

プロセスバリデーションに適した PrP<sup>Sc</sup> 画分を用いた  
血液製剤製造工程のプロセスバリデーション

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医科学研究科 プリオン病学講座 教授  
研究協力者 前野 英毅 日本赤十字社 血漿分画センター研究部 研究員

研究要旨

培養細胞を用いて生産される医薬品や、血液製剤などの医薬品のプリオン汚染リスクを適切に評価するために、粒子径の小さい PrP<sup>Sc</sup> 凝集体を用いて製造工程における PrP<sup>Sc</sup> の除去効果を調べるのが求められている。本研究では、263K 株感染ハムスター脳を 1% Sodium Undecyl Sulfate(SUS)で処理後に、プラノバ 35N を通過する画分をスパイク試料として、血液凝固第 VIII 因子製剤[FVIII]および人免疫グロブリン製剤[HBIG]製造工程のウイルス除去工程をモデルとして、プリオン除去のプロセスバリデーションを実施した。プリオンの検出は Protein misfolding cyclic amplification(PMCA)法による PrP<sup>Sc</sup> の増幅を指標とした。FVIII 製造工程のプラノバ 20N 濾過におけるプリオンの減少率は $>5.3\text{Log}_{10}$ であった。一方、HBIG 製造工程のプラノバ 35N 濾過におけるプリオンの減少率は $1.5\text{Log}_{10}$ であった。今後、異なる溶液中での PrP<sup>Sc</sup> の存在状態、膜への非特異的吸着等、より詳細な検討は必要であるが、本研究で使用したスパイク試料を用いることで、より厳密なプリオン除去のプロセスバリデーションの実施が可能になると考えられる。

A. 研究目的

医薬品やその原材料の製造工程に PrP<sup>Sc</sup> を添加して、実験的に除去効果が検討されているが、これまでの報告の多くは、プリオン感染動物の脳乳剤あるいはマクロソーム画分を添加した試料を用いて、プリオン除去効果を評価している。脳乳剤やマクロソーム画分に存在する PrP<sup>Sc</sup> は、遠心操作により容易に沈殿するような粒子サイズの大きい PrP<sup>Sc</sup> 凝集体が多く含まれている。一方、血液等に存在する可能性があるプリオンを構成する PrP<sup>Sc</sup> の粒子サイズは小さいことが予想される。従って、使

用するスパイク用試料によっては、適切なプロセスバリデーションが実施できていない可能性がある。我々は昨年度の研究で、263K 株感染ハムスターの脳を SUS 処理後に、プラノバ 35N を通過する粒子サイズの小さい PrP<sup>Sc</sup> オリゴマーを用いること、および PrP<sup>Sc</sup> を高感度に検出可能な Protein misfolding cyclic amplification(PMCA)法を用いることで、 $10^3\sim 10^4$  のレンジのプロセスバリデーションが可能になることを報告した。そこで今年度は、この方法を用いて、血液凝固第 VIII 因子製剤[VIII]および人免疫グロブリン製剤[HBIG]製造工程の

ウイルス除去工程をモデルとして、プリオン除去のプロセスバリデーションを実施した。

## B. 研究方法

### 1. スパイク試料の調整

263K 株に感染したハムスターの10%脳乳剤に Sarkosyl を1%となるように添加し、100,000×g, 30 分の超遠心により沈殿画分を得た。沈殿画分を PBS で溶解後、1%となるよう Sodium Undecyl Sulfate(SUS)を加え、37°Cで 1 時間放置した。これをプラノバ 35N(平均孔径 35 nm)で濾過し、スパイク用試料とした。

### 2. PMCA

PMCA 装置 (Elekon 社製) を用いて PrP<sup>Sc</sup>を増幅した。一回の PMCA 反応は、30 分毎に 8 秒間 5 回の超音波処理を 1 サイクルとして、42 サイクル実施した。1 回目の PMCA 反応液をプリオン非感染ハムスターの 10% 脳乳剤で希釈し、再度 PMCA 反応を実施した。2 回目の PMCA 反応液を Proteinase K で処理した後に、PrP<sup>Sc</sup>をウェスタンブロットで検出した。各検体を n = 3 回で試験し、50%の確率で増幅産物を検出できる PrP<sup>Sc</sup> 量を PrP<sup>Sc</sup> 力価(PMCA<sub>50</sub>/mL)と定義して、定量解析を行った。

### 3. スパイク試験

FVIII 溶液に 1/20 量のスパイク用試料を添加し、30 分間攪拌した後、プラノバ 20N により濾過した。また、HBIG 溶液に 1/100 量のスパイク用試料を添加し、30 分間攪拌した後、プラノバ 35N により濾過した。濾過前後の試料を回収し、PMCA 法

を行った。

## C. 研究結果

スパイク用試料を添加した濾過前後の FVIII 溶液を 10 倍段階希釈して PMCA を行い、PrP<sup>Sc</sup> の PMCA 力価を算出したところ、濾過前の試料の総 PMCA 力価は 10.6Log(PMCA<sub>50</sub>)であったが、濾過後の試料からは PrP<sup>Sc</sup> は増幅されなかったことから、PrP<sup>Sc</sup> の PMCA 力価は <5.3Log(PMCA<sub>50</sub>) と推定された。従って PrP<sup>Sc</sup> の減少率は >5.3 であった(表 1)。

同様にスパイク用試料を添加した濾過前後の HBIG 溶液を 10 倍段階希釈して PMCA を行い、PrP<sup>Sc</sup> の PMCA 力価を算出したところ、濾過前の試料は 10.4Log(PMCA<sub>50</sub>)であったが、濾過後の試料からは、10<sup>-4</sup> 希釈まで PrP<sup>Sc</sup> が増幅されたことから、PrP<sup>Sc</sup> の PMCA 力価は 8.9Log(PMCA<sub>50</sub>) と推定された。従って PrP<sup>Sc</sup> の減少率は 1.5 と推定された(表 2)。

## D. 考察

昨年度 1% SUS 処理により、広範なレンジでプロセスバリデーションを実施可能なスパイク用試料が得られることを報告した。被検試料に SUS で処理したスパイク用試料を添加した場合、SUS 濃度は低下し、これに伴い PrP<sup>Sc</sup> 力価も低下するが、それでも 10<sup>3</sup> 程度のレンジでプロセスバリデーションが実施可能であることを報告した。

今年度は昨年度確立したスパイク用試料を用いて、FVIII 製造工程および HBIG 製造工程のウイルス除去行程をモデルとして、プリオン除去効率を検討した。その結果、プリオンの減少率は FVIII 製造工程では >5.3、HBIG 製造工程では 1.5 と推定された。FVIII 製造

工程のモデルとしプラノバ 20N を用いたが、スパイク試料中の SUS 濃度が低下すると、試料中のプリオンはプラノバ 15N や 20N など濾過サイズの小さい膜を通過しなくなる傾向があることから、異なる溶媒中でのプリオンの存在状態など、より詳細にスパイク試料中のプリオンの生化学的および物理学的性状を検討して、プロセスバリデーションの評価結果に反映させる必要がある。

#### E. 結論

本研究では粒子径 35 nm 以下の PrP<sup>Sc</sup> 画分をスパイク試料とした、プリオン除去のプロセスバリデーションが実施可能であることを示した。異なる溶液中での PrP<sup>Sc</sup> の存在状態、膜への非特異的吸着等より詳細な検討は必要であるが、本研究で使用したスパイク試料を用いることで、より厳密なプリオン除去のプロセスバリデーションの実施が可能になると考えられる。

#### F. 健康危険情報

実験室内感染、外部への病原体の拡散などの事故は発生していない。

#### 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 PrP<sup>Sc</sup> 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 PrP<sup>Sc</sup> from PrP<sup>C</sup> 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.* 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 PrP<sup>Sc</sup> 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關与 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質の細胞内局在. 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（予定を含む）**
1. 特許取得  
本年度は該当なし。
  2. 実用新案登録  
本年度は該当なし。
  3. その他  
本年度は該当なし

表1. FVIII 溶液のプロセスバリデーション(プラノバ 20N 濾過)

