

名古屋, 2009.11

- 281) 飛梅 実. プリオン感染に関わる生体側因子の探索. 日本ウイルス学会総会, 徳島市あわぎんホール, 2010.11.7
- 282) Tobiume M. Proteomic analysis of N2a neuroblastoma cell suclons. Prion2010, Salzburg, 2010.9.9-11
- 283) 穴戸-原 由紀子. 進行性多巣性白質脳症の核内ウイルス封入体 -JC ウイルス感染の標的 PML ボディー. 第 99 回日本病理学会総会 ワークショップ「神経疾患と封入体」, 東京, 2010
- 284) 穴戸-原 由紀子, 内原俊記, 市野瀬志津子. 進行性多巣性白質脳症の核内ドット -ウイルス複製を支持する PML ボディー- 第 40 回日本臨床分子形態学会シンポジウム 5 神経系の分子形態科学 -基礎と臨床-. 福岡, 2008.10
- 285) 長嶋和郎. 進行性多巣性白質脳症 PML 研究の進展とその成果. 第 42 回日本神経病理学会北海道地方会: 特別講演, 札幌, 2009.11.14
- 286) 岡 孝之ら. 当院で経験した Gerstmann- Strä ussler-Scheinker 症候群(GSS)の 3 症例の検討. 第 191 回日本神経学会九州地方会, 佐賀, 2010.9.11
- 287) 奴久妻聡一, 奴久妻智代子. JCI 細胞を用いた抗 JCV 薬のスクリーニング系の確立. 第 50 回日本臨床ウイルス学会, 高知, 2009.6.14
- 288) 奴久妻聡一, 亀岡正典, 杉浦重樹, 中道一生, 奴久妻智代子, 三好勇夫, 竹上勉. HIV-1 Tat による Archetype JC ウイルスの増殖促進. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10.27
- 289) 奴久妻聡一, 中道一生, 亀岡正典, 杉浦重樹, 奴久妻智代子, 三好勇夫, 竹上 勉. HIV-1 PML 型 JCV の増殖を促進する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.11.8

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 特願 2008-159272
生細胞、生細胞内の構造物等の単離および採取方法
- 2) JC ウイルス agno を対象とした PML の治療(特願 2001-356836 号)
- 3) JC ウイルスの VP-1 に対する siRNA、およびそれを含有してなる医薬組成物(特願 2006-513677 号)
- 4) 注意欠陥多動性障害の評価方法(特願 2008-171035)
- 5) Clspn 遺伝子発現を指標とする精神疾患の評価方法(特願 2008-171036)
- 出願中の特許
- 6) JC ウイルスの VP-1 に対する siRNA、およびそれを含有してなる医薬組成物(特願 2006-513677 号)発明者: 長嶋和郎, 澤洋文, 大場靖子. 出願年月日 平成 17 年 4 月 26 日, 特許査定 平成 23 年 1 月 18 日
- 7) JC ウイルス agno を対象とした PML の治療(特願 2001-356836 号)発明者: 長嶋和郎, 澤 洋文, 岡田由紀, 出願年月日 平成 13 年 11 月 22 日
- 8) 抗 JC ウイルス剤及び進行性多巣性白質脳症治療剤(特願 2008-276126)。発明者: 大場靖子, 澤 洋文, 出願年月日 平成 20 年 9 月 30 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 資 料

正常型および異常型プリオン蛋白質(PrP)の細胞内輸送と生理的分解酵素の同定

研究分担者：金子 清俊 東京医科大学 神経生理学講座

著者名：金子 清俊, 八谷 如美

研究要旨

新規の生体分子単離システムを構築し、正常型 PrP の輸送異常により惹起される神経細胞死のメカニズムを明らかにした。さらに、正常型 PrP の生理的切断にかかわるおもな切断酵素はカルパインであり、一方、プリオン持続感染細胞においては ADAM 関連酵素であることも同定した。この生理的切断が正常に起こっていれば異常型プリオンタンパク質にはなり得ないことから、これらの成果は予防法・治療法開発の検討にも極めて有効である。

A. 研究目的

正常型 PrP と神経細胞死との関連について、これまで示唆する報告はいくつかあるものの、明確な因果関係が不明であった。そこで細胞内輸送機構に着目し細胞死の分子機構を解明することを目的とした。さらに、正常型 PrP の生理的切断メカニズムを解析し、これらの結果から、最終的にプリオン病の根本的な治療法の開発のヒントとなる成果を上げることが目的とした。

B. 研究方法

マウス神経芽細胞腫由来(N2a)細胞を材料に、神経細胞死および正常型 PrP の生理的切断に関する再構成系を構築し分子機構を解析した。

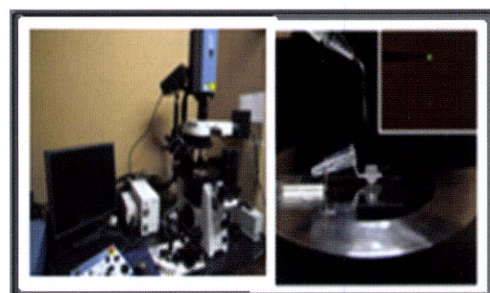
(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた実験のため該当しない。

C. 研究結果

正常型 PrP とミトコンドリアによる神経細胞死には、細胞内のプロテアソーム、14-3-3 蛋白質、ミトコンドリア内膜上の電

子伝達系酵素が直接関わることを明らかにした。さらに、生細胞イメージングにより、正常型 PrP の切断にカルパインが関与することを明らかにした。また、神経細胞死研究の過程において、生細胞から見たままの目的物を夾雑物なく単離回収可能にする生体分子単離システムの構築に成功した(下図；特願2008-159272)。



D. 考察

これらの成果はこれまで不明であった正常型 PrP の生理機能のひとつを明らかにするとともに、正常型 PrP が関与する神経細胞死機構について明確にしたものであり、プリオン病の治療法・予防法への根本対策が検討可能になると期待される。

E. 結 論

[参考文献]

