	90	261-68	2009
Smirnovas V, Kim JI, Lu X, Atarashi R, Caughey B, Surewicz WK	Distinct structures of scrapie prion protein (PrP <sup>Sc</sup> )-seeded versus spontaneous recombinant prion protein fibrils revealed by hydrogen/deuterium exchange.	J Biol Chem	284	24233-41	2009
Fujihara A, Atarashi R, Fuse T, Ubagai K, Nakagaki T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Katamine S, Nishida N	Hyperefficient PrP <sup>Sc</sup> amplification of mouse-adapted BSE and scrapie strain by protein misfolding cyclic amplification technique.	FEBS J	276	2841-8	2009

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	83	3852-60	2009
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	91	563-9	2010
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	121	127-30	2010
Tsuboi Y, Doh-Ura K, Yamada T	Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases.	Neuropathology	29	632-6	2009
Nomura S, Miyasho T, Maeda N, Doh-ura K, Yokota H	Autoantibody to glial fibrillary acidic protein in the sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy.	Proteomics	9	4029-35	2009
Teruya K, Kawagoe K, Kimura T, Chen CJ, Sakasegawa Y, Doh-ura K	Amyloidophilic compounds for prion diseases.	Infect Disord Drug Targets	9	15-22	2009

堂浦克美	プリオン病の治療予防開発	臨床神経学	49	946-8	2009
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)	
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		(in press)	
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		(in press)	
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		(in press)	
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		(in press)	

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)	
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		(in press)	
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)	
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)	
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)	
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		(in press)	

Kimura T, Ishikawa K, Sakasegawa 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)	
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)	
Sakata H, Horiuchi M, Takahashi I, Kinjo M	Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy.	Curr Pharm Biotechnol		(in press)	
Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-Ura K	In vivo detection of prion amyloid plaques using [(11)C]BF-227 PET.	Eur J Nucl Med Mol Imag		(in press)	