PrP <sup>Sc</sup> 画分	希釈列							総 PrP <sup>Sc</sup> 量 <sup>d)</sup> Log[PMCA <sub>50</sub> ]
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
濾過前	NT	NT	+++ <sup>b)</sup>	+++	+++	+-- <sup>c)</sup>	---	10.6
濾過後	--- <sup>a)</sup>	---	---	NT	NT	NT	NT	<5.3

a) n = 3で実施し、3検体ともPrP<sup>Sc</sup>が増幅されなかったことを示す。

b) n = 3で実施し、3検体ともにPrP<sup>Sc</sup>陽性であったことを示す。

c) n = 3で実施し、1検体のみPrP<sup>Sc</sup>陽性であったことを示す。

d) PrP<sup>Sc</sup>の検出結果から求めたPMCA力価と溶液量から総PrP<sup>Sc</sup>量を算出した。

表2. HBIG 溶液のプロセスバリデーション(プラノバ 35N 濾過)

PrP <sup>Sc</sup> 画分	希釈列							総 PrP <sup>Sc</sup> 量 Log[PMCA <sub>50</sub> ]
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
濾過前	NT	NT	+++	+++	+++	+--	---	10.4
濾過後	NT	NT	+++	++-	---	---	--	8.9

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
平成21年度分担研究報告書  
遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出手法の標準化  
及びプリオン除去工程評価への適用に関する研究  
-異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究-

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、その原材料に混入する恐れがあるウシ異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の高感度な検出法の開発が望まれている。動物由来製造原材料の品質確保および種々の製造工程の安全性評価を目的としたPrP<sup>Sc</sup>の検出法の開発に資する基礎研究として、ウシスプライス変異型プリオン蛋白質(PrPSV)検出法の開発を目的としてモノクローナル抗体の調製を行った。

抗原としてウシPrPSVのC末端に相当するペプチド又は大腸菌で発現させたウシPrPSV組換え蛋白質を用いてマウスを免疫後、抗体価が上昇したマウスの脾細胞から抗ウシPrPSVモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立した。得られた抗体はELISAでウシPrPSVのC末端ペプチド及び組換え蛋白質に対して同様の反応性を示し、ウシPrPとPrPSVで一次構造が異なるC末端を特異的に認識することを確認した。これらの抗体を用いたイムノプロット法で組換え蛋白質に対する反応性を調べたが、用いた抗体の濃度では検出できなかった。

次に、ヒツジ胎児脳由来細胞株OA1からmRNAを調製し、ヒツジPrPのGPIアンカーシグナル配列を欠損したPrPSVを解析し、その塩基配列から一次構造を明らかにした。OA1は171残基がGluのPrP(ARQ)及びPrPSV(ARQ)並びにArgのPrP(ARR)及びPrPSV(ARR)のmRNAを発現しており、それぞれの遺伝子を発現ベクターにクローニングした。これらの研究成果は、スクレイピーやBSE罹患ヒツジ試料を用いた解析等への応用が期待される。

A. 研究目的

人のプリオン病には硬膜移植等によって発症した感染性CJD、プリオン蛋白質遺伝子(*PRNP*)にコードされた253残基のアミノ酸に変異がある遺伝型CJD及び*PRNP*に変異のない散発型CJDが知られ、約85-90%を散発性CJDが占めている。一方、1996年に英国で発症が確認された変異型CJDは、従来の散発型CJDとは異なって若年性の患者で発症し、異常型プリオン蛋白質(PrP<sup>Sc</sup>)の生化学的研究及び英国で多発していた牛海綿状脳症(BSE)に関する疫学研究から、ウシPrP<sup>Sc</sup>の人への伝達によって発症すると考えられている。また、輸血によって変異型CJDを発症したと推定される症例が報告されており、血液を介したCJDの伝達が注目を集めている。多くの遺伝子組換え医薬品等の製造工程ではウシ胎児血清を用いることから、医薬品へのPrP<sup>Sc</sup>汚染を防ぐために、ウシ由来原材料中のPrP<sup>Sc</sup>測定法の確立が望まれている。

昨年の本研究では大腸菌を用いたウシPrPSV発現系の構築およびヒツジPrPSV mRNAの同定について報告した。ウシPrPは264残基のアミノ酸配列を有し、242-264残基はGPIアンカーシグナル配列と推定され、241残基のAlaを介して細胞膜上に結合している。一方、ウシPrPSV mRNAから推定されるアミノ酸配列は260残基からなり、1-240残基はPrPと共通で、C末端の241-260残基は異なったアミノ酸配列を有して

いる。

本年度はウシPrPと一次構造が異なるPrPSVのC末端部位に相当するペプチド及びウシ組換え蛋白質を抗原としてマウスを免疫し、PrPSVを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの樹立を行った。

また、ヒツジ胎児脳由来培養細胞株OA1が発現するmRNAを解析し、その塩基配列からヒツジPrPSVの一次構造を調べた。

B. 研究方法

1. 抗スプライス変異型プリオン蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

ペプチド抗原としてウシPrPSVのアミノ酸配列241-260残基のC末端ペプチドにMBSを架橋剤としてBSAに結合させた免疫原BoPrPSV(241-260)-BSAを調製した。昨年度に構築したウシPrPSV組換え蛋白質を発現する大腸菌を培養し、その菌体から粗精製画分を調製した。これらを抗原としてBALB/cマウスを免疫後に脾細胞とマウス・ミエローマ細胞NS-1又はPAIと細胞融合を行い、固相抗原としてBoPrPSV(241-260)-OVAを用いたELISAで培養上清をスクリーニングした。

2. イムノプロット法

試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体として抗PrP抗体6H4(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)又は抗ウシPrPSV抗体

を、第2抗体にHRP標識抗IgG抗体を用いたイムノブロットングを行い、化学発光法で検出した。

### 3. 細胞培養

ヒツジ胎児脳由来細胞株OAI (ATCC Number: CRL-6538)はT75組織培養用フラスコで培養し、1週間に1度の継代を行った。長期間の培養は9-cm組織培養用シャーレで行い、4日ごとに培地を交換した。

### 4. RT-PCR

培養したOAI細胞からDNase I消化したtotal RNAを調製し、スーパースクリプトIII RNase H-逆転写酵素(インビトロジェン株式会社)を用いてfs-cDNAを合成し、RT-PCRに用いた。同時にゲノムDNAを調製し、陽性対象としてPCRに用いた。PCRはヒツジPRNPのエクソン3にコードされているオープンリーディングフレーム(ORF)のmRNAを検出する各種プライマーと、Ex taq polymerase (タカラバイオ株式会社)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

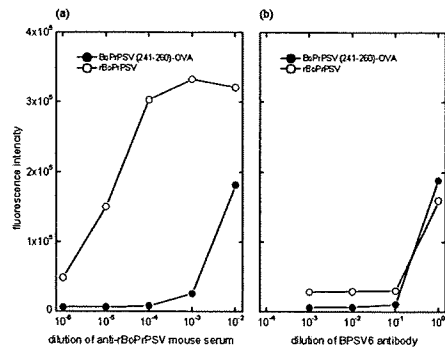
本研究の遂行にあたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定」、「同病原体等安全管理規程」、「同動物実験に関する指針」及び「同遺伝子組換え実験安全管理規則」を遵守した。

## C. 研究結果

### 1. 抗ウシPrPSVモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

先に確認したウシPrPSVのORFは260アミノ酸をコードし、1-240残基まではPrPと同じ一次構造を有している。PrPSVの蛋白質発現を確認するため、C末端に相当するペプチドに対するマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立を行った。ウシPrPSVの241-260残基に相当するペプチドでマウスを免疫し、脾細胞からハイブリドーマ2株を樹立した。産生するIgMクラスの抗体はELISAで固相抗原のペプチドを認識した。しかし、ハイブリドーマのクローニングを数回繰り返しても、それらの特異性は低く、十分な反応性を有する抗体は得られなかった。

次に、ウシPrPSV組換え蛋白質でマウスを免疫し、固相抗原としてウシPrPSVの241-260残基に相当するペプチド及びウシPrPSV組換え蛋白質を用いたELISAで抗体価を測定した。5回免疫後のマウスの抗血清は、免疫原のrBoPrPSVに対して高い抗体価を示した(Fig. 1a)。抗血清中には免疫原のrBoPrPSVのC末端を特異的に認識する抗体も存在し、固相抗原のBoPrPSV (241-260)-OVAにも弱いながら反応性を示した(Fig. 1a)。そこで、このマウスから脾臓を摘出し、