- 1) Hachiya N, Alam R, Sakasegawa Y, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins. *Embo J* 12(4) : 1579-1586, 1993
- 2) Hachiya N, Komiya T, Alam R, Iwahashi J, Sakaguchi M, Omura T, Mihara K. MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *Embo J* 13(21) : 5146-5154, 1994
- 3) Hachiya N, Mihara K, Suda K, Horst M, Schatz G, Lithgow T. Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature* 376(6542) : 705-709, 1995
- 4) Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neurosci Lett* 374(2) : 98-103, 2005
- 5) Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 327(3) : 894-899, 2005

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Omi K, Hachiya NS, Tanaka M, Tokunaga K, Kaneko K. 14-3-3zeta is indispensable for aggregate formation of polyglutamine-expanded huntingtin protein. *Neurosci Lett* 431 : 45-50, 2008
- 2) Hachiya NS, Kozuka Y, Kaneko K. Mechanical stress and formation of protein aggregates in neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses* 70(5) : 1034-1037, 2008
- 3) Ogasawara D, Hachiya NS, Kaneko K, Sode K, Ikebukuro K. Detection system based on the conformational change in an aptamer and its application to simple bound/free separation. *Biosens Bioelectron* 24(5) : 1372-1376, 2009
- 4) Hachiya N, Komata Y, Harguem S, Nishijima K, Kaneko K. Possible involvement of calpain-like activity in normal processing cellular prion protein, *Neuroscience Letters*, 2011, (in press)
- 5) 八谷如美, 金子清俊. プリオン病. アルツハイマー病 - 基礎研究から予防・治療の新しいパラダイム - Vol. 66, 平井俊策 ed. 日本臨床社(東京) 360-365, 2008
- 6) 金子清俊. ウシ海綿状脳症. 「蛋白質 核酸 酵素」増刊号「キーワード: 蛋白質の一生」 Vol.53, 遠藤斗志也 ed. 共立出版(東京), 912, 2008
- 7) 金子清俊. Prusiner. *Clinical Neuroscience* 27 : 830, 2009
- 8) 八谷如美, 金子清俊. 正常プリオン蛋白とその機能, プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 金原出版 22-28, 2010
- 9) 金子清俊. その他の認知症 7) 金子清俊, その他の認知症 7) プリオン病と認知症. 認知症治療マニュアル, 神経内科 72 :

435-439, 2010

- 10) 八谷如美, 金子清俊. クロイツフェルト・ヤコブ病. 今日の精神疾患治療指針, 医学書院 2011(印刷中)
- 11) 八谷如美, 金子清俊. プリオン. 生化学事典, 朝倉書店 2011(印刷中)

2. 学会発表

- 1) 八谷如美. 細胞質/ミトコンドリア型 PrPC による神経細胞死機構. 日本生化学会第 82 回大会シンポジウム招待講演, 神戸, 2009.10.21-24
- 2) Harguem S, 小俣結子, 今川美登里, 八谷如美, 金子清俊. PrPC の分子内プロセシングにはカルパイン様のプロテアーゼが関与している. プリオン研究会, 蔵王, 2009.8.29-30
- 3) 西島佳奈, 八谷如美, 金子清俊. 細胞質/ミトコンドリア PrPC 依存性の神経細胞死機構. 2009 年プリオン研究会, 蔵王, 2009.8.29-30
- 4) 西島佳奈, 今川 文, 八谷如美, 金子清俊. 蛋白質解きほぐし活性を持つ Aip2p 多量体・Unfoldin の多量体形成機構について. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009.10.21-24
- 5) 八谷如美, 西島佳奈, 小俣結子, 金子清俊. 生体分子を単離可能なレーザーマイクロダイセクションシステムの開発. 第 83 回日本生化学会大会, 神戸, 2010.12.7-10
- 6) 西島佳奈, 小俣結子, 八谷如美, 金子清俊. 正常型プリオン蛋白質によるミトコンドリアの機能不全. 第 83 回日本生化学会大会, 神戸, 2010.12.7-10
- 7) 小俣結子, 西島佳奈, 八谷如美, 金子清俊. 蛋白質解きほぐし因子アンフォルジンによるプリオン蛋白質凝集体の可溶化. 第 83 回日本生化学会大会, 神戸, 2010.12.7-10
- 8) Hachiya N, Nishijima K, Kozuka Y, Kaneko K. Activation of a cryptic pathway for PrPC-dependent neuronal cell death, Tokyo, 2010.11.11-12
- 9) 八谷如美. 立毛筋のしくみ. 日テレニュース 24, 東京, 2010.1.11
- 10) 八谷如美. アンフォルジンの構造と機能. 東京薬科大学生命物理化学研究室セミナー, 東京, 2010.6.12
- 11) プリオン蛋白質の合成不良と疾患形成の分子機構. 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 2010.9. 17-18
- 12) Hachiya N, Nishijima K, Kaneko K. Application of a novel protein-unfolding factor, Unfoldin, to the detection and destruction of pathogens. The EMBO meeting, Barcelona, 2010.9.4-7
- 13) Hachiya N, Nishijima K, Komata Y, Kozuka Y, Kaneko K. Identification and characterization of cryptic neurotoxic signal of PrP. Sapporo, 2010.7.24-25
- 14) Nishijima K, Komata Y, Kaneko K, Hachiya N. Application of protein-unfolding chaperone, Unfoldin/Oligomeric Aip2p to the detection and destruction of aggregated PrP, Sapporo, 2010.7.24-25
- 15) Hachiya N, Nishijima K, Kaneko K. Application of a novel protein-unfolding factor, Unfoldin, to the detection and destruction of pathogens, the EMBO meeting, Barcelona, 2010.9.4-7
- 16) Hachiya N. Activation of a cryptic pathway for PrPC-dependent neuronal cell death, PRION JAPAN & CANADA, Tokyo, 2010.11.11-12

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特願 2008-159272

生細胞、生細胞内の構造物等の単離および
採取方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン病における酸化ストレス関与に関する研究

研究分担者：作道 章一 琉球大学医学部保健学科生体代謝

研究協力者：小野寺 節 東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫

研究協力者：生田 和良 大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫

研究要旨

これまでに我々はプリオン蛋白質(PrP)遺伝子欠損神経細胞株を用いて、正常型PrP(PrP^C)が酸化ストレスの制御に関わることを報告してきた。プリオン感染時の脳内では異常型PrP(PrP^{Sc})の増加に連動してPrP^Cが減少することから、脳が酸化ストレス亢進状態にあると考えられている。そこで、本研究では、グリアおよびマクロファージ由来のPrP遺伝子欠損細胞株を作製し、これらの細胞種においてもPrP^Cが抗酸化ストレス制御に関わっているかを調べるとともに、マウスへのプリオン感染によって脳内の酸化ストレスが実際に亢進しているのかを、酸化の標的分子となるDNA、脂質、ならびに蛋白質について、酸化的ダメージの痕跡を免疫ブロットおよび免疫組織化学的解析によって解析することで検証した。結果、いずれの生体分子も、プリオン感染初期より経時的に酸化的ダメージが増加していることが明らかとなった。これらの結果から、PrP^Cは広範な細胞種において抗酸化ストレス因子として機能するが、プリオン感染時にはその機能破綻により、脳が酸化ストレスに曝されることが明らかとなった。

A. 研究目的

これまでに我々はPrP遺伝子欠損マウス由来不死化神経細胞株(HpL)を樹立し、PrP遺伝子発現と抗酸化ストレス活性が相関することを示してきた¹⁾。さらに、プリオン感染時の脳内ではPrP^{Sc}の増加とPrP^Cの減少が生じていることが示されつつあり、PrP^C欠乏による抗酸化能低下とPrP^{Sc}蓄積による酸化ストレス増大が起きている可能性が考えられた。そこで、本研究では、神経細胞以外の細胞種においてもPrP^Cが抗酸化ストレス制御に関わるのかを調べるとともに、プリオン感染マウス脳の酸化ストレス動態の解析から、プリオン病発症メカニズムにおける酸化ストレス代謝の関与について検討を行った。

B. 研究方法

PrP遺伝子欠損グリア細胞株、マクロファージ細胞株を新たに作製し、血清除去による細胞死の程度をPrP発現細胞と非発現細胞において比較した。また、プリオン感染マウス脳について、ウエスタンブロッティングによる経時的解析と免疫組織化学染色による組織局在検索を行った。

(倫理面への配慮)

琉球大学医学部病原体等安全管理委員会、動物実験委員会の規定に従って行った。

C. 研究結果

PrP^Cが広範な細胞種において抗酸化ストレス制御に関わること(図1)、プリオン感染による脳内の酸化的損傷が観察された(図2)。

D. 考 察

Pr^{PC} は広範な細胞種において抗酸化ストレスに働くがプリオン感染時には酸化ストレス代謝の破綻が生じていることが示唆された。

E. 結 論

プリオン病の病態発現には脳内の酸化ストレス動態変化が関連していることが考えられる。

[参考文献]

1) Sakudo A, Onodera T, Suganuma Y, Kobayashi T, Saeki K, Ikuta K. Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini-Rev Med Chem* 6 ; 589-601, 2006

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

1) 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

2) Hosokawa T, Ono F, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Zanusso G, Takahashi H, Sata T, Sakudo A, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Yoshikawa Y, Onodera T. Distinct immunohistochemical localization in Kuru plaques using novel anti-prion protein antibodies. *Microbiol Immunol* 52 : 25-29, 2008

3) Hosokawa T, Tsuchiya K, Sato I, Takeyama N, Ueda S, Tagawa Y, Kimura KM, Nakamura I, Wu G,

Sakudo A, Casalone C, Mazza M, Caramelli M, Takahashi H, Sata T, Sugiura K, Baj A, Toniolo A, Onodera T. A monoclonal antibody(1D12) defines novel distribution patterns of prion protein(PrP) as granules in nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 366 : 657-663, 2008

4) Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, Sakudo A, Nakajima K, Ano Y, Sugiura K, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T. Cellular prion protein prevents brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice. *Arch Virol* 153 : 1007-1012, 2008

5) Sakudo A, Onodera T, Ikuta K. PrP^{Sc} level and incubation time in a transgenic mouse model expressing Borna disease virus phosphoprotein after intracerebral prion infection. *Neurosci Lett* 431 : 81-85, 2008

6) Sakudo A, Ikuta K. Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. *Curr Med Chem* 16 : 380-389, 2009

7) Ano Y, Sakudo A, Uraki R, Sato Y, Kono J, Sugiura K, Yokoyama T, Itohara S, Nakayama H, Yukawa M, Onodera T. Enhanced enteric invasion of scrapie agents into the villous columnar epithelium via maternal immunoglobulin. *Int J Mol Med* 26 : 845-851, 2010

8) Uraki R, Sakudo A, Ando S, Kitani H, Onodera T. Enhancement of phagocytotic activity by prion protein in PrP-deficient macrophage cells. *Int J Mol Med* 26 : 527-532, 2010

9) Sakudo A, Xue G, Kawashita N, Ano Y, Takagi T, Shintani H, Tanaka Y, Onodera T, Ikuta K. Structure of the

prion protein and its gene : an analysis using bioinformatics and computer simulation. *Curr Protein Pept Sci* 11 : 166-179, 2010

- 10) 作道章一, 小野寺 節. 慢性消耗病とその他の動物プリオン病. In : 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」・編. プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 東京, 金原出版 235-239, 2010
- 11) 作道章一. プリオン病とプリオン不活化法の一般知識. *防菌防黴* 38 : 149-153, 2010
- 12) Sakudo A, Onodera T. Tissue- and cell type-specific modification of prion protein (PrP)-like protein Doppel, which affects PrP endoproteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 404 : 523-527, 2011
- 13) Sakudo A, Ano Y, Onodera T, Nitta K, Shintani H, Ikuta K, Tanaka Y. Fundamentals of prions and their inactivation. *Int J Mol Med* (in press)

2. 学会発表

- 1) 作道章一, 阿野泰久, 小林孝徳, 小野寺節, 生田和良. 可視・近赤外分光法によるマウススクレイピー感染病態解析. 第146回日本獣医学会学術集会, 宮崎, 2008.9.24-26
- 2) 阿野泰久, 作道章一, 梶村佳史, 生田和良, 小野寺 節. スクレイピー感染マウス脳における酸化ストレス障害. 第147回日本獣医学会学術集会, 栃木, 2009.4.2-4
- 3) Ano Y, Sakudo A, He XJ, Sato Y, Yukawa M, Ikuta K, Yokoyama T,