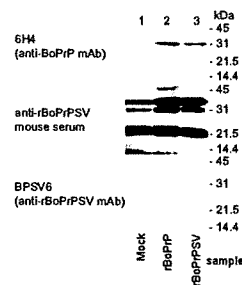


**Fig. 1. Binding of antibodies to coating antigen in ELISA.** (a) Various concentration of anti-rBoPrPSV mouse serum were incubated with BoPrP (241-260)-OVA (●) or rBoPrPSV (○) as coating antigen. (b) Various concentration of anti-rBoPrPSV antibody (BPSV6) were incubated with BoPrPSV (241-260)-OVA (●) or rBoPrPSV (241-260)-OVA as coating antigen

細胞融合を行った。固相抗原としてBoPrPSV (241-260)-OVAを用いたELISAで培養上清を測定し、BoPrPSVのC末端を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ1株を樹立した。ハイブリドーマが産生する抗体(BPSV7)はIgMクラスの抗体で、rBoPrPSVとBoPrPSV (241-260)-OVAを同様に認識した(Fig. 1b)。

### 2. イムノブロット法によるウシPrPSV組換え蛋白質の検出

大腸菌の蛋白質発現系を用い、導入したウシPrP及びPrPSV組換え蛋白質を調製し、イムノブロット法で抗体の反応性を調べた(Fig. 2)。細胞



**Fig. 2. Immunoblot analysis of recombinant bovine splice variant isoform of PrP.** The mock, bovine PrP gene and splice variant were subcloned into and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lane 1), recombinant PrP (lane 2) and PrPSV (lane 3) were detected with anti-PrP mAb 6H4 (upper panel), anti-rBoPrPSV mouse serum (middle panel) and anti-PrPSV mAb BPSV6 (lower panel).

融合に用いたマウス由来抗血清は、免疫原中に含まれるrBoPrPSV以外の菌体由来蛋白質に対する反応性を示した(middle panel, lanes 1-3)。抗PrPモノクローナル抗体6H4は、ウシPrP遺伝子を導入した全細胞溶解液の31 kDa付近にバンドを検出した(upper panel, lane 2)。同様に、ウシPrPSV遺伝子を導入した全細胞溶解液でバンドを検出した(upper panel, lane 3)が、プラスミドのみを導入した全細胞溶解液ではバンドが検出されなかった(upper panel, lane 1)。構築した発現系では、6H4抗体が認識するPrPSVを産生することが確認された。しかし、抗ウシPrPSVモノクローナル抗体BPSV6は、実験に用いたハイブリドーマの培養上清中の抗体濃度では、PrPSV組換え蛋白質を認識しなかった(lower panel, lane 3)。

### 3. ヒツジスプライス変異型プリオン蛋白質 mRNAの解析

長期間培養したヒツジ胎児脳由来細胞株OA1からmRNAを調製し、ヒツジPrP及びPrPSV遺伝子の解析を行った。5回の継代後に40日間培養したOA1細胞(P5D40)のtotal RNAから合成したfs-cDNAを鋳型としたRT-PCRで遺伝子を増幅し、pBluescript II KS(+)にそれぞれの遺伝子をクローニングした。それらの塩基配列は、コドン136がV、コドン156がR、コドン171はQ/Rで、PrP (ARQ/ARR)及びPrPSV (ARQ/ARR)のヘテロ接合型だった。

### D. 考察

本研究では遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、ウシ血清などの動物由来製造原料を汚染する恐れのあるPrP<sup>Sc</sup>の新規検出法の確立を目的とし、その基礎研究としてPrPの発現機構に関する研究を行った。

先に、ヒト脳ではGPI欠損型PrPSV mRNAが発現しており、その予想されるアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体を作製し、ヒトグリオブラストーマ細胞株T98Gが蛋白質として産生していることを報告した[Kikuchi *et al.*, *FEBS J.* 275: 2995-2976 (2008)]。また、昨年度の本研究ではウシ脳及びウシ角膜細胞株BCE C/D-1bがPrPSV mRNAを発現していることを報告した。

今年度はヒトPrPSVを認識するモノクローナル抗体作製と同様な手法を用いてウシPrPSVを認識する抗ペプチド抗体の作製を試みた。合計63匹のマウスをBoPrPSV (241-260)-BSAで免疫し、抗体価が上昇したマウスから脾臓を摘出し、8回の細胞融合を行い、IgMクラスの抗体を産生するハイブリドーマを2株を樹立した。しかし、産生する抗体の特異性は低かった。そこで、新たに大腸菌の菌体から粗精製したBoPrPSV組換

え蛋白質で21匹のマウスを免疫し、固相抗原としてBoPrPSV (241-260)-OVAを用いたELISAでスクリーニングを行った。粗精製した免疫原は大腸菌由来の蛋白質を含んでいたが、固相抗原にPrPSVの特異的なC末端ペプチドを用いたELISAで血清中の抗体価が高いマウスを選択し、細胞融合後、BoPrPSV (241-260)及びPrPSV組換え蛋白質を同様に認識するIgMクラスの特異抗体BPSV6を産生するハイブリドーマを樹立した。この抗体を用いてイムノプロット法を行ったが、今回の実験に用いた抗体の濃度ではrBoPrPSVの検出できなかった。マウス抗血清中の特異抗体はIgG ( $\gamma 2a, \lambda$ )で、細胞融合に十分な抗体価を有していた。先に樹立したヒトPrPSVのC末端を認識するHPSV178はIgGクラスの抗体で、イムノプロット法でヒト培養細胞全抽出液中のPrPSVを検出可能であった。同様の手法でウシPrPSV検出法の開発を試みたが、合計84匹のマウスを免疫し、9回の細胞融合を行ったが、IgGクラスの特異抗体を産生するハイブリドーマは樹立できなかった。今後はIgGクラスの特異抗体を産生するハイブリドーマを樹立するために、ウシPrPSV組換え蛋白質を大量に調製して高度に精製した免疫原の確保し、マウスの他にもニワトリを免疫し、脾細胞を用いてハイブリドーマの樹立およびファージディスプレイ法による特異抗体の調製を予定している。

ヒツジ胎児脳由来細胞株OA1のmRNAを解析し、PrP (ARQ/ARR)及びPrPSV (ARQ/ARR)遺伝子を発現していることを明らかにした。ヒツジのスクレイピーに対する感受性は主にPrP遺伝子(*prnp*)のコドン136、154及び171の多型により制御され、V<sup>136</sup>R<sup>154</sup>Q<sup>171</sup>/VRQ、ARQ/VRQ及びARQ/ARQの遺伝子を持つヒツジがスクレイピーに最も感受性が高く、ARQ/ARRの感受性は中程度とされている。OA1はARQ/ARRのヘテロ接合*prnp*のヒツジ由来の培養細胞で、スクレイピー易感染培養細胞としての利用できる可能性があり、PrPSVのスクレイピー感染に対する関与の解明に利用が期待される。

今後はスクレイピーのマウス脳内投与による伝達実験を行い、感染へのPrPSVの関与、スクレイピー感染脳を抗原としたニワトリへの免疫による異常プリオン蛋白質特異的ニワトリ抗体の調製を予定している。

### E. 結論

本研究ではウシPrP<sup>Sc</sup>の新規検出法確立を目的とし、それらに資する基礎研究としてウシPrPSV組換え蛋白質発現系の構築、ウシPrPSV特異抗体の調製、ヒツジ胎児脳由来細胞株OA1が発現するPrPSV mRNAの解析を行った。これらの結果は、新たなPrP<sup>Sc</sup>バイオアッセイ系の構



築、プリオン病のバイオマーカー測定法開発への寄与が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

蜂須賀暁子, 児矢野聡、菊池裕, 中島治, 青笹正義, 松田治男, 澤田純一, 手島玲子, 抗マウスプリオンペプチドフェージ一本鎖抗体の反応性, 国立衛研報, 127, 26-30 (2009)

2. 学会発表

1. T. Suzuki, A. Kohara, A. Ramadan, Y. Kikuchi, M. Honma, M. Hayashi: Comparative study on *in vivo* genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for the Balkan Endemic Nephropathy, 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), Aug. 20-25, 2009, Firenze, Italy

2. 菊池裕、中島治、豊田淑江、手島玲子、小西良子、山口照英：低酸素条件下で誘導されるGPIアンカー欠損型プリオン蛋白質の発現解析、第82回日本生化学会大会、平成21年10月21-24日、神戸市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部  
中島治