Nakayama H, Onodera T. DNA damage through oxidative stresses in the prion-infected mouse brain. The 14th International Congress of Virology, Istanbul, Turkey, 2008.8.10-15

- 4) Ano Y, Nakayama H, Sato Y, Sakudo A, Manabe N, Yukawa M, Onodera T. Uptake of amyloid protein in the murine and bovine intestines before and after weaning : a model for the enteric invasion of infectious prion protein. *Prion* 2008, Madrid, 2008.10.8-10
- 5) 作道章一. 正常型プリオン蛋白質の機能解析. 第149回日本獣医学会学術集会, 東京, 2010.3.26-28
- 6) 作道章一. プリオン蛋白質遺伝子欠損細胞を用いた正常型プリオン蛋白質の機能解析. 第146回琉球医学会例会, 沖縄, 2010.4.20
- 7) 作道章一, 阿野泰久, 小野寺 節, 生田和良, 田中康春. プリオン感染時の脳内酸化ストレス動態解析. 第150回日本獣医学会学術集会, 帯広, 2010.9.16-18
- 8) 作道章一, 田中康春. プリオン感染に伴う脳内酸化ストレス動態変化. 第148回琉球医学会例会, 沖縄, 2010.10.19

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

3. その他

なし

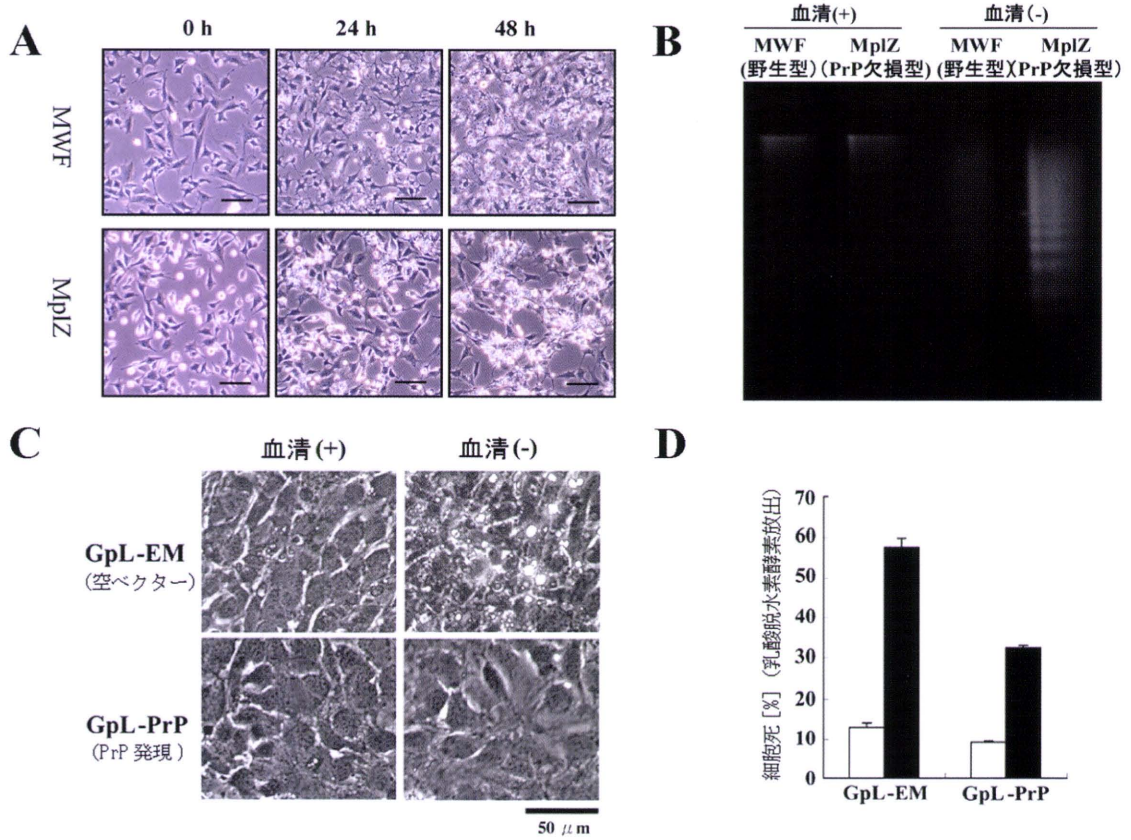


図1 PrPはグリア(GpL)やマクロファージ(MplZ)のいずれにおいても生存維持に寄与している

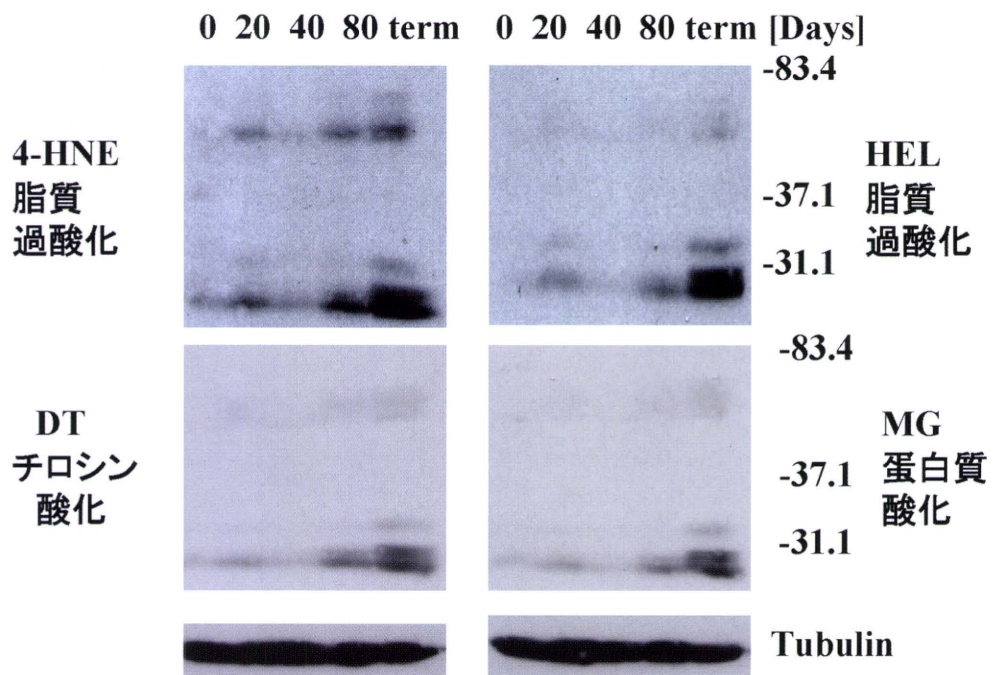


図2 プリオン感染マウス脳の酸化ストレス動態

正常プリオン蛋白質過剰発現による細胞死の解析

研究分担者：坂口 末廣 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

研究協力者：森 剛志 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

研究協力者：村松 直美 徳島大学疾患酵素学研究センター神経変性疾患研究部門

研究要旨

我々は、正常プリオン蛋白質(PrP^C)を HEK293T 細胞に過剰発現させると、アポトーシスを引き起こすことを見出した。しかし、アポトーシスマーカーであるカスパーゼ 3、Bax、Bcl-2、Bcl-X_L、リン酸化 p53 の変化は認められず、オートファジーマーカーである LC3 II の発現が上昇していた。LC3 II の活性化はプリオン感染細胞やプリオン感染マウス脳でも認められた。これらの結果は、PrP^C の過剰発現はプリオンと同様にオートファジーによる細胞死をもたらす可能性を示した。

A. 研究目的

我々は、ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞に正常プリオン蛋白質(PrP^C)を過剰発現させると、顕著なアポトーシスによる細胞死が誘導されることを見出した。この結果は、PrP^C の過剰発現が異常プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の過剰産生と同様な細胞死シグナルを産生している可能性を示した。本研究では、PrP^C 過剰発現による細胞死について解析した。

B. 研究方法

全長 PrP^C 及び変異 PrP の発現ベクターを HEK293T 細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションし、48 時間後に生細胞数をカウントし、細胞毒性を評価した。ウェスタンブロッティングは常法に従って行った。

(倫理面への配慮)

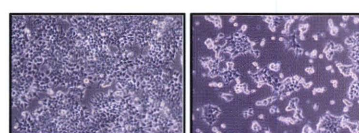
本研究は、関連法令および大学内規定を遵守して実施した。

C. 研究結果(図表を 1~2 点添付)

PrP^C 発現ベクターを HEK293T 細胞にト

ランスフェクションすると、コントロールベクターと比べて、著明な細胞死が認められた(図)。また、この細胞死には OR 領域が重要な役割を担っていることが分かった。これらの細胞は、蛍光標識したアネキシン V に陽性を示したことから、アポトーシスを起こしていることが分かった。また、カスパーゼ 3、Bax、Bcl-2、Bcl-X_L、リン酸化 p53) は変化していなく、LC3 II の発現が上昇していた。

(a) vehicle (b) PrP



D. 考察

我々は、HEK293T 細胞に PrP^C を過剰発現させると、オートファジーが活性化され、またアポトーシスが誘導されることを見出した。プリオン病では、PrP^C が PrP^{Sc} へと構成的に変換し、PrP^{Sc} が過剰に産生される。従って、PrP^C の過剰発現は PrP^{Sc} の過剰産生による細胞死と同様なメカニズムを介して起こっている可能性を示唆している。