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

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
Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K.	Infectious prion protein in the filtrate even after 15nm filtration. Biologicals.				In press.
Hirata Y, Ito H, Furuta T, Ikuta K, Sakudo A.	Degradation and destabilization of abnormal prion protein using alkaline detergents and proteases.	Int J Mol Med.	25	267-270	2010
Sakudo A, Ikuta K	Fundamentals of prion diseases and their involvement in the loss of function of cellular prion protein. Protein	Pept Lett.	16	217-229	2009
Sakudo A, Ikuta K	Prion protein functions and dysfunction in prion diseases.	Curr Med Chem.	16	380-389	2009
Nishimura T, Sakudo A, Xue G, Ikuta K, Yukawa M, Sugiura K, Onodera T.	Establishment of a new glial cell line from hippocampus of prion protein gene-deficient mice.	Biochem Biophys Res Commun.	377	1047-1050	2008
Sakudo A, Wu G, Onodera T, Ikuta K,	Octapeptide repeat region of prion protein (PrP) is required at an early stage for production of abnormal prion protein in PrP-deficient neuronal cell line	Biochem Biophys Res Commun	365	164-169	2008

Sakudo A, Taniuchi Y, Kobayashi T, Onodera T, Ikuta K,	Normal cytochrome c oxidase activity in prion protein gene-deficient mice,	Protein Peptide Lett	15	250-254	2008
Sakudo A, Nakamura I, Tsuji S, Ikuta K.	GPI-anchor-less human prion protein is secreted and glycosylated but lacks SOD activity	Int J Mol Med	21	217-222	2008
Sakudo A, Onodera T, Ikuta K	PrP <sup>Sc</sup> level and incubation time in a transgenic mouse model expressing Borna disease virus phosphoprotein after intracerebral prion infection,	Neurosci Lett	431	81-85	2008
Sakudo A, Wu G, Onodera T, Ikuta K.	Octapeptide repeat region of prion protein (PrP) is required at an early stage for production of abnormal prion protein in PrP-deficient neuronal cell line.	Biochem Biophys Res Commun.	365	164-169	2008
Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Hattori S, Ohtani M, Narita Y, Kawabata Y, Miyatake Y, Nanjo A, Iwao E, Morita M, Wilson E, MacLean C and Ikuta K	Prion removal by nanofiltration under different experimental conditions.	Biologicals	36	27-36	2008
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 <sup>Sc</sup> is critical for the infectivity of the Chandler prion strain.	J Virol.	83	3852-3860	2009

Song, C.-H., Honmou, O., Nakamura, K., Hamada, H., Furuoka, H., Hasebe, R., and Horiuchi, M.	Effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions	J Virol.	83	5918-5927	2009
Horiuchi, M., Karino, A., Furuoka, H., Ishiguro, N., Kimura, K., and Shinagawa, M.	Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrPSc from PrPC and neutralizes prion infectivity	Virology	394	200-207	2009
Nakamitsu, S., Kurokawa, A., Yamasaki, T., Uryu, M., Hasebe, R., and Horiuchi, M.	Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells	J. Gen. Virol.	91	563-569	2010
Sakata, H., Horiuchi, M., Takahashi, I., and Kinjo, M.	Confomational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy.	Curr. Pharm. Biotechnol.			In press.

**Short  
Communication****Cell density-dependent increase in the level of protease-resistant prion protein in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells**

Satoshi Nakamitsu, Aya Kurokawa, Takeshi Yamasaki, Masahide Uryu, Rie Hasebe and Motohiro Horiuchi

**Correspondence**Motohiro Horiuchi  
horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp

Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan

Cells persistently infected with prions continuously produce protease-resistant prion protein (PrP-res). Here, we show that the PrP-res level in prion-infected Neuro2a (N2a) neuroblastoma cells decreased to 50% of their initial level over the first 48 h and then recovered by 96 h after seeding. The level of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) also appeared to fluctuate, but did not influence the fluctuation of the PrP-res level. Prion-infected N2a cells, co-cultured with a higher number of prion-unsusceptible cells, had twice as much PrP-res as those cultured without unsusceptible cells, suggesting that cell density influences the fluctuation of PrP-res. Direct cell-to-cell contact between cells, rather than soluble factors, was involved in the cell density-dependent increase in the PrP-res level. The cholesterol content, which is known to influence PrP-res formation, also changed depending on cell density. Our data suggest that alterations in cellular microenvironments controlled by cell density influence PrP-res formation.

Received 28 August 2009

Accepted 6 October 2009

The causative agent of prion diseases, prion, is believed to be composed mainly of an abnormal isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>). During the progression of the disease, a host-encoded cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) undergoes a conformational change to form PrP<sup>Sc</sup>, which accumulates in the central nervous system. It is known that PrP<sup>Sc</sup> is composed of protease-sensitive and -resistant forms (Tzaban *et al.*, 2002; Safar *et al.*, 2005; Pastrana *et al.*, 2006). The PrP<sup>Sc</sup> form that is resistant to limited proteolysis is referred to as PrP-res, and PrP-res is used as a diagnostic marker of prion diseases.

Studies using prion-infected cells have provided many insights into prion biology, including the mechanism of PrP biosynthesis and the cell biological mechanism of prion propagation (Caughey & Raymond, 1991; Borchelt *et al.*, 1992; Vey *et al.*, 1996; Naslavsky *et al.*, 1997; Marijanovic *et al.*, 2009), and transmission of prions (Fevrier *et al.*, 2004; Gousset *et al.*, 2009; Mattei *et al.*, 2009). Although cells persistently infected with prions produce PrP-res and possess prion infectivity, the PrP-res level is known to change depending on the culture conditions, such as composition of the medium and differentiation state of cells (Rubenstein *et al.*, 1990; Bate *et al.*, 2004). The PrP-res level also changes during routine cell passage, possibly caused by subtle differences in the culture conditions.

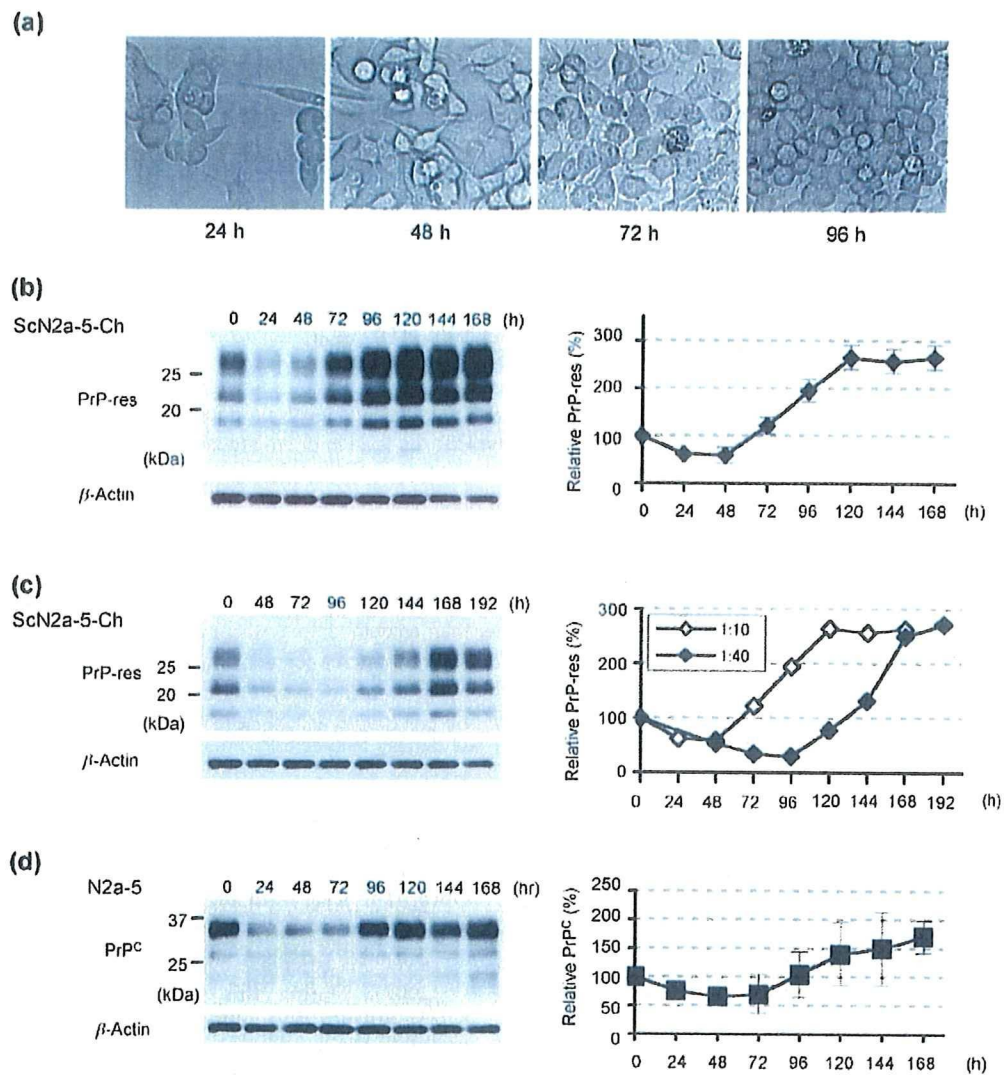
PrP<sup>Sc</sup> in prion-infected cells is believed to exist in a dynamic equilibrium between synthesis and degradation.