E. 結 論

PrP^C の過剰発現はプリオンと同様なメカニズムでオートファジーを活性化させ神経細胞死をもたらす可能性が考えられた。

F. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) 森 剛志, 坂口末廣. プリオン病. *Clinical Neuroscience* 28(8) : 906-908, 2010
- 2) 坂口末廣. プリオン蛋白異常化と伝達・進行のメカニズム. In: 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」・編. プリオン病と遅発性ウイルス感染症, 東京, 金原出版株式会社 37-43, 2010
- 3) Sakaguchi S, Ishibashi D, Matsuda H. Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 19(7) : 907-917, 2009
- 4) Sakaguchi S : Prospects for Preventative Vaccines against Prion Diseases. *Protein and Peptide Letters* 16(3) : 260-270, 2009
- 5) 坂口末廣. プリオン病と治療戦略の最近の動向. *BRAIN and NERVE* 61 : 929-938, 2009
- 6) Sakaguchi S. Antagonistic roles of the N-terminal domain of prion protein to doppel. *Prion* 2(3) : 107-111, 2008
- 7) Yoshikawa D, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Okimura N, Yamaguchi Y, Mori T, Miyata H, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S. Dominant-negative effects of the amino-terminal half of prion protein on neurotoxicity of PrP-like protein/doppel in mice. *Journal of Biological Chemistry* 283(35) :

24202-24211, 2008

- 8) Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, Sakudo A, Nakajima K, Ano Y, Sugiura K, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T. Cellular prion protein prevents brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice. *Archives of Virology* 153(6) : 1007-1012, 2008

2. 学会発表

- 1) 森 剛志, 村松直美, 犬伏祥子, 山口仁孝, 坂口末廣. プリオン蛋白の過剰発現は細胞を誘導する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, あわぎんホール(徳島), 2010.11.7-9
- 2) 村松直美, 森 剛志, 山口仁孝, 藤田浩司, 坂口末廣. 培養細胞を用いたプリオンの細胞死誘導のメカニズム. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, あわぎんホール(徳島), 2010.11.7-9
- 3) 村松直美, 森 剛志, 山口仁孝, 藤田浩司, 坂口末廣. A prion protein with familial mutation, PrP-Y145Stop, induces cell death through G2 cell cycle arrest. 第 33 回に本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド(神戸), 2010.12.7-10
- 4) 森 剛志, 村松直美, 犬伏祥子, 山口仁孝, 矢野雅司, 藤田浩司, 坂口末廣. プリオン蛋白過剰発現誘導性細胞死の分子機構. 第 33 回に本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド(神戸), 2010.12.7-10
- 5) 森 剛志, 松田真美, 村松直美, 山口仁孝, 藤田浩司, 坂口末廣. プリオン蛋白過剰発現による細胞死メカニズムの解析. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸国際会議場(神戸), 2009.10.21-24
- 6) 村松直美, 森 剛志, 山口仁孝, 藤田浩司,

- 坂口末廣. 遺伝性プリオン病 Y145Stop 変異における細胞毒性の検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 都師センターホテル(東京), 2009.10.25-27
- 7) 村松直美, 森 剛志, 山口仁孝, 藤田浩司, 坂口末廣. Enhanced toxicity of a hereditary prion mutation by proteasomal inhibitors : Implication of proteasomal dysfunction in the pathogenesis of prion diseases. 第 31 回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜(横浜). 2009.12.9-12
- 8) 坂口末廣. シンポジウム「急性脳炎・脳症」: プリオン病におけるプリオン蛋白の役割. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 岡山コンベンションセンター, 2008.10.26-28
- 9) 坂口末廣, 「なにをどれだけ食べるべきか?」ー栄養素・食品の機能と安全性の科学ー: タンパク質・プリオン. 日本農芸化学会中四国支部第 11 回市民フォーラム/徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部市民講座, 徳島大学蔵本キャンパス臨床第 2 講堂, 2008.12.6
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

プリオンの伝達性に関する研究

研究分担者：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

プリオン病の感染、発症のメカニズムは明らかにはされていない。プリオン病の様態は一様ではなく、原因不明の孤発性プリオン病、遺伝性(家族性)プリオン病、感染(伝達)によるプリオン病など様々である。このプロジェクトでは、プリオンの伝達メカニズムを明らかにするために遺伝子改変モデルマウスを用いて、ヒトプリオン病の伝達試験による解析を行った。まず、ヒトの遺伝性プリオン病の一つであるゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)のモデルマウスの作製と解析を行った。その結果、GSSモデルマウスは自然発症し、異常なプリオン蛋白質の蓄積を認めた。その異常なプリオン蛋白質をモデルマウスに継代接種することにより発症までの期間が著しく減少した。マウス/ヒトキメラ型プリオン蛋白質を発現する遺伝子導入マウスは、孤発性 CJD 由来のプリオン接種により伝達が容易に成立するが、内因性のマウス野生型のプリオン蛋白質の存在下では潜伏期間が著しく延長した。これは導入ヒト型遺伝子産物のプリオン変換に際してマウス内因性の正常プリオン蛋白質は抑制的に作用するが、同時に、それ自身のプリオンへの変換が促進されることによると考えられた。BSE のヒトへの感染評価モデルとしてヒトプリオン蛋白質を過剰発現するヒト化マウスを樹立し、伝達試験を行った。その結果、日本の非定型 BSE は従来型 BSE と同様にヒトに感染する可能性のあることが示された。

A. 研究目的

プリオン病は伝達性の神経変性疾患であり、人獣共通感染症である。プリオン病が伝達(=感染)するか否かについては、実験動物への伝達試験が唯一の手段である。ヒトプリオンの伝達試験により、プリオン蛋白質の異常化のプロセスに迫ることを目的に、ヒト型プリオン蛋白質遺伝子改変マウスを作製して、伝達試験を行った。また、日本で発見された非定型 BSE のヒトに対する感染性についての評価を行った。

B. 研究方法

(1) ヒト遺伝性プリオン病(ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病：GSS)モ

デルマウスの解析

モデルマウス：ヒト GSS のプリオン蛋白質遺伝子変異部位である codon 102 のアミノ酸 に相当するマウスプリオン蛋白質遺伝子の codon101 を Proline から Leucine に置換したトランスジェニックマウス(Tg-MoP101L#4)。
(2) ヒト化モデルマウスの内因性プリオン蛋白質の異常化について

Tg モデルマウス：PrP exon 3 の ORF の Sma I から BstEII 間をヒト型のプリオンタンパク遺伝子に換えたヒト/マウスキメラ型。伝達試験はヒト孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(sCJD)由来の 10%脳乳剤 20 μ l をマウス脳内に接種した。

(3) ヒト化マウスに対する BSE の伝達試験

ヒトのプリオン蛋白質遺伝子の多型に合わせてコドン 129 メチオニン(M)もしくはバリン(V)のヒト型プリオン蛋白質遺伝子ノックイン(Ki)マウスとトランスジェニック(Tg)マウスを用いた。Ki マウス と Tg マウスをそれぞれ交配し、ヒトプリオン蛋白質を過剰発現するヒト化マウス(Ki+TgHu129MM、Ki+TgHu129VV)を樹立し、BSE の伝達試験を行った。

(倫理面への配慮)

「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に則り、動物衛生研究所の動物実験委員会により審査承認されている。(承認番号 第 07-10号、第 08-043号)

C. 研究結果

1. GSS のモデルマウスであるプリオン蛋白質遺伝子のコドン 101 をプロリンからロイシンに置換したトランスジェニックマウスが自然発症し、免疫組織染色プラーク型の異常プリオン蛋白質の蓄積が認められた。さらに、自然発症マウス脳の 10%ホモジネートを作製し、同じ系統の 8 週齢のトランスジェニックマウスの脳内に接種したところ、マウスプリオン病の症状を呈した。自然発症モデルマウスの脳内に蓄積した異常プリオン蛋白質は、継代接種により、GSS 自然発症モデルマウスのプリオン蛋白質異常化の促進因子として働くことが考えられる(H20)。
2. マウスの内因性の正常プリオン蛋白質(MoPrP^C)と導入ヒト型遺伝子産物を同時に発現するマウスでは、潜伏期間が著しく延長した。このことは、マウスの内因性プリオン蛋白質は発現量に応じて導入遺伝子産物のヒト型プリオンへの変換を抑制した。一方、このマウスでは導入ヒト型遺伝子産物のプリオン変換と同時に、難変