Supplementary material is available with the online version of this paper.

Theoretically, after each cell division, the amount of PrP<sup>Sc</sup> per cell must halve, after which it increases again to an appropriate level until the next cell division (Weissmann, 2004). Indeed, a decrease in PrP-res levels in cultured cells 48–72 h after passage followed by recovery of the PrP-res level thereafter has been reported (Ghaemmaghami *et al.*, 2007). During this process, certain host factors can modulate the equilibrium level of PrP<sup>Sc</sup> by changing the rate of PrP-res formation, although the factors remain to be elucidated.

To understand the mechanism of fluctuation in the PrP-res levels in prion-infected cells, we analysed the kinetics of PrP-res levels in N2a subclones, N2a-5 and N2a-3 persistently infected with the Chandler strain (ScN2a-5-Ch and ScN2a-3-Ch; Uryu *et al.*, 2007). In addition, N2a-5 and N2a-3 cells persistently infected with the 22L strain (ScN2a-5-22L and ScN2a-3-22L) were used. Methods of immunoblotting and dot blotting for detecting PrP are described in Supplementary Material (available in JGV Online).

When ScN2a-5-Ch cells were seeded at a split ratio of 1 : 10, the culture was 40–50% confluent 48 h after seeding, and 80–90% confluent at 72 h after seeding (Fig. 1a). For analysing PrP-res levels, cells were first seeded into several 60 mm dishes at a 1 : 10 split ratio. At 72 h after seeding, the cells grown in one dish were harvested and used as the 0 h sample. Cells grown in other dishes were seeded again into new 60 mm dishes at a 1 : 10 or 1 : 40 split ratio, and



**Fig. 1.** Kinetics of the change in PrP levels in N2a subclone. (a) Phase-contrast microscopic images of ScN2a-5-Ch cells at the indicated culture times. (b) Changes in PrP-res levels in ScN2a-5-Ch cells. For the detection of  $\beta$ -actin, 10  $\mu$ g post-nuclear cell lysates was loaded. For the detection of PrP-res, the cell lysates were treated with proteinase K (PK) and 100  $\mu$ g cell lysate equivalents was loaded. The PrP-res level relative to that of PrP-res at 0 h was calculated, and graphs on the right represent the mean  $\pm$  SD of the relative PrP-res levels ( $n=3$ ). (c) The kinetics of PrP-res level in ScN2a-5-Ch cells passaged at a 1:40 split ratio ( $n=1$ , filled diamonds). Changes in the PrP-res level obtained after the passage at a 1:10 split ratio (open diamonds) were overlaid. (d) Changes in PrP<sup>C</sup> levels in N2a-5 cells. Cell lysates (10  $\mu$ g) without PK treatment were loaded. Graphs show the PrP<sup>C</sup> level relative to the PrP<sup>C</sup> level at 0 h (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ).

were harvested every 24 h for quantification of PrP-res by immunoblotting. In N2a-5 and N2a-3 cells infected with the Chandler strain, the level of PrP-res decreased to about 50% of that of the 0 h PrP-res sample over the first 48 h, following which PrP-res levels recovered to the initial level by 72–96 h after seeding. If the cells were maintained in the same dishes thereafter, PrP-res levels further increased and then reached a plateau (Fig. 1b; Supplementary Fig. S1a, available in JGV Online). When ScN2a-5-Ch cells were

seeded at a 1:40 split ratio, under which the cultures became confluent at 120–144 h after seeding, PrP-res levels began to increase from 96 h after seeding, and had recovered to the initial level by 120–144 h (Fig. 1c). This result indicates that fluctuation in the level of PrP-res does not simply depend on the time period after the seeding of cells. Although a pattern of the kinetic change of the PrP-res level in N2a cells infected with the 22L strain did not appear to be the same as that of the PrP-res level in the

Chandler-infected cells, the fluctuation in PrP-res level was also observed (Supplementary Fig. S1b, available in JGV Online).

The kinetics of PrP<sup>C</sup> levels in N2a-5 and N2a-3 cells, especially by 96 h after seeding, were similar to those of PrP-res levels (Fig. 1d; Supplementary Fig. S1c, available in JGV Online). The PrP<sup>C</sup> levels decreased to about 50% of that of the control (the amount of PrP<sup>C</sup> at 0 h) over the first 48 h, but had recovered by 96 h after seeding, suggesting that fluctuation in the PrP-res level might be caused by a change in the level of PrP<sup>C</sup>. However, the kinetics of PrP<sup>C</sup> and PrP-res levels in PrP-overexpressing cells showed that even though the cells expressed a level of PrP<sup>C</sup> that would be sufficient for PrP-res formation, the PrP-res level still decreased after seeding of the cells (Supplementary Fig. S2, available in JGV Online). Therefore, the observed fluctuation in the PrP-res level appears to be independent of that in the PrP<sup>C</sup> level.

The results described above suggested that cell density is one of the factors for the increase in PrP-res level. To determine if cell density is indeed related to the increase in the PrP-res level, ScN2a-3-Ch cells were co-cultured with various numbers of N2a-1 cells to produce conditions under which the same number of ScN2a-3-Ch cells was present in cultures of different cell densities. N2a-1 cells express the same level of PrP<sup>C</sup> as N2a-3 cells but are not susceptible to prions (Uryu *et al.*, 2007). Therefore, changes in the PrP-res level in these co-cultures should represent changes in PrP-res level in ScN2a-3-Ch cells.

First, we analysed the effect of the presence of N2a-1 cells at different densities on the growth of ScN2a-3-Ch cells. ScN2a-3-Ch cells, labelled with the PKH26 fluorescent dye, were co-cultured for 72 h with various numbers of N2a-1 cells (Fig. 2a). Counting of cells labelled with red revealed no significant difference in the number of ScN2a-3-Ch cells among co-cultures. This suggested that different numbers of counterpart cells did not influence the growth of ScN2a-3-Ch cells at least over 72 h. Therefore, the experimental condition was considered to be suitable for comparison of the PrP-res level in ScN2a-3-Ch cells cultured at different cell densities.

To analyse the effect of cell density on the PrP-res level, a uniform number of ScN2a-3-Ch cells (1:20 split ratio) was cultured for 3 days with various numbers of N2a-1 cells. ScN2a-3-Ch cells cultured with higher numbers of N2a-1 cells (Fig. 2b, 1:10 to 1:80 split ratio) had PrP-res at a level that was almost twice as high as the same number of ScN2a-3-Ch cells cultured in the absence of N2a-1 cells. These results suggest that a higher cell density facilitates PrP-res formation. Consistent with this observation, cells in areas with a higher cell density showed more intense fluorescence signals of PrP<sup>Sc</sup> than cells with a lower cell density (Supplementary Fig. S3, available in JGV Online).

Since no difference was observed in the PrP-res levels in ScN2a-3-Ch cells cultured with or without the conditioned medium of N2a-1 cells grown at various densities (Fig. 2c),

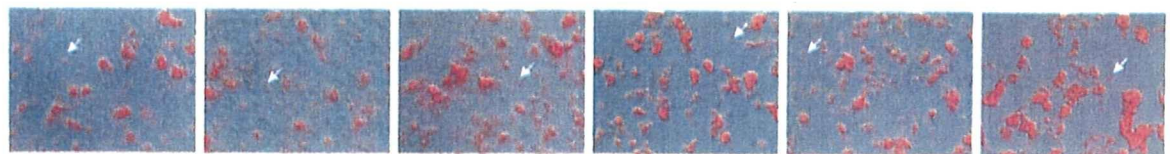
direct cell-to-cell contact rather than soluble factors is involved in the increase in PrP-res levels. In addition, co-culture of ScN2a-3-Ch cells with methanol-fixed N2a-1 cells did not increase PrP-res level (Fig. 2d), indicating that direct cell-to-cell contact between live cells is necessary for the increase in PrP-res levels. We further analysed the effect of PrP<sup>C</sup> expression in the co-cultured counterpart cells on PrP-res formation, using N2a-24 cells that express trace levels of PrP<sup>C</sup> (Uryu *et al.*, 2007). The cell density-dependent increase in PrP-res levels was again observed when ScN2a-3-Ch cells were cultured with high numbers of N2a-24 cells (Fig. 2e, 1:5 and 1:10 split ratio). We confirmed that the level of PrP<sup>C</sup> in N2a-3 cells did not change under co-culture (Supplementary Fig. S4, available in JGV Online).

It has been reported that cellular cholesterol contents are increased in several cells when the cells reach confluency (Cansell *et al.*, 1997; Corvera *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2007). Since cholesterol depletion has been shown to affect PrP-res formation in prion-infected cell cultures (Taraboulos *et al.*, 1995; Bate *et al.*, 2004; Prior *et al.*, 2007), we first stained N2a-5 cells with filipin III, a sterol-binding polyene antibiotic. Stronger fluorescent intensities were observed in cells at a higher cell density than in cells at a lower cell density (Fig. 3a, compare cells at 24 and 96 h after seeding at 1:10 split ratio, or cells 72 h after seeding at 1:5 or 1:40 split ratio). Consistent with this observation, the cellular cholesterol content of subconfluent N2a-5 cells (Fig. 3b, 24 h after seeding) was about 25% less than that in confluent N2a-5 cells (96 h after seeding). In addition, the cholesterol content in N2a-5 cells seeded at a higher split ratio (Fig. 3c, 1:40) was lower than that in cells seeded at a lower split ratio (1:5). These results demonstrated that the cellular cholesterol content of N2a-5 cells increased when the cells reached confluency.

To examine whether an approximately 25% decrease in cellular cholesterol content influences PrP-res formation, cholesterol depletion was carried out with lovastatin or methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) under non-cytotoxic conditions (Fig. 3d). Lovastatin treatment resulted in 26% decrease in the cholesterol content of ScN2a-5-Ch cells. Under this condition, the level of PrP-res decreased to 45% of that of the untreated control. Thus, it is possible that the approximately 25% lower content of cholesterol in subconfluent N2a-5 cells affects PrP-res formation. In turn, the cholesterol content of nearly confluent, or confluent N2a cells, may be sufficient to maintain the level of PrP-res. On the contrary, M $\beta$ CD treatment reduced cellular cholesterol content to 35% of that of untreated cells, which drastically reduced the level of PrP-res. Although M $\beta$ CD is known to remove cholesterol from the cell membrane (Christian *et al.*, 1997; Simons *et al.*, 1998), M $\beta$ CD also directly binds to PrP<sup>C</sup> and inhibits the conversion of PrP<sup>C</sup> to PrP-res (Prior *et al.*, 2007). Therefore, the efficient clearance of PrP-res appears to be due not only to cholesterol depletion, but also to a direct effect of M $\beta$ CD on PrP<sup>C</sup>.

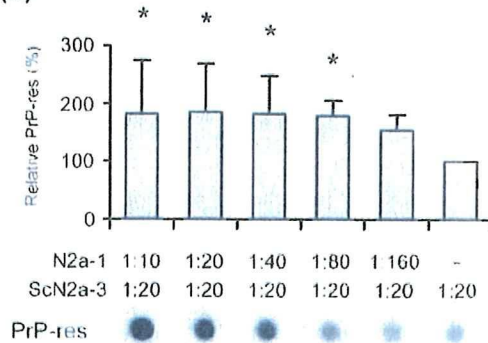
(a)

N2a-1	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	-
ScN2a-3-Ch	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20

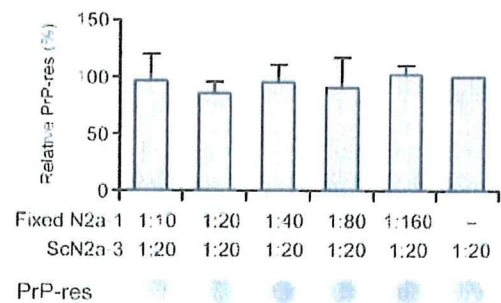


63.3±7.1      68.5±21.1      66.7±16.4      67.8±14.0      64.0±2.8      70.0±17.0

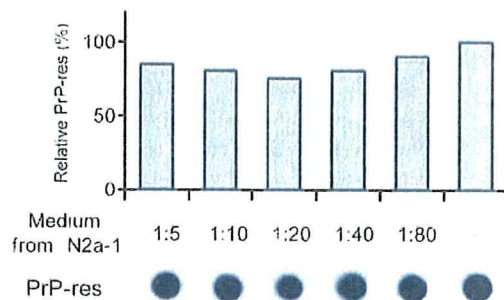
(b)



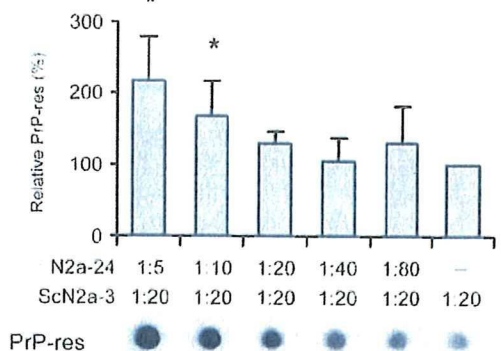
(d)



(c)

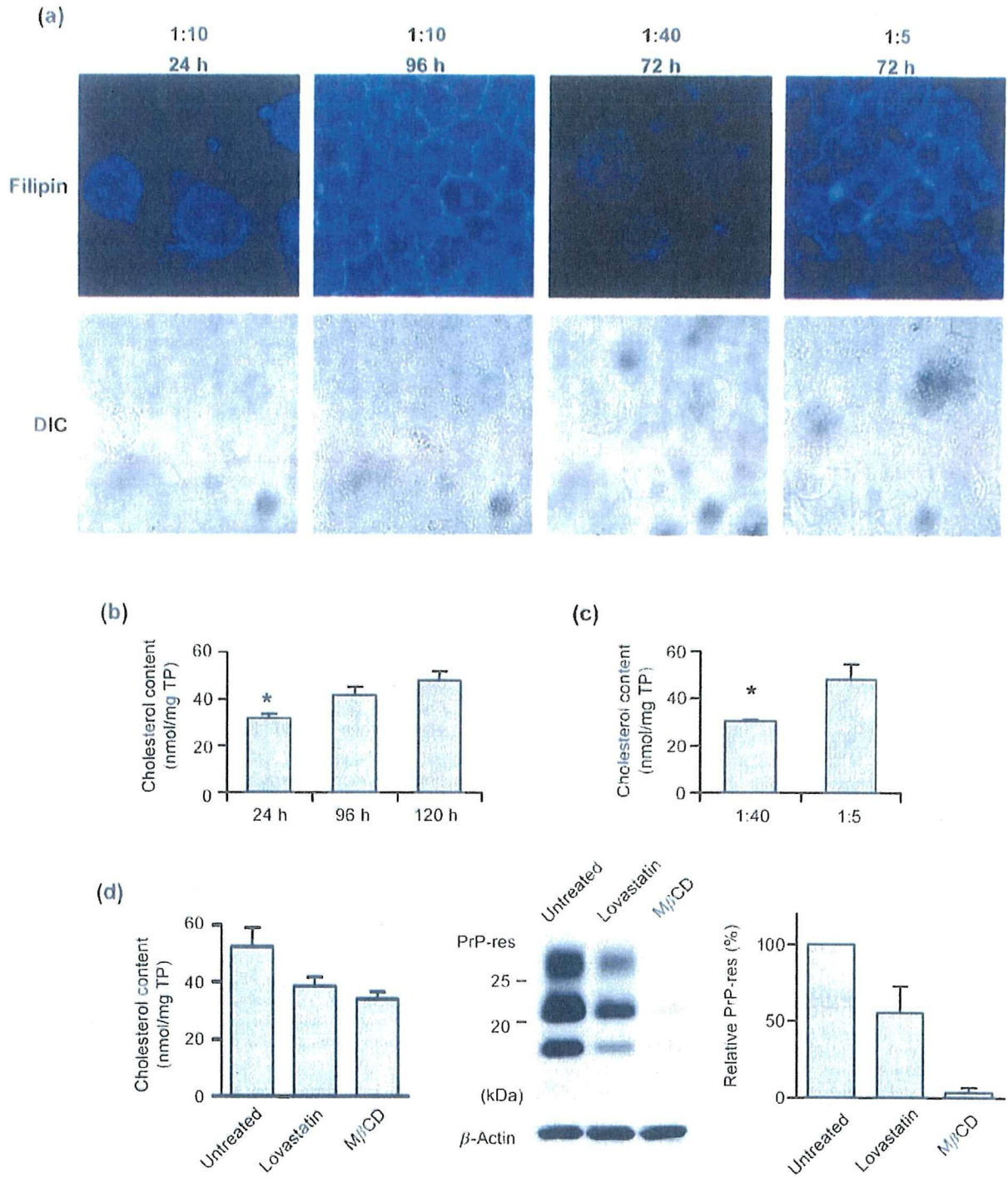


(e)