換性である内因性マウス野生型プリオン蛋白質の変換が促進されていた(H21)。

3. C-BSE、L-BSE、H-BSE のうち C-BSE と L-BSE のみが Ki+TgHu129MM に伝達出来た。潜伏期間はそれぞれ C-BSE が平均 897 日、L-BSE が平均 713 日であった。このことから、C-BSE も L-BSE もコドン 129 がメチオニン型のヒトに伝達し易いことが示唆された(H22)。

D. 考察

GSS モデルの遺伝子改変マウスが自然発症し、2 種類の病理変化が認められたが、遺伝子がランダムに導入されるトランスジェニックマウスであることから、遺伝子の発現量に差があることも考えられる。

プリオンに変換されやすいプリオン蛋白質が難変換プリオン蛋白質と共存することで変換抑制を受ける現象は、異分子の干渉作用やドミナントネガティブ効果として説明されている。これとは反対に変換されやすいプリオン蛋白質がプリオンに変換されることにより難変換プリオンも変換が促進される現象を見いだした。今のところこの変換に関わるこの興味深い現象のメカニズムは不明である。

BSE のヒトへの感染は C-BSE 由来とされている vCJD が報告されているが、日本の L-BSE も人への感染が起りうることが示された。しかも、ヒト化マウスへの伝達試験の潜伏期間から考えてヒトに対する感受性は C-BSE と同等か、もしくはそれ以上に高いと考えられた。

E. 結論

ヒトの GSS の変異遺伝子を持ったモデルマウスが自然発症した。ヒト型プリオン蛋白質遺伝子改変マウスの内因性プリオン蛋白質は、プリオン変換に抑制的に働きながら、自信が異常化されることが判明した。日本の非定型 BSE は従来型 BSE と同様にヒトに感染

する可能性があることが示された。

[参考文献]

- 1) Manson JC, et al. A single amino acid alteration (101L) introduced into murine PrP dramatically alters incubation time of transmissible spongiform encephalopathy 18 : 6855-6864, 1999
 - 2) Barron RM, et al. Changing a single amino acid in the N-terminus of murine PrP alters TSE incubation time across three species barriers. The EMBO Journal 20 : 5070-5078, 2001
 - 3) Hsiao KK et al. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. Science 250 : 1587-1590, 1990
 - 4) Kitamoto, T., Mohri, S., Ironside, J. W., Miyoshi, I., et al. : Follicular dendritic cell of the knock-in mouse provides a new bioassay for human prions. BBRC 294 : 280-286, 2002
 - 5) Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. Cell 83 : 79-90, 1995
 - 6) Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, et al. Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 13079-13084, 2002
 - 7) Béringue V, Herzog L, Reine F, et al. Transmission of Atypical Bovine Prions to Mice Transgenic for Human Prion Protein. Emerging Infectious Diseases 14 : 1898-1901, 2008
 - 8) Kong Q, Zheng M, Casalone C. et al. Evaluation of the Human Transmission Risk of an Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy Prion Strain. J.Virol 82 : 3697-3701, 2008
- F. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)
1. 論文発表
 - 1) Yokoyama T, Mohri S. Prion diseases and emerging prion diseases. Current Medicinal Chemistry 15 : 912-915, 2008
 - 2) Iwamaru Y, et al. Lactoferrin induces cell surface retention of prion protein and inhibits prion accumulation. Journal of Neurochemistry 107 : 636-646, 2008
 - 3) Masujin K, et al. Biological and biochemical characterization of L-type BSE prion detected in Japanese beef cattle. Prion 2 : 123-128, 2008
 - 4) Hizume M, Kobayashi A, Teruya K, Ohashi H, Ironside J W, Mohri S, and Kitamoto T. Human prion protein (PrP) 219K is converted to PrP^{Sc} but shows heterozygous inhibition in variant Creutzfeldt-Jakob disease infection. JBC 284(6) : 3603-3609, 2009
 - 5) Yokoyama T, et al. Alteration of the biological and biochemical characteristics of bovine spongiform encephalopathy prions during interspecies transmission in transgenic mice models. J.Gen.Virol 90 : 261-268, 2009
 - 6) Kobayashi A, Asano M, Mohri S, Kitamoto T : A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection. Neuropathology 29 : 619-624, 2009
 - 7) Kobayashi A, Hizume M, Teruya K, Mohri S, Kitamoto T : Heterozygous

inhibition in prion infection—The stone fence model. *Prion* 3 : 27-30, 2009

- 8) Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, Kitamoto T. Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection. *J Virol* 84(7) : 3230-3238, 2010

2. 学会発表

- 1) 毛利資郎. 「新しいプリオンによる牛海綿状脳症(非定型 BSE)」第 56 回日本実験動物学会総会シンポジウム. 大宮市. 2009.5.16

- 2) 毛利資郎. 「動物モデルを用いたプリオンの伝播研究」プリオン研究会 2009. 宮城県蔵王町. 2009.8.30

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プリオン感染におけるトレースバック現象の実験的証明

研究分担者 小林 篤史 東北大学大学院医学系研究科 病態神経学分野
研究分担者 竹内 敦子 東北大学大学院医学系研究科 病態神経学分野
研究分担者 毛利 資郎 動物衛生研究所 プリオン病研究センター
研究協力者 北本 哲之 東北大学大学院医学系研究科 病態神経学分野

研究要旨

本研究では、プリオンには PrP のアミノ酸配列を越えた感染の後も元の配列の PrP を異常化する能力があることが明らかとなった。その由来をたどる(トレースバック)方向への感染実験を行うことで感染性プリオン病の由来を同定できる可能性が示唆されたのである。そこで我々は、孤発性 CJD-VV2 プリオンを用いてこのトレースバック現象を実験的に証明することを目的とした。孤発性 CJD-VV2 プリオンを接種した 129M/M マウスは長い潜伏期間の後に発病し、脳内には中間タイプの PrP^{Sc} が蓄積していた。このマウスの脳ホモジネートを継代接種すると、遺伝子型が異なるにもかかわらず 129V/V マウスの方が 129M/M マウスより早く発病した。そして、これらの 129V/V マウス脳に蓄積する PrP^{Sc} は中間タイプからタイプ 2 へと戻っていた。これらの結果から、プリオンはアミノ酸配列を越えた感染の後でも元のプリオンの記憶を保持し、元のアミノ酸配列の PrP を異常化させやすい能力を保持していることが明らかになった。

A. 研究目的

我々はこれまでの研究において、プリオンが PrP のアミノ酸配列を超えた感染の後も元の配列の PrP を異常化させやすいという現象(トレースバック現象)を持つことを明らかにした。この現象を利用することで、感染性由来プリオン病の由来を同定できる可能性が示唆されたが、トレースバック現象はこれまで実験的には証明されていない。そこで、孤発性 CJD-VV2 プリオンを用いてトレースバック現象が感染源特定的手段となることを証明する。また新たな試みとして、Protein Misfolding Cyclic Amplification(以下 PMCA)法を用いたヒトプリオンの *in vitro* 増幅についても検討を行った。

B. 研究方法

- ① 129M/M のヒト PrP を発現するノックインマウスに孤発性 CJD-VV2 を脳内接種した。この 129M/M ヒト型マウスの脳ホモジネートをさらに 129M/M あるいは 129V/V ヒト型マウスに脳内接種し、トレースバック現象を観察した。潜伏期間、脳内の PrP 沈着パターン、PrP^{Sc} のタイプを免疫組織化学及びウエスタンブロットによって解析した。
- ② 293F 細胞(ヒト胎児腎臓細胞由来)にヒト PrP^C (129M)を一過性に発現させた細胞破砕液を基質として用い、CJD プリオンから PMCA 法によってプロテアーゼ抵抗性 PrP (PrP^{res})を産生させ、proteinase K 処理の後、ウエスタンブロット法により PrP^{res} を検出した。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とした研究に関しては、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の規定に従い研究を行った。また動物実験に関しては動物衛生研究所動物実験に関する指針を遵守した。

C. 研究結果

- ① 孤発性 CJD-VV2 プリオンを接種された 129M/M ヒト型マウスを 129M/M 及び 129V/V ヒト型マウスにそれぞれ継代接種すると、遺伝子型が異なるにも関わらず、元の遺伝子型と同じ 129V/V ヒト型マウスに強い感染性を示すことが明らかになった。さらに孤発性 CJD-VV2 プリオンが 129M/M ヒト型マウスに感染すると、PrP 沈着パターン及び PrP^{Sc} タイプが変化するが、そのプリオンが元の遺伝子型の 129V/V ヒト型マウスに戻れば、それらの性質も元に戻ることが分かった。
- ② PMCA 反応により、変異型 CJD 脳由来プリオンはマルチラウンド PMCA 法により効率よく増幅され、感染脳ホモジネートの 10^{-9} ないし 10^{-10} 希釈から PrP^{res} が検出可能であったが、孤発性 CJD 脳由来プリオンの増幅効率は変異型 CJD 脳由来プリオンよりも顕著に低かった。また孤発性 CJD-MM2 は今回の PMCA 条件下では全く増幅せず、一方孤発性 CJD-MV2 由来プリオンは基質の遺伝子型が 129V の時のみ顕著に増幅された。

D. 考 察

- ① トレースバック実験の結果、PrP のアミノ酸配列を超えた感染では、新たな性質をもつプリオン株が生み出されるが、元のアミノ酸配列の宿主に感染すれば元の性質のプリオンに戻り、強い感染性が引き起こされることが明らかとなった。新たな PrP アミノ酸配列に対して、プリオンの立体構

造の適合と多様な PrP^{Sc} 分子集団の中から選択が起きることがこのようなトレースバック現象の分子基盤になっているかもしれない。

- ② CJD の PMCA 法によるヒトプリオンの増幅では、タイプ別に増幅効率が大きく異なることが明らかとなったが、これは同時に、タイプ別に適切な PMCA 条件がそれぞれ異なることを示している。今回の PMCA 条件下においては、孤発性 CJD-MV2 は基質の遺伝子型が 129M では増幅されず、129V で顕著に増幅された。この結果により、臨床診断の難しいとされる孤発性 CJD-MV2 において、脳脊髄液や血液中から 129VPrP^C を基質に用いた PMCA を行い PrP^{res} を検出することで、孤発性 CJD-MV2 の確定診断法として応用できる可能性が示唆された。

E. 結 論

- ① トレースバック現象を利用することで、感染性由来プリオン病の由来を同定できる可能性が実験的には証明された。
- ② ヒトプリオンはタイプにより PMCA 法による増幅効率が大きく異なることが明らかとなった。

[参考文献]

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(2008/4/1~2011/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Kobayashi A, et al. Experimental Verification of a Traceback Phenomenon in Prion Infection. *J Virol* 84 : 3230-3238, 2010
- 2) Hizume M, et al. Amino acid conditions

near the GPI anchor attachment site of prion protein for the conversion and the GPI anchoring. *Biochem Biophys Res Commun* 391 : 1681-1686, 2010

- 3) Kobayashi A, et al. A traceback phenomenon can reveal the origin of prion protein. *Neuropathology* 29 : 619-624, 2009
- 4) Hizume M, et al. Human prion protein (PrP) 219K is converted to PrP^{Sc} but shows heterozygous inhibition in variant Creutzfeldt-Jacob disease infection. *J Biol Chem* 284 : 3643-3609, 2009
- 5) Kobayashi A, et al. Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients. *Acta Neuropathol* 116:561-566, 2008

2. 学会発表

- 1) Kobayashi A, et al. Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection. *Asia-Oceania*

Symposium on Prion Diseases, Sapporo, Japan, 2010.7.25

- 2) 小林篤史, 佐久間信行, 北本哲之. ヒト異常型プリオン蛋白タイプ特異的抗体の作製. プリオン研究会, 新潟, 2009.8.29
- 3) 竹内敦子, 山本 幸, 北本哲之, 森田将典. リコンビナント PrPC を用いたヒトプリオンの高効率な in vitro 増幅, 新潟, 2009.8.29
- 4) Takeuchi A, et al. Prion inactivation efficacy of an alkaline cleaner is incomplete, but is superior to sodium hydroxide, and is comparable to sodium dodecyl sulfate. *Prion2008, Madrid, 2008.10.8-10*

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

3. その他

なし