**Fig. 2.** Effect of cell density on PrP-res formation. (a) Co-cultured ScN2a-3-Ch cells with prion-unsusceptible N2a-1 cells. ScN2a-3-Ch cells labelled with PKH26 fluorescent dye (labelled with red) were co-cultured with various numbers of N2a-1 cells for 3 days. Phase-contrast images of the cells, overlaid with the corresponding fluorescent images, are shown. The ratios at the top indicate the split ratio of ScN2a-3-Ch and N2a-1 cells at seeding. The means  $\pm$  SD of the number of labelled cells from four micrographs are shown below the images. The arrows indicate cells with threshold intensity that were counted as positive. For all (b–e), the PrP-res levels were measured by dot blotting and representative blots are shown. The split ratios of cells at seeding are indicated below each graph. (b) PrP-res levels in ScN2a-3-Ch cells co-cultured with N2a-1 cells for 3 days. The graph indicates the level of PrP-res relative to those in ScN2a-3-Ch cells without N2a-1 cells ( $n=4$ ). Asterisks indicate significant difference ( $P<0.05$ ) as analysed by Williams' multiple comparison test. (c) Effect of conditioned medium (CM). N2a-1 cells were seeded into 60 mm dishes at a 1:5 to 1:80 split ratio and cultured for 3 days. The supernatants (CM) were then harvested and filtered through a 0.22  $\mu$ m filter. An equal volume of CM was added to ScN2a-3-Ch cells that were seeded at a 1:10 split ratio 24 h before the addition of CM, and the cells were incubated for an additional 48 h. The graph represents the level of PrP-res relative to the amount of PrP-res in ScN2a-3-Ch cells cultured without CM ( $n=1$ ). (d) PrP-res levels in ScN2a-3-Ch cells co-cultured with fixed N2a-1 cells. N2a-1 cells seeded into 24-well-plates were cultured for 3 days and fixed with methanol. ScN2a-3-Ch cells were seeded at a 1:20 split ratio into wells containing fixed N2a-1 cells and cultured for 3 days. The graph shows the level of PrP-res relative to the amount of PrP-res in ScN2a-3-Ch cells without fixed N2a-1 ( $n=3$ ). (e) PrP-res levels in ScN2a-3-Ch cells co-cultured with N2a-24 cells for 3 days ( $n=4$ ). The co-culture was started at a ratio of 1:5 because growth rate of N2a-24 cells was slower than that of ScN2a-3 cells.





**Fig. 3.** The effect of cell density on cholesterol content. (a) Cellular localization of cholesterol. N2a-5 cells seeded at a 1 : 10 split ratio and cultured for 24 or 96 h, or cells seeded at a 1 : 5 or 1 : 40 split ratio and cultured for 72 h, were stained for cholesterol with filipin III. Top, fluorescence images; bottom, phase-contrast microscopic images. (b) Cholesterol content of subconfluent (24 h after seeding at a 1 : 10 split ratio) and confluent N2a-5 cells (96 and 120 h after seeding at a 1 : 10 split ratio). Cholesterol content is expressed as nmol per mg total protein (TP) ( $n=3$ ). The asterisk indicates significant difference ( $P < 0.05$ ). (c) Cholesterol content of N2a-5 cells seeded at a 1 : 5 or 1 : 40 split ratio and cultured for 72 h. (d) Effect of cholesterol depletion on PrP-res formation. ScN2a-5-Ch cells were treated with 0.3  $\mu$ M lovastatin or 2.0  $\mu$ M M $\beta$ CD for 96 h. The graph on the left indicates cholesterol content ( $n=3$ ). The image in the middle is a representative immunoblot of PrP<sup>Sc</sup> and corresponding  $\beta$ -actin, and the graph on the right shows the PrP-res level ( $n=3$ ).

Cell confluency has also been reported to affect intracellular distribution of cholesterol in Chinese hamster ovary cells (Takahashi *et al.*, 2007). Treatment of prion-infected cells with a 24-dehydrocholesterol reductase inhibitor, U18666A, has been shown to inhibit PrP-res formation (Klingenstein *et al.*, 2006; Hagiwara *et al.*, 2007; Marijanovic *et al.*, 2009). Although treatment with U18666A did not appear to alter cellular cholesterol content (data not shown), U18666A inhibited intracellular cholesterol transport, resulting in a redistribution of cholesterol from the plasma membrane to intracellular compartments (Liscum & Underwood, 1995; Sparrow *et al.*, 1999; Klingenstein *et al.*, 2006). As shown in Fig. 3(a), N2a cells in an area of high cell density showed more intense cholesterol staining on the plasma membrane than N2a cells in an area with lower cell density. Therefore, cell density-dependent cellular localization of cholesterol may also influence PrP-res formation.

Here, we showed that a higher cell density, which increases the opportunity of cell-to-cell contact, facilitated PrP-res formation in prion-infected N2a cells. We also showed the possibility that cell density-dependent cholesterol content and/or localization may influence fluctuation in the PrP-res level. However, it remains to be clarified how cholesterol influences PrP-res formation that is controlled by cell density. Prion propagation in continuously dividing cultured cells differs from prion propagation in non-dividing neuronal cells in the central nervous system. However, the acceleration of PrP-res formation by direct cell-to-cell contact is somewhat analogous to the deposition of PrP<sup>Sc</sup> at neuro-muscular junction (Andréoletti *et al.*, 2004; Thomzig *et al.*, 2004) or to synaptic deposition of PrP<sup>Sc</sup> (Kitamoto *et al.*, 1992) in that specific and direct cell-to-cell interaction provides a niche for PrP-res formation. Further analysis of the cell density-dependent increase in PrP-res formation will provide clues for clarification of the environment that is required for PrP-res formation *in vivo*.

## Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-Aid for JSPS Fellows (no. 20.7303). This work was supported by a grant from the Global COE Program (F-001) and a Grant-in-Aid for Science Research (A) (grant no. 18208026) and a Grant-in-Aid for Exploratory Research (grant no. 20658070) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan. This work was also supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (grant no. 20330701, Research on Measures for Intractable Diseases). This work was also partly supported by a Grant-in-Aid from the BSE Control Project of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, and the Program of Founding Research Centers for Emerging and Reemerging Infectious Diseases, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

## References

- Andréoletti, O., Simon, S., Lacroux, C., Morel, N., Tabouret, G., Chabert, A., Lugan, S., Corbière, F., Ferré, P. & other authors (2004). PrP<sup>Sc</sup> accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med* 10, 591–593.
- Bate, C., Langeveld, J. & Williams, A. (2004). Manipulation of PrPres production in scrapie-infected neuroblastoma cells. *J Neurosci Methods* 138, 217–223.
- Borchelt, D. R., Taraboulos, A. & Prusiner, S. B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267, 16188–16199.
- Cansell, M., Gouygou, J. P., Jozefonvicz, J. & Letourneur, D. (1997). Lipid composition of cultured endothelial cells in relation to their growth. *Lipids* 32, 39–44.
- Caughey, B. & Raymond, G. J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266, 18217–18223.
- Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C. & Rothblat, G. H. (1997). Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 38, 2264–2272.
- Corvera, S., DiBonaventura, C. & Shpetner, H. S. (2000). Cell confluence-dependent remodeling of endothelial membranes mediated by cholesterol. *J Biol Chem* 275, 31414–31421.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H. & Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9683–9688.
- Ghaemmaghami, S., Phuan, P., Perkins, B., Ullman, J., May, B. C. H., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (2007). Cell division modulates prion accumulation in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17971–17976.
- Goussset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D. T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A. & other authors (2009). Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 11, 328–336.
- Hagiwara, K., Nakamura, Y., Nishijima, M. & Yamakawa, Y. (2007). Prevention of prion propagation by dehydrocholesterol reductase inhibitors in cultured cells and a therapeutic trial in mice. *Biol Pharm Bull* 30, 835–838.
- Kitamoto, T., Shin, R. W., Doh-ura, K., Tomokane, N., Miyazono, M., Muramoto, T. & Tateishi, J. (1992). Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 140, 1285–1294.
- Klingenstein, R., Löber, S., Kujala, P., Godsave, S., Leliveld, S. R., Gmeiner, P., Peters, P. J. & Korth, C. (2006). Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments. *J Neurochem* 98, 748–759.
- Liscum, L. & Underwood, K. W. (1995). Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem* 270, 15443–15446.
- Marijanovic, Z., Caputo, A., Campana, V. & Zurzolo, C. (2009). Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS Pathog* 5, e1000426.
- Mattei, V., Barenco, M. G., Tasciotti, V., Garofalo, T., Longo, A., Boller, K., Löwer, J., Misasi, R., Montrasio, F. & Sorice, M. (2009). Paracrine diffusion of PrP(C) and propagation of prion infectivity by plasma membrane-derived microvesicles. *PLoS One* 4, e5057.
- Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G. & Taraboulos, A. (1997). Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272, 6324–6331.
- Pastrana, M. A., Sajjani, G., Onisko, B., Castilla, J., Morales, R., Soto, C. & Requena, J. R. (2006). Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrP<sup>Sc</sup> fraction. *Biochemistry* 45, 15710–15717.

- Prior, M., Lehmann, S., Sy, M., Molloy, B. & McMahon, H. E. M. (2007). Cyclodextrins inhibit replication of scrapie prion protein in cell culture. *J Virol* 81, 11195–11207.
- Rubenstein, R., Scalici, C. L., Papini, M. C., Callahan, S. M. & Carp, R. I. (1990). Further characterization of scrapie replication in PC12 cells. *J Gen Virol* 71, 825–831.
- Safar, J. G., Geschwind, M. D., Deering, C., Didorenko, S., Sattavat, M., Sanchez, H., Serban, A., Vey, M., Baron, H. & other authors (2005). Diagnosis of human prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3501–3506.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G. & Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6460–6464.
- Sparrow, S. M., Carter, J. M., Ridgway, N. D., Cook, H. W. & Byers, D. M. (1999). U18666A inhibits intracellular cholesterol transport and neurotransmitter release in human neuroblastoma cells. *Neurochem Res* 24, 69–77.
- Takahashi, M., Murate, M., Fukuda, M., Sato, S. B., Ohta, A. & Kobayashi, T. (2007). Cholesterol controls lipid endocytosis through Rab11. *Mol Biol Cell* 18, 2667–2677.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S. B. & Avraham, D. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 129, 121–132.
- Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Kratzel, C., Mai, J. & Beekes, M. (2004). Preclinical deposition of pathological prion protein PrP<sup>Sc</sup> in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest* 113, 1465–1472.
- Tzaban, S., Friedlander, G., Schonberger, O., Horonchik, L., Yedidia, Y., Shaked, G., Gabizon, R. & Taraboulos, A. (2002). Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* 41, 12868–12875.
- Uryu, M., Karino, A., Kamihara, Y. & Horiuchi, M. (2007). Characterization of prion susceptibility in Neuro2a mouse neuroblastoma cell subclones. *Microbiol Immunol* 51, 661–669.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A. & Prusiner, S. B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14945–14949.
- Weissmann, C. (2004). The state of the prion. *Nat Rev Microbiol* 2, 861–871.

## Effect of Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Mice Infected with Prions<sup>∇†</sup>

Chang-Hyun Song,<sup>1</sup> Osamu Honmou,<sup>2</sup> Natsuo Ohsawa,<sup>1</sup> Kiminori Nakamura,<sup>3</sup> Hirofumi Hamada,<sup>3</sup> Hidefumi Furuoka,<sup>4</sup> Rie Hasebe,<sup>1</sup> and Motohiro Horiuchi<sup>1\*</sup>

Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818,<sup>1</sup> Departments of Neural Repair and Therapeutics<sup>2</sup> and Molecular Medicine,<sup>3</sup> Sapporo Medical University, South-1st, West-16th, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, and Department of Pathobiological Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro 080-8555, Japan<sup>4</sup>

Received 23 January 2009/Accepted 9 March 2009

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) have been reported to migrate to brain lesions in experimental models of ischemia, tumors, and neurodegenerative diseases and to ameliorate functional deficits. In this study, we attempted to evaluate the therapeutic potential of MSCs for treating prion diseases. Immortalized human MSCs (hMSCs) that express the *LacZ* gene were transplanted into the unilateral hippocampi or thalami of mice, and their distributions were monitored by the expression of  $\beta$ -galactosidase. In mice infected with prions, hMSCs transplanted at 120 days postinoculation (dpi) were detected on the contralateral side at 2 days after transplantation and existed there even at 3 weeks after transplantation. In contrast, few hMSCs were detected on the contralateral side for mock-infected mice. Interestingly, the migration of hMSCs appeared to correlate with the severity of neuropathological lesions, including disease-specific prion protein deposition. The hMSCs also migrated to a prion-specific lesion in the brain, even when intravenously injected. Although the effects were modest, intrahippocampal and intravenous transplantation of hMSCs prolonged the survival of mice infected with prions. A subpopulation of hMSCs in the brains of prion-infected mice produced various trophic factors and differentiated into cells of neuronal and glial lineages. These results suggest that MSCs have promise as a cellular vehicle for the delivery of therapeutic genes to brain lesions associated with prion diseases and, furthermore, that they may help to regenerate neuronal tissues damaged by prion propagation.

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders of humans and animals that are strongly associated with the conversion of normal prion protein (PrP<sup>C</sup>) to a disease-specific isoform of prion protein (PrP<sup>Sc</sup>). Many inhibitors of PrP<sup>Sc</sup> formation, investigated by using cells persistently infected with prions or an *in vitro* conversion reaction, have been reported as candidates for therapeutics (55). Several compounds or active/passive immunization with PrP showed a prophylactic effect when administered before, simultaneously with, or just after inoculation with prions (14, 19, 43, 50, 52). However, only a few compounds, such as amphotericin B and its derivative pentosan polysulfate, porphyrin derivatives, and certain amyloidophilic compounds, have been shown to be effective at prolonging survival when administered in the middle or late stage of prion infection (10, 13, 25, 27). In clinical trials, pentosan polysulfate seems to extend the survival of several patients beyond the mean but appears unable to arrest the progression of the disease (4, 45).

Recently, we demonstrated that intraventricular infusion of an anti-PrP monoclonal antibody (MAb) could antagonize dis-

ease progression even when initiated after clinical onset, although the distribution of the MAb was largely restricted to the hippocampus and thalamus (53). Thus, improved delivery of the MAb may enhance its beneficial effects. Additionally, because antagonizing PrP<sup>Sc</sup> formation is not sufficient to restore degenerated lesions, it is necessary to pursue ways to regenerate degenerated neuronal tissues.

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent adult stem cells of mesodermal origin. They can differentiate into mesenchymal lineages, such as osteoblasts, adipocytes, and myocytes (15, 41, 44). Remarkably, they also *trans*-differentiate into nonmesodermal cell types, including neuronal and glial lineages (48, 61). A number of studies have shown that MSCs migrate to damaged neuronal tissues following cerebral or systemic transplantation in animal models of ischemia (2, 7), spinal cord injury (23), brain tumors (37), Parkinson's diseases (21, 30), and Niemann-Pick disease (24). The introduction of MSCs in these model contexts resulted in functional recovery; however, the precise mechanisms for restoration remain to be elucidated (36, 38).

In this study, we investigated the therapeutic potential of MSCs for prion diseases. Although the use of mouse MSCs is suitable for studying the effect of MSCs on mice infected with prions, we used immortalized human MSCs (hMSCs) here because of the lack of appropriate methods for the isolation of mouse MSCs at the beginning of the study. In addition, hMSCs can be readily expanded in cell culture; their phenotypes remain similar to those of the primary human MSCs (26); and

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japan. Phone and fax: 81-11-706-5293. E-mail: horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 18 March 2009.